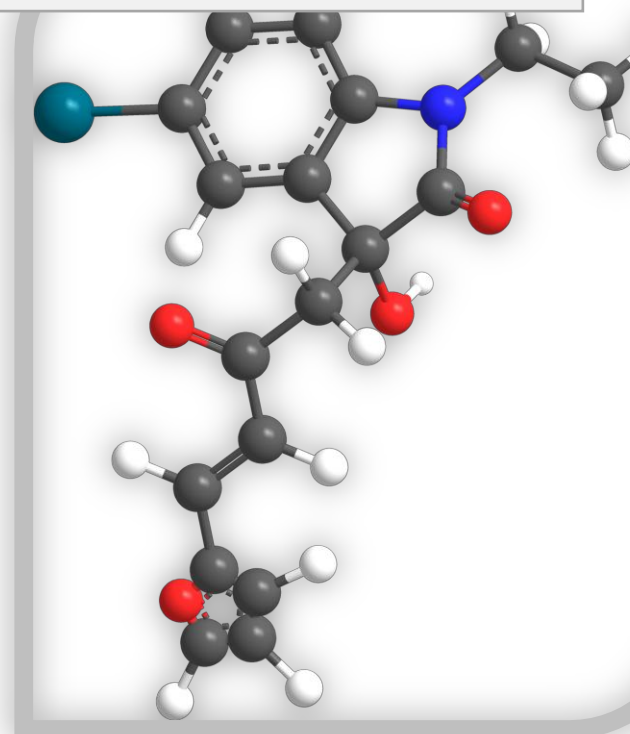




UNIVERSITAT DE VALENCIA

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

**DISEÑO POR TOPOLOGÍA MOLECULAR Y ENSAYOS FARMACOLÓGICOS DE
NUEVOS INHIBIDORES FRENTE A WNT/ β -CATENINA Y PI3K/Akt/mTOR**



Directores:

Mari Carmen Recio Iglesias

Jorge Gálvez Álvarez

Tesis Doctoral

Riccardo Zanni

Valencia, 2015



D. Jorge Gálvez Álvarez Catedrático de Química Física y Dña. M^a del Carmen Recio Iglesias Profesora titular de Farmacología, de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por el Ldo. **Riccardo Zanni**, titulado “**Diseño por Topología molecular y ensayos farmacológicos de nuevos inhibidores frente a Wnt/ β -catenina y PI3K/Akt/mTOR**”, ha sido realizado en los departamentos de Química Física y Farmacología de la Universitat de València, bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Lo que firmamos en Valencia, Diciembre de dos mil quince

Prof.Dr. Jorge Gálvez Álvarez

Prof.Dra. M^a del Carmen Recio Iglesias

A mi hija
A mi mujer
A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Pocas veces a lo largo de la vida se logran retos tan importantes como este. Menos aún se viven años tan intensos como los últimos que he vivido. Por esa razón, quiero aprovechar esta oportunidad para dar las gracias a todos los que de verdad han sido y siguen siendo piezas fundamentales en mi vida.

Empezando por el cambio radical que ha representado el hecho de mudarme a otro país, pasando por el matrimonio con mi querida esposa y finalmente, el regalo más importante de todos, el nacimiento de mi hija Claudia. En muchas ocasiones he pensado que a lo mejor, demasiadas cosas se habían juntado y que quizás no lograría llegar al final del recorrido...Sin embargo, todos estos cambios, estos retos, me han ayudado a madurar y a hacerme más fuerte.

En primer lugar, siento el deber de agradecer a todos mis familiares, mi madre (que siempre ha creído en mí, probablemente la persona que ante cualquier situación no deja de defenderme... *ahhh la mamma!*); a Maurizio por enseñarme que en la vida hay que aprender como apañarse; a mi padre Massimo que en los últimos años ha estado muy cercano a pesar de los km que nos separan; a mi hermana Chiara (una inagotable fuente de energía positiva y mi primera mejor amiga) y a mi esposa María por haber sido siempre mi punto de referencia a lo largo de este proceso, en particular, nunca has dejado de apoyarme en los últimos (muy intensos) años, aguantando como solo tú eres capaz en mis momentos de crisis y reconduciéndome cada vez al camino! Y como no, a mi hija Claudia, quiero darle las gracias más especiales, ya que desde que llegó, me hizo entender lo que de verdad es importante en la vida y lo bonito que es crecer como persona, como hombre y sobretodo, como padre.

A mis directores de Tesis, Mari Carmen y Jorge, que se han prodigado cada día para que todos mis esfuerzos fuesen lo más efectivos posible. Aguantando mis momentos de bajón y guiándome con paciencia en el mundo de la Farmacología y del Diseño de Fármacos por Topología molecular, transmitiéndome la pasión que sienten por sus disciplinas. Especialmente Jorge, quiero agradecerte el apoyo incondicional que me has brindado, sin tí no me hubiera sido posible embarcarme en el apasionante viaje que ha sido mi tesis doctoral. Ahora nos toca seguir luchando para que la Topología molecular siga participando en colaboraciones con empresas, patentes, publicaciones y congresos.

También quiero agradecer a todos los profesores y profesionales que han participado en la realización de esta tesis: Inés Díaz-Laviada, Patrizia Romualdi, Sanzio Candeletti, Ramón García Domenech (además de experto en Topología Molecular, un gran profesor y compañero de excursiones) y por supuesto, a todos los profesores del

departamento de Farmacología y de Química Física que he tenido el gusto de conocer: Rosa, Jose Luis, Salva, Mamen, Lionello, Olga, Facundo, Julián...

A mis amigos de Bologna (Massimiliano, Stefano, Alice, Daniele, Rachele, Gianluca y Mirko) pues a pesar de la distancia, siempre han hecho todo lo posible por apoyarme y sacarme una sonrisa, llegando incluso a “idear” una noche semanal de skype para que me sintiera como en casa.

Un pensamiento muy especial a mi abuelo, que ya no está entre nosotros, pero que ha sido la persona que siempre ha “invertido” en mi formación, creyendo en mis capacidades hasta el último día (espero que estes orgulloso de mí) porque la verdad que sin tu ayuda probablemente ahora no estaría escribiendo estas líneas. Y como no, otro agradecimiento especial a mis otros abuelos, que siempre han sido una segunda familia para mí, donde me he sentido acogido y arropado en las bellas colinas boloñesas.

Por último, a todas las personas que he visto a diario y también han formado parte de esta tesis como el servicio de limpieza y el personal del bar de Farmacia (vosotros sabéis quienes sois).

No me puedo olvidar de mi familia política, Maria José y Jorge, gracias por estar siempre presentes y ¡por apoyarnos en todo!

A todos aquellos olvidados en los párrafos precedentes y que habéis contribuido a que hoy esté aquí: ¡Muchas gracias!

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

ARTÍCULOS

García-Domenech, R., Gálvez-Llompert, M., Zanni, R., Recio, M. C., & Gálvez, J. (2013). QSAR methods for the discovery of new inflammatory bowel disease drugs. *Expert Opin Drug Discov*, 8(8), 933-949.

Zanni, R., Gálvez-Llompert, M., Morell, C., Rodríguez-Henche, N., Díaz-Laviada, I., Recio-Iglesias, M. C., Garcia-Domenech, R., Gálvez, J. (2015). Novel cancer chemotherapy hits by molecular topology: Dual akt and beta-catenin inhibitors. *PLoS ONE*, 10(4), e0124244.

Zanni, R., Gálvez-Llompert, M., Garcia-Domenech, R., Gálvez, J. (2015). Latest advances in molecular topology applications for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 10(9), 945-957.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Giner Ventura, E., Stulz, A., Zanni, R., Giner Pons, R.M., Rios Cañavate, J.L., Recio Iglesias, M.C.(2015). Novel protective effect of an indol derivate on DSS-induced acute colitis in Balb/C mice.XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Farmacología.Valencia (España),2015. Publicado en: *Basis & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 117 (Suppl. 2), 1–47. **Póster.**

ABREVIATURAS

Ac	Absorbancia control
ADME/Tox	Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AKT	Proteína-quinasa B
ALD	Análisis lineal discriminante
ANOVA	Análisis de varianza
AOM	Azoximetano
Ap	Absorbancia problema
APC	Poliposis adenomatosa familiar <i>(Poliposis adenomatosa coli)</i>
AR/RA	Adreno receptor/Receptor androgenico
ARML	Análisis de regresión multilíneal
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>Colección americana de cultivos tipo (American type culture collection)</i>
AUC	Área bajo la curva <i>(Area under the curve)</i>
BAD	Promotor de la muerte asociada a Bcl-2 <i>(Bcl-2-associated death promoter)</i>
Bcl-2	Célula-B CLL/linfoma 2
BSA	Albúmina sérica bovina
CADD	Diseño de fármacos asistido por computadora <i>(Computer-Aided Drug Design)</i>
CAPE	Ácido caféico fenetil ester

ABREVIATURAS

CCR	Cancer colorrectal
CoMFA	Análisis comparativo de campo molecular <i>(Comparative molecular field analysis)</i>
CoMSIA	Análisis comparativo de los índices de similitud molecular <i>(Comparative molecular similarity index analysis)</i>
COX	Ciclooxigenasa
CP	Cáncer de próstata
CRPC	Cáncer de próstata resistente a castración
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco <i>(Dulbecco's modified Eagle médium)</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOI	Densidad óptica integrada
DSS	Dextrano sulfato sódico
Ea	Expectativa de actividad
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEE	Error estándar de estimación
EE.UU.	Estados unidos de América
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
Ei	Expectativa de inactividad
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas <i>(Enzyme-linked immunosorbent assay)</i>
eNOS	Enzima óxido nítrico sintetasas endotelial <i>(Endothelial nitric oxide synthase)</i>
F	Parámetro de Fisher-Snedecor

FBDD	Diseño de fármacos basado en fragmento <i>(Fragment-based drug design)</i>
FD	Función discriminante
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FN	Falsos negativos
FP	Falsos positivos
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
HOCl	Peróxido de hidrógeno en ácido hipocloroso
IAE	Índice de actividad de la enfermedad
IFN	Interferón
IKK	I κ B quinasa
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
ITC	Índices topológicos de carga
IWP	Inhibidor de proteína Wnt (<i>Inhibitor Wnt protein</i>)
LGO	<i>Leave group out</i>
LOO	<i>Leave one out</i>
MD	Dinámica molecular (<i>Molecular dynamics</i>)
MLP	Perceptrón multicapa
MPO	Mieloperoxidasa
mTOR	Proteína-quinasa serina/treonina
mTORC	Subunidad catalítica proteína-quinasa serina/treonina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio
NF κ B	Factor Nuclear κ B

ABREVIATURAS

p	Significación estadística
p53	Antigene tumoral p53 (<i>Cellular tumor antigen p53</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PGs	Prostaglandinas
PI3K	Fosfoinositol-3-quinasa
PKC	Proteína Quinasa-C
PMSF	Fenil metano sulfonil fluoruro (<i>Phenylmethanesulfonylfluoride</i>)
PRESS	Suma de los cuadrados de los residuales
PSA	Antígeno prostático específico
PVDF	Polivinilideno difluoruro
QSAR	Relaciones cuantitativas de estructura-actividad (<i>Quantitative structure–activity relationship</i>)
QSPR	Relaciones Cuantitativas Estructura-Propiedad
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Redes neuronales artificiales
ROC	Característica operativa del receptor (<i>Receiver operating characteristics</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SCIE	Servei Central de Suport a la Investigació Experimental
SD	Desviación estándar (<i>standard deviation</i>)
SDS-PAGE	Detergente aniónico dodecilsulfato sódico
Se	Sensibilidad
SFB	Suero fetal bovino

Sp	Especificidad
STAT	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción
TM	Topología Molecular
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TSA	Terapia supresora de andrógenos
UV	Universitat de Valencia
vHTS	Cribado virtual de alto rendimiento <i>(Virtual high-throughput screening)</i>
VN	Verdaderos negativos
VP	Verdaderos positivos

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	23
I.1. MÉTODOS COMPUTACIONALES APLICADOS AL DISEÑO Y SELECCIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS	23
I.1.1. Enfoque bioinformático (<i>Target identification</i>)	26
I.1.1.1. <i>Structure (Target)-Based Drug Design</i>	27
I.1.1.2. <i>Ligand-Based Drug Design</i>	32
I.1.2. Enfoque químico-informático (identificación y optimización de leads)	35
I.1.2.1. Química combinatoria (<i>Combinatorial chemistry</i>)	36
I.1.2.2. Cribado Virtual (<i>Virtual Screening</i>)	37
I.1.2.3. <i>Virtual High-Troughput Screening (vHTS)</i>	38
I.1.2.4. <i>Data mining</i>	39
I.2. TOPOLOGÍA MOLECULAR	40
I.2.1. Principios: Teoría de Grafos	40
I.2.1.1. Teoría de grafos: ideas clave	42
I.2.1.2. Representación matemática de grafos	49
I.2.1.3. Las moléculas cómo grafos	52
I.2.2. Índices topológicos y topoquímicos	53
I.2.2.1. Índices topológicos	53
I.2.2.2. Índices topoquímicos	65
I.2.3. La Topología Molecular y el diseño de fármacos	66
I.3. INFLAMACIÓN Y CÁNCER	71
I.4. QUIMIOPREVENCIÓN	78
I.5. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/Akt/mTOR	82
I.6. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA	86
I.7. TIPOS DE CÁNCER ASOCIADOS A LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PI3K/Akt/mTOR Y WNT/ β -CATENINA	90
I.7.1. Cáncer de colon	93
I.7.2. Cáncer de próstata	97

II. MATERIAL Y MÉTODOS	103
II.1. OBTENCIÓN DE LOS MODELOS TOPOLÓGICOS	103
II.1.1. Construcción de la base de datos y división de los compuestos entre grupo de entrenamiento y test	104
II.1.2. Cálculo de descriptores moleculares	110
II.1.3. Métodos estadísticos aplicados en la obtención de los modelos	115
II.1.3.1. Análisis lineal discriminante (ALD)	115
II.1.3.2. Análisis de regresión multilinear (ARML)	119
II.1.3.3. Redes de neuronas artificiales (RNAs)	121
II.2. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS	123
II.2.1. Validación interna del modelo	124
II.2.1.1. Validación cruzada	124
II.2.1.2. Test de aleatoriedad de Fischer	126
II.2.1.3. Curvas ROC	127
II.2.2. Validación externa	130
II.3. DIAGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA	131
II.4. CRIBADO VIRTUAL DE BASES DE DATOS	133
II.5. ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	134
II.5.1. Material y reactivos	134
II.5.2. Cultivo celular: línea HT-29	134
II.5.3. Ensayo de proliferación y citotoxicidad	135
II.6. ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	137
II.6.1. Animales de experimentación	137
II.6.2. Inducción de colitis ulcerosa aguda por Dextrano Sulfato Sódico (DSS)	138
II.6.3. Obtención de las muestras	142
II.6.4. Cáncer colorrectal asociado a CU por DSS y Azoximetano (DSS/AOM)	143
II.6.5. Estudio histológico	145

II.6.6. Determinaciones bioquímicas	146
II.6.6.1. Infiltración neutrofílica: medida de la actividad mieloperoxidasa	146
II.6.6.2. Determinación de citocinas por Enzimoimmunoensayo (ELISA)	149
II.6.6.3. Ensayo Western Blot	150
II.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	152
III. RESULTADOS	155
III.1. OBTENCIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS MODELOS TOPOLÓGICOS	155
III.1.1. Modelo 1: Inhibición de Akt por compuestos naturales	155
III.1.2. Modelo 2: Inhibidores de Akt por compuestos de origen comercial	160
III.1.3. Modelo 3: Inhibición de β-catenina por compuestos naturales	164
III.1.4. Modelo 4: Inhibición de β-catenina por compuestos comerciales	168
III.1.5. Modelo 5: Inhibición cuantitativa de Akt por compuestos comerciales	172
III.1.6. Modelo 6: Inhibición cuantitativa de β-catenina por compuestos comerciales	179
III.1.7. Modelo 7: Inhibición de Akt por compuestos comerciales. Modelo no lineal	185
III.1.8. Modelo 8: Inhibición de β-catenina por compuestos comerciales. Modelo no lineal	190
III.2. CRIBADO VIRTUAL DE BASES DE DATOS	195
III.3. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	198
III.3.1. Efecto sobre la proliferación y citotoxicidad	198
III.3.1.1. Línea celular HT-29	198
III.3.1.1. Línea celular PC-3	200
III.3.2. Efecto de los compuestos sobre las proteínas Akt y β-catenina	202
III.3.2.1. Inhibición de Akt	202
III.3.2.2. Inhibición de β -catenina	204
III.3.3. Inmunofluorescencia	206

III.4. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	209
III.4.1. Efecto del inhibidor 4 en un modelo de inducción de colitis ulcerosa aguda por DSS	209
III.4.1.1. Índice de actividad de la enfermedad	209
III.4.1.2. Evaluación macroscópica	212
III.4.1.3. Estudio histológico	214
III.4.1.4. Efecto sobre la actividad MPO	216
III.4.1.5. Efecto sobre la producción de IL-6 en el colon	217
III.4.1.6. Efecto sobre la inducción de COX-2 e iNOS y de la activación del factor de transcripción NF-kB	218
III.4.2. Efecto sobre el cáncer colorrectal asociado a colitis ulcerosa crónica inducida por AOM/DSS	220
IV. DISCUSIÓN	231
V. CONCLUSIONES	259
VI. BIBLIOGRAFÍA	263
VII. ANEXOS	315
ANEXO I. MATERIAL DE LABORATORIO	315
ANEXO II. REACTIVOS	317
ANEXO III. ANTICUERPOS Y KITS	319
ANEXO IV. COMPOSICIÓN DE TAMPONES	320
ANEXO V. INFORMACIÓN ADICIONAL SOBRE LOS MODELOS TOPOLÓGICOS	322
ANEXO VI. AUTORIZACIÓN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	410
VIII. SUMMARY	413
IX. ARTÍCULOS PUBLICADOS	453

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. MÉTODOS COMPUTACIONALES APLICADOS AL DISEÑO Y SELECCIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS

Hoy en día, los métodos computacionales juegan un papel esencial en el proceso de investigación y desarrollo de nuevos fármacos. Distintas herramientas asistidas por ordenador proporcionan una importante ayuda durante todo el proceso de desarrollo de nuevas moléculas activas, desde su identificación al descubrimiento del mecanismo de acción del fármaco, pasando por los ensayos preclínicos y clínicos, hasta la fase final de comercialización (Barril y Luque, 2012). La etapa clave dentro del proceso de descubrimiento de nuevos fármacos sigue siendo la identificación y optimización de compuestos cabeza de serie o *leads* de una manera rápida y eficiente. Los *leads* presentan una actividad farmacológica o biológica terapéuticamente útil, así como un perfil toxicológico y farmacocinético favorable. Una estimación sobre el tiempo y coste invertidos para introducir un nuevo medicamento en el mercado, es de alrededor de 7 a 12 años y 1.200 millones de dólares. Donde, sólo 5 de cada 40.000 compuestos testados *in vivo* con animales llegan a fases de ensayo clínico en humanos, siendo aprobado tan sólo un compuesto de cada cinco. Esto representa una enorme carga en términos de tiempo, dinero y recursos humanos (Kapetanovic, 2008).

Por lo expuesto anteriormente, la industria farmacéutica reorientó sus departamentos de I+D a sabiendas de las ventajas que ofrecen los métodos de descubrimiento de fármacos asistidos por ordenador (*computer-aided drug design-CADD* o métodos *in silico*). Las técnicas CADD se pueden definir, como aquellas "técnicas asistidas por computadora

utilizadas para descubrir, diseñar y optimizar compuestos con estructura y propiedades deseadas" (Gálvez y cols., 2012).

Otra gran ventaja que los métodos *in silico* ofrecen a la industria farmacéutica consiste en que pueden predecir propiedades farmacocinéticas y toxicológicas (ADME/Tox) de los candidatos a fármacos. Por último, la aplicación de estas técnicas CADD permite emplear metodologías de cribado virtual (*virtual screening*), lo que posibilita rastrear millones de moléculas de distintas bases de datos en poco tiempo (Gálvez y cols., 2012).

El empleo actual de las técnicas CADD en distintos ámbitos, no sería posible sin los constantes avances en materia de *hardware* y *software*. Éstos permiten realizar cálculos matemáticos y estadísticos complejos de un modo rápido y veloz (Barril y Luque, 2012).

En general, las CADD aplicadas al ámbito farmacéutico implican (Kapetanovic, 2008):

- El uso de herramientas computacionales para agilizar el descubrimiento y desarrollo de fármacos.
- La aplicación de esta metodología para aumentar el conocimiento sobre las relaciones receptor (*target*)-ligando, permitiendo predecir el mecanismo de acción de distintos principios activos.
- El desarrollo de modelos de predicción para identificar compuestos con perfiles farmacocinéticos y toxicológicos optimizados.

Podemos dividir los métodos *in silico* aplicados al descubrimiento de nuevos fármacos en dos grandes grupos:

a) los basados en *Target Identification* (enfoque bioinformático) (Cunningham, 2000; Materi y Wishart, 2007; Silowski y cols., 2013) dentro del cual, a su vez encontramos el *Structure-based* y el *Ligand-based CADD*.

b) los basados en *Lead Finding and Optimization* (enfoque quimioinformático) (Velingkar y cols., 2011).



Figura I.1. Métodos *in silico* aplicados al descubrimiento de fármacos.

I.1.1. Enfoque bioinformático (Target identification)

Como apreciamos en la Figura I.2, existen dos tipos de métodos *in silico* aplicados al descubrimiento de nuevos fármacos basados en la identificación del receptor (Cunningham, 2000; Materi y Wishart, 2007; Silowski y cols., 2013). Por un lado, encontramos las técnicas basadas en la interacción directa fármaco-receptor (*Structure-based CADD*): *Docking molecular*, *Structure-based virtual screening*, *Pharmacophore modeling*, *De novo design*, *Fragment-based drug design (FBDD)* y *Molecular dynamics*, y, por otro, encontramos las metodologías basadas en las características del ligando que determinan su interacción con el receptor, es decir, lo que podríamos llamar técnicas indirectas (*Ligand-based CADD*): *QSAR*, *Ligand-base virtual screening*, *Pharmacophore modeling*. Cabe resaltar que algunas técnicas comparten metodología tanto del enfoque de *Structure-based* como del *Ligand-based* como es el caso de la modelización del farmacóforo (*Pharmacophore modeling*).

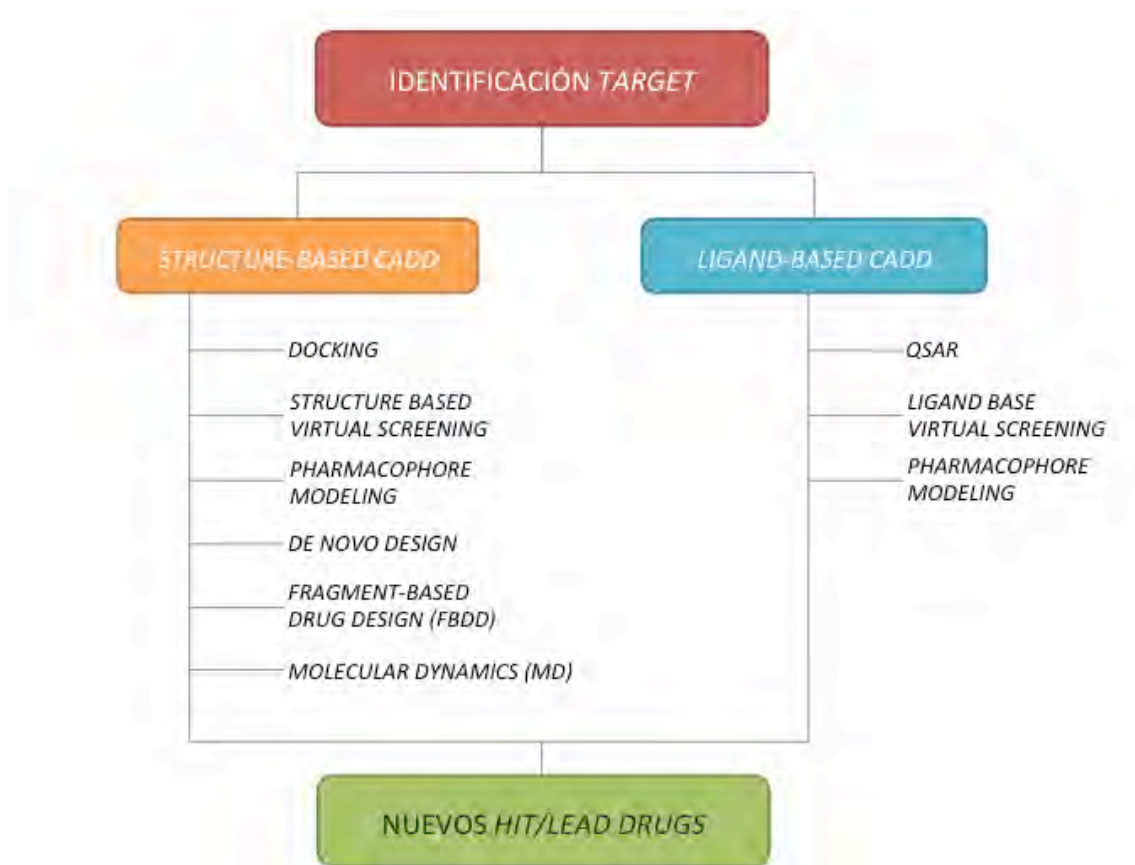


Figura I.2. Técnicas CADD basadas en un enfoque bio-informático (*Target Identification*).

I.1.1.1. Structure (Target)-Based Drug Design

El diseño de fármacos basado en la estructura (*Structure-based*) se basa en el conocimiento de la estructura tridimensional de la diana biológica obtenida a través de métodos tales como la cristalografía de rayos X o la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). El principio del diseño, identificación y optimización de fármacos basado en la estructura consiste en identificar compuestos biológicamente activos mediante la información relacionada con la estructura del receptor o *target*, que normalmente es una proteína o una parte de ella.

Docking molecular

Las técnicas de *Docking* molecular se utilizan para identificar y optimizar compuestos *leads* mediante el examen y modelado de interacciones moleculares entre ligandos y dianas macromoleculares. El acoplamiento molecular es un enfoque computacional que predice la orientación de una molécula pequeña (ligando) al formar un complejo estable con una diana macromolecular (receptor) utilizando unas funciones específicas de valoración (Chen y cols., 2012). En el proceso de acoplamiento, se generan múltiples conformaciones y orientaciones del ligando, seleccionándose las más favorables. Funciones de valoración se aplican para evaluar la estanqueidad de la interacción, a través, por ejemplo, de la predicción de la energía libre vinculante. Las validaciones del proceso se pueden llevar a cabo con ligandos activos e inactivos conocidos, con datos cristalográficos y con predicciones de rango de orden y afinidades de unión (Kapetanovic, 2008).

Structure-based virtual screening

El cribado virtual basado en la estructura comienza con la identificación de un lugar o sitio potencial de unión al ligando en la molécula diana. El sitio de unión al ligando puede ser el centro activo de una enzima, un lugar de ensamblaje con otra macromolécula o de comunicación, que es necesario en el mecanismo de acción de la molécula en estudio. La determinación de la estructura de una proteína diana mediante RMN, cristalografía de rayos X o el modelado de homología, es un aspecto esencial e inicial en el proceso de cribado virtual basado en la estructura, seguido después por el acoplamiento del ligando. Esta técnica aúna un conjunto de conocimientos que combinan estructuras de rayos X,

bioinformática y técnicas de modelado molecular, que permiten a los diseñadores de fármacos producir rutinariamente modelos de homología de calidad para el receptor. Estos modelos sirven de base para establecer y evaluar modelos eficientes utilizados para el rastreo de bibliotecas virtuales de compuestos (Lounnas y cols., 2013).

Pharmacophore modeling

Un farmacóforo se define como una disposición espacial de grupos funcionales y patrones estructurales comunes a las moléculas activas y esenciales para una determinada actividad biológica (Kim y cols., 2010). Los modelos farmacofóricos se basan en el concepto de similitud molecular, centrándose en la identificación de características químicas comunes de un conjunto de ligandos conocidos que sean representativos de una determinada interacción ligando-diana macromolecular. En general, el proceso de modelado farmacofórico se divide en dos fases principales (Vuorinen y cols., 2014):

- Creación del espacio conformacional para cada ligando en el conjunto de entrenamiento para representar la flexibilidad conformacional de los ligandos.
- Alineación de los múltiples ligandos en el conjunto de entrenamiento y determinación de las características esenciales químicas comunes para construir modelos farmacofóricos.

Diseño de novo

El diseño de fármacos *de novo* es un proceso iterativo en el cual la estructura tridimensional del receptor se utiliza para diseñar nuevas moléculas. Se trata de la determinación estructural del complejo diana o *lead target* junto con el diseño de modificaciones del *lead* utilizando herramientas de modelado molecular. Puede así utilizarse para diseñar nuevas clases de compuestos que presenten sustituyentes similares al *target* a través del empleo de una estructura molecular base (*scaffold*) (Jain y Agrawal, 2004; Schneider y Fechner, 2005; Hartenfeller y Schneider, 2011).

Fragment-based drug design (FBDD)

El diseño de fármacos basado en fragmentos moleculares se caracteriza por la identificación de fragmentos con bajo peso molecular o compuestos químicos que puedan unirse, aunque sea débilmente, a la diana biológica de interés. Los fragmentos que forman interacciones de alta calidad son entonces optimizados para la obtención de compuestos *leads* caracterizados por una alta afinidad y selectividad frente a la diana. Esta metodología requiere el uso de técnicas experimentales tales como RMN, cristalografía de rayos X y resonancia de plasma de superficie para identificar *hits*, que son compuestos que presentan una actividad farmacológica o biológica que probablemente llegará a ser terapéuticamente útil, pero aún requieren modificaciones estructurales para ajustarse mejor a la diana. Estas técnicas son muy sensibles y algunas de ellas ofrecen información detallada sobre la interacción con el fragmento de proteína, importante para la optimización del *hit* (Kumar y cols., 2005; Hajduk y Greer, 2007).

Molecular dynamics

La dinámica molecular es una manera de simular computacionalmente el movimiento de las moléculas y es ampliamente utilizada para proporcionar una perspectiva dinámica de su comportamiento real, en particular en el caso de la interacción fármaco-receptor. Simulaciones de dinámica molecular se utilizan hoy en día para estudiar casi todo tipo de macromoléculas: proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos de interés biológico o médico. Las simulaciones abarcan rangos y resoluciones espaciales y temporales muy amplias. Todos los átomos en la dinámica molecular, por ejemplo los millones de átomos individuales que constituyen una proteína dada y las moléculas de agua circundantes, se mueven en una serie de cortos pasos de tiempo (por ejemplo, 2 fs). En cada paso, las fuerzas en cada átomo determinan, a partir del campo de fuerza, una colección de parámetros físicos que representan las fuerzas interatómicas (por ejemplo tipo van der Waals). Después se calculan computacionalmente y se determina la posición atómica y la velocidad, actualizándolas de acuerdo con las leyes del movimiento de Newton. Este proceso se repite miles de millones de veces para proporcionar trayectorias atómicas continuas que pueden durar 1 μ s o más. Las simulaciones de dinámica molecular son adecuadas para el estudio de las proteínas de la membrana, que representan desafíos particulares para los métodos experimentales (Borhani y Shaw, 2012; Ge y cols., 2013).

I.1.1.2. Ligand-Based Drug Design

El diseño de fármacos basado en el ligando se fundamenta en el conocimiento de moléculas que se unen a la diana biológica de interés pero no de la diana en sí misma. Por lo general, son casos en los que no se dispone de información relativa a la estructura 3D de la proteína diana. Entre estos métodos se pueden destacar los enfoques moleculares de similitud, las relaciones cuantitativas de estructura-actividad (QSAR) y los modelos farmacofóricos. Basadas en patrones de ligandos conocidos, estas técnicas pueden aplicarse para rastrear bases de datos moleculares con el objetivo de identificar compuestos con patrones similares y que deben por tanto presentar actividades farmacológicas similares (Bacilieri y Moro, 2006).

QSAR

QSAR es el acrónimo de *Quantitative structure–activity relationship*, cuya traducción es "relaciones cuantitativas estructura-actividad". Se trata de un método que relaciona la estructura química con la actividad físicoquímica, biológica o farmacológica de los compuestos bajo estudio, mediante modelos matemáticos. Si se puede determinar cuantitativamente, es decir numéricamente, la actividad de un conjunto de ligandos y se puede cuantificar de algún modo la estructura molecular de dichos ligandos, entonces se puede construir un modelo matemático que relacione ambas. La modelización basada en técnicas QSAR permite determinar de modo cuantitativo cual es la influencia de una determinada estructura molecular sobre la actividad de una molécula (Patel y cols., 2014).

El proceso de construcción de un modelo QSAR se puede resumir en las siguientes etapas:

- En primer lugar, se recoge información sobre los ligandos y sus actividades biológicas o propiedades físicoquímicas.
- Posteriormente, se calculan los descriptores moleculares. Estos descriptores se relacionan con la actividad de los ligandos por medio de distintos métodos matemático-estadísticos de modelado para obtener los modelos de predicción QSAR.
- Finalmente, los modelos obtenidos son sujetos a procesos de validación interna y externa. El objeto principal de estas validaciones es garantizar, en lo posible, que los modelos sean de aplicación en la búsqueda de nuevas moléculas activas.

Las principales diferencias entre los algoritmos QSAR utilizados con mayor frecuencia residen en su modo de generar los descriptores. Por ejemplo, el análisis comparativo de campos moleculares (CoMFA, *Comparative Molecular Field Analysis*) se basa en la hipótesis de que las interacciones ligando-receptor son de tipo no-covalente y en que la variación de la actividad biológica se correlaciona mejor con las variaciones de parámetros estéricos y electrostáticos de la molécula. Asimismo, encontramos otros procedimientos como el análisis comparativo de índices de similitud moleculares (CoMSIA, *Comparative molecular similarity index analysis*), basado en el cálculo de índices de similitud para moléculas previamente alineadas en relación a determinadas propiedades físicoquímicas (interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno). Finalmente, los índices se correlacionan con la actividad biológica (Lee y cols., 2011).

Ligand-Based Virtual Screening

Las técnicas de cribado virtual basadas en ligandos se centran fundamentalmente en el análisis de similitud molecular comparativo de compuestos con actividad conocida y desconocida, independientemente de los métodos o algoritmos utilizados. Los compuestos se seleccionan utilizando programas informáticos para predecir su unión a una diana, siendo un requisito clave el conocimiento acerca de los criterios geométricos y energéticos responsables de la unión a las proteínas ligando. Es una de las técnicas utilizadas para rastrear bases de datos de compuestos de gran tamaño seleccionando un número más pequeño de compuestos para las pruebas biológicas. Por supuesto, la técnica se puede utilizar para seleccionar compuestos para el rastreo de bases de datos de elaboración propia o de proveedores externos (Klebe, 2006).

I.1.2. Enfoque quimio-informático (identificación y optimización de *leads*)

Una vez identificado el *target*, se procede a su optimización con el fin de obtener nuevos fármacos. El enfoque quimio-informático emplea distintas técnicas: química combinatoria, *virtual high throughput screening*, *QSAR*, *virtual screening* o cribado virtual y *data mining* (Figura I.3.).



Figura I.3. Descubrimiento y optimización de compuestos *lead*.

I.1.2.1. Química combinatoria (Combinatorial chemistry)

La química combinatoria consiste básicamente en generar nuevas moléculas combinando átomos y grupos, lo que posibilita la preparación de un gran número (decenas de miles o incluso millones) de compuestos en un solo proceso. Estas bibliotecas de compuestos se pueden construir como mezclas, conjuntos de compuestos individuales o estructuras químicas generadas *in silico*. La química combinatoria se puede utilizar tanto para generar nuevos *leads* para un *target* específico, como para optimizar un *lead* conocido. Se puede definir como la sistemática y repetitiva conexión covalente de un conjunto de diferentes "bloques de construcción" de diversas estructuras, que interaccionan entre sí para producir una gran variedad de diversas entidades moleculares (Pandeva y Thakkar, 2005; Aneesh y cols., 2010).

Hay dos enfoques principales en la química combinatoria:

- El método del "*pool* y de división", que implica asignar los compuestos de partida a partes de un polímero.
- El método de "síntesis paralela", en el que las diferentes combinaciones de la estructura química se preparan por separado, en paralelo, usando miles de recipientes de reacción y un robot programado para añadir los reactivos apropiados a cada uno (Aneesh y cols., 2010).

1.1.2.2. Cribado Virtual (*Virtual Screening*)

El cribado virtual es un método habitual en el ámbito de la quimioinformática. Sus orígenes se hallan en la investigación de compuestos basados en la estructura de proteínas o en la búsqueda del acoplamiento y similitud química de pequeñas moléculas. La mayoría de los enfoques del cribado virtual dependen de la aplicación de descriptores de la estructura molecular y las propiedades que a menudo se clasifican como mono, bi o tridimensionales (1D, 2D o 3D), en función de la representación molecular que se emplea en el cálculo (Bajorath, 2002). Dos de los principales procedimientos de procesamiento para un cribado virtual eficiente y rápido son: el procedimiento de similitud 2D, que permite el cálculo de una amplia variedad de descriptores a partir de una representación 2D de una molécula (o grafo molecular) (García-Domenech y cols., 2008). La mayoría de los descriptores 2D se pueden calcular rápidamente, permitiendo que cientos de miles de estructuras se puedan describir, para ser procesadas en menos de una hora. El segundo enfoque para acelerar la tramitación de una biblioteca virtual implica el “*clustering*” o la puesta en común de reactivos basados en la similitud estructural (Walters y cols., 1998). Hay dos tipos principales de sistemas de cribado virtual: los más populares basados en la estructura, tales como el *docking* molecular o el diseño “*de novo*”, que se pueden utilizar cuando la estructura 3D de la diana biológica está disponible. Como alternativa, existen los enfoques simples basados en ligandos, aplicables en ausencia de información estructural (Willett, 2006).

1.1.2.3. *Virtual High-Troughput Screening (vHTS)*

El aumento del costo de introducir un nuevo medicamento en el mercado, el creciente número de dianas de interés terapéutico para las que no existen moduladores de pequeño tamaño asociados, junto con el aumento de los requisitos en seguridad introducidas por las autoridades competentes, ha incrementado la dificultad de encontrar nuevos principios activos para empresas farmacéuticas y de biotecnología (Macarron y cols., 2011). El cribado virtual de alto rendimiento (vHTS) utiliza computación de alto rendimiento para el rastreo de grandes bases de datos químicas, dando prioridad a los compuestos de síntesis (Subramaniam y cols., 2008). Los algoritmos y el hardware actuales permiten el cribado basado en la estructura de hasta 100.000 moléculas al día utilizando agrupaciones de procesamiento en paralelo. El vHTS se lleva a cabo utilizando métodos de selección basados en el receptor o en el ligando. El método basado en el receptor implica el uso de la estructura 3D de los receptores diana para buscar potenciales compuestos candidatos que puedan modular la función de receptor diana. Cada uno de los compuestos de la base de datos está acoplado en el sitio de unión del receptor con el mejor ajuste electrostático posible. En caso de que no se disponga de información estructural del receptor, se aplica el método basado en el ligando, haciendo uso de la información proporcionada por los inhibidores ya conocidos. Estructuras similares a los inhibidores conocidos se identifican a partir de bases de datos químicas por variedad de métodos (Khedkar y cols., 2007; Bielska y cols., 2011), como por ejemplo, el de similitud estructural o el rastreo farmacofórico.

1.1.2.4. *Data mining*

El *Data mining* o minería de datos, es un campo multidisciplinar de las ciencias computacionales. Podemos definirlo como el proceso computacional de descubrir patrones en largas bases de datos por medio de distintas técnicas estadísticas. Tiene como fin el extraer información a partir de las bases de datos que puede ser transformada en conocimiento para su aplicación en distintos campos (Mannhold y cols., 2013). De ahí que la industria farmacéutica emplee desde hace décadas el *data mining* para rastrear numerosas bases de datos relacionadas con el campo de la química, la biología y la farmacología (Wild, 2009).

La clave de esta metodología por tanto, es la selección de la bases de datos a rastrear. Cada base de datos posee información de una fuente particular y por tanto, se debe limitar su uso para encontrar moléculas derivadas de esa fuente. Así por ejemplo, si rastreamos una base de datos de medicamentos comercializados (*drug repurposing*) no podemos esperar identificar compuestos con estructuras químicas novedosas.

I.2. TOPOLOGÍA MOLECULAR

I.2.1. Principios: Teoría de Grafos

Se puede definir la topología cómo aquella parte de las matemáticas que estudia las transformaciones de los cuerpos geométricos que permanecen inalterados por deformación. Si es posible transformar un cuerpo en otro por simple deformación, es decir, sin romper ni rasgar ninguna de sus partes, diremos que ambos cuerpos corresponden a la misma variedad topológica. Por el contrario, la topología cambia si se ha de romper o/y pegar fragmentos para llegar al otro cuerpo.

La topología, como disciplina matemática autónoma, aparece en el siglo XVII con Leibniz, quién se dio cuenta de que había problemas que solo dependían de la posición y de los factores relacionados con ella y no de cantidad alguna. Leibniz lo denominó geometría de la posición o *análisis situs*, o sea análisis de la posición o del lugar (De Risi, 2007). En 1679, G. Leibniz publica su famoso libro *Característica Geométrica*, en el cual estudia más las propiedades topológicas que las puramente métricas de las figuras. Insiste en que, aparte de la representación coordenada de figuras, en palabras del propio Leibniz “se necesita otro análisis, puramente geométrico o lineal, que también defina la posición (*situs*), como el álgebra define la magnitud” (Mates, 1989). Y añadía: “por ello, cuando recientemente se mencionó cierto problema que parecía realmente pertenecer a la geometría, pero estaba dispuesto de tal manera que ni precisaba la determinación de cantidades ni admitía solución mediante el cálculo de ellas, no dudé en referirlo a la geometría de la posición” (Mates, 1989).

La topología considera los mismos elementos que la geometría pero de un modo diferente: no trata de distancias o ángulos sino de transformaciones continuas entre objetos. Así pues, para la topología un círculo es equivalente a un cuadrado o una elipse; una esfera no se diferencia de un cubo: se dice que la esfera y el cubo son objetos topológicamente equivalentes, porque se pasa de uno al otro mediante una transformación continua (es decir, sin romper ninguna línea o superficie) y reversible. Es curioso que nuestra visión convencional del mundo es marcadamente geométrica más que topológica, como lo demuestra el hecho de que para referirnos a algo contradictorio hablamos de la “cuadratura del círculo”, siendo así que, como mencionado antes, ambos objetos son equivalentes topológicamente.

Una simple referencia reciente ilustra la gran importancia que la topología ha adquirido en áreas tan aparentemente alejadas como la termodinámica: “La universalidad de la termodinámica es debida al hecho de que propiedades homogéneas de la misma, como la presión, temperatura y sus análogos, no dependen del tamaño o la forma. Por ello la termodinámica sigue una teoría topológica (no geométrica)” (Kiehn, 2008).

Otra definición de topología que quizás se ajuste mejor a la aplicación que nos interesa aquí, es aquella según la cual la topología “estudia las posiciones e interconexiones de los elementos de un conjunto”.

Aunque en el estudio de la topología intervienen disciplinas matemáticas tal como el álgebra, el cálculo y el análisis matemático, formalmente, la topología incluye tres subdisciplinas:

- La teoría de grafos
- La teoría de nudos
- La teoría de superficies

La que tiene un mayor interés para nosotros es la teoría de grafos, por lo que vamos a profundizar en ella a continuación.

1.2.1.1. Teoría de grafos: ideas clave

Un grafo es un conjunto de puntos llamados vértices (o nodos) conectados por líneas llamadas aristas o arcos. Los estudios de gráficos constituyen una disciplina conocida como la teoría de grafos. Fue L. Euler (1707- 1783) el que introdujo la noción de grafo (Pappas, 1989). En efecto, en el siglo XVIII los habitantes de Könisberg (hoy en día Kaliningrado, Rusia), se preguntaban si era posible recorrer esta ciudad pasando una vez y sólo una, por cada uno de los puentes del río Pregel y volver al punto de partida. En aquella época, Könisberg tenía siete puentes uniendo las cuatro partes de la ciudad (A, isla, B y C) separadas por las aguas y dispuestas como se indica en la Figura I.4:

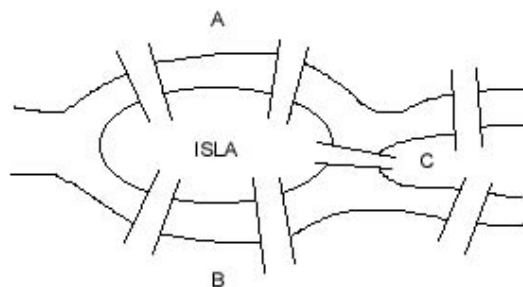


Figura I.4. Esquema de los puentes de la ciudad de Könisberg (Prusia Oriental) en 1700.

Euler se dio cuenta de que cada porción de tierra se podía representar por un punto y cada puente por una línea. Uniendo los correspondientes puntos obtuvo una figura resultante como la que aparece en la Figura I.5 (un grafo). Así, el problema puede plantearse del siguiente modo: ¿se puede recorrer el grafo sin pasar dos veces por un mismo punto o línea? (Alexanderson, 2006).

Euler demostró que no era posible ya que el número de líneas que convergen en cada punto es impar. En teoría de grafos esta idea se corresponde con la posibilidad de encontrar un llamado “camino euleriano” en un grafo.

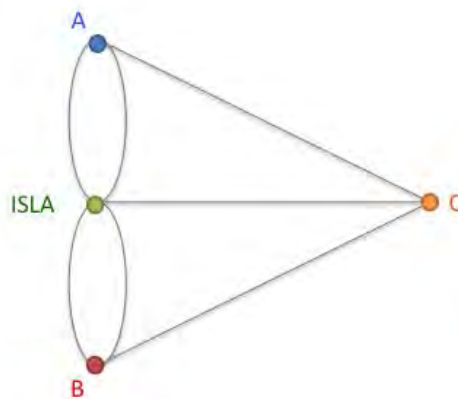


Figura I.5. Grafo de Euler basado en el esquema de los puentes de la ciudad de Königsberg (Rusia) en 1700.

Los puntos A, B, C e isla se llaman nodos o vértices y las líneas que los unen se llaman aristas o arcos. La teoría de grafos fue desarrollada más adelante por A. Cayley y J. J. Sylvester durante el siglo XIX (Cayley, 1878; Sylvester, 1878). Sin embargo, la palabra grafo apareció por primera vez en el contexto de las ciencias naturales en 1878, cuando el matemático inglés James J. Sylvester escribió un artículo titulado "Química y Álgebra", que fue publicado en la revista Nature, donde escribió que "cada

covariante e invariante por lo tanto, se convierte en expresable mediante un grafo precisamente idéntico con un diagrama Kekuleano o químico-gráfico" (Sylvester, 1878*).

En el siglo XX, la teoría de grafos se convirtió en una herramienta esencial en diferentes áreas de la ciencia y la tecnología donde la conectividad juega un papel fundamental. Piénsese, por ejemplo, en la optimización de las redes de comunicación y de transporte (Cover, 1998), el diseño de circuitos eléctricos (por ejemplo, en los ordenadores) (Deo, 2004), la sincronización de interacción de osciladores con diferentes topologías (Ren, 2008), o el análisis de las redes sociales (Wasserman y Faust, 1994), entre otros.

En la Figura I.6 vemos un ejemplo de grafo, formado por cinco nodos o vertices (V_1, V_2, V_3, V_4, V_5) y cinco aristas que unen los vértices ($\{V_1, V_2\}, \{V_2, V_5\}, \{V_3, V_4\}, \{V_3, V_5\}, \{V_4, V_5\}$). Cada segmento o arista representa un vínculo directo entre dos nodos de la red.

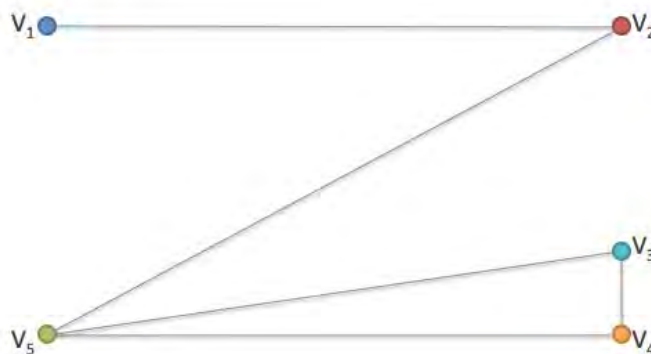


Figura I.6. Ejemplo de grafo.

Algunos conceptos de interés se definen a continuación. Por ejemplo, un camino (*path*), es la secuencia de aristas que une un vértice con otro, recorrida sin pasar dos veces por el mismo vértice. Así, las aristas $\{V_1, V_2\}$, $\{V_2, V_5\}$ representan un camino entre V_1 y el V_5 . La longitud de un camino es el número de aristas que contiene. En este caso es igual a 2, porque tiene dos aristas:

$$V_1 \rightarrow V_2 \rightarrow V_5$$

Un paseo (*walk*) de longitud “L” es un recorrido que puede pasar entre dos vertices, de modo que el total de aristas recorridas sea L, aunque podemos pasar más de una vez por la misma arista. Por ejemplo:

$$V_1 \rightarrow V_2 \rightarrow V_1$$

En este caso, hablaríamos de un paseo de longitud 2 entre V_1 y V_1 .

De lo dicho se deduce que todos los *paths* son *walks* pero no lo recíproco. Además, llamaremos camino o paseo de auto-retorno (*self-returning*) a aquel que comienza y acaba en el mismo vértice (Hall y Kier, 2001).

Por otra parte, los grafos se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios, aunque fundamentalmente podemos hacer dos divisiones: los grafos simples (Figura I.6), formados por aristas simples y vértices y los pseudografos, en los que se incluye información adicional. Un ejemplo de pseudografo se muestra en la Figura I.7, donde apreciamos un multigrafo, es decir un grafo formado por aristas múltiples.



Figura I.7. Representación de un multigrafo.

Si asociamos a alguno de los vértices (o aristas) un símbolo para caracterizarlo o “etiquetarlo” entonces estamos hablando de un grafo *etiquetado*, como por ejemplo si a los vértices o aristas se les asignan letras para caracterizarlos. Si a los vértices o aristas se les asignan valores numéricos, el grafo se llama *ponderado*.

La *valencia* (δ) de un vértice de un grafo, se define como el número de aristas que convergen en ese vértice.

El número de aristas de un grafo se suele representar por la letra m y el número de vértices por n . Se llama grafo *completo* a aquel en el que cada vértice está enlazado a todos los demás.

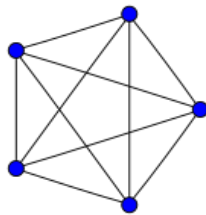


Figura I.8. Ejemplo de grafo completo.

Observando la Figura I.8, es fácil demostrar que el número de aristas de un grafo completo es igual a las combinaciones de n vértices tomados de 2 en 2, como se expresa en la siguiente expresión matemática:

$$m = \binom{n}{2} = \frac{n!}{2!(n-2)!}$$

Se llama grafo *regular* a aquel que tiene todos sus vértices con la misma valencia (Figura I.9). Por ejemplo, para $\delta=2$, la Figura I.9 representa distintos grafos regulares con valencias 2 y 3.

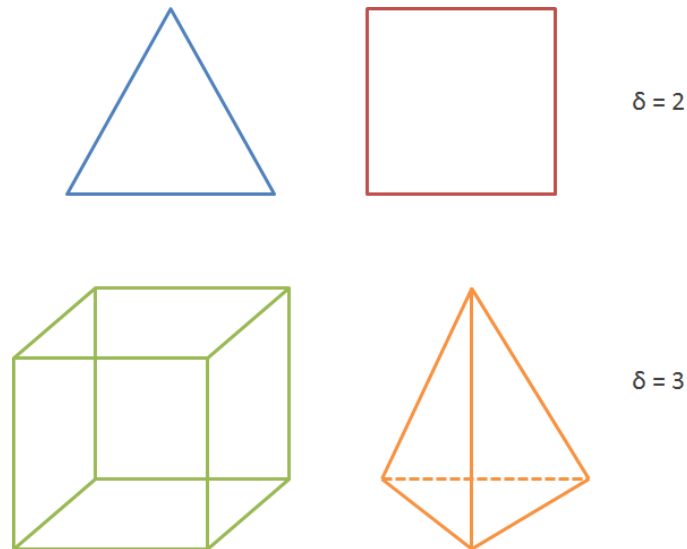


Figura I.9. Ejemplo de grafos regulares con valencias 2 y 3, respectivamente.

Se habla de grafo *conexo* a aquel para el que cualquier par de vértices tiene al menos un camino que los una, mientras que llamamos grafo *cíclico*, a aquel que contiene al menos un ciclo. En este tipo de grafos se llama número ciclomático (μ) a:

$$\mu = m - n + k$$

Donde m = número de aristas; n = número de vértices. k =componentes de conexión del grafo. Para grafos conexos $k=1$, con la expresión queda del siguiente modo:

$$\mu = m - n + 1$$

Por ejemplo, para un cubo (ver Figura I.9), el valor de $\mu = 12-8 +1 = 5$.

Se llama grafo *bipartido* al que puede ser dividido en dos conjuntos de vértices dentro de los cuales no existen conexiones (aristas). Por ejemplo el grafo etiquetado que apreciamos en la Figura I.10:

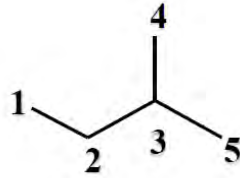


Figura I.10. Grafo bipartito.

Puede ser descompuesto en dos grupos de vértices, a saber: (1,3) y (2,4,5) que internamente no tienen conexiones entre sí (Gálvez y cols., 1995).

Se llama grafo en *árbol* a aquel grafo conexo que no contiene ciclos. Todos los árboles son bipartidos. Mientras que llamamos grafo en estrella (*star graph*) a aquel en el que todos los vértices están unidos solo a uno central sin estar enlazados entre si, es decir, todos los vértices convergen en uno (Figura I.11):

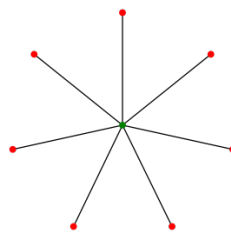


Figura I.11. Representación de un grafo en estrella.

Por último, cabe introducir el concepto de *subgrafo*, entendiendo por tal cualquier parte de un grafo constituido por una o varias de sus aristas interconectadas.

I.2.1.2. Representación matemática de grafos

Una de las principales ventajas de los grafos, es que cada uno de ellos puede representarse por una matriz, A , llamada matriz de *adyacencia* o matriz *topológica*. Las matrices son objetos matemáticos muy versátiles, de tal modo que pueden ser manipuladas para obtener a partir de ellas muchos descriptores matemáticos. Las matrices pueden sumarse, restarse, multiplicarse, dividirse, transponerse (operación en que se intercambian filas por columnas), etc. En la Figura I.12, podemos ver la matriz topológica asociada al grafo de la Figura I.6.

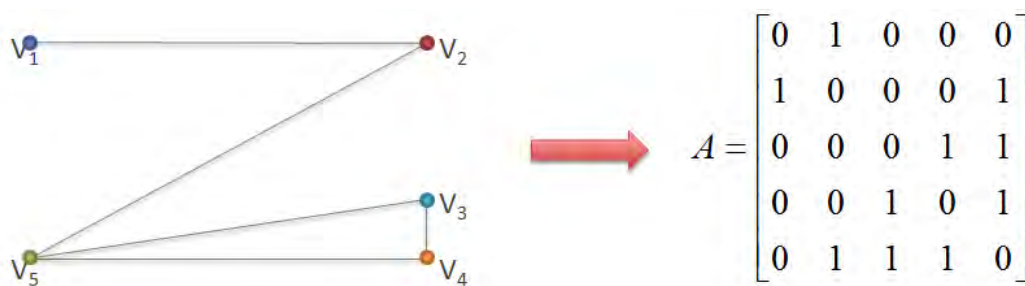


Figura I.12. Transformación de un grafo de cinco vértices en una matriz topológica.

Los elementos a_{ij} de esta matriz adoptan valor 0 si no existe enlace (arista) entre el vértice i y el j y valor 1 si existen enlace entre ambos. Como cada elemento se considera no enlazado a sí mismo, los elementos de la diagonal principal de esta matriz tendrán valor 0.

Apreciamos en la Figura I.12, como la matriz de adyacencia es siempre cuadrada ($n \times n$), es decir, tiene el mismo número de filas que de columnas. Se llama rango de la matriz al número de filas (o columnas) que posee y en el caso de esta matriz coincide con el número de vértices del grafo (n). Además las matrices de adyacencia son simétricas, es decir, los elementos

posicionados simétricamente respecto a la diagonal principal (la que va de arriba a la izquierda y abajo a la derecha) son iguales. Dicho de otro modo, la transpuesta (la resultante de cambiar filas por columnas) de la matriz de adyacencia es igual a sí misma.

Además, una propiedad importante de la matriz topológica es que puede construirse numerando los vértices (es decir, etiquetándolos ordinalmente) en cualquier orden. Aunque evidentemente la posición de los números ordinales cambia dentro de la matriz, todas sus propiedades permanecen invariantes.

Si A es la matriz de adyacencia de un grafo y $a_{ij}^{(k)}$ representa el término ij de la matriz A^k , entonces $a_{ij}^{(k)}$ es igual al número de *walks* de longitud k entre V_i y V_j . Para el grafo de las Figuras I.6 y I.12, la suma de todos los términos de la matriz A^3 (la matriz al cubo) representa el número total de *walks* de longitud 3 entre dos vértices cualesquiera del grafo.

$$A^3 = \begin{bmatrix} 0 & 2 & 1 & 1 & 0 \\ 2 & 0 & 1 & 1 & 4 \\ 1 & 1 & 2 & 3 & 4 \\ 1 & 1 & 3 & 2 & 4 \\ 0 & 4 & 4 & 4 & 2 \end{bmatrix}$$

Así, por ejemplo, solo hay 2 posibles *walks* de longitud 3 entre los vértices 1 y 2 del grafo.

Otro término determinante a la hora de trabajar con matrices es el concepto de *autovalor* también llamado *valor propio* o *eigenvalue*. Un escalar " l " se dice que es un autovalor de la matriz A si existe un vector no nulo, " x ", tal que:

$$A \times x = l \times x$$

Los autovalores se calculan como las soluciones al polinomio característico de la matriz A . Dicho polinomio es el que resulta de resolver el determinante de la matriz introduciendo en cada uno de los elementos nulos de la diagonal principal la variable “ x ”. Por ejemplo, para el grafo (Figura I.13):

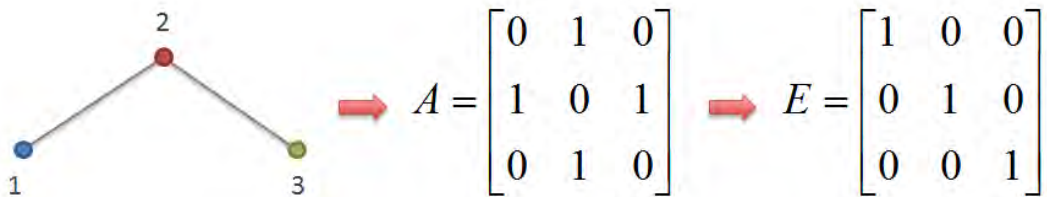


Figura I.13. Matrices topológicas y unidad referidas al grafo simple de tres vértices.

El producto de $x * E$ será:

$$X * E = \begin{bmatrix} X & 0 & 0 \\ 0 & X & 0 \\ 0 & 0 & X \end{bmatrix}$$

y el determinante de $T - xE$ será:

$$\det \begin{bmatrix} -X & 0 & 0 \\ 0 & -X & 0 \\ 0 & 0 & -X \end{bmatrix} = -x^3 + 2x = 0$$

El polinomio del primer miembro de la ecuación, se llama polinomio característico de la matriz. Las soluciones de la ecuación serían $x = 0, \sqrt{2}, -\sqrt{2}$ que se corresponden con los autovalores. Una propiedad interesante de los autovalores es que su suma algebraica siempre vale 0.

Además de la matriz de adyacencia, tenemos otras muchas matrices que son de interés en la teoría de grafos, entre las que vamos a destacar la matriz de adyacencia de aristas. Esta matriz se construye numerando las aristas en vez de los vértices y asignando al elemento ij un valor 1 si la arista “ i ” está unida a la “ j ” y 0, en caso contrario. Más adelante

trataremos otro tipo de matrices, como por ejemplo la de distancias, constituida por elementos que son las distancias topológicas entre los vértices, entendiendo por distancia topológica el número de aristas entre ellos por el camino más corto.

I.2.1.3. Las moléculas cómo grafos

La aplicación de la teoría de grafos a la química fue bastante tardía. El primero en darse cuenta de que las moléculas podían ser representadas por grafos fue el matemático inglés Arthur Cayley en 1874 (Heydemann, 1997). Es decir, antes incluso de que se hubiese acuñado el término grafo.

En la forma más sencilla de esta representación, los átomos de hidrógeno se suprimen, el resto de los átomos se representan como vértices y los enlaces como aristas del grafo. Una vez construido el grafo molecular, se numeran los vértices siguiendo un orden aleatorio. A partir de aquí se construye la matriz de la forma indicada anteriormente, es decir, asignando valor 1 al elemento ij si existe enlace y 0 en caso contrario. Veamos, cómo ejemplo, la representación del isopentano (Figura I.14):

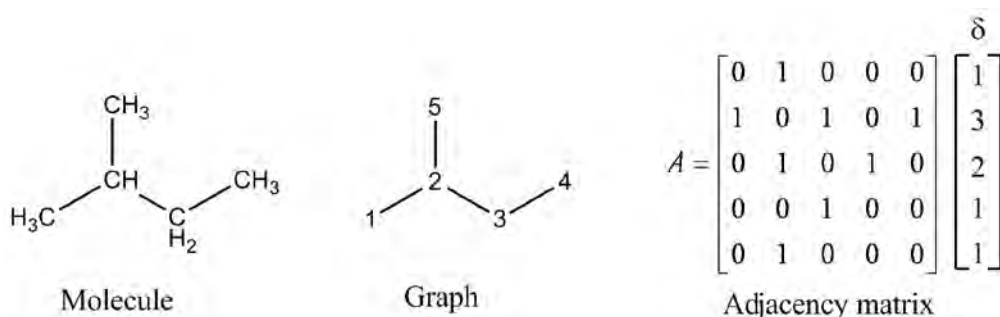


Figura I.14. Ejemplo de transformación del isopentano en un grafo y posteriormente en una matriz de adyacencia.

Asociada a la matriz de adyacencia apreciamos una columna en la que se ofrece información sobre las valencias de los vértices, obtenidos como suma de los elementos de las distintas filas o columnas correspondientes. Así, en el ejemplo, las valencias de los vértices etiquetados como 1,2,3,4 y 5 son 1,3,2,1 y 1 respectivamente (Gálvez y cols., 2012).

I.2.2. Índices topológicos y topoquímicos

I.2.2.1. Índices topológicos

Una vez representadas las moléculas como grafos la primera pregunta que surge es como asignar a cada molécula-grafo-matriz, un número o descriptor que la caracterice. Estos descriptores numéricos se llaman índices topológicos. La idea es que, una vez representadas las moléculas por estos números, podamos establecer relaciones cuantitativas entre la estructura - a la que asignamos ahora un valor numérico- y su actividad en un campo concreto. Estas relaciones, que se conocen como QSAR (acrónimo en inglés de relaciones cuantitativas estructura-actividad) o más genéricamente QSPR (relaciones cuantitativas estructura-propiedad), nos permiten predecir teóricamente las propiedades o actividades de los compuestos químicos analizados.

Un buen índice topológico debe cumplir una serie de requisitos, que han sido recogidos por Randić en un famoso decálogo (Randić, 1992). Entre esos requisitos se encuentran:

- a) Los índices deben ser únicos para cada molécula/grafa.
- b) Deben ser de cálculo sencillo y fácilmente computarizables.
- c) Deben ser capaces de predecir con un razonable nivel de exactitud los valores de ciertas propiedades moleculares.

La primera idea para obtener un índice topológico fue asignar a cada molécula-grafo los autovalores de la matriz de adyacencia. Sin embargo, pronto se comprobó que la idea no era buena porque distintos grafos podían tener iguales autovalores. En efecto Schwenk demostró que aproximadamente cada 3 grafos se repetían los autovalores (Bogner y cols., 2006). Esto llevó a la búsqueda de otras alternativas, de modo que aunque hay descrita en la literatura una variedad amplísima de índices topológicos, nosotros vamos a tratar aquí solo algunos de los más significativos.

El primer índice topológico propiamente dicho fue introducido por Wiener en 1947 (Wiener, 1947). Se basa en el concepto de distancia topológica anteriormente introducido, definiéndose como la suma de todas las distancias topológicas entre cada par de vértice del grafo. Por ejemplo, para el n-butano el índice de Wiener (W) adoptaría valor 10, tal y como se explica en la Figura I.15. (Bonchev, 2001).

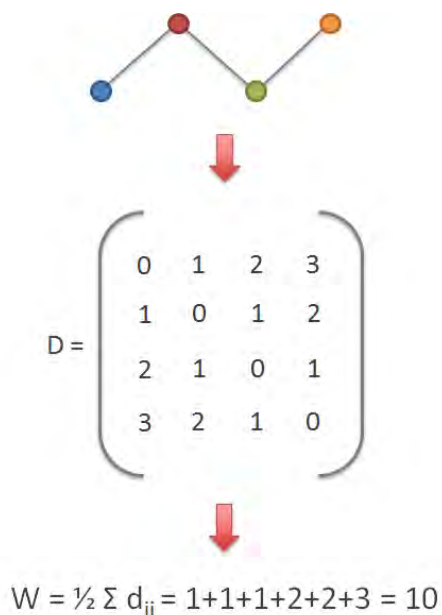


Figura I.15. Cálculo del índice de Wiener para la molécula del n-butano.

Este índice se aplicó a la predicción de la temperatura de ebullición de alcanos (Wiener, 1947). Más adelante se comprobó que también servía para predecir otras propiedades más complejas, como las energías de enlaces de hidrocarburos policíclicos aromáticos, lo que, a su vez permitía modelizar las frecuencias de aparición de bandas UV-visible de compuestos aun no sintetizados. Posteriormente, Bonchev y Menkenian descubrieron una interesante correlación entre el índice de Wiener y las energías y estabilidades de sistemas cristalinos, lo que anticipa una interesante relación entre energía y topología sobre la que volveremos más adelante (Bonchev, 2001).

Posteriormente, en las décadas de los 60 y 70 del pasado siglo, se definieron otros índices interesantes como por ejemplo el de Hosoya, introducido en 1971 (Hosoya, 1971). El índice de Hosoya (Z), es la suma de los números de no-adyacencia del grafo, ($p(k)$), que se definen como el número de formas posibles de ordenar 1,2,3,...m aristas en un grafo de tal manera que no haya contacto entre ellas, es decir, que ningún par converja sobre el mismo vértice. Siguiendo la expresión matemática:

$$Z = \sum_{k=0}^m p(k)$$

Es interesante destacar que los números de no adyacencia de un grafo cualquiera coincide con los coeficientes del polinomio característico del grafo. El índice de Hosoya también dio muy buenas correlaciones con distintas propiedades, entre ellas las temperaturas de ebullición de alcanos.

Finalmente, vamos a describir el índice que ha dado mejores resultados en un mayor número de propiedades y por ello probablemente, el más representativo de todos: el índice de ramificación de Randić (χ). Se define como la suma, para todas las aristas del grafo, de los inversos de las raíces cuadradas de los productos de las valencias de los pares de vértices que delimitan cada una de las aristas. Es decir:

$$\chi = \sum_i \sum_j (\delta_i \delta_j)^{-1/2}$$

La Figura I.16, ilustra el cálculo del índice de Randić para el grafo del 3-metil-pentano. Como se aprecia secuencialmente, los pasos son:

- 1.- Añadir en cada vértice el valor de su valencia topológica.
- 2.- Situar en cada arista los productos de las valencias de los dos vértices que la limitan
- 3.- Obtener las inversas de las raíces cuadradas de cada uno de los productos.
- 4.- Finalmente, sumar dichas inversas.

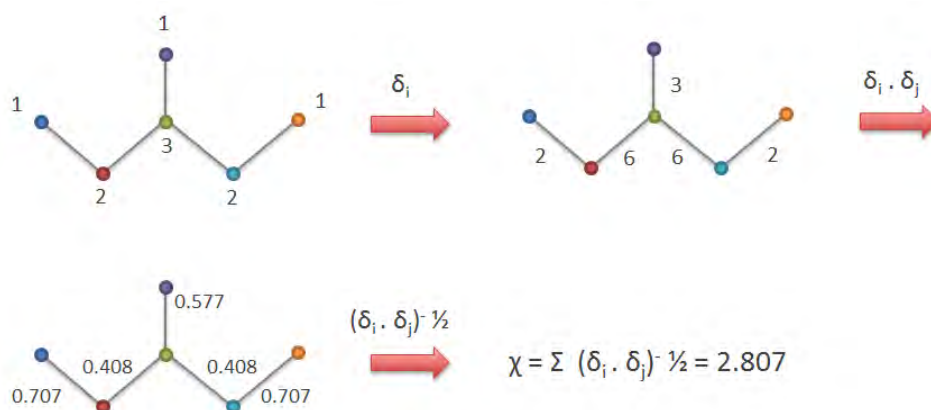


Figura I.16. Cálculo del índice de Randić para la molécula del 3-metil-pentano.

El índice de Randić es una buena medida de la ramificación de un grafo y consecuentemente de una molécula, de tal modo que la idea intuitiva de ramificación adquiere aquí una asignación cuantitativa y por tanto, medible. Para ilustrar esta capacidad del índice, reproducimos a continuación su valor para los grafos correspondientes a los isómeros del butano (Figura I.17):

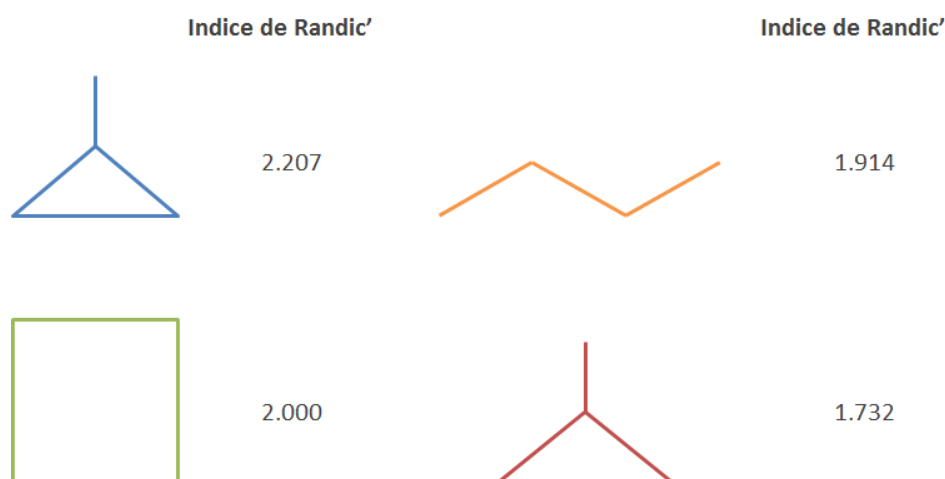


Figura I.17. Valores del índice de ramificación de Randić para los isómeros del butano.

Como se aprecia en la Figura I.17, para los grafos cíclicos, el índice de Randić adopta valores mayores cuando se presenta ramificación, mientras que en los no cíclicos (grafos en forma de árbol) ocurre lo contrario, es decir, disminuye el índice al aumentar la ramificación.

Al igual que el índice de Wiener, el índice de Randić también se empleó para predecir datos experimentales del punto de ebullición para alcanos; mostrando una excelente correlación. Este hecho resultó sorprendente, dado que esta propiedad no es fácil de predecir teóricamente y menos aún en la época, incluso utilizando métodos mucho más sofisticados. La Tabla I.1 y las Figuras I.18 e I.19 ilustran la comparación entre los valores

experimentales de los puntos de ebullición de alcanos y los valores de los índices de Wiener y Randić.

Tabla I.1. Valores de los índices de Wiener (W) y Randić (χ) y datos experimentales del punto de ebullición para un grupo de alcanos.

Compuesto	W	χ	Punto de ebullición (°C)
Metano	0	0	-162,2
Etano	2	1	-88,6
Propano	4	1,41	-42,2
Butano	10	1,91	-0,1
2-Metilpropano	9	1,73	-11,2
Pentano	20	2,41	36,1
2-Metilbutano	18	2,27	27
2,2-Dimetilpropano	16	2	9,5
Hexano	35	2,91	68,8
2-Metilpentano	32	2,77	60,9
3-Metilpentano	31	2,81	63,3
2,2-Dimetilbutano	28	2,56	49,8
2,3-Dimetilbutano	29	2,64	58,1
Heptano	56	3,41	98,5
3-Etilpentano	48	3,35	93,5
2,2-Dimetilpentano	46	3,06	79,2
2,3-Dimetilpentano	46	3,18	89,8
2,4-Dimetilpentano	48	3,13	80,6
2-Metilhexano	52	3,27	90,1

3-Metilhexano	50	3,31	91,8
Octano	84	3,91	125,6
3-Metilheptano	76	3,81	118,9
2,2,3,3-Tetrametilbutano	58	3,25	106,5
2,3,3-Trimetilpentano	62	3,5	114,7
2,3,4-Trimetilpentano	65	3,55	113,7
2,2,4-Trimetilpentane	66	3,42	99,3
Nonano	120	4,41	150,7
2-Metiloctano	114	4,27	143
Decano	165	4,91	174,2
2-Metilnonano	158	4,77	166,9

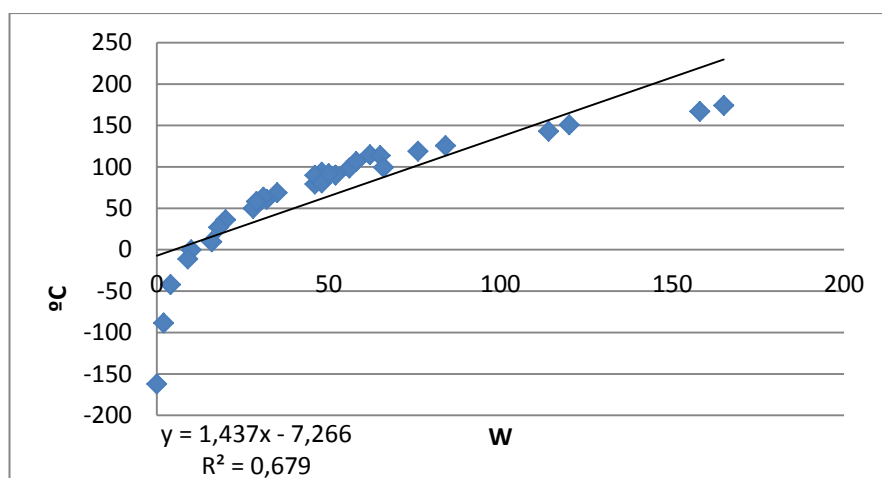


Figura I.18. Gráfico que representa el ajuste a una regresión lineal existente entre el punto de ebullición (°C) y valores del índice de Wiener (W) para el grupo de alcanos de la Tabla I.1.

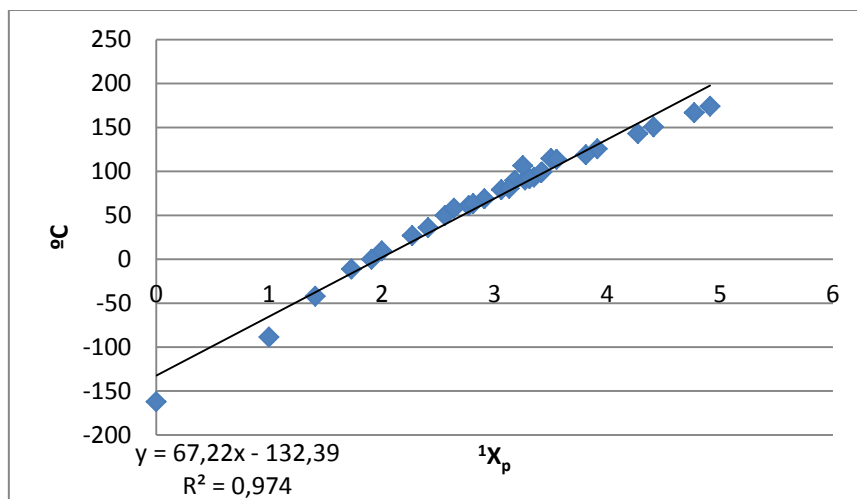


Figura I.19. Gráfico que representa el ajuste a una regresión lineal existente entre el punto de ebullición (°C) y valores del índice de Randić (χ) para el grupo de alcanos de la Tabla I.1.

El índice de Randić se mostró más eficaz no solo para la predicción del punto de ebullición sino para una amplia variedad de propiedades de ámbito físicoquímico (densidad, solubilidad, entalpía de vaporización, etc.) y biológico (potencia anestésica, actividad antibacteriana, inhibición enzimática, etc.) (Kier y Hall, 1986).

A pesar de su eficacia, el índice de Randić presenta dos limitaciones fundamentales:

- a) La primera es la degeneración, es decir, la existencia de grafos distintos que adoptan el mismo valor del índice. Un ejemplo de esto lo encontramos en la Figura I.20, donde se representan dos grafos que corresponden al cubano y al ciclooctano.

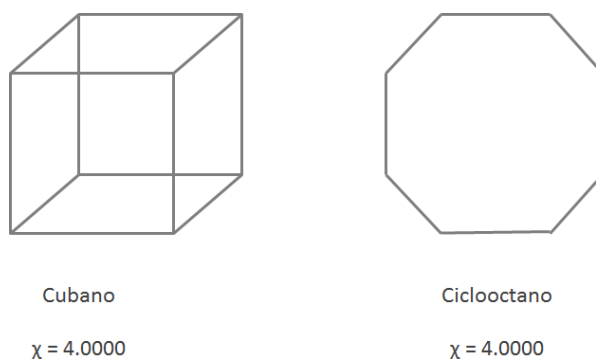


Figura I.20. Valor del índice de Randić para el cubano y el ciclooctano.

Como vemos, en ambos casos el índice de Randić adopta el valor de 4. La razón de esta degeneración se conoce como *accidente matemático* y se da en grafos regulares (aquellos que poseen igual nº de valencia en todos sus vértices). Puede demostrarse fácilmente que esta degeneración se produce como consecuencia del algoritmo de cálculo del índice, que incluye la raíz cuadrada. Si en su lugar se emplease otra raíz (cúbica, cuarta, etc.) la degeneración desaparecería.

- b) La segunda limitación está relacionada con su incapacidad para evaluar enlaces múltiples y heteroátomos.

Esta desventaja se resolvió con la introducción de los índices topoquímicos, como veremos en el apartado correspondiente.

Una extensión del índice de Randić, fue llevada a cabo por Kier y Hall a mediados de los años 70 del pasado siglo (Kier, 2012; Kier y Hall, 1977). Para entender dicha extensión hemos de hacer una breve introducción sobre el concepto de subgrafos. Como explicamos con anterioridad, un subgrafo es cualquier parte de un grafo constituido por una o varias aristas conectadas (subgrafo conexo). Los subgrafos se clasifican en cuatro tipos: *path*, *cluster*, *path-cluster* y *chain*.

Los de tipo *path* son aquellos que solo poseen vértices con valencias 1 y 2. Los *cluster* tienen valencias 1 y 3 o 4, mientras que los *path-cluster* poseen valencias 1, 2 y 3 o 4. Finalmente, los subgrafos tipo *chain* poseen al menos un ciclo. Por último, hay que resaltar que se llama *orden* de un subgrafo al número de aristas que posee.

La Figura I.21 recoge los distintos subgrafos del isopentano, salvo el de tipo *chain* porque obviamente el grafo no posee ciclos. Obsérvese que en este caso particular el único subgrafo tipo *path-cluster* es el constituido por el grafo total del isopentano.

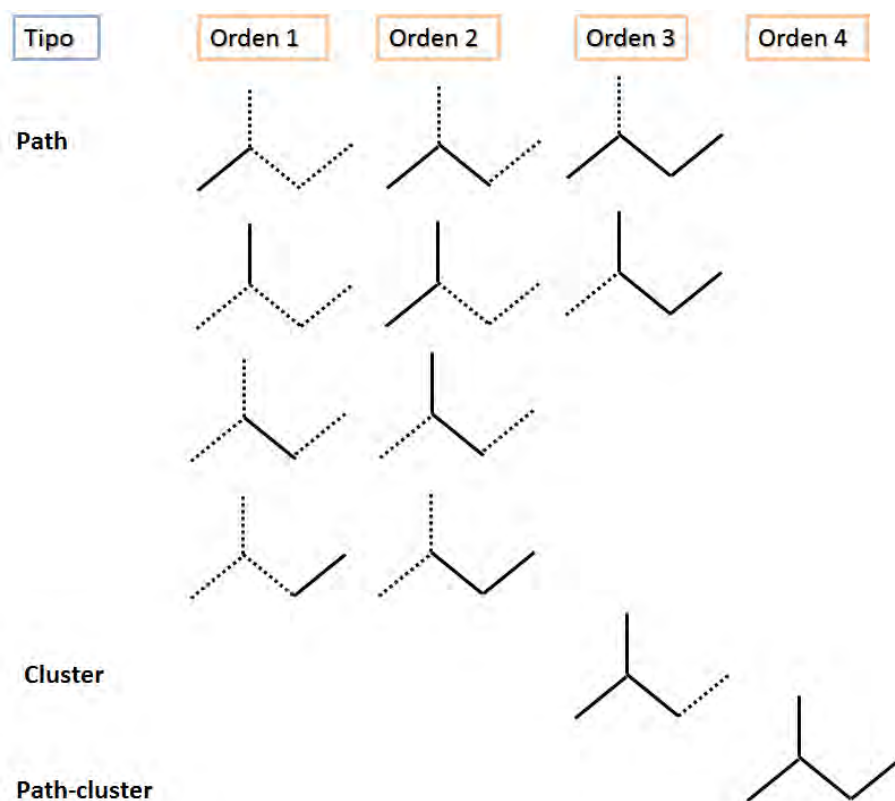


Figura I.21. Los distintos subgrafos del isopentano y sus órdenes asociados.

A partir de aquí, los índices de Kier y Hall, también llamados índices de conectividad molecular, se calculan aplicando el algoritmo de Randić a cada subgrafo de tipo t y orden m . Es decir, para el subgrafo de orden 0 (no reproducido en la figura anterior) el índice sería simplemente la suma de las inversas de las raíces cuadradas de las valencias para todos los vértices del grafo. Para los de orden 1 sería la suma de las inversas de las raíces cuadradas de los productos de las valencias que limitan cara arista del grafo, es decir, coincide con el índice de Randić y así sucesivamente (ver Figura I.22).

$$\begin{aligned}
 m\chi_t &= \sum_{j=1}^{n_m} m\chi_j \quad \rightarrow \quad 0\chi = \sum_{i=1}^n (\delta_i)^{-1/2} \\
 &\quad \rightarrow \quad 1\chi = \sum_{s=1}^{n_m} (\delta_i \cdot \delta_j)^{-1/2} \\
 &\quad \rightarrow \quad 2\chi = \sum_{s=1}^{n_m} \left| \delta_i \cdot \delta_j \cdot \delta_k \right|^{-1/2}
 \end{aligned}$$

Figura I.22. Índices de conectividad de Kier y Hall.

A continuación, vamos a profundizar en los llamados índices topológicos de carga (ITC), introducidos por el grupo “Unidad de Diseño de Farmacos y Topología Molecular” en 1994 (Gálvez y cols., 1994). Los ITC se definen como la suma en valor absoluto, para subgrafos de un determinado orden, de los términos de carga. Entendemos por tales, las diferencias entre los elementos simétricos de la matriz producto entre la matriz topológica y la matriz de inversos de los cuadrados de las distancias topológicas. En esta última matriz, los términos de la diagonal principal permanecen inalterados para evitar la indeterminación resultante de

dividir por 0, ya que la distancia de un elemento a sí mismo es 0. La Figura I.23 ilustra el cálculo de los índices de carga G_k y el J_k (valor de G_k ponderado por arista o enlace).

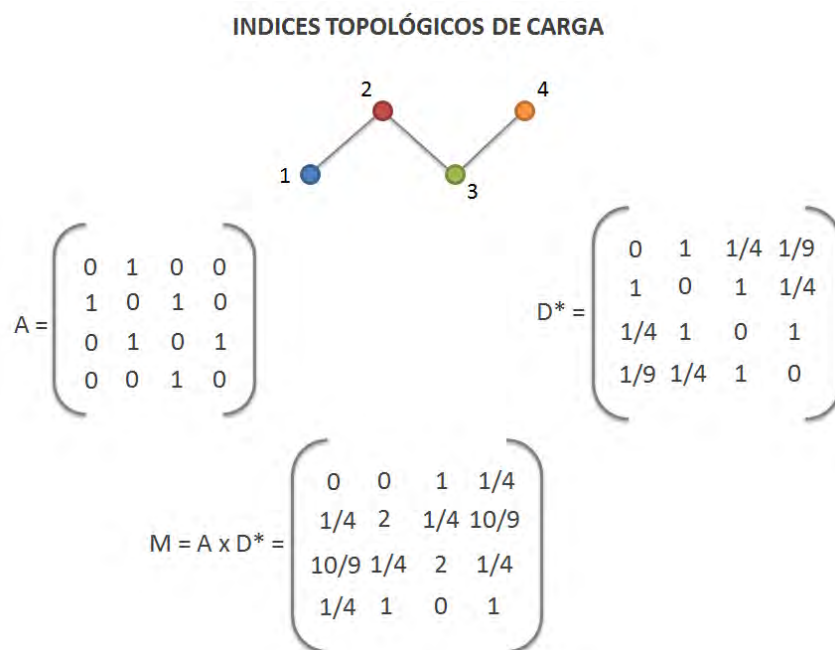


Figura I.23. Obtención de los índices de carga (G_k y el J_k) para el grafo del n-butano.

En la ecuación de los índices de carga aparece *el delta de Kronecker*, $\delta(k, d_{ij})$, que es una función que adopta el valor 1 si i y j son iguales y 0 si son diferentes. Dicho de otro modo, el delta de Kronecker establece que la suma de los términos de carga para calcular el índice correspondiente, solamente se realiza para los vértices situados a una distancia dada d_{ij} .

Por supuesto, hay otros índices topológicos de gran interés, algunos de los cuales se han utilizado en este trabajo, pero serán definidos en el apartado de discusión de resultados.

1.2.2.2. Índices topoquímicos

Anteriormente señalábamos que una limitación importante del índice de Randić es que no tiene en cuenta la presencia de enlaces múltiples y heteroátomos en las moléculas. En realidad, esa deficiencia puede ser extendida a todos los índices topológicos, de modo que los índices que tienen en cuenta esas características químicas de las moléculas se conocen como índices topoquímicos.

La deficiencia más sencilla de resolver es la de los enlaces múltiples. En efecto, la manera más obvia de solventar el problema es asignar a los términos de la matriz topológica en lugar de 0 y 1, un número igual a la multiplicidad del enlace entre el vértice i y el j en el pseudografo. Por ejemplo si entre el vértice i y el j hay un enlace doble, en la matriz pondremos un 2, si hay un triple enlace pondremos un 3 y así sucesivamente.

En cuanto a la presencia de heteroátomos, se puede tener en cuenta asignando un peso en la posición de la diagonal principal correspondiente al heteroátomo. Dicho peso no es más que un valor numérico que asignamos al heteroátomo para caracterizarlo. Aunque hay diferentes algoritmos para ello, el primero fue el llevado a cabo por Kier y Hall, en el que la valencia de un heteroátomo se define como la diferencia entre su número de electrones de valencia (Z^v) y el número de hidrógenos a los que se une el heteroátomo en cuestión (h):

$$\delta^v = Z^v - h$$

Aunque este procedimiento conduce a buenas predicciones, sin embargo, no permite distinguir entre heteroátomos de un mismo grupo del sistema periódico, como por ejemplo halógenos (cloro y bromo, por ejemplo) o anfígenos (azufre y selenio, por ejemplo). De ahí que Kier y Hall introdujeran una variante de valencia definida como:

$$\delta^v = \frac{Z^v - h}{Z - Z^v - 1}$$

Donde Z es el número atómico del heteroátomo. Al introducir el número atómico, podemos ya distinguir entre los distintos elementos de un mismo grupo.

1.2.3. La Topología Molecular y el diseño de fármacos

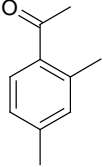
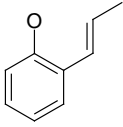
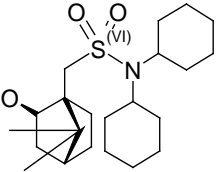
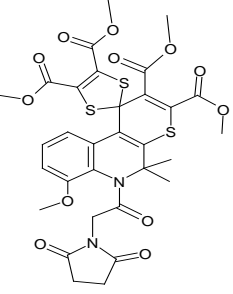
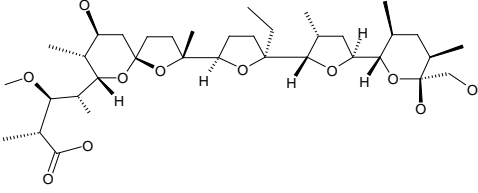
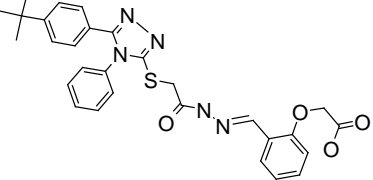
En la literatura hay bastantes aplicaciones de la Topología Molecular (TM) y la química grafo-teórica a la predicción de propiedades farmacológicas (Hansch, 1978; Ou y cols., 1986; Caputo y Cook, 1989; Basak y cols., 1990; Gakh y cols., 1994; Lather y Madan, 2005; Gupta y cols., 2011), sin embargo, son pocos los grupos de investigación que, basándose en la TM, han obtenido nuevos fármacos, sobre todo si se habla de nuevos *hits* o *leads* (Basak, 2011; Takigawa y Mamitsuka, 2013). Un *hit* se puede definir como un compuesto nuevo (no relacionado estructuralmente, al menos de manera evidente, con los ya conocidos) que presenta actividad *in vitro*, mientras que un compuesto *lead* es el que presenta actividad *in vivo*.

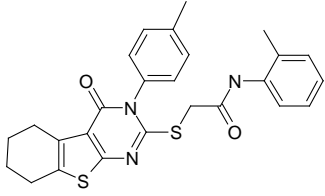
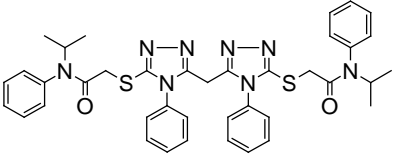
Es precisamente en este campo donde el grupo “Unidad de Diseño de Fármacos y Topología Molecular” ha hecho una mayor contribución, especializándose en la selección y diseño de nuevos *hits* y *leads*. Una de las principales aportaciones del grupo ha sido el empleo de los índices

topológicos en sentido inverso al convencional, es decir, en lugar de predecir propiedades de moléculas ya existentes, se trata de generar nuevos compuestos a partir de propiedades predeterminadas (García-Domenech y cols., 1996). Ello se consigue mediante el empleo de algoritmos originales de semejanza molecular topológica que reproducen un patrón matemático ligado a cada compuesto o grupo de compuestos, que actúa a modo de huella dactilar, lo que permite buscar nuevas moléculas activas con mejores características.

Actualmente empleamos un alto número de descriptores (parte de ellos creados por el grupo), lo que ha permitido diseñar y seleccionar nuevos compuestos 'cabeza de serie' con diferentes actividades farmacológicas: analgésicos (Gálvez y cols., 1994), antidiabéticos (Anton-Fos y cols., 1994), hipolipemiantes (Cercos-Del Pozo y cols., 1996), antineoplásicos (Gálvez y cols., 1996), antivíricos (de Julian-Ortiz y cols., 1999), antihistamínicos (Casaban-Ros y cols., 1999), antibacterianos (Mishra y cols., 2001), broncodilatadores (Rios-Santamarina y cols., 2004), antimaláricos (Mahmoudi y cols., 2006) y anti-Alzheimer (Gálvez y cols., 2010). En conjunto se han obtenido más de 200 nuevos *hits* y *leads*, algunos de ellos han dado lugar a patentes nacionales e internacionales como se puede observar en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Compuestos patentados por la “Unidad de Diseño de Fármacos y Conectividad Molecular” aplicando la TM.

Compuesto	Actividad farmacológica
	Actividad analgésica y anti-inflamatoria (Gálvez y cols., 1991). Patente Nacional (1991)
	Actividad analgésica y anti-inflamatoria (Gálvez y cols., 1991). Patente Nacional (1991)
	Anti-neoplásico (Gálvez y cols., 2004). Patente Internacional (2004)
	Anti-neoplásico (Llompart y cols., 2006). Patente Internacional (2006)
	Infecciones asociadas a Plasmodium (Mazier y cols., 2009). Patente Internacional (2009)
	Alzheimer (Gálvez y cols., 2010) Patente Internacional (2010)

	<p>Alzheimer (Gálvez y cols., 2010)</p> <p>Patente Internacional (2010)</p>
	<p>Alzheimer (Gálvez y cols., 2010)</p> <p>Patente Internacional (2010)</p>

Hay que destacar los resultados obtenidos en el campo de la inflamación y el cáncer. Concretamente, dos cabezas de serie: uno derivado del borneol (MT103) (Gálvez y cols., 2004) y otro derivado de una quinolina (MT477) (Llompart y cols., 2006) superaron los criterios que establece el *National Cancer Institute* (EE.UU.) para nuevas moléculas frente al cáncer, inhibiendo el crecimiento de 60 líneas celulares clave de su panel de ensayos. Además de estos ensayos, nuestras moléculas patentadas como anti-neoplásicos demostraron actividad *in vivo* en ratones. Particularmente MT477, ha mostrado actividad *in vivo* en ratón xeno-transplantado con cáncer de pulmón de células no pequeñas, así como en líneas de cáncer pancreático (Jasinski y cols., 2008; Jasinski y cols., 2008*; Jasinski y cols., 2011).

Ambas moléculas (MT103 y MT477), diseñadas como inhibidoras de la proteína quinasa-C (PKC), son inductoras de mecanismos de apoptosis a través de la vía de la caspasa y otros mediadores (Ras) (Dudek y cols., 2005; Jasinski y cols., 2008-2011*-2008*-2011[§]; Jasinski y cols., 2011).

A la vista de lo expuesto anteriormente, parece evidente que la elección de la TM como herramienta para la búsqueda de nuevos fármacos que actúen como agentes quimioterápicos y/o quimiopreventivos frente al cáncer resulta prometedora.

I.3. INFLAMACIÓN Y CÁNCER

La relación existente entre inflamación y desarrollo de cáncer es innegable y este hecho puede constatarse por el aumento paulatino de publicaciones en dicha área, de acuerdo con los datos obtenidos a través del buscador SciFinder® desde 1994 hasta 2014. En la Figura I.24, se observa el profundo cambio desde 1994. En dicho año solo se registran 7 revisiones bibliográficas sobre inflamación y cáncer, mientras que en el 2013, fueron 201 revisiones bibliográficas las publicadas.

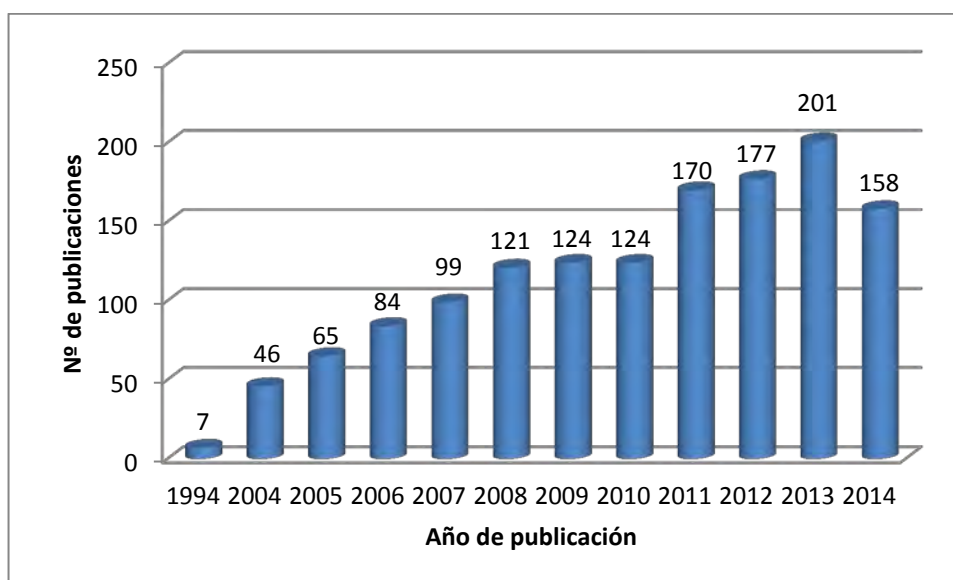


Figura I.24. Resultado de la búsqueda de revisiones bibliográficas con las palabras clave “*Inflammation and cáncer*” en el buscador SciFinder® desde 1994 hasta 2014.

Los primeros indicios acerca de la relación entre inflamación y cáncer proceden del siglo XIX. El médico alemán llamado Rudolf Virchow (Figura I.25), tras numerosas investigaciones histopatológicas sobre tejido canceroso humano identificó infiltrados leucocitarios en los tumores por primera vez (Fillon, 2012; Elinav y cols., 2013; Maiorov y cols., 2013; Sideras y Kwekkeboom, 2014). Hecho que le llevó a postular la “Reiztheorie” (Teoría de la inflamación) donde identificaba como factor

común en varias muestras cáncerosas humanas a la inflamación (Maivorov y cols., 2013).



Figura I.25. Fotografía de Rudolf Virchow.

No obstante, cómo se observa en la Figura I.24, sólo durante la última década apreciamos un aumento en el número de las revisiones bibliográficas que relacionan los procesos inflamatorios con la carcinogénesis (Grivennikov y cols., 2010). El papel de la inflamación en la carcinogénesis es ahora generalmente aceptado, ya que se ha hecho patente que el microambiente inflamatorio es componente esencial de todos los tumores, incluyendo algunos en los que una relación causal directa con la inflamación no ha sido demostrada (Mantovani y cols., 2008). Tan sólo una minoría de los cánceres son causados por mutaciones en la línea germinal, mientras que la gran mayoría (90%) guardan relación con mutaciones somáticas y factores ambientales.

La evidencia científica de la relación entre inflamación crónica y cáncer es extensa (Shacter y Weitzman, 2002). En la Tabla I.3, se describen diversos episodios inflamatorios crónicos que provocan susceptibilidad en las células frente a transformaciones neoplásicas. Muchos de estos tumores son de tipo epitelial (carcinomas). Uno de los casos más

estudiados que relaciona los procesos inflamatorios y el cáncer, es el de la asociación entre la enfermedad inflamatoria intestinal (E.I.I.) y el cáncer colorrectal. Otros casos, son el reflujo esofágico ligado a la enfermedad de Barrett y el adenocarcinoma esofágico, la hepatitis y el cáncer de hígado, la esquistosomiasis y el aumento del riesgo de carcinomas de colon y vejiga, así como infecciones crónicas de *Helicobacter* que han sido relacionadas con cáncer de estómago (Shacter y Weitzman, 2002).

La inflamación crónica está causada por diversos factores, como infecciones de tipo bacteriano, viral o parasitario, agentes químicos irritantes y partículas no digeribles. Cuanto más tiempo perdure el episodio de inflamación crónica, mayor riesgo carcinogénico (Shacter y Weitzman, 2002). De hecho, en muchos casos el desarrollo tumoral está ligado a infecciones crónicas (Vedham y Verma, 2015), agentes dietéticos (Akin y Tozun, 2014; Labbé y cols., 2014), obesidad (Khasawneh y cols., 2009; Park y cols., 2010), inhalación de contaminantes (tales como sílice y amianto) (Belpomme y cols., 2007; Scheen y Giet, 2012), tabaco (Takahashi y cols., 2010) o procesos autoinmunes (Tai y cols., 2010). El común denominador de todos estos procesos es la inflamación crónica, la cual podemos definir como una forma de respuesta protectora prolongada de modo aberrante que cursa con pérdida de la homeostasis tisular (Grivennikov y cols., 2010; Elinav y cols., 2013).

Del mismo modo, el desarrollo del cáncer puede verse como una desregulación de una forma protectora de reparación del tejido y crecimiento celular. Por lo tanto, los procesos inflamatorios y neoplásicos pueden derivar en una “herida que no cura” (Elinav y cols., 2013).

Tabla I.3. Procesos inflamatorios crónicos que predisponen a las células a transformaciones neoplásicas. (Shacter y Weitzman, 2002; Sandhu, 2008; Jiang y cols., 2013)

Cáncer asociado a agentes infecciosos		
Condición	Cáncer asociado	Agente etiológico
Colecistitis crónica	Cáncer de la vesícula biliar	Varias bacterias, litiasis vesicular
Enfermedad inflamatoria pélvica, Cervicitis crónica	Carcinoma de ovario y cuello de útero	Gonorrea, chlamydia, virus del papiloma
Esquistosomiasis	Carcinomas de vejiga, hígado y recto	Esquistosomas
Gastritis	Adenocarcinoma gástrico, linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas	<i>Helicobacter pylori</i>
Hepatitis	Hepatocarcinoma	Virus de la Hepatitis B y C
Infecciones pulmonares crónicas y recurrentes	Carcinoma de pulmón	Varios patógenos bacterianos
Orquitis	Cáncer testicular	Parotiditis
Osteomielitis	Carcinoma ductal infiltrante	Diversas infecciones bacterianas
Prostatitis	Cáncer de próstata	Enterobacterias patógenas
	Sarcoma de kaposi	Virus herpes humano tipo B
Cáncer asociado a otras etiologías		
Condición	Cáncer asociado	Agente etiológico
Asbestosis, silicosis	Mesotelioma, carcinoma de pulmón	Fibras de asbesto, partículas de sílice
Bronquitis	Carcinoma de pulmón	Tabaquismo
Cistitis	Cáncer de vejiga	Catéteres urinarios permanentes, litiasis renal
Colangitis	Colangiocarcinoma, carcinoma de colon	<i>Fasciola hepática</i> , ácidos biliares
Enfermedad inflamatoria intestinal	Carcinoma colorrectal	
Gingivitis, liquen plano	Carcinoma oral de células escamosas	
Irritación-asociada a inflamación de la piel por exposición UV	Cáncer de piel	Sobreexposición a la luz solar
Liquen escleroso	Carcinoma de células escamosas de la vulva	

Pancreatitis crónica	Carcinoma de páncreas	Alcoholismo, factores genéticos
Reflujo esofágico, síndrome de Barrett	Carcinoma esofágico	Ácidos gástricos e irritantes químicos
Sialadenitis	Carcinoma de la glándula salivar	
Tiroiditis de Hashimoto y síndrome de Sjögren	Linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas	
	Cáncer de cabeza y cuello	Humo de cigarro

Como se aprecia en la Tabla I.3, los tipos de procesos inflamatorios crónicos son muy variados. En algunos casos, los desencadenantes son conocidos (bacterias, virus, parásitos, agentes irritantes químicos y partículas no digeribles), mientras que en otros casos el agente causante es desconocido, como en el caso de la enfermedad inflamatoria Intestinal, sialadenitis (inflamación de la glándula salivar) y el liquen escleroso (Shacter y Weitzman, 2002).

Son muchos los mediadores inflamatorios que contribuyen a la formación de neoplasias a través de diferentes mecanismos, como por ejemplo fomentando mutaciones proneoplásicas, desarrollando respuestas inmunes adaptativas, adquiriendo resistencia a la apoptosis e infligiendo cambios en el entorno celular (estimulando el proceso de angiogénesis). Estas alteraciones confieren una ventaja adaptativa a las células susceptibles de transformarse en neoplásicas (Shacter y Weitzman, 2002). Entre los mediadores proinflamatorios se hallan los metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas), diversas citocinas, quimiocinas y radicales libres (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno). La exposición crónica a estos mediadores causa un aumento de la proliferación celular, mutagénesis, activación de oncogenes y por último, angiogénesis. Todo

esto deriva en la proliferación celular descontrolada (Shacter y Weitzman, 2002).

Las prostaglandinas (PGs) contribuyen al desarrollo del cáncer mediante distintos mecanismos, bien sea activando mediadores proinflamatorios o a través de su actividad inmunosupresora, es decir inhibiendo la función de los linfocitos T y los macrófagos. Este hecho fomenta la disminución de la vigilancia del sistema inmunitario, permitiendo que las células tumorales incipientes puedan quedar fuera de su control (Shacter y Weitzman, 2002). Una de las PGs ampliamente relacionadas con el desarrollo de los procesos tumorales es la PGE₂, la cual promueve la supervivencia y proliferación de las células cáncerosas (Mione y Zon, 2012), por lo que fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), como la Aspirina podrían combinarse con agentes anti-tumorales al inhibir la producción de dicha prostaglandina (Mione y Zon, 2012). Además, la PGE₂ induce la síntesis de citocinas como la IL-6, que a su vez, actúa como factor de crecimiento tumoral y favorece el proceso de angiogénesis (Shacter y Weitzman, 2002). En este sentido, se ha visto la relación de esta citocina y varios tipos de cánceres como los de intestino, hígado, estómago, páncreas, pulmón, esófago, pecho, riñón, vejiga, próstata u ovarios (Lu y cols., 2006; Taniguchi y Karin, 2014).

Otras citocinas y quimiocinas también relacionadas con el cáncer son: Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α (Lejeune y cols., 1998), IL-8 (Yuan y cols., 2005), Factor Inducible de Hipoxia (HIF)-1 α (Koh y cols., 2010), Interferón (IFN)- γ (Zaidi y Merlino, 2011), IL-1- β (Li y cols., 2012), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Kumar y cols., 2012), ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Kumar y cols., 2012), IL-15 (Waldmann, 2013), IL-11 (Taniguchi y

Karin, 2014), Factor Nuclear κ B (NF κ B) (Jing y Lee, 2014), Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3 (STAT3) (Siveen y cols., 2014), Factor Nrf2 (Moon y cols., 2014). Por último, las especies reactivas de oxígeno (superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipoclorídrico, oxígeno singulete, el radical hidroxilo) y de nitrógeno (peroxinitrito).

Éstas inducen daño al ADN, lo cual causa mutaciones que provocan la iniciación y promoción de procesos inflamatorios asociados a carcinogénesis (Shecter y cols., 2002; Ohnishi y cols., 2013). Todos estos factores han influido en la idea de la relación existente entre los procesos de inflamación y el cáncer (Figura I.26) (Colotta y cols., 2009). Otros procesos necesarios son: proliferación autosuficiente, insensibilidad a las señales antiproliferativas, evasión de la apoptosis, potencial de replicación ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis (Fan y cols., 2013).



Figura I.26. Las siete características que fomentan el desarrollo del cáncer (Colotta y cols., 2009).

I.4. QUIMIOPREVENCIÓN

La relación entre los procesos inflamatorios y cancerosos, ha posibilitado la ampliación del arsenal terapéutico contra el cáncer. Una de las claves es que la mayoría de los cánceres son prevenibles (Aggarwal y cols., 2004), por lo que el viejo aforismo “más vale prevenir que curar”, adquiere una gran relevancia en los cánceres asociados a procesos inflamatorios. Debido a que los Sistemas de Salud están cada vez más limitados por la situación económica de los países, se hace necesaria la promoción de nuevas estrategias quimiopreventivas frente a cáncer ya que éstas presentan un coste asociado infinitamente inferior al tratamiento del paciente con cáncer y a las secuelas que dicho tratamiento ocasiona en la mayoría de los casos.

Entre los distintos enfoques que actualmente se emplean en la lucha contra el cáncer la quimiopreención, es un gran reto para la sociedad científica. A mediados de los años 70, Michael Sporn acuñó el término “quimiopreención” el cual se refiere a la estrategia de bloquear o ralentizar la insurgencia de las lesiones premalignas con sustancias relativamente no tóxicas (Theisen, 2011).

Siguiendo la clasificación descrita por Lee Wattenberg en 1985 (Wattenberg, 1985), los agentes quimiopreventivos pueden dividirse en dos categorías:

- 1) **Bloqueantes:** evitan que los agentes carcinogénicos lleguen a sus dianas, mediante activación metabólica o interacción con elementos clave macromoleculares (como por ejemplo, ADN, ARN y proteínas).

- 2) **Supresores:** inhiben la transformación maligna de células durante las fases de promoción o progresión del proceso carcinogénico.

Normalmente, los agentes quimiopreventivos frente a cáncer están asociados a productos fitoquímicos (β -caroteno, curcumina, genisteína, resveratrol, etc.), frecuentemente adquiridos a través de la dieta, caracterizados por un perfil toxicológico seguro para su administración a largo plazo, que gozan de amplia aceptación por la sociedad en general.

La tumorigénesis es un proceso que incluye distintas fases celulares: transformación, hiperproliferación, invasión, angiogénesis y por último, metástasis. Con el objetivo de frenar el proceso de tumorigénesis podemos emplear agentes quimiopreventivos que actúan a distintos niveles tal (Figura I.27) (Aggarwal y cols., 2004).



Figura I.27. Etapas en el desarrollo de la carcinogénesis y supresión por agentes quimiopreventivos.

Una rápida detención y tratamiento del estrés inflamatorio podría convertirse en estrategia clave para combatir a múltiples procesos carcinogénicos (Lee y cols., 2013). De hecho, actualmente ya se emplean diversas estrategias siendo una de las más comunes, el empleo de

medicamentos antiinflamatorios, tipo AINEs o inhibidores de COX-2, como celecoxib y los glucocorticoides (por ejemplo, dexametasona) ya que estos fármacos son capaces de reducir la incidencia o la progresión del tumor y la mortalidad asociada (Wu y cols., 2014). Lenalidomida es un análogo de la talidomida, que suprime la producción de distintas citocinas inflamatorias demostrando su eficacia en pacientes con mieloma avanzado múltiple en combinación con dexametasona. Se están ensayando antagonistas de IL-6 o TNF- α por su posible papel quimiopreventivo frente al cáncer (Wu y cols., 2014).

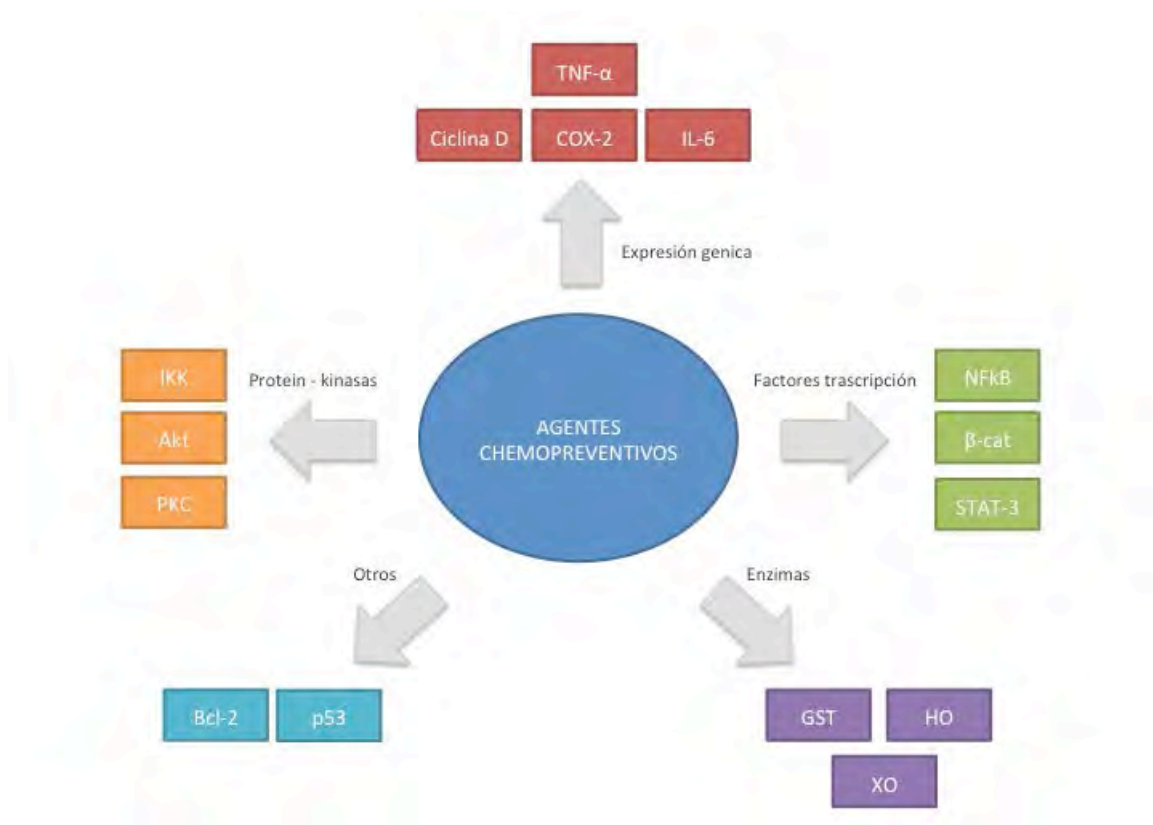


Figura I.28. Targets asociados a agentes quimiopreventivos (Theisen y cols., 2001). IKK: I κ B quinasa; GST: Glutathione S-transferase; HO: Heme oxygenase; XO: Xanthine oxidase.

En la Figura I.28 se resumen muchas de las dianas moleculares que pueden ser consideradas como dianas quimiopreventivas. Como se aprecia en dicha figura existen diferentes mecanismos de acción empleados por los agentes quimiopreventivos: disminuir la expresión génica de distintas proteínas, enzimas y factores de transcripción (ciclina D, COX-2, IL-6, TNF-alfa, NF-kB, β -catenina, STAT-3,...), inhibir la actividad de proteína-quinasas (IKK, Akt, PKC...) y por último, modular la actividad de diversas enzimas y otros agentes implicados en el proceso de tumorigénesis (GST, hemooxigenasa, xantinaoxidasa, protooncogén Bcl-2, el gen p53,...) (Aggarwal y cols., 2004).

Distintos procesos inflamatorios comparten vías de señalización con los procesos carcinogénicos, como por ejemplo, la vía de señalización del PI3K/Akt/mTOR (Roychowdhury y cols., 2010; Kim y cols., 2012) y Wnt/ β -catenina (Silva-Garcia y cols., 2014). Diversos agentes naturales, como el extracto de semilla de uva (Derry y cols., 2014), apigenina (Patel y cols., 2007; Kaur y cols., 2008; Mirzoeva y cols., 2008; Tong y Pelling, 2013), genisteina (Sivalingam y cols., 2014), esfingodienos (Kumar y cols., 2012), han demostrado tener efectos quimiopreventivos y anticancerosos a través de una marcada inhibición de la vía de señalización PI3k/Akt/mTOR entre otros mecanismos de acción.

Además de compuestos de origen natural, distintas moléculas de síntesis han sido empleadas como quimiopreventivos de cáncer actuando a través de inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Encontramos algunos ejemplos como, la metformina (agente antidiabético) (Sivalingam y cols., 2014) o la fosfoaspirina, derivado de la aspirina (Huang y cols., 2014). Asimismo, otros muchos agentes quimiopreventivos ejercen su efecto a través de la inhibición de la vía de

señalización Wnt/ β -catenina. Muchos de origen natural como la isoflavona (Clapper y cols., 2004), β -carotenos (Aggarwal y cols., 2004), licopenos (Aggarwal y cols., 2004), silimarina (Aggarwal y cols., 2004), sulforafano (Aggarwal y cols., 2004), piperina (Li y cols., 2011), oleuropeina (Teiten y cols., 2012), epigallocatequina-3-galato (EGCG) (Teiten y cols., 2012), resveratrol (Teiten y cols., 2012), quercetina (Teiten y cols., 2012), fisetina (Teiten y cols., 2012), curcumina (Li y Zhang, 2014) y el ácido cafeico fenetil ester (CAPE) (Li y Zhang, 2014).

Aunque también encontramos en la literatura ejemplos de agentes quimiopreventivos frente a cáncer que actúan a nivel de la β -catenina como por ejemplo la Mesalazina (Lyakhovic y Gasche, 2010).

1.5. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/Akt/mTOR

La vía de señalización de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K)-proteína-quinasa B (Akt)-diana de la rapamicina en células de mamífero (mTOR), es una antigua vía de transducción de señales celulares conservada desde los gusanos a los seres humanos. Proporciona un nexo crítico que conecta el factor de nutrición y el de crecimiento detectándolo a través de una variedad de procesos celulares vitales: síntesis protéica, proliferación, supervivencia, metabolismo y diferenciación celular. Esta amplia gama de funciones se consigue mediante procesos de señalización a través de distintos efectores que modulan la fosforilación, la transcripción y la traducción de *downstream targets* necesarios para estos procesos (García-Echeverría y Sellers, 2008; Edlind y Hsieh, 2014; Wang y cols., 2014).

La familia de quinasas lipídicas PI3K forma un nexo importante entre las señales *upstream* de crecimiento y la señal *downstream* del mecanismo de transducción. Las PI3K se agrupan en tres clases (I-III) de

acuerdo a sus preferencias de sustrato y homología de secuencia. Su función principal es la de fosforilar el grupo 3'-hidroxilo del fosfatidilinositol y de los fosfoinosítidos. La clase IA PI3K está relacionada con procesos inflamatorios y cáncerosos. Está compuesta dos subunidades funcionales que forman un heterodímero: una subunidad catalítica (p110a, p110b o p110d) y una reguladora (p85a, P55A, p50a, p85b o p85g) (Edlind y Hsieh, 2014). Una variedad de señales estimula la actividad de PI3K principalmente a través de los receptores tirosina quinasa (RTK), pero también a través de la unión directa con la subunidad catalítica p110. Tras la estimulación, la subunidad catalítica de PI3K fosforila el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PI-4,5-P2) a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI-3,4,5-P3), que actúa como un mensajero secundario para reclutar distintas de proteínas que poseen el dominio *pleckstrin* de homología a la membrana celular. Este proceso es revertido por el supresor de tumores PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina) y el INPP4B (inositol polifosfato 4-fosfatasa de tipo II), los cuales conjuntamente defosforilan PI-3,4,5-P3 transformándolo en PI-3-P. Uno de las familias de proteínas relacionadas con la actividad de PI3K es la de proteínas quinasas serina/treonina. Estas proteín-quinasas o Akt se relacionan con procesos inflamatorios y cáncerosos. El reclutamiento de membrana de Akt y la posterior fosforilación conduce a su activación (Edlind y Hsieh, 2014). Una vez activado, el Akt fosforila varios efectores importantes, incluyendo el complejo 2 de esclerosis tuberosa (TSC2), la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), la caja *forkhead* O (FOXO) y otros factores de transcripción y enzimas (p27, BAD y eNOS), que regulan una variedad de procesos que coordinan el crecimiento, la supervivencia, la proliferación, el metabolismo celular y la angiogénesis. Por ello, hoy se conoce el papel

clave que Akt juega en los procesos de iniciación y progresión del cáncer. Asimismo, uno de los principales mediadores implicados en la regulación de la vía de señalización de Akt es la proteína mTOR. Esta desempeña un papel importante en el desarrollo de la tumorigénesis. La proteína-quinasa serina/treonina mTOR está formada por dos subunidades catalíticas: mTORC1 y mTORC2. El complejo catalítico mTORC1, a su vez está formado por componentes esenciales como mTOR, proteína reguladora asociada de mTOR (Raptor) y la proteína letal de mamíferos 8 (mLST8), así como otros elementos no esenciales, PRAS40, DEPTOR y TTI1/tel225. Este complejo funciona como identificador de sustratos, regulador de la biogénesis y de la síntesis de proteínas (Edlind y Hsieh, 2014). El complejo mTORC2 se compone de mTOR, *asociado a mTOR insensible a rapamicina* (Rictor), la proteína-quinasa activada por estrés de mamíferos (mSin1). La función de mTORC2 está relacionada con el metabolismo y supervivencia celular, así como la activación de Akt. La actividad mTORC2 parece estar regulada por mecanismos compartidos y diferenciados respecto al complejo mTORC1, siendo importante destacar que los sustratos mTORC2 proceden a su vez de sustratos mTORC1 e incluyen: Akt, SGK1 y PKCa. Por ello, la cascada de señalización del complejo mTORC1 es activada por pAkt. Como tal, la composición única de cada complejo mTOR así como la distinta posición de sustratos *downstream* de la vía de señalización PI3K-Akt-mTOR explica su capacidad para regular una red compleja de procesos celulares vitales (Edlind y Hsieh, 2014).

Dado el relevante papel de la vía PI3K-Akt-mTOR en la fisiología celular normal, no es de extrañar que esté alterada en una amplia variedad de procesos cánceros. De hecho, alteraciones genéticas en esta vía de señalización se han relacionado con numerosos tipos de cánceres (García-Echeverría y Sellers, 2008).

La vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR (Figura I.29), está implicada en muchos aspectos del crecimiento y la supervivencia celular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y a su vez, interactúa con muchas otras vías, como por ejemplo la vía de los factores inducibles por hipoxia (HIF) (Agani y Jiang, 2013).

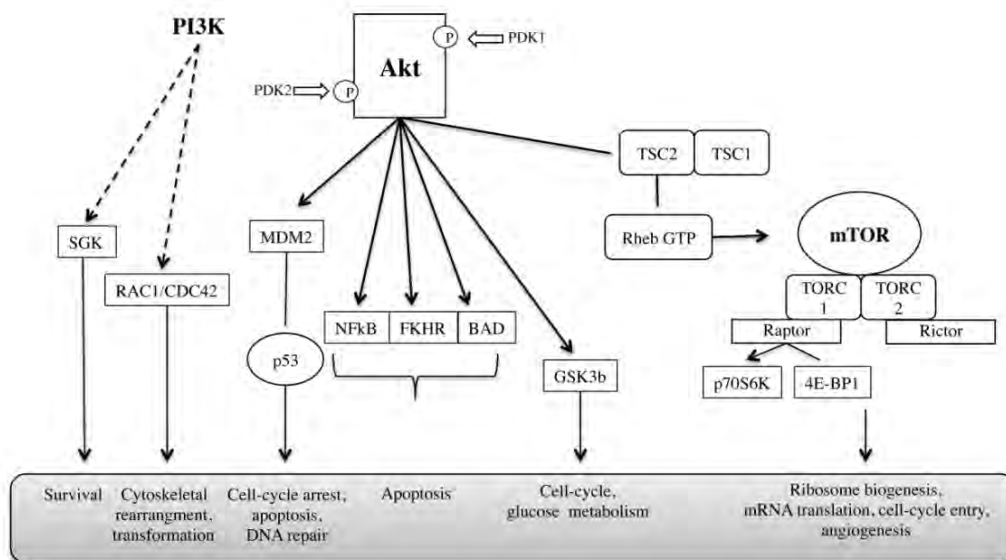


Figura I.29. Vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR y cáncer (Porta y cols., 2014; Tasian y cols., 2014; Paplomata y O'Regan, 2014).

La activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR comporta una profunda alteración del control del crecimiento celular y la supervivencia, lo que se traduce en última instancia en crecimiento descontrolado y metastásico, angiogénesis y resistencia a la terapia. Por lo tanto, esta compleja vía de señalización es hoy en día uno de los candidatos más atractivos para el desarrollo de agentes anticancerígenos y quimiopreventivos (García-Echeverría y Sellers, 2008).

I.6. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA

Las Wnts son glicoproteínas ricas en cisteína, que actúan como ligandos de corto alcance a nivel local y activan vías de señalización mediadas por receptores. El sello distintivo de esta vía es que activan el mecanismo transcripcional de la β -catenina, que es el mediador clave de la señalización de Wnt (Kahn, 2014; de Sousa y cols., 2011).

La β -catenina se localiza dinámicamente en varias ubicaciones subcelulares, incluyendo uniones adherentes, donde contribuye a los contactos célula-célula, en el citoplasma, donde sus niveles están estrechamente controlados y en el núcleo donde participa en la regulación de la cromatina y modificaciones de la transcripción. Los morfógenos Wnt son los reguladores extracelulares centrales de la dinámica de la β -catenina y el *pool* citoplasmático de β -catenina está estrechamente regulado por parte del 'complejo de destrucción' a través de procesos de fosforilación. Este "complejo de destrucción" incluye entre otros el supresor de tumores poliposis adenomatosa coli (APC). En ausencia de señalización por parte de Wnt, la fosforilación marca a la β -catenina citoplasmática para su ubiquitinación y degradación proteasomal (Kahn, 2014; Ring y cols., 2014). Como se comentó anteriormente, un

paso clave en la activación de genes relacionados con la vía Wnt es la formación de un complejo entre β -catenina y los factores de transcripción TCF/LEF, para lo cual son necesarios co-activadores activos como la proteína de unión a Creb (CBP) o p300. Dependiendo de si el co-activador reclutado es CBP o p300, la actividad de Wnt en la población de células madre va a equilibrar entre fenotipos de diferenciación y proliferativas. El complejo p300/ β -catenina promueve la diferenciación de células madre, mientras que el CBP/ β -catenina favorece el mantenimiento de la potencia de las células madre. Finalmente, el complejo de β -catenina induce la transcripción de los genes *target* de la vía Wnt (Figura I.30.).

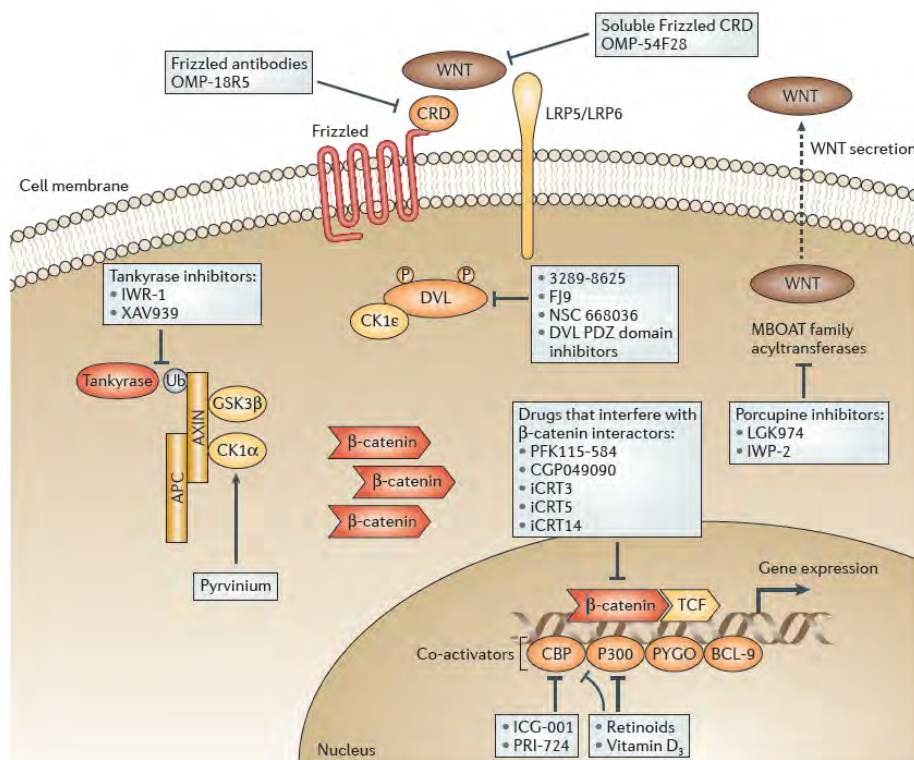


Figura I.30. Una representación simplificada de la vía canónica de la cascada de señalización Wnt/ β -catenina. En la cascada de señalización Wnt/ β -catenina, la β -catenina tiene un papel crucial en el destino celular, la proliferación, la supervivencia y la migración. En ausencia de glicoproteínas extracelulares Wnt, el “complejo de destrucción” fosforila la β -catenina (Kahn, 2014).

Una aberrante señalización de Wnt ha demostrado estar implicada en muchos tumores malignos (Verras y Sun, 2006; Clevers, 2006; Iwai y cols., 2010; Buitrago-Molina y Vogel, 2012; Ren y cols., 2014; Yang y cols., 2014; Tian y cols., 2014). Considerando la importancia de la vía de Wnt en las distintas funciones celulares, no sorprende entonces que una aberrante señalización de Wnt esté relacionada con el desarrollo de distintas enfermedades endocrina (Chen y cols., 2008), neurológicas (Inestrosa y Arenas, 2010) e inflamatorias (Schaale y cols., 2011) y con los procesos carcinogénicos (Fodde y Brabletz, 2007). El hecho de que el cáncer esté causado por una regulación aberrante de la vía de señalización de Wnt, ha hecho que esta vía de señalización adquiera relevancia a nivel terapéutico, ya que en condiciones patológicas la β -catenina escapa a su degradación y las células conservan la activación no regulada de la vía canónica de señalización Wnt, causada por mutaciones en APC, axina o β -catenina. La señalización aberrante de Wnt se caracteriza por la acumulación citoplásmica de β -catenina y su posterior translocación nuclear y actividad, lo que activa el proceso de tumorigénesis.

La vía de señalización Wnt es una cascada de señalización evolutivamente conservada y compleja con importantes funciones en el desarrollo fisiológico. Su papel fundamental en el desarrollo y la homeostasis del organismo queda patente en la diversidad de procesos celulares fundamentales dirigidos por dicha vía, tales como la determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario, la polaridad celular, la proliferación celular, la detención del ciclo celular y la diferenciación, así como la apoptosis y la homeostasis del tejido (Ring y cols., 2014). La vía de señalización Wnt tiene un papel crucial también en la edad adulta: tanto en los procesos diarios de la homeostasis del tejido y

la regeneración de piel y cabello, como en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y en la hematopoyesis. Además, la vía de señalización Wnt/ β -catenina participa en la reparación de lesiones en hígado y pulmón así como en la neurogénesis adulta. Esta vía también tiene un papel importante en la migración celular, la estabilidad e inestabilidad genética y la apoptosis. En consecuencia, una regulación aberrante de esta vía de señalización puede causar graves defectos de desarrollo, es por esto que se ha vinculado a múltiples enfermedades, siendo una de la más notablemente el cáncer (de Sousa y cols., 2011; Khan, 2014; Ring y cols., 2014). La vía del Wnt/ β -catenina se descubrió por primera vez en la mosca *Drosophila* (donde se apreció que una alteración de esta vía derivaba en moscas sin alas, debido a su papel como morfógeno en el desarrollo del ala), se confirmó más tarde su función en el ratón (donde se relacionó la vía de señalización con la formación de tumores) (Khan, 2014; Ring y cols., 2014).

La vía de señalización de Wnt/ β -catenina se divide en tres “ramas”: la vía canónica de Wnt, que actúa a través de la actividad transcripcional de β -catenina y además dos vías independientes β -catenina: la vía de la polaridad celular planar no canónica, que tiene efectos sobre el citoesqueleto y la forma celular y la vía no canónica de Wnt/calció (Ring y cols., 2014). A pesar de que eventos de señalización son dinámicos y perfectamente acoplados, a continuación vamos a analizar más en detalle la vía canónica de Wnt. En ella, el *Dishevelled* (DVL) de unión interrumpe la destrucción del complejo β -catenina (GSK-3 β , APC y axina), evitando así la fosforilación de β -catenina y su consecuente degradación, permitiendo la acumulación de β -catenina en el citoplasma. Posteriormente β -catenina se transloca al núcleo donde forma un complejo transcripcionalmente

activo que conduce a la expresión de genes *target* Wnt. Un paso clave en la activación transcripcional es la formación del complejo entre β -catenina y los miembros del factor de células T (TCF)/factor potenciador linfoide (LEF) de la familia de factores de transcripción. Los miembros de la familia TCF solos no tienen funciones de activación transcripcional y están ligados a inhibidores como Groucho, CtBP o HBP1. Para generar un complejo transcripcionalmente activo, el complejo TCF/ β -catenina recluta la proteína co-activador transcripcional de unión CREB-(CBP) o sus estrechamente relacionados homólogos p300, así como otros componentes de la maquinaria de transcripción basal, para iniciar la transcripción (Yan y cols., 2013 ; Kahn, 2014 ; Ring y cols., 2014 ; Prakash y Anandakumar, 2014).

I.7. TIPOS DE CÁNCER ASOCIADOS A LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

PI3K/Akt/mTOR Y WNT/ β -CATENINA

Como se ha expuesto anteriormente, entre las muchas vías de señalización implicadas en el proceso carcinogénico las vías del PI3K/Akt/mTOR y Wnt/ β -catenina adquieren especial relevancia (Qazi y cols., 2013).

La vía de señalización de la PI3K/Akt/mTOR regula diversas funciones celulares que también son críticas durante la formación del tumor: proliferación crecimiento y supervivencia celular, así como la movilidad, angiogenesis y metabolismo celular. De hecho, esta vía de señalización se encuentra aberrantemente activada en un 30-50% de los cánceres como se aprecia en la Tabla I.4 (Qazi y cols., 2013; Mоргensztern y McLeod, 2005).

Tabla I.4. Relación de cánceres asociados a las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR y Wnt/ β -catenina.

Tipos de cáncer asociado a la vía de señalización*		
	PI3K/Akt/mTOR	Wnt/β-catenina
Cabeza y cuello	X	X
Colorrectal	X	X
Endometrio	X	X
Esofágico		X
Gástrico		X
Glandula suprarrenal		X
Hematológicos	X	X
Hígado	X	X
Mama	X	X
Óseo		X
Ovario	X	X
Páncreas	X	X
Piel		X
Próstata	X	X
Pulmón	X	X
Riñón		X
Sarcoma		X
Tiroide	X	X
Útero	X	X
Vías urinarias	X	

* Referencias Tabla I.4. : Cabeza y cuello (Matta y cols., 2009; Chen y cols., 2013; Khan y Bauman, 2014; Simpson y cols., 2014; Monsalves y cols., 2014) , colorrectal (Bienz y Clevers, 2000; Johnson y cols., 2010), endometrio (Dellinger y cols., 2012; Dong y cols., 2014), esofágico (Wang y Shan, 2009; Jiang y Wang, 2010), gástrico (White y cols., 2012), glandula suprarrenal (El Wakil y Lalli, 2011), hematológicos (Wang y cols., 2009; Kawauchi y cols., 2009; Martelli y cols., 2009; Blachly y Baiocchi, 2014), hígado (Tommasi y cols., 2007; Buitrago-Molina y Vogel, 2012; Liu y cols., 2014; Ma y cols., 2014), mama (King y cols., 2012; Hosford y Miller, 2014), óseo (Tian y cols., 2014), ovario (Arend y cols., 2013; Ali y cols., 2014; Zhao y Shao, 2014), páncreas (Cui y cols., 2012; Wolin, 2013; Cui y Li, 2013; Duan y cols., 2014), piel (Han y Na, 2011; Lucero y cols., 2010), próstata (Gao y cols., 2003; Wang y cols., 2009; Kypta y Waxman, 2012; Tang y Ling, 2014), pulmón (Papadimitrakopoulou, 2012; Sarris y cols., 2012; Gadgeel y Wozniak, 2013; Cheng y cols., 2014; Stewart, 2014), riñón (Banumathy y Cairns, 2010), sarcoma (Cassier y cols., 2010), tiroide (Sastre-Perona y Santisteban, 2012; Manfredi y cols., 2014), útero (Chung y cols., 2009; Hayes y Ellenson, 2010), vías urinarias (Houede y Pourquier, 2015).

Esta activación patológica deriva en mutaciones puntuales, amplificaciones de señal, e inactivación de genes supresores de tumores, lo que pone en marcha el proceso carcinogénico. Asimismo, esta vía de señalización ha sido relacionada con fenómenos de resistencia al tratamiento convencional con agentes quimioterápicos (Wang y cols., 2014), por lo que inhibidores que actúan a distintos niveles de esta vía de señalización han demostrado ser prometedores agentes quimioterápicos, ya que reducen la proliferación y promueven la muerte celular (Georgakis y Younes, 2006; Bauer y cols., 2015). De hecho, la *Food and Drug Administration* (FDA) ya ha aprobado el uso de los primeros inhibidores de esta vía de señalización, los inhibidores mTOR. Concretamente se trata del inhibidor mTOR everolimus aprobado para el tratamiento del carcinoma renal, tumores neuroendocrinos pancreáticos y la esclerosis tuberosa (Lim y cols., 2014; Bauer y cols., 2015).

Por otro lado, alteraciones en la vía de señalización de Wnt/ β -catenina también están relacionadas con numerosos procesos cancerosos (Tabla I.4), ya que esta vía de señalización regula importantes procesos que guardan relación con la progresión del cáncer, tales como: iniciación y crecimiento del tumor, senescencia y muerte celular, así como la diferenciación celular y la metástasis (Anastas y Moon, 2013).

La β -catenina, componente clave de esta vía de señalización, juega un papel crucial en la regulación de la proliferación celular, lo que le ha convertido en una diana prometedora para la búsqueda de nuevos agentes quimiopreventivos y quimioterápicos (Dihlmann y von Knebel Doeberitz, 2005).

Diversas moléculas que afectan a esta vía de señalización se hallan en diferentes fases de estudio clínico, aunque ninguna está aprobada por la FDA. Sin embargo, lo que sí ha autorizado es la redirección de fármacos para otras indicaciones basándose en su actividad inhibitoria de la vía de señalización del Wnt/ β -catenina. Este es el caso, de los anti-helmínticos pyrvinium y niclosamide empleados ambos en el tratamiento del CRC (Mook y cols., 2013; Li y cols., 2014). Otro ejemplo lo encontramos en la clofazimina, fármaco anti-leproso redirigido al tratamiento del cáncer de mama (Blagodatski y cols., 2014). Finalmente, otro ejemplo lo encontramos en los AINEs (ácido acetilsalicílico y sulindac) e inhibidores selectivos de la COX-2 que se emplean en la quimioprevención del CRC en pacientes con EII (enfermedad intestinal inflamatoria) (Kim y cols., 2014).

1.7.1. Cáncer de colon

El CCR es uno de los cánceres más comunes en todo el mundo, con una incidencia de más de un millón de nuevos casos por año (Kumar y cols. 2012). A pesar de la herencia familiar, factores ambientales como mutágenos asociados a la alimentación, enfermedades como la inflamación intestinal crónica o agentes comensales y patógenos intestinales específicos, contribuyen al desarrollo del CCR (Kumar y cols., 2012).

El desarrollo del CCR se puede dividir en tres etapas distintas: iniciación, que altera el mensaje molecular de una célula normal, seguido de promoción y progresión, donde finalmente aparece la célula maligna transformada presentando un fenotipo alterado. La progresión del CCR desde el epitelio del colon normal al fenotipo maligno se acompaña de numerosas alteraciones genéticas. Partiendo de la poliposis adenomatosa

coli (APC), pasando por pólipos, adenomas hasta llegar a los carcinomas, la pérdida de función de la APC es la primera señal de alarma en la patogénesis del CCR (Kumar y cols., 2012).

El tratamiento de las distintas etapas del CCR, actualmente prevee el empleo de los siguientes principios activos: 5-fluorouracilo (coadministrado con la *leucovorina*, derivado del ácido fólico), *capecitabina*, irinotecan y oxaliplatin. Normalmente estos medicamentos se utilizan combinados para potenciar su efecto y en ciclos de 2 a 4 semanas de duración con períodos de descanso para permitir la recuperación del paciente frente a un tratamiento bastante agresivo.

En caso de metástasis se emplean también los llamados anticuerpos monoclonales tales como el cetuximab, bevacizumab, regorafenib, aflibercept y panitumumab (<http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-treating-chemotherapy>). La activación aberrante de las vías de señalización de PI3K/Akt/mTOR y Wnt/ β -catenina han sido relacionadas con el proceso tumorgénico del CCR. De hecho, un 60-70% de los cánceres de colon humanos presentan activación en el Akt (Mattmann y cols., 2011; Wang y cols., 2014), mientras que la vía canónica de la Wnt/ β -catenina presenta mutaciones en aproximadamente el 90% de los CCRs. Estas alteraciones se localizan principalmente en el gen APC y en los genes que codifican a la β -catenina. Al activarse la vía de señalización Wnt/ β -catenina se produce la acumulación de β -catenina en el núcleo (detectada en > 80% de los tumores de CRC). Estos altos niveles de β -catenina nuclear además se relacionan con un mal pronóstico en pacientes con CRC (Phelps y cols., 2009; Sebio y cols., 2014; Yang y cols., 2014 Kumar y cols., 2012).

Por todo lo anteriormente expuesto, el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la inhibición de estas vías de señalización se ha convertido en un reto atractivo para la industria farmacéutica.

Se han descrito diferentes compuestos capaces de inhibir la activación de la del PI3K/Akt/mTOR, tanto de origen natural (licopeno, ácido elálgico, silibinina, epicatequina-gallate, procianidina B2, cannabidiol y deguelina) como sintético (celecoxib, sulidac, ETP-46321, piroxicam, aspirin, 3-chloroacetyl-indole y rapamicina) (Kim y cols., 2014). Asimismo, compuestos naturales (enigmal, luteolina, magnolol, berberina, epicatequina-gallate, curcumina, licopeno, genisteína, triptólido, quercetina y resveratrol) y sintéticos (celecoxib, aspirin, sulidac, ibuprofen) han sido también empleados en CCR actuando a través de la inactivación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Phelps y cols., 2014).

A pesar de las diferentes dianas terapéuticas frente al cáncer colorectal la inhibición del Akt, mTOR y β -catenina son hoy en día una prometedora estrategia para la industria farmacéutica. Este hecho, se puede constatar en los numerosos ensayos preclínicos y clínicos que se han o se están llevando a cabo en este ámbito farmacológico. Entre estos, podemos resaltar en el campo del CCR a los inhibidores duales PI3K/mTOR (menos propensos a inducir resistencia a los medicamentos que los inhibidores de una sola quinasa): GSK2126458, NVP- BEZ235, DS 7423 y BEZ235 (Pal y cols., 2010) los inhibidores del Akt: perifosine (KRX-0401), MK2206, RX-0201, PBI-05204 y GSK2141795 (Pal y cols., 2010; Kim y Eng, 2012) y los inhibidores de mTOR: rapamicina y sus derivados (temsirolimus, everolimus, ridaforolimus y deforolimus) que interrumpen la actividad

mTORC1, probablemente los que más rápidamente han alcanzado una aplicación terapéutica en muchos tipos de cáncer (Roychowdhury y cols., 2010). De hecho, temsirolimus y everolimus están aprobados para el carcinoma metastásico de células renales y tumores neuroendocrinos pancreáticos, siendo en general bien tolerados y seguros. Además de los análogos de la rapamicina, otros inhibidores de quinasa/mTOR, como INK128, están actualmente en ensayos clínicos para tumores sólidos avanzados (Francipane y Lagasse, 2014).

A pesar de que los inhibidores mTOR son los más estudiados, bien tolerados y eficaces, se ha descubierto que éstos provocan una activación del Akt como consecuencia de la inhibición del mTOR, por lo que inhibidores duales Akt/mTOR serían un reto terapéutico alentador. En la actualidad, para evitar este efecto se están empleando combinados con otros agentes citotóxicos en el tratamiento del CRC (Francipane y Lagasse, 2014).

Por último, también encontramos distintos compuestos que actúan a través de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina y que están siendo estudiados en fase de estudio clínico o preclínico frente a cáncer colorrectal: genisteina, PRI-724, CWP232291, 2,4-diamino-quinazolina, LGK 974, FOXY-5, OMP-54F28, OMP-18R5 y OTSA101 (Sebio y cols., 2014).

I.7.2. Cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CP) es la segunda neoplasia maligna más común en hombres en todo el mundo. La Sociedad Americana del Cáncer estima que habrá 220 800 nuevos casos y 27 540 muertes asociados al cáncer de próstata en los Estados Unidos durante el 2015.

Afirman además que a 1 de cada 7 hombres le será diagnosticado cáncer de próstata durante su vida (<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003134-pdf.pdf>). La incidencia de la enfermedad ha aumentado en los últimos años, en parte debido a la difusión del test de detección precoz basado en el antígeno prostático específico (PSA). Gracias a esto, aproximadamente el 90% de los pacientes de EE.UU. con CP presentan la enfermedad localizada en el momento del diagnóstico, por lo que disfrutan de un pronóstico excelente (Edlind y Hsieh, 2014), sin embargo, tras 5 años, un 30% de los pacientes tratados muestran un aumento de los niveles de PSA y la recurrencia de la enfermedad. La mayoría de los cánceres de próstata requieren andrógenos para el crecimiento y son muy sensibles a la terapia supresora de andrógenos (TSA). Sin embargo, esta respuesta es temporal y la mayoría de los pacientes desarrollan inevitablemente resistencia a la TSA, que conduce al llamado cáncer de próstata resistente a castración (CRPC) (Edlind y Hsieh, 2014).

De ahí que el cáncer de próstata sea la segunda causa de muerte en hombres en EE.UU. sólo por debajo del cáncer de pulmón, ya que 1 de cada 38 hombres muere por cáncer de próstata (<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003134-pdf.pdf>).

A nivel básico, se puede afirmar que el cáncer de próstata es causado por cambios en el ADN de las células prostáticas así como alteraciones a nivel de oncogenes y genes supresores de tumores, activando o inhibiendo su actividad, respectivamente, y que pueden derivar en crecimiento anormal de las células de la próstata (<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/prostatecancer>). En la actualidad, se emplean distintos fármacos para el tratamiento del cáncer de próstata: abiraterona, bicalutamida, cabazitaxel, degarelix, docetaxel, cabazitaxel, cloruro de radio-223, goserelina, leuprolida, mitoxantrona, prednisona, sipuleucel-T (<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/prostatecancer>). La vía de la fosfatidil-inositol-3-quinasa PI3K/Akt/mTOR es una de las vías de señalización activadas más frecuentemente en las células de cáncer de próstata (30-50% de los cánceres de próstata) (Morgan y cols., 2009). La activación aberrante de esta vía está relacionada no sólo con la supervivencia y metástasis de las células cancerígenas de próstata, sino también con el desarrollo de resistencia a los medicamentos. Como tal, la inactivación selectiva de esta vía puede proporcionar oportunidades para atacar el cáncer de próstata desde distintos frentes (Tang y Ling, 2014). Incluso, existe la evidencia de que la vía de señalización del PI3K-Akt-mTOR tiene un papel clave en el desarrollo y mantenimiento de la CRPC, ya que esta vía se encuentra alterada en el 100% de los pacientes con CRPC (Edlind y Hsieh, 2014).

Por todo lo expuesto anteriormente, no es de extrañar que la industria farmacéutica haya focalizado esfuerzos en desarrollar nuevos inhibidores de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR para el tratamiento o co-tratamiento junto a inhibidores de AR del cáncer de próstata (Kypta y Waxman, 2012); destacando inhibidores del Akt como el MK2206 y el GDC-0068, los cuales se encuentran en fase de ensayos clínicos iniciales en combinación con bicalutamida o acetato de abiraterona. También se encuentran en fase clínica los inhibidores duales de PI3K/mTOR BEZ235 y GDC-0980, con el objetivo de tratar a pacientes metastásicos con CRPC y se están ensayando en administración individual o en combinación con acetato de abiraterona (Edlind y Hsieh, 2014; Wozney y Antonarakis, 2014).

Por último, cabe destacar el papel de los inhibidores de mTOR (everolimus, temsirolimus, ridaforolimus). Éstos son objeto de distintos ensayos clínicos frente a cáncer de próstata con excelentes resultados fundamentalmente en combinación con otros agentes quimioterápicos (docetaxel, abiraterona), ya que se ha descubierto un efecto rebote de activación de la vía PI3K tras la inhibición de mTOR. De ahí que las estrategias de inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR estén en la actualidad ligadas a la búsqueda de inhibidores duales PI3K/mTOR o Akt/mTOR (Wozney y Antonarakis, 2014).

Además de la vía de señalización de la PI3K/Akt/mTOR otras vías están estrechamente relacionadas con el desarrollo y progresión del cáncer de próstata. Este es el caso de la vía de señalización del Wnt/ β -catenina. Hoy en día se conoce la interacción existente entre la β -catenina y el receptor androgénico, lo que sugiere una interrelación entre la vía de señalización androgénica y la vía del Wnt (Verras y Sun, 2006; Kypta y Waxman, 2012), hecho que queda demostrado con la interacción proteína-proteína existente entre el receptor androgénico (RA) y la β -catenina, que resulta en un aumento de la actividad transcripcional del RA (Kypta y Waxman, 2012).

A la vista de lo expuesto anteriormente, el objetivo principal de la presente Tesis es el descubrimiento de nuevos agentes quimiopreventivos frente a cáncer, utilizando la TM. Para ello se siguieron las siguientes etapas:

- Obtención y validación de modelos topológico-matemáticos para la identificación de inhibidores Akt/mTOR y β -catenina.
- Identificación de compuestos con actividad quimiopreventiva relacionada con la inhibición de las vías de activación PI3K/Akt/mTOR y Wnt/ β -catenina.
- Validación experimental de los compuestos seleccionados mediante ensayos *in vitro*.
- Valoración de la capacidad quimiopreventiva *in vivo* de los compuestos seleccionados.

MATERIAL Y MÉTODOS

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. OBTENCIÓN DE LOS MODELOS TOPOLÓGICOS

La obtención de los modelos topológicos se basa en la relación cuantitativa existente entre la estructura química de una determinada molécula, caracterizada a través de sus índices topológicos (o top-químicos), y una determinada actividad biológica.

En rasgos generales se seguirán varias etapas para la obtención de el/los modelo/s de predicción (Figura II.1):

- 1) Construcción de una base datos formada por moléculas que modulen una determinada diana biológica (datos experimentales).
- 2) Cálculo de los descriptores asociados a la estructura molecular de los compuestos que conforman nuestra base de datos.
- 3) División de la base de datos, asignando un grupo de compuestos al grupo de entrenamiento (*training set*) y otro al grupo de prueba (*test set*). El *test set* servirá para evaluar la capacidad predictiva del modelo, o sea su capacidad para predecir los valores asociados a compuestos no empleados en la obtención del modelo, es decir, fuera del grupo de entrenamiento.
- 4) Obtención del modelo aplicando distintas técnicas estadísticas: análisis lineal discriminante (ALD), análisis de regresión multi-lineal (ARML) y redes neuronales artificiales (RNA).
- 5) Validación del modelo: interna y/o externa.

Tras obtener y validar el modelo de predicción, se puede aplicar al rastreo de bases de datos para identificar nuevas moléculas con la actividad biológica deseada.

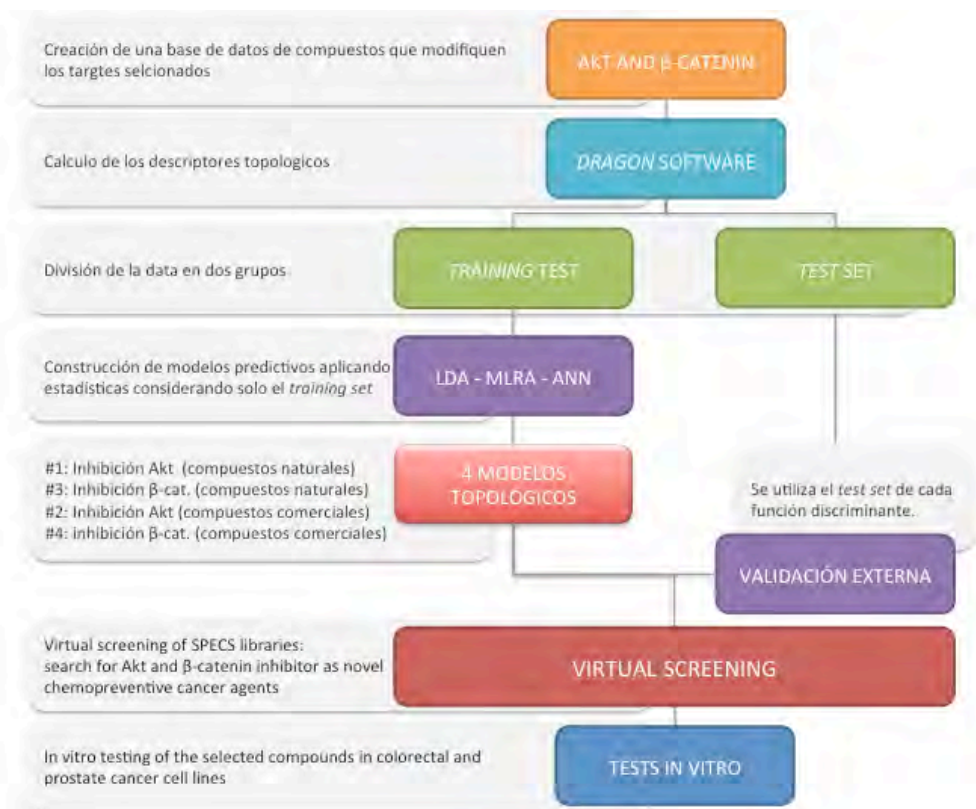


Figura II.1. Etapas en el desarrollo y validación de los modelos de predicción.

II.1.1. Construcción de la base de datos y división de los compuestos entre grupo de entrenamiento y test

Una de las claves a la hora de elaborar un modelo QSAR fiable es la creación de una buena base de datos. Para la obtención de los distintos modelos de predicción de actividad quimioterápica y quimiopreventiva, nos centramos en la búsqueda de compuestos heterogéneos estructuralmente que modulasen la vía de la PI3K/Akt/mTOR y la de Wnt/β-catenina. Dentro de los compuestos incluimos los de origen natural y los de síntesis.

Tras obtener información cualitativa y cuantitativa de la inhibición de estas dianas farmacológicas, se procedió a la construcción de los modelos de predicción para la selección de moléculas con teórica actividad quimiopreventiva y quimioterapéutica frente a cáncer colorrectal y cáncer de próstata.

En primer lugar, se elaboraron cuatro modelos de predicción cualitativa de actividad inhibitoria frente a Akt y β -catenina. Con este fin, se dividió la base de datos total disponible, asignando el 20-35% de ésta al grupo test y el restante al grupo entrenamiento. El grupo entrenamiento o *training set* está formado por el grupo de compuestos a partir de los cuales se construye el modelo. El grupo de entrenamiento actuará de patrón, definiendo el “espacio químico” de aplicación del modelo, es decir, su dominio de aplicación. A continuación, vamos a describir los cuatro modelos de predicción cualitativa de actividad inhibitoria Akt y β -catenina.

El modelo 1 está centrado en la actividad inhibitoria sobre Akt por parte de compuestos de origen natural. Para su elaboración se creó una base de datos de 194 compuestos (40 activos y 154 inactivos como inhibidores del Akt de origen natural) con alta heterogeneidad estructural. Para la recolección de esta base de datos se emplearon distintas fuentes procedentes de la literatura¹ y de una base de datos comercial de productos naturales llamada *MicroSource Pure Natural Products Collection* (*Microsource website*, 2015).

¹ McGuire y cols., 2001; Woo y cols., 2004; Yoon y cols., 2006; Lambert y cols., 2007; Merla y cols., 2007; Morikawa y cols., 2008; Wang y cols., 2009; Oh y cols., 2009; Hwang y cols., 2010; Zhao y cols., 2010; Xiaonan y cols., 2011; Choo y cols., 2011; Merhi y cols., 2011; Buitrago y cols., 2012; Park y cols., 2012; Liu y cols., 2012; Shanmugam y cols., 2012; Kwak y cols., 2013; Xu y cols., 2013; Do y cols., 2013; Raina y cols., 2013; Xie y cols., 2014; Jayasooriva y cols., 2014; Pandev y cols., 2014; Saiprasad y cols., 2014; Dung y cols., 2014; Chen y cols., 2014; Bajer y cols., 2014; Wolle y cols., 2014; Deeb y cols., 2014; Song y cols., 2014; Esmaeili y Farimani, 2014; Ou y cols., 2014; Jin y cols., 2014; Huang y cols., 2014; Syed y cols., 2014 ; Hou y cols., 2015.

Por su parte, el modelo 2 está enfocado a la predicción de la actividad inhibitoria sobre Akt, por parte de compuestos comerciales. Para construirlo se partió de una base de datos formada por 852 compuestos (26 activos y 826 inactivos) con una gran heterogeneidad estructural. Distintas fuentes procedentes de la literatura² y dos bases de datos comerciales: *MicroSource Pure US Drugs Collection* (Microsource website, 2015) y *Selleckchem database* (Selleckchem website, 2015), se rastrearon para la elaboración de la base de datos.

El modelo 3 se centra en la actividad inhibitoria sobre β -catenina por parte de compuestos de origen natural. Para su construcción se empleó una base de datos de 180 compuestos heterogéneos estructuralmente (60 activos y 120 inactivos). También en este caso se partió de diversas fuentes bibliográficas³ y de la base de datos comercial de productos naturales *MicroSource Pure Natural Products Collection* (MicroSource web, 2015), citada anteriormente.

² Böckmann y Nebe, 2003; Jin y cols., 2004; Zhang y cols., 2004; Scartabelli y cols., 2008; Garcia-Echeverria y Sellers, 2008; Hu y cols., 2008; Krech y cols., 2010; Meuillet y cols., 2010; Prinz y cols., 2011; Jeon y cols., 2011; Tabernero y cols., 2011; Makhov y cols., 2012; Ma y cols., 2013; Li y cols., 2013; Toulany y cols., 2014.

³ Chen y cols., 2000; Deng y cols., 2002; Dihlmann y cols., 2003; Kawabata y cols., 2006; Xiao y cols., 2006; Liagre y cols., 2007; Yoshimitsu y cols., 2009; YuJun y cols., 2009; Su y Simmen, 2009; Baskar y cols., 2010; Li y cols., 2010; Saifo y cols., 2010; Choi y cols., 2010; Wei y cols., 2010; Xia y cols., 2010; Thamilselvan y cols., 2011; Pang y cols., 2011; Chinni y cols., 2011; Wang y cols., 2012; Li y Hannah, 2012; Lu y cols., 2012; Lu y cols., 2012; Chen y cols., 2012; Liu y cols., 2013; Park y cols., 2013; Vanella y cols., 2013; Lee y cols., 2013; Su y cols., 2013; Lee y cols., 2013; Wang y cols., 2013; Li y cols., 2013; Cui y cols., 2014; Way y cols., 2014; Joo y cols., 2014; Wang y cols., 2014; Kim y cols., 2014; Choi y cols., 2014; Mojsin y cols., 2014; Fu y cols., 2014; Lee y cols., 2014; Antony y cols., 2014; Kim y cols., 2014; Lin y cols., 2014; Jia y cols., 2015.

Por último, el modelo 4 se centró en la actividad inhibitoria sobre β -catenina por parte de compuestos comerciales. Este modelo se construyó partiendo de una base de datos de 1.254 compuestos (110 activos y 1.144 inactivos como inhibidores de la β -catenina) que poseían heterogeneidad estructural.

Se rastrearon diversas fuentes provenientes de la literatura⁴ y dos bases de datos comerciales: *MicroSource Pure US Drugs Collection* (*MicroSource web*, 2015) y *Selleckchem database* (*Selleckchem web*, 2015).

Cabe resaltar el hecho de que mientras es posible asegurar la actividad inhibitoria sobre Akt o β -catenina de los compuestos pertenecientes al grupo de activos, no así la de los compuestos pertenecientes al grupo de inactivos, ya que no hay certeza de que hayan sido testados frente a Akt (simplemente no hay descrita dicha actividad en la literatura). Esta circunstancia es de aplicación a cualquier otro grupo de compuestos y de actividades para los que no haya constancia expresa de inactividad, sin embargo, como el volumen de compuestos inactivos es muy superior al de activos, el riesgo de error al incluirlos en el grupo de inactivos es despreciable.

⁴ Blum y cols., 2001; Haegele y cols., 2003; Gardner y cols., 2004; Roy y cols., 2005; Canter y cols., 2005; Lu y cols., 2005; Hara y cols., 2005; Suzuki y cols., 2006; Katoh y Katoh, 2007; Raju y Bird, 2007; Behari y cols., 2007; Han y cols., 2008; Fila y cols., 2008; Dehnhardt y cols., 2009; Shan y cols., 2009; Leow y cols., 2010; Xiong y cols., 2010; Panno y cols., 2010; Piazza y cols., 2010; Kaur y Sanyal, 2010; Brown y cols., 2010; Greenspan y cols., 2011; Wang y cols., 2011; Watson, 2011; Suh y cols., 2011; Li y cols., 2011; Syed y cols., 2011; Wang y cols., 2011; Lee y cols., 2011; Tenbaum y cols., 2012; Olivier-Van Stichelen y cols., 2012; Hallett y cols., 2012; Mologni y cols., 2012; Huang y cols., 2012; Stein y cols., 2012; Yadav y cols., 2012; Sundram y cols., 2012; Jiang y cols., 2012; Zeller y cols., 2013; Anitha y cols., 2013; Singh y Katiyar, 2013; Li y cols., 2013; Lee y cols., 2013; Bilir y cols., 2013; Mao y cols., 2013; Matsuzaki y Darcha, 2013; Mao y cols., 2013; Tinsley y cols., 2013; Liu y cols., 2014; Liu y cols., 2014; Arensman y cols., 2014; Pradhan y Olsson, 2014; Kaza, 2014; Wang y cols., 2014; Saini y Sanyal, 2014; Muche y cols., 2014; Way y cols., 2014.

Con el objeto de correlacionar valores cuantitativos de inhibición frente a Akt y β -catenina, se construyeron dos modelos de regresión multilínea (modelo 5 y 6), usando información presente en la base de datos comercial *Selleckchem* (*Selleckchem web*, 2015) y en la literatura (Lepourcelet y cols., 2004).

El modelo 5, se elaboró a partir de un grupo de 7 compuestos para los que se disponía de datos experimentales de concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) (nM) frente a Akt1, mientras que el modelo 6 se elaboró a partir de un grupo de 6 pequeños antagonistas de β -catenina con cierta diversidad estructural de los que se disponía de datos experimentales de CI_{50} (μ M) (Lepourcelet y cols., 2004).

En el caso particular de los modelos 5 y 6 se prefirió partir de una data pequeña para garantizar la homogeneidad de resultados, evitando la recolección de datos experimentales procedentes de distintos autores que pudiera inducir a error o malinterpretación de resultados. De esa forma se evita el fenómeno llamado “garbage in, garbage out”, que se traduciría como “si entra basura, saldrá basura”.

Finalmente, se emplearon técnicas de regresión no-lineal para los modelos de inhibición de Akt y β -catenina. La inhibición de Akt se representó por medio del modelo 7, cuyo grupo de entrenamiento está formado por 164 compuestos (33 inhibidores de Akt y el resto no inhibidores de Akt con distintas actividades farmacológicas: antiinflamatorios y anti-neoplásicos).

Para la recolección de los compuestos pertenecientes al grupo de entrenamiento se partió de distintas fuentes bibliográficas⁵ y de dos bases de datos comerciales: *MicroSource Pure US Drugs Collection* (*MicroSource web*, 2015) y *Selleckchem database* (*Selleckchem web*, 2015).

Por último, la inhibición de β -catenina se predijo aplicando técnicas estadísticas no-lineares a través de las cuales se obtuvo el modelo 8, en el que, el grupo de entrenamiento está constituido por 199 compuestos (85 inhibidores de la β -catenina y el resto no inhibidores con actividades farmacológicas antiinflamatorias y antineoplásicas).

Se consultaron distintas fuentes procedentes de la literatura⁶ y dos bases de datos comerciales: *MicroSource Pure US Drugs Collection* (*MicroSource web*, 2015) y *Selleckchem database* (*Selleckchem web*, 2015) para la elaboración del grupo de entrenamiento.

⁵ Chen y cols., 2000 ; Deng y cols., 2002; Dihlmann y cols., 2003 ; Kawabata y cols., 2006; Xiao y cols., 2006; Liagre y cols., 2007; Yoshimitsu y cols., 2009 ; YuJun y cols., 2009 ; Su y Simmen, 2009; Baskar y cols., 2010; Li y cols., 2010; Saifo y cols., 2010; Choi y cols., 2010; Wei y cols., 2010; Xia y cols., 2010 ; Thamilselvan y cols., 2011; Pang y cols., 2011; Chinni y cols., 2011; Wang y cols., 2012; Li y Hannah, 2012; Lu y cols., 2012; Lu y cols., 2012; Chen y cols., 2012; Liu y cols., 2013; Park y cols., 2013; Vanella y cols., 2013; Lee y cols., 2013; Su y cols., 2013; Lee y cols., 2013; Wang y cols., 2013; Li y cols., 2013; Cui y cols., 2014; Way y cols., 2014; Joo y cols., 2014; Wang y cols., 2014; Kim y cols., 2014; Choi y cols., 2014; Mojsin y cols., 2014; Fu y cols., 2014; Lee y cols., 2014; Antony y cols., 2014; Kim y cols., 2014; Lin y cols., 2014; Jia y cols., 2015.

⁶ Blum y cols., 2001; Haegele y cols., 2003; Gardner y cols., 2004; Roy y cols., 2005; Canter y cols., 2005; Lu y cols., 2005; Hara y cols., 2005; Suzuki y cols., 2006; Katoh y Katoh, 2007; Raju y Bird, 2007; Behari y cols., 2007; Han y cols., 2008; Fila y cols., 2008; Dehnhardt y cols., 2009; Shan y cols., 2009; Leow y cols., 2010; Xiong y cols., 2010; Panno y cols., 2010; Piazza y cols., 2010; Kaur y Sanyal, 2010; Brown y cols., 2010; Greenspan y cols., 2011; Wang y cols., 2011; Watson, 2011; Suh y cols., 2011; Li y cols., 2011; Syed y cols., 2011; Wang y cols., 2011; Lee y cols., 2011; Tenbaum y cols., 2012; Olivier-Van Stichelen y cols., 2012; Hallett y cols., 2012 ; Mologni y cols., 2012; Huang y cols., 2012; Stein y cols., 2012; Yadav y cols., 2012; Sundram y cols., 2012; Jiang y cols., 2012; Zeller y cols., 2013; Anitha y cols., 2013; Singh y Katiyar, 2013; Li y cols., 2013; Lee y cols., 2013; Bilir y cols., 2013; Mao y cols., 2013; Matsuzaki y Darcha, 2013; Mao y cols., 2013; Tinsley y cols., 2013; Liu y cols., 2014; Liu y cols., 2014; Arensman y cols., 2014; Pradhan y Olsson, 2014; Kaza, 2014; Wang y cols., 2014; Saini y Sanyal, 2014; Muche y cols., 2014; Way y cols., 2014.

II.1.2. Cálculo de descriptores moleculares

Para el cálculo de los descriptores moleculares (índices topológicos y topo-químicos) incluidos en la elaboración de los modelos, se empleó el software comercial *Dragon* (versión académica 5) desarrollado en la Universidad de Milán por el profesor Roberto Todeschini y colaboradores (Todeschini y Consonni, 2008). Con este fin se representaron las moléculas en formato MDL (.mol) sin presencia de hidrógenos. En cuanto a los índices utilizados, se pueden dividir en 6 grandes grupos:

- Descriptores topológicos:

Los índices topológicos ya descritos en el apartado de la Introducción, se obtienen a partir de las matrices topológicas de adyacencia y de distancia. Concretamente para la construcción de los modelos de la presente Tesis se emplearon: el índice de Pogliani (D^2) (Pogliani, 1996), el primer índice de Zagreb (ZM1) (Gutman y cols., 1975), el índice de Wiener de todos los caminos (Wap) (Lukovits, 1998), la suma de las distancias topológicas entre los átomos de oxígeno (O) y Bromo (Br)) (T(O-Br)); entre los átomos de nitrógeno (N) y cloro (Cl) T(N-Cl); entre los átomos de azufre (S) y azufre (S) T(S-S); entre los átomos de azufre (S) y flúor (F) T(S-F) (Todeschini y Consonni, 2008); la modificación alfa del índice de doble camino de Kier (S2K) y de triple camino de Kier (S3K) (Kier, 1985) y por último, D/Dr12: índice que representa el cociente de la distancia/detour (o distancia desviada) para anillos de orden 12 (Todeschini y Consonni, 2008).

- Índices relacionados con el concepto de ruta o camino topológico (*walk and path counts*):

Este tipo de descriptores se basan en el recuento de los caminos topológicos dentro de un grafo. Es decir, el número de aristas que conectan dos vértices determinados, guardando también relación con algunos conceptos relacionados con la matriz de distancias topológicas.

Los descriptores pertenecientes a esta clase empleados en la presente Tesis fueron: índices SRW08 y SRW09 (número de caminos de auto-retorno de orden 8 y 9, respectivamente) (Ruecker y Ruecker, 1993); MPC04, MPC08, MPC09, MPC10 (número total de caminos de orden 4,8,9 y 10, respectivamente) (Rücker y Rücker, 2000), piPC02 y piPC05 (número de caminos múltiples de orden 2 y 5, respectivamente) (Randić y Jurs, 1989); PCR (cociente entre el número de enlaces múltiples y el número total de enlaces) (Randić y Wilkins, 1979) y el nCIR (número de circuitos) (Todeschini y Consonni, 2008).

- Índices de conectividad:

Son unos de los índices topológicos más empleados, que se han descrito anteriormente en el apartado de Introducción de la presente Tesis.

Para la elaboración de los modelos empleamos: el X2sol, índice de conectividad de solvatación de orden 2 (Kier y Hall, 1986), que evalúa la entalpía de solvatación inespecífica.

- Descriptores constitucionales:

Los descriptores constitucionales son los más simples y más comúnmente usados, reflejan la composición molecular constitutiva de un compuesto sin aportar información relacionada con su geometría o topología. Algunos de los descriptores constitucionales más comunes son: número de átomos, número de enlaces, número absoluto y relativos de un determinado átomo, número absoluto y relativo de enlaces simples, dobles, triples o aromáticos, número de ciclos, número de bencenos, masa molecular.

Estos índices son insensibles a cualquier cambio conformacional, no son capaces de distinguir entre isómeros siendo por tanto, descriptores 0D o 1D (Todeschini y Consonni, 2008).

Concretamente, en estos modelos se emplean los siguientes descriptores constitucionales: nR06 y nR09 (número de anillos de 6 y 9 enlaces, respectivamente), nN (número de átomos de nitrógeno) y el SCBO, (suma de órdenes de enlace convencionales-sin considerar hidrógenos) (Randić y cols., 1980).

- Índices calculados a partir de la autocorrelación de una función:

Como su nombre indica, se basan en los autovalores (o valores propios) de la matriz topológica correspondiente al grafo en cuestión. Como se expresaba anteriormente (apartado de Introducción), los autovalores son las soluciones al polinomio característico de la matriz.

En este trabajo, empleamos los índices: EEig11r (que corresponde al autovalor número 11 de la matriz de adyacencia de aristas ponderada por integrales de resonancia); EEig11x (autovalor número 11 de la matriz de adyacencia de aristas ponderada por orden de enlace); EEig04d, (autovalor número 4 de la matriz de adyacencia de aristas ponderada por momentos dipolares); ATS6v: índice de autocorrelación de Broto-Moreau para distancia topológica igual a 6 ponderado por el volumen de van de Waals; GATS1v, GATS2v, GATS3v, GATS6v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 1, 2, 3, y 6 ponderados por volumen de van der Waals, respectivamente; GATS3e, GATS6e, GATS8e: índices de autocorrelación de Geary de retardo 3,6 y 8, respectivamente ponderado por la electronegatividad de Sanderson; MATS3m: índice de autocorrelación de Moran de retardo 3 ponderado por la masa atómica; MATS1v: índice de autocorrelación Moran de retardo 1 ponderado por volumen de van der Waals; MATS6e: índice de autocorrelación de Moran de retardo 6 ponderado por la electronegatividad de Sanderson; GATS4m, GATS8m: índices de autocorrelación Geary de retardo 4 y 8, respectivamente ponderado por la masa atómica; GATS6p: índice de autocorrelación Geary de retardo 6 ponderado por la polarizabilidad atómica; VEA1: autovector suma de coeficientes de la matriz de adyacencia (Todeschini y Consonni, 2008).

- Índices topológicos de carga:

Los índices topológicos de carga fueron introducidos por el grupo de investigación “Unidad de Diseño de Fármacos por Topología Molecular” en 1994 para evaluar las transferencias de carga entre pares de átomos de la molécula (o vértices del grafo). Descritos con anterioridad en el apartado de Introducción, se emplearon para la construcción de los modelos los siguientes índices: GGI4 y GGI8 (índice de carga de orden 4 y 8, respectivamente); JGI1, JGI2, JGI4, JGI5 y JGI10, (índice de carga ponderados por enlace de orden 1, 2, 4, 5 y 10, respectivamente); JGT (índice de carga topológica global); GGI4 y GGI8 (corresponden a las cargas transferidas intramolecularmente a distancia topológica igual a 4 y 8) (Gálvez y cols., 1994).

II.1.3. Métodos estadísticos aplicados en la obtención de los modelos

II.1.3.1. Análisis lineal discriminante (ALD)

El análisis lineal discriminante es una técnica estadística que por medio de la combinación lineal de variables independientes (descriptores moleculares) permite distinguir entre dos o más categorías u objetos. En este caso, moléculas activas o inactivas respecto a una determinada actividad farmacológica. En esencia, el procedimiento seguido en la discriminación consiste en encontrar la función matemática lineal (función discriminante) que ubica en dos regiones distintas del hiperespacio a las dos categorías de moléculas (activas e inactivas).

Esta técnica estadística busca una doble finalidad: clasificatoria y predictiva. Clasificatoria, ya que a partir de una variable dependiente cualitativa o categórica (moléculas activas o no, respecto a una determinada actividad farmacológica) y un conjunto de una o más variables independientes cuantitativas (índices o descriptores moleculares), el ALD permite clasificar a cada molécula objeto de estudio en alguno de los grupos establecidos por la variable dependiente. Además siempre que se aprecie efectiva diferencia entre grupos, el análisis discriminante cumple una finalidad de tipo predictivo, ya que si aplicamos el modelo discriminante a un grupo de moléculas desconocidas podremos predecir si estas poseen o no una determinada actividad farmacológica (Rodríguez y Mora, 2001).

El ALD clasifica a los individuos (moléculas, en este caso) entre los grupos (activas o inactivas) considerando las variables que mejor caracterizan, y por tanto diferencian, a los grupos. Estas variables,

denominadas canónicas o discriminantes, se expresan como combinaciones lineales de las variables originales mediante una función discriminante.

Adoptando la expresión matemática (Furnival, 1971):

$$f = g(X_1, X_2, \dots, X_n)$$

Donde, f , es la función discriminante; $g(X_1, X_2, \dots, X_n)$ son las funciones lineales de las variables discriminantes introducidas en el análisis.

El algoritmo seguido para la selección de los descriptores incluidos en los modelos fué el de Furnival-Wilson (Furnival, 1971), en el que las variables son introducidas paso a paso (*stepwise*) (Van Waterbeemed, 1995), en función de su mayor valor del parámetro de Fisher-Snedecor (F) (James, 2006), el cual, establece la relevancia de las variables candidatas. Es decir, en cada paso, la variable que mayor contribución aporta a la división de los grupos se incorpora en la ecuación discriminante (o se elimina la variable que hace la menor contribución).

A la hora de obtener la función discriminante, podemos considerar que las probabilidades *a priori* de pertenecer a los grupos es para todos la misma, o bien podemos considerar que la probabilidad previa equivale a la proporción de casos que hay en cada grupo. En este caso, seguimos la primera opción.

Así mismo, aplicamos el llamado *Principio de Parsimonia*, el cual expone que cuando dos explicaciones logran explicar una misma observación, la explicación más sencilla será la que se escoge *a priori*. Por lo que a la hora de seleccionar los modelos de la presente Tesis doctoral se seleccionaron aquellos, que con buenas características estadísticas

presentaran el menor número de descriptores y de más fácil interpretación (Vandekerckhove y cols., 2014).

Por último, con el fin de evitar el temido sobreajuste (*overfitting*) del modelo, se siguió una relación de al menos 1:10, entre el número de descriptores incorporados al modelo y el número de compuestos del conjunto de entrenamiento. Es decir, cada variable introducida en el modelo debía de ser capaz de explicar al menos la clasificación o discriminación de 10 compuestos del grupo de entrenamiento para no sacrificar la capacidad predictiva sobre compuestos no utilizados para el entrenamiento (grupo test).

Los criterios empleados a la hora de valorar la bondad y representatividad de las funciones discriminantes fueron:

- Lambda de Wilks (λ):

El parámetro lambda de Wilks (λ) determina la habilidad de la función discriminante para diferenciar entre dos categorías o grupos (en este caso, compuestos activos e inactivos) (Massart y cols., 1988). En un análisis de clasificación en el que se contemplan dos categorías, el λ de Wilks mide las desviaciones que se producen dentro de cada grupo respecto a las desviaciones totales sin distinción de grupos, es decir, como si pertenecieran a un único grupo. Como se aprecia en la expresión matemática:

$$\lambda \text{ Wilks} = \frac{\text{suma de cuadrados intragrupo}}{\text{suma de cuadrados totales}} = \frac{|S|}{|T|}$$

Donde S es la matriz de varianzas-covarianzas combinada, calculada a partir de las matrices de varianzas-covarianzas de cada grupo y T es la matriz de varianzas-covarianzas total calculada sobre todos los casos

como si pertenecieran a un único grupo. Cuando los grupos se encuentren superpuestos en el espacio multidimensional, las desviaciones dentro de cada grupo y totales serán aproximadamente iguales y por tanto λ , tendrá valores próximos a 1; a medida que los grupos se vayan separando, la variabilidad intergrupos aumentará y la variabilidad intragrupos se irá haciendo comparativamente menor respecto a la variabilidad total, llegando a adoptar valores próximos a 0 (Rodríguez y Mora, 2001).

- Distancia de Mahalanobis:

En estadística, la distancia de Mahalanobis mide la distancia de cada caso a la media de todos los casos de la categoría (Srinivasaraghavan y Allada, 2006). En este caso, la distancia de Mahalanobis nos sirve para medir la distancia a la que cada molécula viene clasificada respecto a la media del grupo de moléculas activas o inactivas respecto a una determinada actividad farmacológica (inhibición de Akt o β -catenina). De este modo podemos determinar con qué precisión la molécula es clasificada en uno de los grupos.

- Significación estadística (valor p):

Si el valor de p asociado es inferior al nivel de significación (normalmente 0.05) rechazamos la hipótesis nula (H_0) de igualdad entre los grupos, por lo que la información aportada por la función discriminante es significativa estadísticamente (Massart y cols., 1988).

- Parámetro de Fisher-Snedecor (F):

El parámetro de Fisher-Snedecor (F) viene determinado por una distribución de probabilidad continua que permite detectar la presencia o no de diferencias significativas entre muestras diferentes (James, 2006).

II.1.3.2. Análisis de regresión multilinear (ARML)

Con el fin de correlacionar valores cuantitativos de la propiedad experimental bajo estudio, se desarrollan modelos aplicando la técnica del análisis de regresión multilinear. En ella las variables independientes son los índices topológicos y la variable dependiente, el valor experimental de la propiedad o alguna de sus modificaciones matemáticas (por ejemplo, el $\log\text{Cl}_{50}$ Akt o β -catenina).

A la hora de seleccionar el mejor modelo ARML nos basamos en el coeficiente de correlación múltiple al cuadrado (r^2) o coeficiente de regresión, que representa una medida de la proximidad o de ajuste de la recta de regresión a la nube de puntos. Este término recibe el nombre de bondad de ajuste, definiéndose también como el porcentaje de varianza explicada por la recta de regresión. Adopta valores entre 0 y 1, por lo que $1 - r^2$ nos indica qué porcentaje de las variaciones no se explica a través del modelo de regresión (varianza inexplicada).

El algoritmo seguido para la selección de los descriptores incluidos en el modelo fue el de Furnival-Wilson (Furnival, 1971), en el que las variables con el mínimo valor del parámetro de Mallows (C_p) se seleccionan para formar parte del modelo de regresión (Stone y Mallows).

Además del coeficiente de regresión (r^2), hay que tener en cuenta otros parámetros estadísticos a la hora de valorar la bondad de la ecuación obtenida, como son:

- Error estándar de estimación (EEE):

Este parámetro varía en función del número de compuestos empleados en la elaboración del modelo y viene calculado a partir del cuadrado de la suma de los valores residuales (valor observado menos valor calculado de la propiedad a correlacionar) (Massart y cols., 1988). Se define con la siguiente expresión matemática:

$$EEE = \sqrt{\frac{\sum(\text{residuales})^2}{N - N_v - 1}}$$

Donde N , es el número de compuestos empleados en la elaboración del modelo y N_v , es el número de variables independientes presentes en el modelo. Lógicamente, el mejor modelo es el que muestra un menor error estándar.

- Parámetro de Fisher-Snedecor (F):

Este parámetro descrito anteriormente, adopta valores crecientes cuanto mejor ajuste presenta la ecuación de predicción a los valores experimentales observados.

- Significación estadística (valor p):

Si el p-valor asociado al estadístico es inferior al nivel de significación (normalmente 0.05) rechazamos la hipótesis de que la propiedad a estudio guarde relación con los índices topo-químicos empleados en el modelo de regresión (Massart y cols., 1988).

II.1.3.3. Redes de neuronas artificiales (RNAs)

Uno de los métodos de correlación entre estructura química y propiedad que se están aplicando crecientemente en el descubrimiento de fármacos para el estudio de relaciones no lineales son las redes neuronales (Reutlinger y Schneider, 2012).

La red neuronal artificial (RNA) es un sistema de aprendizaje basado en el funcionamiento del sistema nervioso animal. Se trata de un dispositivo de interconexión de neuronas que colaboran entre sí para producir estímulos de salida basados en distintos algoritmos matemáticos computacionales (Patel, 2013). Es decir, al entrenar a la red, ésta aprende cómo debe comportarse y cuando activar unas unidades de procesamiento u otras al suministrarle una entrada. La mayoría de las RNAs se componen de al menos tres capas - de entrada, ocultas y de salida - (Figura II.2) formadas por neuronas que conforman una arquitectura llamada *perceptrón multicapa* (en inglés, *multilayer perceptron*, MLP). Las capas de neuronas de entrada reciben los datos de los archivos de entrada y la capa de salida envía la información procesada al mundo exterior. Entre las capas de entrada y de salida, puede haber muchas otras ocultas que pueden contener neuronas interconectadas con distintos pesos adoptando distintas estructuras (Patel, 2013). Así mismo, cada neurona tiene asociada una función matemática (función de transferencia), encargada de generar la señal de salida de la neurona a partir de las señales de entrada.

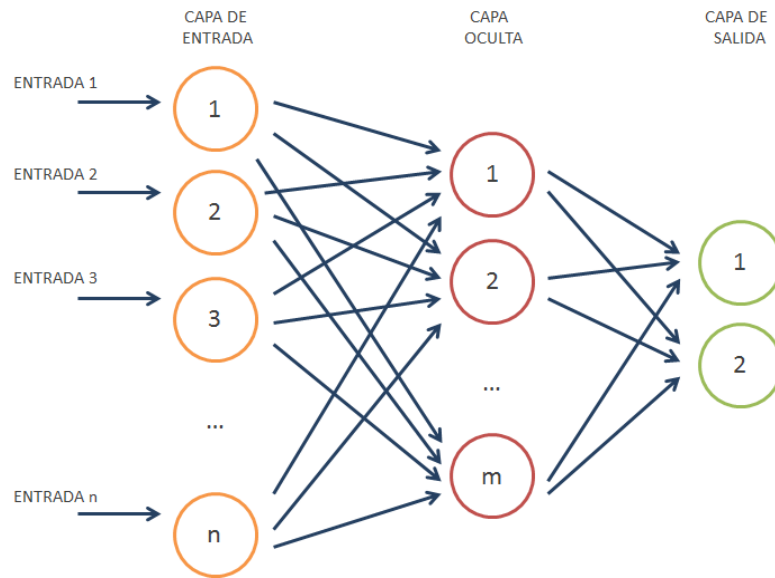


Figura II.2. Ejemplo de red neuronal artificial tipo perceptrón multicapa, formada por n neuronas de entrada, m neuronas en su capa oculta y dos neuronas de salida.

Como se ha comentado anteriormente, el proceso de aprendizaje de la RNA es similar al adoptado por el cerebro animal. Durante el aprendizaje, los datos de entrada (en este caso, los valores experimentales de la propiedad bajo estudio) se introducen en la capa de entrada como valores matemáticos, produciéndose un valor de salida. El valor de salida (calculado) finalmente se compara con el valor de salida requerido (observado) (Patel, 2013).

Dependiendo de la diferencia entre estos dos valores, la RNA ajusta sus factores internos lógicos para producir el valor de salida correcto (observado). Durante el aprendizaje, la red continúa con el proceso (autoadaptar) los datos estándar en orden cíclico hasta que la diferencia entre la salida de la RNA y la salida estándar lleguen a ser tan bajo como sea posible o hasta un número dado de repeticiones cíclicas. Esto es similar al aprendizaje deductivo humano en el cual, la persona estudia repetidas veces la literatura hasta adquirir el conocimiento satisfactoriamente. Una vez entrenada, la red puede predecir datos de

salida cuando se encuentre frente a datos nuevos de entrada (Patel, 2013).

Existen distintos procesos de aprendizaje; en la presente Tesis se empleó el llamado *proceso supervisado*. En él se utiliza un conjunto de entrenamiento con una salida conocida para entrenar la red mediante la asignación de pesos a cada neurona. Basado en el algoritmo de entrenamiento, también podemos diferenciar distintos tipos de redes neuronales: perceptrón simple, red Adaline, perceptrón multicapa, red back-propagation, y memoria asociativa bidireccional. Durante el aprendizaje y uso, las redes procesan gran cantidad de complejos cálculos matemáticos basados en variables estructurales y funcionales así como en una función matemática que figura en el modelo de RNA (Devillers, 1996).

II.2. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS

El proceso de validación es una etapa clave, cuyo objetivo principal es determinar la robustez y capacidad predictiva del modelo. Podemos distinguir dos tipos de validaciones: interna y externa (Gramatica, 2007; Tropsha, 2010). La validación interna del modelo consiste en emplear el grupo de moléculas perteneciente al conjunto de entrenamiento para testar el modelo. Mientras que la validación externa, en cambio, emplea un grupo de compuestos de prueba o *test* formado por moléculas no empleadas en la construcción del modelo. Este grupo test se utiliza para predecir la propiedad o categoría asociada a cada compuesto.

II.2.1. Validación interna del modelo

Con el fin de validar internamente el modelo de regresión se llevan a cabo dos tipos de estudio: validación cruzada (*cross-validation*) y test de aleatoriedad de Fischer (*Scrambling model*).

II.2.1.1. Validación cruzada

La validación cruzada o *cross-validation* se basa en las técnicas *Leave One Out* (LOO -“Dejar-uno-afuera”) y *Leave Group Out* (LGO -“Dejar algunos a fuera”). Consisten en retirar del conjunto de entrenamiento n compuestos (n igual a 1 en LOO o muchos en LGO), volver a calcular el modelo con los compuestos restantes y predecir la clasificación de los compuestos eliminados con este nuevo modelo. El proceso se repite hasta que todos los compuestos del conjunto de entrenamiento son eliminados al menos una vez (Gramatica, 2007).

En la presente Tesis, se determina la estabilidad de los modelos de regresión aplicando la técnica del LOO, es decir, eliminando un compuesto (y su correspondiente propiedad $\log\text{Cl}_{50}$) del conjunto de entrenamiento y volviendo a obtener un modelo sin este compuesto. Con el nuevo modelo se predice la propiedad para el compuesto eliminado, repitiéndose el proceso para todos los compuestos del conjunto y obteniéndose así una predicción para cada uno de ellos.

Los valores del coeficiente de correlación y de los residuales obtenidos al realizar las sucesivas eliminaciones se comparan con los de la ecuación seleccionada. Si son similares a los de la ecuación original el modelo se considerará estable. Por esta razón, con los resultados obtenidos en el test de estabilidad se realizará una representación gráfica de los residuales

frente a residuales obtenidos en el estudio de validación cruzada, que permitirá la detección de compuestos que no se ajustan al modelo.

Además de esta representación, se emplea un parámetro clave a la hora de evaluar la estabilidad del modelo. Se trata del coeficiente de correlación de la validación cruzada, Q^2 , cuya expresión matemática se expone a continuación:

$$Q^2 = \frac{SD - PRESS}{SD}$$

Donde, SD , es la desviación estándar al cuadrado de cada valor respecto de la media:

$$SD = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

$PRESS$, es la suma de los cuadrados de los residuales:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - y_{i(vc)})^2$$

Siendo y_i , el valor experimental de la variable dependiente del compuesto i ; $y_{i(vc)}$, el valor medio experimental de la variable dependiente e \bar{y} , el valor predicho en la validación cruzada de la variable dependiente del compuesto i .

Por convenio general se considera aceptable un valor de $Q^2 > 0,5$ (Gramatica, 2007).

II.2.1.2. Test de aleatoriedad de Fischer

El objetivo de este test es comprobar la probabilidad de correlación fortuita entre los descriptores y la variable dependiente. Para ello, y siguiendo un proceso al azar, se modifica el valor de la propiedad de cada compuesto (variable dependiente) del grupo de entrenamiento (Gramatica, 2007). Este nuevo valor estará comprendido dentro del rango de valores experimentales de la propiedad a estudio. Por ejemplo, si el logaritmo del valor de Cl_{50} para un grupo de compuestos se encuentra entre 0-4 los valores aleatorios generados estarán dentro de este intervalo.

Al dar un valor arbitrario a la propiedad, cancelamos cualquier relación que pudiera existir entre estructura y propiedad. A continuación, se generan nuevos modelos para evaluar si existe probabilidad de correlación al azar entre las variables independientes y la variable dependiente, calculándose los parámetros r^2 y Q^2 (test de estabilidad) para diez series. El modelo a validar será considerado como no aleatorio si ninguno de los valores de los coeficientes es $> 0,5$. Finalmente, se representan los valores de los coeficientes obtenidos, para apreciar gráficamente si el modelo seleccionado pasa o no el test de aleatoriedad.

Cuando un modelo de predicción supera las pruebas de estabilidad y aleatoriedad se considera que su calidad predictiva y robustez han quedado validadas.

II.2.1.3. Curvas ROC

Para evaluar a los modelos discriminantes o de clasificación, se determina el balance entre *sensibilidad* (Se , es decir la tasa de verdaderos positivos, VP) y *especificidad* (Sp , es decir tasa de verdaderos negativos, VN). Las definiciones son:

$$Se = \frac{VP}{VP+FN}$$

$$Sp = \frac{VN}{VN+FP}$$

donde FN , denota los falsos negativos (moléculas activas respecto a una determina actividad farmacológica -inhibición de Akt o β -catenina- identificadas como inactivas por el modelo) y FP representa los falsos positivos (moléculas inactivas identificadas como activas por el modelo). A partir de aquí, se construyen las llamadas *Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic)* asociadas al modelo, graficando el balance de Se frente a $1-Sp$ (1-especificidad) (Massart y cols., 1988).

El área bajo la curva (AUC, del inglés *area under the curve*) ROC constituye un criterio clave para determinar (Cerdeja y Cifuentes, 2012):

- El punto de corte en el que se alcanza la sensibilidad y especificidad más altas.
- La capacidad discriminante del modelo, comprobando que no proporciona una clasificación al azar (Hamel, 2009).
- La capacidad discriminante de un modelo respecto a otro.

La curva ROC se elabora basándose en la unión de distintos puntos de corte, correspondiendo el eje Y a la sensibilidad y el eje X a 1-especificidad de cada uno de ellos. Ambos ejes, incluyen valores entre 0 y 1 (0% a 100%). La Figura II.3 ilustra la forma de una curva ROC (Hamel, 2009).

Otro parámetro de interés, relacionado con la curva ROC es el *índice de Youden*, que determina el punto de corte con sensibilidad y especificidad más alta. Viene descrito por la siguiente expresión matemática (Cerde y Cifuentes, 2012):

$$\text{Índice de Youden} = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$$

Este punto de corte corresponde gráficamente, al punto de la curva ROC más cercano al ángulo superior-izquierdo del gráfico (punto 0,1), es decir, al punto del gráfico cuya sensibilidad = 100% y especificidad = 100% (Figura II.3) (Cerde y Cifuentes, 2012).

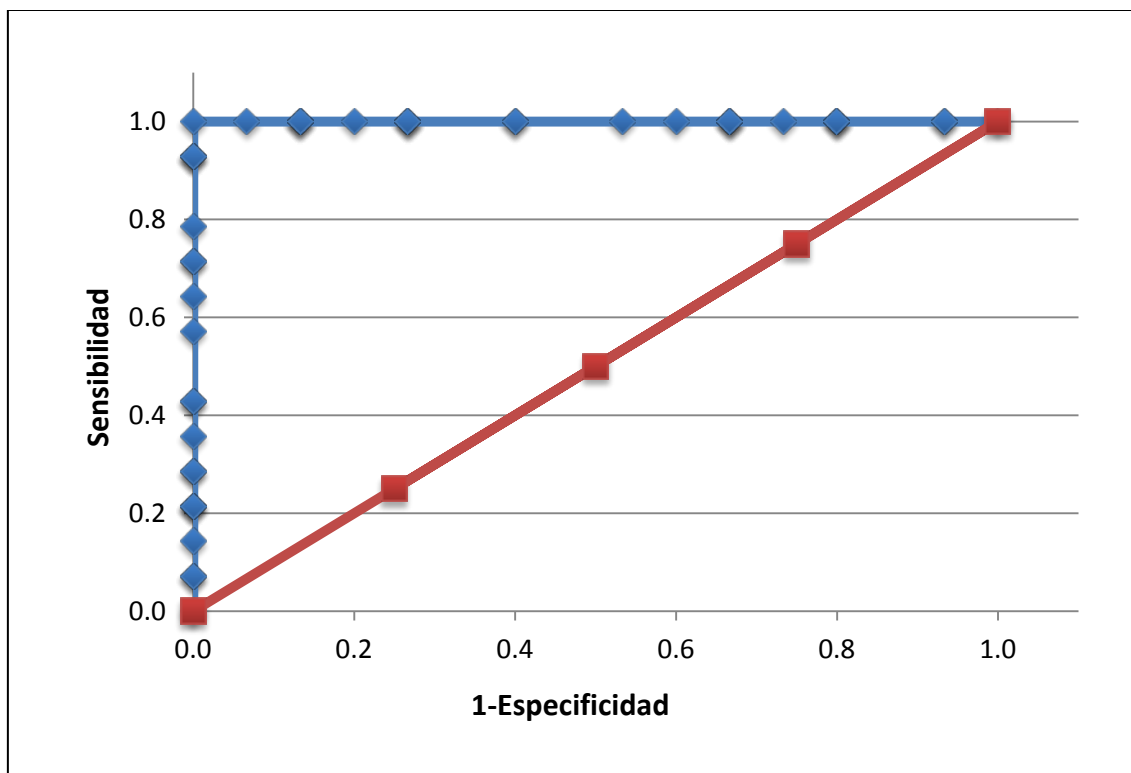


Figura II.3. Gráfico de curva ROC de un modelo discriminante. Cada punto de la curva ROC (rombos azules) corresponde a un posible punto de corte del modelo, y nos informa de su respectiva sensibilidad (eje y) y 1-especificidad (eje x). Los ejes del gráfico incluyen valores entre 0 y 1 (0% a 100%). En rojo se aprecia la diagonal de referencia o línea de no-discriminación.

Como bien explican Cerda J. y Cifuentes L (Cerda y Cifuentes, 2012) podemos simplificar la significación de una curva ROC a la representación de la “proporción de verdaderos positivos” (eje Y) versus la “proporción de falsos positivos” (eje X) para cada punto de corte de un modelo de discriminación.

En toda curva ROC aparece un elemento denominado diagonal de referencia o línea de no-discriminación; línea trazada desde el punto 0,0 al punto 1,1, que delimita un cuadrado de área = 1,00 (ver Figura II.3). Esta línea de no-discriminación describe la curva ROC para un modelo incapaz de discriminar entre moléculas activas e inactivas; debido a que cada

punto de corte que la compone determina la misma proporción de verdaderos positivos que de falsos positivos, la cual está asociada a un $AUC = 0,50$ (la línea de no-discriminación divide en dos mitades iguales el cuadrado de área = 1,00) (Cerdeja y Cifuentes, 2012). Por tanto, un modelo tendrá mayor capacidad discriminante a medida que sus puntos de corte tracen una curva ROC lo más lejana posible a la línea de no-discriminación; dicho de otra manera, lo más cercana posible a los lados izquierdo y superior del gráfico (Cerdeja y Cifuentes, 2012). Es decir, conforme el AUC del modelo se acerque al valor 1,00 (clasificación perfecta), mejor capacidad discriminante tendrá éste.

En la presente Tesis, se decidió priorizar S_p sobre S_e en la construcción de los modelos con el objetivo de reducir el número de falsos positivos seleccionados tras el cribado virtual de bases de datos (compuestos seleccionados como inhibidores de Akt y β -catenina que no presentan dicha actividad). Esto puede comportar la pérdida de algunos *scaffolds* estructurales potencialmente novedosos, ya que se estarán perdiendo muchos falsos negativos.

II.2.2. Validación externa

Como señalábamos con anterioridad, la validación externa del modelo consiste en predecir el valor de la propiedad (variable dependiente) para un conjunto de compuestos que no han sido utilizados para generar el modelo (grupo test). En general, este tipo de validación se considera un paso imprescindible a la hora de testar la robustez y capacidad predictiva de modelos con grupos de entrenamiento formados por grandes números de compuestos (por encima de 100) (Baumann, 2003; Baumann y Stiefl, 2004).

En este caso, se destinó el 20% de la base de datos empleada en la construcción del modelo como grupo test.

II.3. DIAGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

Para determinar el dominio de aplicabilidad de los modelos discriminantes se emplea el diagrama de distribución farmacológica (DDF), introducido por el grupo para este fin (Gálvez y cols., 1996). El DDF se puede definir como una representación gráfica que proporciona una forma directa de visualización de las zonas de solapamiento mínimo entre compuestos activos e inactivos, indicando el intervalo óptimo de valores de la función discriminante, es decir, la región del espacio en la que la probabilidad de encontrar compuestos activos es máxima (Figura II.4).

Desde una perspectiva diferente, un DDF es un diagrama de distribución de frecuencias de variables dependientes en el que la ordenada representa la expectativa (probabilidad de actividad) y el eje de abscisas los valores de la función discriminante (FD). Para una gama arbitraria de valores de una función dada, la expectativa de actividad se puede definir como: $Ea = a/(i + 1)$, donde a es el número de compuestos activos en el rango dividido por el número total de compuestos activos y i es el número de compuestos inactivos en el intervalo dividido por el número total de compuestos inactivos. La expectativa de inactividad se define del mismo modo como $Ei = i/(a+1)$. Por medio de estos diagramas, es fácil visualizar los intervalos en los que hay una probabilidad máxima de encontrar nuevos compuestos activos, así como la probabilidad mínima para encontrar compuestos inactivos.

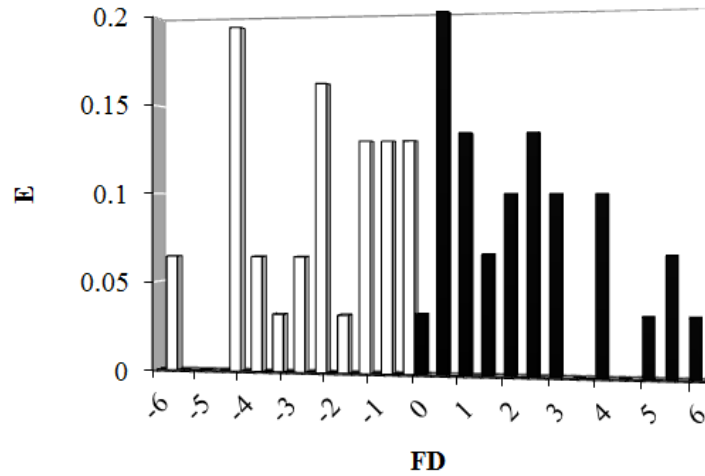


Figura II.4. Ejemplo de diagrama de distribución farmacológica. Se representa la E, expectativa frente a los valores de la función discriminante (FD), para un grupo de moléculas activas (barras negras) e inactivas (barras blancas).

II.4. CRIBADO VIRTUAL DE BASES DE DATOS

Una vez contruidos y validados los modelos 1-8, se llevó a cabo un cribado virtual de bases de datos al objeto de seleccionar nuevos inhibidores de Akt y β -catenina. Dos bases de datos comerciales fueron rastreadas: *Specs Natural compounds* y *Specs Screening compounds* (Specs database). La primera está compuesta por 1.000 compuestos de origen natural (aislados y sintetizados) procedentes de plantas, hongos, bacterias y organismos marinos. Mientras que la segunda, consta de 200.000 compuestos con perfil de fármaco, lo que se denomina en inglés *drug-like*. Presentando características de absorción, distribución, metabolismo y excreción óptimas.

Tras el rastreo de las arriba mencionadas bases de datos se seleccionaron los potenciales agentes quimioterápicos basados en la inhibición de Akt y/o β -catenina. Finalmente, se procedió a testar estas moléculas *in vitro* e *in vivo* con el objetivo de validar la actividad farmacológica predicha por los modelos contruidos.

II.5. ENSAYOS *IN VITRO*

II.5.1. Material y reactivos

Los distintos compuestos CAS nº 256378-54-8 (inhibidor 1)⁷, 663203-38-1 (inhibidor 2), 247079-73-8 (inhibidor 3), 689769-86-6 (inhibidor 4), 15940-61-1 (inhibidor 5) y 431925-096 (inhibidor 6) se adquirieron a Specs (Zoetermeer, Holanda). Los inhibidores de referencia de Akt (LY294002) y ciclina (AT7519) fueron proporcionados por Selleckchem (Madrid, España) mientras que el inhibidor de referencia frente a β -catenina (FH535) procede de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El resto de material y reactivos empleados en la presente Tesis se detalla en los Anexos I-IV.

II.5.2. Cultivo celular: línea HT-29

La línea celular HT-29 son células adherentes de adenocarcinoma de colon humano (*American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, EEUU*). Fue proporcionada por el Servei Central de Support a la Investigació Experimental de la Universitat de València (SCSIE). Para su cultivo se emplearon frascos de 75 cm² de superficie, en medio DMEM GlutaMAX™ 4,5 g/L glucosa suplementado con 20% suero fetal bovino (SFB) y 1% antibiótico (100 U/mL penicilina, 100 µg /mL estreptomina). La temperatura se mantuvo a 37°C en incubador celular con atmósfera controlada al 5% de CO₂ y 95% de humedad hasta alcanzar la confluencia (70-80%).

⁷ La denominación de inhibidores para los compuestos seleccionados es puramente convencional ya que aun solo se trata de “potenciales” inhibidores.

Cada 2-3 días se realizó el pase de células a un frasco nuevo, para lo que se emplea una solución de tripsina al 0,25% (p/v) en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,53 mM. El recuento celular se realizó mediante un contador Z2™ Coulter Counter®.

Las células fueron utilizadas entre los pases 15 y 25. Los compuestos en estudio se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración máxima de 0,5%.

II.5.3. Ensayo de proliferación y citotoxicidad

Se ha seguido el método propuesto por Mosmann (1983) (Mosmann, 1983). Es una técnica que se basa en la reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio (MTT) a formazán, producto coloreado que absorbe a 490 nm. Dicha reacción está catalizada por enzimas succinildeshidrogenasas mitocondriales (Figura II.5). A mayor número de células vivas más cantidad de formazán se detecta.

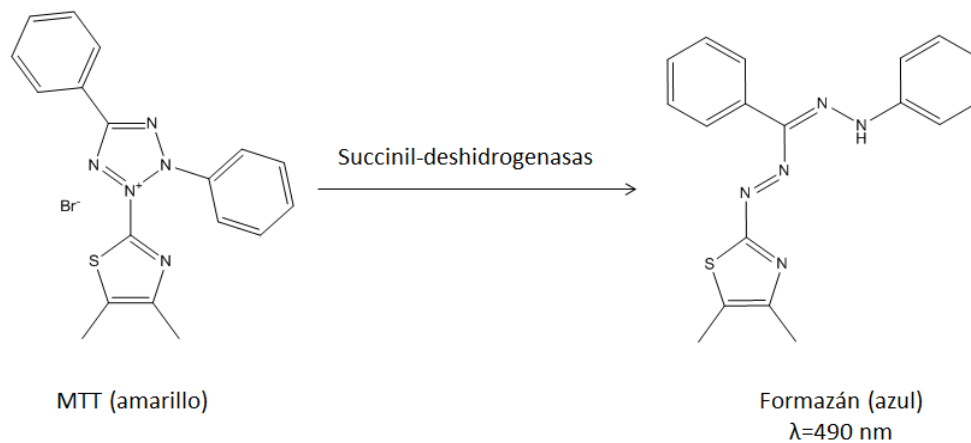


Figura II.5. Reacción de reducción del MTT a formazán.

Se disponen 200 μL de suspensión celular en placas de 96 pocillos (2×10^5 células/mL). A las 24 horas el medio se reemplaza por medio DMEM libre de suero fetal bovino (0,5% SFB). Tras 2 horas, se añaden 5 μL de los compuestos a estudiar y de los inhibidores de referencia a distintas concentraciones: 1, 10, 100 μM . A las 24 h se elimina el medio y se añaden 100 μL de MTT en medio o PBS (0,5 mg/mL). Se incuba la placa a 37°C hasta que aparecen depósitos de color azul (aproximadamente 1 h). En este momento, se elimina el sobrenadante y se añaden 100 μL de DMSO para que disuelva los cristales de formazán. La absorbancia se mide a 490 nm en un lector de placas Victor™ X3 (Perkin Elmer).

Los resultados se expresan en lecturas absolutas de absorbancia; por lo que un descenso de absorbancia indica una reducción de la viabilidad celular, que se determina según la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{(A_b - A_p)}{A_b} \times 100$$

Siendo,

A_b = media aritmética de la absorbancia de las células sin tratar (blanco)

A_p = media aritmética de la absorbancia de las células tratadas con el producto problema.

II.6. ENSAYOS *IN VIVO*

Como se explica en el apartado de la Introducción de esta Tesis, el límite entre inflamación y cáncer es cada día más difuso. De hecho es ampliamente conocido el papel que muchos mediadores carcinogénicos juegan en distintos procesos inflamatorios. Este es el caso de las dos dianas farmacológicas objeto de esta Tesis: Akt y β -catenina. Por ello, para probar su capacidad preventiva frente al desarrollo de procesos cancerosos se ha seguido un modelo de cáncer colorrectal asociado a colitis ulcerosa crónica inducida por la administración de un agente cancerígeno como es el azoximetano y un irritante de la mucosa intestinal como es el dextrano sulfato sódico (DSS). El método ocasiona tumores fundamentalmente en el recto de los animales, de modo similar a lo que ocurre en los enfermos de colitis ulcerosa crónica. Previo a este estudio, se determinó la toxicidad del producto a estudiar *in vivo* así como su efecto antiinflamatorio en la colitis ulcerosa aguda inducida por DSS.

II.6.1. Animales de experimentación

Se han empleado ratones hembras de las razas Balb/C y C57BL/6 suministrados por Harlan Interfauna Ibérica S.L. (Barcelona, España), con una edad comprendida entre 6-8 semanas y un peso de 18-20 g. Tras la recepción de los animales, éstos se estabularon bajo condiciones perfectamente estandarizadas: $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ de temperatura, bajo condiciones de 12h de luz/oscuridad, 60% de humedad, alimentación artificial estandar y agua *ad libitum*. Previa utilización de los animales en experimentación estos permanecieron durante 7 días para garantizar su aclimatación al estabulario de SCSIE del campus de Burjassot (Valencia). Los animales se distribuyeron a razón de 5-6 animales por grupo.

Los procedimientos utilizados están aprobados por la Conselleria de Agricultura i Ganadería de la Generalitat Valenciana (nº autorización: 2015/VSC/PEA/00023 de 21/01/2015, Anexo) de acuerdo con la legislación vigente (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero).

II.6.2. Inducción de colitis ulcerosa aguda por Dextrano Sulfato Sódico (DSS)

La colitis ulcerosa (CU) inducida por la administración de DSS, es un modelo experimental que reproduce fielmente algunos de los síntomas característicos de la enfermedad en humanos como la pérdida de peso, diarrea, sangre en heces, y cambios histológicos similares a los que se presentan en los enfermos de CU (Kim y cols., 2012). Al mismo tiempo, este modelo permite evaluar el efecto de nuevos fármacos que permitan avanzar en la farmacoterapia de la CU. El modelo de CU aguda inducida por DSS en *hamsters* fue descrito por primera vez en 1985 (Ohkusa Toshifumi, 1985) y adaptado al empleo de ratones en 1990 por Okhusa y colaboradores (Okayasu y cols., 1990).

El DSS es un polisacárido sulfatado con un peso molecular que oscila desde pocos KDa a más de 100.000. El DSS de 36-50 KDa administrado en el agua de bebida es el que produce la CU en los animales de experimentación. Dependiendo de la dosis, del tiempo de exposición y la frecuencia de su administración, los animales pueden desarrollar colitis aguda o crónica o incluso lesiones displásicas (Perse y Cerar, 2012).

La inflamación se produce por un efecto tóxico del DSS sobre las células del epitelio intestinal y altera la integridad de la barrera mucosa, quedando expuestos la *lámina propia* y el compartimento submucoso a los antígenos luminales y bacterias entéricas generando con ello el proceso inflamatorio (Low y cols., 2013).

La colitis aguda se induce en ratones Balb/C administrando durante 7 días DSS al 3% (p/v) en el agua de bebida. Esta línea de ratones es usualmente utilizada en diversos protocolos experimentales de inflamación como es el ensayo de colitis aguda.

Los ratones se distribuyen aleatoriamente en grupos a razón de 2-6 ratones por grupo: Blanco o sano (Agua de bebida); grupo Blanco + Tratamiento (Agua de bebida + inhibidor 4); grupo Control (DSS 3% en el agua de bebida); grupo Control + Tratamiento (DSS al 3% en agua de bebida + inhibidor 4).

El producto en estudio, inhibidor 4 se administró a una dosis de 70 mg/kg, disuelto en agua a razón de 0,2 ml por ratón. Dicha administración se hizo por vía oral (*p.o*) mediante una sonda gástrica en los días 0, 2 y 4 del experimento. En la Figura II.8 se resume el procedimiento llevado a cabo.

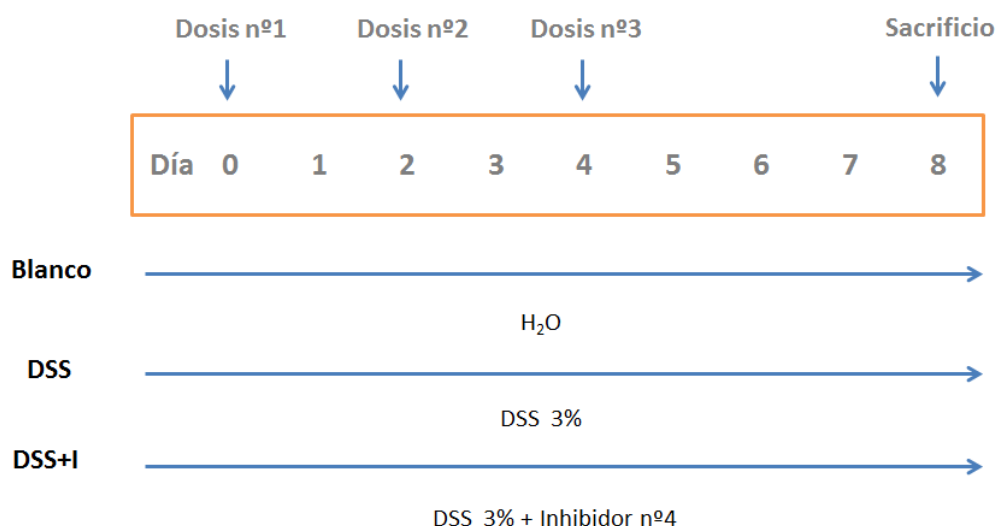


Figura II.8. Esquema de inducción y tratamiento de la colitis ulcerosa aguda al 3%.

Cada día se observa el aspecto de los animales, anotando el peso de cada uno, así como el volumen de líquido bebido. En función del volumen total de líquido ingerido por los ratones se puede calcular la cantidad de DSS que ha recibido cada ratón lo que asegura la reproducción de la colitis. Del mismo modo, se anota la consistencia de las heces y la presencia de sangre visible en heces. Estos datos, junto con la pérdida de peso serán utilizados para el cálculo del Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) (en inglés DAI, *Disease Activity Index*) (Cooper y cols., 1993). El IAE es un factor acumulativo que cuantifica la pérdida de peso, diarrea y sangrado en heces en la colitis ulcerosa inducida en animales de experimentación, según la Tabla II.1:

Tabla II.1. Evaluación del índice de actividad de la enfermedad (IAE) (Cooper y cols., 1993).

IAE			
Puntuación	Pérdida de peso	Diarrea	Sangre en heces
0	No existe	No existe	No existe
1	1-5%		
2	6-10%		
3	10-20%	Semidura	Leve sangrado
4	>20%	Diarrea	Alto sangrado

Tras obtener los resultados de cada uno de los animales, se aplica la fórmula correspondiente al IAE:

$$IAE = \frac{(Pp+Pd+Ps)}{3}$$

Siendo:

Pp = Puntuación correspondiente a la pérdida de peso.

Pd = Puntuación correspondiente al grado de diarrea.

Ps = Puntuación correspondiente a la presencia de sangre en heces.

El IAE se expresa con valores comprendidos entre 1-4.

II.6.3. Obtención de las muestras

Una vez sacrificados los animales, se practica un corte longitudinal en el abdomen y se extrae el colon de cada uno de ellos y se disponen en placas Petri con PBS frío. A continuación, cada uno de estos intestinos se analiza macroscópicamente: Se mide la longitud del mismo y tras retirar el ciego y limpiar el contenido en heces, se procede a pesar cada intestino. Por último, cada muestra será fraccionada en porciones de aproximadamente 0,5 cm empezando desde la parte distal (Figura II.9). Cada uno de estos fragmentos servirá para completar los estudios bioquímicos e histológicos que junto con el IAE permitirán determinar si el producto en estudio protege o no frente a la enfermedad. Todos los fragmentos, excepto el que se analiza por histología, se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura II.9. Esquema de los fragmentos seccionados sobre las muestras intestinales: C3 (fragmento proximal), C4 (fragmento medio), C5 (fragmento medio) y C6 (fragmento distal).

II.6.4. Cancer colorrectal asociado a CU por DSS y Azoximetano (DSS/AOM)

Okayasu y col (Okayasu y cols., 1996), descubrieron que tras la administración de azoximetano (AOM) seguido del tratamiento con DSS lograban producir un daño crónico caracterizado por necrosis y regeneración en la mucosa intestinal, lo que predisponía al desarrollo de tumores a nivel colorrectal.

El CCR asociado a colitis se induce mediante la inyección intraperitoneal de AOM (7,5 mg/kg) el día 0, y la administración posterior de 3 ciclos de DSS a partir del día 7 (Figura II.10). Cada ciclo consta de 7 días de agua suplementada con DSS, seguidos de 14 días de agua de bebida. Los animales se reparten aleatoriamente en 8 grupos: Blanco (agua de bebida); grupo Control o DSS (reciben los 3 ciclos de DSS al 2% en agua de bebida); grupo DSS + Tratamiento (tres ciclos de DSS al 2% + inhibidor 4); grupo DSS + AOM (inyección previa de AOM + 3 ciclos de DSS al 2%); DSS + AOM + Tratamiento (inyección previa de AOM + 3 ciclos de DSS al 2% + inhibidor 4) (Figura II.10). El inhibidor 4 fue suministrado por vía oral a la dosis de 35 mg/kg disuelto en agua de bebida (0,2 mL/ratón) (Figura II.10). Los animales se pesan tres veces a la semana, y la presencia de diarrea o sangre en heces se observa durante todo el experimento. Tras 63 días, los animales se sacrifican por dislocación cervical. Cada animal recibe 24 dosis de producto problema.

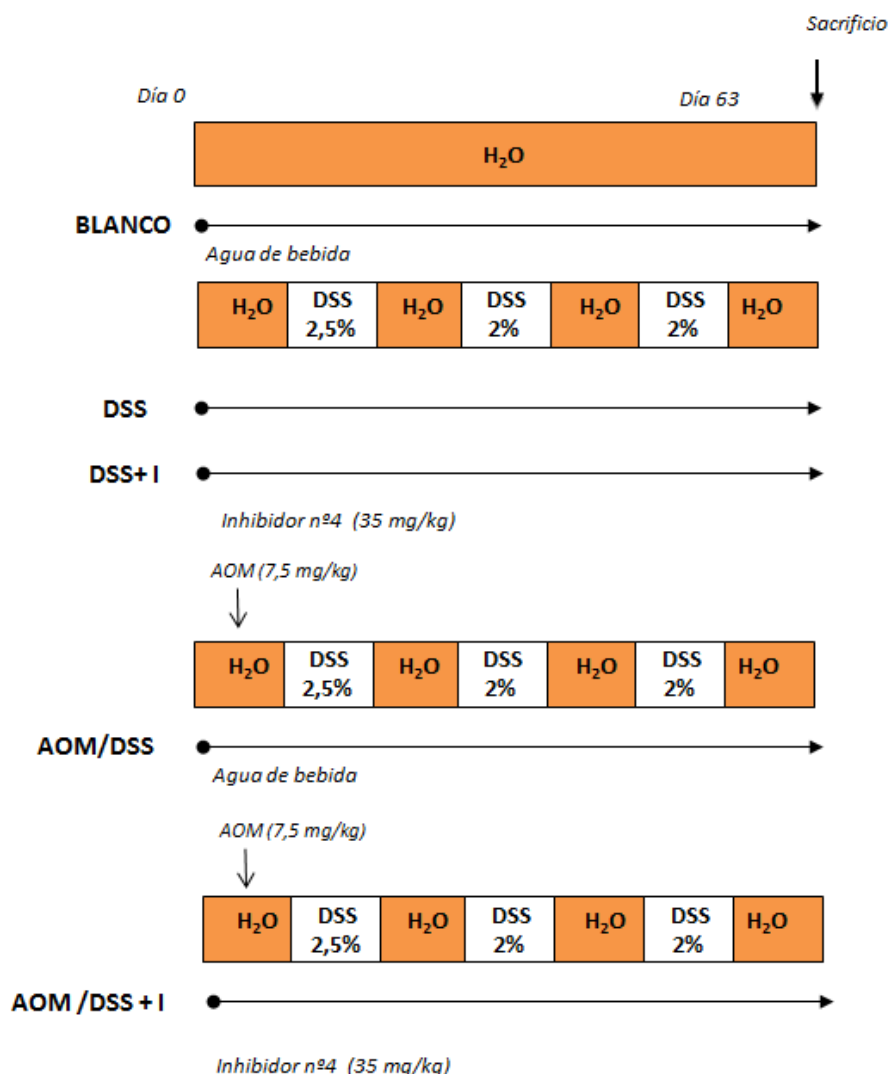


Figura II.10. Esquema del protocolo de inducción de CCR asociado a CU.

En el caso de CCR, el IAE también informa de la severidad y del progreso de la enfermedad en este modelo. Se utilizan los mismos parámetros que en la Tabla II.1. En este caso, se hace también una evaluación del estado de los animales al terminar cada ciclo, para así controlar la evolución de la enfermedad de forma macroscópica.

La obtención de las muestras, y análisis de las mismas se hace del mismo modo descrito en el apartado II.6.3. Tras la muerte del animal se extrae el colon y se observa macroscópicamente la presencia de tumores. Después, se cortan longitudinalmente, se miden, se pesan, se congelan

con nitrógeno líquido y se guardan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para el estudio histológico, se corta un pequeño fragmento de la parte distal del colon (aproximadamente 0,5 cm) y se fija en p-formaldehído 4% disuelto en PBS. Se deja toda la noche a temperatura ambiente y se guarda al día siguiente a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

II.6.5. Estudio histológico

En el modelo de CU aguda, es el fragmento C4 del colon de los diferentes grupos de animales el utilizado para el examen histológico. En este análisis microscópico, se compara el estado de la mucosa colónica en las muestras de los grupos no tratados y sanos con la de los grupos control y tratados. Esta mucosa en individuos sanos está constituida por el epitelio y las criptas, que incluyen abundantes células caliciformes con gran contenido en mucopolisacáridos (Arribas, 2009). Por tanto, los parámetros histológicos utilizados como indicadores de daño tisular son: el daño de las criptas, el grado de inflamación y su extensión. Las muestras conservadas en formaldehído al 4% fueron procesadas en la Sección de Microscopía del SCSIE.

Para obtener los cortes histológicos, las muestras embebidas en parafina se seccionan ($8\text{ }\mu\text{m}$) y se tiñen con hematoxilina y eosina. La hematoxilina es un colorante básico, que tiñe de color azul-violeta las estructuras ácidas como el núcleo o el retículo endoplasmático. La eosina, en cambio, es un colorante ácido que tiñe de rojo-rosa las estructuras básicas como mitocondrias y proteínas citoplasmáticas. Estos cortes se analizan y gracias a la tinción es posible detectar las diferencias en las estructuras características de la mucosa entre los grupos, observando así el posible beneficio del producto en estudio a nivel histológico. Con el

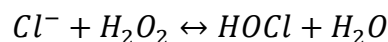
microscopio se observaron hasta 8 diferentes campos (aumentos 4X y 10X).

Para el estudio histopatológico del CCR se procede de modo similar. Identificando la pérdida de epitelio, infiltración celular y la ulceración e incluyendo, la determinación de presencia de regiones displásicas en los diferentes grupos a estudio.

II.6.6. Determinaciones bioquímicas

II.6.6.1. Infiltración neutrofílica: medida de la actividad mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa es la enzima encargada de catalizar la transformación del ión cloruro y el peróxido de hidrógeno en ácido hipocloroso (HOCl) y se localiza fundamentalmente en los neutrófilos y monocitos. Tal como se aprecia en la siguiente reacción ilustrada:



El HOCl es un potente agente oxidante, clave en el desarrollo de mecanismos de defensa contra agentes infecciosos; sin embargo, una excesiva presencia de HOCl puede llegar a ser nocivo para el huésped. Ya que el ácido hipocloroso reacciona en presencia de proteínas y ácidos grasos insaturados, transformándose en una especie reactiva de oxígeno capaz de desestabilizar a las membranas celulares. Diversas patológicas asociadas al estrés oxidativo guardan relación con el aumento de la actividad de la MPO como por ejemplo, enfermedades de tipo infeccioso o inflamatorio (Edwards y Swan, 1986).

Una de las características fenotípicas de la CU es la acumulación leucocitaria en la mucosa intestinal. Es por esto, que adquiere importancia la detección de la actividad de la mieloperoxidasa, ya que ésta nos permite determinar el número de neutrófilos infiltrados en la muestra de colon y por tanto, conocer el nivel de inflamación de dicho tejido y por tanto de estrés oxidativo (Edwards y Swan, 1986).

El método utilizado es el descrito en otros trabajos propios del grupo de investigación (Giner et al., 2011). A continuación, se describirá brevemente.

Puesto que las lesiones en la mucosa intestinal son más abundantes en el recto, el fragmento más distal (C6) es el que se selecciona para realizar esta medida enzimática. Las muestras se homogenizan con el tampón fosfato sódico 80 mM con 0,5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB). A continuación, se centrifugan a 11 300 x *g* a 4°C durante 20 min y se recoge el sobrenadante.

Seguidamente, se toman 30 µl de cada muestra y se adicionan por triplicado en los diferentes pocillos de la microplaca. Es fundamental homogenizar cada muestra con el agitador vórtex antes de pipetear para asegurarnos que la fracción tomada es representativa de la muestra completa. Junto a las muestras se deben pipetear 100 µl de PBS, 85 µl de tampón fosfato sódico 0,22 M y 15 µl de peróxido de hidrógeno al 0,017%. Para que reaccione se deben añadir 20 µl del sustrato cromogénico de la enzima, este sustrato se prepara con 58 mg de tetrametilbencidina (TMB) y 10 ml de una solución acuosa de dimetilformamida al 8%. El sustrato se incubaba en la placa a 37°C durante 3 min. Una vez transcurrido este tiempo, la microplaca se introduce en hielo para detener la reacción

enzimática al adicionar 30 μl de tampón acetato sódico 1,46 M a pH 3. Se deja unos segundos que el color se estabilice y se lee la absorbancia en el lector de placas a 630 nm. Esta absorbancia será representativa del nivel de actividad enzimática.

La aparición de color en esta reacción se produce debido a que la TMB en presencia de H_2O_2 al ser degradada por la peroxidasa da lugar a un producto de color azul, según se muestra en la Figura II.11.

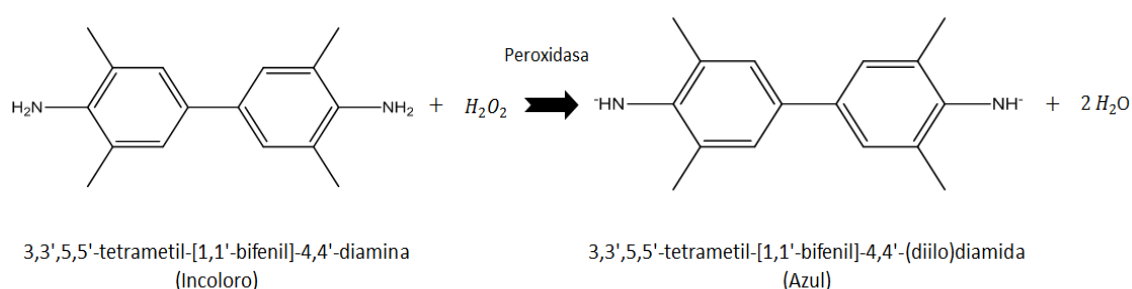


Figura II.11. Reacción de oxidación de tetrametilbencidina por medio de la peroxidasa.

El porcentaje de inhibición de la actividad MPO se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\overline{A_C} - \overline{A_P}}{\overline{A_C}} \times 100$$

Donde $\overline{A_C}$, es la media aritmética de la absorbancia correspondiente al grupo control y $\overline{A_P}$, es la media aritmética de la absorbancia correspondiente al grupo problema.

II.6.6.2. Determinación de citocinas por Enzimoimmunoensayo (ELISA)

La técnica ELISA se utiliza para determinar la concentración de moléculas específicas en una muestra. Generalmente, el tipo de ELISA más utilizado es el de tipo sándwich. El anticuerpo de captura se une a la base del pocillo y capta al antígeno presente en la muestra. Las moléculas que no se hayan unido se eliminan con los lavados. Se añade el anticuerpo de detección asociado a una enzima, que se une al antígeno y mediante una reacción enzimática, convierte un sustrato incoloro en un compuesto azulado. Existe la posibilidad de realizar una recta patrón con concentraciones conocidas de antígeno, y así, mediante la medida de la absorbancia, determinar la concentración de la molécula de interés.

Tras pesar la porción C5 de cada una de las muestras procedentes del modelo de colitis aguda, se homogenizaron con ayuda de un Polytron en Nonidet NP-40 1% en PBS. Las muestras se sonicaron 3 veces durante 10 s y se centrifugan a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se recoge el sobrenadante y en el mismo se determinó el nivel IL-6 utilizando un kit de ELISA específico, operando según las instrucciones del fabricante del kit (eBioscience). Los valores de absorbancia total de cada una de las muestras se obtienen restando los valores de absorbancia obtenidos a 570 nm a los obtenidos a 450 nm.

Una vez realizada la curva patrón, se interpolan los valores de absorbancias totales de las muestras y se obtienen las concentraciones existentes de IL-6 en cada una de ellas, que, tras dividir el valor obtenido por los g de tejido, se calcula el promedio de las concentraciones totales.

II.6.6.3. Ensayo *Western Blot*

Obtención de la fracción proteica

Para determinar las proteínas de interés utilizando la técnica de *Western Blot*, es necesario aislar y purificar las proteínas de una muestra de tejido. Para la extracción de proteínas, el fragmento de colon (C3) se homogenizó con 0,5 ml de un tampón que contiene: HEPES 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, PMSF 0,5 mM, DTT 0,5 mM, anti-fosfatasas (NaF 25 mM y Na₂VO₄ 2 mM) y 2 tabletas de anti-proteasas (Aprotinina 1 µg/ml, Leupeptina 1 µg/ml, Pepsatina 1 µg/ml), c.s.p. 50 mL, pH 7,9. A continuación, las muestras se centrifugan a 2 500 x g durante 10 min a 4°C.

Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantifican usando el método Bradford. El reactivo de Bradford contiene un colorante hidrofóbico, el azul de *Coomassie*, cuyas disoluciones acuosas, en presencia de ácido fosfórico, poseen un color pardo que se convierten en azul intenso al entrar en contacto con la parte hidrofóbica de una proteína. La intensidad de este color azulado, medida por absorbancia, será proporcional a la concentración de proteínas en una muestra.

Una alícuota de la muestra se diluye 1:5 y 5 µL de la misma (por duplicado) se añaden a una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se adicionan 250 µL de reactivo de Bradford y tras 15 min de reposo se mide la absorbancia a 570 nm. Para calcular la concentración de proteínas de cada muestra, se realiza una curva estándar de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA 10 mg/ml, por diluciones seriadas 2

mg/ml, 1 mg/ml, 500 µg/ml...) sobre la que se interpolan los valores obtenidos para cada muestra problema, según la ecuación de la recta:

$$x = \frac{y-a}{m}$$

x = concentración desconocida

y = absorbancia conocida

a = ordenada en el origen

m = pendiente

Reducción y desnaturalización de las proteínas

Una vez cuantificada la concentración de proteínas, se alícuota los volúmenes correspondientes a la misma cantidad de muestra de proteínas, se completan con agua destilada para que todas tengan el mismo volumen, y se hierven a 100 °C con un tampón desnaturizante que contiene DTT y SDS (*Reducing Buffer*) (5:1, v/v).

Electroforesis e inmunotransferencia

Cantidades iguales de proteína se cargan en el gel de poliacrilamida y se separan con tampón de electroforesis (Anexo IV) durante 50 min a 150 V. Posteriormente, se transfiere a una membrana de nitrocelulosa mediante el método de transferencia húmeda, usando un tampón de transferencia (Anexo IV) durante 120 min a 120 mA. La membrana se bloquea con leche desnatada en polvo al 5% disuelta en PBS-Tween 20 al 0,05% durante 90 min. A continuación, se incuba con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C y agitación suave. Al día siguiente, la membrana se lava tres veces con PBS-TWEEN® 20 al 0,05% y se incuba con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, cabra o ratón 1:12.000) durante 1 h a Tª ambiente con ligera agitación. Después de lavar tres

veces la membrana, se hace reaccionar con el reactivo de quimioluminiscencia, se deja actuar 3-5 min y se visualizan las proteínas separadas con ayuda de un transiluminador LAS-3000 mini.

La detección de β -actina (anti- β -actina 1:10.000) se usa como control interno de carga, y por tanto, para normalizar las diferencias en las cantidades de proteínas entre las diferentes muestras. El análisis densitométrico se realiza con el programa Multi-Gauga v2.0 de Fujifilm.

La intensidad de las bandas se cuantifica densitométricamente utilizando el programa Multi Gauge de Fujifilm y el programa SCION IMAGE. El valor de la densidad de cada mancha se normaliza respecto al valor obtenido para la β -actina correspondiente.

II.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El software empleado para la elaboración de los modelos topológicos fue Statistica 9.0., mientras que para el tratamiento estadístico de los datos experimentales se utilizó el software comercial GraphPad Prism 4.0. (Motulsky y Christopoulos, 1999).

Los resultados se expresan como la medida de los valores \pm error estándar de la media (E.E.M.) o la medida de los valores \pm la desviación estándar (D.S.). La significación estadística de las diferencias entre cada grupo se determinó usando el análisis de varianza ANOVA simple de una vía, seguido del test de la t de Dunnett para comparaciones múltiples o la distribución de la t de Student para comparaciones de dos grupos, en función de las características del experimento.

RESULTADOS

III. RESULTADOS

III.1. OBTENCIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS MODELOS TOPOLÓGICOS

Aplicando técnicas estadísticas de tipo lineales y no-lineales, se desarrollaron 6 modelos discriminantes (cualitativos) frente a la inhibición de Akt y β -catenina y 2 modelos predictivos (cuantitativos). A continuación, vamos a ver cada uno de los ocho modelos empleados para la selección de nuevos compuestos inhibidores de Akt y β -catenina. En el Anexo V se encuentra información adicional sobre los modelos descritos.

III.1.1. Modelo 1: Inhibición de Akt por compuestos naturales

La función discriminante (FD_1), formada por tres variables, tiene como objeto identificar nuevos productos naturales con actividad inhibitoria frente a Akt. FD_1 adopta la siguiente expresión matemática:

$$FD_1 = -2,046970 - 1,007164 * nR09 - 0,000005 * Wap + 2,276221 * EEig11r$$

Ecuación III.1

Parámetros estadísticos que definen al modelo:

$$N = 153, F = 28,628, \lambda = 0,6344, p < 0,00002$$

Dónde:

N: número de compuestos empleados en la elaboración del modelo

F: parámetro Fisher–Snedecor

λ : lambda de Wilks

p: estadístico p-valor

nR09: número de anillos de 9 miembros

Wap: índice de Wiener de todos los caminos

EEig11r: auto-valor número 11 de la matriz de adyacencia de aristas ponderada por integrales de resonancia

De acuerdo con la FD_1 , un compuesto de origen natural vendrá clasificado como inhibidor Akt si el valor de FD_1 se encuentra entre 0 y 4; por otro lado, un compuesto natural será clasificado como inactivo cuando adopte valores entre -0.5 y -6 (Figura III.1). Por último, aquellas moléculas con valores de $FD_1 > 4$ o $FD_1 < -6$ serán consideradas como no clasificables. Aplicando este criterio al grupo de entrenamiento (*training set*) compuesto por 153 moléculas naturales, 26 de 30 inhibidores de Akt de origen natural fueron correctamente clasificados por el modelo (81% acierto) mientras que 101 de las 123 moléculas inactivas fueron también correctamente clasificadas (82% acierto), como se puede apreciar en la Tabla III.1.

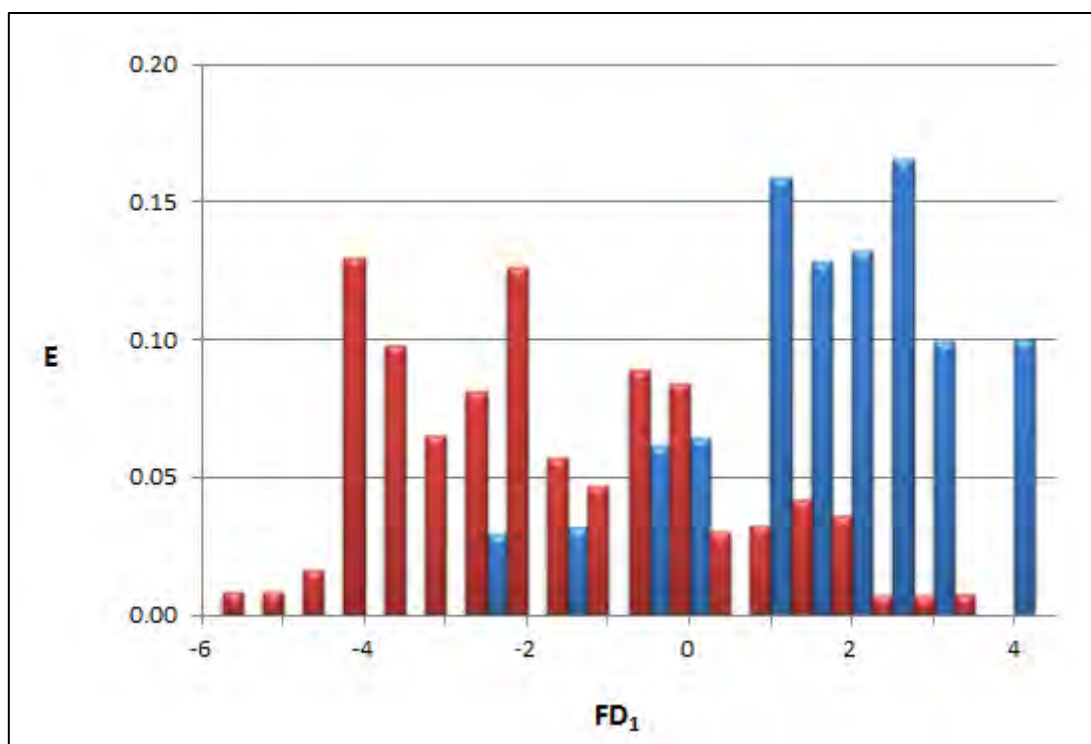


Figura III.1. Diagrama de distribución farmacológica para inhibidores naturales de Akt, obtenido empleando la FD_1 (el color azul representa los inhibidores de Akt mientras que el color rojo, los compuestos sin actividad inhibitoria frente a Akt).

Tabla III.1. Matriz de clasificación obtenida a partir de la FD_1 para el *training* y *test set*.

	PORCENTAJE DE CORRECTA CLASIFICACIÓN (%)	CLASIFICACIÓN COMPUESTOS		
		Activos	Inactivos	No-clasificados
TRAINING SET				
Grupo activos	81	26	4	–
Grupo inactivos	82	22	101	–
TEST SET				
Grupo activos	63	5	3	–
Grupo inactivos	87	3	27	1

El mejor modo de evaluar la calidad de cualquier función discriminante es aplicar un test de validación externa (*test set*) al modelo y ver cómo éste predice la clasificación de estas moléculas (inhibidores o no del Akt). En este caso, este grupo estaba formado por 39 compuestos (8 activos y 31 inactivos) los cuales no se emplearon en la construcción del modelo. El 20% del conjunto de datos fue seleccionado aleatoriamente para constituir el grupo test. La FD_1 fue capaz de clasificar correctamente el 63% en el grupo de activos (5/8 compuestos) y el 87% del grupo de inactivos (27/31 compuestos), tal y como se indica en la Tabla III.1.

Aunque la aplicación de la FD_1 conlleve la pérdida en la identificación de algunos compuestos naturales inhibidores de Akt (37%), el punto clave es que reconoce al 87% de los compuestos naturales no inhibidores de Akt, por lo que el riesgo de incluir “falsos activos” se minimiza, lo que significa que el modelo posee una alta especificidad en el descubrimiento de inhibidores naturales del Akt. Esto se refleja perfectamente en la curva ROC que aparece en la Figura III.2 referida al grupo de entrenamiento, así como la que aparece en la Figura III.3, que corresponde al grupo test. Las respectivas áreas bajo las curvas (AUCs) fueron 0,933 (grupo de entrenamiento) y 0,815 (grupo test), lo que ilustra la calidad del ajuste.

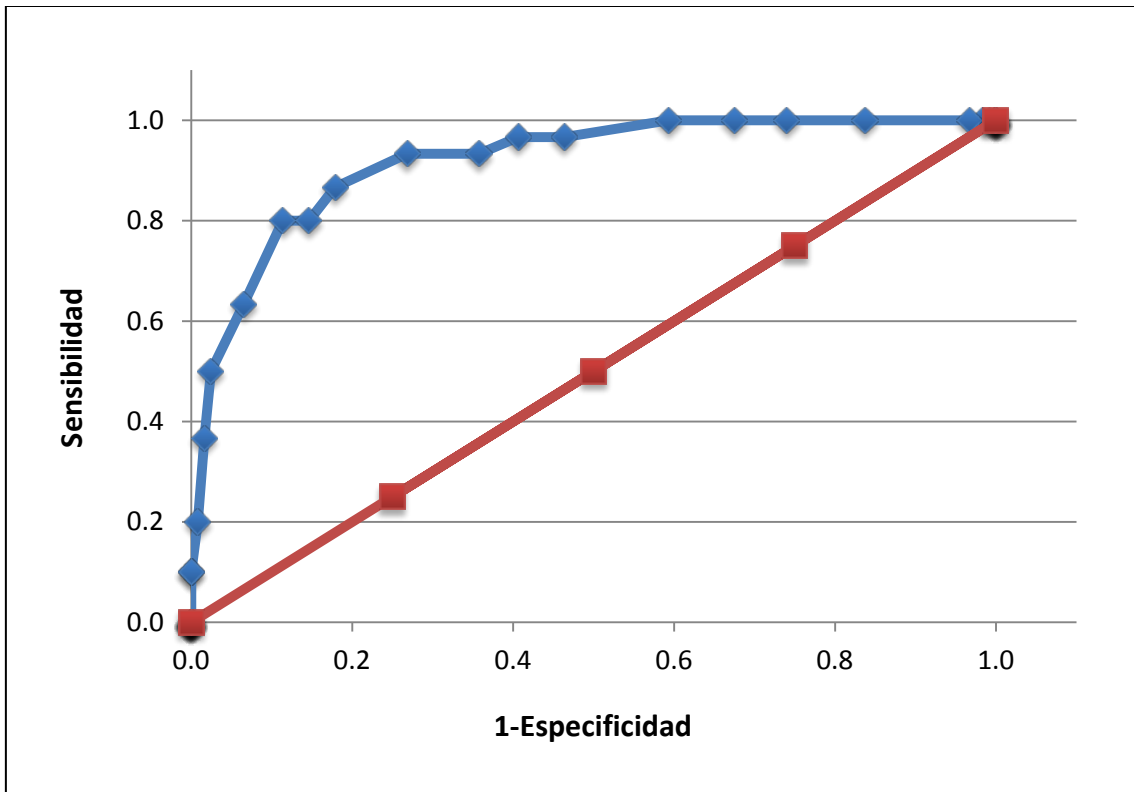


Figura III.2. Curva ROC correspondiente al conjunto de entrenamiento del modelo 1.

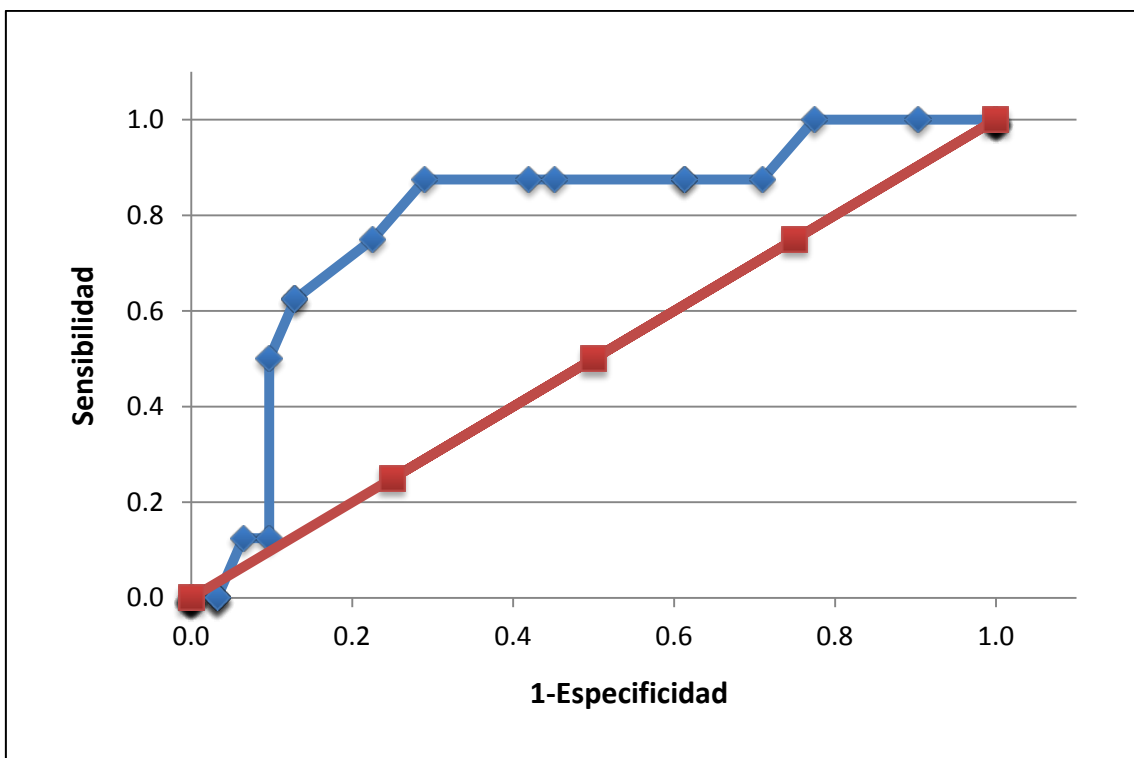


Figura III.3. Curva ROC correspondiente al test externo del modelo 1.

III.1.2. Modelo 2: Inhibidores de Akt por compuestos de origen comercial

Otra función discriminante (FD_2) fue usada para identificar inhibidores de Akt de origen comercial. Esta función incluye cinco variables:

$$FD_2 = -13,835 + 0,073 * T(O \dots Br) - 0,002 * SRW08 + 0,137 * MPC04 + 6,256 * piPC02 - 1,712 * piPC05$$

Ecuación III.2

Los parámetros estadísticos son:

$$N = 647, F = 5,950, \lambda = 0,956, p < 0,00002$$

Dónde:

N: número de compuestos empleados en la elaboración del modelo

F: parámetro Fisher–Snedecor

λ : lambda de Wilks

p: estadístico p-valor

T(O...Br): suma de las distancias topológicas entre los átomos de oxígeno (O) y Bromo (Br)

SRW08: número de caminos de auto-retorno de orden 8

MPC04: número total de caminos de orden 4

piPC02 y piPC05: número de caminos múltiples de orden 2 y 5, respectivamente

Con respecto a la FD_2 , un compuesto fue clasificado como potencial inhibidor de Akt si adopta valores de la FD_2 entre 1,5 y 7,5. Por el contrario, un compuesto será etiquetado como inactivo si FD_2 presenta valores entre 1,5 y -6 (Figura III.4). Finalmente, moléculas con valores de $FD_2 > 7,5$ o $FD_2 < -6$ serán consideradas como no-clasificables por el modelo. Siguiendo este criterio y aplicándolo al grupo de entrenamiento compuesto por 647 compuestos, 16 de los 20 inhibidores de Akt fueron correctamente

clasificados (80% de acierto), mientras que 452 de los 627 compuestos inactivos fueron también clasificados correctamente (72% acierto), tal y como se aprecia en la Tabla III.2.

Cabe resaltar el área de solapamiento existente para valores de FD_2 que adoptan valores entre 0,5-3,5, por lo que a la hora de seleccionar a potenciales inhibidores de Akt hay que tener en cuenta que será una zona con posibles falsos activos. En este caso, se asume esta posibilidad minimizando al máximo sus efectos al incluir como potenciales activos sólo a moléculas con valores de $FD_2 > 1,5$. Si nos fijamos en la Figura III.4 a partir de este rango el número de compuestos activos clasificados correctamente supera claramente al de inactivos.

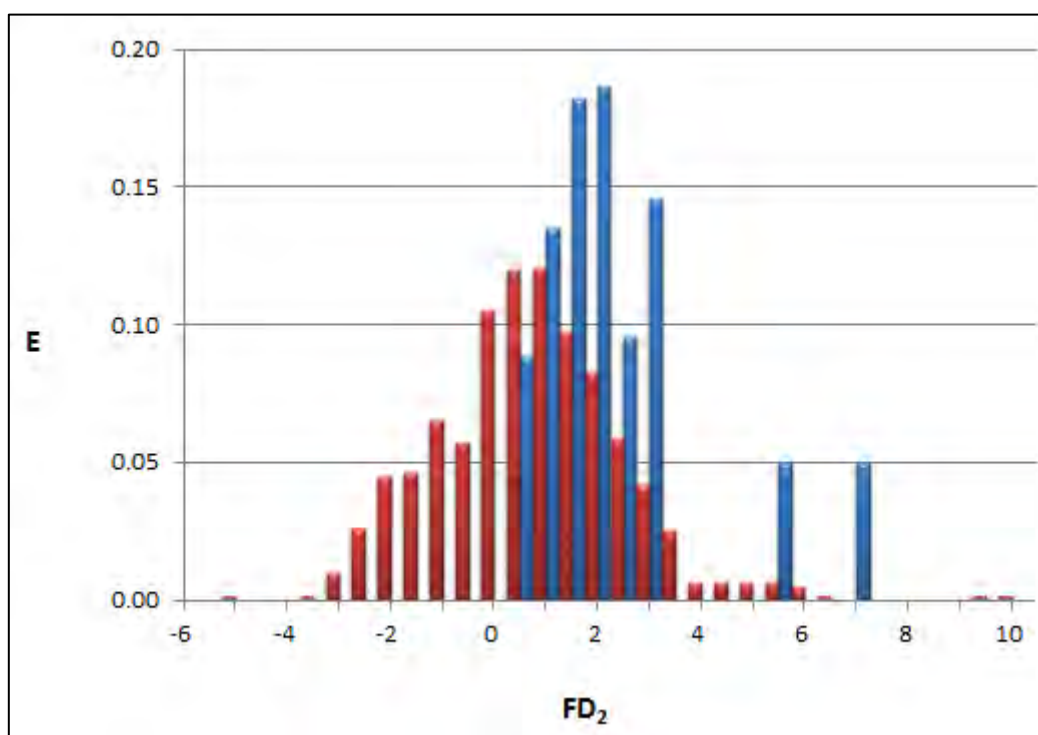


Figura III.4. Diagrama de distribución farmacológica para inhibidores naturales de Akt obtenido empleando la FD_2 (el color azul representa los inhibidores de Akt mientras que el color rojo, los compuestos sin actividad inhibitoria frente a Akt).

Tabla III.2. Matriz de clasificación obtenida a partir de la FD_2 para el *training* y *test set*.

	PORCENTAJE DE CORRECTA CLASIFICACIÓN (%)	CLASIFICACIÓN COMPUESTOS		
		Activos	Inactivos	No-clasificados
TRAINING SET				
Grupo activos	80	16	4	–
Grupo inactivos	72	173	452	2
TEST SET				
Grupo activos	83	5	1	–
Grupo inactivos	81	38	161	1

Posteriormente, se realizó un test de validación externa para determinar la capacidad predictiva del modelo (FD_2). Para ello se partió de 206 compuestos (6 inhibidores de Akt y 200 inactivos frente a la inhibición de Akt) no incluidos en el grupo de entrenamiento. Estos compuestos que conformaban el *test set*, representaban aproximadamente el 20% de toda la data. FD_2 fue capaz de clasificar correctamente al 83% del grupo de activos (5/6 compuestos) y al 81% de los inactivos (161/200 compuestos), como se indica en la Tabla III.2.

En resumen, la aplicación de la FD_2 conduce a descartar tan sólo un 17% de los compuestos activos y un 19% de los inactivos como inhibidores de Akt. En otras palabras, este modelo presenta una alta especificidad así como una alta sensibilidad. Las Figuras III.5 y III.6 recogen las correspondientes curvas ROC, para el grupo de entrenamiento y test, cuyos respectivos valores de AUC fueron 0,850 y 0,943.

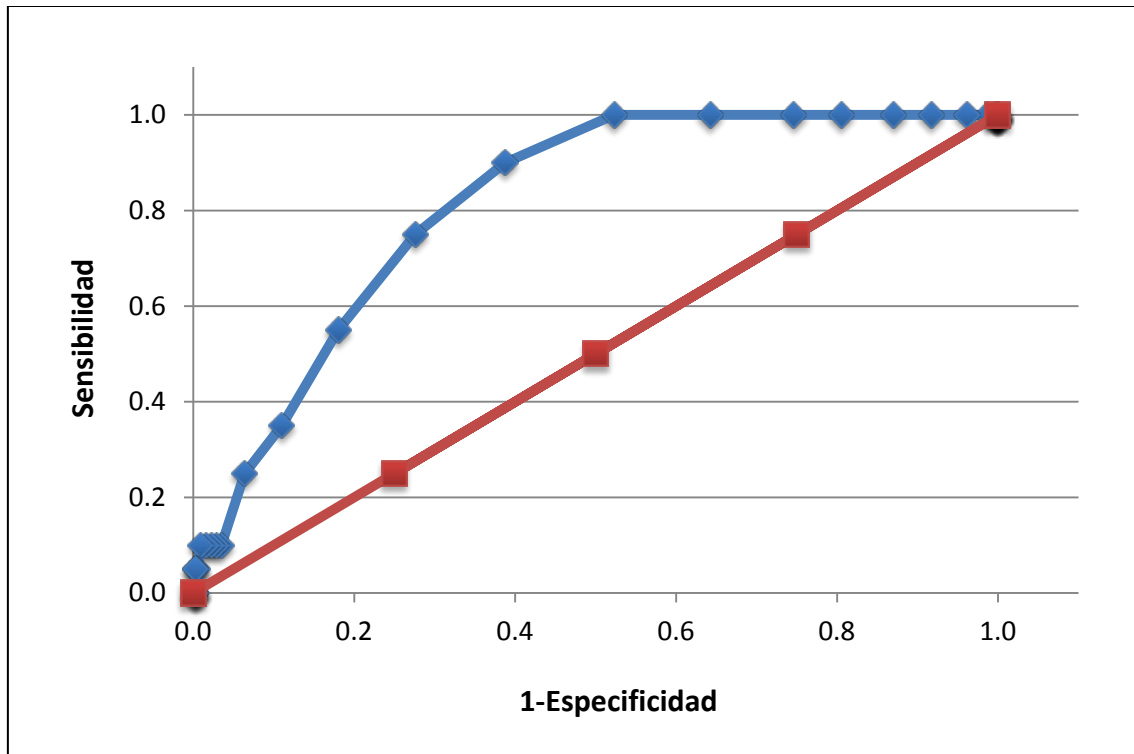


Figura III.5. Curva ROC correspondiente al grupo de entrenamiento del modelo 2.

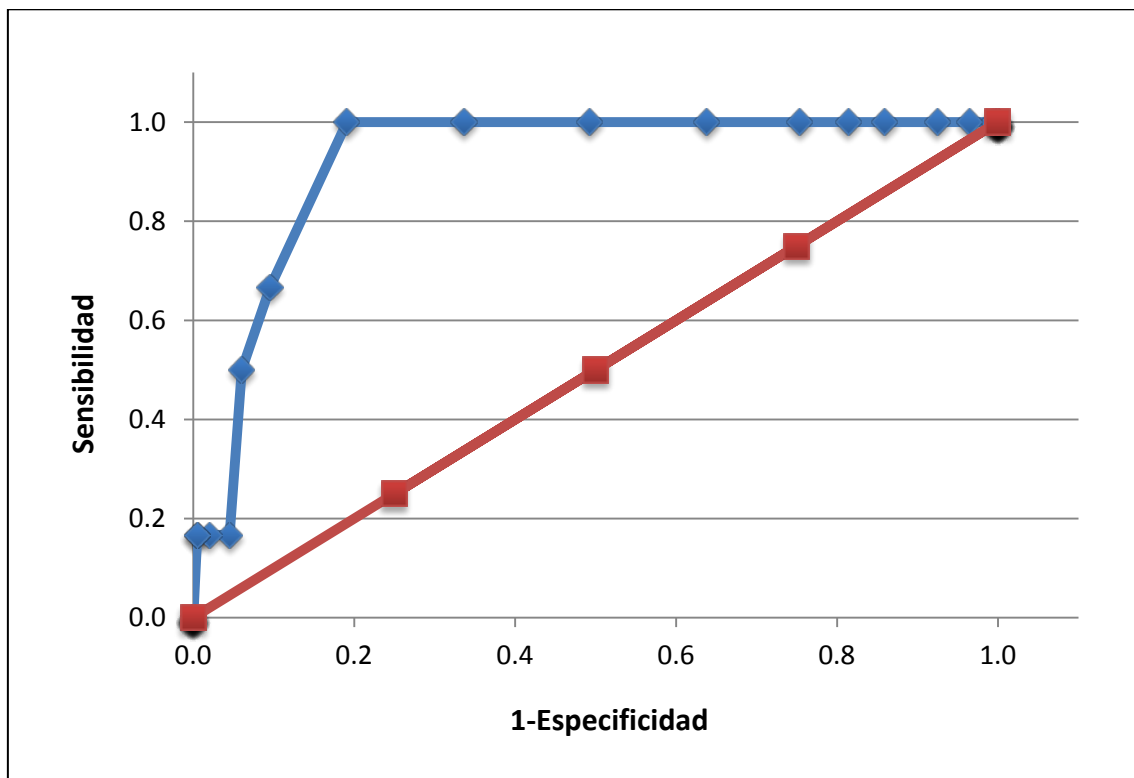


Figura III.6. Curva ROC correspondiente al test externo del modelo 2.

III.1.3. Modelo 3: Inhibición de β -catenina por compuestos naturales

Para la selección de inhibidores de β -catenina de origen natural, se utilizó la función discriminante FD_3 . Esta función estaba compuesta por cinco variables, como se muestra abajo:

$$FD_3 = -12,179 - 0,427 * Dz + 1,174 * S2K + 6,219 * PCR + 1,634 * X2sol + 79,748 * JGI4$$

Ecuación III.3

$$N = 111, F = 7,656, \lambda = 0,733, p < 0,00002$$

Dónde:

N: número de compuestos empleados en la elaboración del modelo

F: parámetro Fisher–Snedecor

λ : lambda de Wilks'

p: estadístico p-valor

Dz: índice de Pogliani

S2K: modificación alfa del índice de doble camino de Kier

PCR: cociente entre el número de enlaces múltiples y el número total de enlaces

X2sol: índice de conectividad de solvatación de orden 2

JGI4: índice topológico de carga de orden 4 ponderado por enlace

En la aplicación de FD_3 , un compuesto es clasificado como inhibidor de la β -catenina si adopta valores entre 0 y 5, mientras que es considerado no inhibidor si FD_3 muestra valores comprendidos entre 0 y -5. Finalmente, moléculas con valor de $FD_3 > 5$ o $FD_3 < -5$ son consideradas como no-clasificables (Figura III.7). Este criterio fue aplicado a 111 moléculas que conformaban el *training set*, de los que 31 de 40 inhibidores naturales de β -catenina fueron correctamente clasificados por el modelo (78% aciertos) mientras que 52 de los 71 compuestos naturales no inhibidores, fueron también correctamente clasificados (73% acierto), como se puede ver en la Tabla III.3.

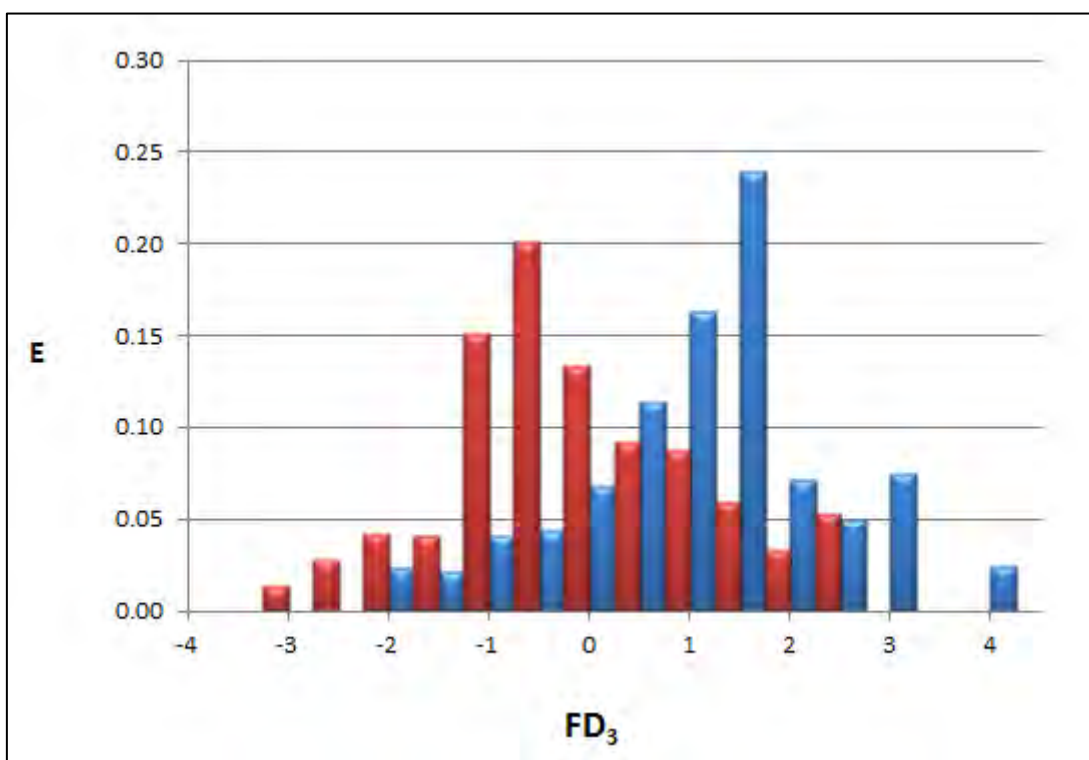


Figura III.7. Diagrama de distribución farmacológica para inhibidores naturales de β -catenina obtenido empleando la FD_3 (el color azul representa los inhibidores de β -catenina mientras que el rojo, los compuestos sin actividad inhibitoria frente a β -catenina).

Tabla III.3. Matriz de clasificación obtenida a partir de la FD₃ para el *training* y *test set*.

	PORCENTAJE DE CORRECTA CLASIFICACIÓN	CLASIFICACIÓN COMPUESTOS		
		Activos	Inactivos	No-clasificados
TRAINING SET				
Grupo activos	78	31	9	–
Grupo inactivos	73	19	52	–
TEST SET				
Grupo activos	67	16	6	2
Grupo inactivos	88	2	15	–

La validación de la FD₃ se llevó a cabo a través de un grupo externo formado por 41 moléculas (24 activas y 17 inactivas frente a inhibición de β -catenina), que no habían sido previamente incluidas en el *training set*. Al igual que en los casos anteriores, este conjunto de moléculas corresponden al 20% de toda la data disponible. En este caso, el modelo fue capaz de clasificar correctamente un 67% de moléculas activas (16/24) y un 88% de inactivas (15/17 compuestos no inhibidores de β -catenina) como se expone en la Tabla III.3.

El modelo discriminante FD₃ fue incapaz de detectar al 33% de los compuestos naturales inhibidores de β -catenina; sin embargo, identificó correctamente al 88% de los compuestos naturales que no presentaban actividad como inhibidores de la β -catenina, por lo que este modelo reduce mucho el riesgo de selección de falsos activos. Lo que confirma que el modelo posee una alta especificidad de predicción de inhibidores naturales de β -catenina. Las Figuras III.8 y III.9 recogen las correspondientes curvas ROC, cuyas AUC fueron 0.844 y 0.843 para el *training* y *test*, respectivamente.

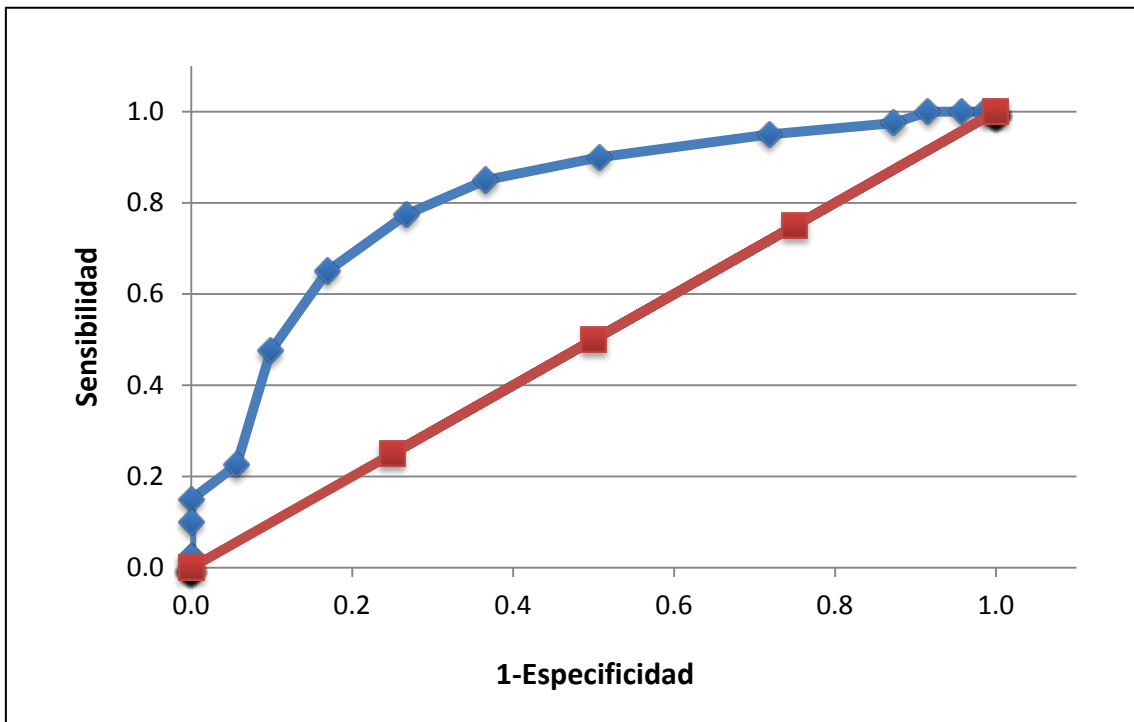


Figura III.8. Curva ROC correspondiente al grupo de entrenamiento del modelo 3.

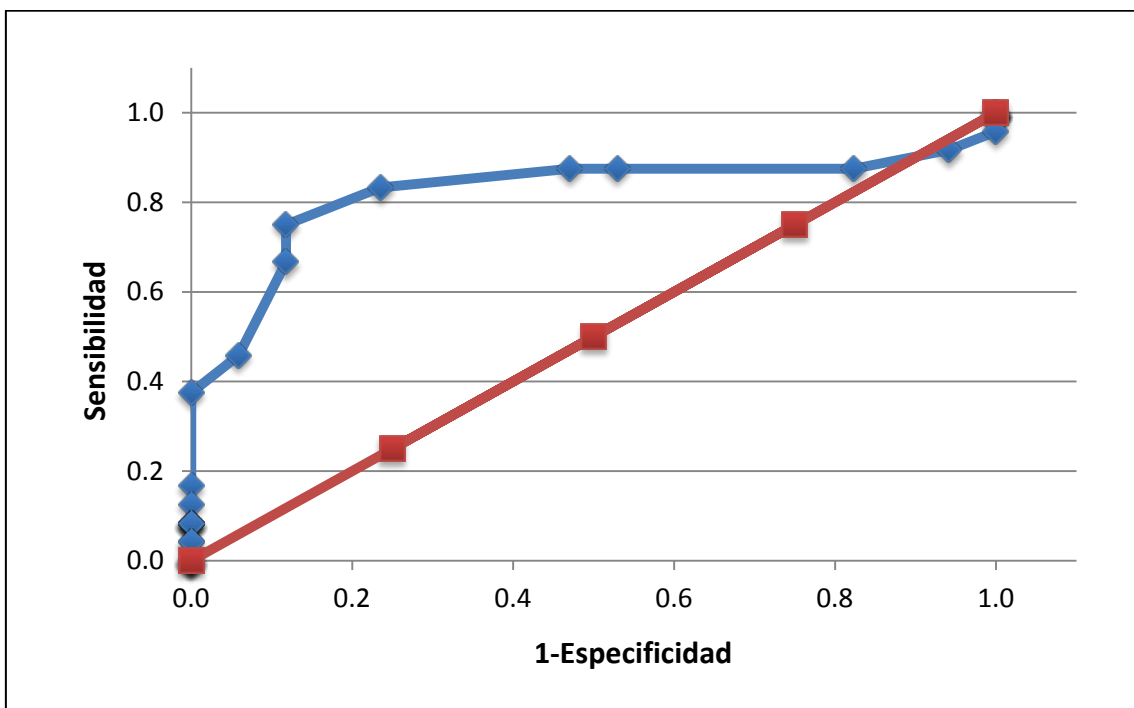


Figura III.9. Curva ROC correspondiente al test externo del modelo 3.

III.1.4. Modelo 4: Inhibición de β -catenina por compuestos comerciales

Para la clasificación de compuestos comerciales inhibidores de β -catenina, la función empleada (FD_4) toma la forma:

$$FD_4 = -0,381 + 0,254 * SCBO - 0,292 * nN - 0,075 * ZM1 + 1,159 * GGI4$$

Ecuación III.4

Parámetros estadísticos que definen al modelo:

$$N = 837, F = 15,498, \lambda = 0,931, p < 0,00002$$

Dónde:

N: número de compuestos empleados en la elaboración del modelo

F: parámetro Fisher–Snedecor

λ : lambda de Wilks

p: estadístico p-valor

SCBO: suma de órdenes de enlace convencionales sin considerar hidrógenos

nN: número de átomos de nitrógeno

ZM1: primer índice de Zagreb

GGI4: índice topológico de carga de orden 4

Un compuesto es clasificado como inhibidor de β -catenina si FD_4 toma valores de 0 a 4,5, mientras que un compuesto se etiquetará como inactivo si FD_4 adopta valores entre 0 y -4. Por último, las moléculas que presentan valores de $FD_4 > 4,5$ o $FD_4 < -4$ quedan indeterminadas por el modelo (Figura III.10). Para todo el conjunto de compuestos (840), 48 de 73 inhibidores de β -catenina (66%) fueron clasificados correctamente por el modelo, mientras que 570 de los 764 compuestos inactivos también fueron bien clasificados por FD_4 (75% de precisión), como se ilustra en la Tabla III.4.

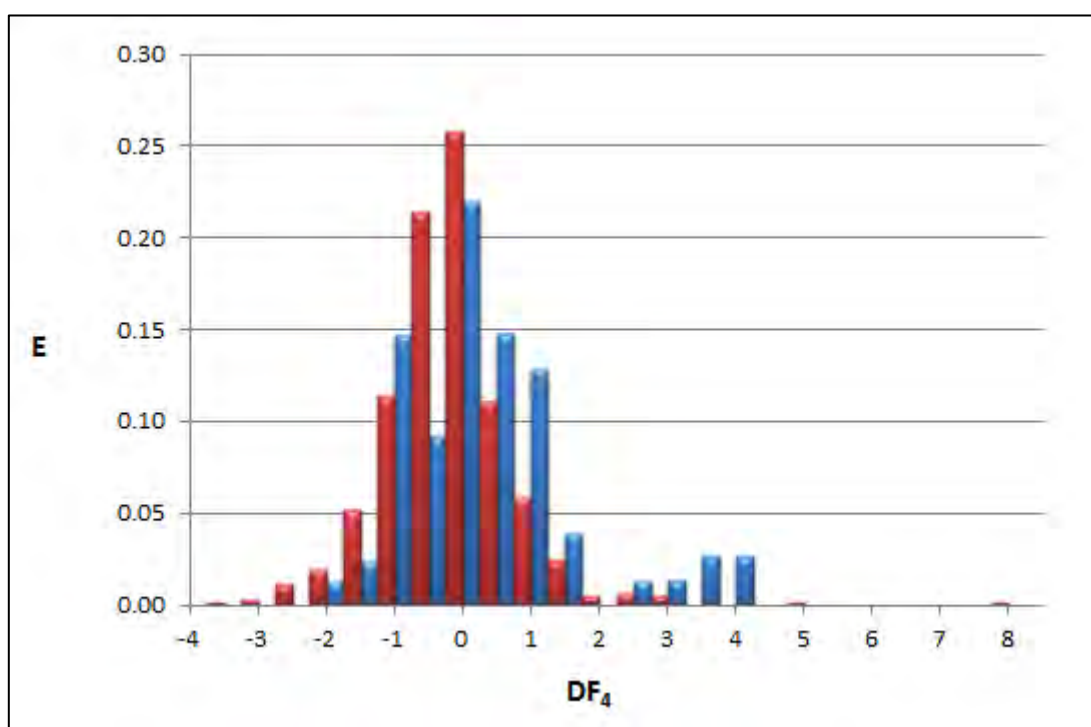


Figura III.10. Diagrama de distribución farmacológica para inhibidores naturales de β -catenina obtenido empleando la FD_4 (el color azul representa los inhibidores de β -catenina mientras que el rojo se refiere a los compuestos sin actividad inhibitoria frente a β -catenina).

Tabla III.4. Matriz de clasificación obtenida a partir de la FD_4 para el *training* y *test set*.

	PORCENTAJE DE CORRECTA CLASIFICACIÓN (%)	CLASIFICACIÓN COMPUESTOS		
		Activos	Inactivos	No-clasificados
TRAINING SET				
Grupo activos	66	48	25	–
Grupo inactivos	75	192	570	2
TEST SET				
Grupo activos	88	14	2	–
Grupo inactivos	74	49	141	–

En este caso, el conjunto de validación externa incluye 206 compuestos (16 activos y 190 inactivos). El grupo de prueba fue seleccionado aleatoriamente correspondiendo al 20% de toda la data. El modelo fue capaz de clasificar correctamente al 88% del grupo activo (14/16 compuestos inhibidores de β -catenina) y al 74% del grupo inactivo (141/190 compuestos), como se refleja en la Tabla III.4.

De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que este modelo presenta una mayor sensibilidad (88%) pero una menor especificidad, ya que se identificaron correctamente un 74% de los compuestos inactivos, es decir el 26% de los compuestos no inhibidores de β -catenina fueron seleccionados como inhibidores de β -catenina por el modelo. Esto podría conducir a la selección de falsos activos, por lo que a la hora de emplear este modelo en el rastreo virtual hay que tener en cuenta este hecho. Las Figuras III.11 y III.12 reflejan las curvas ROC con áreas de 0,800 (grupo entrenamiento) y 0,843 (grupo test).

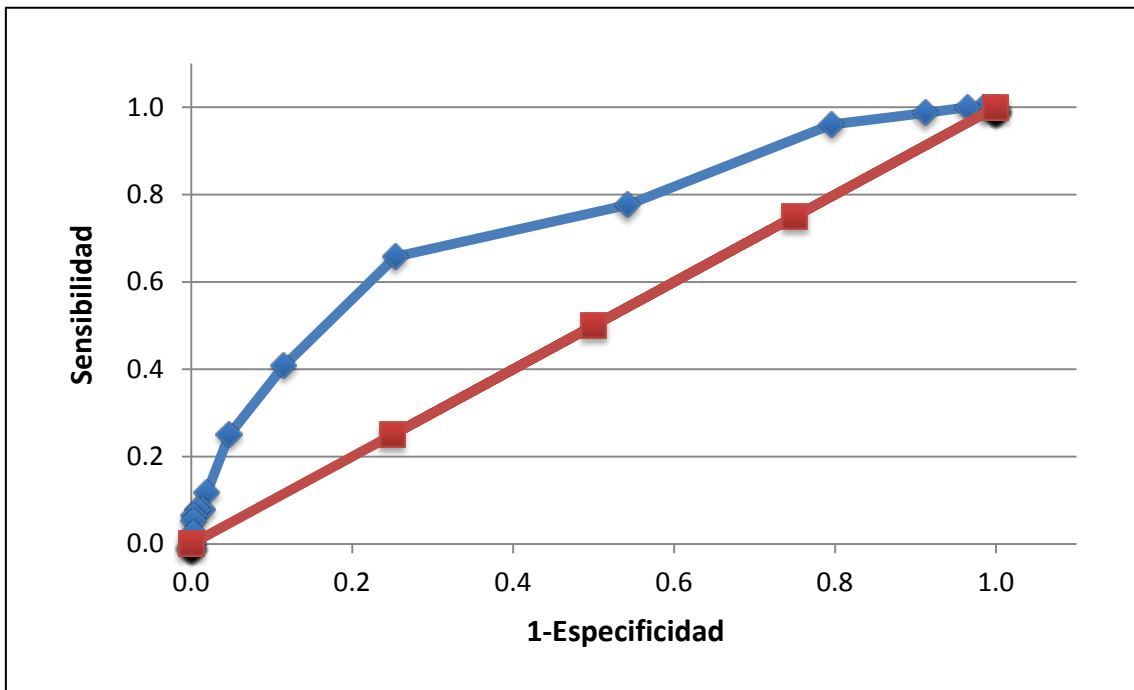


Figura III.11. Curva ROC correspondiente al grupo de entrenamiento del modelo 4.

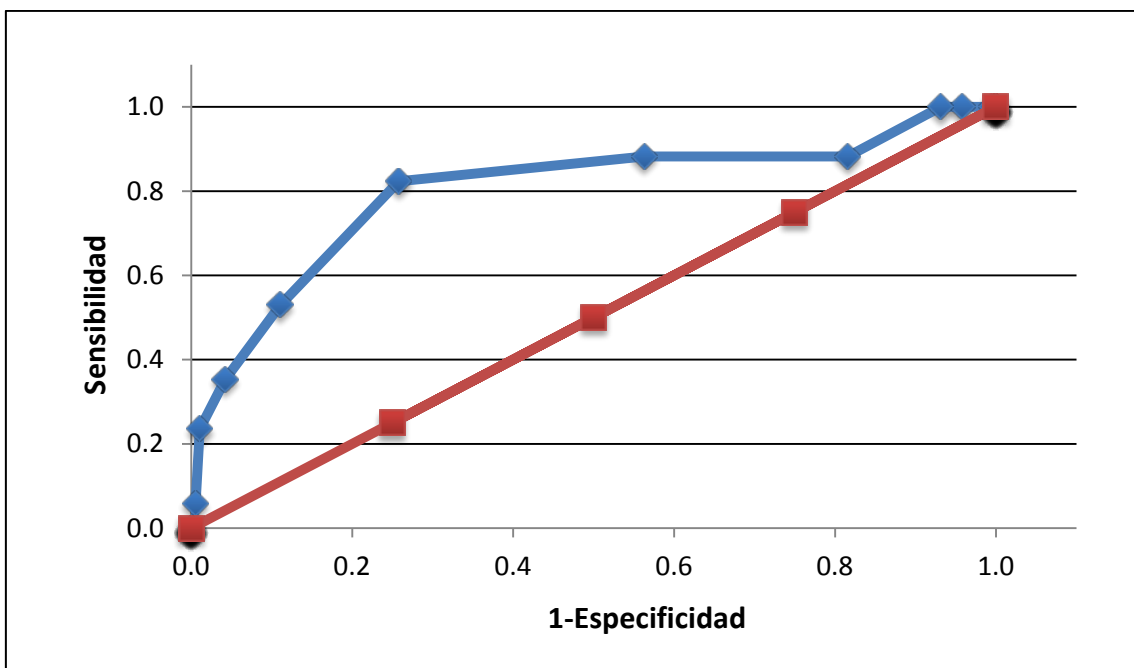


Figura III.12. Curva ROC correspondiente al test externo del modelo 4.

III.1.5. Modelo 5: Inhibición cuantitativa de Akt por compuestos comerciales

Para poder predecir la inhibición de Akt desde un punto de vista cuantitativo se desarrollan modelos aplicando la técnica del análisis de regresión multilínea. Para ello, en primer lugar se transformó logarítmicamente la propiedad a correlacionar, CI_{50} (nM). Ello obedece a que habitualmente se consiguen mejores correlaciones acotando el intervalo en escala logarítmica, cuando la variabilidad de los valores es grande. La ecuación que se obtuvo fue la siguiente:

$$\log CI_{50}(nM) = 8,310(\pm 0,658) - 2,277(\pm 0,214) \cdot EEig04d$$

Ecuación III.5

Los parámetros estadísticos que definen al modelo, son:

$$\begin{array}{cccc} N=7 & r^2=0,958 & F=113,65 & EEE=0,267 \\ & p<0,00013 & Q^2= 0,919 & \end{array}$$

Dónde:

N: número de compuestos empleados en la elaboración del modelo

r^2 : coeficiente de regresión

F: parámetro Fisher–Snedecor

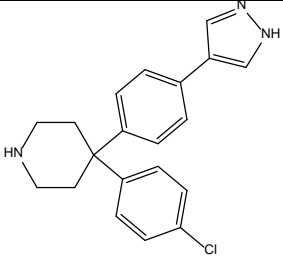
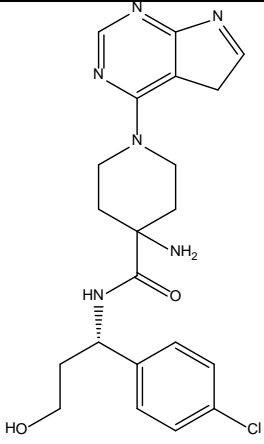
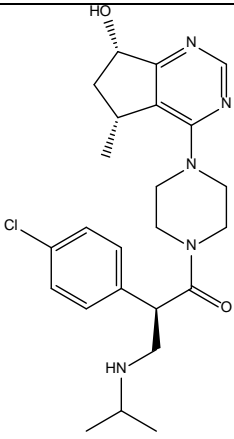
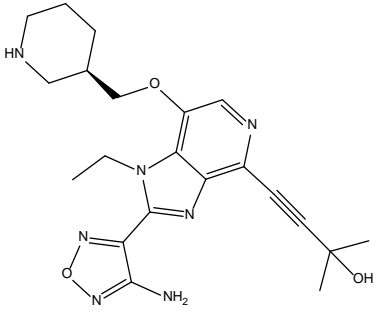
EEE: error estándar de estimación

p: estadístico p-valor

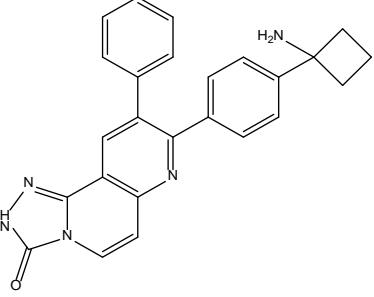
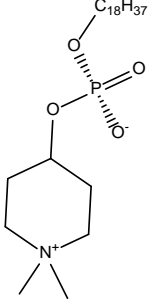
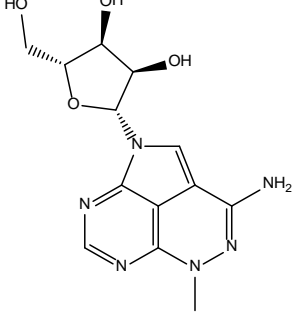
Q^2 : coeficiente de correlación de la validación cruzada

EEig04d: auto-valor número 4 de la matriz de adyacencia de aristas ponderada por momentos dipolares

Tabla III.5. Predicción de la inhibición de Akt1 y valor del índice topológico empleado para cada compuesto analizado a partir de la Ecuación III.5.

Estructura química	Compuesto	EEig04d	log CI ₅₀ obs	log CI ₅₀ cal	log CI ₅₀ cal cv
	AT7867	3,059	1,505	1,346	1,319
	AZD5363	3,350	0,477	0,683	0,735
	GDC-0068	3,190	0,699	1,047	1,112
	GSK690693	3,528	0,301	0,278	0,268

RESULTADOS

	MK-2206	3,306	0,903	0,783	0,756
	Perifosine	1,984	3,672	3,793	4,527
	Triciribine	2,885	2,114	1,742	1,671

Si observamos la Tabla III.5 apreciamos como en términos generales la Ecuación III.5 predice correctamente el valor de $\log CI_{50}$ Akt para distintos compuestos inhibidores de Akt reconocidos en la literatura. Las mayores discrepancias las encontramos en los compuestos: GDC-0068 y Triciribine. La Figura III.13 muestra gráficamente la comparación entre los valores experimentales y los calculados obtenidos a partir de la Ecuación III.5.

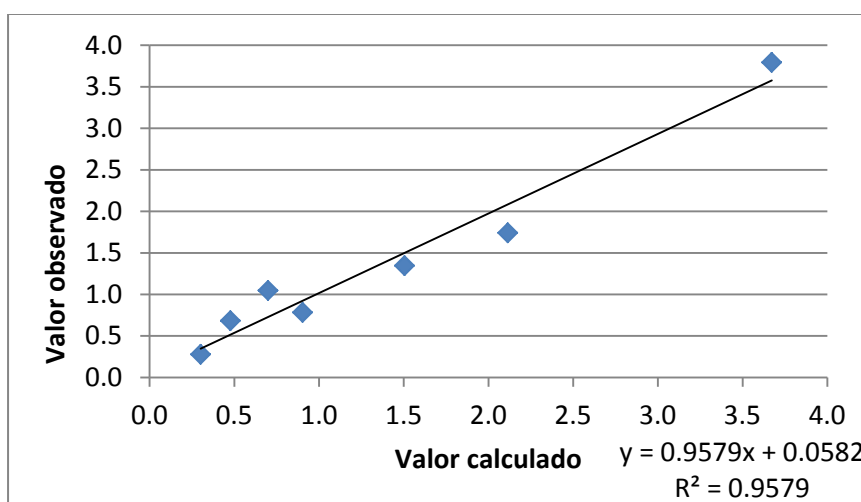


Figura III.13. Representación gráfica del $\log CI_{50}$ observado frente a $\log CI_{50}$ calculado a través de la Ecuación III.5. Intervalo de confianza= 0,95.

La validación del modelo de regresión (Ecuación III.5) se hizo a través de un validación cruzada (cv) de tipo “leave-one-out”. En la Tabla III.5 se muestran los valores de predicción para cada compuesto tras la validación interna, mientras que en la Figura III.14 se representan los valores residuales y los residuales de la cv. Por valor residual se entiende la diferencia entre el valor observado y el calculado.

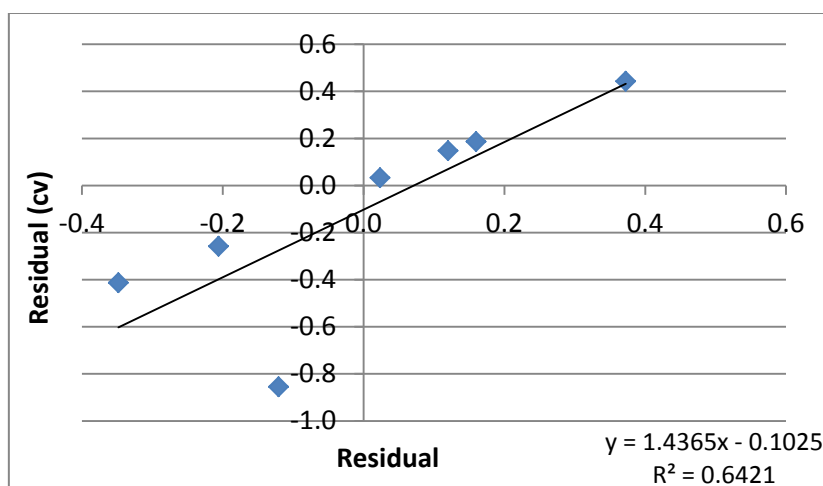


Figura III.14. Test de estabilidad (validación cruzada). Residuales obtenidos con el modelo 5 frente a los obtenidos con la validación cruzada.

Cuando se lleva a cabo el test de validación cruzada (L-O-O), Perifosine (al igual que el resto de compuestos del grupo entrenamiento) se elimina del *training set* y se destina al grupo test externo. El modelo que se genera con los restantes compuestos no es capaz de predecir correctamente el valor de $\log\text{Cl}_{50}$ de Perifosine. Por lo que se aprecia una pérdida de estabilidad del modelo debida a Perifosine.

De hecho, si nosotros elimináramos a Perifosine del modelo (volviendo a construir el modelo sin él) y repetimos el test de estabilidad, se ve como la estabilidad aumenta significativamente (Figura III.15). Queda claro pues que el compuesto causante de la inestabilidad del modelo es Perifosine. Este hecho es totalmente razonable si analizamos las estructuras químicas de los modelos que conforman el *training set* (Tabla III.5), donde se aprecia una clara diferencia estructural entre Perifosine y el resto de compuestos que conforman el modelo 5.

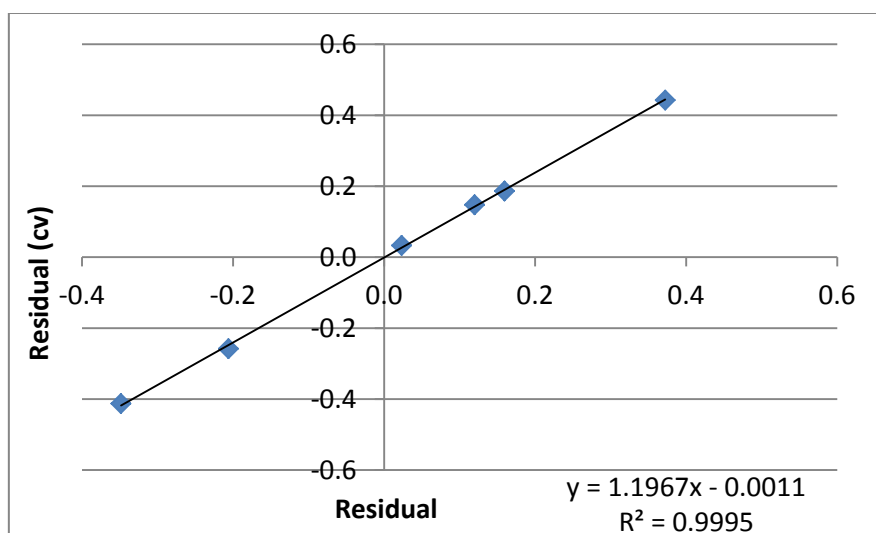


Figura III.15. Test de estabilidad (validación cruzada) generando el mismo modelo sin el compuesto Perifosine. Residuales obtenidos con el modelo (sin Perifosine) frente a los obtenidos con la validación cruzada.

Con el objetivo de encontrar posibles “outliers” se determinó si el valor residual de algún compuesto predicho superaba $\pm 2 \cdot \text{EEE}$ (0,267) (Figura III.16). Como se aprecia, de los 7 compuestos 5 muestran residuales inferiores a $\pm 1 \cdot \text{EEE}$, representando al 71% de la data. Ningun compuesto aparece fuera del rango de $\pm 2 \cdot \text{EEE}$, por lo que, el modelo de predicción de inhibición Akt es aplicable a todo el grupo.

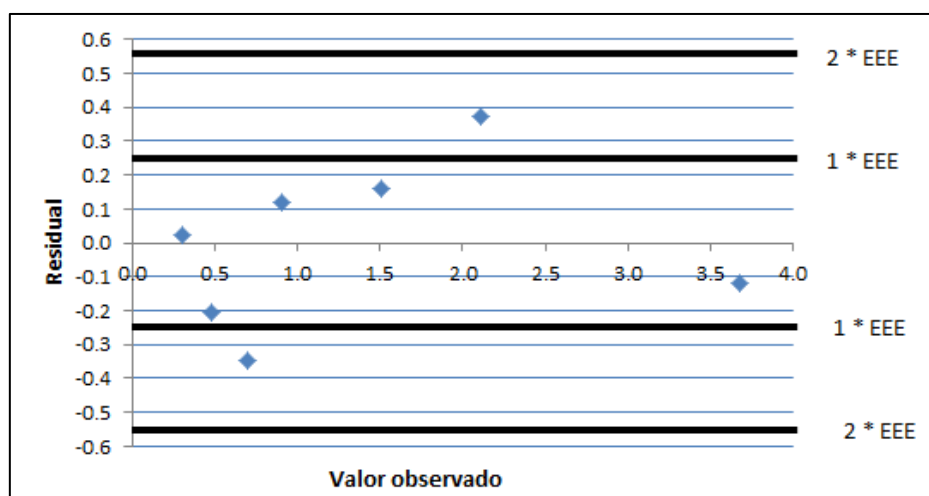


Figura III.16. Representación gráfica del residual frente al valor observado para cada compuesto, empleando la Ecuación III.5.

Por último, la Figura III.17 representa gráficamente el test de aleatoriedad al que sometimos al modelo (Ecuación III.5). En ella representamos el coeficiente de determinación (Q^2) frente a la varianza (r^2).

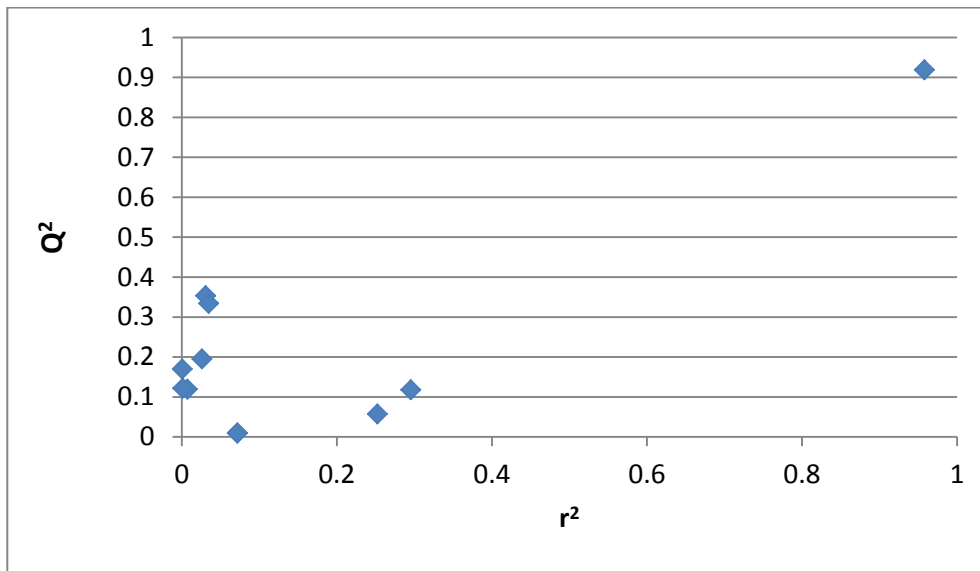


Figura III.17. Test de aleatoriedad. Representación gráfica de Q^2 frente a r^2 obtenido en el estudio de aleatoriedad.

Si observamos la Figura III.17 se evidencia la no aleatoriedad del modelo ya que todos los puntos obtenidos a partir de las series aleatorias (10 series) se encuentran en el cuadrante inferior izquierdo de la gráfica, los cuales corresponden a coeficiente de regresión y de correlación pequeños. Se diferencia claramente al valor del modelo ($r^2 = 0,958$) que aparece en el cuadrante superior derecha, que es muy superior a cualquiera de los obtenidos aleatoriamente.

III.1.6. Modelo 6: Inhibición cuantitativa de β -catenina por compuestos comerciales

Para poder predecir la inhibición de β -catenina por compuestos comerciales desde un punto de vista cuantitativo, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\log CI_{50}(\mu\text{M}) = 1,852(\pm 0,293) - 17,211(\pm 3,280) \cdot JGI2$$

Ecuación III.6

Los parámetros estadísticos que definen al modelo, son:

N=6	$r^2=0,873$	F=27,54	EEE=0,172
	$p<0,0063$		$Q^2= 0,726$

Dónde:

N: número de compuestos empleados en la elaboración del modelo

r^2 : coeficiente de regresión

F: parámetro Fisher–Snedecor

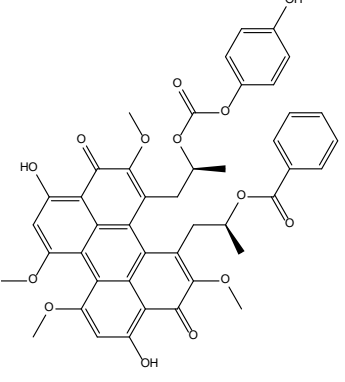
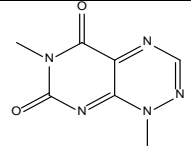
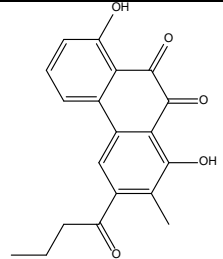
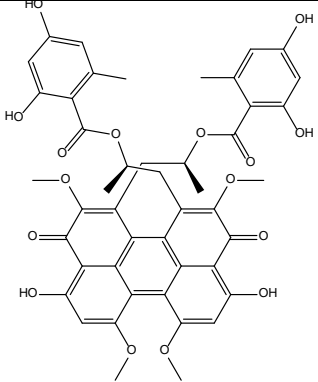
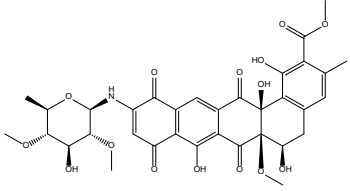
EEE: error estándar de estimación

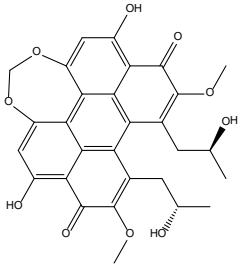
p: estadístico p-valor

Q^2 : coeficiente de correlación de la validación cruzada

JGI2: índice de carga de orden 2 ponderado por enlace

Tabla III.6. Predicción de la inhibición de β -catenina y valor del índice topológico empleado para cada compuesto analizado a partir de la Ecuación III.6.

Estructura Química	Compuesto	JGI2	log CI ₅₀ obs	log CI ₅₀ cal	log CI ₅₀ cal cv
	PKF115-584	0,065	0,505	0,734	0,851
	PKF118-310	0,111	-0,097	-0,058	-0,035
	PKF118-744	0,097	0,380	0,183	0,132
	PKF222-815	0,073	0,613	0,596	0,591
	ZTM000990	0,114	-0,194	-0,110	-0,045

	CGP049090	0,061	0,939	0,802	0,708
---	-----------	-------	-------	-------	-------

Si observamos la Tabla III.6 apreciamos como en términos generales la Ecuación III.6 predice correctamente el valor de $\log Cl_{50}$ β -catenina para distintos compuestos activos según la literatura. Las mayores discrepancias las encontramos en los compuestos PKF115-584 y PKF118-744, aunque no son *outliers* según el criterio establecido anteriormente. La Figura III.18 muestra gráficamente la comparación valores observados-valores calculados a través de la Ecuación III.6.

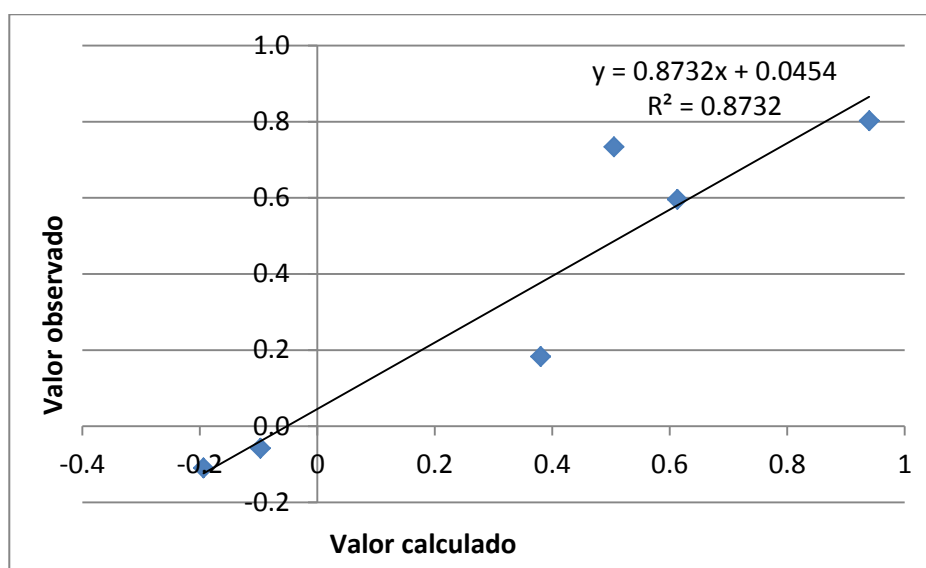


Figura III.18. Representación gráfica del $\log Cl_{50}$ observado frente a $\log Cl_{50}$ calculado a través de la Ecuación III.6. Intervalo de confianza= 0,95.

La validación del modelo de regresión (Ecuación III.6.) se hizo a través de una cros-validación (cv) de tipo “leave-one-out”. En la Tabla III.6. se muestran los valores de predicción para cada compuesto tras la validación interna. Mientras que la representación de los residuales obtenidos por validación cruzada frente a los obtenidos directamente de la ecuación, aparecen en la Figura III.19. Como se aprecia en el gráfico inferior, el modelo es absolutamente estable ya que al realizar el test de validación cruzada logra predecir correctamente a todos los compuestos de la data.

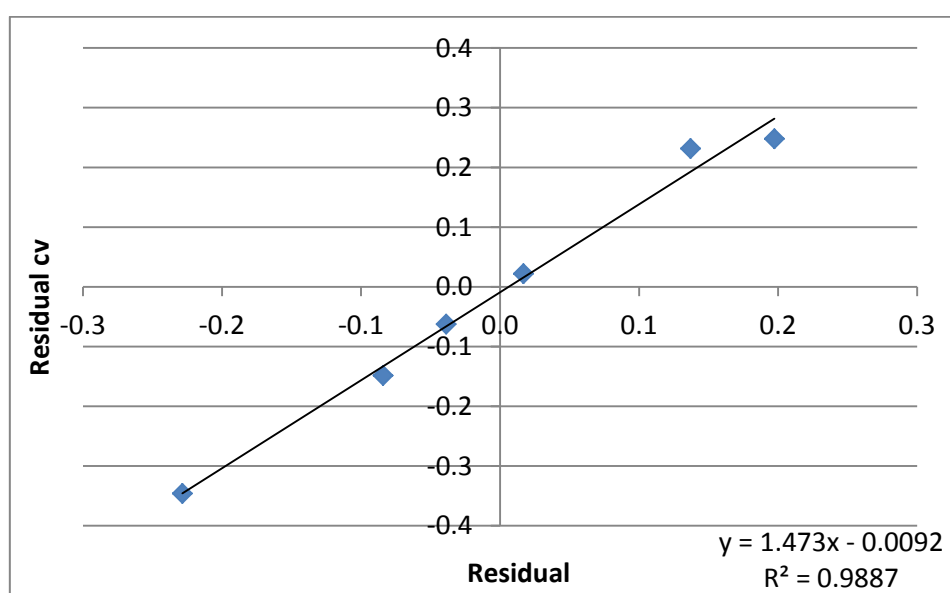


Figura III.19. Test de estabilidad (cros-validación). Residuales obtenidos con el modelo frente a los obtenidos con la validación cruzada.

La distribución de residuales frente a los valores observados a través del modelo 6, aparece en la Figura III.20. Como se aprecia de los 6 compuestos 4 muestran residuales inferiores a $\pm 1^*$ EEE, representando al 67% de la data. Ningun compuesto aparece fuera del rango de $\pm 2^*$ EEE , por lo que, el modelo de predicción de inhibición β -catenina, es aplicable a todo el grupo.

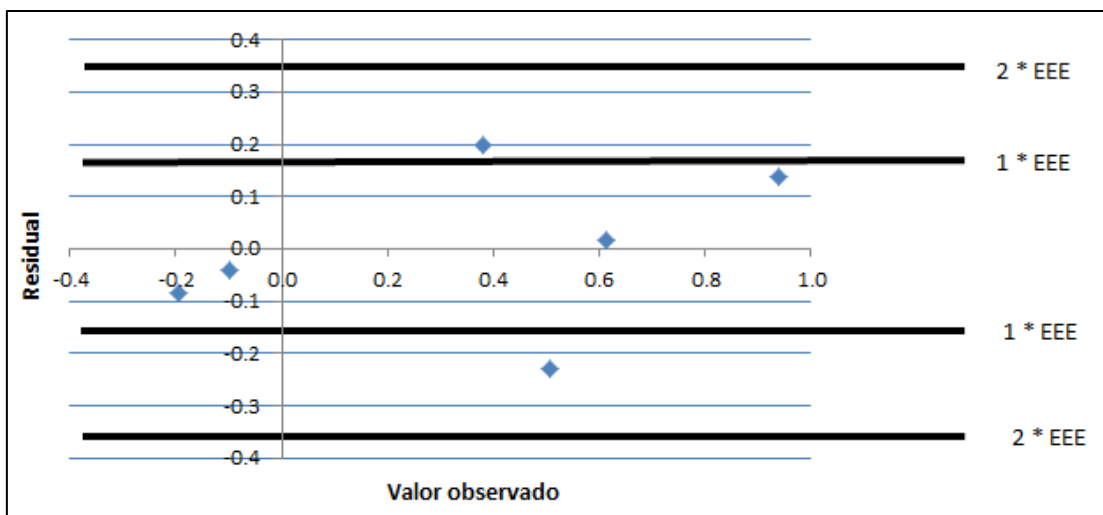


Figura III.20. Representación gráfica del residual frente al valor observado para cada compuesto empleando la Ecuación III.6.

Por último, la Figura III.21 representa gráficamente el test de aleatoriedad al que sometimos al modelo (Ecuación III.6).

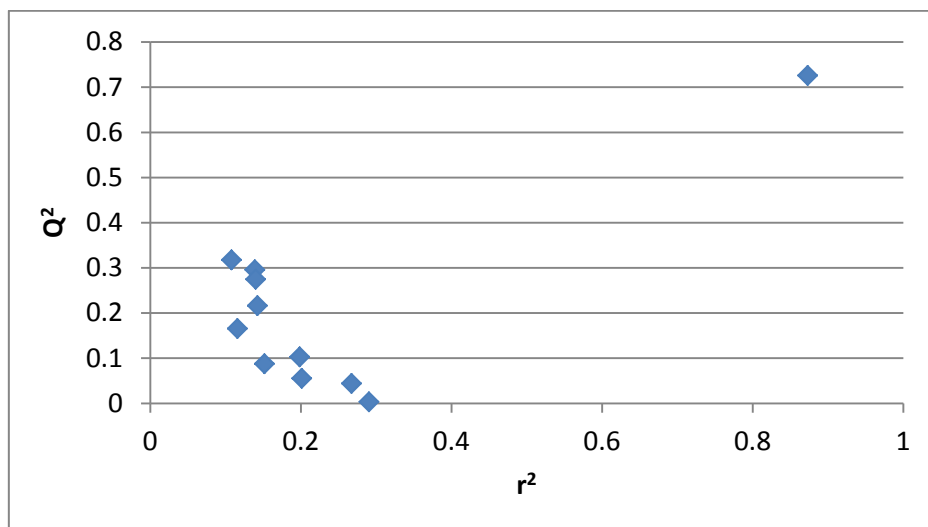


Figura III.21. Test de aleatoriedad. Representación gráfica de Q^2 frente a r^2 obtenido en el estudio de aleatoriedad.

Si observamos la Figura III.21 se evidencia la no aleatoriedad del modelo ya que todos los puntos obtenidos a partir de las series aleatorias (10 series) se encuentran en el cuadrante inferior izquierdo de la gráfica. En general todos los test aleatorios se diferencian de una manera clara del valor de r^2 (0,873) para el modelo (Ecuación III.6) que aparece en el cuadrante superior derecho.

III.1.7. Modelo 7: Inhibición de Akt por compuestos comerciales. Modelo no lineal

Finalmente, se emplearon técnicas de regresión no-lineares (redes neuronales artificiales, RNAs), para modelizar la inhibición de Akt. Para ello se emplearon un conjunto de descriptores (ATS6v, GATS6v, GATS3e, JGI1, JGI10, GGI8, JGT, EEig11x), previamente seleccionados por medio de análisis lineal discriminante.

El conjunto de datos empleado para la obtención del modelo 7, constaba de 164 moléculas (33 inhibidores de Akt y el resto no inhibidores de Akt con distinta actividad farmacológica, en concreto anti-inflamatorios y anti-neoplásicos). La red de neuronas artificiales se entrenó con el 60% del conjunto de datos (*training set*), reservando un 20% de la data para conformar el grupo test y el restante 20% como validación externa de la RNA. Los compuestos incluidos fueron seleccionados al azar por el software empleado para la construcción de la red neuronal.

La red neuronal elegida (Figura III.22), posee una arquitectura tipo MLP 8-9-2 con ocho neuronas en la capa de entrada (una por cada descriptor seleccionado previamente), una capa oculta formada por nueve neuronas y una capa de salida con dos neuronas, que muestra el valor predicho de la clasificación (activo o inactivo). El algoritmo de entrenamiento de la RNA fue la regresión logística, y la función de activación de la capa interior y la salida fue de tipo Softmax.

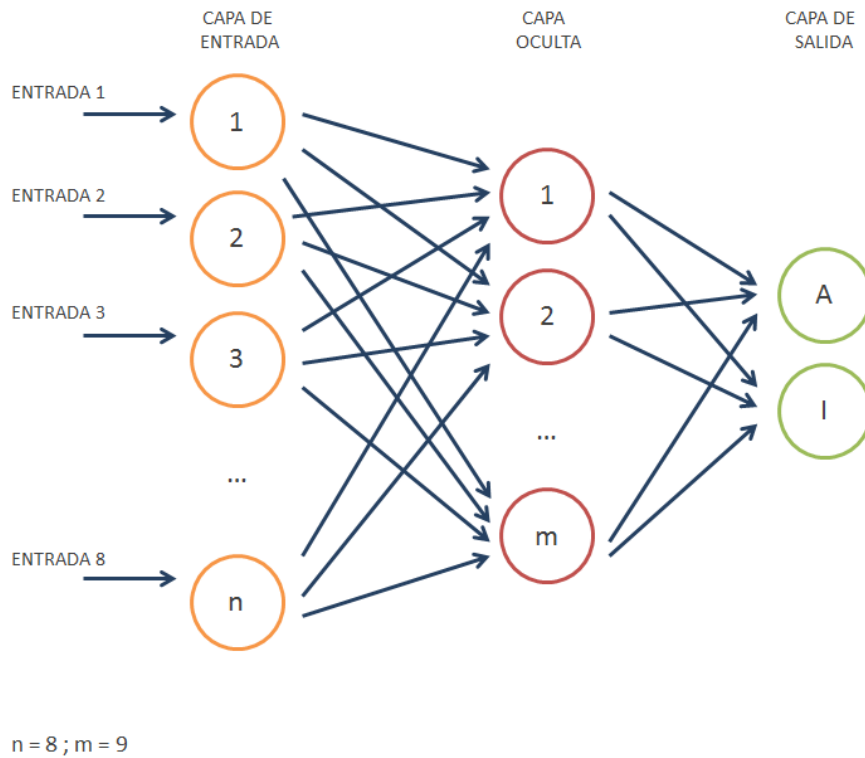


Figura III.22. Disposición de la red neuronal utilizada para la predicción de inhibición de Akt. L1: capa de entrada con 8 neuronas, cada una asociada a uno de los índices topológicos seleccionados; L2: capa oculta con 9 neuronas determinadas empíricamente; L3: capa de salida con 2 neuronas, una correspondiente al valor activo y otra al inactivo de la variable categórica o discreta.

Tabla III.7. Matriz de clasificación correspondiente al modelo 7
(grupo *training*, test y validación externa).

	PORCENTAJE DE CORRECTA CLASIFICACIÓN (%)	CLASIFICACIÓN COMPUESTOS	
		Activos	Inactivos
TRAINING SET			
Grupo activos	89	17	2
Grupo inactivos	90	8	71
TEST SET			
Grupo activos	100	8	-
Grupo inactivos	100	-	25
VALIDATION SET			
Grupo activos	100	6	-
Grupo inactivos	89	3	24

Tal y como se aprecia en la Tabla III.7, de los 98 compuestos que conformaban el grupo de entrenamiento (*training set*) de la red neuronal, el 90% fue correctamente identificado como inhibidor o no de Akt. En el grupo test, el modelo 7 acertó el 100% de los compuestos que lo conformaban (33 moléculas). Y finalmente, el modelo 7 fue sometido a una validación externa, formada por 33 moléculas (6 inhibidores de Akt y 27 no inhibidores). En este caso el modelo 7 demostró una mayor sensibilidad al identificar el 100% de los inhibidores de Akt, aunque también se aprecia una especificidad muy alta, con casi el 90% de los compuestos no inhibidores de Akt perfectamente identificados. En este caso, y a diferencia de lo visto con los modelos MLR, el grupo test formaría parte de una validación interna que realiza la red neuronal a la hora de construir la red y entrenarla, mientras que el grupo de validación externa

está formado por compuestos que el modelo no ha registrado con anterioridad.

Las correspondientes curvas ROC aparecen en la Figura III.23 (AUC=0,973), Figura III.24 (AUC=1,000) y Figura III.25 (AUC=0,975), para el grupo de entrenamiento, test y de validación, respectivamente.

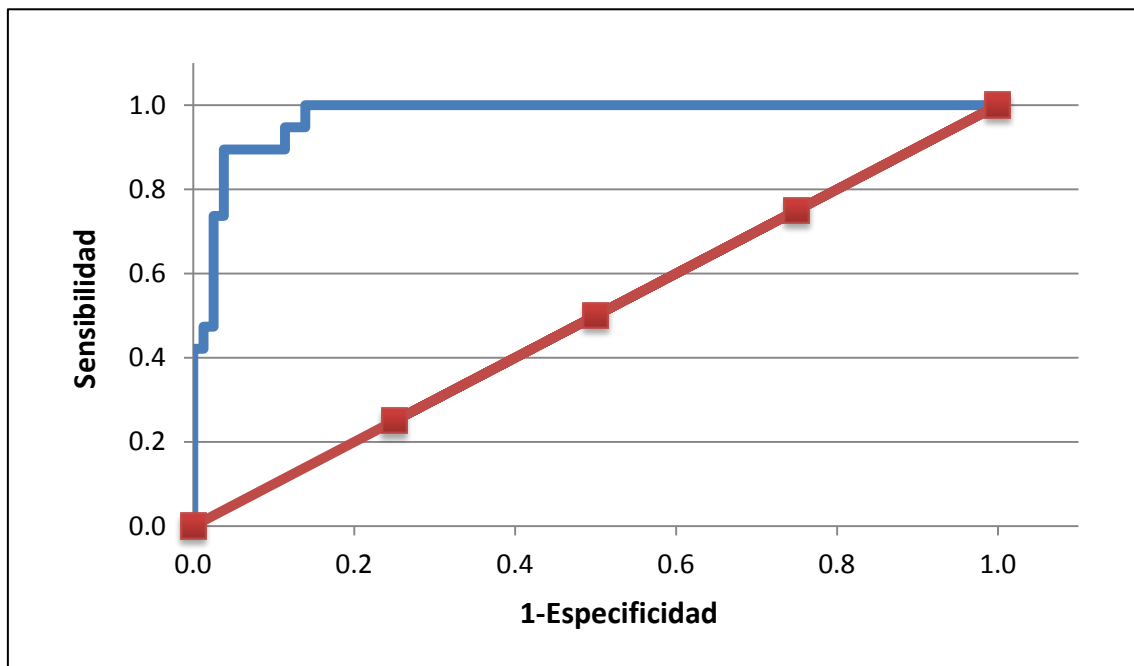


Figura III.22. Curva ROC correspondiente al conjunto de *training* del modelo 7.

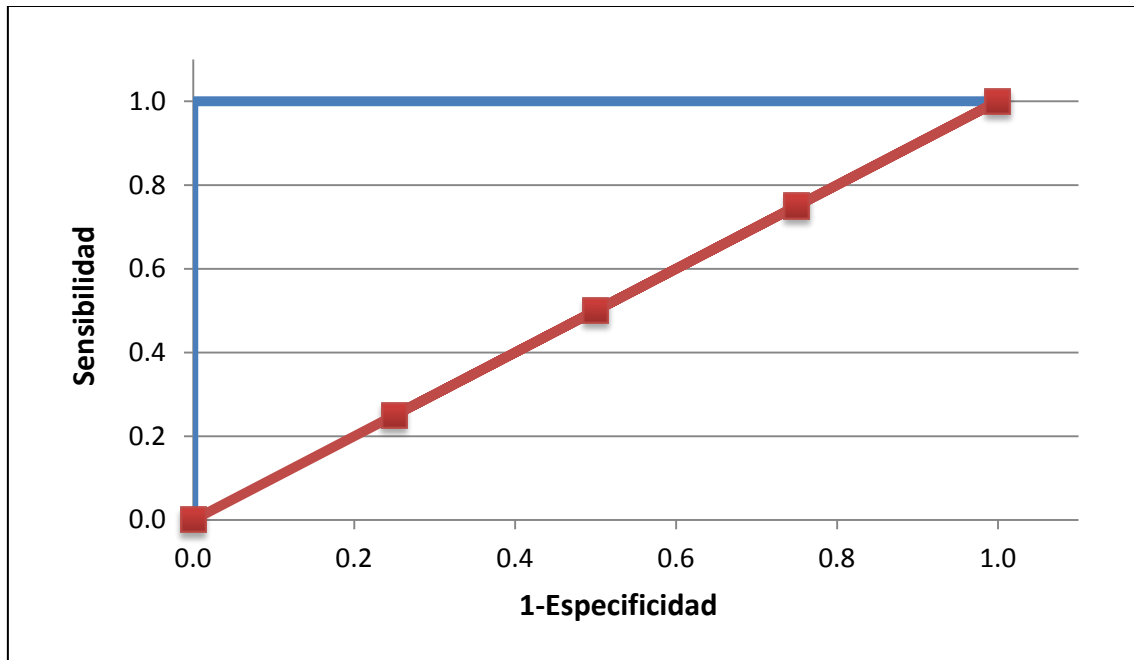


Figura III.23. Curva ROC correspondiente al conjunto test del modelo 7.

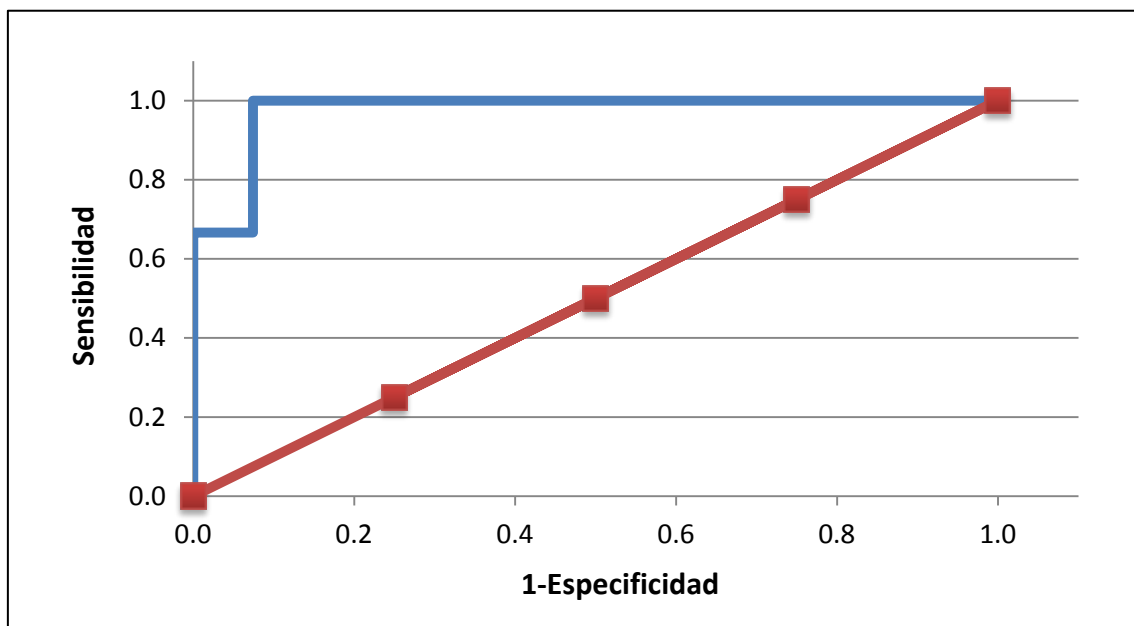


Figura III.24. Curva ROC correspondiente al conjunto de validación externa del modelo 7.

III.1.8. Modelo 8: Inhibición de β -catenina por compuestos comerciales.

Modelo no lineal

Finalmente, se emplearon también RNAs para modelizar la inhibición de β -catenina por compuestos comerciales. Para la elaboración del modelo 8, se emplearon un conjunto de 15 descriptores constitucionales, topológicos y topoquímicos (nCIR, nN, nR06, Wap, S3K, D/Dr12, T(N..Cl), T(S..S), T(S..F), SRW09, MPC08, MPC09, MPC10, PCR, MATS3m, MATS1v, MATS6e, GATS4m, GATS8m, GATS1v, GATS2v, GATS3v, GATS6e, GATS8e, GATS6p, JGI5, JGI10 y VEA1), previamente seleccionados por medio de análisis lineal discriminante.

El conjunto de datos empleado para la obtención del modelo 8, constaba de 199 moléculas (85 inhibidores de β -catenina y el resto no inhibidores con dos actividades farmacológicas: anti-inflamatorios y anti-neoplásicos). La RNA se entrenó igual que en el caso anterior, con el 60% del conjunto de datos (*training set*), reservando un 20% de la data para conformar el grupo test y el restante 20% como validación externa; todos ellos fueron seleccionados aleatoriamente por el software empleado para construcción de la red neuronal.

Se obtuvo una RNA con la siguiente arquitectura neuronal que predice la inhibición de β -catenina con la siguiente arquitectura neuronal (Figura III.26): tipo MLP 28-14-2 con veintiocho neuronas en la capa de entrada (una por cada descriptor seleccionado previamente), una capa oculta formada por catorce neuronas y una capa de salida con dos neuronas, que muestra el valor predicho de la LDA. El algoritmo de entrenamiento fue el BFGS 83, y la función de activación de la capa interior y la salida fueron respectivamente, logística y la Softmax.

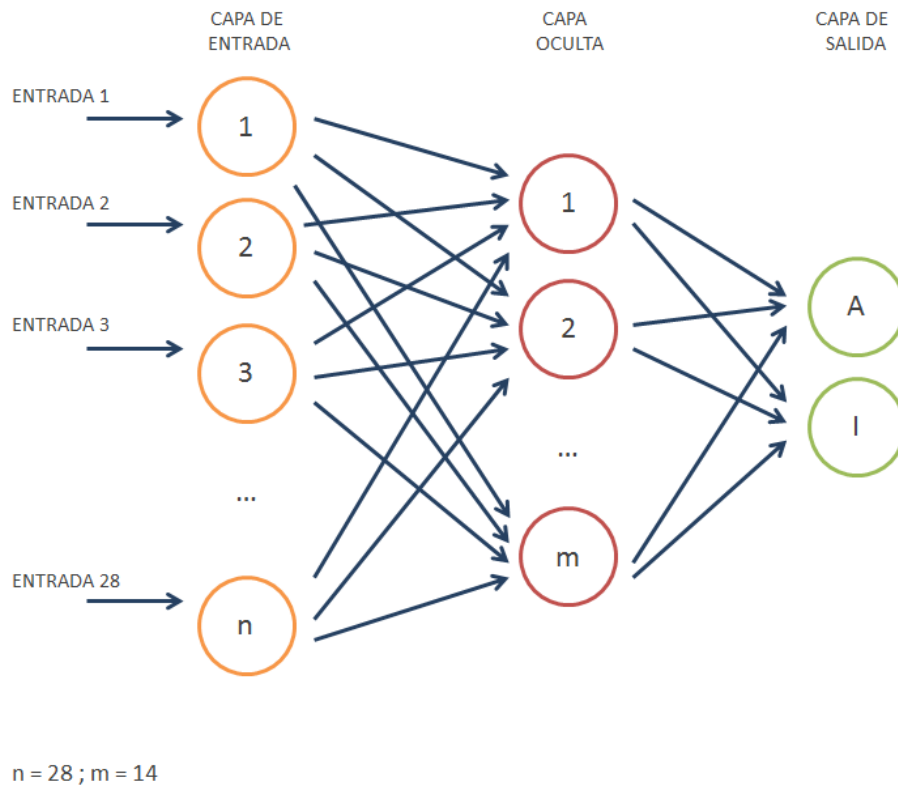


Figura III.26. Disposición de la red neuronal utilizada en esta investigación para el modelo de predicción de inhibición de β -catenina. L1: capa de entrada con 28 neuronas, correspondientes con los índices topológicos seleccionados; L2: capa oculta con 14 neuronas determinadas empíricamente; L3: capa de salida con 2 neuronas, una correspondiente al valor activo y otra al inactivo de la variable dependiente del ALD.

Tabla III.8. Matriz de clasificación correspondiente al modelo 8
(grupo *training*, *test* y *validación externa*).

	PORCENTAJE DE CORRECTA CLASIFICACIÓN (%)	CLASIFICACIÓN COMPUESTOS	
		Activos	Inactivos
TRAINING SET			
Grupo activos	100	50	-
Grupo inactivos	100	-	71
TEST SET			
Grupo activos	76	13	4
Grupo inactivos	86	3	19
VALIDATION SET			
Grupo activos	94	17	1
Grupo inactivos	76	5	16

Tal y como se aprecia en la Tabla III.8, de los 199 compuestos que conformaban el grupo de entrenamiento (*training set*) de la red neuronal, el 100% de los compuestos fue correctamente identificado como inhibidor o no de β -catenina. En el grupo test, el modelo 8 acertó el 76% de los inhibidores de β -catenina y el 86% de los no inhibidores. Finalmente, el modelo 8 fue sometido a una validación externa, formada por 39 moléculas (18 inhibidores de β -catenina y 21 no inhibidores). En este caso el modelo 8 demostró una mayor sensibilidad al identificar el 94% de los inhibidores de β -catenina, dejando escapar al 24% de los no inhibidores al clasificarlos como activos. Por lo que al aplicar este modelo para identificar nuevos inhibidores de β -catenina se tendrá en cuenta que es más sensible que específico.

El grupo test, al igual que en modelo anterior forma parte de una validación interna que realiza la red neuronal a la hora de construir la red y entrenarla. Mientras que el grupo de validación externa, sin embargo sí que está formado por compuestos que el modelo nunca ha registrado.

Las correspondientes curvas ROC aparecen en las Figuras III. 27, III.28 y III.29, con AUCs respectivas de 1,000, 0,810 y 0,923.

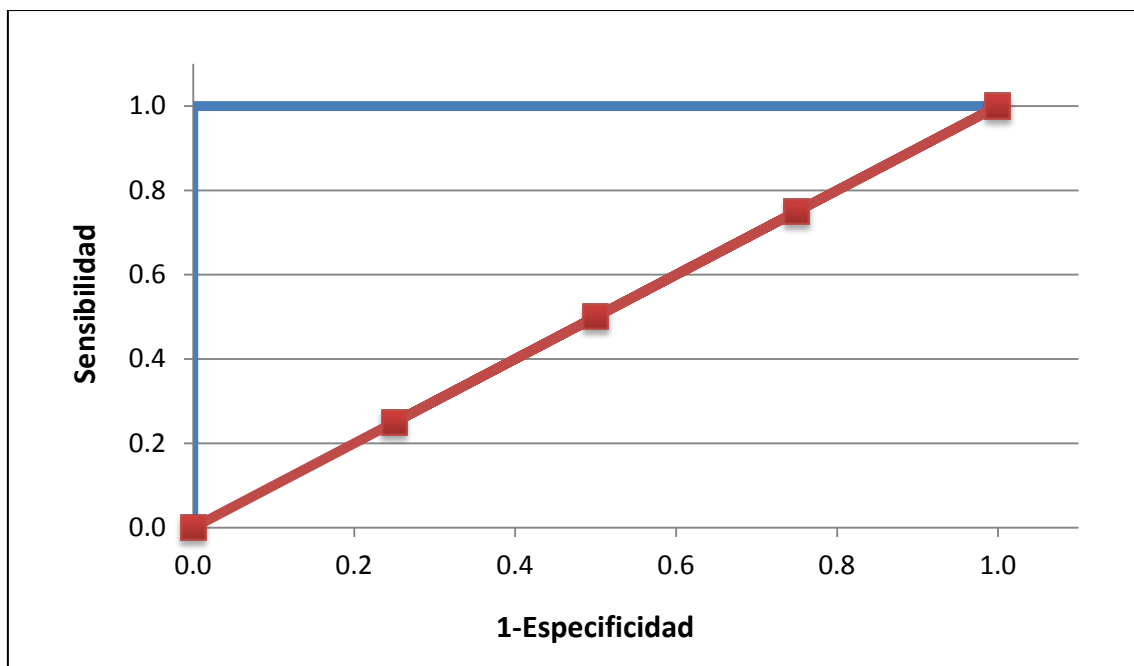


Figura III.27. Curva ROC correspondiente al conjunto de *training* del modelo 8.

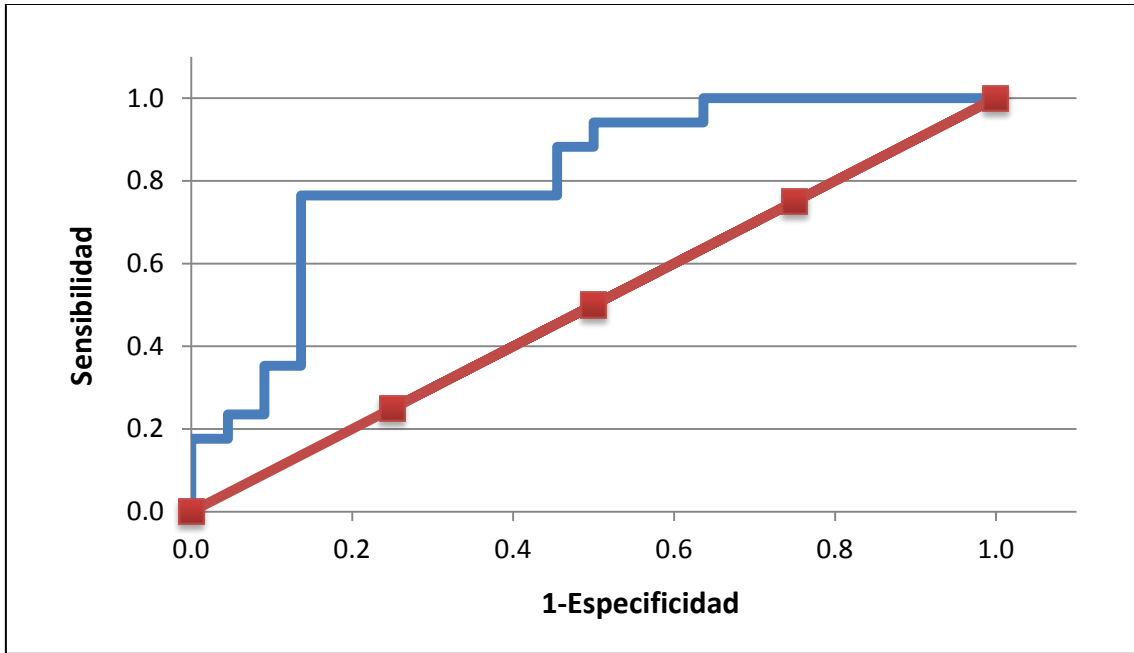


Figura III.28. Curva ROC correspondiente al grupo test del modelo 8.

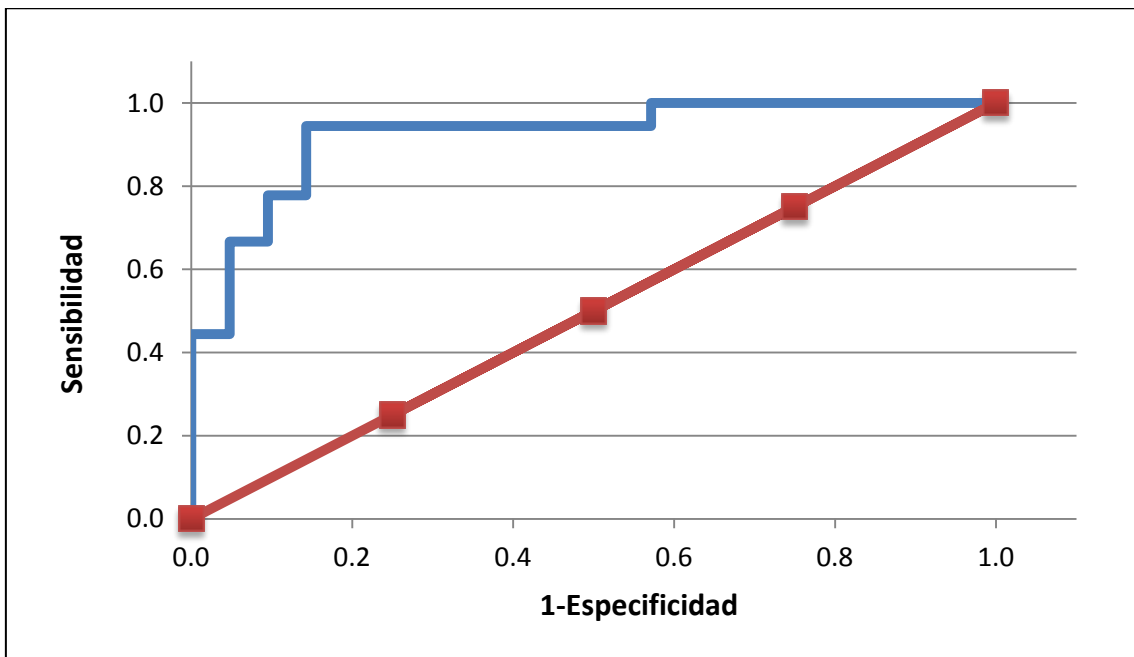


Figura III.29. Curva ROC correspondiente al grupo de validación externa del modelo 8.

III.2. CRIBADO VIRTUAL DE BASES DE DATOS

Basándonos en los modelos descritos anteriormente (modelos 1-8), se llevó a cabo un cribado virtual con el objetivo de seleccionar potenciales inhibidores de Akt y β -catenina. Para ello, se rastreó la librería de compuestos de la casa comercial Specs, a partir de la cual se seleccionaron 6 posibles inhibidores (Figura III.30) que presentaban características óptimas, tanto desde el punto de vista cualitativo (modelos 1-4 y 7-8), como desde el punto de vista de cuantitativo (valores de CI_{50}) modelos 5 y 6 (Tabla III.9). Por supuesto, otros modelos que tuvieron en cuenta parámetros fisicoquímicos (ADME/Tox, solubilidad en agua,...etc) se emplearon para la selección de estos potenciales inhibidores de Akt y β -catenina (datos no mostrados).

Finalmente, para la selección de los compuestos se tuvieron en cuenta otros factores de tipo económico, cantidad suministrada del compuesto, etc...

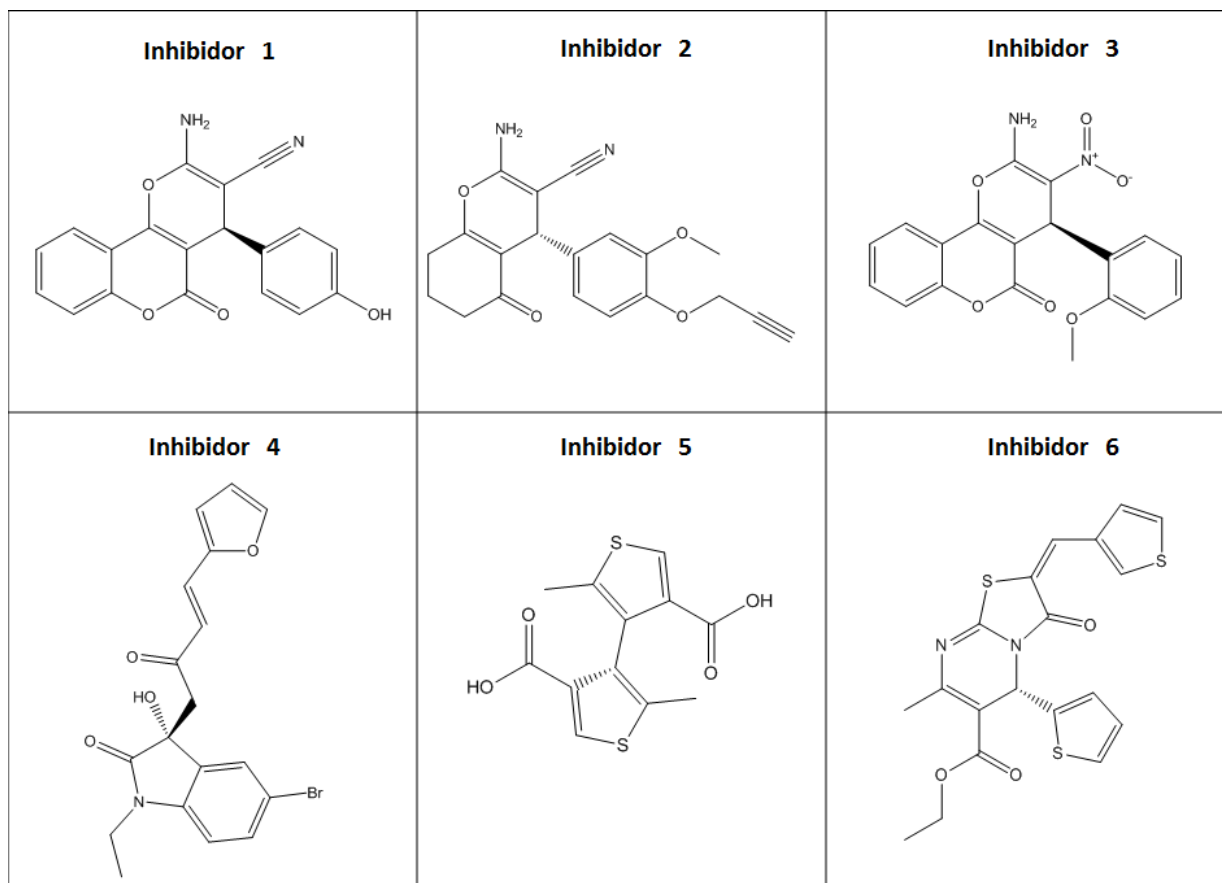


Figura III.30. Potenciales inhibidores de Akt y β -catenina seleccionados por TM.

Tabla III.9. Modelos empleados en la selección de los compuestos con potencial actividad inhibitoria frente a Akt y β -catenina. Resultados del cribado virtual en la base de datos Specs.

COMPUESTOS	Nº Registro CAS	Mod. 1		Mod. 2		Mod. 3		Mod. 4		Mod. 5	Mod. 6	Mod. 7	Mod. 8
		FD ₁	P. A.	FD ₂	P. A.	FD ₃	P. A.	FD ₄	P. A.	Cl ₅₀ (μ M)	Cl ₅₀ (nM)	Inh. Akt	Inh. β -cat
Inhibidor 1*	256378-54-8	1,68	0,84	1,67	0,70	1,75	0,85	1,55	0,82	6,71	3,50	Si	Si
Inhibidor 2	663203-38-1			3,97	0,67			1,31	0,78	6,92	2,99	Si	Si
Inhibidor 3	247079-73-8			2,52	0,77			1,24	0,77	7,22	4,27	Si	Si
Inhibidor 4	689769-86-6			3,02	0,92			0,36	0,58	3,19	1,41	Si	Si
Inhibidor 5	15940-61-1			2,24	0,62			0,77	0,68	1,39	1,65	Si	Si
Inhibidor 6	431925-09-6			4,28	0,91			0,19	0,54	0,70	6,10	Si	Si

P.A.: probabilidad de actividad.; Mod.: modelo; Inh.: inhibición; FD: función discriminante;
 β -cat: β -catenina

*Compuesto de origen natural.

Tal y como se aprecia en la Tabla III.9, los modelos 1 y 3 tan sólo se aplicaron para la selección de productos de origen natural (inhibidor 1). Tras la aplicación de los modelos 5 y 6 se obtienen valores cuantitativos de Cl₅₀ para nuestras moléculas seleccionadas. Por último, al aplicar los modelos basados en redes neuronales (modelos 7 y 8) tan solo se obtiene una clasificación dicotómica (inhibidor-no inhibidor).

III.3. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS *IN VITRO*

III.3.1. Efecto sobre la proliferación y citotoxicidad

III.3.1.1. Línea celular HT-29

Se expuso la línea celular de cáncer de colon humano (HT-29) a los potenciales inhibidores de Akt y β -catenina (inhibidores 1-6) seleccionados, con el fin de determinar la viabilidad celular. Tal y como se muestra en la Tabla III.10, varios de los compuestos seleccionados demostraron una viabilidad celular o citotoxicidad mejor o similar a la demostrada por los inhibidores de referencia de β -catenina (FH535), Akt (LY294002) y multi-CDK (AT7519). El inhibidor 4 a la concentración de 100 μ M eliminó al 48% de las células. Estos datos son comparables a los obtenidos con los fármacos de referencia que a esa misma concentración destruyeron al 38%, 51% y 36% de las células.

Tabla III.10. Efecto de viabilidad celular en la línea HT-29 de los compuestos seleccionados.

Grupo	Concentración (μM)	A \pm D.E.	Viabilidad celular (%)
Blanco	0	0,88 \pm 0,03	-
Vehículo (DMSO)	1	0,86 \pm 0,03	97
	10	0,86 \pm 0,12	98
	100	0,80 \pm 0,17	91
Inhibidor 1	1	0,84 \pm 0,17	95
	10	0,77 \pm 0,12	87
	100	0,86 \pm 0,10	98
Inhibidor 2	1	0,87 \pm 0,22	99
	10	0,79 \pm 0,19	89
	100	0,82 \pm 0,19	93
Inhibidor 3	1	0,84 \pm 0,17	95
	10	0,78 \pm 0,09	88
	100	0,63 \pm 0,14*	72*
Inhibidor 4	1	0,77 \pm 0,09	87
	10	0,75 \pm 0,13	85
	100	0,46 \pm 0,11**	52**
Inhibidor 5	1	0,85 \pm 0,20	96
	10	0,78 \pm 0,15	89
	100	0,71 \pm 0,12	80
FH535	1	0,80 \pm 0,04	91
	10	0,72 \pm 0,10	81
	100	0,55 \pm 0,14*	62*
LY294002	1	0,90 \pm 0,05	102
	10	0,71 \pm 0,06*	81*
	100	0,43 \pm 0,09**	49**
AT7519	1	0,59 \pm 0,08**	67**
	10	0,59 \pm 0,04***	67***
	100	0,56 \pm 0,02***	64***

Los valores se expresan en función del grupo blanco (células sin vehículo ni compuestos) y representan la media de la absorbancia \pm D.E., siendo representativos de al menos tres experiencias independientes por grupo. Las diferencias entre los grupos frente al blanco fueron determinadas por medio del análisis de varianza (ANOVA) seguido del test t de Student. No diferencias significativas ($p>0,05$); *Diferencias significativas (Valores de $p<0,05$); **Muy significativas (Valores de $p<0,01$); ***Extremadamente significativas (Valores de $p<0,001$) $n=3$; Test t Student).

III.3.1.1. Línea celular PC-3

En primer lugar, se determinó el efecto anti-proliferativo de los compuestos seleccionados a distintas concentraciones siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado II.5.3 de Material y Métodos.

En la Tabla III.11 se presentan los resultados obtenidos. Destaca el inhibidor 4 el cual, aniquila totalmente a las células tumorales prostáticas a la concentración de 200 μ M. Los inhibidores 1 y 6 también fueron capaces de destruir células tumorales de cáncer de próstata aunque en un menor grado (58% y 31%, respectivamente).

Tabla III.11. Efecto de viabilidad celular en la línea PC-3 de los compuestos seleccionados.

Grupo	Concentración (μM)	A \pm D.E.	Viabilidad celular (%)
Blanco	0	0,40 \pm 0,02	100
Vehículo (DMSO)	10	0,40 \pm 0,03	100
Inhibidor 1	50	0,35 \pm 0,04	88
	100	0,24 \pm 0,03	61 ^{**}
	200	0,16 \pm 0,03	42 ^{***}
Inhibidor 2	50	0,37 \pm 0,02	101
	100	0,37 \pm 0,02	101
	200	0,34 \pm 0,02	92
Inhibidor 3	50	0,32 \pm 0,02	83 ^{**}
	100	0,32 \pm 0,03	83 [*]
	200	0,28 \pm 0,02	72 ^{**}
Inhibidor 4	50	0,22 \pm 0,01	60 ^{***}
	100	0,16 \pm 0,01	44 ^{**}
	200	0,010 \pm 0,001	3 ^{***}
Inhibidor 5	50	0,340 \pm 0,001	101
	100	0,360 \pm 0,001	106
	200	0,360 \pm 0,005	107
Inhibidor 6	50	0,34 \pm 0,06	88
	100	0,32 \pm 0,05	83 [*]
	200	0,27 \pm 0,06	69 [*]

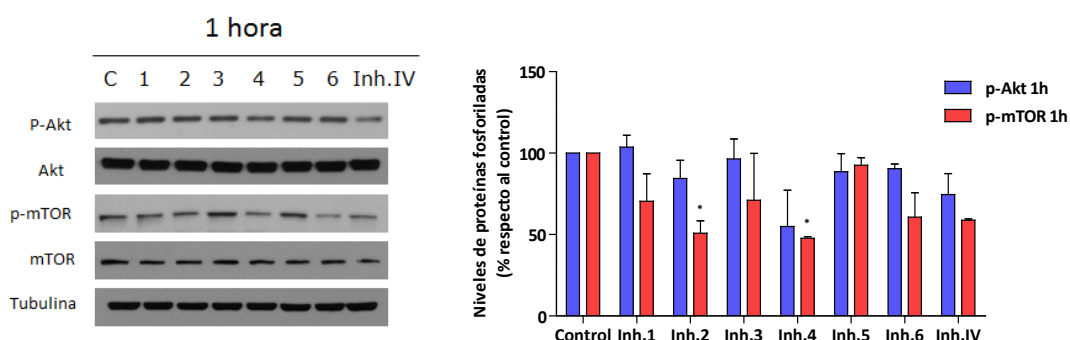
Los valores se expresan en función del grupo blanco y representan la media de la absorbancia \pm desviación estándar (DE), siendo representativos de al menos dos experiencias independientes por grupo realizadas en duplicado. Las diferencias entre los grupos frente al blanco fueron determinadas por medio del test de la t de Student. No diferencias significativas ($p > 0,05$); ^{*} Diferencias significativas (Valores de $p < 0,05$); ^{**} Muy significativas (Valores de $p < 0,01$); ^{***} Extremadamente significativas (Valores de $p < 0,001$) $n=3$; Test t Student).

III.3.2. Efecto de los compuestos sobre las proteínas Akt y β -catenina

III.3.2.1. Inhibición de Akt

En la activación de Akt se produce la fosforilación de dos residuos aminoacídicos: Treonina 308 (Thr308) en el *loop* de activación y la Serina 473 (Ser473) en el motivo hidrófobico del carbono terminal. La fosforilación de ambos sitios de regulación conduce a la completa activación de la enzima. Para evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos seleccionados frente a Akt, se procedió a medir el nivel de fosforilación de la enzima en el residuo aminoacídico Serina 347. Como se muestra en la Figura III.31, el inhibidor 4 a la hora del tratamiento, indujo ya un descenso en la fosforilación de Ser473 en Akt. Este efecto puede ser comparado con un inhibidor de referencia de Akt (inhibidor IV, un compuesto benzimidazólico permeable celularmente que inhibe reversiblemente la fosforilación/activación de Akt). Cuando las células PC-3 fueron incubadas con los compuestos durante 48 horas, el efecto fue aún mayor, observándose además actividad inhibitoria en los compuestos 3 y 6 (Figura III.31).

A)



B)

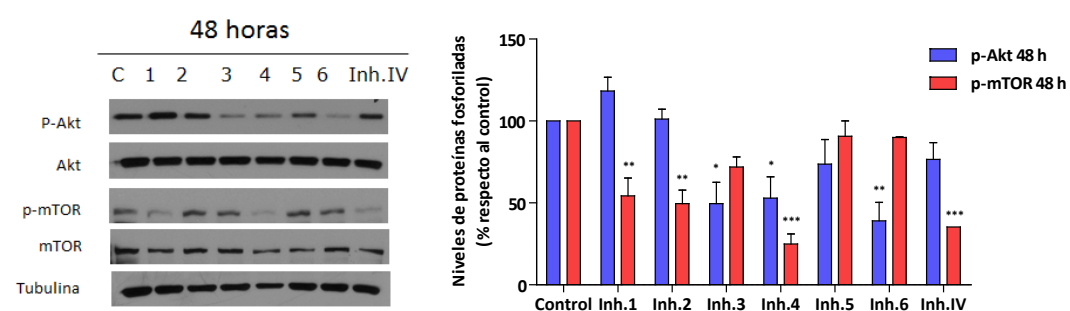


Figura III.31. Efecto de los compuestos seleccionados en la vía de señalización del Akt/mTOR mediante *Western Blot*. La línea celular PC-3 fue tratada con un vehículo (C) o con los compuestos seleccionados (50 μ M) y las proteínas se detectaron aplicando la técnica del *Western blot* pasada 1 h (Sección A) y 48 horas (Sección B). En el panel superior se muestra una imagen representativa de tres experimentos diferentes, mientras que en la parte inferior, se muestran los valores medios de densitometría \pm error estándar de la media (E.E.M.) de los experimentos. Sin diferencias significativas respecto al blanco ($p > 0,05$); * Diferencias significativas ($p < 0,05$); ** Muy significativas ($p < 0,01$); *** Extremadamente significativas ($p < 0,001$); $n=3$; Test t Dunnett.

Para evaluar el impacto de los compuestos seleccionados en la vía de señalización del Akt/mTOR, se empleó la técnica de *Western blot* para observar el estado de fosforilación y expresión de proteínas totales de la diana de la rapamicina en células de mamífero (mTOR), un efector clave de la vía de señalización del Akt. Como se observa en la Figura III.31, todos los agentes probados excepto el inhibidor 5, causaron disminución de la

fosforilación de mTOR, siendo los inhibidores 2, 4 y 6 los más activos tras una 1 hora de tratamiento y los inhibidores 1, 2 y 4 a las 48 horas del tratamiento.

Estos resultados indican que todos los compuestos ensayados, a excepción del inhibidor 5, inhiben la vía de señalización del Akt.

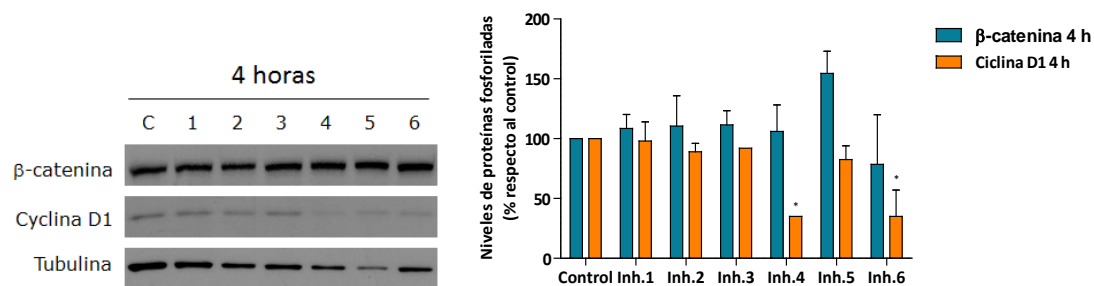
III.3.2.2. Inhibición de β -catenina

Para investigar si los compuestos también eran capaces de inhibir la vía de la β -catenina, se midieron los niveles de β -catenina, así como su gen diana (ciclina D1) responsable del descenso de su actividad. En condiciones basales, gran parte de la β -catenina celular está ligada a E-cadherina en la membrana celular. La β -catenina citosólica se encuentra en estado inactivo a través de su interacción con un gran complejo de proteínas incluyendo la GSK-3 β . En esta situación, la β -catenina es fosforilada principalmente por GSK-3 β y etiquetada para sufrir poliubiquitinación y degradación en el proteosoma. Bajo estas condiciones, los genes diana de β -catenina son reprimidos. Cuando se activa la vía, GSK-3 β se inhibe provocando la estabilización y acumulación citoplásmica de β -catenina, que en este momento entra en el núcleo, e induce la expresión de sus genes diana. Uno de los genes reguladores de β -catenina mejor caracterizados es la ciclina D1, la cual promueve la progresión del ciclo celular.

Esta es la razón por la que el *Western blot* se emplea para medir el efecto de los compuestos seleccionados sobre los niveles de β -catenina y de ciclina D1.

En la Figura III.32 se aprecia como los inhibidores 4 y 6 reducen significativamente la expresión de ciclina D1.

A)



B)

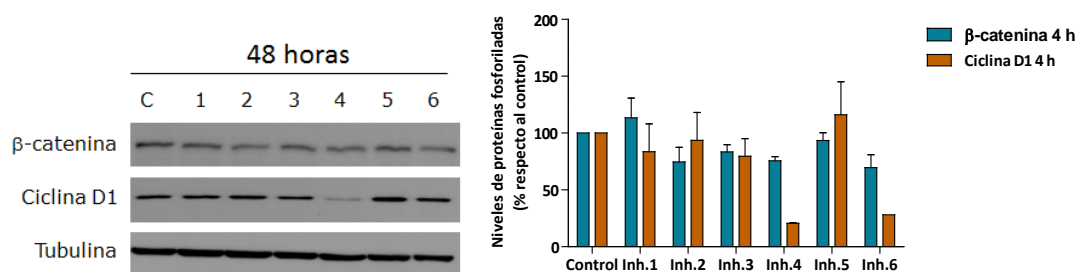


Figura III.32. Efecto de los compuestos seleccionados sobre la vía de señalización de la β-catenina/ciclina-D1 mediante *Western Blot*. La línea celular PC-3 fue tratada con un vehículo (C) o con los compuestos seleccionados (50 μM) y las proteínas se detectaron aplicando la técnica del *Western blot* a las 4 horas (sección A) y a las 48 horas (sección B). En el panel superior se muestra una imagen representativa de tres experimentos diferentes y en la parte inferior, apreciamos los valores medios de densitometría ± error estandar de la media (E.E.M.) de los experimentos. No se aprecian diferencias significativas respecto al blanco ($p > 0,05$); * Diferencias significativas respecto al grupo blanco ($p < 0,05$); $n=3$; Test t Dunnett.

III.3.3. Inmunofluorescencia

En la presente Tesis se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia en la Universidad de Alcalá de Henares. Para la visualización de las células PC-3 se empleó un microscopio confocal de barrido por láser (Leica TCS SP5) con software de imágenes LAS- AF, usando un objetivo de aceite de 63X.

Para profundizar en el papel inhibitor de los compuestos seleccionados, la línea celular PC-3 fue estimulada con el activador de la vía de la β -catenina/ciclina D1, Wnt3a (Wnt). Cuando las células fueron estimuladas con Wnt, la β -catenina fue captada por uniones adherentes de membrana y acumulada en el núcleo (Figura III.33). Cuando las células fueron tratadas previamente con los compuestos seleccionados la redistribución de β -catenina fue inhibida. Este efecto se aprecia en los inhibidores 2, 4 y 6 (Figura III.33). Por otra parte, los niveles de β -catenina en las células tratadas con el inhibidor 6 fue inapreciable (Figura III.33).

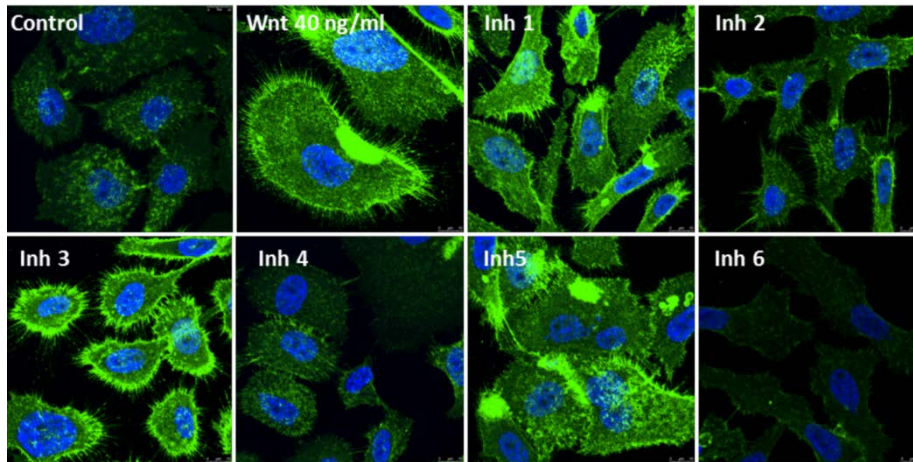


Figura III.33. Efecto de los compuestos seleccionados sobre la distribución celular de β -catenina en la línea celular PC-3. Se sembraron las células en cubreobjetos de vidrio, siendo pretratadas durante 30 min con una concentración de 50 μ M de los inhibidores y posteriormente, co-tratados con 40 ng/ml Wnt3 (Wnt) durante 4 horas. Las células se tiñeron con un anticuerpo policlonal anti- β -catenina seguido por anticuerpo anti-conejo IgG conjugado (anti-Alexa-Fluor488). La imagen confocal mostrada es representativa de dos experimentos independientes.

Como se observa en la Figura III.32 y III.33, los compuestos seleccionados fueron capaces de afectar tanto a la redistribución subcelular así como a la actividad de la β -catenina, ya que inhibieron su paso del citoplasma al núcleo, su reclutamiento en la membrana plasmática y por último, la expresión de su gen diana ciclina D1. Concretamente los inhibidores 2, 4 y 6 fueron los que demostraron mayor actividad.

En particular, los compuestos que inhiben tanto Akt como β -catenina tuvieron el mayor impacto en la viabilidad celular lo que apoya la idea de que un inhibidor dual de la vía Akt/mTOR y β -catenina podría tener un efecto antiproliferativo potente contra el cáncer de próstata humano (células PC-3), aunque el impacto putativo de los compuestos en otras vías de señalización no se descarta.

III.4. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS *IN VIVO*

De los resultados obtenidos *in vitro* se puede concluir que los inhibidores 4 y 6 son susceptibles de ser estudiados *in vivo* como potenciales agentes quimiopreventivos de CCR asociado a CU. No obstante, por razones de disponibilidad por parte del proveedor el inhibidor 6 no pudo ser ensayado.

III.4.1. Efecto del inhibidor 4 en un modelo de inducción de colitis ulcerosa aguda por DSS

A continuación, se muestran los resultados obtenidos con el modelo de CU agudo descrito en el apartado correspondiente. Los animales tuvieron acceso libre al agua de bebida.

No se detectaron diferencias significativas en el consumo de agua por cada grupo durante la inducción de la colitis. Cada ratón bebió una media diaria de 4,5 mL de agua, lo que equivale a una ingesta diaria de 136 mg de DSS/ratón), lo que asegura la aparición de la enfermedad.

III.4.1.1. Índice de actividad de la enfermedad

Uno de los síntomas característicos de la colitis ulcerosa es la pérdida de peso. Los ratones a los que se les suministró DSS sufren una pérdida de peso respecto al día 0. Sin embargo, paradójicamente los ratones que pertenecen al grupo DSS sólo padecen un 2% de pérdida de peso, mientras que los pertenecientes al grupo DSS+I perdieron un 6% de peso (Tabla III.12).

Tabla III.12. Evaluación de la pérdida de peso en un modelo de colitis ulcerosa inducido por DSS en ratones. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con n= 6 ratones por grupo.

	Evolución del peso de los ratones (g)			Pérdida de peso (%)
	Día 0	Día 4	Día 8	
Blanco	20,80 ± 1,10	20,60 ± 0,84	20,65 ± 0,07	0,7
DSS	19,70 ± 0,48	20,00 ± 0,40	19,30 ± 0,91	2,0
I	20,20 ± 0,80	20,40 ± 0,60	19,95 ± 0,65	1,2
DSS+I	21,23 ± 0,20	20,57 ± 0,41	19,90 ± 0,29	6,3

*I: Inhibidor 4.

El Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) es un parámetro que sirve para evaluar el grado de colitis ulcerosa reproducida en los ratones. Éste se basa en la determinación de tres factores: pérdida de peso, consistencia de heces y sangrado rectal. Al calcular el IAE se aprecia como los ratones tratados con DSS padecen diarrea y sangrado rectal a partir del octavo día. Sin embargo, los del grupo DSS+I, a pesar de mostrar una mayor pérdida de peso, sufren menos sangrado rectal y una significativa mejoría en la consistencia de las heces. El IAE asigna el valor 0 al grupo Blanco y muestra un valor menor en el grupo tratado con el producto que en el grupo DSS (Tabla III.13 y Figura III.34).

Tabla III.13. Evaluación del índice de actividad de la enfermedad (IAE) en un modelo de colitis ulcerosa inducido por DSS en ratones. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con n= 6 ratones por grupo.

	I*	DSS	DSS+I
Pérdida de peso	1,0	1,0	2,0
Consistencia heces	0,0	4,0	2,0
Sangrado rectal	0,0	1,3	1,0
Total IAE	0.3	2.1	1.7

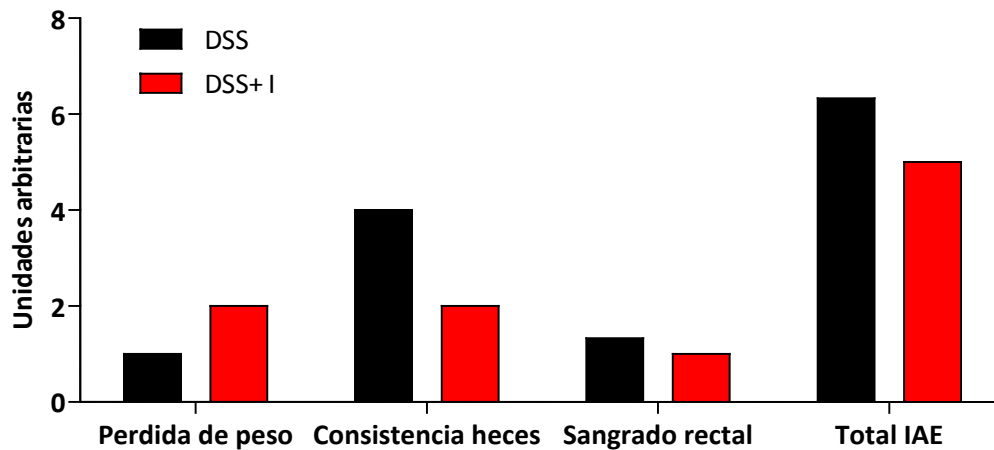


Figura III.34. Representación del IAE para los grupos DSS y DSS+I en un modelo de colitis ulcerosa inducido por DSS en ratones. El tratamiento con el inhibidor 4 no previno la pérdida de peso pero tuvo un ligero efecto protector en el valor total de IAE.

III.4.1.2. Evaluación macroscópica

Tras el sacrificio de los animales se extrajo el colon de los mismos y se comprobó cómo en los ratones tratados con DSS el intestino sufría un acortamiento significativo respecto al blanco ($6,6 \pm 0,5$ vs $10,0 \pm 0,1$ cm). El producto ensayado no tuvo efecto sobre el acortamiento en los animales sin DSS y fue capaz de proteger a los tratados con DSS ($6,6 \pm 0,5$ vs $8,9 \pm 0,2$ cm).

En la Figura III.35 se aprecia cómo no existen diferencias significativas entre el grupo Blanco y el grupo tratado con el inhibidor 4 en cuanto a longitud del colon.

Tabla III.14. Efecto del inhibidor 4 en ratones con colitis ulcerosa inducida por DSS. Para el análisis estadístico se empleó el análisis de varianza ANOVA seguido del test de la t de Dunnett. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con $n= 6$ ratones por grupo. Diferencia respecto al blanco: $^{##}p<0,01$; respecto al control: $^{**}p<0,01$.

	Longitud del colon (cm)
Blanco	$10,0 \pm 0,0^{**}$
DSS	$6,6 \pm 0,5^{##}$
I	$9,8 \pm 0,3^{**}$
DSS+I	$8,9 \pm 0,2^{**}$

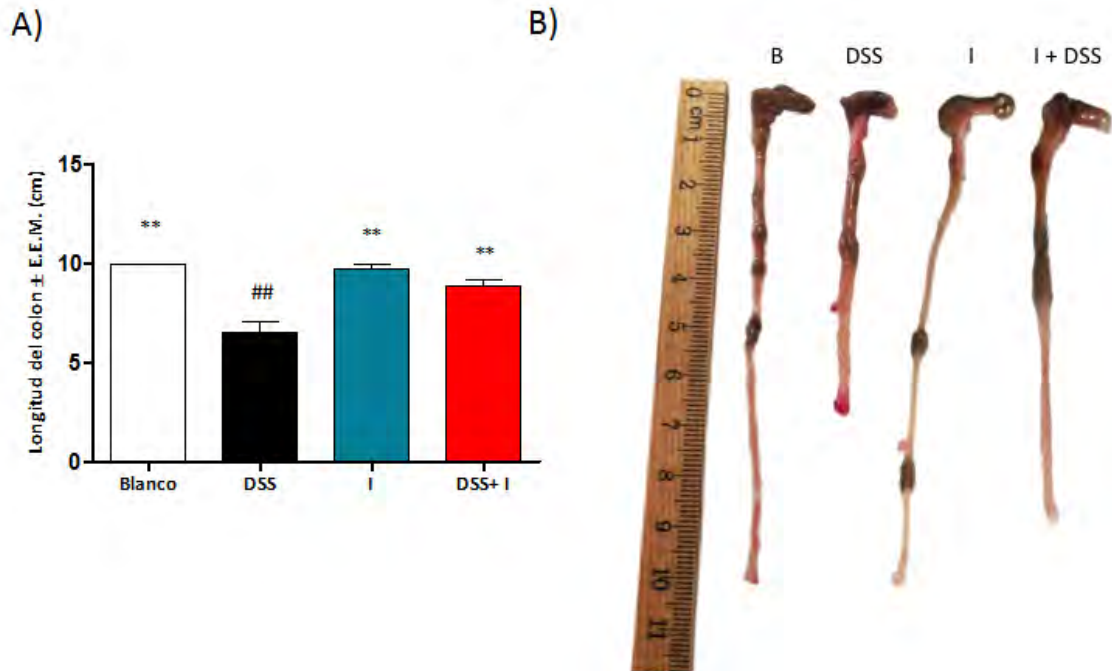


Figura III.35. Efecto del inhibidor 4 sobre la longitud del colon. El gráfico de barras de la izquierda (A) representa los datos recogidos en la Tabla III.14 la imagen de la derecha (B) es una foto representativa del colon de un ratón del grupo Blanco, del grupo DSS, del grupo DSS+I, y del grupo del I. Para el análisis estadístico se empleó el análisis de varianza ANOVA seguido del test de la t de Dunnett. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con $n=6$ ratones por grupo. Diferencia respecto al blanco: ## $p<0,01$; respecto al control: ** $p<0,01$.

La relación entre el peso y la longitud del colon, parámetro relacionado con el edema y la hiperplasia del colon, fue mayor en el grupo DSS comparado con los otros tres grupos (Figura III.36). Si bien la diferencia entre grupos resultó ser no significativa.

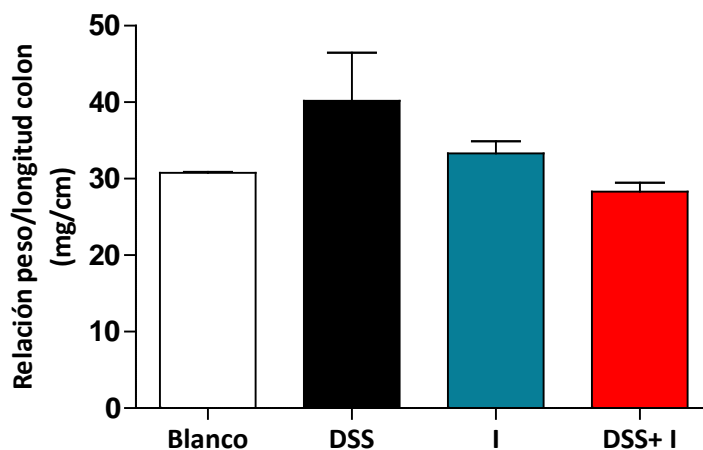


Figura III.36. Efecto sobre la relación peso/longitud de los intestinos. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos al realizar el análisis de varianza ANOVA seguido del test de la t de Dunnett ($p > 0.05$). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con $n = 6$ ratones por grupo.

III.4.1.3. Estudio histológico

En la Figura III.37 se muestran imágenes representativas de los corte histológicos procedentes del colon de los animales tratados con DSS, inhibidor o inhibidor y DSS. El grupo blanco y el del inhibidor, presentan características morfológicas y estructurales típicas de un intestino sano. Sin embargo, en el grupo control (DSS) se observa presencia de daño epitelial grave con infiltración celular en el tejido mucoso, alteraciones en las criptas, edema, erosión epitelial y ulceración. Por el contrario, en el grupo tratado con el se aprecia un efecto protector reflejado por una menor infiltración de células inflamatorias, reducción de la severidad y extensión de la inflamación y por último, un menor grado de daño en la mucosa intestinal. La apariencia de las criptas en este grupo, fue similar a la del grupo blanco.

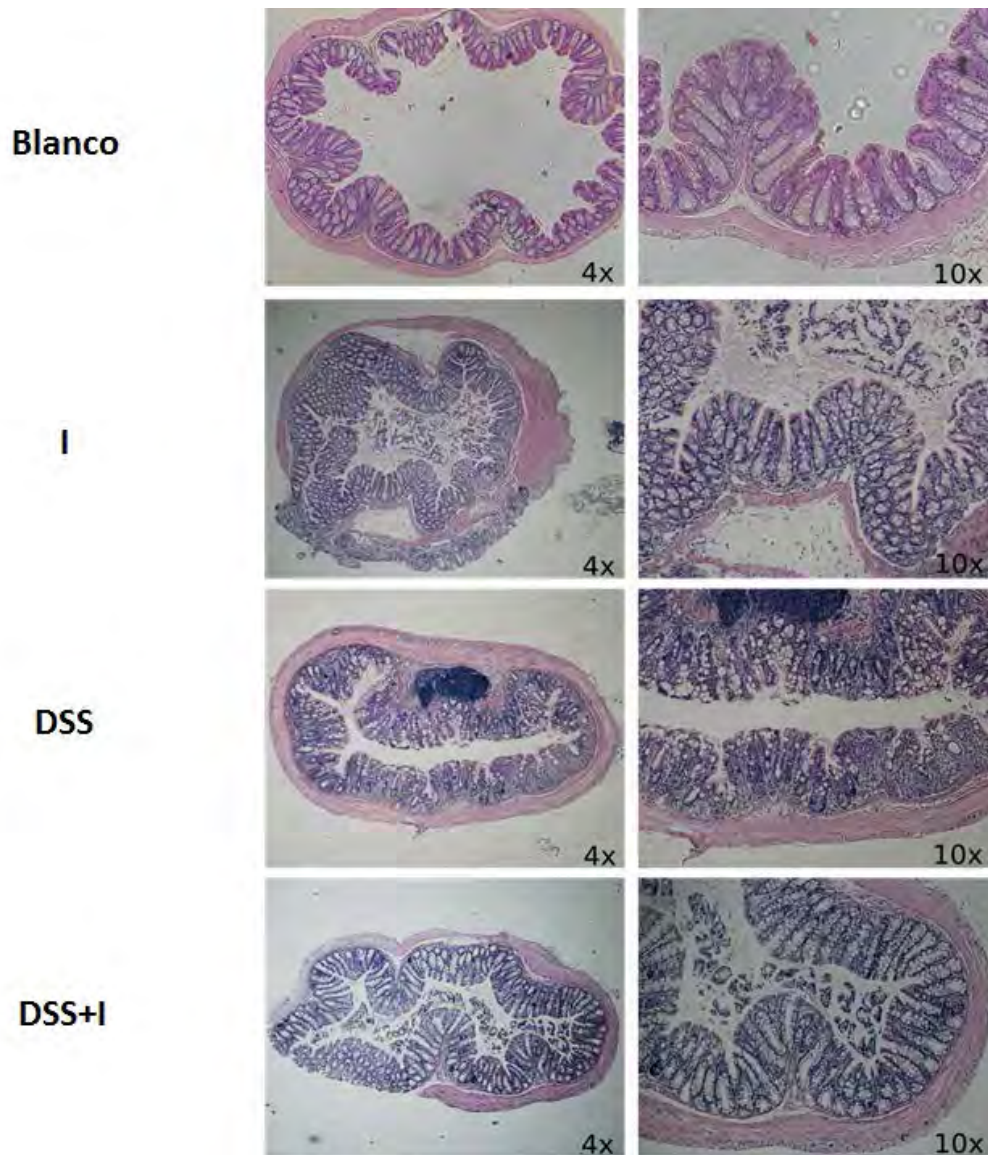


Figura III.37. Efecto del inhibidor 4 sobre la apariencia histológica de las muestras de colon asociadas a un modelo de colitis ulcerosa inducida por DSS. Imágenes representativas de colon teñidas con hematoxilina y eosina se muestran a 4x y 10x aumentos.

III.4.1.4. Efecto sobre la actividad MPO

El nivel de infiltración leucocitaria se determinó indirectamente a través de la actividad de MPO. En la Figura III.38 se muestran los valores obtenidos de MPO en el grupo control ($0,25 \pm 0,025$ U/mg) de tejido, mientras que el tratamiento con el inhibidor 4 redujo dichos niveles en un 41%.

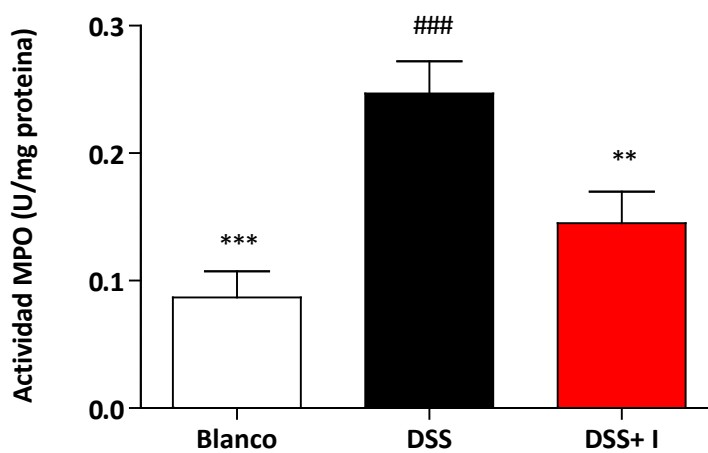


Figura III.38. Efecto del inhibidor 4 sobre los niveles de actividad enzimática MPO. Los valores se expresan como la media \pm E.E.M. y se normalizan respecto a los mg de tejido. La significación estadística de las diferencias de cada grupo respecto al blanco y al control se determinaron por medio del análisis de varianza ANOVA seguido del test de la t de Dunnett (diferencia respecto al blanco: ### $p < 0,001$; respecto al control: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; $n = 6$).

III.4.1.5. Efecto sobre la producción de IL-6 en el colon

La infiltración de células inmunitarias debida al incremento de la permeabilidad intestinal generada por la administración de DSS, da lugar a su vez, a un aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias, como la IL-6. El análisis de los niveles de IL-6 mostró que el tratamiento con inhibidor 4 impide el aumento en la producción de esta citocina (Figura III.39).

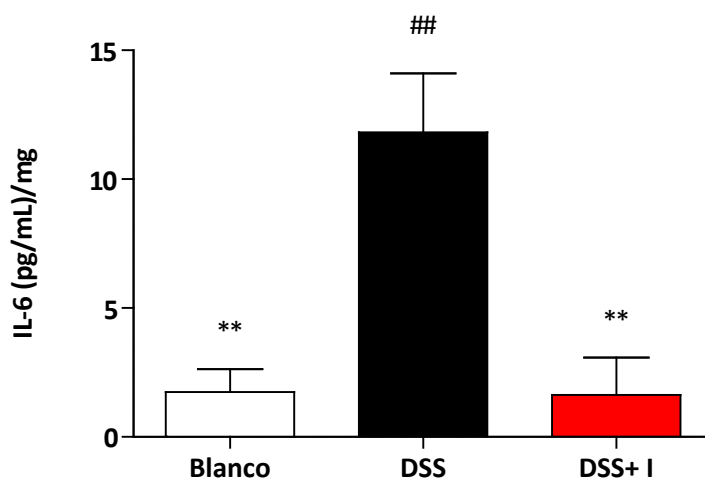
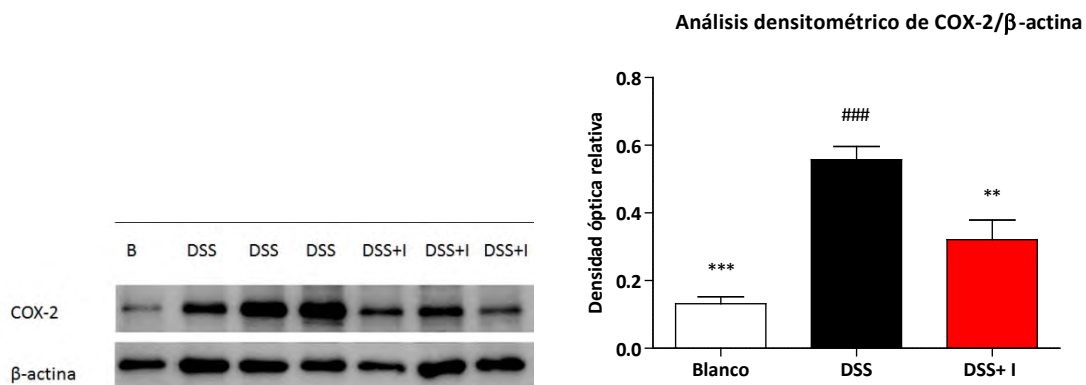


Figura III.39. Efecto del inhibidor 4 sobre la producción intestinal de citocinas pro-inflamatorias. Los valores se expresan como la media de la concentración de la citocina respecto al peso del intestino [(pg/mL)/mg ± E.E.M.]. La significación estadística de las diferencias de cada grupo respecto al blanco y al control se determinaron por medio del análisis de varianza ANOVA seguido del test de la t de Dunnett (diferencia respecto al blanco: ## $p < 0,01$; respecto al control: ** $p < 0,01$; $n = 6$).

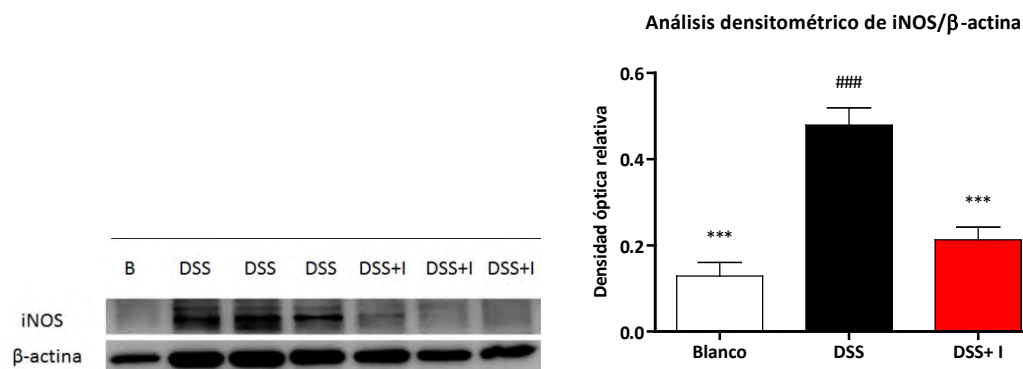
III.4.1.6. Efecto sobre la inducción de COX-2 e iNOS y de la activación del factor de transcripción NF-kB

El inhibidor 4 redujo significativamente la expresión de COX-2 e iNOS en las muestras de colon (Figura III.40). En dicha reducción, pueden estar implicada la inhibición del NF-kB como se observa en la Figura III.40. La activación de NF-kB ha demostrado ser un paso clave en el incremento de los niveles de COX-2 e iNOS (Abdullah y cols., 2013; Kojima y cols., 2004; Maihofner y cols., 2003), por lo que no es de extrañar que el producto reduzca la activación y la translocación de la subunidad p65 al núcleo (Figura III.40).

A)



B)



C)

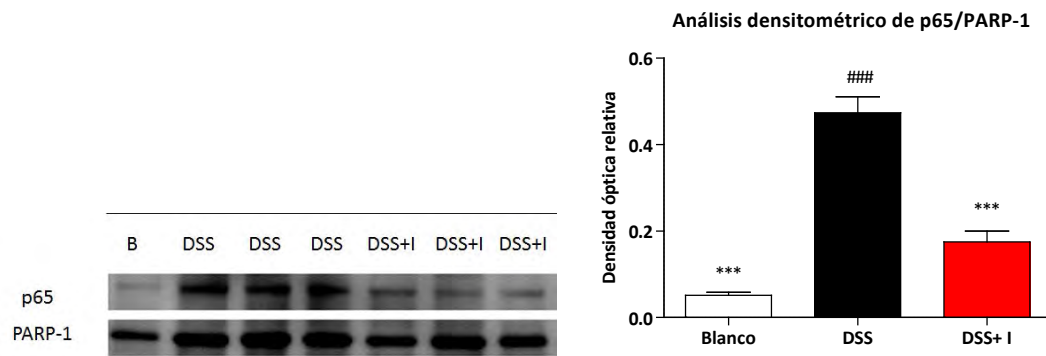


Figura III.40. Efecto del inhibidor 4 sobre la expresión de COX-2 (A) e iNOS (B) y sobre la translocación nuclear de p65 (C). Imagen representativa de un *Western Blot* tras la incubación con el anticuerpo correspondiente. Los gráficos de barras representan los datos derivados del análisis densitométrico de todas las imágenes de *Western blot* obtenidas. Los valores se expresan como la media de la densidad óptica relativa \pm E.E.M. Frente al grupo control: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; frente al blanco: ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (t de Dunnett, $n = 6$).

III.4.2. Efecto sobre el cáncer colorrectal asociado a colitis ulcerosa crónica inducida por AOM/DSS

Durante los 64 días del experimento no se apreciaron diferencias en el consumo de agua y pienso entre los animales de los distintos grupos que sobrevivieron al primer ciclo de DSS. El consumo medio diario de DSS fue de 4,7 ml/ratón lo que proporciona un consumo de DSS de 1,8 g/ratón tras los 64 días de tratamiento. Los ratones recibieron por vía oral un total de 24 dosis de una solución de inhibidor 4 de 35 mg/kg en un volumen de administración de 0,2 ml de agua/dosis.

En la Tabla III.15 se muestran los resultados referentes al número de animales que sobrevivieron. Tras el primer ciclo con DSS al 2,5%, se presentó una considerable mortalidad en los grupos tratados con DSS, AOM/DSS y AOM/DSS + inhibidor 4 (40% en los dos primeros y 33% en el grupo tratado con inhibidor 4). Por ello, en los siguientes ciclos se redujo la concentración de DSS al 2%. No obstante, hay que destacar el efecto protector que tuvo el compuesto en estudio desde el primer ciclo con DSS, registrándose solo una muerte (supervivencia del 83%). Estos resultados, sugieren que el producto protegería a los animales de la CU crónica por DSS, sin embargo no prevendría el efecto causado a raíz de la combinación de AOM/DSS.

Tabla III.15. Efecto de los tratamientos en la supervivencia de los ratones al final del experimento en los distintos grupos.

Grupo	Nº ratones vivos/total	Supervivencia (%)
Blanco	5/5	100%
DSS/AOM	4/10	40%
DSS/AOM +I	2/6	33%
DSS	2/5	40%
DSS+ I	5/6	83%

Si bien el estudio del efecto del compuesto inhibidor 4 en la CU crónica y en el CCR asociado a CU crónica se hizo de modo simultáneo, la notable diferencia de resultados obtenidos hace que se describan por separado.

En primer lugar, se indican los resultados obtenidos en la CU crónica inducida por la presencia de DSS en el agua de bebida. Como en la CU aguda, se produce una ligera diarrea y en alguna ocasión hemorragia rectal. A diferencia de lo que ocurre en el modelo agudo, se pudo observar, en los animales que superaron el primer ciclo de DSS, escasa variación de peso de los mismos comparados con los controles y blancos. Donde se pudo ver mejoría fue en los parámetros relacionados con el sangrado y consistencia de las heces. Los animales que recibieron al inhibidor 4 estuvieron protegidos (Tabla III.16).

Tabla III.16. Efecto del inhibidor 4 sobre la CU crónica inducida por la administración de 3 ciclos de DSS (a cada ciclo de DSS le siguieron dos semanas en las que se administró exclusivamente agua). El IAE se calculó el último día teniendo en cuenta los parámetros de: presencia de sangre rectal y consistencia de las heces. No diferencias significativas respecto del grupo control (t test de Dunnet) ($p > 0,05$); Muy significativas $** p < 0,01$.

Grupo	Sangrado rectal	Consistencia heces	IAE
DSS	2,50 ± 0,05	2,40 ± 0,05	2,50 ± 0,05
DSS + I	0,07 ± 0,10**	0,30 ± 0,05**	0,19 ± 0,10**
^a Referencia	0,71 ± 0,30**	0,57 ± 0,20**	0,64 ± 0,21**

^a(Giner y cols.,2015)

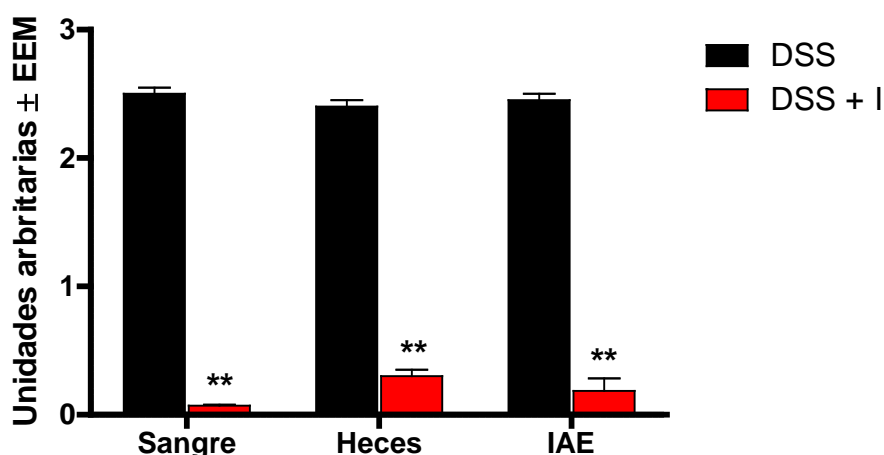


Figura III.41. Efecto del inhibidor 4 sobre el índice de actividad de la enfermedad (IAE) en la CU crónica inducida por tres ciclos de DSS. El IAE se calculó el último día teniendo en cuenta los parámetros: presencia de sangre rectal y consistencia de las heces. $** p < 0,01$ Diferencias significativas respecto del grupo control (t test de Dunnet).

Una vez sacrificados los animales y extraído el colon de cada uno de ellos, la inspección visual permitió ver a nivel macroscópico que la pared del intestino estaba adelgazada con presencia de úlceras en el recto

además se apreciaba un acortamiento de la longitud del mismo en el grupo control respecto al blanco (Tabla III.17). Sin embargo, en los ratones tratados con el inhibidor 4, se pudo apreciar una mejoría tal y como se muestra en la Figura III.42.

Tabla III.17. Efecto del inhibidor 4 en la CU crónica inducida por DSS en el peso corporal y sobre el acortamiento del colon. Media \pm SEM de los ratones supervivientes al final del experimento. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs grupo blanco (*t* Test de Dunnet).

Tratamiento	Supervivencia	Peso ratón (g)	Longitud colon (cm)
Blanco	5 (5)	22,6 \pm 0,16	8,52 \pm 0,24
DSS 2%	2 (6)	23,8 \pm 0,60	6,25 \pm 0,35**
DSS + I	5 (6)	22,1 \pm 0,14	7,53 \pm 0,30*

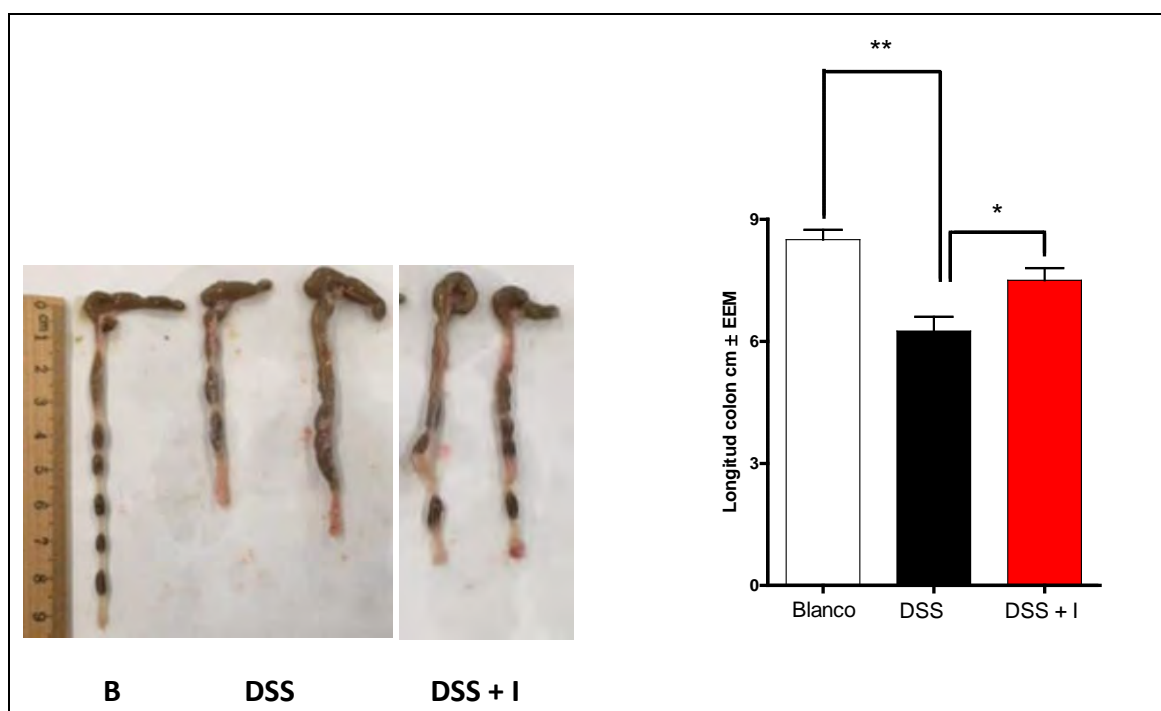


Figura III.42. Efecto del inhibidor 4 (35 mg/kg) sobre la CU crónica inducida por DSS en ratones C57BL/6. Vista macroscópica del colon de los animales tratados con tres ciclos de DSS, en los que se observa el acortamiento significativo del colon respecto al blanco, mientras que los tratados con inhibidor 4 están protegidos. # $p < 0,05$ vs grupo DSS; ### $p < 0,01$ vs grupo blanco (*t* Test de Dunnet).

Una representación de imágenes del estudio histopatológico de todos los grupos de ratones relacionados con el modelo de CU crónica se muestran en la Figura III.44. La imagen correspondiente al colon de un ratón con acceso libre al agua de bebida o Blanco (Figura III.43.A), muestra una morfología normal, sin inflamación o úlceras, con criptas normales e infiltración celular discreta. Sin embargo, tras los tres ciclos con DSS se puede observar (Figura III.43.B) el cambio en la arquitectura del colon, típico de un proceso inflamatorio que incluye, daño en las criptas, edema e infiltración celular y la ulceración de la mucosa. Por el contrario, el estudio histopatológico de las muestras procedentes de los animales tratados con el inhibidor 4 presentan una mejoría clínica respecto a los tratados solo con DSS, como se aprecia en la Figura III.43C.

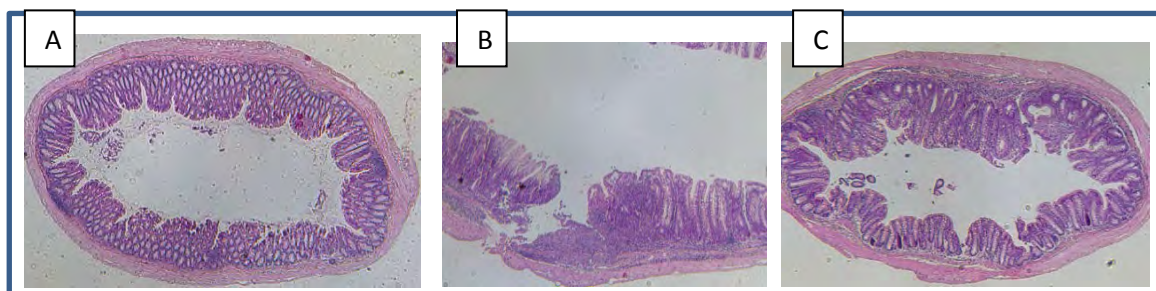


Figura III.43. Efectos del inhibidor 4 en los parámetros típicos de la CU crónica inducida por DSS. Las imágenes son representativas de los cortes de colon teñidos con hematoxilina/eosina se muestran a 4x aumentos. A) Grupo blanco que recibe solo agua. B) Grupo control que recibe DSS. C) Grupo tratado con inhibidor 4 + DSS.

Respecto a los resultados en la prevención del CCR asociado a CU, los datos se presentan a continuación. Las cifras de supervivencia al tratamiento de los animales con AOM/DSS y AOM/DSS + inhibidor 4 son similares (40 y 33%, respectivamente). Sin embargo, puesto que el grupo de animales tratados en la CU crónica presentaban buen aspecto así como los que sobrevivieron al primer ciclo de DSS tras la administración del

AOM, se decidió continuar el estudio hasta el final. En la Tabla III.18 se presentan los datos obtenidos en cada uno de los grupos respecto a la supervivencia, acortamiento del intestino y presencia de tumores. Al analizar la longitud de los intestinos comparando los resultados con el grupo blanco, se observa un acortamiento del colon significativo en el grupo control o AOM/DSS, mientras que los animales tratados con el inhibidor 4 estuvieron protegidos (presentaron una longitud del colon similar a la del grupo blanco).

Respecto a la aparición de tumores, la incidencia fue del 100% tanto en el grupo control que recibió AOM/DSS como en el tratado con el inhibidor 4. Sin embargo, lo que se pudo observar es una disminución en el número de tumores (53%) presentes en las muestras de colon. Es decir, en las condiciones del ensayo, la cantidad de fármaco recibido no ha sido suficiente para impedir la aparición de cáncer colorectal aunque si el número de tumores e incluso el tamaño de éstos (Figura III.44A).

Tabla III.18. Efecto del inhibidor 4 en el CCR asociado a CU inducido por AOM/DSS. Media \pm EEM ^ap<0,01 vs grupo blanco; ^bp<0,05 vs grupo AOM/DSS. ^cDato bibliográfico (t test de Dunnet) (Giner y cols., 2015).

	Nº ratones supervivientes	Longitud (cm \pm EEM)	Nº Tumores \pm EEM
Blanco	5 (5)	8,52 \pm 0,24	0
AOM/DSS	4 (10)	6,58 \pm 0,27 ^a	7,5 \pm 0,6
AOM/DSS + I	2 (6)	8,1 \pm 0,15	3,5 \pm 1,5 ^b
AOM	-	-	2,1 \pm 0,5 ^c

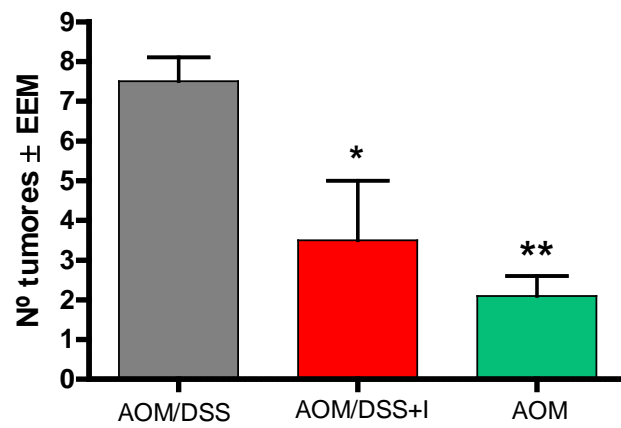
Como se muestra en la Figura III.44, los ratones sufrieron inflamación en el intestino grueso con pérdida de la arquitectura del epitelio y aparición de pólipos neoplásicos. El tratamiento con el inhibidor 4 además de reducir el acortamiento del colon (Tabla III.18) inducido por el AOM/DSS, evita la lesión en el epitelio, sin embargo, no fue capaz de impedir la aparición de los tumores, aunque si la multiplicidad de los mismos. Desde un punto de vista histológico (Fig III.44B) tras la tinción con eosina/hematoxilina, las lesiones que se muestran se corresponden con adenocarcinoma.

A



B AOM/DSS AOM/DSS + I AOM/DSS AOM/DSS + I

B



Blanco

AOM/DSS

AOM/DSS + I

Figura III.44. A) Imagen representativa del efecto del inhibidor 4 sobre la generación de tumores en el colon de los animales tratados con AOM/DSS. Cada barra representa la media del número de tumores en cada grupo (media \pm EEM) de los ratones supervivientes al final del experimento. * $p < 0,05$ vs grupo AOM/DSS ** $p < 0,01$ vs grupo AOM/DSS. B) Estudio histológico. A pesar de reducir el número de tumores en el grupo tratado, el compuesto no reduce la incidencia de los mismos. El estudio histológico no muestra diferencias significativas entre el control y el tratado. Las imágenes son representativas de los cortes de colon teñidos con hematoxilina/eosina se muestran a 4x aumentos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los dos modelos de CU (agudo y crónico), se puede concluir, que el inhibidor 4 se puede considerar un buen agente antiinflamatorio aunque no se ha podido demostrar que este efecto se traduzca en actividad quimiopreventiva suficientemente potente como para impedir la aparición de tumores en el colon, tras tratar a los ratones con un agente cancerígeno como es el AOM en un ambiente inflamatorio causado por el DSS.

DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

La quimioprevención y el tratamiento del cáncer representan hoy en día un reto para los investigadores de todo el mundo. Al ser una enfermedad compleja y multifactorial, los posibles enfoques para abordarla son muchos y los costes de las investigaciones que se llevan a cabo elevados. Un aspecto esencial es la búsqueda de nuevos fármacos, y aquí los métodos QSAR se aplican comúnmente con el fin de identificar nuevas moléculas con un perfil farmacológico y toxicológico adecuado. Como los métodos QSAR son muy versátiles, se pueden optimizar las nuevas moléculas en cuanto a sus aspectos ADME-tox, de modo que se reduce la experimentación animal así como las cargas económicas asociadas al desarrollo y comercialización de los nuevos fármacos. Muchos son los autores que se han servido de metodologías QSAR aplicadas a la búsqueda de nuevas moléculas en el campo del tratamiento y quimioprevención del cáncer. Algunos de estos estudios han tenido como objeto distintas vías de señalización implicadas en el desarrollo de procesos inflamatorios y cancerígenos (JAK/STAT3, NF- κ B, p38 α MAPK, Wnt/ β -catenina, PI3K/Akt/mTOR) (Lin y cols., 2014; Qian y cols., 2009; Grossi y cols., 2014; Mook Jr. y cols., 2015; Gravina y cols., 2015).

En esta Tesis se ha perseguido el objetivo de encontrar nuevos inhibidores de la vía de la Wnt/ β -catenina y PI3K/Akt/mTOR, ya que ambas vías de señalización están estrechamente relacionadas con el desarrollo de procesos inflamatorios y cancerígenos en próstata y colon. Siendo una prometedora estrategia a seguir para la quimioprevención y tratamiento del cáncer colorrectal (Dong y cols., 2015).

Con este fin, se ha aplicado una metodología QSAR basada en el empleo de índices topológicos. Como explicado con anterioridad, la TM aplica la teoría de grafos a la caracterización molecular mediante índices topológicos que pueden ser empleados como variables de regresión en QSAR. Se trata pues de una descripción molecular matemática que puede ser utilizada con gran éxito en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, incluyendo fármacos (Gálvez y cols., 2012). La TM presenta la gran ventaja de transformar una actividad farmacológica dada en un patrón matemático-topológico, de modo que se pueden encontrar moléculas totalmente diferentes (*hits* y *leads*), que, siguiendo ese patrón, muestren dicha actividad. Naturalmente ese patrón general puede descomponerse en sub patrones, cada uno de ellos ligado a un mecanismo de acción particular. De esta manera se pueden hacer ambas cosas: buscar nuevos fármacos que sigan un mecanismo de acción determinado, e incluso, en determinados casos lo contrario, deducir el mecanismo de acción a partir del patrón que siguen las moléculas.

El papel de la TM dentro de las metodologías QSAR en el campo de la inflamación y cáncer ha demostrado ser de gran relevancia. Si se analizan los resultados obtenidos por parte del grupo de investigación a lo largo de los últimos años, destaca la contundencia del método a la hora de identificar nuevos *hits* con perfil de antiinflamatorios y antineoplásicos (Gálvez-Llompart y cols., 2013). Aprovechando la experiencia en este ámbito, nace la colaboración con el departamento de Farmacología, con el que se inicia un periodo de investigación centrado en las enfermedades inflamatorias intestinales (EII). Una vez más, la TM demuestra su gran eficacia, permitiendo la identificación de agentes activos frente CU a través de distintos mecanismos como la inhibición de NF-kB e IL-6 (Gálvez-

Llompart y cols., 2011; Gálvez-Llompart y cols., 2013). A tal propósito cabe destacar la importancia y la eficacia del método aplicado en el campo de las enfermedades crónicas intestinales así como los numerosos resultados obtenidos, los cuales se han traducido en una *review* sobre la importancia del método en la búsqueda de tratamientos frente las EII (García-Domenech y cols., 2013). Fue por tanto un paso lógico, intentar ir más lejos. Si la metodología ha sido capaz de identificar nuevos tratamientos frente a CU, por que no aprovechar dicho potencial para la identificación de compuestos que fuesen capaces de prevenir el desarrollo de la inflamación y del cáncer asociado a ésta. Por lo tanto, la presente Tesis nace con el objetivo de encontrar nuevos *hits* con capacidad quimiopreventiva frente a CCR asociado a CU. Para ello, la investigación se centra en dos vías de señalización claves en el desarrollo del cáncer y de los procesos inflamatorios relacionados con él.

Otros autores emplearon índices topológicos en el campo del cáncer de colon para dilucidar qué proteínas pudieran actuar como marcadores tumorales de esta enfermedad (Munteanu y cols., 2009; Aguiar-Pulido y cols., 2012; Martínez-Romero y cols., 2010). Asimismo, también existen antecedentes del empleo de índices topológicos en la búsqueda de nuevos fármacos activos en cáncer de próstata (Sharma y cols., 2009).

Igualmente se han empleado otras metodologías (docking molecular, modelos farmacofóricos, QSAR-3D, etc), con el fin de encontrar nuevos agentes terapéuticos en el campo del cáncer de colon y de próstata (Soon y cols., 2013; Slynko y cols., 2014; Kawkab y cols., 2012; Burnett y Gakh, 2009; Wang y cols, 2004). Del mismo modo, las técnicas QSAR han sido aplicadas a la búsqueda de nuevos inhibidores de la vía de señalización de

Wnt/ β -catenina (Dong y cols., 2015; Li y cols., 2013; Kirubakaran y Karthikeyan, 2013) y la vía del PI3K/Akt/mTOR (Zhan y cols., 2014; Jia y cols., 2013; Ran y cols., 2012; Du-Cuny y cols., 2009; Forino y cols., 2005).

Sin embargo, el empleo de índices topológicos para la identificación de nuevas estrategias terapéuticas en las vías de señalización de Wnt/ β -catenina y PI3K/Akt/mTOR se ha desarrollado por primera vez en la presente Tesis doctoral (Zanni y cols., 2015). Tan solo hay constancia en la literatura de un estudio de Ajmani y cols., (Ajmani y cols., 2010), en el que a través de índices topológicos analizan los requisitos estructurales de los inhibidores de Akt1, si bien no emplean los resultados para buscar nuevos compuestos inhibidores.

En líneas generales, los modelos obtenidos en la presente Tesis doctoral se caracterizan por tener una alta especificidad para detectar falsos positivos (compuestos identificados por el modelo como potenciales inhibidores de Akt o β -catenina y que no poseen dicha actividad farmacológica). En otras palabras, se ha procurado que los modelos fueran altamente específicos, incluso a costa de disminuir algo su sensibilidad, al objeto de garantizar en lo posible resultados positivos.

Cuando analizamos los datos puramente estadísticos asociados a los modelos discriminantes, el lambda de Wilks (λ) es uno de los referentes. Valores de λ próximos a la unidad por regla general se asocian a no discriminación, por lo que conviene aclarar que este parámetro está influenciado por el número tan elevado de compuestos que contenía la muestra. Dicho de otro modo, al haber un número muy alto de compuestos en la zona de solapamiento activos/inactivos, el lambda de Wilks adopta valores próximos a la unidad, a pesar de que el modelo es

eficaz clasificando correctamente los compuestos (<http://.ats.ucla.edu/stat/sas/notes2/>). Este hecho se ve reflejado también al analizar el parámetro estadístico de la distancia de Mahalanobis (datos no mostrados), el cual describe la distancia respecto al centroide (valor medio de los compuestos de una clase), a la que se encuentra cada uno de los compuestos clasificados en el espacio topológico. Además, la distancia de Mahalanobis nos da una medida de la distancia entre los dos centroides (activos e inactivos). Al tener en cuenta este parámetro, se aprecia que para los modelos con lambda de Wilks próximo a la unidad (modelos 2 y 4), el número tan elevado de compuestos provoca una disminución sensible de la distancia entre los dos centroides, causando un solapamiento de varios compuestos. De ahí que pese a ser clasificados correctamente, no se aprecie una división espacial nítida. Esta circunstancia es manifiesta al analizar el número de compuestos clasificados correctamente en las matrices de clasificación de los modelos 2 (Tabla III.2) y 4 (Tabla III.4), donde se aprecian porcentajes de correcta clasificación del 76% y el 70%, respectivamente.

Igualmente, este fenómeno se constata al hallar la media de los valores relacionados con la distancia de Mahalanobis para el modelo 2 respecto al modelo 1 (valor de lambda de Wilks de 0,6). En el caso del modelo 2 se obtiene un valor medio de distancia de Mahalanobis entre los dos centroides de 2,30, mientras que para el modelo 1, el valor casi se duplica: 4,45. Por tanto, se puede concluir que en modelos con un número grande de compuestos (>600 aprox) el solapamiento es inevitable, e implica desviaciones de los valores de la λ de Wilks.

Por otra parte, el empleo de redes neuronales ha permitido lograr un doble objetivo: por un lado, detectar posibles relaciones de tipo no lineal y por otro, ser más restrictivos al construir modelos capaces de distinguir compuestos con actividad inhibitoria frente a Akt o β -catenina, de moléculas antiinflamatorias y anti-neoplásicas. La capacidad de distinguir compuestos pertenecientes a las mismas familias farmacológicas, aporta un valor añadido a la estrategia de búsqueda de inhibidores de Akt y β -catenina.

En general, se puede afirmar que los modelos de tipo cualitativo fueron casi impecables, logrando predecir correctamente la actividad inhibitoria frente a las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR y Wnt/ β -catenina de cinco de los seis compuestos seleccionados, tal y como confirmaron los ensayos *in vitro*.

Por lo que se refiere a la interpretación de resultados en términos de relación estructura-actividad, se presentan a continuación algunos de los aspectos más significativos. Desde luego, no es objetivo de este trabajo el estudio detallado de los aspectos estructurales que determinan la actividad inhibitoria de las vías estudiadas, sin embargo si se pueden analizar características estructurales que condicionan, de una manera clara, la actividad de los compuestos y que se ven reflejadas en los ensayos *in vitro*. Veamos algunas de ellas.

Uno de los factores que parece determinar la mayor potencia inhibitoria frente a Akt es la presencia de anillos condensados 6-5 de carácter aromático (indanos). Este hecho que se ve reflejado en los compuestos seleccionados (1-6), es coherente con los estudios previos de la literatura (Tiqing y cols., 2007). Por ejemplo, los compuestos Akt00566 y Akt00576, cuyas estructuras se muestran a continuación (Figura IV.1) presentan un valor CI_{50} frente Akt de 0,16 y 0,60 nM, respectivamente.

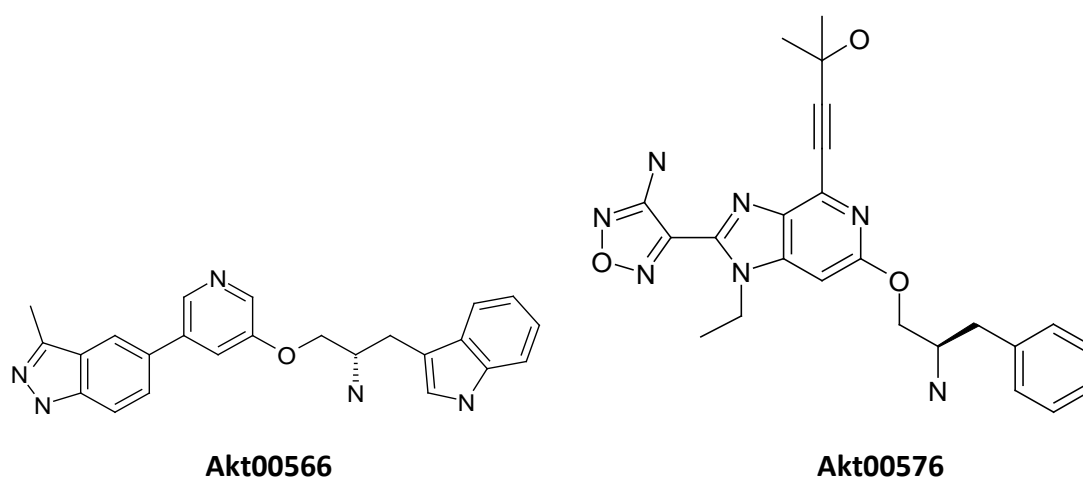
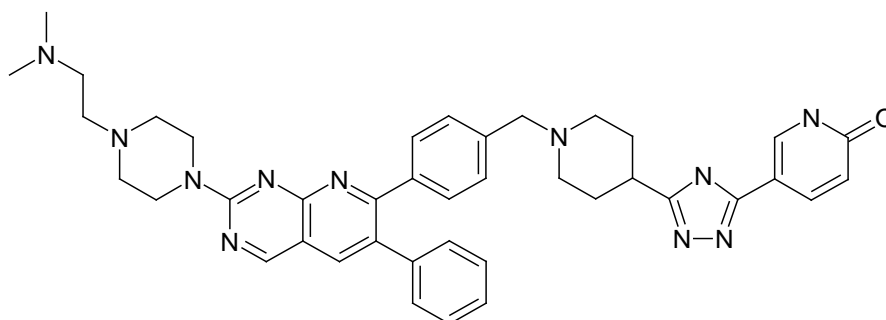


Figura IV.1. Estructura química de los compuestos Akt00566 (izquierda) y Akt00576 (derecha), inhibidores de Akt recogidos en literatura (Tiqing y cols., 2007).

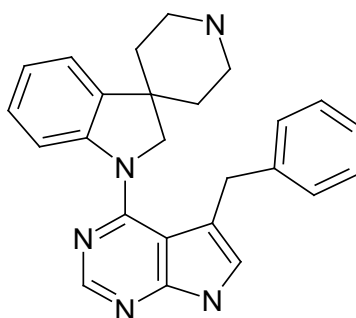
Por otro lado, compuestos con anillos condensados 6-6 como Akt00241, muestran valores de Cl_{50} superiores ($Cl_{50} = 69$ nM) (Figura IV.2).



Akt00241

Figura IV.2. Estructura química del compuesto Akt00241, Estructura química del compuesto Akt00241, inhibidor de Akt (Tiqing y cols., 2007).

Este hecho se ve aún más claramente reforzado si consideramos el inhibidor Akt00723, el cual presenta un valor alto de Cl_{50} (1330 nM) y posee solamente un anillo condensado aromático (pirrolopirimidínico).



Akt00723

Figura IV.3. Estructura química del compuesto Akt00723, inhibidor de Akt descrito en la literatura (Tiqing y cols., 2007).

Se puede pues concluir que hay constancia de que la presencia de anillos condensados, particularmente de tipo 6-5 (evaluados a través del descriptor nR09 presente en los modelos empleados), juega un papel importante en la inhibición de Akt.

De hecho, cinco de los seis compuestos seleccionados (Figura III.30), presentan anillos condensados. Dichos anillos poseen además alta conjugación (aromaticidad) y se encuentran unidos a otros anillos aromáticos simples tales como benceno, furano o tiofeno. Si comparamos esos datos con los datos obtenidos en los ensayos sobre la vía de señalización del Akt/mTOR (Figura III.31), se hace manifiesto que, en general, los compuestos que presentan anillos condensados son los que presentan actividad inhibitoria en dicha vía. En particular, las dos moléculas que tienen anillos condensados de 6-5 miembros son, en la mayor parte de los casos, las más potentes (inhibidores 4 y 6) en las dos vías de señalización estudiadas (Wnt/ β -catenina y PI3K/Akt/mTOR) (Figura III.31 y Figura III.32). Concretamente, en el ensayo de Akt el inhibidor 4 a las 48 h reduce sensiblemente los niveles de p-Akt y p-mTOR, mientras que en los ensayos *in vitro* para determinar la actividad frente a β -catenina, los inhibidores 4 y 6 disminuyen sensiblemente su expresión.

En efecto, el inhibidor 4 presenta un anillo dihidro-indolona mientras que el 6, uno de tipo tiazolpirimidinona (Figura III.30). En este sentido, es significativo que la única molécula que no presenta anillos condensados (inhibidor 5) (Figura III.30) es la que no muestra actividad en ninguno de los ensayos (Figura III.31), a pesar de tener dos anillos de tiofeno aislados.

Por el contrario, el inhibidor 2, que presenta dos anillos hexagonales condensados, solo muestra actividad significativa en m-TOR y moderada en β -catenina. Curiosamente, los dos compuestos menos activos frente a β -catenina (inhibidores 1 y 3) contienen tres anillos condensados, a saber, grupos amino-pirano-cromenona, hecho que refuerza la idea de la necesidad de presencia de un anillo doble 6-5 para obtener una actividad óptima (Figura III.30). Así pues, la presencia de anillos aromáticos condensados es para muchas moléculas una condición necesaria para inhibir estas vías de señalización, si bien no es condición suficiente.

Por otra parte, en las ecuaciones FD_1 a FD_4 aparecen índices relacionados directa o indirectamente con la existencia de alta conjugación y aromaticidad (como por ejemplo EEig11r, piPC02 o SCBO), lo que nos obliga a una interpretación.

En efecto, la influencia de la conjugación se pone de relieve en los 6 compuestos ensayados como inhibidores. Así, es interesante al respecto la comparación entre dos moléculas que muestran una estructura similar: los inhibidores 1 y 3. Ambos comparten el esqueleto común de 2-amino-4-fenil-4H-piranocromenona (Figura IV.4), y ambos comparten grupos electrófilos unidos al anillo bencénico: el inhibidor 1 posee un nitrilo y el inhibidor 3 un nitro (potentes aceptores π) (Figura IV.5).

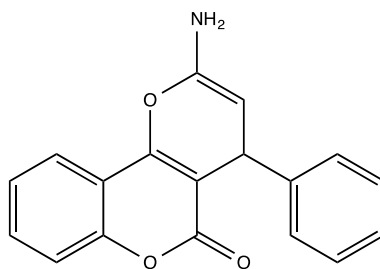


Figura IV.4. Esqueleto tipo 2-amino-4-fenil-4H-piranocromenona.

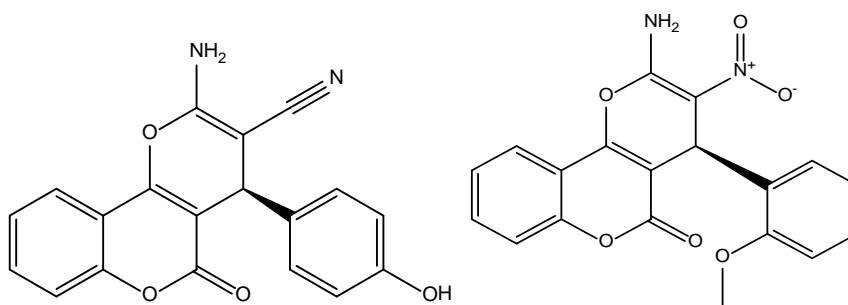


Figura IV.5. Estructura química de los inhibidores 1 y 3.

Además ambos poseen sustituyentes sobre ese mismo anillo que tienen un efecto mesómero dador π (hidroxilo el inhibidor 1 y metoxi el inhibidor 3). La única diferencia es que dichos sustituyentes se encuentran en posición para y orto, respectivamente, en el anillo bencénico. Esa diferencia determina que el primero muestre más actividad inhibitoria frente a mTOR (Figura III.30), mientras que el segundo frente a Akt.

Un comportamiento similar puede observarse en el inhibidor 2, que posee un anillo de tetrahidrocromenona unido a otro bencénico que contiene grupos dadores π tales como el metoxi y el propinólico en posiciones meta y para, respectivamente. Al igual que el inhibidor 1, posee mayor capacidad inhibitoria frente a mTOR (Figura III.30).

La presencia de dadores π también se da en el compuesto que ha demostrado un mejor perfil inhibitorio frente a las vías de señalización estudiadas: el inhibidor 4, ya que posee un átomo de bromo en la posición 5 del anillo dihidroindólico.

En resumen, los resultados apuntan que, para los compuestos que poseen estructura de cromenona, la máxima actividad se da cuando sobre los anillos condensados hay aceptores π y sobre el anillo bencénico adjunto (si existe) dadores π .

Como se observa en las Figuras III.31 y III.32, los dos compuestos que demostraron una mayor actividad (inhibidores 4 y 6) presentan un anillo de pirrolidinona (Figura III.30) y el más potente (inhibidor 4) posee un halógeno (Br) en la posición 5 del anillo indólico, lo que produce un efecto mesómero dador π sobre el anillo. Esta presencia de bromo ya se tiene en cuenta en el modelo FD_2 a través del índice $T(O...Br)$, como factor influyente en la actividad inhibitoria frente a Akt. Ese índice nos indica que no solo es importante la presencia del halógeno, sino su posición respecto al oxígeno del carbonilo del anillo condensado. A este respecto, es interesante señalar los 5 inhibidores ensayados que resultaron activos poseen un grupo carbonilo unido al anillo condensado, lo que sugiere que el carácter nucleófilo (dador de electrones) del carbonilo es también relevante para la actividad.

El hecho de que la presencia de halógenos sea coadyuvante a la actividad, es coherente con lo ya descrito en literatura, donde se constata la presencia de halógenos en algunos de los AINEs más potentes (diclofenac, celecoxib, diflunisal, indometacina) (Hadjipavlou-Litina y cols., 2000; Parisini y cols., 2011). En este caso, si observamos el grupo de compuestos seleccionados por TM (Figura III.30) y los resultados obtenidos *in vitro* en ambas vías (Figura III.31 y Figura III.32), destaca por su actividad el inhibidor 4, que es el único compuesto que presenta un halógeno (Br) en su estructura.

Otros aspectos estructurales y constitutivos a discutir y que coinciden con lo ya publicado en literatura (Ajmani y cols., 2010) sobre los factores determinantes de la actividad inhibitoria frente a Akt son:

-Presencia de aceptores y dadores de hidrógeno. Así, se observa que es necesaria la presencia de ambos (grupos carbonilo e hidroxilo, por ejemplo), aunque los dadores favorecen la actividad. De hecho, todos los compuestos activos poseen al menos un dador, salvo el inhibidor 6, si bien en este caso el grupo éster debe hidrolizarse para de este modo generar un hidroxilo. Es interesante constatar que para la inhibición de mTOR, la presencia de grupos dadores de hidrógeno juega un papel fundamental. De este modo, el inhibidor 1 con dos grupos dadores (OH- y NH₂-) es más potente que el inhibidor 3 con tan solo un grupo dador (NH₂-). Igualmente, la potencia del grupo dador es relevante; así, el inhibidor 4 con un grupo dador potente (OH-), inhibe en mayor grado que el inhibidor 2 (grupo dador NH₂-, menos potente) y este a su vez, más que el inhibidor 6 que no posee ningún grupo dador.

- El número de enlaces rotables es otro factor que influye en la actividad. De acuerdo con Ajmani S. y colaboradores, a mayor número de enlaces rotables menor actividad. Esta afirmación es coherente con el caso del inhibidor 5, que contiene 7 enlaces rotables y resultó ser inactivo. Esta misma característica puede justificar porque las moléculas que poseen anillos condensados son las más activas y demás es coincidente con lo previsto por la conocida “regla del 5” de Lipinski (Lipinski, 2004), de acuerdo con la cual el máximo número de enlaces que posean libre rotación debe ser 5 para una óptima actividad. Sin embargo, el compuesto más potente (inhibidor 4) resultó tener 8 enlaces rotables, lo que demuestra que la regla puede tener excepciones.

-La presencia de halógenos también se ha señalado como coadyuvante a la actividad. Esto es coherente con el hecho de que el inhibidor más potente (inhibidor 4) sea el único que contiene un halógeno.

-Igualmente, la presencia de grupo carbonilo directamente enlazado a anillos aromáticos, favorece la actividad (el único inactivo, el inhibidor 5 no presenta esta característica). Es también interesante comprobar que en todos los compuestos activos, la separación entre estos carbonilos y los grupos dadores π (como NH_2 o Br) es de 6 enlaces, lo que parece ser un factor relevante en la actividad inhibitoria frente a Akt.

Un aspecto de especial interés para nosotros es el papel preponderante que juegan los índices topológicos de carga en relación con la actividad inhibitoria frente a las vías objeto de estudio. Así, se aprecia una relación entre los compuestos activos frente a mTOR, inhibidores 1-4 y 6, los cuales presentan anillos condensados, y el índice JGI2, que es el índice de carga a distancia 2 ponderado por enlace. En general, a mayor valor del índice JGI2 mejor perfil inhibidor frente a mTOR, lo que se interpreta como una medida de la conjugación y aromaticidad del compuesto. Respecto a β -catenina, es interesante que los tres compuestos más activos (inhibidores 2, 4 y 6) posean grupos dadores π , tales como amina primaria, secundaria y terciaria, grupos ester, hidroxilo, metoxi o halógenos. Todos ellos ejercen un efecto mesómero +M, que coherentemente con lo visto anteriormente, favorece la actividad inhibitoria.

Por último, conviene discutir la influencia la quiralidad en la actividad de los inhibidores, ya que todas las moléculas seleccionadas incluyen un carbono quiral. Esto es interesante dado que la TM no distingue entre isómeros ópticos y es por tanto probable que uno de los enantiómeros sea más potente que el otro. Por ello pensamos que podría valer la pena realizar en el futuro ensayos sobre ambos enantiómeros para determinar cuál de los dos (R o S) es más potente como inhibidor de las vías de señalización Wnt/ β -catenina y PI3K/Akt/mTOR.

Tras haber discutido los aspectos físicoquímicos ligados a la inhibición de las dos vías de señalización implicadas en procesos inflamatorios y cancerosos, vamos a continuación a discutir los resultados obtenidos *in vitro*.

Con el fin de respetar el principio de las 3Rs, los seis compuestos seleccionados por TM fueron ensayados empleando dos líneas celulares humanas: HT-29 (cáncer de colon) y PC-3 (cáncer de próstata).

Puesto que las dianas farmacológicas propuestas son las vías de señalización Wnt/ β -catenina y PI3K/Akt/mTOR, cuya anormal activación está implicada en la proliferación celular de diferentes tumores celulares, como el de colon o el de próstata, se inició el estudio *in vitro* de los productos seleccionados (inh 1-6). Entre los compuestos ensayados a una concentración final de 100 μ M, destacan los productos 3 y 4 frente a la proliferación celular de las células HT-29. La intensidad del efecto antiproliferativo es comparable a la de los inhibidores de referencia de β -catenina (FH535), PI3K (LY294002) y cinasa dependiente de ciclina (AT7519). De hecho, el compuesto 4 supera el de FH535 y AT7519. Estos primeros datos aconsejaban la posibilidad de estudiar *in vivo* dicho compuesto en modelos animales de procesos cancerosos de colon.

Comportamiento similar se observó en los cultivos celulares de células de cáncer de próstata (PC-3). A la concentración final de 100 μ M se comprobó que todos los productos, excepto el 2 y 5, inhibían la proliferación celular. De nuevo, sobresale el producto 4 con un efecto antiproliferativo superior al fármaco de referencia, bicalutamida (Jing y cols., 2015). El crecimiento celular es prácticamente anulado cuando se ensaya dicho compuesto a 200 μ M, tan solo un 3% de viabilidad celular.

El estudio bioquímico ha permitido constatar que el efecto antiproliferativo está relacionado con la inhibición de las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR y/o Wnt/ β -catenina. Para ello se determinó el efecto de los compuestos sobre la expresión de Akt y mTOR, tanto a nivel citosólico como nuclear después de 1 y de 48 horas tras el tratamiento de las células PC-3 a una concentración final de 50 μ M. Tras la hora de tratamiento, los productos 2 y 4 reducían significativamente el grado de fosforilación de p-mTOR (aproximadamente un 50%) de modo similar al compuesto inhibidor de Akt, inhibidor IV (40%). Respecto a la fosforilación de Akt, algunos compuestos la inhibieron aunque no de modo significativo. Sin embargo, el grado de inhibición presentado por el compuesto 4 (45%) superó al de referencia inhibidor IV (25%).

A las 48 horas de tratamiento se observó una reducción significativa de la fosforilación de Akt por efecto de los compuestos 3, 4 y 6, con valores superiores al fármaco de referencia. Respecto a p-mTOR podemos afirmar que todos los compuestos, excepto 5 y 6, redujeron significativamente su expresión en PC-3 y lo hicieron de un modo similar al inhibidor IV (aproximadamente un 65%), destacando nuevamente el compuesto 4 que lo hizo en un 75%.

En condiciones basales, la β -catenina celular está unida mayoritariamente a E-cadherina en la membrana celular. La citosólica se mantiene en un estado inactivo a través de su interacción con un gran complejo proteico con varias proteínas, incluyendo GSK-3 β . En esta situación β -catenina es fosforilada principalmente por GSK-3 β y etiquetada para su degradación proteasómica. Bajo estas condiciones, los genes diana de β -catenina son reprimidos. Cuando se activa la vía, la GSK-

3β se inhibe conduciendo a la estabilización y acumulación citoplásmica de β -catenina, que en este momento entra en el núcleo e induce la expresión de sus genes diana, entre ellos el de la ciclina D1, que promueve la progresión del ciclo celular.

Tras las primeras 4 horas de tratamiento, solo el compuesto 6 tuvo un discreto efecto inhibitor sobre la actividad de la β -catenina. Similares resultados se obtuvieron a las 48 h para los compuestos 2, 4 y 6. Es decir, en las condiciones del estudio, los compuestos reducen de modo no significativo la expresión de β -catenina. Aunque la acumulación de la β -catenina en el citoplasma no se afecta, los compuestos 4 y 6 reducen significativamente la expresión de la ciclina D1. Es decir, la interacción de la β -catenina con el gen diana de ciclina D1 no se produce y por lo tanto, se detiene el ciclo celular, apareciendo un efecto antiproliferativo. Con el fin de determinar donde se produce la inhibición de la traslocación de la β -catenina, las células PC-3 se trataron con un inhibidor de GSK- 3β , que permite la entrada de β -catenina, acumulándose en el núcleo celular. Cuando las células se trataron, se observó como los compuestos 2, 4 y 6 reducían los niveles de β -catenina asociada a la membrana y citosólica, acumulándose en una región yuxtánuclear discreta evitando así su translocación al núcleo y por tanto, la activación del gen que codifica la ciclina D1, inhibiendo así la proliferación celular.

Del análisis de los resultados *in vitro* se deduce que el compuesto 4 es el más activo por su efecto antiproliferativo con un mecanismo de acción inhibitorio en ambas vías, lo que le convierte en el *hit* con mayor potencial de aplicación en el tratamiento y quimioprevención del cáncer.

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), principalmente la CU y la enfermedad de Crohn, se caracterizan por una inflamación crónica del tracto gastrointestinal en las que se alternan episodios de crisis con fase de remisión. Los estudios epidemiológicos han indicado que ambas enfermedades son importantes factores de riesgo para el desarrollo del CCR (Siegel y cols., 2014). La colitis crónica ocasiona un ambiente favorable para la iniciación y promoción del crecimiento tumoral, progresión y metástasis. La incidencia del CCR depende de la duración, severidad y extensión de la inflamación del colon, así como del tratamiento de la enfermedad y factores genéticos y ambientales. Aproximadamente, un 25-40% de los pacientes sin colectomía profiláctica, desarrollarán CCR después de 40 años de enfermedad (Grivennikov, 2013).

Establecer la eficacia de nuevos tratamientos en EII y CCR requiere de la investigación con modelos animales que reproduzcan la clínica de la colitis y CCR humanos. El modelo de inducción de CCR por la administración de AOM/DSS es uno de los más utilizados para este tipo de estudio. La exposición continua del DSS provoca en los animales una inflamación crónica con infiltración celular, erosión de la mucosa y pérdida de las criptas que favorecen los cambios histopatológicos en el epitelio intestinal, pero la incidencia de tumores es relativamente baja y además solo aparece en un 15-20% de los animales (Clapper y cols., 2007). Sin embargo, cuando se inyecta el agente cancerígeno AOM y se exponen los ratones a repetidos ciclos de DSS, la aparición de adenocarcinomas ocurre rápidamente y en todos los animales. El AOM se comporta como un agente alquilante del ADN, provocando mutaciones y promoción de tumores. El grado de inflamación y displasia es similar a la que se observa en las lesiones de colon de pacientes con colitis asociada a cáncer. Por lo

tanto, es un modelo adecuado para probar el efecto quimiopreventivo de fármacos contra el CCR asociado a colitis (Grivennikov, 2013).

El AOM produce una mutación en el codon 33 y en la β -catenina, cambiando su distribución citoplasmática/nuclear y aumentando su presencia en el núcleo de las células, lo que es equivalente a la alteración de la distribución de esta proteína en el CCR humano. Algunos autores han demostrado que la desregulación de la vía PI3K/Akt/mTOR está asociada a la aparición de tumores en el colon. De hecho, un aumento de la expresión de Akt y de la fosforilación de Akt es una señal temprana de la carcinogénesis de colon, activando la cascada oncogénica, promoviendo el crecimiento y proliferación celular e impidiendo la apoptosis.

El primer paso fue estudiar el compuesto 4 en un modelo de inflamación intestinal aguda inducida por la administración de DSS durante 7 días. Este es un excelente modelo preclínico que muestra algunas de las características fenotípicas de la CU humana y se ha comprobado como los tratamientos habituales en humanos tales como corticosteroides, metronidazol, 5-ASA, ciclosporina, etc, son efectivos en este modelo (Sann y cols., 2013). El mecanismo exacto de como el DSS produce la lesión en el epitelio intestinal del colon no está perfectamente aclarado, aunque una acción tóxica sobre el mismo se ha visto implicada. La CU inducida por DSS se caracteriza por un incremento de la infiltración de células inflamatorias, liberación de citocinas pro-inflamatorias, incremento de la expresión de enzimas pro-inflamatorias como COX-2 e iNOS y activación factores de la transcripción nuclear como NF- κ B y STAT3. Estos cambios, producen en el intestino erosión, sangrado, edema y úlceras, lo que conduce a la destrucción de la mucosa intestinal

(Solomon y cols., 2010). En este estudio los ratones Balb/C recibieron DSS (3% P/V) durante 7 días apareciendo en el grupo control diarrea, ligero sangrado rectal y ligera pérdida de peso. Los animales tratados con el compuesto 4 estuvieron protegidos frente a la inflamación inducida por el DSS, mejorando algunos de los signos clínicos como la diarrea y el sangrado (Figura III.34). La severidad de la inflamación intestinal estuvo reducida con respecto al control a pesar de ocasionar una pérdida de peso mayor que en el grupo control (Tabla III.12). Sin embargo, los animales que recibieron solo el compuesto 4 en ausencia de DSS no mostraron cambios significativos en el peso corporal respecto a los ratones que no recibían producto alguno, solo agua de bebida. Esto induce a pensar que el compuesto 4 no es tóxico, al menos de forma aguda.

La evaluación macroscópica y el posterior análisis histológico confirmaron el beneficioso efecto del compuesto 4. Uno de los indicadores de la inflamación intestinal por DSS es el acortamiento del colon (Tabla III.14). Como se puede comprobar, los animales tratados están protegidos, ya que presentan valores de longitud de colon muy semejantes a los de los animales sanos. Esta mejora se corrobora también a nivel histológico, observándose una menor infiltración de células inflamatorias, una reducción de la severidad y extensión de la inflamación así como un menor grado de daño en la mucosa intestinal (Figura III.38). Estos resultados se vieron confirmados con la determinación de la actividad MPO en las muestras homogeneizadas de colon. La MPO es miembro de la superfamilia de las peroxidasas y se almacena en los gránulos azurófilos de los leucocitos, y está implicada en la producción de agentes oxidantes que lesionan los tejidos y perpetúan la inflamación. El

DSS aumenta la infiltración leucocitaria que es reducida por efecto del compuesto 4 (41%).

Por otro lado, es sabido que las citocinas proinflamatorias tienen un papel estelar en la patogénesis de la CU. Una de ellas es la IL-6, clave en la modulación de la respuesta inflamatoria de modo que los niveles en sangre de esta citocina se correlacionan con algunos de los parámetros de la CU. IL-6 ejerce sus efectos a través de su interacción con el receptor soluble para IL-6 (sIL-6R). Un aumento de IL-6 y de su receptor, ocasiona un aumento de la expresión y traslocación del STAT3 mediante la inhibición de la apoptosis de los linfocitos T de la lámina propia. La acumulación de dichas células origina un proceso de inflamación crónica que puede ser bloqueada mediante los anticuerpos para el receptor de IL-6 (Sánchez-Muñoz y cols., 2008). Pues bien, es importante reseñar que el compuesto 4 inhibió en un 80% la producción de IL-6 (Figura III.39), a lo que se suma el hecho de que también inhibió significativamente la expresión de COX-2 (42%) e iNOS (55%) en las muestras de colon (Figura III.40). Estos mediadores inflamatorios están ampliamente relacionados con el desarrollo de CU e incluso con la derivación de ésta a cáncer de colon, particularmente la COX-2 (Setia y cols., 2014; Lee y cols., 2014; Kim y cols., 2015). La vía de señalización celular NF- κ B es una de las principalmente implicadas en la inflamación intestinal. Es un factor regulador de la expresión de genes proinflamatorios. Generalmente, NF- κ B se encuentra en reposo en el citoplasma en forma de heterodímero complejo compuesto por dos subunidades p65/p50 combinadas a su vez con la proteína inhibitoria I κ B. Su activación y traslocación al núcleo resulta en la expresión de citocinas pro-inflamatorias y enzimas como las ya citadas. El análisis por *Western blot* de las muestras de colon en los

animales tratados con el compuesto 4 muestran una marcada reducción de la activación de NF- κ B y la translocación de la subunidad p65 al núcleo (63%) con respecto al control (Figura III.41).

En resumen, los resultados obtenidos *in vivo* con el compuesto 4 en este modelo de inflamación aguda, permitieron que fuera estudiado en el modelo de cáncer colorrectal asociado a colitis ulcerosa crónica inducida por AOM/DSS en ratones C57BL/6, descrito en líneas anteriores. El fin del experimento es la aparición de la displasia o cáncer colorectal en los animales, lo que se asegura por la exposición de los ratones a tres ciclos repetidos de DSS tras la inyección subcutánea de AOM. La administración del compuesto 4 durante las 9 semanas del experimento a razón de tres dosis semanales (30 mg/kg) no redujo la mortalidad respecto al grupo control de AOM/DSS (alrededor de un 40% de bajas tras el primer ciclo de DSS). En los que sobrevivieron, el número de tumores se vio reducido en un 50% no así la incidencia de la aparición del cáncer. Los factores que pueden haber influido en este discreto resultado son varios, si bien pensamos que la dosis y la duración del tratamiento son elementos que pueden haber influido negativamente en el resultado final. Por tanto, son necesarios estudios adicionales que demuestren de modo inequívoco el efecto preventivo de la aparición de CCR en colitis ulcerosa puesto que los resultados obtenidos con los animales sometidos a tres ciclos de DSS sin tratamiento previo con AOM así lo sugieren. De hecho, el compuesto 4 redujo la mortalidad de los ratones tras el primer ciclo de DSS (Tabla III.16), mientras que las bajas en el control fueron notables. En el grupo control, la administración cíclica de DSS provocó una colitis crónica cuantificada mediante el IAE y corroborada macroscópicamente e histopatológicamente. La administración por vía oral del compuesto 4,

durante las 9 semanas del experimento a razón de tres dosis semanales, protegió a los animales de las alteraciones del colon inducidas por el DSS. No se observó pérdida de peso corporal respecto al control, pero si una mejora de la consistencia de las heces y la ausencia de sangre en las mismas, lo que proporcionó un valor de IAE muy inferior al del control e incluso al fármaco de referencia 5-ASA (Giner y cols., 2013) (Tabla III.17). Esta mejora estuvo acompañada de una protección de acortamiento del colon tras los 64 días de tratamiento (Tabla III.18). El estudio histológico, revela que el compuesto 4 es capaz de disminuir el daño en las criptas, el nivel de edema e infiltración celular y la ulceración de la mucosa intestinal (Figura III.44C).

Todos estos datos, sugieren el importante efecto anti-inflamatorio del compuesto 4 en la CU aguda y crónica. Los datos obtenidos a nivel molecular en la inflamación aguda así como en los estudios *in vitro* con células cancerosas, hacen pensar que el compuesto 4 puede prevenir la aparición y progresión de las lesiones cancerosas a nivel del colon, aunque la primera aproximación no haya tenido el éxito deseado.

Hoy en día, es un hecho reconocido que los procesos inflamatorios característicos de la CU están estrechamente ligados al desarrollo de cáncer colorrectal por activación, entre otras, de las vías PI3K/Akt/mTOR y Wnt/ β -catenina, por lo que reduciendo la inflamación o bien inhibiendo dichas vías se podría conseguir un efecto quimiopreventivo frente a la aparición del cáncer. De hecho, una reciente publicación pone de relevancia la importancia de eliminar los procesos inflamatorios crónicos ya que contribuyen al desarrollo del cáncer generando un microambiente inmunosupresor que favorece la formación de tumores y la progresión del

cáncer (Wang D y DuBois R N, 2015). Este entorno inmunosupresor permite a las células tumorales evadir la inmunovigilancia del anfitrión favoreciendo el crecimiento tumoral, su progresión y difusión. Un ejemplo de esto lo encontramos en los mediadores proinflamatorios IL-6 e PGE2, los cuales estimulan la iniciación del proceso tumoral mediante el silenciamiento de la supresión tumoral y/o la reparación de genes por medio de la inducción de la metilación del DNA. Asimismo, el factor de transcripción NF-kB activa la vía de señalización del Wnt ligada a procesos de iniciación tumorales (Schwitalla S y cols., 2013).

En conclusión, sería necesario un futuro estudio de las propiedades ADME-tox del compuesto 4, para poder iniciar el proceso que transforme el *hit* en un *lead*. Aunque por supuesto queda mucho camino por recorrer hasta que el compuesto 4 pudiera pasar a la fase de ensayo clínico, los resultados han confirmado plenamente que la TM es una metodología muy eficaz en la búsqueda de nuevos compuestos cabeza de serie potencialmente eficaces como agentes quimiopreventivos frente al cáncer.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. Se han elaborado modelos matemáticos QSAR que relacionan la actividad inhibitoria de distintos compuestos de las vías de señalización celular PI3K/Akt/mTOR y Wnt/ β -catenina, con sus descriptores topológicos. En general, los modelos obtenidos resultaron significativos estadísticamente y presentaron una buena capacidad predictiva.
2. Estos modelos se usaron para rastrear la base de datos Specs, constituida por aproximadamente 280.000 moléculas, y de este modo identificar nuevos *hits* y *leads* inhibidores de las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR y Wnt/ β -catenina. Resultado de esta búsqueda fue la selección de seis compuestos, uno de ellos de origen natural, que pasaron a ensayos experimentales para confirmar su actividad farmacológica.
3. Los compuestos 4 y 6, derivados de tipo tiazolpirimidinona e indólico, respectivamente, inhibieron sustancialmente el crecimiento de dos líneas celulares humanas tumorales (HT-29 and PC3). Estos compuestos, tal y como los modelos predijeron, fueron capaces de inhibir las vías de señalización de la Wnt/ β -catenin y de la PI3K/Akt/mTOR. Además también inhibieron significativamente la activación de la ciclina D1, responsable de la progresión del ciclo celular.

4. La disponibilidad del compuesto 4 permitió su ensayo *in vivo* en un modelo de CCR asociado a CU inducida por AOM/DSS. A pesar de su notable efecto antiinflamatorio en un modelo de CU inducida por DSS, el producto no pudo detener la aparición de tumores de colon a la dosis utilizada (30 mg/kg), a pesar de que disminuyó el número y tamaño de los mismos.
5. Sobre la base de los modelos matemáticos, los resultados experimentales se han discutido en términos de relación estructura-actividad, demostrándose que factores tales como moléculas altamente conjugadas que incluyan anillos condensados tipo 6/5, presencia de dadores de hidrógeno, de grupos que estabilizan por resonancia (aceptores y dadores de electrones p), entre otros, juegan un papel relevante en la actividad.
6. Los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* permite refinar los modelos, de modo que, por ejemplo, se podría optimizar la predicción de los valores de CI_{50} para inhibidores de las vías de señalización estudiadas.
7. Finalmente, este trabajo es un claro exponente de la eficacia del desarrollo de los proyectos colaborativos interdisciplinarios, en este caso farmacología-diseño molecular. Ello queda manifiestamente demostrado por la obtención de al menos dos nuevos compuestos cabeza de serie con notable actividad *in vitro* e *in vivo* que, siguiendo los mecanismos previstos, podrían constituirse en un futuro como nuevos fármacos protectores frente al cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

Abdullah, M., Rani, A. A., Sudoyo, A. W., Makmun, D., Handjari, D. R., & Hernowo, B. S. (2013). Expression of NF- κ B and COX2 in colorectal cancer among native Indonesians: The role of inflammation in colorectal carcinogenesis. *Acta Med Indones*, 45(3), 187-192.

Agani, F., & Jiang, B. (2013). Oxygen-independent regulation of HIF-1: Novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 13(3), 245-251.

Aggarwal, B. B., Takada, Y., & Oommen, O. V. (2004). From chemoprevention to chemotherapy: Common targets and common goals. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 13(10), 1327-1338.

Aguiar-Pulido, V., Munteanu, C. R., Seoane, J. A., Fernández-Blanco, E., Pérez-Montoto, L. G., González-Díaz, H., & Dorado, J. (2012). Naïve bayes QSDR classification based on spiral-graph shannon entropies for protein biomarkers in human colon cancer. *Molecular BioSystems*, 8(6), 1716-1722.

Ajmani, S., Agrawal, A., & Kulkarni, S. A. (2010). A comprehensive structure-activity analysis of protein kinase B-alpha (Akt1) inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 28(7), 683-694.

Akin, H., & Tozun, N. (2014). Diet, microbiota, and colorectal cancer. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 48 Suppl 1, S67-9. doi:10.1097/MCG.0000000000000252.

Alexanderson, G. (2006). About the cover: Euler and Königsberg's bridges: A historical view. *Bulletin of the American Mathematical Society*, 43(4), 567-573.

Ali, A. Y., Farrand, L., Kim, J. Y., Im-Aram, A., Byun, S., Leung, E. L., . . . Tsang, B. K. (2014). New perspectives in chemoresistant ovarian cancer. *Section Title: Pharmacology*, 285-316.

Anastas, J. N., & Moon, R. T. (2013). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(1), 11-26.

Aneesh, T., Belzik, N., Nisha, A., Resiya, S., Silvipriya, K., Asha, M., & Sonu, J. (2010). A tool in chemical synthesis: Combinatorial library design. *Inventi Impact: Med Chem*.

Anitha, P., Priyadarsini, R. V., Kavitha, K., Thiagarajan, P., & Nagini, S. (2013). Ellagic acid coordinately attenuates wnt/ β -catenin and NF- κ B signaling pathways to induce intrinsic apoptosis in an animal model of oral oncogenesis. *European Journal of Nutrition*, 52(1), 75-84.

Anton-Fos, G. M., Garcia-Domenech, R., Perez-Gimenez, F., Peris-Ribera, J. E., Garcia-March, F. J., & Salabert-Salvador, M. T. (1994). Pharmacological studies of the two new hypoglycaemic compounds 4-(3-methyl-5-oxo-2-pyrazolin-1-yl)benzoic acid and 1-(mesitylen-2-sulfonyl)-1H-1,2,4-triazole. *Arzneimittel-Forschung*, 44(7), 821-826.

Antony, L., van der Schoor, F., Dalrymple, S. L., & Isaacs, J. T. (2014). Androgen receptor (AR) suppresses normal human prostate epithelial cell proliferation via AR/ β -catenin/TCF-4 complex inhibition of c-MYC transcription. *The Prostate*, 74(11), 1118-1131.

Arend, R. C., Londoño-Joshi, A. I., Straughn, J. M., & Buchsbaum, D. J. (2013). The wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: A review. *Gynecologic Oncology*, 131(3), 772-779.

Arensman, M. D., Kovochich, A. N., Kulikauskas, R. M., Lay, A. R., Yang, P., Li, X., . . . Chien, A. J. (2014). WNT7B mediates autocrine wnt/ β -catenin signaling and anchorage-independent growth in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*, 33(7), 899-908.

Arribas, B., Rodríguez-Cabezas, M., Camuesco, D., Comalada, M., Bailón, E., Utrilla, P., . . . Gálvez, J. (2009). A probiotic strain of escherichia coli, nissle 1917, given orally exerts local and systemic anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *British Journal of Pharmacology*, 157(6), 1024-1033.

Atreya, R., & Neurath, M. F. (2005). Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 28(3), 187-195.

- Bacilieri, M., & Moro, S. (2006). Ligand-based drug design methodologies in drug discovery process: An overview. *Current Drug Discovery Technologies*, 3(3), 155-165.
- Bajer, M. M., Kunze, M. M., Bles, J. S., Bokesch, H. R., Chen, H., Brauß, T. F., . . . Henrich, C. J. (2014). Characterization of pomiferin triacetate as a novel mTOR and translation inhibitor. *Biochemical Pharmacology*, 88(3), 313-321.
- Bajorath, J. (2002). Integration of virtual and high-throughput screening. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(11), 882-894.
- Banumathy, G., & Cairns, P. (2010). Signaling pathways in renal cell carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, 10(7), 658-664.
- Barril, X., & Luque, F. J. (2012). Molecular simulation methods in drug discovery: A prospective outlook. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(1), 81-86.
- Basak, S. C. (2011). Role of mathematical chemodescriptors and proteomics-based biodescriptors in drug discovery. *Drug Development Research*, 72(2), 225-233.
- Basak, S. C., Niemi, G. J., & Veith, G. D. (1990). A graph-theoretic approach to predicting molecular properties. *Mathematical and Computer Modelling*, 14, 511-516.
- Baskar, A. A., Ignacimuthu, S., Paulraj, G. M., & Al Numair, K. S. (2010). Chemopreventive potential of beta-sitosterol in experimental colon cancer model—an in vitro and in vivo study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, (1)24.
- Bauer, T. M., Patel, M. R., & Infante, J. R. (2015). Targeting PI3 kinase in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 146, 53-60. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.09.006
- Baumann, K. (2003). Cross-validation as the objective function for variable-selection techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(6), 395-406.
- Baumann, K., & Stiefl, N. (2004). Validation tools for variable subset regression. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 18(7-9), 549-562.
- Behari, J., Zeng, G., Otruba, W., Thompson, M. D., Muller, P., Micsenyi, A., . . . Monga, S. P. (2007). R-etodolac decreases β -catenin levels along with survival and proliferation of hepatoma cells. *Journal of Hepatology*, 46(5), 849-857.

Belpomme, D., Irigaray, P., Hardell, L., Clapp, R., Montagnier, L., Epstein, S., & Sasco, A. J. (2007). The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environmental Research*, *105*(3), 414-429.

Bielska, E., Lucas, X., Czerwoniec, A., Kasprzak, J. M., Kaminska, K. H., & Bujnicki, J. M. (2011). Virtual screening strategies in drug design—methods and applications. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, *92*(3).

Bienz, M., & Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to wnt signaling. *Cell*, *103*(2), 311-320.

Bilir, B., Kucuk, O., & Moreno, C. S. (2013). Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Journal of Translational Medicine*, *11*(1), 280.

Blachly, J. S., & Baiocchi, R. A. (2014). Targeting PI3-kinase (PI3K), AKT and mTOR axis in lymphoma. *British Journal of Haematology*, *167*(1), 19-32.

Blagodatski, A., Poteryaev, D., & Katanaev, V. (2014). Targeting the wnt pathways for therapies. *Mol Cell Ther*, *2*, 28.

Blum, C. A., Xu, M., Orner, G. A., Fong, A. T., Bailey, G. S., Stoner, G. D., . . . Dashwood, R. H. (2001). Beta-catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis*, *22*(2), 315-320.

Böckmann, S., & Nebe, B. (2003). The in vitro effects of H-89, a specific inhibitor of protein kinase A, in the human colonic carcinoma cell line caco-2. *European Journal of Cancer Prevention*, *12*(6), 469-478.

Bogner, S., Furnstahl, R., Ramanan, S., & Schwenk, A. (2006). Convergence of the born series with low-momentum interactions. *Nuclear Physics A*, *773*(3), 203-220.

Bonchev, D. (2001). The overall wiener index A new tool for characterization of molecular topology. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, *41*(3), 582-592.

Borhani, D. W., & Shaw, D. E. (2012). The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(1), 15-26.

Brown, J. B., Lee, G., Managlia, E., Grimm, G. R., Dirisina, R., Goretsky, T., . . . Yang, G. (2010). Mesalamine inhibits epithelial β -catenin activation in chronic ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 138(2), 595-605. e3.

Buitrago, C. G., Arango, N. S., & Boland, R. L. (2012). $1\alpha, 25$ (OH) $2D_3$ -dependent modulation of akt in proliferating and differentiating C2C12 skeletal muscle cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(4), 1170-1181.

Burnett, M. N., & Gakh, A. A. (2009). CINF 43-application of the modular chemical descriptor language (MCDL) methodology to SAR and QSAR in prostate cancer chemotherapy. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, , 238.

Canter, R. J., Kesmodel, S. B., Heitjan, D. F., Veeramachaneni, N. K., Mokadam, N. A., Drebin, J. A., & Fraker, D. L. (2005). Suppression of β -catenin by antisense oligomers augments tumor response to isolated limb perfusion in a rodent model of adenomatous polyposis Coli–Mutant colon cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 12(9), 733-742.

Caputo, J. F., & Cook, K. J. (1989). A graph-theoretical approach to the prediction of physical properties of alkanes based on the distance matrix. *Pharmaceutical Research*, 6(9), 809-812.

Casabán-Ros, E., Antón-Fos, G., Gálvez, J., Duart, M., & García-Doménech, R. (1999). Search for new antihistaminic compounds by molecular connectivity. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 18(1), 35-42.

Cassier, P., Pissaloux, D., Alberti, L., Ray-Coquard, I., & Blay, J. Y. (2010). Targeted treatment of rare connective tissue tumors and sarcomas. [Traitements cibles des sarcomes et des tumeurs conjonctives rares] *Bulletin Du Cancer*, 97(6), 693-700. doi:10.1684/bdc.2010.1115.

Cayley, P. (1878). Desiderata and suggestions: No. 1. the theory of groups. *American Journal of Mathematics*, 1(1), 50-52.

Cercós-DEL-POZO, R., Pérez-Giménez, F., Gálvez-Alvarez, J., Salabert-Salvador, M., Garcia-March, F., & Antón-Fos, G. (1996). Correlation of pharmacological

properties of a group of hypolipaeamic drugs by molecular topology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48(3), 240-244.

Cerda, J., & Cifuentes, L. (2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Revista Chilena De Infectología*, 29(2), 138-141.

Chen, B., Zhang, Z., Liu, Z., Zhao, Q., Jiang, K., Yang, K., ... Zhao, Y. (2012) EGCG inhibited the proliferation of NP69-LMP1 cells through Wnt1- β -catenin pathway. *Xiandai Shengwuyixue Jinzhan*, 12(36), 7034-7039.

Chen, G., A, J., Wang, M., Farley, S., Lee, L. Y., Lee, L. C., & Sawicki, M. P. (2008). Menin promotes the wnt signaling pathway in pancreatic endocrine cells. *Molecular Cancer Research : MCR*, 6(12), 1894-1907. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-2206.

Chen, L., Morrow, J. K., Tran, H. T., Phatak, S. S., Du-Cuny, L., & Zhang, S. (2012). From laptop to benchtop to bedside: Structure-based drug design on protein targets. *Current Pharmaceutical Design*, 18(9), 1217-1239. doi:CPD-EPUB-20120203-005 [pii]

Chen, M., Liu, T., & Guo, G. (2013). Wnt/ β -catenin signaling pathway and brain glioma. *Guoji Zhongliuxue Zazhi*, 40(9), 668-670. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2013.09.009

Chen, R. H., Ding, W. V., & McCormick, F. (2000). Wnt signaling to beta-catenin involves two interactive components. glycogen synthase kinase-3beta inhibition and activation of protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17894-17899. doi:10.1074/jbc.M905336199 [doi]

Chen, W., Huang, Y., Yang, M., Lee, C., Chen, C., Yeh, C., . . . Kuan, Y. (2014). Protective effect of rutin on LPS-induced acute lung injury via down-regulation of MIP-2 expression and MMP-9 activation through inhibition of akt phosphorylation. *International Immunopharmacology*, 22(2), 409-413.

Cheng, H., Shcherba, M., Pendurti, G., Liang, Y., Piperdi, B., & Perez-Soler, R. (2014). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway: Potential for lung cancer treatment. *Lung Cancer Management*, 3(1), 67-75.

Chinni, S. R., Li, Y., Upadhyay, S., Koppolu, P. K., & Sarkar, F. H. (2001). Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in

prostate cancer cells. *Oncogene*, 20(23), 2927-2936. doi:10.1038/sj.onc.1204365.

Choi, H., Gwak, J., Cho, M., Ryu, M., Lee, J., Kim, S. K., . . . Cuong, N. M. (2010). Murrayafoline A attenuates the wnt/ β -catenin pathway by promoting the degradation of intracellular β -catenin proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(1), 915-920.

Choi, J., Jiang, X., Jeong, J. B., & Lee, S. (2014). Anticancer activity of protocatechualdehyde in human breast cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, 17(8), 842-848.

Choo, E. J., Rhee, Y., Jeong, S., Lee, H., Kim, H. S., Ko, H. S., . . . Kim, J. H. (2011). Anethole exerts antimetastatic activity via inhibition of matrix metalloproteinase 2/9 and AKT/mitogen-activated kinase/nuclear factor kappa B signaling pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(1), 41-46.

Chung, M., Lai, H., Sytwu, H., Yan, M., Shih, Y., Chang, C., . . . Lin, Y. (2009). SFRP1 and SFRP2 suppress the transformation and invasion abilities of cervical cancer cells through wnt signal pathway. *Gynecologic Oncology*, 112(3), 646-653.

Clapper, M. L., Cooper, H. S., & CHANG, W. L. (2007). Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: A promising model for the development of chemopreventive interventions1. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(9), 1450-1459.

Clapper, M. L., Coudry, J., & Chang, W. L. (2004). β -Catenin-mediated signaling: A molecular target for early chemopreventive intervention. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 555(1), 97-105.

Clevers, H. (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469-480.

Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073-1081. doi:10.1093/carcin/bgp127 [doi]

Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., & Sedergran, D. J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 69(2), 238-249.

Cover, T. M. (1998). Comments on broadcast channels. *IEEE Transactions on Information Theory*, 44(6), 2524-2530.

Cui, J., Jiang, W., Wang, S., Wang, L., & Xie, K. (2012). Role of wnt/ β -catenin signaling in drug resistance of pancreatic cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 18(17), 2464-2471.

Cui, L., Jia, X., Zhou, Q., Zhai, X., Zhou, Y., & Zhu, H. (2014). Curcumin affects β -catenin pathway in hepatic stellate cell in vitro and in vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(11), 1615-1622.

Cui, Y., & Li, C. (2013). Relationship between wnt/ β -catenin signaling pathway and pancreatic cancer. *Zhongliu Yanjiu Yu Linchuang*, 25(12), 856-858. doi:10.3760/cma.j.issn.1006-9801.2013.12.023

Cunningham, M. J. (2000). Genomics and proteomics: The new millennium of drug discovery and development. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(1), 291-300.

de Julián-Ortiz, J. V., Gálvez, J., Muñoz-Collado, C., García-Domenech, R., & Gimeno-Cardona, C. (1999). Virtual combinatorial syntheses and computational screening of new potential anti-herpes compounds 1. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(17), 3308-3314.

De Risi, V. (2007). Geometry and monadology. *Leibniz's Analysis Situs and Philosophy of Space*.

de Sousa, E. M., Vermeulen, L., Richel, D., & Medema, J. P. (2011). Targeting wnt signaling in colon cancer stem cells. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(4), 647-653. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1204.

Deeb, D., Gao, X., Liu, Y. B., Pindolia, K., & Gautam, S. C. (2014). Pristimerin, a quinonemethide triterpenoid, induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the inhibition of pro-survival Akt/NF- κ B/mTOR signaling proteins and anti-apoptotic bcl-2. *International Journal of Oncology*, 44(5), 1707-1715.

Dehnhardt, C. M., Venkatesan, A. M., Chen, Z., Ayrál-Kaloustian, S., Dos Santos, O., Delos Santos, E., . . . Lucas, J. (2009). Design and synthesis of novel diaminoquinazolines with in vivo efficacy for β -catenin/T-cell transcriptional factor 4 pathway inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(2), 897-910.

del Estado, B. O. (2013). Real decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial Del Estado*, 34, 11370-11421.

Dellinger, T. H., Planutis, K., Tewari, K. S., & Holcombe, R. F. (2012). Role of canonical wnt signaling in endometrial carcinogenesis. *51*, 62.

Deng, J., Miller, S. A., Wang, H., Xia, W., Wen, Y., Zhou, B. P., . . . Hung, M. (2002). β -Catenin interacts with and inhibits NF- κ B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell*, 2(4), 323-334.

Deo, N. (2004). *Graph theory with applications to engineering and computer science* PHI Learning Pvt. Ltd.

De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M. L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., . . . Fazio, V. M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of Carcinogenesis*, 10, 9-3163.78279. doi:10.4103/1477-3163.78279

Devillers, J. (1996). *Neural networks in QSAR and drug design* Academic Press.

Dihlmann, S., & von Knebel Doeberitz, M. (2005). Wnt/ β -catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. *International Journal of Cancer*, 113(4), 515-524.

Dihlmann, S., Klein, S., & Doeberitz Mv, M. (2003). Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(6), 509-516.

Do, M. T., Kim, H. G., Choi, J. H., Khanal, T., Park, B. H., Tran, T. P., . . . Jeong, H. G. (2013). Antitumor efficacy of piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. *Food Chemistry*, 141(3), 2591-2599.

Dong, P., Konno, Y., Watari, H., Hosaka, M., Noguchi, M., & Sakuragi, N. (2014). The impact of microRNA-mediated PI3K/AKT signaling on epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness in endometrial cancer. *Journal of Translational Medicine*, 12, 231-014-0231-0. doi:10.1186/s12967-014-0231-0 [doi]

Dong, G., Lee, S. Y., Zhao, H., Lee, Y., Jeong, J. H., Jeon, R., . . . Ryu, J. (2015). Diarylheptanoids from lesser galangal suppress human colon cancer cell growth

through modulating wnt/ β -catenin pathway. *Journal of Functional Foods*, 18, 47-57.

Duan, L., Ying, G., Danzer, B., Perez, R. E., Shariat-Madar, Z., Levenson, V. V., & Maki, C. G. (2014). The prolyl peptidases PRCP/PREP regulate IRS-1 stability critical for rapamycin-induced feedback activation of PI3K and AKT. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(31), 21694-21705. doi:10.1074/jbc.M114.550038 [doi]

Du-Cuny, L., Song, Z., Moses, S., Powis, G., Mash, E. A., Meuillet, E. J., & Zhang, S. (2009). Computational modeling of novel inhibitors targeting the akt pleckstrin homology domain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(19), 6983-6992.

Dudek, A. Z., Griffin, R., Nelson, C. M., Gandhi, L., Terai, K., Ugaz, E., & Gálvez, J. (2005). Preclinical evaluation of MT103, a postulated novel protein kinase C modulator: Validation of drug discovery method based on molecular topology. *Cancer Research*, 65(9 Supplement), 933-933.

Dung, T. T. M., Kim, S. C., Yoo, B. C., Sung, G., Yang, W. S., Kim, H. G., . . . Yoon, K. (2014). (5-hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-yl) methyl 6-hydroxynaphthalene-2-carboxylate, a kojic acid derivative, inhibits inflammatory mediator production via the suppression of Syk/Src and NF- κ B activation. *International Immunopharmacology*, 20(1), 37-45.

Edlind, M. P., & Hsieh, A. C. (2014). PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian Journal of Andrology*, 16(3), 378-386. doi:10.4103/1008-682X.122876 [doi]

Edwards, S. W., & Swan, T. (1986). Regulation of superoxide generation by myeloperoxidase during the respiratory burst of human neutrophils. *Biochem.J*, 237, 601-604.

El Wakil, A., & Lalli, E. (2011). The Wnt/ β -catenin pathway in adrenocortical development and cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 332(1), 32-37.

Elinav, E., Nowarski, R., Thaiss, C. A., Hu, B., Jin, C., & Flavell, R. A. (2013). Inflammation-induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nature Reviews Cancer*, 13(11), 759-771.

Elisa Buitrago-Molina, L., & Vogel, A. (2012). mTor as a potential target for the prevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Current Cancer Drug Targets*, 12(9), 1045-1061.

Elisa Buitrago-Molina, L., & Vogel, A. (2012). mTor as a potential target for the prevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Current Cancer Drug Targets*, 12(9), 1045-1061.

Esmaeili, M. A., & Farimani, M. M. (2014). Inactivation of PI3K/Akt pathway and upregulation of PTEN gene are involved in daucosterol, isolated from *salvia sahendica*, induced apoptosis in human breast adenocarcinoma cells. *South African Journal of Botany*, 93, 37-47.

Fan, Y., Mao, R., & Yang, J. (2013). NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein & Cell*, 4(3), 176-185.

Fei, J., Zhou, L., Liu, T., & Tang, X. Y. (2013). Pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies for discovery of novel Akt2 inhibitors. *International Journal of Medical Sciences*, 10(3), 265-275. doi:10.7150/ijms.5344.

Fila, C., Metz, C., & van der Sluijs, P. (2008). Juglone inactivates cysteine-rich proteins required for progression through mitosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21714-21724. doi:10.1074/jbc.M710264200 [doi]

Fillon, M. (2012). Preliminary insights on the role of inflammation in cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(17), 1275-1276. doi:10.1093/jnci/djs386 [doi]

Fodde, R., & Brabletz, T. (2007). Wnt/ β -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), 150-158.

Forino, M., Jung, D., Easton, J. B., Houghton, P. J., & Pellecchia, M. (2005). Virtual docking approaches to protein kinase B inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(7), 2278-2281.

Francipane, M. G., & Lagasse, E. (2014). mTOR pathway in colorectal cancer: An update. *Oncotarget*, 5(1), 49.

Fu, Y., Chang, H., Peng, X., Bai, Q., Yi, L., Zhou, Y., . . . Mi, M. (2014). Resveratrol inhibits breast cancer stem-like cells and induces autophagy via suppressing wnt/ β -catenin signaling pathway. *PLoS One*, 9(7), e102535.

Furnival, G. M. (1971). All possible regressions with less computation. *Technometrics*, 13(2), 403-408.

Gadgeel, S. M., & Wozniak, A. (2013). Preclinical rationale for PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors as therapy for epidermal growth factor receptor inhibitor-resistant Non-Small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, 14(4), 322-332.

Gakh, A. A., Gakh, E. G., Sumpter, B. G., & Noid, D. W. (1994). Neural network-graph theory approach to the prediction of the physical properties of organic compounds. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 34(4), 832-839.

Gálvez, J., Gálvez-Llompart, M., & Garcia-Domenech, R. (2012). Introduction to molecular topology: Basic concepts and application to drug design. *Current Computer-Aided Drug Design*, 8(3), 196-223.

Gálvez, J., Gálvez-Llompart, M., & García-Domenech, R. (2012). Molecular topology as a novel approach for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(2), 133-153.

Gálvez, J., Garcia, R., Salabert, M., & Soler, R. (1994). Charge indexes. new topological descriptors. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 34(3), 520-525.

Gálvez, J., García-Domenech, R., de Gregorio Alapont, C., de Julián-Ortiz, J., & Popa, L. (1996). Pharmacological distribution diagrams: A tool for de novo drug design. *Journal of Molecular Graphics*, 14(5), 272-276.

Gálvez, J., Garcia-Domenech, R., de Julian-Ortiz, J. V., & Soler, R. (1995). Topological approach to drug design. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 35(2), 272-284.

Gálvez, J., Garcia-Domenech, R., De Julian-Ortiz, V., & Soler, R. (1994). Topological approach to analgesia. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 34(5), 1198-1203.

Gálvez, J., García-Domenech, R., García-March, F., Moliner-Llusar, R. (1991). Derivados del 1-(2,4 dimetil)fenil etanona. Compuestos con aplicaciones farmacológicas por su actividad analgésica y antiinflamatoria. *Número de solicitud: 9101134*

Gálvez, J., García-Domenech, R., García-March, F., Moliner-Llusar, R. (1991). Derivados del 2-(1-propenil) fenol. Compuestos con aplicaciones farmacológicas por su actividad analgésica y antiinflamatoria. *Número de solicitud: 9101034*

Gálvez, J., Gomez-Lechón, M., García-Domenech, R., & Castell, J. (1996). New cytostatic agents obtained by molecular topology. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6(19), 2301-2306.

Gálvez, J., Llompart, J., Land, D., & Pasinetti, G. (2010). Compositions for treatment of Alzheimer's disease using abeta-reducing and/or abeta-anti-aggregation compounds. *Mount Sinai School of Medicine of New York University, USA, Inc Medisyn Technologies, Editors. Patent Application Country: Application: WO.*

Gálvez, J., Llompart, J., Land, D., Pasinetti, G. (2010). Compositions for treatment of alzheimer's disease using β -reducing and/or β -anti-aggregation compounds. *PCT Int Appl. 2010-US1041; 2009-61211821: 184.*

Gálvez, J., Llompart, J., Pal, K. (2004). N,N-dicyclohexyl-(1S)-isoborneol-10-sulfonamide (MT103) and related compounds for the treatment of cancer. *US Pat Appl Publ. 2004;2004-836638; 2002-251616: 39.*

Gálvez-Llompart, M., Iglesias, María del Carmen Recio, Gálvez, J., & García-Domenech, R. (2013). Novel potential agents for ulcerative colitis by molecular topology: Suppression of IL-6 production in caco-2 and RAW 264.7 cell lines. *Molecular Diversity*, 17(3), 573-593.

Gálvez-Llompart, M., Zanni, R., & García-Domenech, R. (2011). Modeling natural anti-inflammatory compounds by molecular topology. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 9481-9503.

Gálvez-Llompart, M., Zanni, R., Romualdi, P., & García-Domenech, R. (2013). Selection of nutraceutical compounds as COX inhibitors by molecular topology. *Medicinal Chemistry Research*, 22(7), 3466-3477.

Gao, N., Zhang, Z., Jiang, B., & Shi, X. (2003). Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(4), 1124-1132.

García-Domenech, R., Gálvez, J., de Julián-Ortiz, J. V., & Pogliani, L. (2008). Some new trends in chemical graph theory. *Chemical Reviews*, 108(3), 1127-1169.

García-Domenech, R., Gálvez-Llompart, M., Zanni, R., Recio, M. C., & Gálvez, J. (2013). QSAR methods for the discovery of new inflammatory bowel disease drugs. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8(8), 933-949.

García-Domenech, R., García-March, F., Soler, R., Gálvez, J., Antón-Fos, G., & Julián-Ortiz, D. (1996). New analgesics designed by molecular topology. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 15(3), 201-207.

García-Echeverría, C., & Sellers, W. (2008). Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene*, 27(41), 5511-5526.

García-Echeverría, C., & Sellers, W. (2008). Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene*, 27(41), 5511-5526.

Gardner, S., Hawcroft, G., & Hull, M. (2004). Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on β -catenin protein levels and catenin-related transcription in human colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer*, 91(1), 153-163.

Ge, H., Wang, Y., Li, C., Chen, N., Xie, Y., Xu, M., . . . Gu, Q. (2013). Molecular dynamics-based virtual screening: Accelerating the drug discovery process by high-performance computing. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(10), 2757-2764.

Georgakis, G. V., & Younes, A. (2006). From rapamycin to rapamycin: Targeting PI3K/Akt/mTOR for cancer therapy, 131-140.

Giner, E., Andújar, I., Recio, M. C., Ríos, J. L., Cerdá-Nicolás, J. M., & Giner, R. M. (2011). Oleuropein ameliorates acute colitis in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12882-12892.

Giner, E., Recio, M., Ríos, J., & Giner, R. (2013). Oleuropein protects against dextran sodium sulfate-induced chronic colitis in mice. *Journal of Natural Products*, 76(6), 1113-1120.

Giner, E., Recio, M. C., Ríos, J. L., Cerdá-Nicolás, J. M., Giner, R. M. (2015). Chemopreventive effect of oleuropein in colitis-associated colorectal cancer in C57BL/6 mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 10.1002/mnfr.201500605 [doi].

Gramatica, P. (2007). Principles of QSAR models validation: Internal and external. *QSAR & Combinatorial Science*, 26(5), 694-701.

Gravina, G. L., Mancini, A., Scarsella, L., Colapietro, A., Jitariuc, A., Vitale, F., . . . Festuccia, C. (2015). Dual PI3K/mTOR inhibitor, XL765 (SAR245409), shows superior effects to sole PI3K [XL147 (SAR245408)] or mTOR [rapamycin] inhibition in prostate cancer cell models. *Tumor Biology*, , 1-11.

Greenspan, E. J., Madigan, J. P., Boardman, L. A., & Rosenberg, D. W. (2011). Ibuprofen inhibits activation of nuclear {beta}-catenin in human colon adenomas and induces the phosphorylation of GSK-3{beta}. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 4(1), 161-171. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0021 [doi]

Grivennikov, S. I. (2013). Inflammation and colorectal cancer: Colitis-associated neoplasia. *Seminars in Immunopathology*, , 35(2) 229-244.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.

Grossi, V., Peserico, A., Tezil, T., & Simone, C. (2014). p38 α MAPK pathway: A key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(29), 9744.

Gupta, M., Dureja, H., & Madan, A. K. (2011). Models for the prediction of receptor tyrosine kinase inhibitory activity of substituted 3-aminoindazole analogues. *Scientia Pharmaceutica*, 79(2), 239-257. doi:10.3797/scipharm.1102-08.

Gutman, I., Trinajstić, N., & Wilcox Jr, C. (1975). Graph theory and molecular orbitals. XII. acyclic polyenes. *The Journal of Chemical Physics*, 62(9), 3399-3405.

Hadjipavlou-Litina, D. (2000). Quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies on non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Current Medicinal Chemistry*, 7(4), 375-388.

Haegeler, L., Ingold, B., Naumann, H., Tabatabai, G., Ledermann, B., & Brandner, S. (2003). Wnt signalling inhibits neural differentiation of embryonic stem cells by controlling bone morphogenetic protein expression. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(3), 696-708.

Hajduk, P. J., & Greer, J. (2007). A decade of fragment-based drug design: Strategic advances and lessons learned. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(3), 211-219.

Hall, L. H., & Kier, L. B. (2001). Issues in representation of molecular structure: The development of molecular connectivity. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 20(1), 4-18.

Hallett, R. M., Kondratyev, M. K., Giacomelli, A. O., Nixon, A. M., Girgis-Gabardo, A., Ilieva, D., & Hassell, J. A. (2012). Small molecule antagonists of the

Wnt/beta-catenin signaling pathway target breast tumor-initiating cells in a Her2/Neu mouse model of breast cancer. *PLoS One*, 7(3), e33976.

Hamel, L. (2009). *Model Assessment with ROC Curves*. 1316-1323.

Han, A., Song, Z., Tong, C., Hu, D., Bi, X., Augenlicht, L. H., & Yang, W. (2008). Sulindac suppresses β -catenin expression in human cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 583(1), 26-31.

Han, J., & Na, K. Wnt/ β -catenin signaling pathway in canine skin melanoma and a possibility as a cancer model for human skin melanoma.

Hansch, C. (1978). Recent advances in biochemical QSAR. *Correlation analysis in chemistry* (pp. 397-438) Springer.

Hara, A., Sakata, K., Yamada, Y., Kuno, T., Kitaori, N., Oyama, T., . . . Mori, H. (2005). Suppression of β -catenin mutation by dietary exposure of auraptene, a citrus antioxidant, in N, N-diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinomas in rats. *Oncology Reports*, 14(2), 345-351.

Hartenfeller, M., & Schneider, G. (2011). De novo drug design. *Chemoinformatics and computational chemical biology* (pp. 299-323) Springer.

Hayes, M. P., & Ellenson, L. H. (2010). Molecular alterations in uterine serous carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 116(2), 286-289.

Heydemann, M. (1997). *Cayley graphs and interconnection networks* Springer.

Hill, T., & Lewicki, P. (2006). *Statistics: Methods and applications: A comprehensive reference for science, industry, and data mining* StatSoft, Inc.

Hosford, S. R., & Miller, T. W. (2014). Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4/6, src, JAK/STAT, PARP, HDAC, and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 7, 203.

Hosoya, H. (1971). Topological index. A newly proposed quantity characterizing the topological nature of structural isomers of saturated hydrocarbons. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 44(9), 2332-2339.

Hou, L., Li, Y., Song, H., Zhang, Z., Sun, Y., Zhang, X., & Wu, K. (2015). Protective macroautophagy is involved in vitamin E succinate effects on human gastric carcinoma cell line SGC-7901 by inhibiting mTOR axis phosphorylation. *PLoS One*, 10(7), e0132829.

Houédé, N., & Pourquier, P. (2015). Targeting the genetic alterations of the PI3K–AKT–mTOR pathway: Its potential use in the treatment of bladder cancers. *Pharmacology & Therapeutics*, *145*, 1-18.

Hu, C., Solomon, V. R., Ulibarri, G., & Lee, H. (2008). The efficacy and selectivity of tumor cell killing by akt inhibitors are substantially increased by chloroquine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *16*(17), 7888-7893.

Huang, B. Y., Cao, L. Y., & Fu, X. G. (2012). Effects of tanshinone IIA on Wnt/beta-catenin signaling pathway of high glucose induced renal tubular epithelial cell transdifferentiation. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi = Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine / Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Xue Hui, Zhongguo Zhong Yi Yan Jiu Yuan Zhu Ban*, *32*(7), 965-969.

Huang, L., Wong, C. C., Mackenzie, G. G., Sun, Y., Cheng, K. W., Vrankova, K., . . . Rigas, B. (2014). Phospho-aspirin (MDC-22) inhibits breast cancer in preclinical animal models: An effect mediated by EGFR inhibition, p53 acetylation and oxidative stress. *BMC Cancer*, *14*(1), 141.

Huang, M., Tang, S., Upadhyay, G., Marsh, J. L., Jackman, C. P., Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2014). Embelin suppresses growth of human pancreatic cancer xenografts, and pancreatic cancer cells isolated from KrasG12D mice by inhibiting akt and sonic hedgehog pathways. *PloS One*, *9*(4), e92161.

Hussain, K. A., Radhi, W. A., & Ismael, S. M. (2012). Quantitative structure-activity relationships (QSAR) study and improving it of some schiff-base ligands as anticancer for prostate cancer. *J.Chem.Pharm.Res*, *4*(3), 1702-1707.

Hwang, T., Wang, C., Kuo, Y., Huang, H., Wu, Y., Kuo, L., & Wu, Y. (2010). The hederagenin saponin SMG-1 is a natural FMLP receptor inhibitor that suppresses human neutrophil activation. *Biochemical Pharmacology*, *80*(8), 1190-1200.

Inestrosa, N. C., & Arenas, E. (2010). Emerging roles of wnts in the adult nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(2), 77-86.

Iwai, S., Yonekawa, A., Harada, C., Hamada, M., Katagiri, W., Nakazawa, M., & Yura, Y. (2010). Involvement of the wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, *37*(5), 1095-1103.

Jain, S. K., & Agrawal, A. (2004). De novo drug design: An overview. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(6), 721-728.

James, F. (2006). *Statistical methods in experimental physics* World Scientific Singapore.

Janice J, K., Md Sharif, S., Marcus M, M., & Waliul I, K. (2012). Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *Journal of Visualized Experiments*, (60) .

Jasinski, P., Welsh, B., Gálvez, J., Land, D., Zwolak, P., Ghandi, L., . . . Dudek, A. Z. (2008). A novel quinoline, MT477: Suppresses cell signaling through ras molecular pathway, inhibits PKC activity, and demonstrates in vivo anti-tumor activity against human carcinoma cell lines. *Investigational New Drugs*, 26(3), 223-232.

Jasinski, P., Zwolak, P., Terai, K., & Dudek, A. Z. (2008)*. Novel ras pathway inhibitor induces apoptosis and growth inhibition of K-ras-mutated cancer cells in vitro and in vivo. *Translational Research*, 152(5), 203-212.

Jasinski, P., Zwolak, P., Terai, K., Borja-Cacho, D., & Dudek, A. Z. (2011). PKC-alpha inhibitor MT477 slows tumor growth with minimal toxicity in in vivo model of non-ras-mutated cancer via induction of apoptosis. *Investigational New Drugs*, 29(1), 33-40.

Jasinski, P., Zwolak, P., Terai, K., Vogel, R. I., Borja-Cacho, D., & Dudek, A. Z. (2011)*. MT477 acts in tumor cells as an AURKA inhibitor and strongly induces NRF-2 signaling. *Anticancer Research*, 31(4), 1181-1187. doi:31/4/1181 [pii]

Jasinski, P., Zwolak, P., Vogel, R. I., Bodempudi, V., Terai, K., Gálvez, J., . . . Dudek, A. Z. (2011)[§]. MT103 inhibits tumor growth with minimal toxicity in murine model of lung carcinoma via induction of apoptosis. *Investigational New Drugs*, 29(5), 846-852.

Jayasooriya, Rajapaksha Gedara Prasad Tharanga, Dilshara, M. G., Park, S. R., Choi, Y. H., Hyun, J., Chang, W., & Kim, G. (2014). 18 β -glycyrrhetic acid suppresses TNF- α induced matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor by suppressing the akt-dependent NF- κ B pathway. *Toxicology in Vitro*, 28(5), 751-758.

Jeon, S. J., Seo, J. E., Yang, S., Choi, J. W., Wells, D., Shin, C. Y., & Ko, K. H. (2011). Cellular stress-induced up-regulation of FMRP promotes cell survival by

modulating PI3K-akt phosphorylation cascades. *Journal of Biomedical Science*, 18(1), 17-32.

Jia, D., Yang, W., Li, L., Liu, H., Tan, Y., Ooi, S., . . . Wang, L. (2015). β -Catenin and NF- κ B co-activation triggered by TLR3 stimulation facilitates stem cell-like phenotypes in breast cancer. *Cell Death & Differentiation*, 22(2), 298-310.

Jiang, C., & Wang, W. (2010). Relationship between wnt/ β -catenin signal pathway and carcinogenesis for esophageal adenocarcinoma. *Zhongliuxue Zazhi*, 16(5), 338-342.

Jiang, J., Li, J., Yunxia, Z., Zhu, H., Liu, J., & Pumill, C. (2013). The role of prostatitis in prostate cancer: Meta-analysis. *PloS One*, 8(12), e85179.

Jiang, S., Liang, Z., Wei, G., Liu, Y. (2012). Wnt/ β -catenin pathway regulating glucocorticoids-mediated Alzheimer's disease-like pathological changes. *Zhonghua Shenjingke Zazhi*, 45(7), 500-504.

Jin, K., Oh, Y. N., Hyun, S. K., Kwon, H. J., & Kim, B. W. (2014). Betulinic acid isolated from vitis amurensis root inhibits 3-isobutyl-1-methylxanthine induced melanogenesis via the regulation of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in B16F10 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 38-43.

Jin, X., Gossett, D., Wang, S., Yang, D., Cao, Y., Chen, J., . . . Lin, J. (2004). Inhibition of AKT survival pathway by a small molecule inhibitor in human endometrial cancer cells. *British Journal of Cancer*, 91(10), 1808-1812.

Jing, H., & Lee, S. (2014). NF-kappaB in cellular senescence and cancer treatment. *Molecules and Cells*, 37(3), 189-195. doi:10.14348/molcells.2014.2353.

Johnson, S. M., Gulhati, P., Rampy, B. A., Han, Y., Rychahou, P. G., Doan, H. Q., . . . Evers, B. M. (2010). Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *Journal of the American College of Surgeons*, 210(5), 767-776.

Joo, Y. N., Eun, S. Y., Park, S. W., Lee, J. H., Chang, K. C., & Kim, H. J. (2014). Honokiol inhibits U87MG human glioblastoma cell invasion through endothelial cells by regulating membrane permeability and the epithelial-mesenchymal transition. *International Journal of Oncology*, 44(1), 187-194.

Kahn, M. (2014). Can we safely target the WNT pathway? *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(7), 513-532.

Khan, S. A., & Bauman, J. E. (2014). The phosphatidyl-inositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway as a therapeutic target in head and neck cancer. *Clinical Investigation*, 4(12), 1123-1138.

Kapetanovic, I. (2008). Computer-aided drug discovery and development (CADD): In silico-chemico-biological approach. *Chemico-Biological Interactions*, 171(2), 165-176.

Katoh, M., & Katoh, M. (2007). WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(14), 4042-4045. doi:13/14/4042 [pii]

Kaur, J., & Sanyal, S. (2010). Oxidative stress and stress-signaling in chemoprevention of early colon cancer by diclofenac. *Am J Biomed Sci*, 2(1), 63-78.

Kaur, P., Shukla, S., & Gupta, S. (2008). Plant flavonoid apigenin inactivates akt to trigger apoptosis in human prostate cancer: An in vitro and in vivo study. *Carcinogenesis*, 29(11), 2210-2217. doi:10.1093/carcin/bgn201 [doi]

Kawabata, K., Murakami, A., & Ohigashi, H. (2006). Citrus auraptene targets translation of MMP-7 (matrilysin) via ERK1/2-dependent and mTOR-independent mechanism. *FEBS Letters*, 580(22), 5288-5294.

Kawauchi, K., Ogasawara, T., Yasuyama, M., Otsuka, K., & Yamada, O. (2009). Regulation and importance of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in hematologic malignancies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 9(9), 1024-1038.

Kaza, N. (2014). *Mechanisms of AT101 [(-)-gossypol] induced cytotoxicity in malignant peripheral nerve sheath tumors* (Doctoral dissertation, The University of Alabama at Birmingham).

Khasawneh, J., Schulz, M. D., Walch, A., Rozman, J., Hrabe de Angelis, M., Klingenspor, M., . . . Arkan, M. C. (2009). Inflammation and mitochondrial fatty acid beta-oxidation link obesity to early tumor promotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3354-3359. doi:10.1073/pnas.0802864106.

Khedkar, S. A., Malde, A. K., Coutinho, E. C., & Srivastava, S. (2007). Pharmacophore modeling in drug discovery and development: An overview. *Medicinal Chemistry*, 3(2), 187-197.

Kiehn, R. (2008). The non-equilibrium thermodynamic environment and Prigogine's dissipative structures.

Kier, L. (2012). *Molecular connectivity in chemistry and drug research* Elsevier.

Kier, L. B. (1985). A shape index from molecular graphs. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 4(3), 109-116.

Kier, L. B., & Hall, L. H. (1986). Molecular connectivity in structure-activity analysis. *Chemometrics Research Studies Press*.

Kier, L. B., & Hall, L. H. (1986). Molecular connectivity in structure-activity analysis.

Kier, L., & Hall, L. (1977). Nature of structure-activity-relationships and their relation to molecular connectivity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 12(4), 307-312.

Kirubakaran, P., & Karthikeyan, M. (2013). Pharmacophore modeling, 3D-QSAR and DFT studies of IWR small-molecule inhibitors of wnt response. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 33(5), 276-285.

Kim, D., & Eng, C. (2012). The promise of mTOR inhibitors in the treatment of colorectal cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(12), 1775-1788.

Kim, J., Kim, Y. H., Song, G., Kim, D., Jeong, Y., Liu, K., . . . Oh, S. (2014). Ursolic acid and its natural derivative corosolic acid suppress the proliferation of APC-mutated colon cancer cells through promotion of β -catenin degradation. *Food and Chemical Toxicology*, 67, 87-95.

Kim, K., Kim, N. D., & Seong, B. (2010). Pharmacophore-based virtual screening: A review of recent applications. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 5(3), 205-222.

Kim, W., Lee, Y., Jeong, S., Nam, J., Lee, S., & Jung, Y. (2015). Colonic delivery of celecoxib is a potential pharmaceutical strategy for repositioning the selective COX-2 inhibitor as an anti-colitic agent. *Archives of Pharmacal Research*, , 1-9.

Kim, M., Song, Y., Kim, C., & Hwang, J. (2014). Kirenol inhibits adipogenesis through activation of the wnt/ β -catenin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(2), 433-438.

Kim, T., Choi, S. J., Lee, Y. H., Song, G. G., & Ji, J. D. (2012). Combined therapeutic application of mTOR inhibitor and vitamin D 3 for inflammatory bone destruction of rheumatoid arthritis. *Medical Hypotheses*, 79(6), 757-760.

Kim, Y., Kahn, M., Kim, Y., & Kahn, M. (2014). The role of the wnt signaling pathway in cancer stem cells: Prospects for drug development. *Research & Reports in Biochemistry*, 4.

King, T. D., Suto, M. J., & Li, Y. (2012). The wnt/ β -catenin signaling pathway: A potential therapeutic target in the treatment of triple negative breast cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(1), 13-18.

Klebe, G. (2006). Virtual ligand screening: Strategies, perspectives and limitations. *Drug Discovery Today*, 11(13), 580-594.

Koh, M. Y., Spivak-Kroizman, T. R., & Powis, G. (2010). HIF-1 α and cancer therapy. *Angiogenesis inhibition* (pp. 15-34) Springer.

Kojima, M., Morisaki, T., Sasaki, N., Nakano, K., Mibu, R., Tanaka, M., & Katano, M. (2004). Increased nuclear factor- κ B activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression. *Anticancer Research*, 24(2B), 675-681.

Krech, T., Thiede, M., Hilgenberg, E., Schafer, R., & Jurchott, K. (2010). Characterization of AKT independent effects of the synthetic AKT inhibitors SH-5 and SH-6 using an integrated approach combining transcriptomic profiling and signaling pathway perturbations. *BMC Cancer*, 10(1), 287. doi:10.1186/1471-2407-10-287.

Kumar, A., Pandurangan, A. K., Lu, F., Fyrst, H., Zhang, M., Byun, H. S., . . . Saba, J. D. (2012). Chemopreventive sphingadienes downregulate wnt signaling via a PP2A/Akt/GSK3beta pathway in colon cancer. *Carcinogenesis*, 33(9), 1726-1735. doi:10.1093/carcin/bgs174.

Kumar, A., Pandurangan, A. K., Lu, F., Fyrst, H., Zhang, M., Byun, H. S., . . . Saba, J. D. (2012). Chemopreventive sphingadienes downregulate wnt signaling via a PP2A/Akt/GSK3beta pathway in colon cancer. *Carcinogenesis*, 33(9), 1726-1735. doi:10.1093/carcin/bgs174 [doi]

Kumar, A., Voet, A., & Zhang, K. (2012). Fragment based drug design: From experimental to computational approaches. *Current Medicinal Chemistry*, 19(30), 5128-5147.

Kumar, M., Kumar, S., & Kaur, S. (2012). Role of ROS and COX-2/iNOS inhibition in cancer chemoprevention: A review. *Phytochemistry Reviews*, 11(2-3), 309-337. doi:10.1007/s11101-012-9265-1

Kwak, D. H., Lee, J., Kim, D., Kim, T., Lee, K. J., & Ma, J. Y. (2013). Inhibitory effects of hwangryunhaedok-tang in 3T3-L1 adipogenesis by regulation of Raf/MEK1/ERK1/2 pathway and PDK1/Akt phosphorylation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013

Kypta, R. M., & Waxman, J. (2012). Wnt/ β -catenin signalling in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 9(8), 418-428.

Labbé, D., Zadra, G., Ebot, E., Mucci, L., Kantoff, P., Loda, M., & Brown, M. (2014). Role of diet in prostate cancer: The epigenetic link. *Oncogen*.

Lambert, J. R., Young, C. D., Persons, K. S., & Ray, R. (2007). Mechanistic and pharmacodynamic studies of a 25-hydroxyvitamin D₃ derivative in prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(1), 189-195.

Lather, V., & Madan, A. K. (2005). Application of graph theory: Topological models for prediction of CDK-1 inhibitory activity of aloisines. *Croat.Chem.Acta*, 78(1), 55-61.

Lee, C., Huang, H., & Juan, H. (2011). Reviewing ligand-based rational drug design: The search for an ATP synthase inhibitor. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8), 5304-5318.

Lee, H., Bae, S., Kim, K., Kim, W., Chung, S., Yang, Y., & Yoon, Y. (2011). Shikonin inhibits adipogenesis by modulation of the WNT/ β -catenin pathway. *Life Sciences*, 88(7), 294-301.

Lee, H., Na, H., & Surh, Y. (2013). Resolution of inflammation as a novel chemopreventive strategy. *Seminars in Immunopathology*, 35(2) 151-161.

Lee, I., Kamba, A., Low, D., & Mizoguchi, E. (2014). Novel methylxanthine derivative-mediated anti-inflammatory effects in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(5), 1127.

Lee, Y., Kim, W., Hong, S., Park, H., Yum, S., Yoon, J., & Jung, Y. (2014). Colon-targeted celecoxib ameliorates TNBS-induced rat colitis: A potential pharmacologic mechanism and therapeutic advantages. *European Journal of Pharmacology*, 726, 49-56.

Lee, M., Kim, W. K., Park, H. J., Kang, S. S., & Lee, S. K. (2013). Anti-proliferative activity of hydnocarpin, a natural lignan, is associated with the suppression of

wnt/ β -catenin signaling pathway in colon cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(20), 5511-5514.

Lee, S. Y., Lim, T. G., Chen, H., Jung, S. K., Lee, H. J., Lee, M. H., . . . Dong, Z. (2013). Esculetin suppresses proliferation of human colon cancer cells by directly targeting beta-catenin. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 6(12), 1356-1364. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0241 [doi]

Lee, Y., Shin, S., Jue, S., Kwon, I., Cho, E., Cho, E., . . . Kim, E. (2013). The role of PIN1 on odontogenic and adipogenic differentiation in human dental pulp stem cells. *Stem Cells and Development*, 23(6), 618-630.

Lejeune, F. J., Rüegg, C., & Liénard, D. (1998). Clinical applications of TNF- α in cancer. *Current Opinion in Immunology*, 10(5), 573-580.

Leow, P., Tian, Q., Ong, Z., Yang, Z., & Ee, P. R. (2010). Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as wnt/ β -catenin antagonists against human osteosarcoma cells. *Investigational New Drugs*, 28(6), 766-782.

Lepourcelet, M., Chen, Y. P., France, D. S., Wang, H., Crews, P., Petersen, F., . . . Shivdasani, R. A. (2004). Small-molecule antagonists of the oncogenic tcf/ β -catenin protein complex. *Cancer Cell*, 5(1), 91-102.

Li, B., Flaveny, C. A., Giambelli, C., Fei, D. L., Han, L., Hang, B. I., . . . Burlingame, O. (2014). Repurposing the FDA-approved pinworm drug pyrvinium as a novel chemotherapeutic agent for intestinal polyposis. *PloS One*, 9(7), e101969.

Li, H., Yang, B., Huang, J., Xiang, T., Yin, X., Wan, J., . . . Ren, G. (2013). Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting β -catenin signaling pathway. *Toxicology Letters*, 220(3), 219-228.

Li, J., Chen, X., Ding, X., Cheng, Y., Zhao, B., Lai, Z., . . . Wang, C. (2013). LATS2 suppresses oncogenic wnt signaling by disrupting β -catenin/BCL9 interaction. *Cell Reports*, 5(6), 1650-1663.

Li, J., Davies, B. R., Han, S., Zhou, M., Bai, Y., Zhang, J., . . . Liu, Y. J. (2013). The AKT inhibitor AZD5363 is selectively active in PI3KCA mutant gastric cancer, and sensitizes a patient-derived gastric cancer xenograft model with PTEN loss to taxotere. *J. Transl. Med*, 11, 241.

Li, J., Xiang, S., Zhang, Q., Wu, J., Tang, Q., Zhou, J., . . . Hann, S. S. (2015). Combination of curcumin and bicalutamide enhanced the growth inhibition of

androgen-independent prostate cancer cells through SAPK/JNK and MEK/ERK1/2-mediated targeting NF- κ B/p65 and MUC1-C. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34(1), 1-11.

Li, L., Wang, Z., & Wang, Z. (2011). Combination of IL-24 and cisplatin inhibits cervical cancer growth in a xenograft nude mice model. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(12), 3293-3298.

Li, Q., & Hannah, S. S. (2012). Wnt/ β -catenin signaling is downregulated but restored by nutrition interventions in the aged heart in mice. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 55(3), 749-754.

Li, X., Pu, J., Jiang, S., Su, J., Kong, L., Mao, B., . . . Li, Y. (2013). Henryin, an ent-kaurane diterpenoid, inhibits wnt signaling through interference with β -catenin/TCF4 interaction in colorectal cancer cells. *PloS One*, 8(7), e68525.

Li, Y., & Zhang, T. (2014). Targeting cancer stem cells by curcumin and clinical applications. *Cancer Letters*, 346(2), 197-205.

Li, Y., Wang, L., Pappan, L., Galliher-Beckley, A., & Shi, J. (2012). IL-1 β promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation. *Mol Cancer*, 11(7).

Li, Y., Wicha, M. S., Schwartz, S. J., & Sun, D. (2011). Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(9), 799-806.

Li, Y., Zhang, T., Korkaya, H., Liu, S., Lee, H. F., Newman, B., . . . Sun, D. (2010). Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(9), 2580-2590. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2937.

Liagre, B., Vergne-Salle, P., Leger, D. Y., & Beneytout, J. (2007). Inhibition of human rheumatoid arthritis synovial cell survival by hecogenin and tigogenin is associated with increased apoptosis, p38 mitogen-activated protein kinase activity and upregulation of cyclooxygenase-2. *International Journal of Molecular Medicine*, 20(4), 451-460.

Lim, H. J., Crowe, P., & Yang, J. (2014). Current clinical regulation of PI3K/PTEN/Akt/mTOR signalling in treatment of human cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(4), 1-19.

Lin, B., Wan, S., Liu, F., Cui, Z., Zhang, X., Li, X. (2014). Effect of bergapten on cells cycle in nasopharyngeal carcinoma. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, 49(10), 837-842.

Lin, Y., Wang, F., & Zhang, G. (2014). Natural products and their derivatives regulating the janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Journal of Asian Natural Products Research*, 16(7), 800-812.

Lipinski, C. A. (2004). Lead-and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 337-341.

Liu, J., Li, G., Liu, D., & Liu, J. (2014). FH535 inhibits the proliferation of HepG2 cells via downregulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 9(4), 1289-1292.

Liu, J., Zhang, M., Zhu, Q., & Wang, S. (2014). Relationship between wnt/ β -catenin signaling pathway and hepatocellular carcinoma. *Weichangbingxue He Ganbingxue Zazhi*, 23(9), 994-997. doi:10.3969/j.issn.1006-5709.2014.09.004

Liu, T., Lin, Y., Wen, X., Jorissen, R. N., & Gilson, M. K. (2007). BindingDB: A web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. *Nucleic Acids Research*, 35(Database issue), D198-201. doi:gkl999 [pii]

Liu, X., Zhao, G., Yan, Y., Bao, L., Chen, B., & Qi, R. (2012). Ginkgolide B reduces atherogenesis and vascular inflammation in ApoE^{-/-} mice. *PLoS One*, 7(5), e36237.

Liu, Y., Wang, W., Xu, J., Li, L., Dong, Q., Shi, Q., . . . Tang, M. (2013). Dihydroartemisinin inhibits tumor growth of human osteosarcoma cells by suppressing wnt/ β -catenin signaling. *Oncology Reports*, 30(4), 1723-1730.

Liu, Y., Zhou, L. (2014). Nanfang Hospital, Southern Medical University, Peop. Rep. China, assignee. Application of compound ICG-001 in preparation of drugs for treating chronic kidney disease. Patent Application Country: Application: CN; CN; Priority Application Country: CN patent CN104055779. 20924; Patent Application Date: 20140613.; Priority Application Date: 20140613.

Llompart, J., Gálvez, J., Pal, K. (2006). Treatment of cáncer with MT477 derivatives. *US Pat Appl Publ.* 2005-179796; 2004-60586519: 57.

Lounnas, V., Ritschel, T., Kelder, J., McGuire, R., Bywater, R. P., & Foloppe, N. (2013). Current progress in structure-based rational drug design marks a new mindset in drug discovery. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 5(6), 1-14.

Low, D., Tran, H. T., Lee, I., Dreux, N., Kamba, A., Reinecker, H., . . . Mizoguchi, E. (2013). Chitin-binding domains of escherichia coli ChiA mediate interactions with intestinal epithelial cells in mice with colitis. *Gastroenterology*, 145(3), 602-612. e9.

Lu, D., Cottam, H. B., Corr, M., & Carson, D. A. (2005). Repression of beta-catenin function in malignant cells by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18567-18571. doi:0509316102 [pii]

Lu, H., Ouyang, W., & Huang, C. (2006). Inflammation, a key event in cancer development. *Molecular Cancer Research : MCR*, 4(4), 221-233. doi:4/4/221 [pii]

Lu, W., Jia, G., Meng, X., Zhao, C., Zhang, L., Ren, Y., . . . Ni, Y. (2012). Beta-catenin mediates the apoptosis induction effect of celastrol in HT29 cells. *Life Sciences*, 91(7), 279-283.

Lu, W., Lin, C., King, T. D., Chen, H., Reynolds, R. C., & Li, Y. (2012). Silibinin inhibits wnt/ β -catenin signaling by suppressing wnt co-receptor LRP6 expression in human prostate and breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 24(12), 2291-2296.

Lucero, O. M., Dawson, D. W., Moon, R. T., & Chien, A. J. (2010). A re-evaluation of the "Oncogenic" nature of wnt/ β -catenin signaling in melanoma and other cancers. *Current Oncology Reports*, 12(5), 314-318.

Lukovits, I. (1998). An all-path version of the wiener index. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 38(2), 125-129.

Lyakhovich, A., & Gasche, C. (2010). Systematic review: Molecular chemoprevention of colorectal malignancy by mesalazine. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 31(2), 202-209.

M Derry, M., R Somasagara, R., Raina, K., Kumar, S., Gomez, J., Patel, M., . . . Agarwal, C. (2014). Target identification of grape seed extract in colorectal cancer using drug affinity responsive target stability (DARTS) technique: Role of endoplasmic reticulum stress response proteins. *Current Cancer Drug Targets*, 14(4), 323-336.

Ma, L., Wei, W., Chua, M., & So, S. (2014). WNT/ β -catenin pathway activation in hepatocellular carcinoma: A clinical perspective. *Gastrointestinal Cancer: Targets & Therapy*, 4.

Ma, L., Zhang, G., Miao, X., Deng, X., Wu, Y., Liu, Y., . . . Sun, D. (2013). Cancer stem-like cell properties are regulated by EGFR/AKT/ β -catenin signaling and preferentially inhibited by gefitinib in nasopharyngeal carcinoma. *FEBS Journal*, 280(9), 2027-2041.

Macarron, R., Banks, M. N., Bojanic, D., Burns, D. J., Cirovic, D. A., Garyantes, T., . . . Paslay, J. W. (2011). Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(3), 188-195.

Mahmoudi, N., de Julian-Ortiz, J. V., Ciceron, L., Gálvez, J., Mazier, D., Danis, M., . . . Garcia-Domenech, R. (2006). Identification of new antimalarial drugs by linear discriminant analysis and topological virtual screening. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 489-497. doi:dk470.

Maier, T. J., Janssen, A., Schmidt, R., Geisslinger, G., & Grosch, S. (2005). Targeting the beta-catenin/APC pathway: A novel mechanism to explain the cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(10), 1353-1355. doi:04-3274fje.

Maihofner, C., Charalambous, M. P., Bhambra, U., Lightfoot, T., Geisslinger, G., Gooderham, N. J., & Colorectal Cancer Group. (2003). Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 24(4), 665-671.

Maierov, E. G., Keskin, O., Gursoy, A., & Nussinov, R. (2013). The structural network of inflammation and cancer: Merits and challenges. *Seminars in Cancer Biology*, , 23(4) 243-251.

Makhov, P. B., Golovine, K., Kutikov, A., Teper, E., Canter, D. J., Simhan, J., . . . Kolenko, V. M. (2012). Modulation of Akt/mTOR signaling overcomes sunitinib resistance in renal and prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(7), 1510-1517. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0907 [doi]

Manfredi, G. I., Dicitore, A., Gaudenzi, G., Caraglia, M., Persani, L., & Vitale, G. (2014). PI3K/Akt/mTOR signaling in medullary thyroid cancer: A promising molecular target for cancer therapy. *Endocrine*, *48*(2), 1-8.

Mannhold, R., Kubinyi, H., Folkers, G., Hoffmann, R. D., Gohier, A., & Pospisil, P. (2013). *Data mining in drug discovery* John Wiley & Sons.

Mantovani, A., Marchesi, F., Porta, C., Allavena, P., & Sica, A. (2008). Linking inflammation reactions to cancer: Novel targets for therapeutic strategies. *Targeted therapies in cancer* (pp. 112-127) Springer.

Mao, J., Hu, X., Xiao, Y., Yang, C., Ding, Y., Hou, N., . . . Zhang, X. (2013). Overnutrition stimulates intestinal epithelium proliferation through beta-catenin signaling in obese mice. *Diabetes*, *62*(11), 3736-3746. doi:10.2337/db13-0035 [doi]

Mao, Y., Tian, W., Huang, Z., & Ana, J. (2013). 594 convenient synthesis of toxoflavin that targets β -Catenin/Tcf4 signaling activities. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, *51*(3), 594-597.

Martelli, A. M., Evangelisti, C., Chiarini, F., Grimaldi, C., Manzoli, L., & McCubrey, J. A. (2009). Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *18*(9), 1333-1349.

Martinez-Romero, M., Vázquez-Naya, J. M., R Rabunal, J., Pita-Fernández, S., Macenlle, R., Castro-Alvariño, J., . . . Vázquez, S. (2010). Artificial intelligence techniques for colorectal cancer drug metabolism: Ontologies and complex networks. *Current Drug Metabolism*, *11*(4), 347-368.

Massart, D. L., Vandeginste, B., Deming, S., Michotte, Y., & Kaufman, L. (1988). *Chemometrics: A textbook*.

Materi, W., & Wishart, D. S. (2007). Computational systems biology in drug discovery and development: Methods and applications. *Drug Discovery Today*, *12*(7), 295-303.

Mates, B. (1989). *The philosophy of leibniz: Metaphysics and language*.

Matsuzaki, S., & Darcha, C. (2013). Involvement of the wnt/ β -catenin signaling pathway in the cellular and molecular mechanisms of fibrosis in endometriosis. *PloS One*, *8*(10), e76808.

Matta, A., & Ralhan, R. (2009). Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck Oncology, 1*, 6-3284-1-6. doi:10.1186/1758-3284-1-6 [doi]

Mattmann, M. E., Stoops, S. L., & Lindsley, C. W. (2011). Inhibition of akt with small molecules and biologics: Historical perspective and current status of the patent landscape. *Expert Opinion on Therapeutic Patents, 21*(9), 1309-1338.

Mazier, D., Mahmoudi, N., Farhati, K., Garcia-Domenech, R., Gálvez, J., Derouin, F., & Danis, M. (2009). Monensin derivatives for preventing and treating plasmodium infections. *PCT Int Appl WO, 2009074649*, A1.

McGuire, T. F., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2001). Vitamin D(3)-induced apoptosis of murine squamous cell carcinoma cells. selective induction of caspase-dependent MEK cleavage and up-regulation of MEKK-1. *The Journal of Biological Chemistry, 276*(28), 26365-26373. doi:10.1074/jbc.M010101200 [doi]

Merhi, F., Tang, R., Piedfer, M., Mathieu, J., Bombarda, I., Zaher, M., . . . Bauvois, B. (2011). Hyperforin inhibits Akt1 kinase activity and promotes caspase-mediated apoptosis involving bad and noxa activation in human myeloid tumor cells. *PloS One, 6*(10), e25963.

Merla, R., Ye, Y., Lin, Y., Manickavasagam, S., Huang, M. H., Perez-Polo, R. J., . . . Birnbaum, Y. (2007). The central role of adenosine in statin-induced ERK1/2, akt, and eNOS phosphorylation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 293*(3), H1918-28. doi:00416.2007.

Meuillet, E. J., Zuohe, S., Lemos, R., Ihle, N., Kingston, J., Watkins, R., . . . Powis, G. (2010). Molecular pharmacology and antitumor activity of PHT-427, a novel Akt/phosphatidylinositide-dependent protein kinase 1 pleckstrin homology domain inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics, 9*(3), 706-717. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0985.

Mione, M., & Zon, L. I. (2012). Cancer and inflammation: An aspirin a day keeps the cancer at bay. *Current Biology, 22*(13), R522-R525.

Mirzoeva, S., Kim, N. D., Chiu, K., Franzen, C. A., Bergan, R. C., & Pelling, J. C. (2008). Inhibition of HIF-1 alpha and VEGF expression by the chemopreventive bioflavonoid apigenin is accompanied by akt inhibition in human prostate carcinoma PC3-M cells. *Molecular Carcinogenesis, 47*(9), 686-700.

Mishra, R. K., Garcia-Domenech, R., & Gálvez, J. (2001). Getting discriminant functions of antibacterial activity from physicochemical and topological parameters. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 41(2), 387-393.

Mojsin, M., Vicentic, J. M., Schwirtlich, M., Topalovic, V., & Stevanovic, M. (2014). Quercetin reduces pluripotency, migration and adhesion of human teratocarcinoma cell line NT2/D1 by inhibiting wnt/ β -catenin signaling. *Food & Function*, 5(10), 2564-2573.

Mologni, L., Brussolo, S., Ceccon, M., & Gambacorti-Passerini, C. (2012). Synergistic effects of combined Wnt/KRAS inhibition in colorectal cancer cells. *PLoS One*, 7(12), e51449.

Mook, R. A., Chen, M., Lu, J., Barak, L. S., Lyerly, H. K., & Chen, W. (2013). Small molecule modulators of wnt/ β -catenin signaling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(7), 2187-2191.

Mook, R. A., Wang, J., Ren, X., Chen, M., Spasojevic, I., Barak, L. S., . . . Chen, W. (2015). Structure–activity studies of wnt/ β -catenin inhibition in the niclosamide chemotype: Identification of derivatives with improved drug exposure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(17), 5829-5838.

Moon, E. J., & Giaccia, A. (2014). Dual roles of NRF2 in tumor prevention and progression: Possible implications in cancer treatment. *Free Radical Biology and Medicine*, 79, 292-299.

Monsalves, E., Juraschka, K., Tateno, T., Agnihotri, S., Asa, S. L., Ezzat, S., & Zadeh, G. (2014). The PI3K/AKT/mTOR pathway in the pathophysiology and treatment of pituitary adenomas. *Endocrine-Related Cancer*, 21(4), R331-44. doi:10.1530/ERC-14-0188 [doi]

Morgan, T. M., Koreckij, T. D., & Corey, E. (2009). Targeted therapy for advanced prostate cancer: Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Current Cancer Drug Targets*, 9(2), 237-249.

Morgensztern, D., & McLeod, H. L. (2005). PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs*, 16(8), 797-803.

Morikawa, K., Nonaka, M., Mochizuki, H., Handa, K., Hanada, H., & Hirota, K. (2008). Naringenin and hesperetin induce growth arrest, apoptosis, and

cytoplasmic fat deposit in human preadipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 11030-11037.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63.

Motulsky, H., & Christopoulos, A. (1999). GraphPad software inc. *San Diego CA*, Mucho, S., Kirschnick, M., Schwarz, M., & Braeuning, A. (2014). Synergistic effects of beta-catenin inhibitors and sorafenib in hepatoma cells. *Anticancer Research*, 34(9), 4677-4683. doi:34/9/4677 [pii]

Munteanu, C. R., Magalhães, A. L., Uriarte, E., & González-Díaz, H. (2009). Multi-target QPDR classification model for human breast and colon cancer-related proteins using star graph topological indices. *Journal of Theoretical Biology*, 257(2), 303-311.

Oh, J. H., & Kwon, T. K. (2009). Withaferin A inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules by inactivation of akt and NF- κ B in human pulmonary epithelial cells. *International Immunopharmacology*, 9(5), 614-619.

Ohnishi, S., Ma, N., Thanan, R., Pinlaor, S., Hammam, O., Murata, M., & Kawanishi, S. (2013). DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694-702. doi:S0016508590000725 [pii]

Okayasu, I., Ohkusa, T., Kajiura, K., Kanno, J., & Sakamoto, S. (1996). Promotion of colorectal neoplasia in experimental murine ulcerative colitis. *Gut*, 39(1), 87-92.

Okusa Toshifumi. (1985). Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and change in intestinal microflora. *Japan Gastroenterology Journal*, 82(5), 1327-1336.

Olivier-Van Stichelen, S., Guinez, C., Mir, A. M., Perez-Cervera, Y., Liu, C., Michalski, J. C., & Lefebvre, T. (2012). The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of beta-catenin and cell proliferation. *American*

Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, 302(4), E417-24.
doi:10.1152/ajpendo.00390.2011 [doi]

Ou, X., Liu, M., Luo, H., Dong, L. Q., & Liu, F. (2014). Ursolic acid inhibits leucine-stimulated mTORC1 signaling by suppressing mTOR localization to lysosome. *PLoS One*, 9(4), e95393.

Ou, X., Ouyang, Y., & Lien, E. (1986). Examination of quantitative relationship of partition coefficient (log P) and molecular weight, dipole moment and hydrogen bond capability of miscellaneous compounds. *J. Mol. Sci. (Int. Ed.)*, 4, 89-95.

Pal, S. K., Reckamp, K., Yu, H., & Figlin, R. A. (2010). Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 19(11), 1355-1366.

Pandey, M. K., Kale, V. P., Song, C., Sung, S., Sharma, A. K., Talamo, G., . . . Amin, S. G. (2014). Gambogic acid inhibits multiple myeloma mediated osteoclastogenesis through suppression of chemokine receptor CXCR4 signaling pathways. *Experimental Hematology*, 42(10), 883-896.

Pandeya, S., & Thakkar, D. (2005). Combinatorial chemistry: A novel method in drug discovery and its application. *Indian Journal of Chemistry*, 44, 335-348.

Pang, X., Wu, Y., Wu, Y., Lu, B., Chen, J., Wang, J., . . . Liu, M. (2011). (-)-Gossypol suppresses the growth of human prostate cancer xenografts via modulating VEGF signaling-mediated angiogenesis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(5), 795-805. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0936 [doi]

Panno, M. L., Giordano, F., Mastroianni, F., Palma, M. G., Bartella, V., Carpino, A., . . . Andò, S. (2010). Breast cancer cell survival signal is affected by bergapten combined with an ultraviolet irradiation. *FEBS Letters*, 584(11), 2321-2326.

Papadimitrakopoulou, V. (2012). Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 7(8), 1315-1326. doi:10.1097/JTO.0b013e31825493eb [doi]

Paplomata, E., & O'Regan, R. (2014). The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: Targets, trials and biomarkers. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 1-13. 1758834014530023.

Pappas, T. (1989). *The joy of mathematics: Discovering mathematics all around you* Wide World Pub./Tetra.

Parisini, E., Metrangolo, P., Pilati, T., Resnati, G., & Terraneo, G. (2011). Halogen bonding in halocarbon–protein complexes: A structural survey. *Chemical Society Reviews*, 40(5), 2267-2278.

Park, H., Park, K., Lee, D., Kang, S., Nagappan, A., Kim, J., . . . Hah, Y. (2012). Polyphenolic extract isolated from korean *Lonicera japonica* thunb. induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells: Involvements of PI3K/Akt and MAPKs. *Food and Chemical Toxicology*, 50(7), 2407-2416.

Park, J. S., Choi, G. S., Jang, Y. S., Jun, S. H., & Kang, H. (2010). Influence of obesity on the serum carcinoembryonic antigen value in patients with colorectal cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 19(10), 2461-2468. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0569 [doi]

Park, S., Gwak, J., Han, S. J., & Oh, S. (2013). Cardamonin suppresses the proliferation of colon cancer cells by promoting β -catenin degradation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(6), 1040-1044.

Patel, D., Shukla, S., & Gupta, S. (2007). Apigenin and cancer chemoprevention: Progress, potential and promise (review). *International Journal of Oncology*, 30(1), 233-245.

Patel, H. M., Noolvi, M. N., Sharma, P., Jaiswal, V., Bansal, S., Lohan, S., . . . Bhardwaj, V. (2014). Quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies as strategic approach in drug discovery. *Medicinal Chemistry Research*, 23(12), 4991-5007.

Patel, J. (2013). Science of the science, drug discovery and artificial neural networks. *Current Drug Discovery Technologies*, 10(1), 2-7.

Perše, M., & Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and tricks. *BioMed Research International*, 2012, 1-13.

Phelps, R. A., Broadbent, T. J., Stafforini, D. M., & Jones, D. A. (2009). New perspectives on APC control of cell fate and proliferation in colorectal cancer. *Cell Cycle*, 8(16), 2549-2556

Piazza, G. A., Keeton, A. B., Tinsley, H. N., Whitt, J. D., Gary, B. D., Mathew, B., . . . Reynolds, R. C. (2010). NSAIDs: Old drugs reveal new anticancer targets. *Pharmaceuticals*, 3(5), 1652-1667.

Pogliani, L. (1996). Modeling with special descriptors derived from a medium-sized set of connectivity indices. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(46), 18065-18077.

Porta, C., Paglino, C., & Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in Oncology*, 4.

Pradhan, A., & Olsson, P. E. (2014). Juvenile ovary to testis transition in zebrafish involves inhibition of ptges. *Biology of Reproduction*, 91(2), 33. doi:10.1095/biolreprod.114.119016.

Prakash, R., & Anandakumar, S. (2014). Regulation of carcinogenesis induced by abnormality of WNT/ β -catenin signaling pathway. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(6), 497-505.

Prinz, H., Chamasmani, B., Vogel, K., Böhm, K. J., Aicher, B., Gerlach, M., . . . Müller, K. (2011). N-benzoylated phenoxazines and phenothiazines: Synthesis, antiproliferative activity, and inhibition of tubulin polymerization. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(12), 4247-4263.

Qazi, A. K., Hussain, A., Hamid, A., Qurishi, Y., Majeed, R., Ahmad, M., . . . Saxena, A. K. (2013). Recent development in targeting PI3K-akt-mTOR signaling for anticancer therapeutic strategies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(10), 1552-1564. doi:10.2174/1871520613666131125123241

Qian, L., Lu, H., Liao, S., Miao, T., Shen, Y., & Zheng, K. (2009). 3d-qsar and docking studies of novel quinazoline analogues as oral inhibitors towards ap-1 and nf-kb. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry*, 8(03), 373-384.

Raina, K., Agarwal, C., Wadhwa, R., Serkova, N. J., & Agarwal, R. (2013). Energy deprivation by silibinin in colorectal cancer cells: A double-edged sword targeting both apoptotic and autophagic machineries. *Autophagy*, 9(5), 697-713.

Raju, J., & Bird, R. P. (2007). Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. *Cancer Letters*, 255(2), 194-204.

Ran, T., Lu, T., Yuan, H., Liu, H., Wang, J., Zhang, W., . . . Chen, Y. (2012). A selectivity study on mTOR/PI3K α inhibitors by homology modeling and 3D-QSAR. *Journal of Molecular Modeling*, 18(1), 171-186.

Randić, M. (1992). In search of structural invariants. *Journal of Mathematical Chemistry*, 9(2), 97-146.

Randić, M., & Jurs, P. C. (1989). On a fragment approach to Structure-activity correlations. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 8(1), 39-48.

Randić, M., & Wilkins, C. L. (1979). Graph theoretical approach to recognition of structural similarity in molecules. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 19(1), 31-37.

Randić, M., Brissey, G. M., Spencer, R. B., & Wilkins, C. L. (1980). Use of self-avoiding paths for characterization of molecular graphs with multiple bonds. *Computers & Chemistry*, 4(1), 27-43.

Ren, H., Li, S., Zhang, M., Shen, S., & Wang, W. (2014). Relationship between wnt/ β -catenin signaling pathway and tumor of digestive system. *Weichangbingxue He Ganbingxue Zazhi*, 23(6), 718-720. doi:10.3969/j.issn.1006-5709.2014.06.037

Ren, W. (2008). Synchronization of coupled harmonic oscillators with local interaction. *Automatica*, 44(12), 3195-3200.

Reutlinger, M., & Schneider, G. (2012). Nonlinear dimensionality reduction and mapping of compound libraries for drug discovery. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 34, 108-117.

Ring, A., Kim, Y., & Kahn, M. (2014). Wnt/catenin signaling in adult stem cell physiology and disease. *Stem Cell Reviews and Reports*, 10(4), 512-525.

Rios-Santamarina, I., Garcia-Domenech, R., Gálvez, J., Morcillo Esteban, J., Santamaria, P., & Cortijo, J. (2004). Getting new bronchodilator compounds from molecular topology. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 22(4), 271-277. doi:10.1016/j.ejps.2004.03.013

Rodríguez, J., & Mora, R. (2001). Estadística informática: Casos y ejemplos con el SPSS. *Publicaciones Universidad De Alicante, España*.

Roy, H. K., Karolski, W. J., Wali, R. K., Ratashak, A., Hart, J., & Smyrk, T. C. (2005). The nonsteroidal anti-inflammatory drug, nabumetone, differentially

inhibits β -catenin signaling in the MIN mouse and azoxymethane-treated rat models of colon carcinogenesis. *Cancer Letters*, 217(2), 161-169.

Roychowdhury, A., Sharma, R., & Kumar, S. (2010). Recent advances in the discovery of small molecule mTOR inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*, 2(10), 1577-1589.

Rücker, G., & Rücker, C. (2000). Walk counts, labyrinthicity, and complexity of acyclic and cyclic graphs and molecules. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 40(1), 99-106.

Ruecker, G., & Ruecker, C. (1993). Counts of all walks as atomic and molecular descriptors. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 33(5), 683-695.

Saifo, M. S., Rempinski Jr, D. R., Rustum, Y. M., & Azrak, R. G. (2010). Targeting the oncogenic protein beta-catenin to enhance chemotherapy outcome against solid human cancers. *Mol Cancer*, 9(1), 310.

Saini, M. K., & Sanyal, S. N. (2014). Piroxicam and c-phycoyanin prevent colon carcinogenesis by inhibition of membrane fluidity and canonical wnt/ β -catenin signaling while up-regulating ligand dependent transcription factor PPAR γ . *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(5), 537-550.

Saiprasad, G., Chitra, P., Manikandan, R., & Sudhandiran, G. (2014). Hesperidin induces apoptosis and triggers autophagic markers through inhibition of aurora-A mediated phosphoinositide-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase-3 beta signalling cascades in experimental colon carcinogenesis. *European Journal of Cancer*, 50(14), 2489-2507.

Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A., & Yamamoto-Furusho, J. K. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 14(27), 4280-4288.

Sandhu, J. S. (2008). Prostate cancer and chronic prostatitis. *Current Urology Reports*, 9(4), 328-332.

Sann, H., Erichsen J. V., Hessmann M., Pahl A., & Hoffmeyer A. (2013) *Life Sciences*, 92, 737-745.

Sarkar, F. H., & Li, Y. (2004). Cell signaling pathways altered by natural chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 555(1), 53-64.

Sarris, E. G., Saif, M. W., & Syrigos, K. N. (2012). The biological role of PI3K pathway in lung cancer. *Pharmaceuticals*, 5(11), 1236-1264.

Sastre-Perona, A., & Santisteban, P. (2012). Role of the wnt pathway in thyroid cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 3.

Scartabelli, T., Gerace, E., Landucci, E., Moroni, F., & Pellegrini-Giampietro, D. E. (2008). Neuroprotection by group I mGlu receptors in a rat hippocampal slice model of cerebral ischemia is associated with the PI3K–Akt signaling pathway: A novel postconditioning strategy? *Neuropharmacology*, 55(4), 509-516.

Schaale, K., Neumann, J., Schneider, D., Ehlers, S., & Reiling, N. (2011). Wnt signaling in macrophages: Augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses. *European Journal of Cell Biology*, 90(6), 553-559.

Scheen, A. J., & Giet, D. (2012). Role of environment in complex diseases: Air pollution and food contaminants. [Role de l'environnement dans les maladies complexes: pollution atmospherique et contaminants alimentaires] *Revue Medicale De Liege*, 67(5-6), 226-233.

Schneider, G., & Fechner, U. (2005). Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(8), 649-663.

Sebio, A., Kahn, M., & Lenz, H. (2014). The potential of targeting wnt/ β -catenin in colon cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 18(6), 611-615.

Setia, S., Nehru, B., & Sanyal, S. N. (2014). The PI3K/Akt pathway in colitis associated colon cancer and its chemoprevention with celecoxib, a cox-2 selective inhibitor. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(6), 721-727.

Shacter, E., & Weitzman, S. A. (2002). Chronic inflammation and cancer. *Oncology*, 16(2), 217-232.

Shan, B., Wang, M., & Li, R. (2009). Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Investigation*, 27(6), 604-612.

Shanmugam, M. K., Nguyen, A. H., Kumar, A. P., Tan, B. K., & Sethi, G. (2012). Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic

triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. *Cancer Letters*, 320(2), 158-170.

Sharma, B., Pilania, P., & Singh, P. (2009). Modeling of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibitory activity of apoptosis-inducing agents potentially useful in prostate cancer chemotherapy: Derivatives of diarylpyrazole. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(2), 607-615.

Shin, S. Y., Yoon, H., Ahn, S., Kim, D., Bae, D., Koh, D., . . . Lim, Y. (2013). Structural properties of polyphenols causing cell cycle arrest at G1 phase in HCT116 human colorectal cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16970-16985.

Schwitalla S., Fingerle A.A., Cammareri P., Nebelsiek T., Göktuna S.I., Ziegler P.K.,... Greten F.R.(2013) Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*. 152(1-2), 25-38.

Sideras, K., & Kwekkeboom, J. (2014). Cancer inflammation and inflammatory biomarkers: Can neutrophil, lymphocyte, and platelet counts represent the complexity of the immune system? *Transplant International*, 27(1), 28-31.

Siegel, R., DeSantis, C., & Jemal, A. (2014). Colorectal cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64(2), 104-117.

Silva-García, O., Valdez-Alarcón, J. J., & Baizabal-Aguirre, V. M. (2014). The wnt/ β -catenin signaling pathway controls the inflammatory response in infections caused by pathogenic bacteria. *Mediators of Inflammation*, 2014

Simpson, D. R., Mell, L. K., & Cohen, E. E. W. (2014). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology*, , Ahead of Print. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.11.012

Singh, T., & Katiyar, S. K. (2013). Honokiol inhibits non-small cell lung cancer cell migration by targeting PGE2-mediated activation of β -catenin signaling. *PLoS One*, 8(4), e60749.

Sivalingam, V. N., Myers, J., Nicholas, S., Balen, A. H., & Crosbie, E. J. (2014). Metformin in reproductive health, pregnancy and gynaecological cancer: Established and emerging indications. *Human Reproduction Update*, 20(6), 853-868. doi:10.1093/humupd/dmu037 [doi]

Siveen, K. S., Sikka, S., Surana, R., Dai, X., Zhang, J., Kumar, A. P., . . . Bishayee, A. (2014). Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1845*(2), 136-154.

Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., & Lowe, E. W., Jr. (2013). Computational methods in drug discovery. *Pharmacological Reviews*, *66*(1), 334-395. doi:10.1124/pr.112.007336 [doi]

Slynko, I., Scharfe, M., Rumpf, T., Eib, J., Metzger, E., Schüle, R., . . . Sippl, W. (2014). Virtual screening of PRK1 inhibitors: Ensemble docking, rescoring using binding free energy calculation and QSAR model development. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *54*(1), 138-150.

Solomon, L., Mansor, S., Mallon, P., Donnelly, E., Hoper, M., Loughrey, M., . . . Gardiner, K. (2010). The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: An overview. *Comparative Clinical Pathology*, *19*(3), 235-239.

Song, N. R., Chung, M., Kang, N. J., Seo, S. G., Jang, T. S., Lee, H. J., & Lee, K. W. (2014). Quercetin suppresses invasion and migration of H-ras-transformed MCF10A human epithelial cells by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase. *Food Chemistry*, *142*, 66-71.

Srinivasaraghavan, J., & Allada, V. (2006). Application of mahalanobis distance as a lean assessment metric. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, *29*(11-12), 1159-1168.

Stein, U., Fleuter, C., Siegel, F., Smith, J., Kopacek, A., Scudiero, D., . . . Walther, W. (2012). Impact of mutant β -catenin on ABCB1 expression and therapy response in colon cancer cells. *British Journal of Cancer*, *106*(8), 1395-1405.

Stewart, D. J. (2014). Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *106*(1), djt356. doi:10.1093/jnci/djt356.

Stone, M. Mallows' cp statistic. *Encyclopedia of Biostatistic*.

Su, T., Lin, J., Tsai, C., Huang, T., Yang, Z., Wu, M., . . . Wu, Y. (2013). Inhibition of melanogenesis by gallic acid: Possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and wnt/ β -catenin signaling pathways in B16F10 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(10), 20443-20458.

Su, Y., & Simmen, R. C. (2009). Soy isoflavone genistein upregulates epithelial adhesion molecule E-cadherin expression and attenuates beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Carcinogenesis*, *30*(2), 331-339. doi:10.1093/carcin/bgn279 [doi]

Subramaniam, S., Mehrotra, M., & Gupta, D. (2008). Virtual high throughput screening (vHTS)--a perspective. *Bioinformation*, *3*(1), 14-17.

Suh, N., Reddy, B. S., DeCastro, A., Paul, S., Lee, H. J., Smolarek, A. K., . . . Rao, C. V. (2011). Combination of atorvastatin with sulindac or naproxen profoundly inhibits colonic adenocarcinomas by suppressing the p65/beta-catenin/cyclin D1 signaling pathway in rats. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, *4*(11), 1895-1902. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0222 [doi]

Sundram, V., Chauhan, S. C., Ebeling, M., & Jaggi, M. (2012). Curcumin attenuates β -catenin signaling in prostate cancer cells through activation of protein kinase D1. *PLoS One*, *7*(4), e35368.

Suzuki, M., Nakagawa-Goto, K., Nakamura, S., Tokuda, H., Morris-Natschke, S. L., Kozuka, M., . . . Lee, K. (2006). Cancer preventive agents. part 5. anti-tumor-promoting effects of coumarins and related compounds on epstein-barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Pharmaceutical Biology*, *44*(3), 178-182.

Syed, D. N., Afaq, F., Maddodi, N., Johnson, J. J., Sarfaraz, S., Ahmad, A., . . . Mukhtar, H. (2011). Inhibition of human melanoma cell growth by the dietary flavonoid fisetin is associated with disruption of wnt/ β -catenin signaling and decreased mitf levels. *Journal of Investigative Dermatology*, *131*(6), 1291-1299.

Syed, D. N., Chamcheu, J., Khan, M. I., Sechi, M., Lall, R. K., Adhami, V. M., & Mukhtar, H. (2014). Fisetin inhibits human melanoma cell growth through direct binding to p70S6K and mTOR: Findings from 3-D melanoma skin equivalents and computational modeling. *Biochemical Pharmacology*, *89*(3), 349-360.

Sylvester, J. J. (1878). Chemistry and algebra. *Nature*, *17*, 284.

Sylvester, J. J. (1878)*. On an application of the new atomic theory to the graphical representation of the invariants and covariants of binary quantics, with three appendices. *American Journal of Mathematics*, *1*(1), 64-104.

Tabernero, J., Cervantes, A., Saura, C., Roda, D., Yan, Y., Lin, K., . . . Patel, P. (2011). Targeting the PI3K-akt-mTOR pathway with GDC-0068, a novel selective ATP competitive akt inhibitor. *Ann Oncol*, 22.

Tai, P., Yu, E., Joseph, K., & Miale, T. (2010). A review of autoimmune diseases associated with cancer. *Oncology Publications*, 70.

Takahashi, H., Ogata, H., Nishigaki, R., Broide, D. H., & Karin, M. (2010). Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKK β -and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell*, 17(1), 89-97.

Takigawa, I., & Mamitsuka, H. (2013). Graph mining: Procedure, application to drug discovery and recent advances. *Drug Discovery Today*, 18(1), 50-57.

Tang, K., & Ling, M. (2014). Targeting drug-resistant prostate cancer with dual PI3K/MTOR inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, 21(26), 3048-3056.

Tang, K., & Ling, M. (2014). Targeting drug-resistant prostate cancer with dual PI3K/MTOR inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, 21(26), 3048-3056.

Taniguchi, K., & Karin, M. (2014). IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars in Immunology*, , 26(1) 54-74.

Tasian, S. K., Teachey, D. T., & Rheingold, S. R. (2014). Targeting the PI3K/mTOR pathway in pediatric hematologic malignancies. *Frontiers in Oncology*, 4

Teiten, M., Gaascht, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2012). Targeting the wingless signaling pathway with natural compounds as chemopreventive or chemotherapeutic agents. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(1), 245-254.

Tenbaum, S. P., Ordóñez-Morán, P., Puig, I., Chicote, I., Arqués, O., Landolfi, S., . . . Mendizabal, L. (2012). [Beta]-catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. *Nature Medicine*, 18(6), 892-901.

Thamilselvan, V., Menon, M., & Thamilselvan, S. (2011). Anticancer efficacy of deguelin in human prostate cancer cells targeting glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin pathway. *International Journal of Cancer*, 129(12), 2916-2927.

Theisen, C. (2001). Chemoprevention: What's in a name? *Journal of the National Cancer Institute*, 93(10), 743.

Tian, J., He, H., & Lei, G. (2014). Wnt/ β -catenin pathway in bone cancers. *Tumor Biology*, 35(10), 9439-9445.

Tian, J., He, H., & Lei, G. (2014). Wnt/ β -catenin pathway in bone cancers. *Tumor Biology*, 35(10), 9439-9445.

Tinsley, H. N., Grizzle, W. E., Abadi, A., Keeton, A., Zhu, B., Xi, Y., & Piazza, G. A. (2013). New NSAID targets and derivatives for colorectal cancer chemoprevention. *Prospects for chemoprevention of colorectal neoplasia* (pp. 105-120) Springer.

Todeschini, R., & Consonni, V. (2008). *Handbook of molecular descriptors* John Wiley & Sons.

Tommasi, S., Pinto, R., Pilato, B., & Paradiso, A. (2007). Molecular pathways and related target therapies in liver carcinoma. *Current Pharmaceutical Design*, 13(32), 3279-3287.

Tong, X., & Pelling, J. C. (2013). Targeting the PI3K/Akt/mTOR axis by apigenin for cancer prevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(7), 971-978. doi:CMCACA-E PUB-20121211-9.

Toulany, M., Minjgee, M., Saki, M., Holler, M., Meier, F., Eicheler, W., & Rodemann, H. P. (2014). ERK2-dependent reactivation of akt mediates the limited response of tumor cells with constitutive K-RAS activity to PI3K inhibition. *Cancer Biology & Therapy*, 15(3), 317-328.

Tropsha, A. (2010). Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Molecular Informatics*, 29(6-7), 476-488.

Van Waterbeemd, H. (1995). Discriminant analysis for activity prediction. *Method and Principles in Medicinal Chemistry*, 2, 265-282.

Vandekerckhove, J., Matzke, D., & Wagenmakers, E. (2014). Model comparison and the principle of parsimony. *Oxford Handbook of Computational and Mathematical Psychology*. Oxford University Press, Oxford.

Vanella, L., Di Giacomo, C., Acquaviva, R., Barbagallo, I., Cardile, V., Kim, D. H., . . . Sorrenti, V. (2013). Apoptotic markers in a prostate cancer cell line: Effect of ellagic acid. *Oncology Reports*, 30(6), 2804-2810.

Vedham, V., & Verma, M. (2015). Cancer-associated infectious agents and epigenetic regulation. *Cancer epigenetics* (pp. 333-354) Springer.

Velingkar, V. S., Pokharna, G., & Kolhe, N. S. (2011). Chemoinformatics: A novel tool in drug discovery. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3(1), 71-75.

Verras, M., & Sun, Z. (2006). Roles and regulation of wnt signaling and β -catenin in prostate cancer. *Cancer Letters*, 237(1), 22-32.

Verras, M., & Sun, Z. (2006). Roles and regulation of wnt signaling and β -catenin in prostate cancer. *Cancer Letters*, 237(1), 22-32.

Vuorinen, A., Engeli, R., Meyer, A., Bachmann, F., Griesser, U. J., Schuster, D., & Odermatt, A. (2014). Ligand-based pharmacophore modeling and virtual screening for the discovery of novel 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(14), 5995-6007.

Waldmann, T. A. (2013). The biology of IL-15: Implications for cancer therapy and the treatment of autoimmune disorders. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 16(1) S28-S30.

Walters, W. P., Stahl, M. T., & Murcko, M. A. (1998). Virtual screening—an overview. *Drug Discovery Today*, 3(4), 160-178.

Wang, C., Dai, J., Sun, Z., Shi, C., Cao, H., Chen, X., . . . Han, X. (2014). Targeted inhibition of disheveled PDZ domain via NSC668036 depresses fibrotic process. *Experimental Cell Research*,

Wang, D., Wiest, O., Helquist, P., Lan-Hargest, H., & Wiech, N. L. (2004). QSAR studies of PC-3 cell line inhibition activity of TSA and SAHA-like hydroxamic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(3), 707-711.

Wang, G., Fang, Y., Lu, Z., Pan, Z., Wan, D. (2012). Effects of indomethacin on the proliferation and invasion of colon cancer cell line hct116 and its mechanisms. *Shiyong Yixue Zazhi*, 28(11), 1756-1758.

Wang, H., Duan, L., Zou, Z., Li, H., Yuan, S., Chen, X., . . . Zha, H. (2014). Activation of the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway is involved in S100A4-induced viability and migration in colorectal cancer cells. *International Journal of Medical Sciences*, 11(8), 841.

Wang, J., Zhou, D., He, X., Wang, Y., Hu, W., Jiang, L., & Dou, J. (2011). Effect of downregulated beta-catenin on cell proliferative activity, the sensitivity to

chemotherapy drug and tumorigenicity of ovarian cancer cells. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 57 Suppl, OL1606-13.

Wang, L., & Shan, B. (2009). Effect of wnt/ β^2 -catenin signaling pathway on esophagus carcinogenesis. *Aibian, Jibian, Tubian*, 21(2), 156-158.

Wang, N., Wang, Z., Peng, C., You, J., Shen, J., Han, S., & Chen, J. (2014). Dietary compound isoliquiritigenin targets GRP78 to chemosensitize breast cancer stem cells via beta-catenin/ABCG2 signaling. *Carcinogenesis*, 35(11), 2544-2554. doi:10.1093/carcin/bgu187 [doi]

Wang, S., Liu, Q., Zhang, Y., Liu, K., Yu, P., Liu, K., . . . Wang, F. (2009). Suppression of growth, migration and invasion of highly-metastatic human breast cancer cells by berbamine and its molecular mechanisms of action. *Mol Cancer*, 8(1), 81-96.

Wang, W., Wen, Q., Xu, L., Xie, G., Li, J., Luo, J., . . . Li, J. (2014). Activation of Akt/mTOR pathway is associated with poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*, 9(8), e106098.

Wang, Y., Liu, X., Zhou, L., Zhu, H., Fan, Z., Li, Q. (2013). Effect of tanshinone IIA on angiogenesis in nude mice with colorectal cancer. *Zhongguo Shiyang Fangjixue Zazhi*, 19(3), 167-171.

Wang, Y., Zhang, J., & Gu, Z. (2009). Wnt/ β^2 -catenin signal pathway and malignant hematological disease. *Zhongguo Shiyang Xueyexue Zazhi*, 17(1), 234-237.

Wang, Y., Zhang, X., & Wang, H. (2011). Involvement of BMPR2 in the protective effect of fluoxetine against monocrotaline-induced endothelial apoptosis in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 89(5), 345-354.

Wang, Z., Huang, Y., & Zhang, J. (2014). Molecularly targeting the PI3K-akt-mTOR pathway can sensitize cancer cells to radiotherapy and chemotherapy. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 19(2), 233-242. doi:10.2478/s11658-014-0191-7

Wasserman, S., & Faust, K. (1994). *Social network analysis: Methods and applications*, Cambridge university press.

- Watson, S. (2001). Oncogenic targets of β -catenin-mediated transcription in molecular pathogenesis of intestinal polyposis. *The Lancet*, 357(9256), 572-573.
- Wattenberg, L. W. (1985). Chemoprevention of cancer. *Cancer Research*, 45(1), 1-8.
- Way, T., Huang, J., Chou, C., Huang, C., Yang, M., & Ho, C. (2014). Emodin represses TWIST1-induced epithelial–mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the β -catenin and akt pathways. *European Journal of Cancer*, 50(2), 366-378.
- Wei, W., Chua, M., Grepper, S., & So, S. (2010). Small molecule antagonists of Tcf4/ β -catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo. *International Journal of Cancer*, 126(10), 2426-2436.
- White, B. D., Chien, A. J., & Dawson, D. W. (2012). Dysregulation of wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*, 142(2), 219-232.
- Wiener, H. (1947). Structural determination of paraffin boiling points. *Journal of the American Chemical Society*, 69(1), 17-20.
- Wild, D. J. (2009). Mining large heterogeneous data sets in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.*, 4(10), 995-1004.
- Willett, P. (2006). Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. *Drug Discovery Today*, 11(23), 1046-1053.
- Wolin, E. M. (2013). PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in the therapy of pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Letters*, 335(1), 1-8.
- Wolle, D., Lee, S. J., Li, Z., Litan, A., Barwe, S. P., & Langhans, S. A. (2014). Inhibition of epidermal growth factor signaling by the cardiac glycoside ouabain in medulloblastoma. *Cancer Medicine*, 3(5), 1146-1158.
- Woo, K. J., Jeong, Y., Park, J., & Kwon, T. K. (2004). Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and akt inactivation in U937 leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(4), 1215-1222.
- Wozney, J. L., & Antonarakis, E. S. (2014). Growth factor and signaling pathways and their relevance to prostate cancer therapeutics. *Cancer and Metastasis Reviews*, 33(2-3), 581-594.
- Wu, Y., Antony, S., Meitzler, J. L., & Doroshow, J. H. (2014). Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. *Cancer Letters*, 345(2), 164-173.

Xia, J. J., Pei, L. B., Zhuang, J. P., Ji, Y., Xu, G. P., Zhang, Z. P., . . . Yan, J. L. (2010). Celecoxib inhibits beta-catenin-dependent survival of the human osteosarcoma MG-63 cell line. *The Journal of International Medical Research*, 38(4), 1294-1304.

Xiao, D., Li, M., Herman-Antosiewicz, A., Antosiewicz, J., Xiao, H., Lew, K. L., . . . Singh, S. V. (2006). Diallyl trisulfide inhibits angiogenic features of human umbilical vein endothelial cells by causing akt inactivation and down-regulation of VEGF and VEGF-R2. *Nutrition and Cancer*, 55(1), 94-107.

Xiaonan, W., Qing, W., Xu, Y., Liansheng, Z., Yiping, W., & Yanwen, S. (2011). Study of celastrol on akt signaling pathway and its roles in the apoptosis of K562 cells. *Journal of Cancer Therapy*, 2011.

Xie, R. H., Yin, M., Yin, C. C., Cheng, X. G., Xu, Z. W., Cao, X. Q., & Chen, W. C. (2014). Mechanism of chlorogenic acid on apoptosis of rat nucleus pulposus cells induced by oxidative stress. *Zhong Yao Cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese Medicinal Materials*, 37(3), 465-469.

Xiong, N., Cao, X., Zhang, Z., Huang, J., Chen, C., Zhang, Z., . . . Sun, S. (2010). Long-term efficacy and safety of human umbilical cord mesenchymal stromal cells in rotenone-induced hemiparkinsonian rats. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 16(11), 1519-1529.

Xu, H., Song, J., Gao, X., Xu, Z., Xu, X., Xia, Y., & Dai, Y. (2013). Paeoniflorin attenuates lipopolysaccharide-induced permeability of endothelial cells: Involvements of F-actin expression and phosphorylations of PI3K/Akt and PKC. *Inflammation*, 36(1), 216-225.

Yadav, V. R., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2012). Cardamonin sensitizes tumour cells to TRAIL through ROS-and CHOP-mediated up-regulation of death receptors and down-regulation of survival proteins. *British Journal of Pharmacology*, 165(3), 741-753.

Yan, Z., Zhu, Z., Wang, J., Sun, J., Chen, Y., Yang, G., . . . Deng, Y. (2013). Synthesis, characterization, and evaluation of a novel inhibitor of WNT/ β -catenin signaling pathway. *Molecular Cancer*, 12, 116/1-116/10. doi:10.1186/1476-4598-12-116

Yang, Y., Yang, J., Tao, H., & Jin, W. (2014). New perspectives on β -catenin control of cell fate and proliferation in colon cancer. *Food and Chemical Toxicology*, *74*, 14-19.

Yoon, S. O., Shin, S., Lee, H. J., Chun, H. K., & Chung, A. S. (2006). Isoginkgetin inhibits tumor cell invasion by regulating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Molecular Cancer Therapeutics*, *5*(11), 2666-2675. doi:5/11/2666 [pii]

Yoshimitsu, T., Ino, T., Futamura, N., Kamon, T., & Tanaka, T. (2009). Total synthesis of the β -catenin inhibitor, (-)-agelastatin A: A second-generation approach based on radical aminobromination. *Organic Letters*, *11*(15), 3402-3405.

Yuan, A., Chen, J., Yao, P., & Yang, P. (2005). The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci*, *10*, 853-865.

YuJun, H., BaoHua, L., DeBing, X., & JuXin, Z. (2009). Effects of caffeic acid phenethyl ester on the colorectal cancer via the β -catenin pathway. *Chinese Journal of Digestive Surgery*, *8*(4), 294-297.

Zaidi, M. R., & Merlino, G. (2011). The two faces of interferon-gamma in cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(19), 6118-6124. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0482 [doi]

Zanni, R., Gálvez-Llompart, M., Morell, C., Rodríguez-Henche, N., Díaz-Laviada, I., Recio-Iglesias, M. C., . . . Gálvez, J. (2015). Novel cancer chemotherapy hits by molecular topology: Dual akt and beta-catenin inhibitors. *PLoS ONE*, *10*(4), e0124244.

Zeller, J., Turbiak, A. J., Powelson, I. A., Lee, S., Sun, D., Showalter, H. H., & Fearon, E. R. (2013). Investigation of 3-aryl-pyrimido [5, 4-e][1, 2, 4] triazine-5, 7-diones as small molecule antagonists of β -catenin/TCF transcription. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *23*(21), 5814-5820.

Zhan, W., Li, D., Che, J., Zhang, L., Yang, B., Hu, Y., . . . Dong, X. (2014). Integrating docking scores, interaction profiles and molecular descriptors to improve the accuracy of molecular docking: Toward the discovery of novel Akt1 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *75*, 11-20.

Zhang, X. D., Gillespie, S. K., & Hersey, P. (2004). Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(2), 187-197.

Zhao, H., & Shao, S. (2014). Progress of signal pathway in ovarian cancer stem cells. *Jiepouxue Jinzhan*, 20(2), 174-177.

Zhao, S., Duan, H., Xu, Y., Lu, Y., & Jiang, Z. (2010). Effects of rhaponticin on proliferation of SK-BR-3 breast cancer cells. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 5, 017.

Referencias electronicas:

American Cancer Society (s.f.). Chemotherapy for colorectal cancer. Recuperado el 15 de junio, 2015, de <http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-treating-chemotherapy>

American Cancer Society (s.f.). Prostate Cancer. Recuperado el 25 de junio, 2015, de <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003134-pdf.pdf>

National Cancer Institute (s.f.). Drugs approved for prostate cancer. Recuperado el 25 de julio, 2015, de <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/prostatecancer>

MicroSource website [en línea]. Pure natural products [fecha de consulta: 6 Mayo 2015]. Base de datos disponible en: <http://www.msdiscovery.com/natprod.html>

Selleckchem website [en línea]. [Fecha de consulta: 28 Marzo 2015]. Base de datos disponible en: <http://www.selleckchem.com/>

Specs website. [en línea]. [Fecha de consulta: 2 Febrero 2015]. Base de datos disponible en: <http://www.Specs.net/>

UCLA: Statistical Consulting Group (s.f.). Introduction to SAS. Recuperado el 5 de septiembre, 2015, de <http://www.ats.ucla.edu/stat/sas/notes2/>

ANEXOS

VII. ANEXOS

ANEXO I. MATERIAL DE LABORATORIO

Material	Suministrado por
Agitador magnético	IKA® RCT Basic
Agitador orbital	Gyro-Rocker STR9 (Sigma-Aldrich)
Balanza de precisión	Sartorius
Baño termostatado con agitación	Julabo SW-20
Baño ultrasonidos	Branson Ultrasonics
Campana de flujo laminar	Telstar Bio-II-A V6.03
Centrífugas	Eppendorf 5810 R
	Hettich Mikko 200
Citómetro de flujo	BD FACSCanto™ II (BD Bioscience)
Congelador (-80 °C)	Esco Lexicon® ULT Freezer, Esco
Contador de células	Z2™ Series COULTER COUNTER®, Beckmann Coulter
Cubreobjetos de vidrio estériles 1,5 mm	Sigma-Aldrich
Espectrofotómetros	Multiskan EX Plate Reader Labsystems
	Victor™ X3 2030 Multilable Reader Perkin-Elmer
Estufa termostatada	Selecta
Frasco T-175 para cultivo celular	Sarstedt
Fuente de alimentación para electroforesis	Amersham Biosciences EPS-301
Homogenizador	Kinemática Polytron
Incubador	Thermo Electro Corp Hepa Class 00 (Thermoscientific)
Material quirúrgico (pinzas, tijeras)	Fine Science Tools
Membrana de transferencia , Amersham™ Hybond™ P 0,45 PVDF	GE Healthcare
Mezclador de vórtice	IKA® Vortex Genius 3
Microscópios	Nikkon Eclipse TE2000-S y E800
	Leica TCS SP5
Papel secante Whatman 3 MM	GE Healthcare
Parafilm	Sigma-Aldrich
Placas de 6 y de 96 pocillos	Sarstedt
Placas de 96 pocillos costar® (para ELISA)	Corning Incorporated
Placa de microtitulación	Deltalab
Películas fotográficas	Amersham Biosciences Hyperfilm™ ECL
pH-metro	Crison
Pipetas automáticas	Eppendorf Research
	Labnet, BioPette
	Multicanal BioPette
	Repetidora Bibby Step, Bibby Sterilin Ltd.
Puntas para pipetas automáticas	Deltalab
Sistemas de electroforesis vertical y de transferencia húmeda	Mini PROTEAN® Tetra cell, Bio-Rad
Sistema de purificación de agua Millipore	Milli-Q®, Merck Millipore
Tubos de polipropileno	Sarstedt

ANEXOS

Unidad de electroforesis horizontal	Biostep GH102
Unidad de transferencia semi-seca	Amersham Biosciences Hoefer™ TE 70
Ultrasonidos	Branson Sonifier® S-150

Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EE.UU.); BD Bioscience (San Jose, CA, EE.UU.); Bionline (Humber road, Londres); Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.); Bio-step (Burkhardtsdorf, Alemania); Bibby Sterilin Ltd. (Staffordshire Reino Unido); Branson Ultrasonics (Danbury, CT, EE.UU.); Corning Incorporated (Corning, NY, EE.UU.); Crison (Barcelona, España); Deltalab (Barcelona, España); Eppendorf Research (Hamburg, Alemania); Esco (Barnsley, Reino Unido); Fine Science Tools (Heidelberg, Alemania); GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Reino Unido); Hettich (Tuttlingen, Alemania); IKA (Staufen, Alemania); Julabo (Seelbach, Alemania); Labnet (Edison, NJ, EE.UU.); Leica (Paterna, España); Merck Millipore (Darmstadt, Alemania); Nikon (Barcelona, España); PerkinElmer (Massachusetts, EE.UU.); Sarstedt (Nürnbrecht, Alemania); Sartorius (Göttingen, Alemania); Selecta (Madrid, España); Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.); Telstar (Madrid, España)

ANEXO II. REACTIVOS

Sigma-Aldrich
Acetato de sodio
Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES)
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
Ácido sulfúrico
Acrilamida/bis-Acrilamida (30%)
Albúmina sérica bovina (BSA)
Aprotinina
Azida sódica
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB)
Cloruro de magnesio
Cloruro potásico
Dihidrógeno fosfato de potasio
Dimetilformamida (DMF)
Dimetilsulfóxido (DMSO)
Ditiotreitol (DTT)
Dodecilsulfatosódico (SDS)
Formaldehído
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)
Fluoruro de sodio
Glicerol
Glicina
Hidróxido de sodio
Igepal CA-630
Inhibidor de Akt IV
Inhibidor dual de Wnt/ β -catenina (FH535)
Leupeptina
Metanol
Nitrógeno líquido
Ortovanadato de sodio
Penicilina/Estreptomina
Pepstatina
Peróxido de hidrógeno
Persulfato de amonio (APS)
Reactivo de Bradford
Reactivo de Griess
Tetrametilbencidina (TMB)
Tetrametiletildiamina (TEMED)
Tris(hidroximetil)aminometano (Tris base)
Tris (hidroximetil) aminometano clorhidrato (Tris HCl)
Trinitroclorobenceno (TNCB)

Tritón X-100
Tween® 20
Tween® 80
PBS estéril
Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)
Tripsina
Otros
Cóctel de inhibidores de proteasas (Roche)
Dextrano sulfato sódico (DSS) (MP Biomedicals)
Inhibidor de referencia de la vía PI3K/Akt/mTOR (LY294002) (Deltaclon)
Inhibidor de referencia ciclina (AT7519) (Deltaclon)
Leche en polvo desnatada (Central Lechera Asturiana)
Membrana de PVDF Hybond™-P (GE Healthcare)
Patrón de proteína de peso molecular (Bio-Rad)
Proteína humana recombinante Wnt3 (R&D Systems)
Tampón reductor (Pierce Biotechnology)

Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.); Central Lechera Asturiana (Granda-Siero, Asturias, España); Deltaclon (Madrid, España); MP Biomedicals (Santa Ana, CA, EE.UU.); Pierce Biotechnology (Rockford, IL, EE.UU.); Roche (Basel, Suiza); Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)

ANEXO III. ANTICUERPOS Y KITS

Anticuerpos primarios	Compañía
Akt	Cell Signalling Technology
β -actina	Santa Cruz Biotechnology
β -catenina	Santa Cruz Biotechnology
β -tubulina	Sigma-Aldrich
Ciclina D1	Merck Millipore
COX-2	Merck Millipore
iNOS	Abcam
mTOR	Cell Signalling Technology
p65	Merck Millipore
p-Akt-ser473	Cell Signalling Technology
p-mTOR	Cell Signalling Technology
Anticuerpos secundarios	Company
IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa	Santa Cruz Biotechnology
IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa	Santa Cruz Biotechnology
Kits	Company
Kit de Elisa para la determinación de IL-6 en ratones	eBioscience
Reactivo de quimioluminiscencia	Merck Millipore

Abcam (Cambridge, Reino Unido); Cell Signaling Technology (Beverly, CA, EE.UU.); eBioscience (San Diego, CA, EE.UU.); (Merck Millipore (Darmstadt, Alemania); Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.)

ANEXO IV.COMPOSICIÓN DE TAMPONES

IV.1.Tampones para preparación de muestras (*Western blot*, citocina y mieloperoxidasa)

Tampón muestras (<i>Western blot</i>)		Condiciones de centrifugación
HEPES pH 7.8	10 mM	2 500 x g durante 10 min a 4°C
KCl	10 mM	
MgCl ₂	1.5 mM	
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	0.5 mM	
Aprotinina	1 mM	
Leupeptina	1 mM	
Pepstatina A	1 mM	
NaF	25 mM	
Na ₃ VO ₄	2 mM	
Ditiotreitol (DTT)	0.5 mM	
Inhibidor polivalente de proteasas	1 comprimido/10 mL	
Tampón muestras (actividad mieloperoxidasa)		Condiciones de centrifugación
Tampón fosfato sódico	80 mM	11300 x g durante 20 min a 4°C
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB).	0,5 % (p/v)	
Tampón muestras (determinación de IL-6)		Condiciones de centrifugación
Tampón PBS con Igepal CA-630	0,1 % (p/v)	20.000 x g durante 10 min a 4°C
Inhibidor polivalente de proteasas	1 comprimido/10 mL	

IV.2. Tampones para *Western blot*

Tampones para <i>Western blot</i>		
Tampón <i>Running</i> (10 x)	Tris Base Glycine SDS H ₂ O millipore	30.3 g 144.0 g 10.0 g c.s.p. 1 L
Tampón de transferencia (10 x)	Tris Base Glycine H ₂ O millipore	30.3 g 14.0 g c.s.p. 1 L
Tampón de transferencia (1 x)	Tampón de tranferencia (10 x) Metanol H ₂ O distilled	250 mL 500 mL 1750 mL

IV.3. Otros tampones

Tampón PBS (20 x)	
NaCl	160 g
Na ₂ HPO ₄	23.2 g
KH ₂ PO ₄	4 g
KCl	4 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 L
Tampón PBS-Tween	
PBS con Tween 20	0.5%

IV.4. Composición geles (Western Blot)

Composición geles (Western blot)	Running gel (10%)	Stacking gel (5%)
H ₂ O millipore	4.0 mL	2.1 mL
Solución acrilamida/bis-acrilamida 30% (p/v)	3.3 mL	0.5 mL
1.5 M Tris base (pH 8.3)	2.5 mL	-
1 M Tris HCl (pH 6.8)	-	0.38 mL
SDS 10% (p/v)	0.1 mL	0.03 mL
APS 10% (p/v)	0.1 mL	0.03 mL
TEMED	0.004 mL	0.003 mL

ANEXO V. INFORMACIÓN ADICIONAL SOBRE LOS MODELOS TOPOLÓGICOS

Anexo V.1. Compuestos que conforman el grupo de entrenamiento del modelo 1 y valores de FD_1 asociados a estos.

Compuestos	nR09	Wap	EEig11r	FD_1	Clas.	P. A.
Grupo Activo						
Adenosinemonophosphate [251]	1	9225	0.811	-1.252	I	0.222
Berbamine [252]	0	956363	2.969	0.168	A	0.540
Calcidiol [253]	1	17594	1.832	1.032	A	0.737
Celastrol [254]	0	93004	2.186	2.487	A	0.923
Chlorogenic acid [255]	0	5830	1.002	0.206	A	0.551
Enoxolone [256]	0	99722	2.231	2.558	A	0.928
Gambogic acid amide [257]	2	367988	3.156	1.375	A	0.798
Geneticin [258]	0	22326	1.786	1.912	A	0.871
Ginkgolide B [259]	1	94014	2.075	1.222	A	0.772
Hederagenin [260]	0	98135	2.179	2.447	A	0.920
Hesperidin [261]	0	67545	2.892	4.215	A	0.985
Hyperforin [262]	0	17839	2.138	2.735	A	0.939
Isoginkgetin [263]	0	192923	2.707	3.198	A	0.961
Kojic acid [264]	0	320	0	-2.048	I	0.114
Madecassic acid [265]	0	111544	2.452	3.005	A	0.953
Mangiferin [266]	0	36882	1.788	1.848	A	0.864
Naringin [267]	0	97739	2.865	4.01	A	0.982
Pomiferin [268]	0	35525	2.084	2.528	A	0.926
Ouabain [269]	1	180066	2.865	2.612	A	0.932
Palmatine [270]	0	31467	1.487	1.188	A	0.766
Peoniflorin [271]	1	34902	2.075	1.503	A	0.818
Piperine [272]	1	6450	1.222	-0.303	I	0.425
Pristimerin [273]	0	100629	2.187	2.453	A	0.921
Quercetin [274]	0	8350	0.88	-0.084	I	0.479
Rhapontin [275]	0	17239	1.766	1.891	A	0.869
Rutin [266]	0	98059	2.876	4.034	A	0.983
Silibinin [276]	0	81287	2.461	3.169	A	0.960
Sitosterol [277]	1	40984	1.996	1.295	A	0.785
Ursolic acid [278]	0	90531	2.277	2.706	A	0.937
Vitamin E [279]	0	12536	1.827	2.052	A	0.886
Grupo Inactivo						
2,6-Dimethoxyquinone	0	506	-0.882	-4.057	I	0.017
2-Acetylpyrrole	0	159	0	-2.048	I	0.114
3,4-Dimethoxydalbergione	0	3238	0.9	-0.014	I	0.497
7,2-Dihydroxyflavone	0	5633	0.463	-1.02	I	0.265
7,4-Dihydroxyflavone	0	5907	0.666	-0.559	I	0.364
7,8-Dihydroxyflavone	0	5762	0.515	-0.902	I	0.289

Acetoxyphenol	0	409	-1	-4.325	I	0.013
Aconitine	3	489529	2.79	-1.043	I	0.260
Agmatine	0	114	0	-2.047	I	0.114
Alizarin	0	17132	1.73	1.81	A	0.859
Arecoline	0	397	-1.036	-4.407	I	0.012
Artemisinin	0	15916	0.85	-0.188	I	0.453
Asarylaldehyde	0	754	-0.768	-3.799	I	0.022
Azelaicacid	0	344	-0.737	-3.726	I	0.024
Baicalein	0	6474	0.661	-0.573	I	0.360
Betaine	0	66	0	-2.047	I	0.114
Bicuculline (+)	3	77053	2.106	-0.641	I	0.345
Biochanin A	0	7728	0.873	-0.096	I	0.476
Brucine	6	280357	2.176	-4.469	I	0.011
Caperatic acid	0	2707	1.352	1.018	A	0.735
Capsaicin	0	2688	0.753	-0.346	I	0.414
Carnitine	0	170	0	-2.048	I	0.114
Cevadine	2	1106372	2.929	-2.65	I	0.065
Cineole	0	636	-1	-4.326	I	0.013
Citrinin	0	3002	-0.009	-2.082	I	0.111
Cotarnine	1	4474	0.086	-2.88	I	0.053
Cotinine	0	1114	-0.596	-3.409	I	0.032
Crassin Acetate	0	10720	1.227	0.695	A	0.667
Daidzein	0	5920	0.593	-0.725	I	0.326
Desoxyepanganine	1	2788	-0.511	-4.23	I	0.014
Digitoxin	1	1067756	2.987	-1.327	I	0.208
Digoxina	1	1102711	3.046	-1.359	I	0.203
Epicatechin	0	7642	0.595	-0.729	I	0.325
Esculetin	0	1405	-0.507	-3.208	I	0.039
Eugenol	0	521	-0.871	-4.032	I	0.017
Folic acid	0	23186	2	2.395	A	0.916
Formononetin	0	6847	0.759	-0.352	I	0.413
Galanthamine	2	17777	0.884	-2.134	I	0.106
Geranylgeranio	0	194	0	-2.048	I	0.114
Harmaline	2	4686	0.204	-3.619	I	0.026
Hinokitiol	0	537	-0.87	-4.03	I	0.017
Huperzinea	0	6120	0.476	-0.992	I	0.270
Hydrocotarnine	1	4474	0.086	-2.88	I	0.053
Inositol	0	486	-0.677	-3.59	I	0.027
Menadione	0	1380	-0.516	-3.228	I	0.038
Menthol	0	399	-1	-4.325	I	0.013
Morin	0	8350	0.812	-0.238	I	0.441
Theobromine	1	1297	-0.554	-4.321	I	0.013
Colchiceine	0	19381	1.604	1.512	A	0.819
Deltaline	4	273281	2.216	-2.33	I	0.088
1r,9s-Hydrastine	2	50420	1.998	0.247	A	0.561

Melatonin	1	2735	0.121	-2.792	I	0.058
Ajmaline	5	79223	1.779	-3.41	I	0.032
Salsolidine	0	1994	-0.332	-2.812	I	0.057
Vincamine	3	55671	1.602	-1.686	I	0.156
Vindoline	4	82993	2.04	-1.826	I	0.139
Dihydrojasmonic Acid, Methyl Ester	0	1100	-0.219	-2.551	I	0.072
Penicillic Acid	0	441	-0.858	-4.002	I	0.018
Diprotin A	0	2894	1.104	0.452	A	0.611
Albizziine	0	136	0	-2.048	I	0.114
D,L-Threo-3-hydroxyaspartic acid	0	121	0	-2.047	I	0.114
Rutilantinone	0	44306	1.733	1.687	A	0.844
Dihydromyristicin	1	1564	-0.596	-4.418	I	0.012
Paeonol	0	504	-0.867	-4.023	I	0.018
Apiole	1	2128	0	-3.064	I	0.045
4-O-Methylphloracetophenone	0	611	-0.691	-3.623	I	0.026
Acetosyringone	0	742	-0.647	-3.523	I	0.029
Eupatoriocromene	0	2292	0	-2.058	I	0.113
Inosine	1	5729	0.593	-1.731	I	0.150
Salicin	0	3461	0.606	-0.684	I	0.335
Khellin	1	6541	0.531	-1.876	I	0.133
Citropten	0	1988	-0.137	-2.368	I	0.086
Pachyrrhizin	2	35654	1.801	-0.131	I	0.467
Pteryxin	0	17482	1.508	1.303	A	0.786
Evernic Acid	0	5305	0.836	-0.169	I	0.458
Norstictic Acid	1	31955	1.439	0.07	A	0.517
Colforsin	0	17727	1.412	1.083	A	0.747
Salvinorin B	0	24940	1.557	1.379	A	0.799
Salvinorin A	0	31497	1.747	1.78	A	0.856
Eupatorin	0	11901	1.267	0.781	A	0.686
Ligustilide	1	1604	-0.329	-3.811	I	0.022
Griseofulvin	1	10354	1.181	-0.415	I	0.398
Ichthyone	1	57899	2.038	1.31	A	0.787
Protoporphyrin IX	0	193446	2.735	3.26	A	0.963
Quassin	0	36221	1.719	1.694	A	0.845
Cryptotanshinone	1	18983	0.976	-0.923	I	0.284
Pachyrrhizone	2	98597	2.037	0.107	A	0.526
Pseudo-Anisatin	2	7744	0.395	-3.199	I	0.039
Frequentin	0	1551	0.181	-1.642	I	0.162
Abcisic Acid (Cis,Trans; +/-)	0	1582	0	-2.054	I	0.114
Chrysanthemic Acid, Ethyl Ester	0	641	-0.553	-3.309	I	0.035
Dihydrocelastryl Diacetate	0	145616	2.515	2.986	A	0.952
Beta-escin	0	2437316	3.533	-5.582	I	0.004
Nonylphenol	0	1178	0	-2.052	I	0.114
Norharman	2	2805	-0.234	-4.607	I	0.010
Octopamine	0	397	-1	-4.325	I	0.013

Patulin	1	879	-0.998	-5.33	I	0.005
Picrotin	3	28432	0.552	-3.947	I	0.019
Picrotoxinin	3	25486	0.545	-3.949	I	0.019
Pimpinellin	1	5840	0.361	-2.26	I	0.094
Plectocomine Methyl Ether	2	3979	-0.013	-4.11	I	0.016
Purpurin	0	6999	0.446	-1.065	I	0.256
Purpurogallin	0	2433	-0.324	-2.796	I	0.058
Pyridoxine	0	506	-0.775	-3.813	I	0.022
Pyrocatechuic acid	0	399	-1	-4.325	I	0.013
Reserpine	2	280011	2.751	0.871	A	0.704
Resveratrol	0	2319	0.076	-1.885	I	0.132
Retinol	0	2271	0.659	-0.558	I	0.364
Safrole	1	1090	-0.727	-4.714	I	0.009
Scopoletin	0	1687	-0.356	-2.865	I	0.054
Securinine	2	7901	0.2	-3.644	I	0.025
Sennoside	0	1234645	3.327	-0.339	I	0.413
Tannicacid	0	1596253	3.956	-0.624	I	0.345
Theaflavindigallate	0	802628	3.215	1.459	A	0.810
Thiamine	0	2646	0.263	-1.461	I	0.188
Trigonelline	0	314	0	-2.048	I	0.114
Tryptamine	2	13238	0.634	-2.681	I	0.064
Umbelliferone	0	1163	-0.793	-3.857	I	0.021
Ursodiol	1	34454	1.694	0.638	A	0.654
Usnic acid	2	13147	1.065	-1.7	I	0.155
Xanthopterin	0	1402	-0.537	-3.276	I	0.036
Xanthurenicacid	0	1964	-0.23	-2.58	I	0.070
Yohimbine	2	55192	1.739	-0.365	I	0.410

FD: Función discriminante.

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

P.A.: probabilidad de que el compuesto sea activo.

nR09: número de anillos de 9 miembros.

Wap: índice de Wiener de todos los caminos.

EEig11r: autovalor número 11 de la matriz de adyacencia de aristas ponderada por integrales de resonancia.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.2. Compuestos que conforman el grupo de test del modelo 1 y valores de FD_1 asociados a estos.

Compuestos	nR09	Wap	EEig11r	FD_1	Clas.	P. A.
Grupo Activo						
Betulinic acid [280]	1	88997	2.169	1.46	A	0.811
Calcitriol [281]	1	19531	1.872	1.11	A	0.753
Camphor [282]	0	729	-0.81	-3.89	I	0.020
Cholecalciferol [283]	1	16108	1.797	0.96	A	0.723
Cosmosiin [284]	0	32090	2	2.35	A	0.913
Embelin [285]	0	2470	0.675	-0.52	I	0.372
Ergosterol [286]	1	37919	1.937	1.18	A	0.764
Fisetin [287]	0	7447	0.799	-0.26	I	0.434
Grupo Inactivo						
6,4-Dihydroxyflavone	0	5907	0.471	-1.00	I	0.268
Anethole	0	422	-1	-4.33	I	0.013
Anisodamine	0	6614	0.85	-0.14	I	0.464
Avocadene	0	1233	0.446	-1.04	I	0.262
Canavanine	0	247	-0.978	-4.27	I	0.014
Cantharidin	1	2566	-0.37	-3.91	I	0.020
Cedrol	0	3796	-0.077	-2.24	I	0.096
Chrysanthemic acid	0	414	-0.847	-3.98	I	0.018
Chrysin	0	5761	0.469	-1.01	I	0.268
Creatinine	0	164	0	-2.05	I	0.114
Dantron	0	6228	0.456	-1.04	I	0.261
Emodic acid	0	10142	0.707	-0.49	I	0.381
Erysolin	0	198	0	-2.05	I	0.114
Estragole	0	506	-0.891	-4.08	I	0.017
Fusidic acid	1	62762	2.47	2.27	A	0.906
Glutathione	0	969	0.083	-1.86	I	0.134
Guvacine	0	239	0	-2.05	I	0.114
Harmalol	2	3979	-0.188	-4.51	I	0.011
Harmane	2	3352	-0.193	-4.52	I	0.011
Icariin	0	99894	3.001	4.31	N.C.	0.987
Mimosine	0	742	-0.472	-3.13	I	0.042
Naringenin	0	6688	0.723	-0.43	I	0.393
Lappaconitine	3	391443	2.742	-0.69	I	0.334
Colchicine	0	21224	1.622	1.54	A	0.824
1-Methylxanthine	1	1059	-0.685	-4.62	I	0.01
Piplartine	0	4641	1.141	0.53	A	0.629
Salsoline	0	1685	-0.418	-3.01	I	0.047
Strychnine	6	192569	2.009	-4.43	I	0.012
Kinetin	1	3422	-0.081	-3.26	I	0.037
Kainic Acid	0	851	-0.15	-2.39	I	0.084
Physcion	0	9087	0.681	-0.54	I	0.368

FD: Función discriminante.

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

P.A.: probabilidad de que el compuesto sea activo.

nR09: número de anillos de 9 miembros.

Wap: índice de Wiener de todos los caminos

EEig11r: autovalor número 11 de la matriz de adyacencia de aristas ponderada por integrales de resonancia.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.3. Compuestos que conforman el grupo de entrenamiento del modelo 2 y valores de FD₂ asociados a estos.

Compuestos	T(O..Br)	SRW08	MPC04	piPC02	piPC05	FD ₂	Clas.	P.A.
Grupo Activo								
1,3-Dihydro-1-(1-((4-(6-Phenyl-1h-Imidazo[4,5-G]Quinoxalin-7-Yl)Phenyl)Methyl)-4-Piperidiny)-2h-Benzimidazol-2-One [290]	0	9342	142	4.745	6.468	5.55	A	0.945
10-(4'-(N-Diethylamino)Butyl)-2-Chlorophenoxazine [290]	0	4432	62	3.97	5.576	1.09	I	0.450
1l6-Hydroxymethyl-Chiro-Inositol-2-(R)-2-O-Methyl-3-O-Octadecyl-Sn-Glycerocarbonate [291]	0	5016	63	3.932	4.331	1.95	A	0.620
A-66 [289]	0	4856	68	4.234	5.771	2.38	A	0.724
AT7867 [288]	0	5054	69	4.094	5.587	1.56	A	0.522
Balanol [292]	0	8466	115	4.585	5.994	3.41	A	0.721
CCT128930 [288]	0	5010	67	4.078	5.525	1.38	I	0.480
Erlotinib [293]	0	4758	68	4.19	5.835	2.19	A	0.691
Gefitinib [294]	0	5620	76	4.263	5.802	2.07	A	0.608
GSK690693 [288]	0	6136	88	4.290	5.858	2.76	A	0.726
H-89 [295]	26	4718	59	4.248	5.717	3.50	A	0.895
Miltefosine [288]	0	2768	25	3.555	3.296	0.65	I	0.461
MK-2206 [288]	0	7984	103	4.466	6.227	1.59	A	0.325
Perifosine [288]	0	3758	40	3.738	3.892	0.85	I	0.440
PF-04691502 [288]	0	6332	90	4.277	5.889	2.51	A	0.661
SH-5 [296]	0	5108	61	3.97	4.357	1.68	A	0.549
SH-6 [296]	0	4628	53	3.912	4.174	1.50	A	0.538
Staurosporine [297]	0	10764	185	4.595	6.617	7.40	A	0.986
TIC10 [288]	0	6190	91	4.277	5.694	3.26	A	0.812
Triciribine [288]	0	5676	86	4.025	5.684	2.04	A	0.598
Grupo Inactivo								
Acarbose	0	9606	122	4.304	5.182	1.72	A	0.256
Acebutolol	0	3276	40	3.807	4.949	0.44	I	0.374
Aceclidine	0	2362	29	3.045	3.738	-1.94	I	0.068
Acedapsone	0	4168	48	4.127	5.468	0.86	I	0.413
Acetaminophen	0	1430	16	3.219	4.344	-1.80	I	0.098
Acetanilide	0	1172	14	3.091	4.143	-2.02	I	0.086
Acetarsol	0	2662	26	3.611	4.828	-1.27	I	0.114
Acetazolamide	0	2134	22	3.555	4.22	-0.07	I	0.333
Acetriazoic acid	0	2924	36	3.664	4.956	-0.31	I	0.238
Acetylcholine	0	1098	6	2.708	1.946	-1.6	I	0.128
Acetylcysteine	0	1046	9	2.773	2.565	-1.74	I	0.115
Acyclovir	0	2782	40	3.555	4.883	-0.04	I	0.300

Adenosinephosphate	0	4866	65	3.97	5.236	1.21	I	0.449
Adiphenine	0	3376	46	3.85	5.17	0.95	I	0.492
Adrenalinebitartrate	0	1872	19	3.258	4.466	-2.24	I	0.058
Aklomide	0	2146	23	3.466	4.691	-1.32	I	0.125
Alaproclate	0	2698	27	3.555	4.489	-0.98	I	0.146
Albendazole	0	2810	40	3.689	5.094	0.38	I	0.393
Albuterol	0	2762	27	3.526	4.644	-1.55	I	0.087
Alendronate	0	3134	19	3.332	2.485	-0.91	I	0.139
Alfluzosin	0	4984	67	4.094	5.595	1.41	I	0.490
Algesteroneacetophenide	0	10344	143	4.357	5.7	2.57	A	0.393
Aliskirenhemifumarate	0	6018	64	4.205	5.069	0.53	I	0.227
Allopurinol	0	1834	25	3.296	4.635	-1.39	I	0.127
Alprenolol	0	2228	27	3.466	4.575	-0.74	I	0.199
Althiazide	0	4778	56	4.111	5.416	0.73	I	0.340
Alverinecitrate	0	2580	33	3.714	4.812	0.52	I	0.443
Amantadine	0	3326	42	3.091	4.007	-2.26	I	0.038
Amikacin	0	8080	101	4.159	4.89	1.49	I	0.298
Amiloride	0	2490	28	3.584	4.779	-0.74	I	0.188
Aminocaproic acid	0	560	5	2.398	1.792	-2.34	I	0.076
Aminoglutethimide	0	3628	42	3.664	4.875	-0.76	I	0.140
Aminohippuric acid	0	1876	20	3.434	4.533	-1.12	I	0.158
Aminosalicilate	0	1762	19	3.296	4.443	-1.74	I	0.095
Amiodarone	0	5582	80	4.248	5.781	2.64	A	0.735
Amitraz	0	3506	41	3.989	5.352	0.56	I	0.388
Amitriptyline	0	3738	55	3.932	5.583	1.26	I	0.545
Amlodipine	0	5006	73	4.094	5.583	2.21	A	0.680
Amodiaquine	0	4570	61	4.111	5.714	1.32	I	0.498
Amoxapine	0	4430	66	4.025	5.724	1.73	A	0.609
Amoxicillin	0	6534	76	4.043	5.182	-0.07	I	0.122
Amphotericinb	0	10550	130	4.71	5.407	3.08	A	0.505
Amprolium	0	2930	37	3.761	5.17	0.05	I	0.310
Ampyzinesulfate	0	1158	12	2.944	4.043	-3.01	I	0.034
Anethole	0	1362	16	3.178	4.443	-2.09	I	0.077
Aniracetam	0	2710	35	3.584	4.745	-0.16	I	0.279
Anthralin	0	3998	56	3.892	5.572	0.65	I	0.375
Apomorphine	0	5218	75	4.007	5.823	1.1	I	0.398
Apramycin	0	8304	107	4.111	4.942	1.47	I	0.281
Aripiprazole	0	5478	72	4.19	5.509	1.85	A	0.565
Armodafinil	0	3000	42	3.807	5.153	0.91	I	0.510
Ascorbic acid	0	2060	24	3.178	3.784	-1.26	I	0.134
Ascorbylpalmitate	0	3430	43	3.784	4.22	1.64	A	0.656
Atenolol	0	2342	27	3.555	4.595	-0.45	I	0.244
Atomoxetine	0	2796	37	3.714	5.03	0.27	I	0.366
Atovaquone	0	5714	78	4.205	5.765	1.86	A	0.550
Atropineoxide	0	4652	59	3.871	4.883	0.8	I	0.366

Atropinesulfate	0	3966	55	3.738	4.787	0.96	I	0.452
Avobenzone	0	4104	44	4.007	5.313	-0.04	I	0.225
Azaperone	0	3860	49	3.951	5.165	1.03	I	0.478
Azithromycin	0	11160	129	4.454	5.056	0.73	I	0.075
Aztreonam	0	6606	63	4.22	4.934	-0.46	I	0.084
Bacampicillin	0	7260	88	4.19	5.204	1	I	0.249
Bacitracin	0	15218	199	5.209	5.999	5.31	A	0.709
Bekanamycin	0	7102	88	3.97	4.71	0.79	I	0.219
Benazepril	0	5074	71	4.19	5.434	2.65	A	0.765
Bendroflumethiazide	0	6378	75	4.357	5.775	1.05	I	0.310
Benserazide	0	2788	28	3.611	4.585	-0.83	I	0.162
Benurestat	0	1994	21	3.466	4.543	-1.04	I	0.165
Benzbromarone	30	4644	65	4.094	5.7	3.83	A	0.923
Benzethonium	0	5102	55	4.094	5.165	0.27	I	0.228
Benzocaine	0	1620	18	3.258	4.431	-1.81	I	0.092
Benzoylpas	0	3172	39	3.871	5.193	0.49	I	0.394
Benzoylperoxide	0	2630	32	3.761	4.997	0.26	I	0.377
Benzthiazide	0	5592	67	4.344	5.787	1.43	I	0.451
Benzylbenzoat	0	2246	28	3.638	4.89	-0.1	I	0.319
Bepheniumhydroxynapthoate	0	2824	33	3.714	4.844	-0.02	I	0.301
Bepidil	0	3958	56	3.951	5.112	1.89	A	0.676
Beta-Carotene	0	6498	70	4.466	5.46	1.35	I	0.368
Betahistine	0	1048	13	2.944	4.06	-2.68	I	0.048
Betaine	0	974	6	2.565	0	1.09	I	0.690
β-Propiolactone	0	866	2	2.197	0	-1.55	I	0.142
Bethanechol	0	1364	11	2.833	1.946	-0.66	I	0.257
Bezafibrate	0	4172	43	4.043	5.22	0.07	I	0.241
Bifonazole	0	4350	65	4.143	5.714	2.51	A	0.776
Biotin	0	2502	37	3.332	3.85	0.48	I	0.440
Bisacodyl	0	4558	64	4.205	5.72	2.33	A	0.732
Bisoprololfumarate	0	2614	30	3.611	4.585	-0.21	I	0.274
Bithionate	0	3668	44	3.912	5.293	0.27	I	0.310
Bromhexine	0	3118	38	3.611	4.762	-0.43	I	0.208
Bromindione	14	3852	56	3.912	5.525	2.17	A	0.742
Bromocriptinemesylate	60	11998	179	4.625	6.146	9.48	N.C.	0.998
Bromperidol	19	4788	55	4.06	5.293	1.85	A	0.614
Brompheniraminemaleate	0	2920	38	3.738	5.13	0.13	I	0.328
Brucine	14	3852	56	3.912	5.525	2.17	A	0.742
Bumetanide	0	4396	55	4.143	5.613	1.22	I	0.485
Bupivacaine	0	3472	45	3.714	4.812	0.38	I	0.348
Bupropion	0	2636	27	3.526	4.575	-1.18	I	0.125
Buspirone	0	5362	72	4.007	4.97	1.86	A	0.576
Butacaine	0	2556	31	3.611	4.605	0.01	I	0.324
Butamben	0	1760	20	3.332	4.477	-1.43	I	0.125
Butoconazole	0	4022	53	4.06	5.231	1.83	A	0.659

Caffeine	0	3242	42	3.526	4.754	-0.65	I	0.170
Candesartan	0	8432	128	4.673	6.252	5.37	A	0.949
Canrenoic acid	0	7406	92	4.043	5.268	0.23	I	0.128
Canrenone	0	7754	104	4.06	5.361	1.13	I	0.245
Capobenic acid	0	3234	41	3.784	5.011	0.41	I	0.370
Capsaicin	0	2688	31	3.714	4.7	0.22	I	0.364
Carbachol	0	1098	6	2.708	1.946	-1.6	I	0.128
Carbamazepine	0	3608	54	3.892	5.602	1.1	I	0.514
Carbenicillin	0	6692	82	4.078	5.187	0.65	I	0.215
Carbinoxamine	0	2990	39	3.761	5.13	0.27	I	0.355
Carisoprodol	0	2218	21	3.296	3.332	-0.48	I	0.245
Cefaclor	0	5908	68	4.025	5.204	-0.06	I	0.144
Cefadroxil	0	6166	70	4.078	5.278	-0.1	I	0.131
Cefamandole	0	7136	87	4.277	5.442	1.25	I	0.305
Cefdinir	0	6252	77	4.127	5.257	1.03	I	0.312
Cefditorin	0	8824	105	4.543	5.649	1.65	A	0.286
Cefonicid	0	7972	96	4.454	5.565	1.71	A	0.353
Cefoperazone	0	9952	124	4.605	5.743	2.23	A	0.340
Cefotaxime	0	6664	83	4.22	5.333	1.48	I	0.387
Cefprozil	0	6378	75	4.143	5.429	0.31	I	0.176
Cefsulodin	0	8526	103	4.533	5.79	1.67	A	0.308
Ceftibuten	0	6106	73	4.143	5.204	0.96	I	0.308
Ceftriaxone	0	8218	102	4.443	5.617	1.88	A	0.376
Cephalexin	0	5908	68	4.025	5.204	-0.06	I	0.144
Cephalothin	0	5816	71	4.06	5.063	0.99	I	0.332
Cephradine	0	5908	68	3.989	5.056	-0.04	I	0.148
Cetirizine	0	4362	60	4.025	5.323	1.73	A	0.613
Chenodiol	0	7402	99	3.951	4.934	1.19	I	0.278
Chloramphenicol	0	3084	33	3.689	4.754	-0.54	I	0.191
Chlorcyclizine	0	3762	52	3.85	5.273	0.82	I	0.433
Chlormadinoneacetate	0	8282	109	4.159	5.442	1.24	I	0.237
Chlorocresol	0	1362	13	3.091	4.205	-2.64	I	0.046
Chloroguanide	0	2210	26	3.555	4.477	-0.12	I	0.318
Chlorotrianisene	0	4782	64	4.22	5.872	1.72	A	0.581
Chloroxine	0	2708	34	3.584	5.159	-1	I	0.143
Chlorpheniramine	0	2920	38	3.738	5.13	0.13	I	0.328
Chlorpropamide	0	2670	28	3.714	4.71	-0.17	I	0.280
Chlorprothixene	0	4118	58	3.97	5.707	0.94	I	0.436
Chlortetracycline	0	9872	134	4.443	6.04	2.23	A	0.347
Chlorthalidone	0	5456	69	4.174	5.704	1.05	I	0.370
Chlorzoxazone	0	2020	28	3.401	4.844	-1.06	I	0.162
Cholecalciferol	0	5552	72	3.951	4.913	1.23	I	0.406
Choline	0	772	3	2.197	0	-1.22	I	0.190
Ciclopirox	0	2744	35	3.434	4.533	-0.81	I	0.167
Cilostazol	0	4700	67	4.043	5.252	2.25	A	0.707

Cimetidine	0	1898	24	3.466	3.829	0.79	I	0.558
Cinchonine	0	5146	71	3.932	5.481	0.82	I	0.336
Ciprofloxacin	0	5534	74	4.06	5.609	1.03	I	0.360
Citalopram	0	4888	67	4.043	5.609	1.26	I	0.460
Clarithromycin	0	11352	131	4.477	5.13	0.63	I	0.065
Clavulanate	0	3502	42	3.401	4.369	-1.29	I	0.091
Clemastine	0	4492	56	3.951	5.252	0.58	I	0.326
Clofazimine	0	6918	100	4.5	6.277	3.43	A	0.806
Clofibrate	0	2584	25	3.497	4.5	-1.4	I	0.104
Clomiphenecitrate	0	4662	64	4.205	5.787	2.01	A	0.658
Clomipramine	0	4004	58	3.932	5.476	1.33	I	0.541
Clonidine	0	2286	30	3.497	4.635	-0.35	I	0.265
Clopidogrel	0	4054	58	3.892	5.112	1.6	A	0.604
Clopidol	0	2094	20	3.332	4.489	-2.12	I	0.061
Clotrimazole	0	5492	84	4.19	5.894	2.81	A	0.772
Cloxyquin	0	2370	30	3.497	5.063	-1.26	I	0.125
CoenzymeB12	0	26688	396	5.529	7.01	9.63	N.C.	0.869
Colistimethate	0	15670	172	5.328	5.642	2.06	A	0.076
Colistin	0	11510	146	4.868	5.485	4.21	A	0.704
Cotinine	0	2256	30	3.367	4.511	-0.9	I	0.175
Cresol	0	1426	13	3.091	4.111	-2.61	I	0.046
Cromolyn	0	6854	93	4.454	5.984	2.82	A	0.696
Crotamiton	0	2226	28	3.466	4.615	-0.67	I	0.211
Cyclizine	0	3504	50	3.784	5.198	0.78	I	0.441
Cyclobenzaprine	0	3552	54	3.932	5.69	1.32	I	0.571
Cycloserine	0	898	9	2.485	1.946	-2.18	I	0.080
Cyclosporine	0	14350	177	4.984	5.645	3.23	A	0.281
Cyclothiazide	0	6326	82	4.263	5.609	1.81	A	0.494
Cyproheptadine	0	4510	68	4.06	5.808	1.92	A	0.647
Cyproterone	0	8980	113	4.143	5.472	0.24	I	0.085
Dantrolene	0	3990	54	4.06	5.338	1.84	A	0.665
Dapsone	0	3372	36	3.912	5.303	-0.25	I	0.225
Debrisoquinsulfate	0	2344	29	3.401	4.673	-1.27	I	0.124
Decoquinatate	0	4546	63	4.06	5.624	1.48	I	0.539
Demeclocycline	0	9162	127	4.407	5.984	2.57	A	0.477
Denatoniumbenzoate	0	4146	50	3.97	5.159	0.73	I	0.383
Desipramine	0	3552	54	3.829	5.425	1.13	I	0.524
Dexlansoprazole	0	4714	59	4.127	5.541	1.15	I	0.446
Dexpanthenol	0	1942	14	2.996	2.565	-1.45	I	0.118
Dexpropranolol	0	2952	38	3.689	5.165	-0.3	I	0.239
Dextromethorphan	0	5498	77	3.807	5.394	0.3	I	0.215
Dibenzothiophene	0	2746	42	3.638	5.371	-0.01	I	0.309
Dibucaine	0	3824	52	3.912	5.472	0.75	I	0.410
Dicumarol	0	5684	78	4.248	5.905	1.95	A	0.574
Dicyclomine	0	3814	47	3.497	4.078	-0.13	I	0.225

Diethylcarbamazine	0	2060	23	3.045	3.296	-1.4	I	0.120
Diethylstilbestrol	0	3370	44	3.892	5.416	0.53	I	0.389
Diethyltoluamide	0	2068	24	3.367	4.511	-1.34	I	0.125
Digitoxin	0	14058	187	4.625	5.595	3.02	A	0.258
Digoxin	0	14500	194	4.644	5.638	3.14	A	0.256
Dihydroergotamine	0	11736	176	4.654	6.131	5.42	A	0.883
Dihydrostreptomycin	0	8656	113	4.22	5.017	2.15	A	0.409
Diloxanide	0	2184	22	3.401	4.489	-1.6	I	0.097
Diperodon	0	4058	55	4.06	5.112	2.23	A	0.741
Dipyridamole	0	6606	100	4.234	5.927	2.99	A	0.746
Dipyrrone	0	4224	56	3.989	5.088	1.63	A	0.600
Dirithromycin	0	12410	153	4.554	5.283	1.75	A	0.135
Disopyramide	0	4748	59	3.97	5.298	0.52	I	0.297
Disulfiram	0	1862	18	3.135	2.89	-0.43	I	0.275
D-Lactitol	0	4038	46	3.497	3.989	-0.56	I	0.150
Dobutamine	0	3230	37	3.871	5.075	0.3	I	0.346
Docosanol	0	1424	19	3.091	2.944	0.22	I	0.451
Domperidone	0	6264	94	4.263	5.684	3.45	A	0.837
Donepezil	0	5322	76	4.143	5.557	2.34	A	0.688
Dopamine	0	1566	17	3.178	4.369	-2.24	I	0.063
Doxazosin	0	7054	97	4.382	5.945	2.58	A	0.630
Doxepin	0	3738	55	3.932	5.583	1.26	I	0.545
Doxylamine	0	3474	42	3.761	5.124	-0.27	I	0.217
Droperidol	0	5258	74	4.205	5.595	2.51	A	0.729
Duloxetine	0	3550	52	3.892	5.308	1.45	I	0.603
Dyphylline	0	3766	50	3.664	4.92	-0.02	I	0.247
Edoxudine	0	3386	45	3.555	4.477	0.13	I	0.299
Edrophonium	0	2124	19	3.258	4.394	-2.62	I	0.038
Eletriptan	0	5304	70	4.248	5.591	2.15	A	0.648
Enalapril	0	4148	54	3.932	4.754	1.73	A	0.627
Enilconazole	0	2888	40	3.714	4.844	0.81	I	0.493
Enoxacin	0	4882	67	3.989	5.576	0.99	I	0.394
Enrofloxacin	0	5918	78	4.111	5.67	1.03	I	0.333
Equilin	0	5390	73	3.932	5.416	0.71	I	0.299
Ergonovine	0	5502	81	4.06	5.645	1.99	A	0.598
Ergotamine	0	11736	176	4.682	6.194	5.49	A	0.890
Erythromycin	0	11154	128	4.466	5.1	0.6	I	0.067
Erythrosine	0	8350	121	4.454	6.33	3.07	A	0.656
Escitalopram	0	4888	67	4.043	5.609	1.26	I	0.460
Estradiol	0	5390	73	3.829	5.209	0.42	I	0.242
Estrone	0	5390	73	3.871	5.242	0.63	I	0.282
Estropipate	0	6218	81	4.127	5.38	1.43	I	0.408
Ethambutol	0	1234	12	2.708	2.303	-1.66	I	0.117
Ethamivan	0	2524	29	3.497	4.727	-1.13	I	0.135
Ethinylestradiol	0	6282	81	3.951	5.303	0.34	I	0.184

Ethionamide	0	1550	17	3.219	4.443	-2.07	I	0.074
Ethosuximide	0	1936	19	2.996	3.219	-1.87	I	0.080
Ethoxzolamide	0	3118	38	3.807	5.209	0.03	I	0.295
Ethynodioldiacetate	0	7182	98	4.06	5.159	1.79	A	0.428
Etidronate	0	2756	9	3.219	0	2.02	A	0.772
Etomidate	0	2930	41	3.689	4.89	0.63	I	0.444
Eucatropine	0	4100	45	3.738	4.654	-0.45	I	0.162
Eugenol	0	1700	20	3.258	4.511	-1.84	I	0.089
Evansblue	0	14078	174	5.22	6.899	2.69	A	0.198
Ezetimibe	0	6774	80	4.304	5.753	0.65	I	0.212
Famotidine	0	2660	31	3.85	4.277	1.86	A	0.747
Febuxostat	0	3774	50	3.97	5.389	1.08	I	0.495
Felbamate	0	2086	25	3.497	4.443	-0.31	I	0.285
Fenbendazole	0	3562	51	3.97	5.438	1.55	A	0.627
Fenoterol	0	3434	42	3.892	5.124	0.63	I	0.408
Fexofenadine	0	7556	89	4.407	5.737	0.99	I	0.231
Fipronil	0	5874	70	4.174	5.635	0.47	I	0.225
Florfenicol	0	3594	35	3.871	4.852	-0.32	I	0.204
Fluconazole	0	4136	57	3.951	5.081	1.72	A	0.627
Flucytosine	0	1362	13	3.045	3.892	-2.39	I	0.058
Fludrocortisone	0	8888	109	4.078	5.22	-0.1	I	0.064
Flumequine	0	4610	64	3.912	5.576	0.64	I	0.332
Flunarizine	0	5178	71	4.248	5.666	2.41	A	0.712
Fluorescein	0	6870	105	4.304	6.182	3.15	A	0.761
Fluoxetine	0	3618	42	3.85	5.153	-0.05	I	0.249
Fluphenazine	0	6102	80	4.174	5.72	1.24	I	0.370
Flurothyl	0	1520	7	2.773	1.946	-1.9	I	0.088
Fluvastatin	0	5524	82	4.248	5.897	2.83	A	0.773
Fluvoxamine	0	3076	34	3.689	4.875	-0.6	I	0.184
Folicacid	0	5536	70	4.331	5.69	2.04	A	0.605
Fomepizole	0	592	7	2.565	1.946	-1.34	I	0.180
Fosfomicincalcium	0	1764	10	2.833	1.609	-1.02	I	0.177
Furazolidone	0	2446	32	3.584	4.477	0.41	I	0.426
Furosemide	0	3924	47	4.043	5.242	1.07	I	0.483
Fusidicacid	0	9944	135	4.331	5.497	2.46	A	0.394
Galanthamine	0	5412	82	3.912	5.595	1.47	I	0.475
Gallaminetriethiodide	0	6024	59	4.06	4.875	-0.75	I	0.076
Gemfibrozil	0	2904	25	3.611	4.511	-1.35	I	0.100
Gemifloxacinmesylate	0	6262	87	4.205	5.746	2.03	A	0.553
Gentamicin	0	7022	85	3.97	4.663	0.62	I	0.194
Glucaptate	0	2176	18	3.091	2.833	-1.23	I	0.134
Gluconolactone	0	2228	23	2.996	3.401	-2.22	I	0.054
Gramicidin	0	22970	310	5.617	6.727	6.32	A	0.414
Guaifenesin	0	1816	21	3.258	4.382	-1.71	I	0.096
Guanethidine	0	1348	17	2.944	2.996	-0.91	I	0.213

Guanfacine	0	2230	26	3.526	4.543	-0.45	I	0.249
Halazone	0	2838	24	3.689	4.745	-1.27	I	0.110
Haloperidol	0	4788	55	4.06	5.293	0.46	I	0.283
Hetacillin	0	7984	104	4.143	5.398	1.12	I	0.232
Hexachlorophene	0	4472	52	4.025	5.476	0.15	I	0.240
Hexylresorcinol	0	1784	21	3.296	4.431	-1.49	I	0.118
Histamine	0	796	11	2.708	2.708	-1.61	I	0.136
Homatropine	0	3824	51	3.714	4.745	0.62	I	0.378
Hydralazine	0	2166	29	3.434	4.99	-1.25	I	0.132
Hydrastine	0	6760	105	4.263	5.948	3.52	A	0.826
Hydrochlorothiazide	0	4152	45	3.989	5.308	-0.11	I	0.212
Hydroflumethiazide	0	5070	54	4.094	5.485	-0.36	I	0.138
Hydroquinone	0	1032	10	2.944	4.078	-3.09	I	0.032
Hydroxyamphetamine	0	1430	16	3.135	4.29	-2.23	I	0.066
Hydroxychloroquine	0	3548	47	3.829	5.247	0.48	I	0.365
Hydroxyzinepamoate	0	10840	154	4.898	6.569	4.98	A	0.862
Hyoscyamine	0	3966	55	3.738	4.787	0.96	I	0.452
Imipramine	0	3738	55	3.871	5.429	1.15	I	0.515
Inositol	0	2496	24	2.944	3.219	-2.63	I	0.034
Iodipamide	0	6286	80	4.394	5.697	2.29	A	0.613
Iodoquinol	0	2708	34	3.584	5.159	-1	I	0.143
Iopanicacid	0	3010	33	3.638	4.812	-0.81	I	0.156
Isoniazid	0	1284	14	3.091	4.205	-2.35	I	0.062
Isopropamide	0	5458	60	4.025	5.313	-0.45	I	0.116
Isoproterenol	0	2206	23	3.401	4.543	-1.6	I	0.096
Isosorbide	0	1958	28	2.833	3.258	-1.77	I	0.088
Isosorbidemononitrate	0	2364	35	3.135	3.664	-0.43	I	0.247
Kanamycinasulfate	0	7102	88	3.97	4.71	0.79	I	0.219
Ketanserin	0	5732	75	4.22	5.517	1.93	A	0.566
Ketoconazole	0	7100	98	4.394	5.628	3.24	A	0.766
Ketotifen	0	4642	72	4.043	5.727	2.23	A	0.708
Labetalol	0	3686	44	3.951	5.193	0.65	I	0.396
Lactulose	0	4960	60	3.611	4.277	-0.27	I	0.153
Levamisole	0	2600	40	3.497	4.779	0.14	I	0.351
Levobunolol	0	3712	43	3.761	4.99	-0.38	I	0.188
Levocarnitine	0	1364	11	2.833	1.946	-0.66	I	0.257
Levodopa	0	2128	21	3.434	4.522	-1.47	I	0.110
Levofloxacin	0	6330	90	4.143	5.817	1.79	A	0.489
Levonordefrin	0	2130	21	3.332	4.511	-2.1	I	0.062
Lincomycin	0	5040	66	3.761	4.431	1.07	I	0.403
Lindane	0	2496	24	2.944	3.219	-2.63	I	0.034
Lobendazole	0	2348	34	3.555	4.875	0.02	I	0.340
Loperamide	0	7222	91	4.357	5.768	1.57	A	0.371
Loratadine	0	5364	79	4.19	5.808	2.53	A	0.726
Losartan	0	5486	83	4.304	5.799	3.56	A	0.878

Lovastatin	0	5526	74	3.989	4.977	1.69	A	0.520
Loxapinesuccinate	0	4688	68	4.06	5.737	1.68	A	0.580
Mafenide	0	2052	18	3.497	4.554	-1.39	I	0.120
Malathion	0	2520	25	3.434	3.689	-0.28	I	0.266
Maprotiline	0	5636	81	3.951	5.79	0.79	I	0.301
Mebendazole	0	3948	55	4.043	5.553	1.59	A	0.609
Mebeverine	0	4596	57	4.111	5.347	1.35	I	0.503
Meclizine	0	5054	71	4.19	5.602	2.41	A	0.719
Meclocycline	0	9604	136	4.454	6.089	3.03	A	0.560
Mefexamide	0	2384	27	3.555	4.533	-0.42	I	0.246
Memantine	0	4626	57	3.332	4.205	-1.63	I	0.049
Menadione	0	2708	34	3.584	5.153	-0.99	I	0.144
Menthol	0	1762	19	2.773	2.944	-2.45	I	0.049
Mepenzolate	0	5234	63	4.025	5.333	0.38	I	0.242
Mephenterminesulfate	0	1784	17	3.178	4.19	-2.37	I	0.053
Mesna	0	772	3	2.773	0	2.38	A	0.896
Metaproterenol	0	2158	25	3.401	4.522	-1.19	I	0.140
Metaraminol	0	1808	19	3.219	4.344	-2.15	I	0.065
Metaxalone	0	2470	33	3.555	4.554	0.19	I	0.371
Metformin	0	912	6	2.708	1.946	-1.23	I	0.183
Methacholine	0	1364	11	2.833	1.946	-0.66	I	0.257
Methacycline	0	9258	131	4.419	6.011	2.95	A	0.565
Methapyrilene	0	2470	34	3.611	4.635	0.54	I	0.455
Methenamine	0	2688	36	2.944	3.892	-2.52	I	0.035
Methocarbamol	0	2150	25	3.466	4.443	-0.63	I	0.221
Methoxsalen	0	3516	52	3.784	5.476	0.55	I	0.385
Methscopolamine	0	5980	76	3.912	5.037	0.47	I	0.219
Methylatropine	0	4652	59	3.807	4.836	0.48	I	0.295
Methyldopa	0	2702	23	3.526	4.564	-1.84	I	0.067
Methyleneblue	0	4188	54	3.97	5.778	0.13	I	0.252
Methylphenidate	0	2728	38	3.497	4.663	-0.19	I	0.272
Methylthiouracil	0	1314	15	2.996	3.367	-1.43	I	0.140
Methysergidemaleate	0	5958	88	4.111	5.73	2.21	A	0.619
Metolazone	0	5612	72	4.22	5.7	1.45	I	0.454
Metronidazole	0	1832	24	3.219	4.078	-1.05	I	0.170
Mianserin	0	4394	67	3.912	5.557	1.52	A	0.560
Miconazolenitrate	0	4298	57	4.094	5.333	1.86	A	0.648
Midodrine	0	2600	31	3.555	4.762	-0.7	I	0.189
Minaprine	0	3556	47	3.871	5.283	0.66	I	0.409
Minocycline	0	9136	126	4.419	5.971	2.58	A	0.481
Molsidomine	0	2464	35	3.466	4.248	0.44	I	0.432
Monensin	0	11610	149	4.431	5.268	2.06	A	0.212
Montelukast	0	8206	98	4.605	6.052	1.63	A	0.319
Moxifloxacin	0	7090	103	4.234	5.82	2.62	A	0.637
Mupirocin	0	5392	61	4.025	4.419	1.35	I	0.446

Nadide	0	9388	125	4.615	5.829	3.41	A	0.664
Nafcillin	0	7724	100	4.248	5.72	1.2	I	0.260
Nafronyl	0	4432	61	4.007	5.347	1.57	A	0.571
Nalbuphine	0	8914	124	4.127	5.753	1.29	I	0.215
Nalidixicacid	0	3508	46	3.761	5.318	-0.12	I	0.241
Naltrexone	0	8548	122	4.143	5.808	1.76	A	0.327
Natamycin	0	8624	107	4.454	5.215	2.51	A	0.502
Nateglinide	0	3600	43	3.784	4.71	0.47	I	0.358
Nefopam	0	3338	49	3.784	5.283	0.83	I	0.465
Neomycin	0	9046	118	4.22	5.011	2.06	A	0.362
Neostigmine	0	2700	25	3.526	4.635	-1.69	I	0.078
Niacin	0	1158	12	3.045	4.143	-2.55	I	0.053
Niacinamide	0	1158	12	3.045	4.143	-2.55	I	0.053
Nicardipine	0	6310	87	4.394	5.79	3.04	A	0.770
Nicergoline	20	7682	111	4.331	5.892	4.48	A	0.905
Niclosamide	0	3768	45	3.989	5.394	0.51	I	0.359
Nicotineditartrate	0	1942	27	3.219	4.369	-1.36	I	0.127
Nicotinylalcoholtartrate	0	900	10	2.833	3.932	-3.27	I	0.028
Nifedipine	0	4976	70	4.094	5.557	1.9	A	0.612
Nilutamide	0	5090	60	3.97	5.313	-0.05	I	0.177
Nimodipine	0	5378	75	4.19	5.598	2.31	A	0.679
Nisoldipine	0	5310	74	4.159	5.591	2.13	A	0.643
Nithiamide	0	1624	20	3.296	3.989	-0.55	I	0.264
Nitrendipine	0	4966	69	4.111	5.561	1.88	A	0.609
Nitrofurantoin	0	2704	36	3.689	4.625	0.85	I	0.516
Nitrofurazone	0	1756	21	3.434	4.248	-0.26	I	0.316
Nitromide	0	2466	27	3.611	5.017	-1.07	I	0.144
Nizatidine	0	2426	32	3.638	4.127	1.39	I	0.665
Nomifensine	0	3688	52	3.807	5.366	0.54	I	0.371
Nonoxyno	0	1930	25	3.401	4.5	-0.7	I	0.221
Norepinephrine	0	1872	19	3.258	4.466	-2.24	I	0.058
Norethindrone	0	6282	81	3.871	4.963	0.42	I	0.197
Norethynodrel	0	6282	81	3.892	5.03	0.43	I	0.199
Norgestimate	0	7132	100	4.043	5.231	1.94	A	0.467
Norgestrel	0	6504	87	3.892	5.017	0.84	I	0.259
Noscapine	0	7328	116	4.317	6.028	4.09	A	0.877
Novobiocin	0	9382	121	4.635	6.04	2.63	A	0.477
Nystatin	0	10550	130	4.691	5.338	3.08	A	0.505
Octisalate	0	2348	28	3.497	4.522	-0.56	I	0.224
Ofloxacin	0	6330	90	4.143	5.817	1.79	A	0.489
Omeprazole	0	4688	63	4.127	5.645	1.57	A	0.553
Orlistat	0	4766	54	3.871	4.263	0.95	I	0.393
Ornidazole	0	2144	27	3.332	4.205	-0.78	I	0.198
Orphenadrinecitrate	0	3070	41	3.761	5.118	0.41	I	0.381
Oseltamivir	0	3352	43	3.611	4.466	0.3	I	0.337

Ouabain	0	12364	165	4.407	5.493	2.21	A	0.201
Oxantel	0	2458	30	3.584	4.836	-0.5	I	0.229
Oxcarbazepine	0	3938	59	3.932	5.565	1.44	I	0.574
Oxibendazole	0	2810	40	3.689	5.094	0.38	I	0.393
Oxiconazolenitrate	0	4368	58	4.159	5.434	2.09	A	0.695
Oxolinicacid	0	4238	60	3.892	5.472	0.89	I	0.415
Oxybenzone	0	2916	37	3.761	5.22	-0.01	I	0.299
Oxybutynin	0	4338	53	3.892	4.97	0.59	I	0.338
Oxymetazoline	0	3872	46	3.807	5.094	-0.18	I	0.213
Oxyphencyclimine	0	4842	60	3.912	5.011	0.6	I	0.307
Oxyquinoline	0	2032	26	3.401	4.949	-1.53	I	0.107
Oxytetracycline	0	9968	138	4.431	6.038	2.52	A	0.407
Pancuronium	0	11112	150	4.357	5.416	2.48	A	0.321
Pantoprazole	0	4764	67	4.143	5.642	2.08	A	0.666
Papaverine	0	4786	66	4.127	5.796	1.53	A	0.535
Parachlorophenol	0	1032	10	2.944	4.078	-3.09	I	0.032
Paramethadione	0	2322	23	3.091	3.401	-1.81	I	0.077
Pararosaniline	0	4020	54	4.094	5.784	1.23	I	0.516
Paromomycin	0	9046	118	4.22	5.011	2.06	A	0.362
Paroxetine	0	4482	63	4.007	5.371	1.7	A	0.599
Pefloxacin	0	5140	69	4.025	5.553	1.01	I	0.382
Penfluridol	0	7338	87	4.419	5.802	1.12	I	0.266
Penicillamine	0	1408	6	2.708	0	1.11	I	0.668
Penicilling	0	5898	71	3.951	5.05	0.17	I	0.176
Penicillin	0	5960	71	3.97	5.043	0.17	I	0.174
Penteticacid	0	3032	37	3.784	3.85	2.25	A	0.797
Pentylentetrazol	0	1438	22	2.996	3.738	-1.35	I	0.145
Pergolidemesylate	0	5018	79	3.892	5.505	1.88	A	0.603
Perindoprilbumine	0	4522	64	3.784	4.575	1.73	A	0.603
Perphenazine	0	5208	74	4.078	5.638	1.75	A	0.558
Phenacemide	0	1562	19	3.332	4.234	-0.76	I	0.229
Phenacetin	0	1634	20	3.296	4.466	-1.39	I	0.134
Phenelzine	0	1048	13	2.944	4.06	-2.68	I	0.048
Phenindione	0	3594	54	3.85	5.468	1.1	I	0.514
Pheniramine	0	2662	36	3.664	5.043	0.06	I	0.329
Phenolphthalein	0	4500	62	4.143	5.727	1.77	A	0.614
Phenoxybenzamine	0	2840	37	3.738	4.905	0.54	I	0.429
Phentermine	0	1602	16	3.135	4.143	-2.33	I	0.058
Phenyl	0	2788	35	3.761	5.088	0.2	I	0.352
Phenylephrine	0	1628	19	3.178	4.331	-2.02	I	0.076
Phenylethylalcohol	0	978	12	2.89	4.007	-2.93	I	0.039
Phenylmercuriacetate	0	1234	14	3.135	4.159	-1.89	I	0.095
Phthalylsulfathiazole	0	4998	63	4.304	5.591	2.15	A	0.668
Physostigminesalicylate	0	4844	70	3.829	5.308	0.93	I	0.384
Phytonadione	0	5152	64	4.174	5.421	1.46	I	0.491

Pilocarpine	0	2520	35	3.401	4.007	0.34	I	0.402
Pimozide	0	6560	94	4.382	5.823	3.37	A	0.812
Pinacidil	0	2636	26	3.611	4.691	-0.99	I	0.148
Pindolol	0	2754	37	3.611	4.868	-0.02	I	0.306
Pioglitazone	0	3990	53	4.043	5.273	1.71	A	0.635
Piperazine	0	516	6	1.946	1.946	-5.2	I	0.005
Piperidolate	0	4020	57	3.932	5.263	1.52	A	0.588
Piperine	0	3374	46	3.829	5.106	0.93	I	0.488
Pirenzepine	0	5222	77	4.127	5.68	2.36	A	0.700
Polymyxinb	0	12090	156	4.956	5.714	4.58	A	0.744
Potassium-p-Aminobenzoate	0	1416	14	3.178	4.344	-2.3	I	0.062
Pramoxine	0	2604	34	3.555	4.615	-0.05	I	0.309
Pravastatin	0	5138	67	3.97	4.883	1.54	A	0.513
Praziquantel	0	4992	70	3.912	5.22	1.31	I	0.465
Prazosin	0	5686	79	4.22	5.743	2.18	A	0.630
Prilocaine	0	2144	24	3.434	4.489	-1.04	I	0.160
Primaquine	0	3104	43	3.714	5.333	-0.05	I	0.279
Probenecid	0	3270	35	3.784	4.89	-0.28	I	0.226
Procainamide	0	2190	24	3.466	4.511	-0.97	I	0.167
Prochlorperazine	0	5004	70	4.043	5.624	1.41	I	0.490
Procyclidine	0	3850	50	3.664	4.736	0.13	I	0.271
Proglumide	0	3192	40	3.784	4.71	0.87	I	0.485
Promethazine	0	4088	56	3.871	5.517	0.43	I	0.320
Propafenone	0	3388	44	3.912	5.118	1.13	I	0.536
Propylthiouracil	0	1518	19	3.091	3.714	-1.29	I	0.150
Pyridoxine	0	2032	23	3.296	4.522	-1.87	I	0.079
Pyrimethamine	0	3152	42	3.784	5.361	0.11	I	0.309
Pyrithione	0	1096	10	2.833	3.664	-3.21	I	0.029
Quetiapine	0	4836	72	4.094	5.697	2.22	A	0.692
Quinacrine	0	5144	71	4.143	5.852	1.5	A	0.502
Quinidine	0	5538	76	4.007	5.591	1	I	0.352
Quipazine	0	2988	41	3.638	5.22	-0.37	I	0.224
Racephedrine	0	1668	18	3.135	4.22	-2.32	I	0.057
Ramipril	0	5224	75	4.06	5.017	2.8	A	0.783
Ranitidine	0	2426	32	3.638	4.143	1.36	I	0.659
Reserpine	0	10050	150	4.605	6.12	4.95	A	0.884
Resorcinol	0	1040	11	2.944	3.97	-2.79	I	0.043
Retinol	0	3226	34	3.761	4.625	-0.02	I	0.277
Ribavirin	0	3164	43	3.526	4.407	0.24	I	0.337
Riboflavin	0	5806	76	4.159	5.765	1.11	I	0.361
Rimantadine	0	3870	48	3.219	4.205	-2.06	I	0.040
Risedronate	0	3894	31	3.714	4.466	-1.79	I	0.051
Ritanserlin	0	6852	96	4.454	5.951	3.29	A	0.786
Ritodrine	0	3216	37	3.829	5.056	0.1	I	0.302
Rizatriptan	0	3396	50	3.85	5.215	1.38	I	0.597

Rolipram	0	3444	50	3.738	5.004	0.95	I	0.486
Rolitetraacycline	0	10424	143	4.511	6.04	2.79	A	0.441
Ronidazole	0	2080	25	3.401	4.19	-0.47	I	0.255
Ropinirole	0	2960	43	3.638	4.949	0.42	I	0.392
Rosiglitazone	0	3990	53	4.025	5.209	1.71	A	0.634
Roxithromycin	0	11724	139	4.554	5.231	1.29	I	0.108
Rutoside	0	9746	126	4.575	6.004	2.28	A	0.365
Saccharin	0	2746	35	3.638	5.056	-0.43	I	0.227
Salicin	0	3726	46	3.638	4.754	-0.36	I	0.190
Salicylamide	0	1496	16	3.178	4.263	-2.05	I	0.077
Salicylanilide	0	2522	32	3.689	4.997	0.03	I	0.331
Salsalate	0	3252	41	3.871	5.187	0.61	I	0.418
Scopolamine	0	5262	70	3.85	4.97	0.81	I	0.327
Selamectin	0	12486	173	4.682	5.814	4.23	A	0.647
Selegiline	0	1744	20	3.296	4.277	-1.29	I	0.143
Sennosidea	0	15458	222	5.03	6.777	5.53	A	0.740
Sertraline	0	4136	56	3.892	5.451	0.58	I	0.350
Sibutramine	0	4396	47	3.638	4.852	-1.74	I	0.047
Sildenafilcitrato	0	7164	98	4.407	5.922	2.69	A	0.649
Sodium Phenylacetate	0	1172	14	3.091	4.143	-2.02	I	0.086
Sodium Salicylate	0	1496	16	3.178	4.263	-2.05	I	0.077
Sodiumdehydrocholate	0	7836	105	4.094	5.193	1.6	A	0.337
Sodiumnitroprusside	0	4812	15	3.526	0	0.65	I	0.321
Sodiumoxybate	0	420	3	2.197	1.386	-2.89	I	0.047
Solifenacinsuccinate	0	6038	86	4.127	5.598	2.11	A	0.587
Sorbitol	0	1534	12	2.708	2.197	-2.08	I	0.074
Sparteinesulfate	0	4116	60	3.401	4.443	-0.18	I	0.202
Spectinomycin	0	5974	77	3.738	4.71	0.09	I	0.161
Spiperone	0	5820	77	4.174	5.416	1.91	A	0.556
Spirolactone	0	8514	117	4.159	5.347	2.03	A	0.392
Strychnine	0	8370	141	4.174	5.858	4.83	A	0.917
Succinylsulfathiazole	0	3700	44	4.06	5.075	1.5	A	0.605
Sucralose	0	5040	62	3.611	4.304	-0.2	I	0.159
Sulfacetamide	0	2404	24	3.638	4.625	-0.51	I	0.229
Sulfachlorpyridazine	0	3290	36	3.932	5.226	0.17	I	0.312
Sulfameter	0	3416	38	3.951	5.257	0.26	I	0.323
Sulfamethazine	0	3572	41	3.989	5.257	0.59	I	0.390
Sulfamethizole	0	3100	36	3.871	4.942	0.65	I	0.438
Sulfamethoxypridazine	0	3416	38	3.951	5.257	0.26	I	0.323
Sulfamonometoxine	0	3424	39	3.951	5.247	0.39	I	0.354
Sulfanilate	0	4380	43	4.19	5.303	0.43	I	0.300
Sulfanitran	0	4072	46	4.127	5.403	0.89	I	0.427
Sulfapyridine	0	3032	34	3.871	5.147	0.16	I	0.328
Sulfaquinoxaline	0	4218	51	4.127	5.649	0.86	I	0.410
Sulfasalazine	0	5108	61	4.357	5.781	1.67	A	0.545

Sulfinpyrazone	0	5528	82	4.277	5.707	3.33	A	0.849
Sulfisoxazole	0	3478	39	3.932	5.043	0.52	I	0.379
Suloctidil	0	2822	34	3.611	4.654	-0.2	I	0.265
Sulpiride	0	4144	49	3.97	5.112	0.67	I	0.370
Suramin	0	19462	239	5.576	7.157	2.61	A	0.046
Tacrine	0	3306	46	3.689	5.416	-0.34	I	0.214
Tannic	0	25620	323	5.762	7.234	2.84	A	0.010
Taurine	0	772	3	2.773	0	2.38	A	0.896
Teicoplanin	0	772	3	2.773	0	2.38	A	0.896
Telithromycin	0	12084	161	4.727	5.749	3.78	A	0.568
Temefos	0	4716	50	4.127	5.342	0.26	I	0.247
Terazosin	0	5686	79	4.143	5.649	1.86	A	0.553
Terbinafine	0	3522	42	3.932	5.338	0.33	I	0.334
Terbutalinehemisulfate	0	2580	26	3.497	4.543	-1.33	I	0.111
Terfenadine	0	7028	85	4.344	5.697	1.18	I	0.296
Tetracaine	0	2290	27	3.526	4.635	-0.59	I	0.221
Tetrahydrozoline	0	2894	43	3.555	4.868	0.17	I	0.339
Tetramizole	0	2600	40	3.497	4.779	0.14	I	0.351
Thalidomide	0	4198	61	3.871	5.252	1.35	I	0.533
Theophylline	0	2912	37	3.466	4.605	-0.79	I	0.163
Thiabendazole	0	2600	40	3.664	5.112	0.62	I	0.465
Thiamphenicol	0	3594	35	3.871	4.852	-0.32	I	0.204
Thiamylal	0	3450	41	3.466	4.143	-0.53	I	0.178
Thiothixene	0	6426	80	4.331	5.9	1.27	I	0.354
Thiram	0	1342	8	2.944	2.639	-1.52	I	0.128
Thonzylamine	0	3036	39	3.784	5.094	0.39	I	0.379
Tiaprude	0	3564	38	3.892	5.043	-0.04	I	0.254
Ticarcillin	0	6510	81	4.025	4.92	1	I	0.291
Ticlopidine	0	3118	43	3.714	4.868	0.72	I	0.454
Tilmicosin	0	11172	146	4.615	5.371	3.5	A	0.563
Tilorone	0	5228	74	4.159	5.838	1.87	A	0.587
Timolol	0	3284	40	3.611	4.248	0.39	I	0.363
Tioconazole	0	3834	53	3.989	5.017	2.12	A	0.733
Tobramycin	0	6700	84	3.932	4.673	0.87	I	0.254
Tolazamide	0	3380	40	3.871	4.836	0.82	I	0.460
Tolazoline	0	1618	23	3.296	4.357	-0.76	I	0.226
Tolbutamide	0	2740	29	3.738	4.718	-0.03	I	0.303
Toltrazuril	0	5862	72	4.248	5.576	1.33	I	0.409
Topiramate	0	5772	73	3.892	4.673	0.97	I	0.330
Tramadol	0	3696	45	3.611	4.852	-0.78	I	0.136
Tranexamicacid	0	1542	16	2.833	3.045	-2.22	I	0.065
Tranlycypromine	0	1890	19	3.135	4.277	-2.72	I	0.037
Trazodone	0	4858	68	4.06	5.347	2.01	A	0.646
Trichlormethiazide	0	4818	54	4.078	5.425	0.15	I	0.223
Triclosan	0	2992	36	3.784	5.182	-0.09	I	0.278

Trientine	0	514	6	2.197	1.792	-3.36	I	0.029
Trifluoperazine	0	5898	76	4.143	5.677	0.98	I	0.324
Trifluridine	0	4170	51	3.689	4.585	0.04	I	0.237
Trihexyphenidyl	0	4032	51	3.689	4.787	-0.03	I	0.231
Trimethadione	0	2124	20	3.045	3.219	-1.8	I	0.081
Trimethobenzamide	0	4370	56	4.078	5.451	1.28	I	0.502
Trimethoprim	0	3732	49	3.912	5.375	0.69	I	0.401
Trimetozine	0	3522	47	3.714	5.088	0.08	I	0.281
Trioxsalen	0	3978	57	3.892	5.553	0.86	I	0.427
Tripelennamincitrate	0	2652	35	3.689	4.963	0.24	I	0.370
Trisodiummethylenediaminetetra	0	2182	26	3.497	3.497	1.25	I	0.650
Troleandomycin	0	11476	146	4.605	5.318	2.92	A	0.398
Tropicamide	0	3228	43	3.807	5.043	0.78	I	0.461
Tuaminoheptane	0	490	4	2.079	1.386	-3.63	I	0.022
Tylosintartrate	0	12322	158	4.682	5.464	3.1	A	0.383
Tyrothricin	0	14436	196	5.193	6.256	5.92	A	0.850
Undecylenic	0	654	8	2.398	2.079	-2.6	I	0.058
Urea	0	162	0	1.792	0	-2.95	I	0.048
Valacyclovir	0	3860	49	3.85	4.868	0.91	I	0.447
Valsartan	0	5500	78	4.277	5.724	2.81	A	0.771
Vancomycin	0	21584	296	5.434	6.872	5.78	A	0.381
Vardenafil	0	7290	100	4.419	5.883	2.86	A	0.677
Vecuronium	0	10434	145	4.317	5.384	2.95	A	0.481
Venlafaxine	0	3662	45	3.638	4.844	-0.53	I	0.169
Verapamil	0	5820	70	4.205	5.501	1	I	0.334
Vidarabine	0	4110	60	3.761	5.165	0.85	I	0.415
Warfarin	0	4558	65	4.078	5.663	1.77	A	0.610
Yohimbine	0	6424	97	4.094	5.565	2.69	A	0.696
Zidovudine	0	3464	47	3.689	4.635	0.82	I	0.453
Zolmitriptan	0	3646	53	3.85	5.182	1.35	I	0.572

FD: Función discriminante.

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

P.A.: probabilidad de que el compuesto sea activo.

T(O...Br): la suma de las distancias topológicas entre los átomos de oxígeno (O) y Bromo (Br).

SRW08: número de caminos de auto-retorno de orden 8.

MPC04; número total de caminos de orden 4.

piPC02: número de caminos múltiples de orden 2.

piPC05: número de caminos múltiples de orden 5.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.4. Compuestos que conforman el grupo test del modelo 2 y valores de FD₂ asociados a estos.

Compuestos	T(O..Br)	SRW08	MPC04	piPC02	piPC05	FD ₂	Clas.	P. A.
Grupo Activo								
Akt inhibitor IV [298]	0	7498	116	4.575	6.28	4.93	A	0.940
AZD5363 [299]	0	6062	79	4.234	5.572	1.81	A	0.513
GDC-0068 [300]	0	6326	89	4.248	5.613	2.67	A	0.697
API-59CJ-OMe [301]	0	5442	81	4.174	6.08	2.08	A	0.623
PHT-427 [302]	0	3684	46	4.025	5.011	1.7	A	0.652
Sunitinib [303]	0	5406	77	4.234	5.67	2.68	A	0.753
Grupo Inactivo								
Acepromazinemaleate	0	4502	62	4.007	5.62	1.1	I	0.449
Acetohexamide	0	3806	43	3.951	4.963	0.66	I	0.391
Acetohydroxamicacid	0	272	0	1.946	0	-2.2	I	0.092
Adenine	0	1834	25	3.296	4.654	-1.43	I	0.124
Adenosine	0	4110	60	3.761	5.165	0.85	I	0.415
Alpha-Tochopherol	0	5540	64	4.06	5.242	0.28	I	0.209
Alrestatin	0	4422	63	3.951	5.69	0.93	I	0.412
Amifostine	0	1122	8	2.833	2.197	-1.02	I	0.206
Aminacrine	0	3306	46	3.784	5.631	-0.11	I	0.255
Aminopentamide	0	4294	54	3.892	5.323	0.21	I	0.262
Ampicillin	0	6276	74	3.989	5.1	-0.03	I	0.136
Antazoline	0	3036	44	3.829	5.069	1.4	I	0.626
Antipyrine	0	2594	36	3.526	4.779	-0.21	I	0.275
Aspartame	0	2838	33	3.714	4.595	0.38	I	0.390
Astemizole	0	6204	88	4.382	5.838	3.23	A	0.807
Benzoicacid	0	1158	12	3.045	4.143	-2.55	I	0.053
Biperiden	0	4904	68	3.85	5.043	1.12	I	0.426
Bismuthsubsalicylate	0	0	23	2.89	4.29	0.05	I	0.513
Bretylumtosylate	0	2114	20	3.296	4.382	-2.21	I	0.056
Butylparaben	0	1760	20	3.332	4.477	-1.43	I	0.125
Camphor	0	3540	36	3.178	3.761	-2.54	I	0.027
Captopril	0	2208	27	3.178	3.526	-0.71	I	0.206
Carbadox	0	3364	43	3.97	5.666	0.46	I	0.374
Carbidopa	0	2900	26	3.555	4.595	-1.7	I	0.073
Carvedilol	0	5314	78	4.248	5.841	2.8	A	0.778
Cefazolin	0	6512	83	4.205	5.226	1.87	A	0.495
Cefmetazole	0	7256	86	4.159	5.215	0.53	I	0.170
Cefoxitin	0	6996	83	4.127	5.176	0.5	I	0.178
Cefpodoxime	0	6408	81	4.143	5.288	1.31	I	0.366
Ceftazidime	0	8420	98	4.477	5.663	1.06	I	0.200
Cephapirin	0	6060	72	4.127	5.288	0.67	I	0.252
Cetylpyridinium	0	1888	25	3.434	4.248	0.02	I	0.372
Chlorhexidine	0	4358	54	4.234	5.215	2.41	A	0.758

Chloroquine	0	3470	45	3.807	5.293	0.14	I	0.297
Chlorothiazide	0	4152	45	4.025	5.468	-0.15	I	0.204
Chloroxylenol	0	1756	16	3.219	4.317	-2.41	I	0.051
Chlorpromazine	0	4118	58	3.912	5.565	0.82	I	0.407
Cholesterol	0	7118	94	3.951	4.99	0.98	I	0.252
Cinnarizine	0	4662	67	4.159	5.565	2.51	A	0.761
Cinoxacin	0	4238	60	3.892	5.472	0.89	I	0.415
Citicoline	0	5996	67	4.143	4.796	1.06	I	0.335
Clidinium	0	6262	76	4.094	5.451	0.33	I	0.184
Clindamycin	0	5040	66	3.761	4.431	1.07	I	0.403
Clorsulon	0	4312	44	4.111	5.394	0.05	I	0.231
Cloxacillin	0	7744	100	4.277	5.565	1.61	A	0.345
Colforsin	0	9566	119	4.094	5.215	0.02	I	0.060
Cycloheximide	0	3666	46	3.611	4.143	0.63	I	0.393
Cysteine	0	640	2	2.303	0	-0.43	I	0.350
Danazol	0	7802	102	4.094	5.403	0.9	I	0.203
Danthron	0	4416	62	3.97	5.727	0.86	I	0.396
Decamethonium	0	2010	14	3.135	2.639	-0.84	I	0.193
Dehydrocholicacid	0	7836	105	4.094	5.193	1.6	A	0.337
Desoxycorticosterone	0	6714	89	3.932	5.043	0.89	I	0.258
Dexchlorpheniramine	0	2920	38	3.738	5.13	0.13	I	0.328
Diazoxide	0	3186	38	3.761	5.268	-0.49	I	0.195
Dicloxacillin	0	8090	105	4.317	5.613	1.77	A	0.358
Dienestrol	0	3370	44	3.932	5.384	0.83	I	0.464
Diltiazem	0	5226	75	4.159	5.565	2.48	A	0.724
Dimenhydrinate	0	2732	37	3.689	5.043	0.21	I	0.359
Dioxybenzone	0	3254	41	3.829	5.293	0.17	I	0.314
Diphenhydramine	0	2732	37	3.689	5.043	0.21	I	0.359
Diphenylpyraline	0	3486	48	3.807	5.165	0.74	I	0.433
Doxycycline	0	9258	131	4.394	5.981	2.85	A	0.540
Dyclonine	0	2848	36	3.638	4.754	0.02	I	0.309
Econazole	0	3960	53	4.043	5.273	1.77	A	0.650
Ergocalciferol	0	5850	73	4.025	5.024	1.05	I	0.342
Estriol	0	5720	78	3.871	5.22	0.69	I	0.275
Ethacrynicacid	0	3134	35	3.761	4.963	-0.28	I	0.234
Ethopropazine	0	4348	61	3.912	5.489	0.9	I	0.411
Ethylparaben	0	1542	16	3.219	4.394	-2.11	I	0.072
Famciclovir	0	3464	46	3.871	5.075	1.07	I	0.515
Fampridine	0	1096	10	2.944	3.97	-3.04	I	0.034
Finasteride	0	7416	95	4.025	5.056	0.87	I	0.217
Flumazenil	0	4516	67	4.007	5.572	1.84	A	0.629
Foscarnet	0	1008	0	2.708	0	1.09	I	0.689
Gabapentin	0	1960	21	2.944	3.178	-1.9	I	0.078
Gatifloxacin	0	6376	89	4.159	5.762	1.76	A	0.477
Glipizide	0	5222	62	4.29	5.412	1.79	A	0.567

Glucosamine	0	2228	23	2.89	3.219	-2.57	I	0.038
Glycopyrrolate	0	4838	61	3.85	4.883	0.57	I	0.303
Guanabenzacetate	0	1972	22	3.466	4.595	-0.95	I	0.179
Homosalate	0	3588	43	3.689	4.682	-0.06	I	0.250
Hycanthone	0	4906	69	4.06	5.72	1.41	I	0.497
Indapamide	0	5072	65	4.19	5.561	1.62	A	0.536
Irbesartan	0	6556	98	4.357	5.846	3.73	A	0.861
Isoetharinemesylate	0	2662	30	3.497	4.635	-1.11	I	0.132
Isoxsuprine	0	3278	39	3.829	5.004	0.34	I	0.351
Itraconazole	0	10010	142	4.727	6.073	4.77	A	0.866
Josamycin	0	10284	137	4.575	5.288	3.93	A	0.721
Lamotrigine	0	3074	38	3.761	5.323	-0.36	I	0.222
Lansoprazole	0	4714	59	4.127	5.537	1.16	I	0.447
Leucovorin	0	6096	80	4.317	5.525	2.48	A	0.670
Levalbuterol	0	2762	27	3.526	4.644	-1.55	I	0.087
Levothyroxine	0	4434	52	4.078	5.416	0.66	I	0.348
Lidocaine	0	2474	29	3.526	4.595	-0.62	I	0.208
Liothyronine	0	4096	48	4.025	5.371	0.53	I	0.341
Lithiumcitrate	0	1972	17	3.178	3.219	-1.08	I	0.161
Lomefloxacin	0	5582	78	4.078	5.638	1.55	A	0.481
Mecamylamine	0	3706	39	3.135	3.664	-2.56	I	0.026
Medroxyprogesteroneacetate	0	8282	109	4.111	5.273	1.23	I	0.235
Mefloquine	0	5884	71	4.078	5.684	-0.1	I	0.141
Mepivacaine	0	3190	39	3.638	4.727	-0.21	I	0.244
Mestranol	0	6408	83	3.97	5.342	0.41	I	0.190
Methazolamid	0	2456	26	3.611	4.431	-0.18	I	0.290
Methicillin	0	6844	85	4.078	5.323	0.52	I	0.187
Methimazole	0	898	9	2.639	2.565	-2.28	I	0.073
Methoxamine	0	2406	28	3.401	4.727	-1.63	I	0.089
Methylergonovine	0	5628	83	4.078	5.656	2.11	A	0.617
Metoclopramide	0	3000	35	3.664	4.875	-0.46	I	0.208
Mexiletine	0	1902	21	3.296	4.382	-1.64	I	0.100
Miglitol	0	2448	29	2.996	3.466	-1.95	I	0.065
Minoxidil	0	2728	33	3.584	4.875	-0.69	I	0.184
Modafinil	0	3000	42	3.807	5.153	0.91	I	0.510
Monobenzone	0	2120	26	3.584	4.883	-0.45	I	0.256
Morantelcitrato	0	2324	29	3.497	4.431	-0.22	I	0.290
Moxalactam	0	8990	109	4.431	5.635	1.19	I	0.194
Nadolol	0	3970	45	3.761	4.97	-0.59	I	0.149
Naloxone	0	7984	118	4.094	5.796	2.05	A	0.434
Naphazoline	0	2884	42	3.714	5.247	0.4	I	0.393
Netilmicin	0	6850	86	4.007	4.804	1.09	I	0.289
Norfloxacin	0	4882	67	3.989	5.537	1.06	I	0.410
Nortriptyline	0	3552	54	3.892	5.576	1.26	I	0.557
Nylidrin	0	3278	39	3.829	5.004	0.34	I	0.351

Olmesartan	0	6608	95	4.419	5.953	3.42	A	0.817
Oxacillin	0	7406	96	4.234	5.493	1.59	A	0.363
Oxethazaine	0	5874	65	4.22	5.142	0.92	I	0.312
Oxfendazole	0	3948	55	4.043	5.553	1.59	A	0.609
Oxidopamine	0	1904	21	3.296	4.554	-1.94	I	0.076
Pargyline	0	1368	17	3.178	4.174	-1.51	I	0.130
Pentoxifylline	0	3858	52	3.761	4.89	0.73	I	0.403
Perhexiline	0	3228	46	3.367	4.078	0.09	I	0.301
Phenazopyridine	0	2458	30	3.714	5.142	-0.21	I	0.284
Phenformin	0	1694	20	3.401	4.174	-0.35	I	0.300
Phenylpropanolamine	0	1542	16	3.091	4.174	-2.54	I	0.048
Phenytoin	0	4178	60	3.892	5.416	1.11	I	0.473
Pipamperone	0	5090	61	3.97	4.963	0.68	I	0.310
Piperacillin	0	8834	109	4.369	5.442	1.45	I	0.246
Piracetam	0	1304	16	2.89	3.045	-1.38	I	0.146
Pirenperone	0	5732	75	4.234	5.602	1.87	A	0.552
Pizotiline	0	4312	67	3.97	5.602	1.97	A	0.671
Pralidoxime	0	1308	15	3.135	4.344	-2.22	I	0.069
Pregabalin	0	1060	11	2.708	2.398	-1.61	I	0.128
Primidone	0	3538	43	3.584	4.762	-0.75	I	0.144
Probutol	0	8224	87	4.394	5.765	-0.74	I	0.042
Procaine	0	2190	24	3.466	4.511	-0.97	I	0.167
Propantheline	0	5730	70	4.111	5.617	0.4	I	0.220
Propofol	0	2226	25	3.332	4.533	-1.78	I	0.081
Propranolol	0	2952	38	3.689	5.182	-0.33	I	0.234
Proscillaridin	0	10714	137	4.382	5.565	1.39	I	0.152
Protryptiline	0	3552	54	3.871	5.591	1.1	I	0.518
Pyrantel	0	2010	26	3.401	4.304	-0.38	I	0.275
Pyrazinamide	0	1158	12	3.045	4.143	-2.55	I	0.053
Pyridostigmine	0	1806	19	3.332	4.369	-1.48	I	0.119
Pyrilamine	0	3036	39	3.784	5.094	0.39	I	0.379
Quinapril	0	5540	73	4.22	5.425	2.2	A	0.643
Quinine	0	5538	76	4.007	5.545	1.08	I	0.370
Rabeprazole	0	4246	59	4.078	5.533	1.8	A	0.637
Raloxifene	0	6568	95	4.443	6.08	3.43	A	0.821
Ranolazine	0	5058	65	4.159	5.298	1.9	A	0.606
Retinylpalmitate	0	4588	52	4.174	5.017	1.64	A	0.575
Rifampin	0	12558	167	4.868	6.395	3.43	A	0.447
Roxarsone	0	2656	25	3.584	4.812	-1.54	I	0.090
Sarafloxacin	0	6050	84	4.263	5.924	2.1	A	0.585
Simvastatin	0	6092	75	4.043	4.99	1.01	I	0.318
Sisomicin	0	6638	81	3.97	4.736	0.71	I	0.229
Sulconazolenitrate	0	3960	53	4.043	5.273	1.77	A	0.650
Sulfabenzamide	0	3416	38	3.97	5.209	0.46	I	0.369
Sulfadiazine	0	3032	34	3.871	5.147	0.16	I	0.328

Sulfadimethoxine	0	3824	45	4.025	5.357	0.69	I	0.396
Sulfadoxine	0	3968	47	4.025	5.38	0.64	I	0.374
Sulfamerazine	0	3298	37	3.932	5.204	0.33	I	0.347
Sulfamethoxazole	0	3100	36	3.871	4.956	0.63	I	0.432
Sulfathiazole	0	2850	33	3.807	4.86	0.48	I	0.414
Tacrolimus	0	10976	142	4.625	5.485	3.21	A	0.506
Tetracycline	0	9518	128	4.407	5.986	1.99	A	0.315
Tetroquinone	0	2496	24	3.434	4.443	-1.66	I	0.084
Thiamine	0	3054	40	3.761	4.956	0.58	I	0.424
Thimerosal	0	1778	22	3.296	4.477	-1.42	I	0.126
Thiopental	0	3364	38	3.434	4.127	-0.94	I	0.128
Thioridazine	0	5132	72	4.043	5.649	1.39	I	0.474
Tinidazole	0	2692	28	3.664	4.248	0.27	I	0.373
Tolnaftate	0	4020	52	4.043	5.545	1.05	I	0.470
Tranilast	0	3838	49	4.043	5.451	1.16	I	0.512
Triacetin	0	1456	15	3.178	3.135	-0.18	I	0.354
Triamterene	0	3946	54	3.989	5.72	0.83	I	0.422
Trichlorfon	0	2314	14	3.045	1.946	-0.83	I	0.182
Trilostane	0	8424	106	4.007	5.242	-0.07	I	0.075
Trimipramine	0	3996	59	3.912	5.425	1.44	I	0.570
Tripolidine	0	3366	47	3.892	5.333	1.09	I	0.528
Tryptophan	0	2592	34	3.584	4.883	-0.3	I	0.259
Tubocurarine	0	10674	149	4.754	6.422	3.98	A	0.706
Tyloxapol	0	2842	27	3.466	4.5	-1.84	I	0.065
Ursodiol	0	7402	99	3.951	4.934	1.19	I	0.278
Valproate	0	930	9	2.565	2.197	-2.18	I	0.080
Vesamicol	0	3426	46	3.584	4.673	0.04	I	0.277
Vigabatrin	0	724	5	2.565	2.197	-2.31	I	0.074
Xylazine	0	2468	31	3.526	4.736	-0.57	I	0.216
Xylometazoline	0	3454	40	3.738	4.99	-0.42	I	0.194
Zoxazolamine	0	2020	28	3.401	4.844	-1.06	I	0.162

FD: Función discriminante.

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

P.A.: probabilidad de que el compuesto sea activo.

T(O...Br): la suma de las distancias topológicas entre los átomos de oxígeno (O) y Bromo (Br).

SRW08: número de caminos de auto-retorno de orden 8.

MPC04; número total de caminos de orden 4.

piPC02: número de caminos múltiples de orden 2.

piPC05: número de caminos múltiples de orden 5.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.5. Compuestos que conforman el grupo de entrenamiento del modelo 3 y valores de FD₃ asociados a estos.

Compuestos	Dz	S2K	PCR	X2sol	JGI4	FD ₃	Clas.	P. A.
Grupo Activo								
10-Hydroxycampothecin [305]	57	4.087	1.441	11.966	0.055	1.18	A	0.235
Agelastatine [306]	44.75	2.881	1.157	10.396	0.054	0.58	A	0.359
Artenimol [307]	45	2.168	1	9.702	0.064	-1.67	I	0.842
Auraptene [308]	47	4.938	1.44	9.478	0.038	1.02	A	0.265
Bergapten [309]	36	2.65	1.367	7.005	0.053	-0.27	I	0.566
Calphostin [310]	130	11.693	1.594	25.567	0.047	1.48	A	0.187
Camptothecin [311]	57	4.087	1.441	11.966	0.055	1.18	A	0.235
Cardamonin [312]	44	4.855	1.511	8.358	0.044	1.30	A	0.215
Curcumin [313]	60	7.293	1.596	11.25	0.048	2.90	A	0.052
Deguelin [314]	64	4.179	1.414	13.478	0.06	1.00	A	0.269
Diallyltrisulfide [315]	18	6.169	1.144	4.845	0.016	3.68	A	0.025
EGCG [316]	81	6.466	1.386	16.573	0.067	1.87	A	0.134
Ellagic acid [317]	52	3.689	1.36	10.38	0.072	1.11	A	0.249
Emodin [318]	45	3.194	1.392	9.308	0.064	1.33	A	0.210
Esculetin [319]	30	2.418	1.336	5.864	0.085	2.52	A	0.075
Gallic acid [320]	29	2.522	1.238	5.289	0.084	1.44	A	0.192
Gossypol [321]	84	5.767	1.426	17.005	0.058	0.00	A	0.500
Hecogenin [322]	66	3.598	1.008	15.099	0.066	0.07	A	0.484
Honokiol [323]	42	4.242	1.459	8.208	0.045	0.94	A	0.281
Indole-3-Carbinol [324]	23.5	1.945	1.337	4.454	0.029	-2.02	I	0.884
Indomethacin [325]	54.83	5.152	1.37	11.432	0.05	1.64	A	0.162
Isoflavone [326]	36	3.488	1.502	7.207	0.041	0.93	A	0.283
Isoliquiritigenin [327]	42	4.757	1.489	8.24	0.046	1.86	A	0.134
Juglone [328]	29	2.324	1.387	5.681	0.056	0.54	A	0.368
Kirenol [329]	52	3.181	1.054	11.229	0.054	-1.44	I	0.809
Murrayafolinea [330]	33.5	2.121	1.419	7.017	0.048	0.12	A	0.469
Naringin [331]	96	9.358	1.242	18.449	0.049	-0.41	I	0.601
PFK118-310 [332]	32	1.83	1.31	6.167	0.076	0.59	A	0.357
Protocatechualdehyde [333]	23	2.171	1.301	4.042	0.089	2.34	A	0.088
Quercetin [334]	51	4.453	1.386	10.037	0.061	1.16	A	0.240
Resveratrol [335]	37	4.107	1.459	7.487	0.055	2.54	A	0.073
Rotenone [391]	64	4.36	1.319	13.046	0.057	-0.32	I	0.581
Silibinin [336]	80	7.409	1.371	15.625	0.053	0.64	A	0.345
Sitosterol [337]	61	3.657	1.067	13.732	0.05	-0.87	I	0.706
Sulforaphane [338]	21.5	5.219	1.226	4.688	0.027	2.21	A	0.099
Tanshinone [339]	45	2.849	1.415	9.569	0.057	0.93	A	0.283
Theophylline [340]	30	1.52	1.195	5.695	0.074	-0.57	I	0.638
Toxoflavin [341]	32.5	1.871	1.31	6.167	0.076	0.42	A	0.396
Uvaol [342]	66	2.864	1.059	15.546	0.067	0.33	A	0.418
Vincristine [343]	132	9.653	1.254	27.249	0.047	-1.14	I	0.758

Grupo Inactivo								
1r,9s-Hydrastine	62.5	4.572	1.33	12.414	0.046	-1.27	I	0.782
4-O-Methylphloracetophenone	30	2.155	1.261	5.522	0.047	-1.85	I	0.864
Abscisic Acid (Cis,Trans; +/-)	42	2.551	1.283	9.021	0.052	-0.25	I	0.563
Acetosyringone	32	2.241	1.23	5.671	0.064	-1.19	I	0.767
Ajmaline	51	2.581	1.135	11.358	0.054	-1.00	I	0.732
Albizziine	24.5	3.142	1.09	4.192	0.053	-1.10	I	0.750
Anisodamine	48.5	4.523	1.157	9.517	0.037	-1.88	I	0.868
Apiole	36	2.666	1.241	6.284	0.048	-2.61	I	0.931
Asarinin (-)	58	4.886	1.289	11.859	0.031	-1.34	I	0.793
Asarylaldehyde	32	2.627	1.278	5.145	0.06	-1.62	I	0.835
Asiatic acid	75	3.78	1.065	16.787	0.066	-0.45	I	0.611
Azadirachtin	118	6.688	1.065	24.273	0.056	-3.96	I	0.981
Beta-Escin	182	14.11	1.06	36.355	0.059	-2.63	I	0.933
Biochanin A	47	4.147	1.43	9.181	0.048	0.34	A	0.415
Capsaicin	47.5	6.303	1.291	8.893	0.041	0.77	A	0.317
Chlorogenic acid	59	6.136	1.261	11.365	0.065	1.43	A	0.194
Cinchonidine	46	3.862	1.352	9.563	0.043	0.18	A	0.457
Citropten	34	2.583	1.337	6.256	0.056	-0.66	I	0.660
Colchicine	62.5	5.214	1.359	11.948	0.048	-0.94	I	0.720
Colchicine	64.5	5.299	1.347	12.139	0.046	-1.62	I	0.835
Colforsin	65	2.786	1.038	14.35	0.072	-1.02	I	0.735
Crustecdysone	75	4.2	1.068	17.219	0.067	0.85	A	0.301
Cryptotanshinone	47	2.573	1.244	10.484	0.058	0.27	A	0.435
D,L-Threo-3-Hydroxyaspartic acid	25.5	2.675	1.084	4.206	0.04	-3.12	I	0.958
Deltaline	71.5	3.294	1	15.392	0.065	-2.29	I	0.908
Dihydrocelastryl Diacetate	84	4.375	1.237	19.238	0.069	1.72	A	0.152
Dihydromyristicin	31	2.389	1.216	5.649	0.045	-2.23	I	0.903
Diprotin A	53.5	5.048	1.04	9.869	0.042	-3.15	I	0.959
Eugenol.Mol	26	2.252	1.31	4.613	0.052	-0.81	I	0.691
Eupatorin	57	4.7	1.318	10.6	0.054	-1.18	I	0.765
Eupatoriochromene	35	1.853	1.31	7.784	0.072	1.66	A	0.160
Evernic acid	55	4.704	1.312	10.604	0.04	-1.47	I	0.813
Frequentin	40	5.046	1.251	6.966	0.051	-0.11	I	0.527
Gambogic acid amide	100	6.08	1.279	22.267	0.058	1.22	A	0.228
Griseofulvin	54.33	3.722	1.266	10.694	0.063	-0.64	I	0.655
Hydroquinidine	51	4.138	1.305	10.366	0.046	-0.38	I	0.593
Hydroxyprogesterone	51	2.73	1.089	11.603	0.057	-0.47	I	0.617
Ichthyone	67	4.607	1.425	13.821	0.057	0.61	A	0.352
Isoginkgetin	94	8.626	1.498	18.912	0.044	1.54	A	0.177
Kainic acid	34.5	2.692	1.077	6.686	0.056	-1.66	I	0.841
Khellin	43	2.745	1.373	8.198	0.056	-0.92	I	0.715
Kinetin	35.5	3.373	1.398	6.774	0.026	-1.54	I	0.824

Lappaconitine	93	5.796	1.13	19.358	0.059	-1.72	I	0.849
Ligustilide	30	2.633	1.265	5.727	0.025	-2.68	I	0.936
Madecassic acid	78	3.97	1.063	17.354	0.066	-0.59	I	0.645
Norstictic Acid	63	4.505	1.341	12.343	0.052	-1.14	I	0.757
Ouabain	94	6.754	1.044	19.458	0.058	-1.48	I	0.814
Pachyrrhizin	56	4.525	1.506	11.31	0.051	1.13	A	0.244
Pachyrrhizone	61	4.548	1.39	12.346	0.054	0.24	A	0.441
Paeonol	27	1.965	1.288	4.972	0.051	-1.20	I	0.769
Physcion	47	3.267	1.368	9.477	0.064	0.68	A	0.336
Pimpinellin	41	2.926	1.328	7.649	0.053	-1.27	I	0.780
Piplartine	51.5	5.268	1.37	9.226	0.044	-0.88	I	0.707
Plectocomine Methyl Ether	32	2.301	1.25	6.455	0.034	-2.11	I	0.892
Protoporphyrin Ix	90	7.197	1.49	18.817	0.03	0.25	A	0.440
Pseudo-Anisatin	48	2.125	1.031	10.403	0.064	-1.67	I	0.841
Pteryxin	63	4.426	1.289	12.948	0.056	-0.24	I	0.561
Pyridoxine	27.5	2.343	1.296	4.654	0.065	-0.32	I	0.580
Rutin.Mol	102	9.734	1.311	19.538	0.055	0.16	A	0.461
Safrole.Mol	26	2.112	1.282	4.919	0.041	-1.52	I	0.821
Salicin	47	5.145	1.197	8.19	0.053	-1.15	I	0.761
Salsolidine	32.5	2.088	1.254	6.14	0.064	-0.67	I	0.662
Salsoline	30.5	2.012	1.253	5.949	0.069	0.18	A	0.457
Salvinorin A	70	4.893	1.093	14.333	0.054	-1.80	I	0.859
Salvinorin B	63	4.266	1.098	12.92	0.057	-1.59	I	0.830
Strychnine	53	3.302	1.189	12.052	0.041	-0.58	I	0.641
Tetrahydropalmatine	56.5	4.183	1.311	10.946	0.055	-0.97	I	0.725
Theobromine	30	1.52	1.198	5.845	0.065	-1.02	I	0.735
Tryptamine	41	3.128	1.461	8.516	0.048	0.82	A	0.307
Umbelliferone	27	2.222	1.334	5.357	0.075	1.93	A	0.127
Vincamine	56	3.606	1.195	11.842	0.051	-1.01	I	0.733

FD: Función discriminante.

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

P.A.: probabilidad de que el compuesto sea activo.

Dz: índice de Pogliani.

S2K: modificación alfa del índice de doble camino de Kier.

PCR: cociente entre el número de enlaces múltiples y el número total de enlaces.

X2sol: índice de conectividad de solvatación de orden 2.

JGI4: índice de carga ponderados por enlace de orden 4.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.6. Compuestos que conforman el grupo test del modelo 3 y valores de DF₃ asociados a estos.

Compuestos	Dz	S2K	PCR	X2sol	JGI4	FD ₃	Clas.	P.A.
Grupo Activo								
4-Methylesculetin [319]	32	2.212	1.312	6.404	0.078	1.60	A	0.831
Apigenin [344]	45	4.064	1.402	9.12	0.049	0.91	A	0.712
Aspirin [345]	30	2.922	1.337	5.582	0.044	-0.61	I	0.351
Caffeic acid [346]	30	3.329	1.348	5.605	0.069	1.96	A	0.877
Celastrol [347]	70	3.318	1.23	16.392	0.074	2.16	A	0.896
Celecoxib [348]	60	5.249	1.391	12.289	0.051	1.16	A	0.761
CGP049090 [304]	88	6.304	1.419	17.945	0.05	-0.22	I	0.445
Diosgenin [349]	63	3.407	1.06	14.64	0.062	0.38	A	0.593
FH535 [350]	49.7	5.299	1.4	12.31	0.061	6.52	N.C.	0.999
Fisetin [351]	48	4.258	1.395	9.488	0.063	1.53	A	0.821
Hydnocarpin [352]	77	7.217	1.414	15.216	0.049	0.98	A	0.726
ICG-001 [353]	88	9.825	1.316	18.034	0.042	2.78	A	0.941
ICRT-14 [355]	57.5	5.392	1.447	12.553	0.036	1.98	A	0.878
IWP-2 [304]	66	7.287	1.429	15.656	0.041	5.93	N.C.	0.997
JW55 [304]	70	7.955	1.306	13.603	0.029	-0.07	I	0.482
Monocrotaline [356]	52.5	3.209	1.082	10.936	0.037	-3.28	I	0.036
Paclitaxel [357]	138.5	11.711	1.22	28.58	0.051	0.78	A	0.686
PKF118-744 [358]	53	4.131	1.396	10.493	0.059	0.57	A	0.639
PKF222-815 [359]	140	11.329	1.584	27.896	0.046	0.44	A	0.608
PNU-74654 [360]	52	6.127	1.577	10.141	0.028	1.42	A	0.805
Shikonin [361]	47	3.899	1.38	9.371	0.058	0.85	A	0.700
Sulindac [362]	54.5	5.073	1.443	11.547	0.045	1.94	A	0.874
XAV-939 [363]	48.5	4.663	1.305	8.435	0.043	-2.09	I	0.110
ZTM000990 [364]	115.5	8.266	1.308	22.333	0.056	-2.70	I	0.063
Grupo Inactivo								
1-Methylxanthine	28	1.641	1.214	5.286	0.073	-0.20	I	0.450
Anethole	23	2.097	1.318	4.084	0.048	-0.84	I	0.301
Bicuculline (+)	60.5	4.507	1.305	12.529	0.042	-0.78	I	0.313
Chrysanthemic acid, ethylester	30	1.046	1.103	6.349	0.06	-1.74	I	0.149
Crassin acetate	59	4.82	1.185	12.316	0.043	-0.79	I	0.312
Dihydrojasmonic acid, methyl ester	35	3.949	1.053	6.223	0.036	-2.90	I	0.052
Inosine	45	3.743	1.237	8.263	0.044	-2.30	I	0.091
Melatonin	37	3.278	1.292	7.173	0.036	-1.50	I	0.182
Penicillic acid	28	1.252	1.159	5.311	0.06	-1.99	I	0.120
Pomiferin	68	4.925	1.397	14.598	0.055	1.49	A	0.816
Pyromycin	95.5	7.077	1.272	19.183	0.054	-1.09	I	0.252
Quassin	62	3.026	1.128	12.892	0.067	-1.68	I	0.157
Reserpine	98	8.103	1.252	18.855	0.047	-2.17	I	0.102
Rutilantinone	71	5.264	1.362	14.082	0.058	-0.21	I	0.447

ANEXOS

Strophanthidin	64	4.269	1.072	13.867	0.056	-0.70	I	0.330
Trigonelline	22.5	1.742	1.29	4.276	0.066	0.53	A	0.630
Vindoline	73	4.36	1.233	14.92	0.055	-1.80	I	0.142

FD: Función discriminante.

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

P.A.: probabilidad de que el compuesto sea activo.

Dz: índice de Pogliani.

S2K: modificación alfa del índice de doble camino de Kier.

PCR: cociente entre el número de enlaces múltiples y el número total de enlaces.

X2sol: índice de conectividad de solvatación de orden 2.

JGI4: índice de carga ponderado por enlace de orden 4.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.7. Compuestos que conforman el grupo de entrenamiento del modelo 4 y valores de FD₄ asociados a estos.

Compuestos	SCBO	nN	ZM1	GGI4	FD ₄	Clas.	P. A.
Grupo Activo							
10-Hydroxycamptothecin [305]	39	2	154	2.53	0.33	A	0.571
2,4-Diaminoquinazoline [365]	18	4	62	0.71	-0.81	I	0.305
4-Methylesculetin [319]	20	0	74	1.25	0.60	A	0.640
Agelastatine [306]	27	4	122	1.73	-1.83	I	0.134
Apigenin [344]	30	0	108	1.43	0.80	A	0.683
Artenimol [307]	23	0	122	2.45	-0.85	I	0.291
Aspirin [345]	18	0	60	0.66	0.46	A	0.609
Auraptene [366]	30	0	106	0.87	0.29	A	0.566
Azaserine [367]	15	3	48	0.32	-0.68	I	0.335
Bergapten [368]	24	0	88	1.21	0.52	A	0.621
Caffeic acid [346]	18	0	60	0.69	0.49	A	0.618
Calhostin [310]	83	0	318	6.36	4.23	A	0.984
Camptothecin [311]	39	2	154	2.53	0.33	A	0.571
Celecoxib [348]	38	3	142	1.92	-0.03	I	0.483
CGP049090 [304]	55	0	226	5.27	2.75	A	0.936
Curcumin [370]	38	0	130	1.55	1.31	A	0.783
Dexamethasone [371]	35	0	168	3.82	0.34	A	0.572
Diallyltrisulfide [315]	10	0	30	0.08	0.00	A	0.499
Ellagic acid [372]	33	0	130	3.18	1.94	A	0.870
Fenoprofen [373]	26	0	88	0.65	0.38	A	0.588
FH535 [350]	32	2	114	1.96	0.89	A	0.703
Fisetin [351]	31	0	114	1.9	1.15	A	0.754
Gallic acid [320]	16	0	58	0.92	0.40	A	0.596
Gossypol [374]	53	0	210	5.48	3.69	A	0.974
Hecogenin [322]	37	0	192	4.11	-0.63	I	0.336
Honokiol [375]	29	0	98	1.23	1.06	A	0.737
Hydnocarpin [352]	49	0	188	2.88	1.30	A	0.778
Ibuprofen [376]	19	0	70	0.74	0.05	A	0.509
ICG-001 [353]	60	4	222	2.81	0.30	A	0.560
ICRT-14 [355]	41	3	146	1.53	-0.02	I	0.487
Indole-3-Carbinol [324]	16	1	56	0.26	-0.51	I	0.373
Indomethacin [325]	36	1	132	2.05	0.94	A	0.713
Isoflavone [326]	27	0	90	0.9	0.77	A	0.678
Isoliquiritigenin [327]	28	0	94	0.92	0.74	A	0.672
IWP-2 [304]	46	4	170	1.92	-0.39	I	0.394
Juglone [378]	20	0	68	0.9	0.64	A	0.651
JW55 [304]	45	2	166	1.32	-0.46	I	0.377
Kirenol [329]	27	0	136	2.55	-0.77	I	0.308
LGK-974 [379]	46	6	156	1.21	-0.75	I	0.313
Melphalan [379]	23	2	86	0.82	-0.62	I	0.345

Mesalamine [380]	15	1	52	0.65	-0.01	I	0.495
Monocrotaline [381]	28	1	130	1.58	-1.49	I	0.179
Murrayafoline A [382]	24	1	88	1.06	0.05	A	0.508
Mycophenolatemofetil [382]	39	1	156	2.1	-0.03	I	0.482
Nabumetone [383]	24	0	84	1.07	0.65	A	0.652
Naproxen [384]	24	0	86	1.11	0.55	A	0.628
Naringin [331]	52	0	224	3.46	0.04	A	0.495
Nocodazole [385]	31	3	110	0.81	-0.69	I	0.328
NSC668036 [386]	36	2	150	2	-0.75	I	0.312
Paclitaxel [357]	84	1	346	7.65	3.58	A	0.970
PFK118-310 [332]	20	4	74	1.29	-0.53	I	0.368
Phenylbutazone [387]	33	2	118	1.81	0.66	A	0.653
Piroxicam [388]	35	3	124	2.25	0.94	A	0.713
PKF118-744 [358]	35	0	130	2.76	1.95	A	0.872
PKF222-815 [359]	87	0	344	7.04	4.08	A	0.982
PNU-74654 [360]	36	2	120	0.78	0.08	A	0.513
Protocatechualdehyde [333]	14	0	46	0.53	0.34	A	0.582
Pyrvinium [389]	43	3	156	1.98	0.26	A	0.556
Quercetin [390]	32	0	120	2.13	1.22	A	0.766
Rotenone [391]	41	0	166	3.06	1.13	A	0.747
Shikonin [361]	29	0	108	2.04	1.25	A	0.772
Sitosterol [337]	34	0	168	2.65	-1.28	I	0.210
Sorafenib [392]	45	4	164	1.72	-0.43	I	0.384
Sulforaphane [338]	12	1	36	0.16	-0.14	I	0.463
Sulindac [362]	37	0	132	1.68	1.07	A	0.737
Tanshinone [339]	33	0	122	2.21	1.41	A	0.799
Theophylline [340]	18	4	70	1.19	-0.85	I	0.297
Topotecan [394]	44	3	180	3.32	0.26	A	0.553
Toxoflavin [395]	20	5	74	1.29	-0.82	I	0.303
Uvaol [342]	37	0	196	5.06	0.18	A	0.532
Vincristine [343]	80	4	354	8.24	1.77	A	0.842
XAV-939 [363]	29	2	114	1.21	-0.75	I	0.315
ZTM000990 [364]	67	1	286	7.29	3.34	A	0.963
Grupo Inactivo							
Acarbose	48	1	234	4.5	-0.81	I	0.294
Acebutolol	29	2	110	1.29	-0.35	I	0.406
Aceclidine	14	1	62	0.46	-1.23	I	0.223
Acedapsone	34	2	116	1.24	0.41	A	0.595
Acepromazinemaleate	32	2	120	1.47	-0.13	I	0.459
Acetaminophen	15	1	50	0.5	-0.03	I	0.489
Acetanilide	14	1	44	0.31	-0.06	I	0.483
Acetarsol	20	1	74	1.05	0.08	A	0.515
Acetohexamide	30	2	110	0.97	-0.47	I	0.379
Acetohydroxamic acid	5	1	16	0	-0.60	I	0.353
Acetriazoic acid	21	1	78	1.4	0.43	A	0.601

Acetylcholine	10	1	42	0.24	-1.00	I	0.266
Acetylcysteine	11	1	40	0.48	-0.32	I	0.418
Acyclovir	21	5	80	0.93	-1.43	I	0.190
Adenosine	25	5	104	1.19	-1.91	I	0.126
Adenosinephosphate	30	5	126	1.51	-1.92	I	0.125
Adiphenine	31	1	108	0.78	0.01	A	0.495
Aklomide	18	2	62	0.73	-0.19	I	0.448
Alaproclate	21	1	82	1.06	-0.26	I	0.431
Albuterol	20	1	82	1.01	-0.57	I	0.357
Alclometazonedipropionate	35	0	166	3.79	0.45	A	0.599
Alfluzosin	36	5	142	2.06	-0.96	I	0.270
Algesteroneacetophenide	44	0	202	4.04	0.33	A	0.569
Aliskirenhemifumarate	44	3	184	2.37	-1.13	I	0.235
Allopurinol	15	4	52	0.33	-1.25	I	0.220
Alpha-tocopherol	35	0	154	2.11	-0.59	I	0.346
Alprenolol	22	1	80	0.7	-0.27	I	0.428
Alrestatin	29	1	104	1.85	1.04	A	0.734
Althiazide	31	3	116	1.8	0.00	A	0.493
Altrenogest	31	0	134	1.98	-0.26	I	0.425
Alverinecitrate	28	1	96	0.22	-0.50	I	0.371
Amantadine	13	1	68	0.33	-2.09	I	0.109
Amcinonide	46	0	220	5	0.60	A	0.631
Amikacin	43	5	206	3.55	-2.26	I	0.090
Amiloride	20	7	72	1	-1.58	I	0.168
Aminacrine	24	2	82	1.08	0.23	A	0.553
Aminocaproic acid	9	1	32	0.16	-0.60	I	0.352
Aminohippuric acid	19	2	64	0.54	-0.31	I	0.419
Aminolevulinic acid	10	1	34	0.32	-0.31	I	0.421
Aminopentamide	30	2	110	1.46	0.09	A	0.517
Aminosalicylate	15	1	52	0.49	-0.19	I	0.449
Amiodarone	41	1	156	1.99	0.35	A	0.577
Amiprilose	27	1	144	2.39	-1.85	I	0.131
Amitraz	31	3	108	1.15	-0.15	I	0.455
Amitriptyline	30	1	108	0.99	-0.01	I	0.491
Amlodipine	36	2	136	2.42	0.78	A	0.678
Amodiaquine	35	3	128	1.48	-0.25	I	0.430
Amoxicillin	33	3	138	2.31	-0.54	I	0.359
Amphotericinb	76	1	318	3.71	-0.92	I	0.268
Ampicillin	32	3	132	2.12	-0.57	I	0.354
Ampyzinesulfate	12	3	40	0.19	-0.99	I	0.270
Amsacrine	43	3	152	1.97	0.55	A	0.626
Anagrelide	23	3	90	1.12	-0.86	I	0.292
Aniracetam	22	1	80	0.74	-0.23	I	0.439
Antazoline	29	3	100	0.54	-0.77	I	0.312
Anthralin	26	0	94	1.46	0.87	A	0.699

Antipyrine	20	2	72	0.6	-0.59	I	0.353
Apomorphine	29	1	116	2.02	0.33	A	0.575
Apramycin	40	5	200	3.59	-2.52	I	0.071
Aripiprazole	40	3	156	1.54	-1.01	I	0.259
Armodafinil	28	1	92	0.7	0.35	A	0.582
Arsanilic acid	15	1	54	0.42	-0.42	I	0.392
Ascorbic acid	14	0	58	0.65	-0.42	I	0.392
Ascorbylpalmitate	32	0	128	0.89	-0.82	I	0.298
Astemizole	48	4	180	1.69	-0.90	I	0.280
Atenolol	23	2	86	0.94	-0.48	I	0.377
Atovaquone	38	0	142	2.05	1.00	A	0.724
Atropineoxide	29	1	118	1.01	-0.99	I	0.265
Atropinesulfate	27	1	110	0.82	-1.12	I	0.241
Avobenzone	32	0	116	1.08	0.30	A	0.568
Azacididine	21	4	88	1.19	-1.44	I	0.188
Azaperone	33	3	120	0.6	-1.18	I	0.229
Azathioprine	28	7	102	0.98	-1.83	I	0.136
Azelaic acid	14	0	50	0.24	-0.30	I	0.423
Azelastine	38	3	144	1.77	-0.36	I	0.402
Azithromycin	55	2	274	5.12	-1.61	I	0.156
Aztreonam	37	5	148	1.61	-1.68	I	0.152
Bacampicillin	41	3	168	2.44	-0.61	I	0.342
Bacitracin	123	17	484	7.2	-2.06	I	0.102
Beclomethasone	45	0	204	4.86	1.38	A	0.790
Bekanamycin	35	5	174	3.11	-2.40	I	0.080
Benazepril	42	2	154	1.84	0.28	A	0.561
Bendroflumethiazide	39	3	150	2.79	0.63	A	0.645
Benurestat	20	2	68	0.54	-0.36	I	0.408
Benzbromarone	32	0	118	1.79	0.97	A	0.720
Benzethonium	37	1	150	1.33	-0.98	I	0.265
Benzocaine	16	1	54	0.38	-0.22	I	0.443
Benzoic acid	13	0	40	0.19	0.14	A	0.533
Benzoylpas	28	1	94	0.88	0.41	A	0.596
Benzoylperoxide	27	0	86	0.38	0.47	A	0.610
Benzthiazide	39	3	140	1.79	0.22	A	0.547
Benzydamine	32	3	116	0.66	-1.07	I	0.251
Benzylbenzoat	24	0	76	0.34	0.41	A	0.597
Bepheniumhydroxynapthoate	26	1	92	0.62	-0.25	I	0.433
Betahistine	13	2	42	0.15	-0.64	I	0.344
Betaine	8	1	34	0	-1.19	I	0.232
Betamethasone	35	0	168	3.82	0.34	A	0.572
Betamethasone-1,7,2,1-dipropionate	45	0	204	4.86	1.38	A	0.790
Betamethasoneacetate	39	0	182	4.06	0.58	A	0.629
Beta-Propiolactone	6	0	22	0	-0.51	I	0.375
Bethanechol	11	2	48	0.24	-1.49	I	0.182

Bezafibrate	34	1	124	1.16	0.01	A	0.495
Bifonazole	38	2	126	0.59	-0.07	I	0.474
Biotin	19	2	80	0.53	-1.52	I	0.176
Bisacodyl	40	1	136	1.36	0.86	A	0.695
Bismuthsubsalicylate	13	7	0	1	2.04	A	0.885
Bithionate	26	0	98	1.37	0.46	A	0.607
Bleomycin	118	17	488	7.15	-3.68	I	0.022
Bretyliumtosylate	16	1	62	0.82	-0.31	I	0.420
Bromhexine	22	2	90	1	-0.97	I	0.270
Bromindione	28	0	98	1.13	0.69	A	0.660
Bromperidol	35	1	134	1.02	-0.65	I	0.335
Brompheniraminemaleate	26	2	92	0.57	-0.60	I	0.350
Brucine	28	0	98	1.13	0.69	A	0.660
Budesonide	39	0	184	4.02	0.39	A	0.583
Bupropion	20	1	78	0.86	-0.44	I	0.386
Buspirone	36	5	148	1.28	-2.31	I	0.087
Busulfan	17	0	62	0.4	-0.25	I	0.434
Butacaine	26	2	96	0.62	-0.84	I	0.296
Butylparaben	18	0	62	0.46	0.08	A	0.515
Caffeine	19	4	76	1.39	-0.81	I	0.304
Camphor	13	0	66	0.11	-1.90	I	0.128
Candesartan	64	6	238	2.21	-1.17	I	0.227
Canrenoic acid	33	0	152	2.64	-0.34	I	0.406
Canrenone	33	0	154	2.53	-0.62	I	0.340
Capobenic acid	28	1	104	1.44	0.31	A	0.571
Captopril	16	1	66	0.89	-0.53	I	0.367
Carbachol	10	2	42	0.24	-1.30	I	0.213
Carbadox	29	4	94	1.14	0.09	A	0.516
Carbenicillin	35	2	142	2.28	-0.08	I	0.471
Carbenoxolone	50	0	242	6.17	1.32	A	0.778
Carbidopa	20	2	78	0.93	-0.65	I	0.338
Carbinoxamine	27	2	96	0.57	-0.64	I	0.339
Carisoprodol	19	2	78	0.96	-0.88	I	0.290
Carprofen	28	1	104	0.98	-0.23	I	0.437
Carvedilol	42	2	154	1.17	-0.49	I	0.371
Cefaclor	33	3	128	1.72	-0.49	I	0.373
Cefadroxil	34	3	134	1.91	-0.46	I	0.379
Cefamandole	43	6	166	1.96	-1.39	I	0.193
Cefdinir	36	5	138	2.01	-0.72	I	0.320
Cefditoren	55	6	216	2.37	-1.61	I	0.159
Cefoperazone	60	9	236	3.28	-1.67	I	0.150
Cefotaxime	40	5	156	2.17	-0.87	I	0.288
Cefoxitin	37	3	148	2.31	-0.28	I	0.421
Cefpodoxime	37	5	146	2.09	-0.97	I	0.267
Cefprozil	37	3	142	2.11	-0.07	I	0.474

Cefsulodin	52	4	194	2.66	0.19	A	0.535
Ceftazidime	51	6	198	2.32	-1.34	I	0.200
Ceftibuten	37	4	142	1.66	-0.88	I	0.286
Ceftriaxone	49	8	192	2.73	-1.50	I	0.175
Cefuroxime	39	4	150	2.04	-0.52	I	0.363
Cephalexin	33	3	128	1.72	-0.49	I	0.373
Cephalothin	35	2	136	1.84	-0.14	I	0.455
Cephradine	32	3	128	1.72	-0.74	I	0.316
Cetirizine	36	2	134	1.08	-0.62	I	0.341
Cetylpyridinium	25	1	90	0.15	-0.90	I	0.285
Chenodiol	32	0	160	3.07	-0.69	I	0.324
Chlorcyclizine	29	2	108	0.96	-0.59	I	0.350
Chlorhexidine	45	10	158	1.24	-2.28	I	0.090
Chlormadinoneacetate	36	0	164	3.64	0.68	A	0.653
Chlorocresol	12	0	42	0.41	0.00	I	0.496
Chloroguanide	22	5	78	0.58	-1.43	I	0.191
Chloroquine	28	3	106	0.99	-0.95	I	0.273
Chlorothiazide	26	3	94	1.41	-0.07	I	0.477
Chlorotrianisene	39	0	136	1.75	1.35	A	0.788
Chloroxine	19	1	68	0.94	0.14	A	0.531
Chloroxylenol	13	0	48	0.52	-0.07	I	0.479
Chlorpheniramine	26	2	92	0.57	-0.60	I	0.350
Chlorpromazine	29	2	110	1.39	-0.24	I	0.434
Chlorpropamide	23	2	80	0.82	-0.17	I	0.453
Chlorprothixene	30	1	110	1.39	0.31	A	0.570
Chlortetracycline	44	2	192	5.56	2.26	A	0.901
Chlorthalidone	33	2	124	1.36	-0.31	I	0.416
Chlorzoxazone	16	1	58	0.45	-0.44	I	0.388
Cholesterol	32	0	158	2.57	-1.13	I	0.236
Choline	6	1	28	0	-1.25	I	0.222
Cilostazol	36	5	140	1.19	-1.81	I	0.136
Cimetidine	22	6	74	0.37	-1.67	I	0.156
Cinnarizine	41	2	142	0.8	-0.28	I	0.422
Ciprofloxacin	33	3	134	1.87	-0.76	I	0.311
Citalopram	34	2	126	1.13	-0.47	I	0.376
Clarithromycin	56	1	274	5.36	-0.79	I	0.297
Clavulanate	18	1	74	1.22	-0.24	I	0.435
Clidinium	36	1	144	1.5	-0.59	I	0.348
Clindamycin	29	2	136	2.33	-1.10	I	0.243
Clofazimine	50	4	180	2.59	0.65	A	0.647
Clomiphenecitrate	41	1	142	1.28	0.58	A	0.633
Clomipramine	30	2	114	1.26	-0.43	I	0.386
Clonidine	19	3	70	0.73	-0.84	I	0.299
Clopidogrel	29	1	110	1.31	-0.04	I	0.483
Clopidol	14	1	54	0.72	-0.34	I	0.413

Clorsulon	28	3	104	1.88	0.24	A	0.553
Cloxacillin	40	3	164	2.69	-0.28	I	0.420
Cloxyquin	18	1	62	0.67	0.02	A	0.502
Clozapine	33	4	126	1.64	-0.72	I	0.321
Colforsin	34	0	170	5.66	2.07	A	0.883
Colistimethate	128	16	510	6.96	-2.72	I	0.054
Colistin	92	16	376	6.08	-2.84	I	0.051
Cortisone	33	0	154	3.16	0.11	A	0.517
Cotinine	18	2	66	0.44	-0.83	I	0.300
Cromolyn	49	0	180	2.68	1.67	A	0.835
Crotamiton	20	1	68	0.78	0.21	A	0.549
Cyclizine	28	2	102	0.76	-0.62	I	0.345
Cyclobenzaprine	30	1	102	0.99	0.44	A	0.603
Cyclopentolate	26	1	104	0.9	-0.82	I	0.299
Cycloserine	8	2	32	0	-1.33	I	0.207
Cyclosporine	97	11	412	8	-0.58	I	0.334
Cyclothiazide	35	3	142	2.04	-0.65	I	0.334
Cyproheptadine	33	1	120	1.44	0.38	A	0.586
Cyproterone	34	0	164	3.08	-0.47	I	0.373
Cysteamine	3	1	10	0	-0.66	I	0.340
Cysteine	7	1	26	0	-0.85	I	0.299
Dactinomycin	115	12	480	8.44	-0.90	I	0.264
Danazol	34	1	154	2.55	-0.64	I	0.337
Dantrolene	34	4	120	0.88	-0.89	I	0.285
Dapsone	26	2	88	0.84	0.02	A	0.499
Daunorubicin	51	1	216	4.79	1.63	A	0.828
Debrisoquinsulfate	18	3	66	0.72	-0.81	I	0.306
Decoquinat	37	1	140	1.65	0.14	A	0.525
Deferoxamine	43	6	166	1.2	-2.27	I	0.090
Dehydrocholic acid	36	0	166	3.71	0.61	A	0.637
Demeclocycline	43	2	184	5.04	1.99	A	0.875
Denatoniumbenzoate	32	2	118	1.48	0.03	A	0.501
Desipramine	28	2	102	0.99	-0.36	I	0.406
Desonide	38	0	184	4.34	0.50	A	0.610
Desoxycorticosterone	30	0	140	2.49	-0.38	I	0.397
Dexchlorpheniramine	26	2	92	0.57	-0.60	I	0.350
Dexlansoprazole	35	3	132	1.64	-0.37	I	0.402
Dexpanthenol	14	1	60	0.48	-1.06	I	0.254
Dextromethorphan	26	1	116	1.74	-0.75	I	0.314
Diazoxide	21	2	76	1.31	0.18	A	0.541
Dibenzothiophene	21	0	72	0.27	-0.13	I	0.463
Dicloxacillin	41	3	170	2.84	-0.31	I	0.413
Dicumarol	38	0	138	2.2	1.47	A	0.807
Dicyclomine	24	1	106	0.55	-1.89	I	0.128
Dienestrol	29	0	98	1.16	0.98	A	0.723

Diethylcarbamazine	15	3	64	0.54	-1.62	I	0.163
Diethylstilbestrol	28	0	98	1.16	0.73	A	0.669
Diethyltoluamide	18	1	64	0.54	-0.27	I	0.428
Diflorasone	36	0	174	4.29	0.69	A	0.654
Diflunisal	26	0	92	0.99	0.47	A	0.609
Digoxin	64	0	320	5.97	-1.21	I	0.214
Dihydroergotamine	60	5	258	4.71	-0.49	I	0.364
Dihydrostreptomycin	44	7	210	3.95	-2.42	I	0.078
Diloxanide	18	1	66	0.7	-0.24	I	0.437
Diltiazem	39	2	148	2.23	0.43	A	0.597
Dimenhydrinate	26	1	90	0.38	-0.38	I	0.402
Diperodon	39	3	140	1.01	-0.68	I	0.329
Diphenhydramine	26	1	90	0.38	-0.38	I	0.402
Dipyridamole	44	8	182	1.91	-2.98	I	0.046
Dipyrene	29	3	110	1.49	-0.41	I	0.392
Dirithromycin	62	2	306	5.74	-1.51	I	0.168
Disopyramide	33	3	124	0.98	-1.04	I	0.255
Disulfiram	17	2	66	0.32	-1.23	I	0.224
D-Lactitol	23	0	110	1.76	-0.75	I	0.313
Dobutamine	29	1	106	0.96	-0.15	I	0.456
Domperidone	42	5	166	1.5	-1.88	I	0.128
Donepezil	38	1	148	1.58	-0.29	I	0.418
Dopamine	14	1	50	0.53	-0.25	I	0.435
Doxepin	30	1	108	0.99	-0.01	I	0.491
Doxycycline	43	2	184	5.4	2.41	A	0.914
Doxylamine	27	2	98	0.58	-0.79	I	0.308
Droperidol	40	3	148	1.27	-0.72	I	0.319
Duloxetine	30	1	106	0.81	-0.07	I	0.476
Econazole	34	2	122	1.03	-0.28	I	0.422
Edoxudine	22	2	92	1.26	-0.82	I	0.301
Edrophonium	15	1	58	0.6	-0.52	I	0.370
Eletriptan	39	2	146	1.13	-0.70	I	0.324
Enalapril	34	2	130	1.52	-0.32	I	0.413
Enoxacin	31	4	122	2.03	-0.47	I	0.377
Enrofloxacin	35	3	144	2.1	-0.74	I	0.316
Epirubicin	52	1	220	4.79	1.58	A	0.821
Equilin	28	0	118	1.65	-0.20	I	0.441
Ergocalciferol	35	0	152	1.71	-0.91	I	0.278
Ergonovine	33	3	134	1.92	-0.70	I	0.325
Ergotamine	61	5	258	4.71	-0.24	I	0.425
Erythromycin	55	1	270	5.2	-0.93	I	0.269
Escitalopram	34	2	126	1.13	-0.47	I	0.376
Estriol	27	0	124	1.81	-0.72	I	0.320
Estrone	27	0	118	1.65	-0.46	I	0.380
Estropipate	33	0	140	1.93	-0.26	I	0.426

Ethacrynic acid	25	0	90	1.28	0.71	A	0.665
Ethambutol	13	2	54	0.24	-1.43	I	0.190
Ethamivan	20	1	74	0.77	-0.25	I	0.434
Ethionamide	15	2	50	0.5	-0.32	I	0.417
Ethosuximide	12	1	50	0.21	-1.14	I	0.240
Ethoxzolamide	23	2	84	1.18	-0.05	I	0.482
Ethynodioldiacetate	36	0	158	2.58	-0.10	I	0.464
Etidronate	12	0	56	0	-1.53	I	0.175
Etomidate	25	2	88	0.92	-0.15	I	0.458
Eucatropine	26	1	108	1.27	-0.70	I	0.325
Eugenol	16	0	54	0.57	0.30	A	0.570
Evansblue	89	6	326	5.79	2.73	A	0.934
Famciclovir	30	5	112	1.09	-1.35	I	0.201
Famotidine	26	7	94	0.61	-2.17	I	0.101
Fampridine	11	3	36	0.22	-0.91	I	0.286
Febuxostat	31	2	110	1.39	0.27	A	0.561
Felbamate	22	2	76	0.43	-0.58	I	0.355
Fenbendazole	31	3	108	0.68	-0.69	I	0.328
Fenofibrate	34	0	126	1.68	0.76	A	0.673
Fenoterol	29	1	108	1.32	0.12	A	0.523
Fenretinide	39	1	142	1.31	0.10	A	0.515
Fenspiride	25	2	100	0.85	-1.13	I	0.240
Finasteride	33	2	158	2.65	-1.37	I	0.196
Florfenicol	27	1	102	1.06	-0.23	I	0.435
Floxuridine	21	2	88	1.22	-0.82	I	0.301
Fluconazole	31	6	116	1.08	-1.70	I	0.150
Flucytosine	12	3	42	0.41	-0.88	I	0.291
Fludarabine	26	5	110	1.46	-1.79	I	0.140
Flufenamic	37	3	148	2.64	0.10	A	0.514
Flumazenil	31	3	118	1.85	-0.09	I	0.470
Flumequine	27	1	106	2.08	0.65	A	0.651
Flumethasone	36	0	174	4.29	0.69	A	0.654
Flumethasonepivalate	43	0	206	4.61	0.43	A	0.593
Flunarizine	43	2	154	1.18	-0.23	I	0.434
Flunisolide	39	0	190	4.73	0.75	A	0.668
Flunixin	29	2	108	1.25	-0.25	I	0.432
Fluocinoloneacetone	40	0	198	5.31	1.08	A	0.736
Fluocinonide	44	0	212	5.47	1.23	A	0.764
Fluorescein	39	0	148	2.23	1.01	A	0.726
Fluorometholone	34	0	164	4.05	0.65	A	0.646
Fluorouracil	21	2	88	1.22	-0.82	I	0.301
Fluoxetine	29	1	108	0.81	-0.46	I	0.379
Fluphenazine	39	3	160	1.81	-1.25	I	0.216
Flurandrenolide	38	0	190	4.73	0.50	A	0.610
Flurothyl	10	0	50	0.24	-1.31	I	0.210

Flutamide	24	2	94	1.63	-0.03	I	0.487
Fluvastatin	41	1	154	1.98	0.49	A	0.611
Fluvoxamine	26	2	100	0.58	-1.19	I	0.229
Folic acid	45	7	162	2.16	-0.64	I	0.336
Foscarnet	8	0	30	0	-0.60	I	0.353
Fosfomicincalcium	9	0	42	0	-1.25	I	0.222
Furazolidone	22	3	80	0.66	-0.90	I	0.284
Furosemide	30	2	108	1.37	0.14	A	0.529
Gabapentin	13	1	56	0.62	-0.85	I	0.296
Galanthamine	28	1	122	2.01	-0.38	I	0.398
Gallaminetriethiodide	39	3	168	0.93	-2.87	I	0.051
Gatifloxacin	36	3	150	2.56	-0.40	I	0.392
Gemfibrozil	22	0	86	0.85	-0.25	I	0.431
Gemifloxacinmesylate	38	5	154	2.42	-0.94	I	0.273
Gentamicin	35	5	174	2.76	-2.80	I	0.055
Gluceptate	15	0	66	0.72	-0.69	I	0.331
Gluconolactone	13	0	58	0.92	-0.37	I	0.405
Glucosamine	12	1	58	0.92	-0.91	I	0.283
Glycopyrrolate	29	1	124	1.08	-1.35	I	0.200
Gramicidin	175	20	684	8.87	-2.79	I	0.049
Griseofulvin	32	0	132	3.14	1.48	A	0.809
Guanabenzacetate	19	4	64	0.53	-0.91	I	0.285
Guanethidine	15	4	60	0.12	-2.10	I	0.108
Guanfacine	20	3	70	0.85	-0.44	I	0.388
Halazone	21	1	74	0.66	-0.12	I	0.465
Haloperidol	35	1	134	1.02	-0.65	I	0.335
Hetacillin	36	3	158	3	-0.48	I	0.372
Hexachlorophene	28	0	110	1.83	0.60	A	0.640
Hexylresorcinol	17	0	62	0.53	-0.10	I	0.472
Histamine	10	3	34	0.13	-1.12	I	0.244
Homatropine	26	1	106	0.82	-1.07	I	0.250
Hydralazine	18	4	60	0.48	-0.93	I	0.281
Hydrastine	39	1	160	2.46	0.08	A	0.510
Hydrochlorothiazide	25	3	94	1.41	-0.32	I	0.414
Hydroflumethiazide	28	3	112	2.41	0.25	A	0.554
Hydroxyamphetamine	14	1	50	0.5	-0.29	I	0.426
Hydroxyurea	5	2	16	0	-0.90	I	0.289
Hydroxyzinepamoate	78	2	288	3.59	1.41	A	0.792
Hyoscyamine	27	1	110	0.82	-1.12	I	0.241
Ifosfamide	15	2	64	0.65	-1.20	I	0.229
Imipramine	29	2	108	0.99	-0.55	I	0.359
Indapamide	35	3	130	1.41	-0.49	I	0.373
Inositol	12	0	60	0.91	-0.78	I	0.310
Iodipamide	45	2	170	2.87	1.04	A	0.731
Iodoquinol	19	1	68	0.94	0.14	A	0.531

Irbesartan	46	6	174	1.61	-1.63	I	0.158
Isoetharinemesylate	20	1	80	1.05	-0.37	I	0.403
Isoflupredoneacetate	38	0	176	3.9	0.59	A	0.632
Isopropamide	34	2	132	1.22	-0.82	I	0.299
Isosorbide	11	0	54	0.33	-1.25	I	0.219
Isosorbidemononitrate	15	1	68	0.57	-1.30	I	0.211
Isotretinon	28	0	104	0.88	-0.04	I	0.482
Isoxsuprine	29	1	106	1.01	-0.08	I	0.473
Itraconazole	68	8	268	2.35	-2.83	I	0.052
Josamycin	66	1	290	4.87	-0.01	I	0.477
Kanamycinasulfate	35	4	174	3.11	-2.11	I	0.104
Ketoconazole	49	4	194	1.62	-1.77	I	0.139
Ketoprofen	28	0	94	0.73	0.53	A	0.624
Ketorolactromethamine	28	1	102	1.05	0.00	A	0.494
Ketotifen	32	1	122	1.7	0.28	A	0.562
Labetalol	32	2	116	1.12	-0.23	I	0.435
Lactulose	24	0	120	1.85	-1.15	I	0.235
Lamotrigine	23	5	82	1.07	-0.91	I	0.283
Lansoprazole	35	3	132	1.64	-0.37	I	0.402
Leucovorin	46	7	172	2.43	-0.82	I	0.296
Levalbuterol	20	1	82	1.01	-0.57	I	0.357
Levamisole	20	2	76	0.4	-1.12	I	0.242
Levobunolol	26	1	106	1.19	-0.64	I	0.338
Levocetirizine	36	2	134	1.08	-0.62	I	0.341
Levodopa	18	1	66	0.77	-0.16	I	0.457
Levofloxacin	35	3	146	2.78	-0.10	I	0.466
Levonordefrin	16	1	62	0.73	-0.41	I	0.395
Levothyroxine	32	1	122	1.81	0.40	A	0.591
Lidocaine	21	2	78	1.01	-0.31	I	0.419
Lindane	12	0	60	0.91	-0.78	I	0.310
Liothyronine	31	1	116	1.7	0.47	A	0.608
Lisinopril	36	3	138	1.6	-0.61	I	0.345
Lithiumcitrate	15	0	58	0.8	0.01	A	0.498
Lobendazole	21	3	74	0.38	-1.03	I	0.260
Loperamide	47	2	180	1.93	-0.29	I	0.417
Loratadine	38	2	144	1.79	-0.03	I	0.482
Losartan	43	6	156	1.45	-1.23	I	0.220
Lovastatin	35	0	150	1.98	-0.44	I	0.381
Loxapinesuccinate	33	3	126	1.72	-0.33	I	0.410
Malathion	21	0	82	1.04	0.01	A	0.497
Maprotiline	30	1	118	1.43	-0.24	I	0.432
Mebendazole	33	3	114	0.84	-0.45	I	0.384
Mebeverine	39	1	146	1.68	0.23	A	0.547
Mecamylamine	13	1	70	0.61	-1.92	I	0.126
Mechlorethamine	7	1	28	0.08	-0.90	I	0.287

Meclocycline	45	2	190	5.71	2.83	A	0.941
Meclofenamate	27	1	96	1.23	0.41	A	0.595
Medroxyprogesteroneacetate	35	0	164	3.64	0.42	A	0.593
Medrysone	31	0	148	3.27	0.18	A	0.535
Mefenamic acid	26	1	90	0.96	0.29	A	0.566
Mefexamide	24	2	88	0.62	-0.75	I	0.316
Mefloquine	33	2	142	2.03	-0.88	I	0.285
Melengestrolacetate	38	0	170	3.96	1.11	A	0.743
Meloxicam	34	3	126	2.18	0.45	A	0.604
Menadione	20	0	68	0.94	0.69	A	0.661
Menthol	11	0	52	0.49	-0.92	I	0.283
Mepenzolate	34	1	132	1.43	-0.28	I	0.422
Mephenterminesulfate	15	1	56	0.47	-0.52	I	0.370
Mepivacaine	23	2	90	1	-0.72	I	0.323
Mesna	8	0	28	0	-0.45	I	0.388
Metaproterenol	18	1	70	0.89	-0.32	I	0.417
Metaraminol	15	1	56	0.54	-0.43	I	0.390
Metformin	10	5	36	0.32	-1.63	I	0.163
Methacholine	11	1	48	0.24	-1.20	I	0.229
Methacycline	44	2	184	5.4	2.66	A	0.932
Methapyrilene	24	3	86	0.47	-1.07	I	0.251
Methazolamid	19	4	70	1.18	-0.61	I	0.348
Methenamine	12	4	60	0	-3.00	I	0.047
Methicillin	34	2	142	2.51	-0.07	I	0.472
Methimazole	9	2	32	0	-1.08	I	0.252
Methoxamine	18	1	70	1.05	-0.13	I	0.463
Methoxsalen	24	0	88	1.29	0.61	A	0.642
Methscopolamine	30	1	132	1.35	-1.39	I	0.194
Methylatropine	28	1	118	1.01	-1.24	I	0.219
Methyldopa	19	1	74	0.93	-0.32	I	0.417
Methylergonovine	34	3	138	2	-0.65	I	0.335
Methylphenidate	22	1	82	0.7	-0.42	I	0.391
Methylthiouracil	12	2	42	0.33	-0.68	I	0.334
Methysergidemaleate	35	3	144	2.04	-0.80	I	0.302
Metoclopramide	24	3	92	1.2	-0.67	I	0.334
Metolazone	35	3	132	2.34	0.45	A	0.602
Metoprolol	22	1	84	0.78	-0.48	I	0.377
Metronidazole	15	3	56	0.78	-0.75	I	0.318
Mexiletine	16	1	60	0.53	-0.49	I	0.376
Mianserin	29	2	112	1.45	-0.32	I	0.413
Midodrine	22	2	82	1.05	-0.31	I	0.419
Miglitol	14	1	66	1.12	-0.77	I	0.312
Minaprine	30	4	110	0.64	-1.44	I	0.187
Minocycline	44	3	188	4.68	1.25	A	0.768
Minoxidil	20	5	76	0.8	-1.54	I	0.174

Mitomycin	32	4	142	2.9	-0.71	I	0.321
Mitoxantrone	42	4	160	2.84	0.41	A	0.590
Molsidomine	21	4	82	0.44	-1.85	I	0.133
Monensin	52	0	264	5.13	-1.03	I	0.250
Montelukast	58	1	220	2.29	0.22	A	0.540
Morantelcitrate	20	2	74	0.39	-0.99	I	0.268
Moxalactam	49	6	194	2.86	-0.92	I	0.275
Moxifloxacin	39	3	166	2.6	-0.78	I	0.304
Mycophenolic	30	0	116	2.03	0.89	A	0.703
Nadolol	26	1	112	1.58	-0.64	I	0.338
Nafcillin	40	2	162	2.76	0.24	A	0.550
Nafronyl	36	1	138	0.99	-0.73	I	0.317
Nalbuphine	34	1	164	3.29	-0.52	I	0.361
Nalidixic acid	24	2	88	1.65	0.44	A	0.603
Naltrexone	34	1	160	3.26	-0.26	I	0.425
Naproxol	22	0	80	1.03	0.40	A	0.593
Natamycin	57	1	242	2.92	-0.96	I	0.264
Nateglinide	29	1	112	1.17	-0.35	I	0.407
Nefopam	27	1	98	0.77	-0.27	I	0.427
Neomycin	45	6	224	3.76	-3.15	I	0.039
Neostigmine	20	2	78	0.88	-0.72	I	0.324
Netilmicin	36	5	172	2.84	-2.30	I	0.087
Niacin	13	1	40	0.19	-0.15	I	0.460
Niacinamide	13	2	40	0.19	-0.44	I	0.389
Nicardipine	48	3	176	2.61	0.76	A	0.671
Nicergoline	43	3	176	2.75	-0.35	I	0.402
Niclosamide	30	2	106	1.59	0.54	A	0.627
Nicotineditartrate	16	2	60	0.28	-1.08	I	0.252
Nicotinylalcoholtartrate	11	1	34	0.15	-0.25	I	0.435
Nilutamide	29	3	120	1.84	-0.76	I	0.313
Nimodipine	39	2	148	2.38	0.60	A	0.636
Nisoldipine	37	2	140	2.46	0.78	A	0.678
Nitrendipine	35	2	130	2.3	0.84	A	0.691
Nitrofurantoin	24	4	86	0.74	-1.05	I	0.256
Nitromide	21	3	72	1.05	-0.10	I	0.470
Nizatidine	25	5	94	0.69	-1.75	I	0.146
Nomifensine	26	2	96	1.21	-0.16	I	0.454
Norepinephrine	15	1	56	0.65	-0.31	I	0.421
Norethindrone	29	0	130	1.9	-0.57	I	0.354
Norethynodrel	29	0	130	1.9	-0.57	I	0.354
Norgestimate	35	1	152	2.74	0.00	I	0.489
Nortriptyline	29	1	102	0.99	0.19	A	0.541
Noscapine	41	1	170	2.93	0.39	A	0.586
Nylidrin	29	1	106	1.01	-0.08	I	0.473
Nystatin	75	1	318	3.79	-1.08	I	0.238

Octisalate	22	0	80	0.62	-0.07	I	0.477
Ofloxacin	35	3	146	2.78	-0.10	I	0.466
Omeprazole	34	3	126	1.74	-0.05	I	0.479
Ornidazole	17	3	66	0.93	-0.82	I	0.303
Orphenadrinecitrate	27	1	96	0.73	-0.17	I	0.453
Oseltamivir	25	2	102	1.64	-0.36	I	0.405
Oxacillin	39	3	158	2.54	-0.25	I	0.427
Oxantel	22	2	78	0.6	-0.53	I	0.367
Oxcarbazepine	29	2	102	1.75	0.78	A	0.680
Oxethazaine	43	3	168	2.06	-0.55	I	0.357
Oxfendazole	33	3	114	0.84	-0.45	I	0.384
Oxidopamine	15	1	56	0.8	-0.13	I	0.464
Oxolinic acid	27	1	104	1.8	0.47	A	0.608
Oxybenzone	25	0	84	0.96	0.79	A	0.682
Oxymetazoline	24	2	100	1.71	-0.39	I	0.398
Oxyphenbutazone	34	2	124	2	0.69	A	0.658
Oxyphencyclimine	32	2	128	1.16	-1.09	I	0.245
Oxytetracycline	44	2	192	5.92	2.68	A	0.932
Pantoprazole	36	3	134	1.75	-0.13	I	0.459
Papaverine	35	1	128	1.87	0.79	A	0.680
Parachlorophenol	11	0	36	0.3	0.06	A	0.514
Paramethadione	13	1	56	0.29	-1.24	I	0.222
Pararosaniline	34	3	114	1.15	0.16	A	0.533
Pargyline	17	1	52	0.31	0.11	A	0.523
Paromomycin	45	5	224	3.76	-2.86	I	0.051
Paroxetine	33	1	128	0.89	-0.86	I	0.291
Penfluridol	48	1	192	1.81	-0.78	I	0.303
Penicillamine	9	1	40	0	-1.39	I	0.198
Penicilling	31	2	126	2.08	-0.13	I	0.460
Penicillinv	32	2	130	2.16	-0.08	I	0.471
Pentetic acid	31	3	118	1.36	-0.66	I	0.335
Pentoxifylline	26	4	102	1.75	-0.56	I	0.357
Pentylentetrazol	13	4	50	0.09	-1.89	I	0.130
Perhexiline	22	1	100	0.69	-1.78	I	0.141
Perindoprilbumine	30	2	128	2.11	-0.50	I	0.370
Perphenazine	36	3	142	1.61	-0.89	I	0.283
Phenacetin	17	1	58	0.54	-0.08	I	0.477
Phenazopyridine	24	5	78	0.6	-0.89	I	0.287
Phenformin	20	5	66	0.23	-1.44	I	0.189
Phenindione	27	0	92	0.94	0.66	A	0.655
Pheniramine	25	2	86	0.38	-0.62	I	0.345
Phenolphthalein	36	0	124	1.47	1.16	A	0.756
Phentermine	14	1	52	0.47	-0.47	I	0.381
Phentolamine	30	3	108	0.96	-0.63	I	0.343
Phenylephrine	15	1	54	0.46	-0.38	I	0.403

Phenylethylalcohol	12	0	38	0.15	-0.01	I	0.496
Phenylmercuriacetate	15	0	48	0.31	0.19	A	0.544
Phenytoin	29	2	102	1	-0.09	I	0.471
Phthalylsulfathiazole	41	3	140	1.6	0.51	A	0.617
Physostigminesalicylate	26	3	112	1.25	-1.61	I	0.163
Phytonadione	41	0	158	1.73	0.19	A	0.536
Pimozide	48	3	182	1.57	-0.89	I	0.281
Pinacidil	24	5	84	0.79	-1.13	I	0.241
Pindolol	23	2	88	0.69	-0.92	I	0.281
Pioglitazone	35	2	126	0.84	-0.55	I	0.359
Pipamperone	34	3	138	1.08	-1.71	I	0.148
Piperacillin	48	5	196	3.25	-0.58	I	0.346
Piperazine	6	2	24	0	-1.24	I	0.223
Piperidolate	33	1	120	1	-0.13	I	0.461
Pipobroman	18	2	72	0.46	-1.26	I	0.218
Piracetam	12	2	46	0.36	-0.96	I	0.276
Pirenperone	41	3	154	1.82	-0.28	I	0.421
Podofilox	41	0	170	2.99	0.74	A	0.668
Polymyxinb	99	16	394	6.15	-2.33	I	0.081
Pralidoxime	14	2	44	0.34	-0.31	I	0.420
Pramoxine	25	1	96	0.45	-1.00	I	0.265
Praziquantel	31	2	126	1.42	-0.89	I	0.284
Prazosin	39	5	150	2.03	-0.83	I	0.296
Prednisolone	33	0	154	3.16	0.11	A	0.517
Prednisone	34	0	154	3.16	0.36	A	0.580
Pregabalín	11	1	44	0.48	-0.62	I	0.347
Pregnenolonesuccinate	37	0	168	2.77	-0.38	I	0.396
Prilocaine	20	2	72	0.82	-0.33	I	0.413
Primaquine	25	3	92	1.03	-0.62	I	0.345
Probenecid	25	1	90	1.06	0.16	A	0.534
Probutol	42	0	192	3.28	-0.31	I	0.410
Procainamide	21	3	76	0.46	-1.09	I	0.249
Procaine	21	2	76	0.46	-0.80	I	0.307
Procyclidine	26	1	108	0.62	-1.45	I	0.186
Proglumide	30	2	108	1.15	-0.11	I	0.466
Promethazine	28	2	106	1.28	-0.32	I	0.414
Propafenone	33	1	116	0.81	-0.05	I	0.480
Propofol	16	0	62	0.65	-0.21	I	0.444
Propranolol	25	1	92	0.8	-0.30	I	0.420
Propylthiouracil	14	2	50	0.53	-0.54	I	0.365
Protryptiline	29	1	102	0.99	0.19	A	0.541
Puromycin	45	7	180	2.41	-1.70	I	0.149
Pyrantel	19	2	68	0.39	-0.79	I	0.309
Pyridostigmine	17	2	60	0.58	-0.47	I	0.381
Pyridoxine	15	1	56	0.84	-0.08	I	0.475

Pyrimethamine	28	3	100	0.81	-0.70	I	0.326
Pyritione	24	4	86	1.19	-0.53	I	0.366
Quetiapine	11	1	36	0.22	-0.32	I	0.418
Quinacrine	37	3	140	1.49	-0.64	I	0.338
Quinidine	37	3	142	1.86	-0.35	I	0.404
Quinine	33	2	132	1.67	-0.55	I	0.359
Quipazine	33	2	132	1.67	-0.55	I	0.359
Quipazine	23	3	84	0.59	-1.03	I	0.258
Rabeprazole	35	3	126	1.4	-0.19	I	0.444
Racephedrine	15	1	54	0.35	-0.51	I	0.373
Raloxifene	49	1	182	2.06	0.51	A	0.613
Ramipril	38	2	152	2.04	-0.35	I	0.404
Ranitidine	25	4	94	0.69	-1.46	I	0.186
Ranolazine	40	3	154	1.78	-0.59	I	0.348
Resorcinol	11	0	36	0.22	-0.03	I	0.490
Retinylpalmitate	45	0	168	0.96	-0.43	I	0.383
Ribavirin	21	4	88	1.15	-1.48	I	0.182
Riboflavin	36	4	144	2.4	-0.42	I	0.388
Rifampin	75	4	314	6	0.91	A	0.695
Risedronate	22	1	88	1.11	-0.40	I	0.396
Ritanserin	49	3	184	2.1	-0.17	I	0.445
Ritodrine	28	1	102	0.88	-0.19	I	0.447
Rizatriptan	28	5	104	0.69	-1.73	I	0.147
Rolitetracycline	50	3	218	5.46	1.42	A	0.796
Ronidazole	18	4	66	0.7	-1.12	I	0.243
Rosiglitazone	35	3	126	0.73	-0.97	I	0.269
Roxarsone	19	1	70	0.85	-0.11	I	0.469
Roxithromycin	62	2	298	5.44	-1.26	I	0.207
Saccharin	19	1	66	0.28	-0.47	I	0.380
Salicin	24	0	100	1.42	-0.14	I	0.458
Salicyl	12	0	40	0.26	-0.03	I	0.490
Salicylanilide	24	1	78	0.61	0.28	A	0.566
Salsalate	28	0	94	0.88	0.71	A	0.664
Sanguinarines	39	1	152	2.24	0.43	A	0.597
Sarafloxacin	40	3	152	2.21	0.07	A	0.507
Scopolamine	29	1	124	1.05	-1.39	I	0.194
Selegiline	19	1	62	0.55	0.14	A	0.532
Semustine	18	3	72	0.82	-1.13	I	0.240
Sennosidea	85	0	350	6.48	2.47	A	0.915
Sertraline	28	1	106	1.2	-0.12	I	0.463
Sibutramine	23	1	98	1.55	-0.39	I	0.398
Sildenafilcitrate	45	6	178	2.21	-1.50	I	0.176
Simvastatin	36	0	158	2.14	-0.60	I	0.344
Sirolimus	77	1	328	5.04	0.13	A	0.509
Sisomicin	34	5	164	2.64	-2.44	I	0.077

Sodium Phenylacetate	14	0	44	0.31	0.24	A	0.556
Sodium Salicylate	14	0	46	0.3	0.08	A	0.516
Sodium dehydrocholate	36	0	166	3.71	0.61	A	0.637
Sodium oxybate	7	0	24	0.16	-0.22	I	0.444
Solifenacinsuccinate	38	2	150	1.6	-0.71	I	0.321
Sorbitol	11	0	50	0.48	-0.78	I	0.311
Spectinomycin	26	2	128	2.86	-0.65	I	0.335
Spiperone	40	3	154	1.37	-1.06	I	0.249
Spirolactone	37	0	174	2.99	-0.57	I	0.351
Strychnine	36	2	164	2.54	-1.18	I	0.228
Succinylsulfathiazole	33	3	114	1.22	-0.01	I	0.489
Sulconazolenitrate	34	2	122	1.03	-0.28	I	0.422
Sulfabenzamide	29	2	96	0.93	0.28	A	0.564
Sulfachlorpyridazine	27	4	92	1.08	-0.33	I	0.412
Sulfadiazine	26	4	86	0.89	-0.36	I	0.406
Sulfadoxine	30	4	106	1.44	-0.21	I	0.440
Sulfamerazine	27	4	92	1	-0.43	I	0.390
Sulfameter	28	4	96	1.12	-0.33	I	0.412
Sulfamethazine	28	4	98	1.12	-0.49	I	0.374
Sulfamethoxazole	25	3	88	0.78	-0.61	I	0.348
Sulfamethoxypyridazine	28	4	96	1.12	-0.33	I	0.412
Sulfamonomethoxine	28	4	96	1.04	-0.43	I	0.389
Sulfanilate	34	2	118	0.92	-0.11	I	0.466
Sulfapyridine	26	3	86	0.89	-0.07	I	0.478
Sulfaquinoxaline	33	4	112	1.26	-0.11	I	0.466
Sulfasalazine	43	4	144	1.63	0.46	A	0.604
Sulfathiazole	24	3	82	0.78	-0.41	I	0.394
Sulfisoxazole	26	3	94	0.94	-0.62	I	0.345
Suloctidil	26	1	102	0.9	-0.67	I	0.332
Sulpiride	30	3	116	1.3	-0.83	I	0.298
Sumatriptan	27	3	102	0.97	-0.92	I	0.280
Suprofen	26	0	90	0.78	0.38	A	0.588
Suramin	132	6	476	7.96	4.93	N.C.	0.992
Tacrolimus	67	1	292	4.99	0.23	A	0.537
Tamoxifencitrate	40	1	138	1.28	0.63	A	0.643
Tannic	172	0	658	11.9	7.73	N.C.	0.999
Taurine	8	1	28	0	-0.74	I	0.321
Teicoplanin	8	1	28	0	-0.74	I	0.321
Telithromycin	71	5	308	5.55	-0.47	I	0.365
Temefos	36	0	134	1.4	0.34	A	0.576
Tenoxicam	33	3	120	2.3	0.79	A	0.681
Terazosin	37	5	150	2.03	-1.34	I	0.201
Terbinafine	31	1	108	0.88	0.12	A	0.522
Terbutalinehemisulfate	19	1	78	1.05	-0.48	I	0.378
Terfenadine	47	1	184	1.38	-0.93	I	0.273

Testosterone	31	0	144	2.48	-0.44		0.383
Tetracaine	23	2	84	0.5	-0.84		0.297
Tetrahydrozoline	21	2	80	0.52	-1.03		0.259
Tetramizole	20	2	76	0.4	-1.12		0.242
Theophylline	18	4	70	1.19	-0.85		0.297
Thiabendazole	22	3	76	0.6	-0.68		0.333
Thiamine	24	4	90	0.98	-1.07		0.251
Thiamylal	21	2	82	1.32	-0.26		0.431
Thimerosal	17	0	58	0.5	0.17	A	0.538
Thioguanine	16	5	58	0.6	-1.43		0.192
Thiopental	19	2	78	1.08	-0.74		0.318
Thioridazine	34	2	134	1.53	-0.60		0.346
Thiothixene	42	3	162	1.85	-0.59		0.347
Thiram	13	2	50	0.32	-1.04		0.258
Thonzylamine	28	4	100	0.81	-0.99		0.265
Tiapride	28	2	104	1.13	-0.34		0.409
Ticarcillin	33	2	138	2.16	-0.43		0.386
Ticlopidine	24	1	90	0.75	-0.46		0.382
Tilmicosin	68	2	310	5.16	-0.96		0.261
Tilorone	39	2	150	0.98	-1.18		0.229
Tinidazole	21	3	78	0.94	-0.69		0.330
Tioconazole	32	2	118	0.81	-0.74		0.316
Tobramycin	34	5	168	2.92	-2.43		0.078
Tolazamide	28	3	104	0.87	-0.94		0.276
Tolazoline	17	2	58	0.19	-0.78		0.311
Tolmetin	27	1	96	1.15	0.31	A	0.572
Tolnaftate	33	1	114	1.22	0.57	A	0.632
Toltrazuril	40	3	154	2.35	0.08	A	0.510
Topiramate	26	1	130	2.16	-1.31		0.206
Toremiphen	41	1	142	1.28	0.58	A	0.633
Tramadol	23	1	96	1.17	-0.67		0.333
Trandolapril	39	2	156	2.18	-0.23		0.433
Tranlycypromine	14	1	52	0.28	-0.69		0.331
Trazodone	36	5	138	0.91	-2.00		0.116
Triacetin	17	0	62	0.72	0.12	A	0.526
Triamcinolone	35	0	168	3.82	0.34	A	0.572
Triamcinolone	35	0	168	3.82	0.34	A	0.572
Triamterene	29	7	102	1.36	-1.13		0.239
Trichlormethiazide	28	3	110	2.08	0.02	A	0.497
Triclosan	24	0	86	1.15	0.59	A	0.639
Trientine	9	4	34	0.08	-1.72		0.151
Trifluoperazine	37	3	152	1.77	-1.20		0.224
Triflupromazine	32	2	128	1.59	-0.59		0.348
Trifluridine	24	2	106	1.42	-1.17		0.231
Trihexyphenidyl	27	1	112	0.65	-1.46		0.184

Trilostane	31	1	152	2.78	-0.97	I	0.266
Trimethadione	12	1	52	0	-1.53	I	0.177
Trimethoprim	28	4	104	1.54	-0.45	I	0.382
Trimetozine	25	1	98	1.32	-0.15	I	0.457
Trimipramine	30	2	114	1.15	-0.56	I	0.356
Trioxsalen	25	0	96	1.64	0.67	A	0.656
Tripelennamincitrate	26	3	90	0.58	-0.73	I	0.321
Tripolidine	30	2	106	0.54	-0.67	I	0.332
Trisodiummethylenediaminetetra	23	2	86	0.96	-0.46	I	0.382
Tropicamide	29	2	100	0.98	0.04	A	0.504
Tryptophan	21	2	76	0.46	-0.80	I	0.306
Tuaminoheptane	7	1	28	0.16	-0.81	I	0.307
Tubocurarine	63	2	256	4.84	1.44	A	0.798
Tylosintartrate	72	1	328	5.83	-0.23	I	0.420
Tyloxapol	18	0	76	0.74	-0.65	I	0.339
Tyrothricin	117	11	444	6.17	-0.03	I	0.465
Ursodiol	32	0	160	3.07	-0.69	I	0.324
Valacyclovir	29	6	114	1.17	-1.96	I	0.120
Valproate	10	0	38	0.4	-0.23	I	0.441
Vancomycin	133	9	550	9.92	1.02	A	0.706
Vardenafil	46	6	182	2.25	-1.50	I	0.176
Venlafaxine	24	1	100	1.36	-0.50	I	0.372
Verapamil	42	2	160	2.03	0.05	A	0.503
Vidarabine	25	5	104	1.19	-1.91	I	0.126
Vigabatrin	10	1	34	0.32	-0.31	I	0.421
Vinblastine	78	4	350	8.03	1.32	A	0.773
Warfarin	34	0	120	1.89	1.44	A	0.804
Xylazine	20	2	74	0.84	-0.46	I	0.383
Yohimbine	35	2	150	1.99	-1.02	I	0.258
Zidovudine	25	5	96	1.42	-1.04	I	0.257
Zileuton	22	2	80	0.91	-0.33	I	0.414
Zolmitriptan	28	3	110	0.73	-1.55	I	0.172
Zomepirac	28	1	102	1.35	0.36	A	0.582

FD: Función discriminante.

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

P.A.: probabilidad de que el compuesto sea activo.

SCBO: suma de órdenes de enlace convencionales-sin considerar hidrógenos.

nN: número de átomos de Nitrogeno.

ZM1: primer índice de Zagreb.

GGI4: índice de carga de orden 4.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.8. Compuestos que conforman el grupo test del modelo 4 y valores de FD₄ asociados a estos.

Compuestos	SCBO	nN	ZM1	GGI4	FD ₄	Clas.	P. A.
Grupo Activo							
Cardamonin [396]	29	0	98	1.196	1.02	A	0.730
Celastrol [347]	43	0	202	5.32	1.56	A	0.818
Cisplatin [397]	4	2	20	0	-1.45	I	0.189
Coumarin [398]	29	0	112	1.529	0.36	A	0.581
Deguelin [314]	41	0	168	3.213	1.16	A	0.752
Diclofenac [399]	27	1	94	1.236	0.57	A	0.633
Diosgenin [349]	36	0	186	3.514	-1.11	I	0.237
EGCG [316]	48	0	196	4.28	2.07	A	0.883
Emodin [400]	30	0	112	2.436	1.66	A	0.837
Etodolac [401]	28	1	114	1.823	0.00	A	0.493
Fenbufen [402]	28	0	92	0.493	0.40	A	0.594
Flurbiprofen [402]	26	0	90	0.844	0.45	A	0.605
Hydrocortisone [403]	32	0	154	3.157	-0.14	I	0.453
Indoprofen [404]	31	1	112	1.169	0.16	A	0.532
Mitotane [405]	25	0	90	1.324	0.75	A	0.675
Rofecoxib [406]	34	0	118	1.193	0.79	A	0.681
Grupo Inactivo							
Acetazolamide	18	4	64	0.775	-0.88	I	0.290
Adenine	15	5	52	0.333	-1.55	I	0.174
Adrenalinebitartrate	15	1	56	0.653	-0.31	I	0.421
Albendazole	24	3	88	0.613	-1.05	I	0.255
Alendronate	15	1	68	0.56	-1.31	I	0.209
Allantoin	14	4	52	0.4	-1.43	I	0.191
Altretamine	18	6	72	1.053	-1.74	I	0.147
Amifostine	12	2	48	0.24	-1.24	I	0.223
Aminogluthimide	23	2	88	0.987	-0.58	I	0.354
Amoxapine	32	3	120	1.527	-0.36	I	0.404
Amprolium	25	4	88	1.076	-0.55	I	0.361
Anethole	15	0	48	0.382	0.27	A	0.565
Aspartame	27	2	96	1.111	-0.02	I	0.489
Atomoxetine	26	1	90	0.693	-0.02	I	0.490
Baclofen	18	1	64	0.702	-0.09	I	0.474
Benserazide	22	3	84	0.804	-1.04	I	0.258
Benzoxiquine	30	1	98	0.747	0.46	A	0.608
Bepridil	35	2	132	0.832	-1.01	I	0.260
Beta-Carotene	52	0	194	1.689	0.23	A	0.546
Biperiden	30	1	126	0.979	-1.37	I	0.198
Bisoprololfumarate	26	1	102	0.862	-0.72	I	0.322
Bromocriptinemesylate	57	5	256	5.491	-0.20	I	0.433
Bumetanide	35	2	124	2.013	0.96	A	0.716

Bupivacaine	26	2	102	1.116	-0.72	I	0.322
Butamben	18	1	62	0.462	-0.22	I	0.443
Butoconazole	35	2	126	1.231	-0.10	I	0.468
Capsaicin	27	1	98	0.893	-0.13	I	0.461
Carbamazepine	28	2	96	1.379	0.55	A	0.627
Carboplatin	16	2	74	1.271	-0.98	I	0.269
Carmustine	13	3	46	0.4	-0.94	I	0.279
Cefazolin	40	8	156	1.884	-2.07	I	0.108
Cefmetazole	40	7	156	2.321	-1.27	I	0.212
Cefonicid	49	6	188	2.476	-0.92	I	0.276
Cephapirin	38	3	144	2.036	-0.05	I	0.480
Chlorambucil	23	1	84	0.502	-0.55	I	0.361
Chloramphenicol	25	2	94	1.022	-0.48	I	0.377
Chlorophyllide	64	4	248	3.53	0.20	A	0.533
Cholecalciferol	33	0	146	1.628	-1.06	I	0.249
Ciclopirox	19	1	76	0.956	-0.44	I	0.387
Cinchonine	31	2	122	1.36	-0.66	I	0.333
Cinoxacin	27	2	104	1.795	0.17	A	0.537
Citicoline	37	4	162	1.988	-2.00	I	0.115
Clemastine	32	1	124	0.796	-0.92	I	0.278
Clobetasolpropionate	40	0	186	4.699	1.28	A	0.773
Clofibrate	20	0	76	0.982	0.14	A	0.529
Clotrimazole	39	2	134	1.443	0.56	A	0.629
CoenzymeB12	142	18	620	12.488	-1.60	I	0.147
Colchicine	39	1	150	2.791	1.22	A	0.765
Cresol	12	0	42	0.333	-0.10	I	0.473
Cycloheximide	24	1	102	1.458	-0.54	I	0.363
Cyclophosphamide	15	2	64	0.542	-1.33	I	0.207
Cytarabine	21	3	88	1.188	-1.15	I	0.237
Danthron	28	0	100	1.893	1.42	A	0.802
Decamethonium	17	2	78	0.4	-2.03	I	0.114
Deracoxib	39	3	144	1.866	0.01	A	0.494
Dexpropranolol	25	1	92	0.796	-0.30	I	0.420
Dibucaine	32	3	118	1.227	-0.56	I	0.357
Digitoxin	63	0	314	5.33	-1.75	I	0.137
Dioxybenzone	26	0	90	1.156	0.81	A	0.688
Diphenylpyraline	29	1	106	0.884	-0.23	I	0.435
Docosanol	22	0	86	0.08	-1.15	I	0.236
Doxazosin	46	5	180	2.507	-0.75	I	0.311
Doxorubicin	52	1	220	4.787	1.58	A	0.821
Dyclonine	26	1	98	0.573	-0.75	I	0.314
Dyphylline	23	4	94	1.632	-0.87	I	0.291
Emetine	45	2	190	3.231	-0.04	I	0.477
Enilconazole	26	2	92	0.768	-0.37	I	0.403
Erythrosine	43	0	172	3.318	1.49	A	0.808

Estradiol	26	0	118	1.653	-0.71	I	0.322
Ethinylestradiol	30	0	130	1.898	-0.31	I	0.414
Ethiopropazine	30	2	114	1.28	-0.41	I	0.392
Ethylparaben	15	0	50	0.382	0.12	A	0.527
Etoposide	55	0	242	4.034	0.11	A	0.512
Exemestane	30	0	132	2.467	0.20	A	0.540
Ezetimibe	43	1	160	2.142	0.73	A	0.666
Fexofenadine	50	1	194	1.542	-0.74	I	0.313
Fipronil	35	4	140	2.939	0.25	A	0.553
Firocoxib	32	0	128	1.312	-0.33	I	0.409
Fludrocortisone	33	0	162	3.659	0.09	A	0.512
Fomepizole	8	2	26	0	-0.88	I	0.291
Fusidic acid	44	0	208	4.775	0.73	A	0.662
Glipizide	43	5	156	1.236	-1.19	I	0.227
Guaifenesin	17	0	62	0.462	-0.18	I	0.452
Halcinonide	38	0	192	4.839	0.48	A	0.605
Homosalate	24	0	98	1.027	-0.44	I	0.384
Hycanthone	34	2	128	1.862	0.23	A	0.549
Hydroquinone	11	0	36	0.302	0.06	A	0.514
Hydroxychloroquine	29	3	110	1.067	-0.90	I	0.283
Iopanic acid	21	1	82	1.236	-0.06	I	0.481
Isoniazid	14	3	44	0.191	-0.78	I	0.312
Isoproterenol	18	1	70	0.813	-0.41	I	0.395
Isoxicam	34	3	126	2.178	0.45	A	0.604
Ketanserin	41	3	154	1.822	-0.28	I	0.421
Levocarnitine	11	1	48	0.24	-1.20	I	0.229
Lincomycin	29	2	136	2.331	-1.10	I	0.243
Lomefloxacin	33	3	134	2.613	0.10	A	0.517
Mafenide	17	2	58	0.462	-0.46	I	0.383
Meclizine	40	2	146	1.258	-0.30	I	0.417
Megestrolacetate	36	0	164	3.637	0.68	A	0.653
Memantine	15	1	84	1	-2.00	I	0.116
Mestranol	31	0	134	1.938	-0.31	I	0.414
Metaxalone	21	1	80	0.738	-0.48	I	0.377
Methocarbamol	21	1	76	0.702	-0.23	I	0.439
Methotrexate	46	8	168	2.28	-0.99	I	0.263
Methyleneblue	29	3	108	1.591	-0.15	I	0.457
Methylprednisolone	43	0	192	4.028	0.81	A	0.681
Miconazolenitrate	35	2	128	1.142	-0.35	I	0.405
Modafinil	28	1	92	0.702	0.35	A	0.582
Monobenzone	22	0	72	0.493	0.38	A	0.589
Mupirocin	39	0	168	1.779	-1.01	I	0.258
Nadide	58	7	242	3.151	-2.19	I	0.095
Naloxone	33	1	148	3.259	0.39	A	0.586
Naphazoline	24	2	84	0.511	-0.58	I	0.355

Nifedipine	34	2	126	2.298	0.88	A	0.701
Nithiamide	16	3	56	0.57	-0.73	I	0.322
Nitrofurazone	19	4	64	0.535	-0.90	I	0.286
Nonoxyno	22	0	80	0.382	-0.35	I	0.408
Norfloxacin	31	3	122	2.031	-0.18	I	0.448
Norgestrel	30	0	134	2.143	-0.33	I	0.410
Novobiocin	58	2	234	4.48	1.41	A	0.794
Olmesartan	47	6	176	2.834	-0.11	I	0.462
Orlistat	38	1	154	1.462	-0.88	I	0.286
Ouabain	48	0	244	5.397	-0.23	I	0.425
Oxaprozin	33	1	112	1.167	0.66	A	0.653
Oxibendazole	24	3	88	0.613	-1.05	I	0.255
Oxiconazolenitrate	37	3	132	1.142	-0.44	I	0.385
Oxybutynin	33	1	124	1.058	-0.36	I	0.402
Oxyquinoline	17	1	56	0.436	-0.05	I	0.484
Pancuronium	48	2	238	4.766	-1.10	I	0.238
Pefloxacin	32	3	128	2.222	-0.15	I	0.453
Pergolidemesylate	29	2	122	1.603	-0.89	I	0.284
Phenacemide	18	2	58	0.311	-0.38	I	0.402
Phenelzine	13	2	42	0.151	-0.64	I	0.344
Phenoxybenzamine	28	1	98	0.782	0.00	I	0.493
Phenyl	25	1	84	0.804	0.31	A	0.571
Phenylpropanolamine	14	1	50	0.351	-0.46	I	0.384
Pilocarpine	19	2	76	0.48	-1.28	I	0.214
Piperine	29	1	106	0.599	-0.56	I	0.357
Pirenzepine	37	5	140	2.092	-0.52	I	0.365
Pizotyline	30	1	116	1.249	-0.31	I	0.417
Potassium-p-Aminobenzoate	14	1	46	0.382	-0.12	I	0.466
Pravastatin	35	0	148	1.769	-0.54	I	0.359
Primidone	22	2	82	0.813	-0.58	I	0.353
Proadifen	34	1	124	1.058	-0.11	I	0.464
Prochlorperazine	34	3	134	1.573	-0.85	I	0.293
Promazine	28	2	104	1.12	-0.35	I	0.406
Propantheline	36	1	142	1.8	-0.09	I	0.467
Proscillaridin	47	0	224	3.974	-0.64	I	0.332
Pyrazinamide	13	3	40	0.191	-0.73	I	0.323
Quinapril	43	2	160	2.178	0.48	A	0.608
Reserpine	58	2	242	4.097	0.37	A	0.575
Retinol	26	0	98	0.804	-0.20	I	0.445
Rimantadine	15	1	78	0.573	-2.05	I	0.112
Rolipram	26	1	104	0.938	-0.78	I	0.308
Ropinirole	24	2	92	0.773	-0.87	I	0.290
Rutoside	55	0	236	4.044	0.58	A	0.625
Salicylamide	14	1	46	0.302	-0.22	I	0.443
Selamectin	67	1	304	4.991	-0.67	I	0.320

Sodiumnitroprusside	24	6	66	0	-0.99	I	0.269
Sparteinesulfate	20	2	98	0.809	-2.30	I	0.089
Streptozosin	20	3	86	1.436	-0.96	I	0.272
Sucralose	24	0	120	1.971	-1.00	I	0.262
Sulfacetamide	20	2	68	0.582	-0.31	I	0.419
Sulfadimethoxine	30	4	106	1.276	-0.40	I	0.395
Sulfamethizole	25	4	88	0.777	-0.90	I	0.285
Sulfanitran	34	3	116	1.364	0.26	A	0.558
Sulfinpyrazone	44	2	152	1.838	0.94	A	0.712
Tacrine	22	2	82	1.08	-0.28	I	0.427
Tadalafil	43	3	172	2.337	-0.53	I	0.361
Teniposide	62	0	266	4.044	0.10	A	0.508
Tetracycline	43	2	186	5.173	2.00	A	0.876
Tetroquinone	16	0	60	0.907	0.23	A	0.554
Thalidomide	28	2	104	1.401	-0.03	I	0.486
Thiamphenicol	27	1	102	1.062	-0.23	I	0.435
Thiotepa	14	3	68	0	-2.80	I	0.056
Timolol	24	4	104	0.886	-2.23	I	0.095
Tolbutamide	24	2	84	0.822	-0.22	I	0.441
Tranexamic acid	12	1	50	0.422	-0.89	I	0.289
Tranilast	34	1	116	1.436	0.93	A	0.711
Triamcinolonediacetate	43	0	196	4.504	1.06	A	0.732
Trichlorfon	12	0	56	0.48	-0.98	I	0.271
Trimethobenzamide	36	2	134	1.667	0.06	A	0.507
Troleandomycin	65	1	298	5.809	0.22	A	0.534
Undecylenic	11	1	42	0.08	-0.94	I	0.280
Urea	4	2	12	0	-0.85	I	0.299
Valsartan	44	5	160	1.844	-0.53	I	0.362
Vecuronium	47	2	230	4.375	-1.21	I	0.219
Vesamicol	24	1	98	0.476	-1.38	I	0.198
Xylometazoline	23	2	94	1.519	-0.41	I	0.392
Zoxazolamine	16	2	58	0.448	-0.73	I	0.322

FD: Función discriminante.

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

P.A.: probabilidad de que el compuesto sea activo.

SCBO: suma de órdenes de enlace convencionales-sin considerar hidrógenos.

nN: número de átomos de Nitrógeno.

ZM1: primer índice de Zagreb.

GGI4: índice de carga de orden 4.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.9. Compuestos seleccionados por cribado virtual de la bases de datos Specs como potenciales agentes anti-cáncer mediante la aplicación de las FD₁₋₄.

Comp.	nR09	Wap	EEig11r	T(O..Br)	SRW08	MPC04	piPC02	piPC05	Dz	S2K	PCR	X2sol	JGI4	SCBO	nN	ZM1	GGI4
Inh. nº1*	0	20410	1.68	0	5788	85	4.248	6.009	55	5.102	1.458	11.045	0.054	39	2	138	2.556
Inh. nº2				0	5252	76	4.143	5.700						38	2	134	2.302
Inh. nº3				0	6276	94	4.290	6.021						40	2	148	2.716
Inh. nº4				28	5012	70	4.078	5.485						34	1	128	1.726
Inh. nº5				0	3542	52	3.850	5.124						25	0	94	1.600
Inh. nº6				0	5504	88	4.220	5.635						39	2	146	1.901

* Seleccionado por cribado virtual de la base de datos Specs de compuestos naturales.

Comp.: compuesto.

FD: Función discriminante.

nR09: número de anillos de 9 enlaces.

Wap: índice de Wiener de todos los caminos.

EEig11r: autovalor número 11 de la matriz de adyacencia de aristas ponderada por integrales de resonancia.

T(O..Br): suma de las distancias topológicas entre los átomos de oxígeno (O) y Bromo (Br).

SRW08: número de caminos de auto-retorno de orden 8.

MPC04: número total de caminos de orden 4.

piPC02: número de caminos múltiples de orden 2.

piPC05: número de caminos múltiples de orden 5.

Dz: índice de Pogliani.

S2K: modificación alfa del índice de doble camino de Kier.

PCR: cociente entre el número de enlaces múltiples y el número total de enlaces.

X2sol: índice de conectividad de solvatación de orden 2.

JGI4: índice de carga ponderados por enlace de orden 4.

SCBO: suma de órdenes de enlace convencionales-sin considerar hidrógenos.

nN: número de átomos de Nitrógeno.

ANEXOS

ZM1: primer índice de Zagreb.

GGI4: índice de carga de orden 4.

Anexo V.10. Compuestos que conforman el grupo de entrenamiento del modelo 7.

Compuestos	ATS6v	GATS6v	GATS3e	JGI1	JGI10	GGI8	JGT	EEig11x	Clas.
Grupo Activo									
10-(4-(N-diethylamino)butyl)-2-chlorophenoxazine [290]	3.23	0.722	1.171	0.154	0.009	0.238	0.38	1.618	A
1L6-Hydroxymethyl-chiro-inositol-2-(R)-2-O-methyl-3-O-octadecyl-sn-glycerocarbonate [291]	3.449	0.888	1.011	0.125	0.005	0.317	0.33	2.195	A
A-66 [289]	3.25	1.544	0.905	0.167	0.007	0.152	0.37	2.618	A
CCT128930 [288]	3.079	1.089	1.132	0.204	0.004	0.165	0.45	1.61	A
Clozapine [288]	3.42	0.832	0.976	0.173	0.006	0.194	0.41	1.626	A
Epirubicin [288]	4.036	0.971	1.012	0.221	0.008	1.006	0.54	2.883	I
GDC-0068 [300]	3.684	1.234	1.068	0.186	0.007	0.464	0.46	2.612	A
Gefitinib [294]	3.51	0.923	0.871	0.162	0.006	0.32	0.38	2.349	A
Miltefosine [288]	3.069	1.688	1.015	0.212	0.005	0.123	0.37	1.259	A
MMEA [288]	3.096	1.177	0.706	0.18	0.006	0.11	0.47	1.537	A
Nocodazole [385]	2.882	1.056	1.115	0.196	0.006	0.13	0.44	1.501	A
Perifosine [288]	3.205	0.681	1.117	0.194	0.004	0.132	0.36	1.842	A
PHT-427 [302]	3.168	0.758	1.243	0.161	0.004	0.141	0.35	1.767	A
Sanguinarines [288]	3.265	1.153	0.742	0.133	0.006	0.163	0.37	2.202	A
SH-5 [296]	3.513	0.998	0.936	0.163	0.005	0.292	0.37	2.196	A
SH-6 [296]	3.434	0.839	0.96	0.158	0.005	0.243	0.36	2.196	A
Sorafenib [392]	3.338	0.943	1.047	0.265	0.007	0.411	0.52	2.663	A
Topotecan [394]	3.631	1.001	0.987	0.229	0.01	0.496	0.55	2.575	A
Triciribine [288]	2.972	1.097	0.808	0.173	0	0.221	0.47	1.546	I
Grupo Inactivo									
Altretamine	2.565	0	1.944	0.3	0	0	0.56	0	I
Amcinonide	3.981	0.882	0.989	0.305	0.008	0.727	0.69	2.495	I
Aminolevulinicacid	0.537	0.291	1.06	0.313	0	0	0.53	0	I
Azaserine	1.486	0.952	1.141	0.273	0	0	0.54	-0.863	I
Azathioprine	2.768	0.863	0.8	0.167	0	0.103	0.41	0.729	I
Azelaicacid	1.8	1.238	0.867	0.208	0	0.049	0.41	-0.708	I
Beclomethasone	4.008	1.019	0.858	0.308	0.008	0.717	0.71	2.442	I
Benzydamine	3.242	0.713	1.322	0.14	0.009	0.234	0.33	1.452	A
Betamethasoneacetate	3.636	0.919	0.89	0.324	0.009	0.448	0.75	2.297	I
Budesonide	3.669	0.989	0.797	0.271	0.009	0.414	0.64	2.238	I
Busulfan	1.818	1.454	1.156	0.423	0	0.222	0.69	-0.188	I
Carbenoxolone	4.216	0.94	0.66	0.356	0.009	0.854	0.76	2.862	I
Carboplatin	0.871	0.881	1.583	0.393	0	0	0.76	-0.303	I
Carprofen	2.62	0.675	0.784	0.214	0	0.13	0.51	0.587	I
Chlorambucil	2.756	1.146	0.394	0.184	0.008	0.09	0.41	0.555	I

Chlorophyllide	4.601	0.999	0.788	0.194	0.011	1.256	0.49	3.202	I
Cisplatin	0	0	0	0.75	0	0	0.75	0	I
Clobetasolpropionate	3.777	0.946	0.959	0.314	0.008	0.468	0.73	2.297	I
Colchicine	3.697	1.186	0.63	0.194	0.002	0.52	0.47	1.883	I
Cortisone	3.234	1.032	0.682	0.293	0.011	0.292	0.7	1.513	I
Coumarin	2.91	0.749	1.015	0.261	0.007	0.3	0.57	1.154	I
Cyclophosphamide	2.079	0	1.171	0.214	0	0	0.47	-0.229	I
Cytarabine	2.189	1.1	0.995	0.222	0	0.045	0.55	0	I
Deracoxib	3.332	1.018	0.8	0.259	0.007	0.572	0.56	2.098	I
Dexamethasone	3.372	1.005	0.907	0.323	0.009	0.304	0.76	1.781	I
Diclofenac	3.047	0.807	0.755	0.2	0	0.054	0.46	0.704	I
Diflunisal	2.46	1.466	1.01	0.237	0	0.156	0.55	0.555	I
Doxorubicin	4.036	0.971	1.012	0.221	0.008	1.006	0.54	2.883	I
Emetine	3.897	0.715	0.661	0.179	0.007	0.517	0.43	2.422	I
Etodolac	2.976	1.415	0.663	0.217	0	0.112	0.5	1.054	I
Fenoprofen	2.677	0.425	1.133	0.184	0.012	0.103	0.41	0.532	I
Fenretinide	3.441	0.689	0.815	0.267	0.006	0.209	0.54	2.265	I
Firocoxib	3.104	1.059	0.879	0.3	0.016	0.251	0.65	1	I
Fluocinonide	3.837	0.967	0.88	0.346	0.011	0.682	0.76	2.584	I
Fluorouracil	2.192	1.217	0.947	0.25	0	0.045	0.57	0.328	I
Flutamide	2.366	0.926	1.127	0.342	0	0.099	0.67	0.399	I
Gallicacid	0.421	0	1.109	0.292	0	0	0.59	-0.558	I
Halcinonide	3.616	0.787	0.915	0.343	0.01	0.443	0.77	2.054	I
Hydrocortisone	3.234	1.032	0.682	0.293	0.011	0.292	0.7	1.512	I
Hydroxyurea	0	0	0.371	0.375	0	0	0.49	0	I
Ibuprofen	1.949	1.154	0.85	0.267	0	0.099	0.57	0	I
Ifosfamide	2.079	0	1.171	0.214	0	0	0.47	-0.293	I
Indoprofen	2.768	0.804	0.99	0.174	0.008	0.22	0.47	1.189	I
Isoflupredoneacetate	3.527	0.856	0.885	0.318	0.01	0.435	0.74	2.258	I
Isoxicam	2.924	1.068	1.084	0.24	0.006	0.194	0.57	1.226	I
Ketoprofen	2.777	1.188	1.018	0.175	0.012	0.103	0.44	0.674	I
Ketorolactromethamine	2.723	0.707	0.924	0.143	0.012	0.086	0.41	0.703	I
Meclofenamate	3.047	0.807	0.978	0.2	0	0.061	0.48	0.464	I
Medrysone	3.327	1.026	0.589	0.286	0.019	0.227	0.68	1.575	I
Mefenamicacid	2.893	0.891	0.903	0.184	0	0.061	0.45	0.711	I
Megestrolacetate	3.469	0.9	0.635	0.306	0.011	0.423	0.7	1.916	I
Melengestrolacetate	3.529	0.878	0.677	0.313	0.01	0.435	0.71	2.231	I
Mesalamine	0	0	1.252	0.273	0	0	0.53	-0.644	I
Methotrexate	3.447	0.697	0.79	0.243	0.008	0.455	0.51	2.563	I
Mitomycin	3.231	0.955	1.009	0.222	0	0.09	0.56	1.502	I
Mycophenolatemofetil	3.327	0.911	0.951	0.167	0.007	0.321	0.43	2	A
Mycophenolic	2.937	0.971	1.006	0.208	0.009	0.243	0.52	1.169	I
Nabumetone	2.445	1.133	0.591	0.222	0.011	0.07	0.48	0.535	I
Naproxen	2.357	1.349	0.747	0.222	0	0.115	0.52	0.439	I
Naproxol	2.255	1.286	0.714	0.206	0	0.07	0.49	0.263	I

Oxyphenbutazone	3.445	1.047	1.142	0.135	0.013	0.172	0.42	1.804	A
Phenylbutazone	3.417	1.224	1.266	0.1	0.012	0.098	0.35	1.799	A
Piroxicam	2.967	1.107	1.202	0.2	0.004	0.156	0.51	1.247	I
Podofilox	3.704	1.282	0.81	0.162	0.008	0.526	0.44	2.167	A
Pregnenolonesuccinate	3.499	0.773	0.549	0.273	0.01	0.412	0.61	1.995	I
Puromycin	3.52	1.045	0.827	0.189	0.008	0.514	0.47	2.625	A
Semustine	2.363	1.167	0.934	0.219	0	0.103	0.48	0	I
Streptozosin	2.251	1.047	1.08	0.25	0	0.07	0.58	0.183	I
Sulindac	3.292	1.149	0.579	0.222	0.01	0.343	0.51	1.755	I
Tamoxifencitrate	3.794	0.644	0.642	0.133	0.006	0.216	0.33	2.618	A
Teniposide	4.331	1.173	0.88	0.16	0.007	1.008	0.41	3.062	I
Tenoxicam	2.864	1.139	1.252	0.208	0.002	0.165	0.52	1.207	I
Testosterone	3.298	0.94	0.818	0.268	0.006	0.276	0.62	1.522	I
Thioguanine	0	0	1.104	0.208	0	0	0.45	-0.709	I
Tolmetin	2.691	0.915	0.736	0.225	0.019	0.138	0.54	0.577	I
Toremiphene	3.92	0.587	0.568	0.129	0.006	0.257	0.32	2.618	A
Triamcinolonediacetate	3.836	0.901	0.868	0.324	0.009	0.666	0.73	2.428	I
Zileuton	2.29	1.673	0.372	0.206	0	0.063	0.47	0.393	I
Zomepirac	2.877	1.11	0.777	0.238	0.019	0.138	0.57	0.926	I

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

ATS6v: índice de autocorrelación de Broto-Moreau para distancia topológica igual a 6 ponderado por el volumen de van de Waals

GATS6v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 6

GATS3e: índices de autocorrelación de Geary de retardo 3

JGI1: índice de carga ponderados por enlace de orden 1

GGI8: cargas transferidas intramolecularmente a distancia topológica igual a 8

JGT: índice de carga topológica global

EEig11x: autovalor número 11 de la matriz de adyacencia de aristas ponderada por orden de enlace

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.11. Compuestos que conforman el grupo test del modelo 7.

Compuestos	ATS6v	GATS6v	GATS3e	JGI1	JGI10	GGI8	JGT	EEig11x	Clas.
Grupo Activo									
AT7867 [288]	3.226	1.011	0.517	0.167	0.006	0.105	0.39	2	A
Balanol [292]	4.023	1.066	0.999	0.221	0.007	0.738	0.523	2.907	A
Erlotinib [293]	3.58	0.769	0.585	0.145	0.006	0.303	0.338	2.582	A
H-89 [295]	3.004	0.787	1.113	0.172	0.007	0.123	0.4	2.489	A
MK-2206 [288]	3.773	0.722	0.916	0.167	0.006	0.49	0.417	2.656	A
Oxaprozín [288]	3.268	0.724	0.906	0.146	0.012	0.197	0.347	1.724	A
Staurosporine [297]	4.322	1.098	0.882	0.131	0.006	0.411	0.39	2.898	A
Sunitinib [303]	3.464	1.041	0.919	0.21	0.005	0.463	0.496	2.121	A
Grupo Inactivo									
Altrenogest	3.047	1.095	0.897	0.231	0.007	0.197	0.584	1.478	I
Aspirin	1.401	1.083	1.083	0.231	0	0	0.471	-0.48	I
Betamethasone	3.372	1.005	0.907	0.323	0.009	0.304	0.758	1.781	I
Bleomycin	4.947	0.984	0.936	0.228	0.008	2.495	0.501	3.802	I
Carmustine	1.65	0.796	1.17	0.182	0	0	0.423	-0.885	I
Dactinomycin	5.183	0.91	0.998	0.224	0.01	2.935	0.524	3.881	I
Daunorubicin	4.013	0.983	1.049	0.226	0.008	0.96	0.547	2.879	I
Diflorasone	3.433	1.101	0.892	0.328	0.009	0.329	0.765	1.926	I
Fenbufen	2.607	1.188	0.713	0.175	0.008	0.094	0.409	0.602	I
Fenspiride	2.657	0.518	0.887	0.214	0.006	0.106	0.423	0.786	I
Floxuridine	2.192	1.217	0.947	0.25	0	0.045	0.57	0.328	I
Flufenamic	3.402	0.782	1.07	0.345	0.018	0.674	0.689	1.561	I
Flumethasone	3.433	1.101	0.892	0.328	0.009	0.329	0.765	1.926	I
Flunisolide	3.585	1.152	0.736	0.329	0.01	0.538	0.729	2.402	I
Flunixin	2.927	0.848	0.921	0.25	0	0.28	0.549	0.712	I
Flurandrenolide	3.585	1.152	0.736	0.329	0.01	0.538	0.729	2.253	I
Flurbiprofen	2.384	0.803	0.936	0.184	0.012	0.103	0.477	0.519	I
Isotretinon	3.092	0.525	0.398	0.295	0.006	0.132	0.6	0.812	I
Mechlorethamine	0.693	0	0.121	0.214	0	0	0.416	0	I
Meloxicam	2.984	1.123	1.259	0.24	0.006	0.194	0.572	1.226	I
Melphalan	2.67	1.209	0.463	0.211	0.008	0.148	0.479	0.538	I
Prednisolone	3.234	1.032	0.682	0.293	0.011	0.292	0.695	1.632	I
Sirolimus	4.632	0.947	0.993	0.235	0.008	1.443	0.527	3.327	I
Thiotepa	0	0	1.372	0.231	0	0	0.374	-0.385	I
Triamcinolone	3.322	0.885	0.894	0.323	0.009	0.304	0.758	1.781	I

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

ATS6v: índice de autocorrelación de Broto-Moreau para distancia topológica igual a 6 ponderado por el volumen de van de Waals.

GATS6v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 6.

GATS3e: índices de autocorrelación de Geary de retardo 3.

JGI1: índice de carga ponderados por enlace de orden 1.

GGI8: cargas transferidas intramolecularmente a distancia topológica igual a 8.

JGT: índice de carga topológica global.

Eig11x: autovalor número 11 de la matriz de adyacencia de aristas ponderada por orden de enlace.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.12. Compuestos que conforman el grupo de validación del modelo 7.

Compuestos	ATS6v	GATS6v	GATS3e	JGI1	JGI10	GGI8	JGT	EEig11x	Clas.
Grupo Activo									
1,3-Dihydro-1-(1-((4-(6-phenyl-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalin-7-yl)phenyl)methyl)-4-piperidinyl)-2H-benzimidazol-2-one [290]	4.069	0.482	1.111	0.143	0.005	0.424	0.35	3.131	A
124011-Akt Inhibitor IV [304]	4.028	1.247	1.4	0.122	0.005	0.496	0.344	2.872	A
AZD5363 [299]	3.531	1.166	1.024	0.197	0.006	0.357	0.463	2.571	A
GSK690693 [288]	3.73	1.094	0.831	0.191	0.007	0.454	0.438	2.496	A
PF-04691502 [288]	3.731	1.032	0.869	0.176	0.006	0.525	0.433	2.409	A
TIC10 [288]	3.748	0.84	1.392	0.136	0.006	0.298	0.355	2.432	A
Grupo Inactivo									
Alclometazonedipropionate	3.463	1.124	0.734	0.306	0.009	0.304	0.713	1.907	I
Amiprilose	3.192	0.921	0.949	0.389	0.011	0.328	0.815	0.842	I
Amsacrine	3.639	0.813	0.736	0.21	0.012	0.336	0.451	2.431	A
Azacididine	2.135	1.058	1.087	0.222	0	0.045	0.55	0	I
Betamethasone1721di propionate	3.975	0.912	0.971	0.308	0.008	0.717	0.707	2.442	I
Celecoxib	3.344	1.179	0.726	0.304	0.004	0.594	0.618	2.182	I
Desonide	3.532	1.079	0.7	0.324	0.01	0.443	0.72	2.238	I
Etoposide	4.217	1.129	0.798	0.177	0.008	0.967	0.441	3.045	A
Exemestane	3.093	1.004	0.737	0.28	0	0.137	0.658	1.18	I
Fludarabine	2.594	1.04	0.878	0.205	0	0.103	0.508	0.916	I
Flumethasonepivalate	3.791	1.082	1.043	0.355	0.011	0.616	0.783	2.575	I
Fluocinoloneacetone	3.613	1.019	0.883	0.347	0.01	0.538	0.772	2.467	I
Fluorometholone	3.391	0.855	0.948	0.333	0.014	0.254	0.775	1.89	I
Griseofulvin	3.254	0.799	0.992	0.25	0	0.158	0.595	1.576	I
Indomethacin	3.385	1.24	0.796	0.204	0.015	0.269	0.505	1.657	I
Methylprednisolone	3.719	0.917	0.694	0.297	0.009	0.565	0.675	2.566	I
Mitotane	2.833	0	0.911	0.184	0	0.037	0.47	0.548	I
Mitoxantrone	3.607	0.842	0.903	0.118	0.007	0.419	0.373	2.303	A
Paclitaxel	4.93	1.115	0.947	0.243	0.008	1.861	0.572	3.462	I
Pipobroman	2.393	1.026	1.247	0.188	0.008	0.074	0.476	0	I
Prednisone	3.234	1.032	0.682	0.293	0.011	0.292	0.695	1.643	I
Rofecoxib	2.984	1.001	0.868	0.208	0.009	0.348	0.489	1.18	I
Salicyl	0	0	1.286	0.167	0	0	0.433	0	I
Suprofen	2.453	0.829	1.05	0.184	0.01	0.117	0.475	0.471	I
Triamcinolone	3.322	0.885	0.894	0.323	0.009	0.304	0.758	1.781	I
Vinblastine	4.999	1.057	0.799	0.254	0.008	1.969	0.57	3.402	I
Vincristine	5.018	1.011	0.788	0.25	0.008	2.014	0.563	3.402	I

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

ATS6v: índice de autocorrelación de Broto-Moreau para distancia topológica igual a 6 ponderado por el volúmen de van de Waals

GATS6v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 6.

GATS3e: índices de autocorrelación de Geary de retardo 3.

JGI1: índice de carga ponderados por enlace de orden 1.

GGI8: cargas transferidas intramolecularmente a distancia topológica igual a 8.

JGT: índice de carga topológica global.

Eig11x: autovalor número 11 de la matriz de adyacencia de aristas ponderada por orden de enlace.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.13. Compuestos que conforman el grupo de entrenamiento del modelo 8 (parte I).

Compuestos	nCIR	nN	nR06	Wap	S3K	D/Dr12	T(N..CI)	T(S..S)	T(S..F)	SRW09	MPC08	MPC09	MPC10	PCR	Clas.
Grupo Activo															
10-hydroxycampothecin [305]	15	2	4	54541	1.489	0	0	0	0	1170	288	340	387	1.441	A
4-Methylesculetin [319]	3	0	2	1674	1.019	0	0	0	0	0	33	27	11	1.312	A
Agelastatine [306]	10	4	1	13853	1.016	123.76	0	0	0	3672	198	197	191	1.157	A
Aspirin [345]	1	0	1	633	1.711	0	0	0	0	0	7	4	4	1.337	A
Bergapten [368]	6	0	2	4474	1.002	0	0	0	0	738	80	69	52	1.367	A
Celastrol [347]	15	0	5	93004	1.186	0	0	0	0	0	381	486	548	1.23	A
Celecoxib [348]	3	3	2	10138	3.111	0	0	0	27	972	122	142	140	1.391	A
CGP049090 [304]	47	0	5	359293	2.242	196.263	0	0	0	198	754	983	1184	1.419	A
Cisplatin [397]	0	2	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	A
Coumarin [398]	3	0	2	4933	2.55	0	0	0	0	0	83	82	71	1.257	A
Deguelin [314]	15	0	5	74925	1.664	0	0	0	0	0	302	371	425	1.414	A
Diclofenac [399]	2	1	2	3176	3.011	0	6	0	0	0	44	37	32	1.462	A
Diflunisal [387]	2	0	2	2645	2.129	0	0	0	0	0	45	44	31	1.424	A
EGCG [316]	5	0	4	33950	2.982	0	0	0	0	0	215	254	262	1.386	A
Ellagic acid [372]	14	0	4	22345	1.373	132.897	0	0	0	0	238	281	272	1.36	A
Fenoprofen [373]	2	0	2	2607	2.316	0	0	0	0	0	40	34	32	1.41	A
Fisetin [351]	4	0	3	7447	1.919	0	0	0	0	0	99	105	93	1.395	A
Flurbiprofen [402]	2	0	2	2505	1.883	0	0	0	0	0	46	34	30	1.358	A
Gallic acid [320]	1	0	1	494	1.358	0	0	0	0	0	0	0	0	1.238	A
Honokiol [375]	2	0	2	3599	1.975	0	0	0	0	0	57	51	46	1.459	A
Hydnocarpin [352]	7	0	5	76104	3.215	0	0	0	0	0	237	286	318	1.414	A
ICG-001 [353]	8	4	6	99875	4.592	0	0	0	0	0	270	332	371	1.316	A
iCRT-14 [355]	4	3	2	17060	2.283	0	0	0	0	2196	128	134	144	1.447	A

ANEXOS

Indomethacin [325]	4	1	2	10064	2.289	0	6	0	0	1368	134	122	117	1.37	A
Isoliquiritigenin [327]	2	0	2	2857	2.769	0	0	0	0	0	32	33	33	1.489	A
IWP-2 [304]	7	4	3	42771	3.432	0	0	20	0	1656	159	151	154	1.429	A
Juglone [378]	3	0	2	1397	0.933	0	0	0	0	0	25	22	10	1.387	A
JW55 [304]	4	2	3	16666	3.952	0	0	0	0	540	104	108	112	1.306	A
Kirenol [329]	6	0	3	12388	1.281	0	0	0	0	0	168	175	168	1.054	A
Meloxicam [387]	4	3	2	7907	1.858	0	0	6	0	684	89	96	84	1.365	A
Melphalan [379]	1	2	1	1679	4.257	0	26	0	0	0	36	28	16	1.203	A
Mesalamine [380]	1	1	1	399	1.258	0	0	0	0	0	2	0	0	1.302	A
Monocrotaline [381]	7	1	0	12781	1.301	0	0	0	0	1836	114	132	145	1.082	A
Murrayafoline A [382]	6	1	2	4590	0.758	0	0	0	0	1170	84	66	54	1.419	A
Naproxen [384]	3	0	2	2699	1.362	0	0	0	0	0	55	51	30	1.36	A
NSC668036 [386]	0	2	0	3376	5.001	0	0	0	0	0	37	34	37	1.05	A
PKF222-815 [359]	24	0	7	922125	4.539	455.332	0	0	0	0	792	1019	1230	1.584	A
PNU-74654 [360]	3	2	2	8181	3.339	0	0	0	0	684	59	61	61	1.577	A
Protocatechualdehyde [333]	1	0	1	320	1.123	0	0	0	0	0	0	0	0	1.301	A
Quercetin [390]	4	0	3	8350	2.007	0	0	0	0	0	109	118	109	1.386	A
Rotenone [391]	15	0	4	73885	1.606	0	0	0	0	954	306	376	428	1.319	A
Shikonin [361]	3	0	2	4451	1.776	0	0	0	0	0	70	68	57	1.38	A
Sitosterol [337]	10	0	3	40984	1.385	0	0	0	0	1170	243	278	296	1.067	A
Sorafenib [392]	3	4	3	20990	5.321	0	45	0	0	0	88	94	99	1.417	A
Sulforaphane [338]	0	1	0	158	7.275	0	0	7	0	0	2	0	0	1.226	A
Theophylline [340]	3	4	1	1268	0.494	0	0	0	0	756	24	12	3	1.195	A
Toxoflavin [395]	3	5	2	1663	0.707	0	0	0	0	0	29	26	12	1.31	A
Uvaol [342]	15	0	5	85224	0.933	0	0	0	0	0	376	464	531	1.059	A
XAV-939 [363]	4	2	3	7625	2.475	0	0	0	33	0	85	100	96	1.305	A
ZTM000990 [364]	16	1	6	415365	2.842	0	0	0	0	0	583	722	887	1.308	A

	Grupo Inactivo														
Altretamine	1	6	1	879	0.582	0	0	0	0	0	12	0	0	1.186	I
Amcinonide	16	0	3	127554	1.783	108.597	0	0	0	3834	513	634	745	1.131	I
Amiprilose	3	1	0	6523	0.974	0	0	0	0	3798	piPC05	73	57	1	I
Azacitidine	2	4	1	2194	1.611	0	0	0	0	1098	40	35	22	1.184	I
Beclomethasone	10	0	3	55399	1.954	0	0	0	0	1656	361	417	453	1.134	I
Benzydamine	4	3	2	8587	2.529	0	0	0	0	1134	94	93	92	1.408	I
Betamethasone	10	0	3	31795	1.139	0	0	0	0	1638	288	321	332	1.135	I
Bleomycin	6	17	3	389597	15.23	0	0	23	0	1998	416	463	505	1.177	I
Busulfan	0	0	0	393	10.087	0	0	7	0	0	6	9	0	1.111	I
Carboplatin	2	2	1	918	0.984	0	0	0	0	0	8	4	0	1.061	I
Carmustine	0	3	0	226	4.29	0	26	0	0	0	1	0	0	1.064	I
Carprofen	6	1	2	6983	1.485	0	5	0	0	1152	117	MPC09	95	1.365	I
Clobetasolpropionate	10	0	3	42661	1.54	0	0	0	0	1656	335	383	405	1.132	I
Cortisone	10	0	3	27609	1.249	0	0	0	0	1404	252	285	291	1.093	I
Dactinomycin	12	12	3	3411404	7.718	0	0	0	0	1476	507	594	692	1.281	I
Daunorubicin	11	1	5	105880	2.664	0	0	0	0	0	375	472	546	1.313	I
Deracoxib	3	3	2	12069	3.172	0	0	0	28	954	131	150	149	1.368	I
Desonide	15	0	3	66777	1.239	86.564	0	0	0	3078	378	463	521	1.126	I
Diallyltrisulfide	0	0	0	120	6.169	0	0	0	0	0	1	0	0	1.144	I
Diflorasone	10	0	3	34285	1.232	0	0	0	0	1638	311	350	362	1.132	I
Diosgenin	16	0	4	113163	1.207	85.7	0	0	0	2790	398	493	584	1.06	I
Etoposide	14	0	5	215686	3.141	0	0	0	0	1656	481	592	700	1.229	I
Exemestane	10	0	3	18170	0.832	0	0	0	0	1134	198	219	207	1.169	I
Fenspiride	3	2	2	4841	2.189	0	0	0	0	900	56	54	50	1.18	I
Firocoxib	3	0	1	6016	2.072	0	0	0	0	2526	98	78	68	1.249	I
Fludarabine	4	5	1	6578	1.607	0	0	0	0	2052	103	100	85	1.264	I

ANEXOS

Flufenamic	2	3	2	7913	4.583	0	17	0	0	0	98	94	91	1.318	I
Flumethasone	10	0	3	34285	1.232	0	0	0	0	1638	311	350	362	1.132	I
Flunisolide	15	0	3	71686	1.334	90.394	0	0	0	3078	403	498	563	1.124	I
Flunixin	2	2	2	4018	2.531	0	0	0	0	0	53	53	47	1.409	I
Fluocinoloneacetone	15	0	3	75197	1.318	94.268	0	0	0	3078	431	526	587	1.121	I
Fluocinonide	15	0	3	91954	1.606	107.584	0	0	0	3078	458	561	632	1.132	I
Fluorometholone	10	0	3	28878	0.96	0	0	0	0	1404	278	309	314	1.136	I
Griseofulvin	4	0	2	10354	1.252	0	0	0	0	1440	161	157	136	1.266	I
Isoflupredoneacetate	10	0	3	38339	1.532	0	0	0	0	1404	282	323	344	1.148	I
Isoxicam	4	3	2	7907	1.755	0	0	0	0	684	89	96	84	1.354	I
Ketoprofen	2	0	2	2784	2.107	0	0	0	0	0	42	36	32	1.404	I
Ketorolactromethamine	4	1	1	5267	1.559	0	0	0	0	1872	72	69	60	1.368	I
Mechlorethamine	0	1	0	75	3.649	0	6	0	0	0	0	0	0	1	I
Meclofenamate	2	1	2	3110	2.237	0	6	0	0	0	41	39	36	1.44	I
Medrysone	10	0	3	24959	0.98	0	0	0	0	1170	246	272	271	1.087	I
Mefenamicacid	2	1	2	2719	1.573	0	0	0	0	0	38	35	32	1.483	I
Megestrolacetate	10	0	3	32750	1.121	0	0	0	0	1422	278	323	338	1.152	I
Melengestrolacetate	10	0	3	35317	1.038	0	0	0	0	1656	299	347	366	1.158	I
Methylprednisolone	10	0	3	53806	2.315	0	0	0	0	1404	300	348	371	1.149	I
Mitomycin	10	4	2	17067	1.166	92.64	0	0	0	5748	245	238	214	1.16	I
Mitoxantrone	6	4	3	26116	3.976	0	0	0	0	0	196	222	228	1.36	I
Mycophenolatemofetil	4	1	2	16267	3.611	0	0	0	0	936	92	84	75	1.326	I
Naproxol	3	0	2	2356	1.201	0	0	0	0	0	49	44	23	1.364	I
Nocodazole	4	3	1	6729	2.206	0	0	0	0	1458	89	86	88	1.361	I
Oxaprozin	3	1	2	6047	2.785	0	0	0	0	936	92	88	76	1.432	I
Oxyphenbutazone	3	2	2	7225	2.255	0	0	0	0	1350	114	108	88	1.309	I
Phenylbutazone	3	2	2	6332	2.073	0	0	0	0	1350	MPC08	94	76	1.322	I

Pipobroman	1	2	1	1084	3.531	0	0	0	0	0	20	14	4	1.04	I
Podofilox	11	0	3	53078	1.877	0	0	0	0	1656	315	363	392	1.284	I
Prednisolone	10	0	3	27609	1.249	0	0	0	0	1404	252	285	291	1.142	I
Prednisone	10	0	3	27609	1.249	0	0	0	0	1404	252	285	291	1.152	I
Pregnenolonesuccinate	10	0	3	42337	2.053	0	0	0	0	1170	247	283	311	1.104	I
Puromycin	5	7	2	36780	3.136	0	0	0	0	2070	176	186	197	1.32	I
Salicyl	1	0	1	247	0.891	0	0	0	0	0	1	0	0	1.318	I
Sanguinarines	21	1	4	82798	1.396	0	0	0	0	1458	302	361	416	1.473	I
Semustine	1	3	1	998	2.89	0	12	0	0	0	18	14	8	1.041	I
Sirolimus	7	1	3	272262	7.654	0	0	0	0	0	215	227	247	1.258	I
Teniposide	15	0	5	373360	3.783	0	0	0	0	2196	529	654	774	1.262	I
Tenoxicam	4	3	2	6905	1.921	0	0	3	0	774	84	76	71	1.365	I
Testosterone	10	0	3	26297	1.263	0	0	0	0	1152	218	252	256	1.089	I
Thiotepa	3	3	0	439	0.888	0	0	0	0	4932	0	0	0	1.02	I
Toremiphene	3	1	3	8194	4.109	0	12	0	0	0	108	108	96	1.36	I
Vincristine	28	4	5	2289926	3.335	392.483	0	0	0	4140	1035	1332	1698	1.254	I
Zileuton	3	2	1	2109	1.724	0	0	0	0	936	43	28	20	1.314	I
Zomepirac	2	1	1	3113	2.006	0	7	0	0	1098	50	42	36	1.325	I

FD: Función discriminante.

nClR: número de circuitos.

nN: número de átomos de Nitrogeno.

nR06: número de anillos de 6 enlaces.

Wap: índice de Wiener de todos los caminos.

S3K: modificación alfa del índice de triple camino de Kier.

D/Dr12: índice que representa el cociente de la distancia/detour (o distancia desviada) para anillos de orden 12.

T(N..Cl): suma de las distancias topológicas entre los átomos de nitrógeno y cloro.

T(S..S): suma de las distancias topológicas entre los átomos de azufre.



T(S..F): suma de las distancias topológicas entre los átomos de azufre y flúor.
SRW09: número de caminos de auto-retorno de orden 9.
MPC08: número total de caminos de orden 8.
MPC09: número total de caminos de orden 9.
MPC10: número total de caminos de orden 10.
PCR: cociente entre el número de enlaces múltiples y el número total de enlaces.
Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.
A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.13. Compuestos que conforman el grupo de entrenamiento del modelo 8 (parte II).

Comp.	MATS3m	MATS1v	MATS6e	GATS4m	GATS8m	GATS1v	GATS2v	GATS3v	GATS6e	GATS8e	GATS6p	VEA1	JGI5	JGI10	Clas.
	Grupo Activo														
10-hydroxycampothecin [305]	0.002	-0.097	0.045	1.056	1.345	0.779	0.734	1.003	1.009	1.351	1.028	4.534	0.04	0.006	A
4-Methylesculetin [319]	-0.077	-0.067	-0.3	1.138	0	0.758	0.827	0.931	1.82	0	1.82	3.489	0.04	0	A
Agelastatine [306]	-0.05	-0.153	0.182	0.966	3.04	0.764	0.667	0.878	1.046	2.586	1.732	4.039	0.04	0	A
Aspirin [345]	-0.278	-0.111	0.324	1.011	0	0.833	0.765	1.083	1.083	0	1.083	3.254	0.04	0	A
Bergapten [368]	-0.231	-0.185	0.667	0.761	0	0.972	0.865	1.058	0.625	0	0.625	3.684	0.03	0	A
Celastrol [347]	0.071	0.015	-0.193	0.569	1.3	0.492	0.427	0.618	1.324	1.3	1.324	4.835	0.04	0.011	A
Celecoxib [348]	-0.049	-0.05	-0.24	0.499	1.687	0.729	0.559	0.738	1.327	1.494	1.071	4.351	0.04	0.004	A
CGP049090 [304]	-0.013	0.036	-0.149	0.892	1.313	0.697	0.778	0.786	1.115	1.313	1.115	5.172	0.03	0	A
Cisplatin [397]	0	-0.167	0	0	0	0.833	1.111	0	0	0	0	2.121	0	0	A
Coumarin [398]	-0.222	-0.356	0.328	1.073	0.635	1.248	0.938	1.069	0.721	1.074	0.879	3.984	0.03	0.007	A
Deguelin [314]	-0.029	-0.159	0.056	0.981	1.199	0.981	1.038	0.964	1.103	1.199	1.103	4.763	0.03	0.011	A
Diclofenac [399]	-0.11	-0.032	-0.288	0.884	1.471	0.617	0.586	0.778	1.22	1.399	0.785	3.95	0.02	0	A
Diflunisal [387]	-0.193	0.02	-0.463	0.901	2.288	0.617	0.722	1.012	1.456	2.33	1.464	3.895	0.04	0	A
EGCG [316]	-0.064	-0.041	0.046	0.986	1.107	0.771	0.977	0.998	0.845	1.107	0.845	4.62	0.03	0.01	A
Ellagic acid [372]	-0.051	-0.057	0.036	1.219	1.031	0.825	0.825	0.945	1.125	1.031	1.125	4.255	0.03	0	A
Fenoprofen [373]	-0.2	-0.053	0.65	1.19	1.36	0.716	0.816	1.133	0.425	1.36	0.425	3.84	0.02	0.012	A
Fisetin [351]	-0.035	-0.026	0.126	1.089	1.273	0.71	0.961	1.009	0.913	1.273	0.913	4.092	0.03	0.006	A
Flurbiprofen [402]	-0.118	0.01	0.716	1.403	0.881	0.536	0.557	0.914	0.841	1.148	0.81	3.821	0.03	0.012	A
Gallic acid [320]	-0.213	0	1.4	1.543	0	0.786	0.887	1.109	0	0	0	3.202	0.03	0	A
Honokiol [375]	-0.111	0.005	-0.153	0.977	1.439	0.503	0.754	1.056	1.257	1.439	1.257	3.943	0.03	0.006	A
Hydnocarpin [352]	-0.086	-0.105	0.058	0.93	1.05	0.853	1.024	1.029	0.916	1.05	0.916	5.228	0.03	0.009	A
ICG-001 [353]	-0.077	-0.112	-0.125	1.159	1.022	0.796	0.575	1.008	1.307	1.019	1.329	4.795	0.03	0.006	A
iCRT-14 [355]	0.035	-0.116	-0.064	1.327	1.007	0.833	0.861	1.073	1.284	1.174	1.064	4.586	0.02	0.006	A

Indomethacin [325]	-0.035	-0.091	-0.06	0.404	2.439	0.776	0.617	0.804	1.034	1.762	1.288	4.047	0.04	0.015	A
Isoliquiritigenin [327]	-0.221	0.013	0.089	0.997	0.877	0.57	0.844	1.096	0.891	0.877	0.891	3.782	0.03	0.006	A
IWP-2 [304]	-0.061	-0.074	-0.314	1.397	1.192	0.776	0.78	1.359	1.44	1.611	0.959	4.162	0.02	0.007	A
Juglone [378]	-0.257	0.021	0	1.463	0	0.557	0.78	1.114	0	0	0	3.365	0.03	0	A
JW55 [304]	0.047	-0.143	-0.138	1.044	0.729	0.929	0.795	0.781	1.142	0.729	1.071	4.186	0.03	0.006	A
Kirenol [329]	0.08	0.015	-0.232	0.954	1.725	0.531	0.493	0.621	1.242	1.725	1.242	4.235	0.04	0.005	A
Meloxicam [387]	-0.136	-0.185	-0.2	0.85	1.175	0.885	0.656	1.109	1.037	1.108	1.142	3.942	0.03	0.006	A
Melphalan [379]	0.089	-0.096	-0.349	0.917	1.049	0.758	0.732	0.685	1.492	0.778	1.071	3.782	0.03	0.008	A
Mesalamine [380]	-0.415	0	0	1.288	0	0.702	0.726	1.265	0	0	0	3.089	0.03	0	A
Monocrotaline [381]	-0.084	-0.158	0.096	1.13	1.246	0.9	0.893	1.095	0.854	1.248	0.869	4.487	0.03	0	A
Murrayafoline A [382]	0.118	-0.105	-0.175	1.459	0	0.946	0.838	0.872	1.515	0	1.287	3.624	0.03	0	A
Naproxen [384]	-0.066	-0.056	-0.292	0.971	2.59	0.72	0.518	0.747	1.349	2.59	1.349	3.724	0.03	0	A
NSC668036 [386]	0.006	-0.233	0.097	1.439	0.854	1.044	0.888	0.98	0.718	0.855	0.731	4.867	0.03	0.006	A
PKF222-815 [359]	-0.087	-0.088	-0.031	1.014	1.101	0.831	0.791	0.902	0.963	1.101	0.963	5.272	0.03	0.008	A
PNU-74654 [360]	-0.06	-0.037	0.062	1.051	1.111	0.844	1.195	1.131	0.903	1.111	0.961	4.13	0.02	0.004	A
Protocatechualdehyde [333]	-0.127	0	2.333	1.786	0	0.643	0.824	1.071	0	0	0	2.967	0.04	0	A
Quercetin [390]	-0.104	-0.022	0.065	1.006	1.354	0.733	0.978	1.045	0.917	1.354	0.917	4.138	0.03	0.004	A
Rotenone [391]	-0.056	-0.159	0.066	0.981	1.199	0.981	1	1.032	1.051	1.199	1.051	4.724	0.03	0.01	A
Shikonin [361]	-0.271	0.014	0.035	1.275	0.955	0.597	0.82	1.167	0.875	0.955	0.875	3.839	0.03	0.006	A
Sitosterol [337]	-0.001	0.003	-0.019	0.566	0.909	0.455	0.588	0.508	0.769	0.909	0.769	4.39	0.03	0.011	A
Sorafenib [392]	-0.144	-0.124	-0.154	0.998	0.665	0.827	0.658	1.02	0.880	0.868	0.898	4.056	0.02	0.007	A
Sulforaphane [338]	-0.149	-0.197	0.424	1.01	2.428	0.877	1.185	0.722	0.710	1.496	0.898	2.93	0.02	0	A
Theophylline [340]	-0.461	-0.546	0	0.794	0	1.263	0.481	1.397	0	0	0	3.364	0.03	0	A
Toxoflavin [395]	-0.272	-0.484	-0.445	0.954	0	1.232	0.647	1.157	1.505	0	1.417	3.476	0.04	0	A
Uvaol [342]	-0.026	0.007	-0.061	0.661	1.333	0.459	0.4	0.714	0.992	1.333	0.992	4.907	0.04	0.012	A
XAV-939 [363]	-0.103	-0.028	-0.126	0.981	1.869	0.655	0.477	0.97	0.859	1.813	0.730	4.196	0.04	0.009	A
ZTM000990 [364]	-0.009	-0.110	-0.009	1.114	0.954	0.881	0.856	0.93	0.999	0.954	1.000	5.002	0.04	0.009	A

	Grupo Inactivo														
Altretamine	-1	-1	0.667	0	0	1.944	0	1.944	0	0	0	3.497	0.06	0	I
Amcinonide	-0.035	-0.057	0.195	1.045	1.134	0.742	0.862	0.954	0.863	1.151	0.878	4.878	0.04	0.008	I
Amiprilose	0.122	-0.261	0.047	1.028	0.799	1.1	1.264	0.94	0.924	0.797	0.918	3.869	0.04	0.011	I
Azacitidine	-0.08	-0.392	-0.101	0.933	1.283	1.246	0.833	1.153	1.088	1.286	1.047	3.681	0.04	0	I
Beclomethasone	-0.063	-0.045	0.09	1.123	0.939	0.716	0.69	0.795	0.937	1.041	1.068	4.722	0.04	0.008	I
Benzdamine	-0.056	-0.048	0.043	1.461	0.838	1.054	0.968	1.303	0.762	0.831	0.693	3.715	0.02	0.009	I
Betamethasone	0.018	0.026	0.14	1.092	1.002	0.553	0.721	0.865	1.011	1.129	1.006	4.552	0.04	0.009	I
Bleomycin	-0.042	-0.177	-0.009	0.64	0.567	0.999	0.966	0.903	1.012	0.957	0.872	6.19	0.02	0.008	I
Busulfan	-0.132	-0.458	-0.456	0.964	3.279	1.374	0.768	0.945	1.347	0.854	1.399	3.578	0.03	0	I
Carboplatin	-0.061	-0.225	-0.202	0.883	0	1.092	0.49	1.671	0.445	0	0.097	3.318	0.03	0	I
Carmustine	0.022	0.059	-0.471	0.891	0	0.704	0.474	1.342	1.42	0	0.986	3.006	0.01	0	I
Carprofen	-0.033	-0.021	0.155	0.803	1.165	0.588	0.51	0.796	0.991	2.004	0.645	3.813	0.04	0	I
Clobetasolpropionate	0.036	-0.014	0.126	0.677	1.284	0.629	0.782	0.988	0.94	1.115	0.97	4.68	0.04	0.008	I
Cortisone	0.1	0.025	-0.043	0.974	1.639	0.534	0.645	0.682	1.032	1.639	1.032	4.418	0.04	0.011	I
Dactinomycin	-0.046	-0.203	-0.027	1.352	0.958	0.966	0.838	0.972	0.914	0.959	0.908	5.159	0.03	0.01	I
Daunorubicin	-0.142	-0.064	0.018	1.142	1.049	0.795	0.898	1.044	0.983	1.049	0.982	4.945	0.04	0.008	I
Deracoxib	-0.054	-0.095	-0.14	0.537	1.499	0.82	0.707	0.811	1.176	1.414	0.951	4.45	0.04	0.007	I
Desonide	0.069	-0.044	-0.018	0.949	1.278	0.711	0.833	0.7	1.079	1.278	1.079	4.556	0.04	0.01	I
Diallyltrisulfide	-1	0.5	0.5	1.6	0	0.5	1.143	2	0	0	0	2.824	0.01	0	I
Diflorasone	-0.031	0.03	0.055	1.143	0.972	0.575	0.731	0.866	1.133	1.055	1.108	4.624	0.04	0.009	I
Diosgenin	-0.091	-0.048	-0.056	0.754	1.151	0.767	0.833	0.976	0.806	1.151	0.806	4.674	0.03	0.008	I
Etoposide	0.114	-0.216	-0.209	0.908	1.114	1.047	0.876	0.798	1.129	1.114	1.129	5.12	0.02	0.008	I
Exemestane	-0.04	0.012	-0.091	0.592	3.3	0.462	0.563	0.737	1.004	3.3	1.004	4.264	0.04	0	I
Fenspiride	-0.122	-0.176	0.198	0.864	1.312	0.954	0.676	0.9	0.519	1.318	0.523	3.488	0.02	0.006	I
Firocoxib	-0.051	-0.132	-0.237	0.489	0.955	0.859	0.916	0.84	1.107	1.118	0.939	3.987	0.03	0.016	I
Fludarabine	-0.038	-0.316	-0.031	0.931	1.603	1.136	0.844	0.947	1.064	1.487	1.019	4.045	0.03	0	I

ANEXOS

Flufenamic	-0.136	0.156	0.249	0.857	0.946	0.651	0.612	1.086	0.751	1.866	0.888	4.519	0.05	0.018	I
Flumethasone	-0.031	0.03	0.055	1.143	0.972	0.575	0.731	0.866	1.133	1.055	1.108	4.624	0.04	0.009	I
Flunisolide	0.011	-0.038	-0.039	1.047	1.284	0.701	0.818	0.734	1.183	1.259	1.159	4.641	0.04	0.01	I
Flunixin	-0.179	-0.059	-0.092	1.215	2.491	0.735	0.53	1.004	0.8	2.441	0.84	4.085	0.03	0	I
Fluocinoloneacetonide	-0.031	-0.033	0.139	1.096	1.269	0.701	0.855	0.854	1.03	1.236	1.021	4.805	0.04	0.01	I
Fluocinonide	-0.031	-0.063	0.128	1.108	1.164	0.762	0.869	0.847	0.971	1.168	0.968	4.84	0.04	0.011	I
Fluorometholone	-0.001	0.023	0.276	1.107	1.047	0.531	0.751	0.906	0.836	1.261	0.85	4.532	0.04	0.014	I
Griseofulvin	0.028	-0.179	0.111	1.03	0.796	0.983	0.958	1.073	0.887	1.021	0.867	4.146	0.04	0	I
Isoflupredoneacetate	0.017	-0.011	0.192	1.119	1.031	0.649	0.754	0.837	0.841	1.154	0.852	4.528	0.04	0.01	I
Isoxicam	-0.196	-0.117	-0.193	1.066	0.789	0.885	0.768	1.002	1.06	0.937	1.049	3.942	0.03	0.006	I
Ketoprofen	-0.152	0.009	-0.208	1.188	1.425	0.534	0.528	1.018	1.188	1.425	1.188	3.951	0.03	0.012	I
Ketorolactromethamine	-0.067	-0.056	-0.046	1.328	1.727	0.662	0.662	0.911	0.701	1.732	0.709	3.723	0.03	0.012	I
Mechlorethamine	0.011	-0.347	2.401	1.913	0	1.714	1.143	1.333	0	0	0	2.598	0.03	0	I
Meclofenamate	-0.143	-0.032	-0.288	0.851	0.099	0.617	0.565	0.996	1.22	2.251	0.785	3.983	0.03	0	I
Medrysone	-0.011	0.015	0.112	1.094	1.818	0.487	0.593	0.589	1.026	1.818	1.026	4.421	0.04	0.019	I
Mefenamicacid	-0.158	-0.033	-0.095	1.066	2.977	0.62	0.58	0.995	0.944	2.991	0.864	3.94	0.03	0	I
Megestrolacetate	0.073	-0.022	-0.1	0.775	1.575	0.635	0.695	0.635	0.9	1.575	0.9	4.521	0.03	0.011	I
Melengestrolacetate	0.059	-0.021	-0.091	0.788	1.504	0.634	0.689	0.677	0.878	1.504	0.878	4.531	0.03	0.01	I
Methylprednisolone	0.055	-0.01	-0.019	0.912	1.166	0.656	0.64	0.694	0.917	1.166	0.917	4.56	0.04	0.009	I
Mitomycin	-0.134	-0.193	0.083	1.029	0.725	0.983	0.727	0.998	0.984	0.734	0.947	3.974	0.04	0	I
Mitoxantrone	-0.065	-0.093	-0.018	1.122	0.938	0.784	0.883	0.883	0.806	0.941	0.862	4.253	0.03	0.007	I
Mycophenolatemofetil	-0.093	-0.199	0.041	1.058	1.134	1.003	0.796	0.923	0.913	1.132	0.909	3.741	0.03	0.007	I
Naproxol	-0.048	-0.059	-0.2	0.952	3.214	0.756	0.559	0.714	1.286	3.214	1.286	3.616	0.03	0	I
Nocodazole	0.036	-0.145	-0.125	0.852	0.818	0.883	0.39	1.196	1.068	1.159	1.066	3.978	0.03	0.006	I
Oxaprozin	-0.14	-0.07	-0.049	1.073	1.732	0.749	0.742	0.948	0.732	1.738	0.719	3.92	0.02	0.012	I
Oxyphenbutazone	-0.127	0.003	-0.1	1.145	0.676	0.666	0.864	1.187	1.104	0.68	1.019	3.989	0.03	0.013	I
Phenylbutazone	-0.058	0.031	-0.192	1.373	0	0.675	0.862	1.304	1.311	0	1.181	3.925	0.03	0.012	I

Pipobroman	0.024	-0.068	-0.51	0.893	1.465	0.681	0.572	0.746	1.33	1.581	1.168	3.519	0.03	0.008	I
Podofilox	-0.001	-0.198	-0.299	0.947	1.041	1.018	0.727	0.81	1.282	1.041	1.282	4.641	0.03	0.008	I
Prednisolone	0.1	0.025	-0.043	0.974	1.639	0.534	0.645	0.682	1.032	1.639	1.032	4.418	0.04	0.011	I
Prednisone	0.1	0.025	-0.043	0.974	1.639	0.534	0.645	0.682	1.032	1.639	1.032	4.418	0.04	0.011	I
Pregnenolonesuccinate	0.011	-0.018	-0.067	0.788	1.367	0.633	0.546	0.549	0.773	1.367	0.773	4.378	0.03	0.01	I
Puromycin	0.121	-0.304	0.018	1.021	1.057	1.114	0.845	0.855	1.09	1.062	1.027	4.404	0.03	0.008	I
Salicyl	-0.357	0	0	1.543	0	0.571	0.701	1.286	0	0	0	2.833	0.06	0	I
Sanguinarines	-0.078	-0.189	-0.156	0.737	1.744	1.038	0.677	0.775	1.184	1.748	1.139	4.618	0.02	0.006	I
Semustine	0.039	0.184	-0.331	0.957	2.765	0.567	0.399	1.089	1.225	1.431	1.033	3.639	0.02	0	I
Sirolimus	0.073	-0.107	0.006	1.055	0.943	0.856	0.908	0.983	0.937	0.943	0.952	4.766	0.03	0.008	I
Teniposide	0.142	-0.176	-0.207	0.694	0.485	0.99	0.835	0.903	1.162	1.205	1.135	5.186	0.02	0.007	I
Tenoxicam	0.149	-0.189	-0.288	0.93	1.205	0.894	0.634	1.155	1.164	1.148	0.956	3.817	0.03	0.002	I
Testosterone	-0.068	-0.026	-0.099	0.634	1.705	0.649	0.62	0.818	0.94	1.705	0.94	4.315	0.03	0.006	I
Thiotepa	-0.3	-0.656	0	0	0	1.742	0.977	1.146	0	0	0	3.16	0	0	I
Toremiphen	0.017	-0.086	-0.1	0.664	1.227	1.102	0.913	0.549	1.029	2.141	0.698	4.365	0.02	0.006	I
Vincristine	0.019	-0.138	0.027	0.833	0.936	0.886	0.665	0.823	1.022	0.935	1.006	5.183	0.03	0.008	I
Zileuton	-0.122	0.193	-0.371	1.014	0.237	0.471	0.321	0.428	1.504	2.965	1.491	3.453	0.02	0	I
Zomepirac	-0.043	-0.067	-0.003	0.442	3.677	0.69	0.644	0.731	0.948	1.927	1.171	3.784	0.04	0.019	I

FD: Función discriminante.

MATS3m: índice de autocorrelación de Moran de retardo 3 ponderado por la masa atómica.

MATS1v: índice de autocorrelación Moran de retardo 1 ponderado por volumen de van der Waals.

MATS6e: índice de autocorrelación de Moran de retardo 6 ponderado por la electronegatividad de Sanderson.

GATS4m: índices de autocorrelación Geary de retardo 4 ponderado por la masa atómica.

GATS8m: índices de autocorrelación Geary de retardo 8 ponderado por la masa atómica.

GATS1v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 1 ponderados por volumen de van der Waals.

GATS2v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 2 ponderados por volumen de van der Waals.

GATS3v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 3 ponderados por volumen de van der Waals.

GATS6e: índices de autocorrelación de Geary de retardo 6 ponderado por la electronegatividad de Sanderson.

GATS8e: índices de autocorrelación de Geary de retardo 8 ponderado por la electronegatividad de Sanderson.

GATS6p: índice de autocorrelación Geary de retardo 6 ponderado por la polarizabilidad atómica.

VEA1: auto-vector suma de coeficientes de la matriz de adyacencia.

JGI5: índice de carga ponderados por enlace de orden 5.

JGI10: índice de carga ponderados por enlace de orden 10.

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.14. Compuestos que conforman el grupo test del modelo 8 (parte I).

Compuestos	nCIR	nN	nR06	Wap	S3K	D/Dr12	T(N..CI)	T(S..S)	T(S..F)	SRW09	MPC08	MPC09	MPC10	PCR	Clas.
Grupo Activo															
Apigenin [344]	4	0	3	6688	1.945	0	0	0	0	0	93	96	95	1.402	A
Artemimol [307]	13	0	3	15916	0.748	0	0	0	0	450	187	204	205	1	A
Camptothecin [311]	15	2	4	54541	1.489	0	0	0	0	1170	288	340	387	1.441	A
Dexamethasone [371]	10	0	3	31795	1.139	0	0	0	0	1638	288	321	332	1.135	I
Etodolac [401]	6	1	2	8775	1.271	0	0	0	0	1206	133	119	110	1.3	I
Fenbufen [402]	2	0	2	2985	2.92	0	0	0	0	0	42	42	40	1.399	A
Hydrocortisone [403]	10	0	3	27609	1.249	0	0	0	0	1404	252	285	291	1.083	I
Indole-3-Carbinol [324]	3	1	1	886	0.693	0	0	0	0	918	18	6	3	1.337	A
Isoflavone [326]	4	0	3	4412	1.419	0	0	0	0	0	65	64	51	1.502	A
Lgk-974 [379]	4	6	4	23905	3.461	0	0	0	0	0	107	103	115	1.486	A
Nabumetone [383]	3	0	2	2819	1.674	0	0	0	0	0	52	49	33	1.38	A
Paclitaxel [357]	13	1	5	319169	4.923	278.262	0	0	0	0	563	700	838	1.22	A
PFK118-310 [332]	3	4	2	1663	0.687	0	0	0	0	0	29	26	12	1.31	A
Piroxicam [388]	4	3	3	8059	1.972	0	0	0	0	0	87	91	82	1.427	A
Sulindac [362]	4	0	2	11060	2.447	0	0	0	11	1350	121	122	119	1.443	A
Vincristine [343]	28	4	5	2E+06	3.335	392.483	0	0	0	4140	1035	1332	1698	1.254	I
Grupo Inactivo															
Aminolevulinicacid	0	1	0	104	4.053	0	0	0	0	0	0	0	0	1.101	I
Amsacrine	7	3	4	27762	2.769	0	0	0	0	0	168	188	188	1.533	A
Chlorophyllide	38	4	0	404110	2.479	0	0	0	0	5832	447	551	674	1.473	I
Colchicine	6	1	1	21224	2.088	106.503	0	0	0	414	201	223	232	1.347	A
Cyclophosphamide	1	2	1	632	2.737	0	16	0	0	0	8	4	0	1.02	I
Doxorubicin	11	1	5	110532	2.973	0	0	0	0	0	387	485	568	1.288	I

Flurandrenolide	15	0	3	71686	1.334	90.394	0	0	0	3078	403	498	563	1.071	I
Flutamide	1	2	1	1629	2.62	0	0	0	0	0	36	26	6	1.208	I
Halcinonide	15	0	3	70233	1.292	90.437	0	0	0	3078	406	489	545	1.07	I
Hydroxyurea	0	2	0	18	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1.087	I
Ifosfamide	1	2	1	761	2.737	0	16	0	0	0	10	6	3	1.024	I
Isotretinon	1	0	1	2554	2.738	0	0	0	0	0	25	23	26	1.462	A
Streptozosin	1	3	1	1415	2.159	0	0	0	0	0	24	18	9	1.047	I
Suprofen	2	0	1	2260	2.043	0	0	0	0	540	40	32	28	1.311	I
Tamoxifencitrato	3	1	3	7804	3.273	0	0	0	0	0	MPC08	100	90	1.37	I
Thioguanine	3	5	1	865	0.831	0	0	0	0	738	17	6	0	1.265	I
Tolmetin	2	1	1	2790	1.765	0	0	0	0	900	44	38	34	1.34	I
Topotecan	15	3	4	89893	1.794	0	0	0	0	1170	346	421	500	1.367	I
Triamcinolone	10	0	3	31795	1.264	0	0	0	0	1638	288	321	332	1.135	I
Triamcinolonediacetate	10	0	3	50362	1.875	0	0	0	0	1656	346	406	438	1.159	I
Trilostane	15	1	3	35636	0.889	0	0	0	0	5676	287	337	370	1.093	I
Vinblastine	28	4	5	2E+06	3.083	384.89	0	0	0	4122	1000	1289	1644	1.256	I

FD: Función discriminante.

nCIR: número de circuitos.

nN: número de átomos de Nitrogeno.

nR06: número de anillos de 6 enlaces.

Wap: índice de Wiener de todos los caminos.

S3K: modificación alfa del índice de triple camino de Kier.

D/Dr12: índice que representa el cociente de la distancia/detour (o distancia desviada) para anillos de orden 12.

T(N..Cl): suma de las distancias topológicas entre los átomos de nitrógeno y cloro.

T(S..S): suma de las distancias topológicas entre los átomos de azufre.

T(S..F): suma de las distancias topológicas entre los átomos de azufre y flúor.

SRW09: número de caminos de auto-retorno de orden 9.

MPC08: número total de caminos de orden 8.

MPC09: número total de caminos de orden 9.

MPC10: número total de caminos de orden 10.

PCR: cociente entre el número de enlaces múltiples y el número total de enlaces.

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.14. Compuestos que conforman el grupo test del modelo 8 (parte II).

Compuestos	MATS3m	MATS1v	MATS6e	GATS4m	GATS8m	GATS1v	GATS2v	GATS3v	GATS6e	GATS8e	GATS6p	VEA1	JGI5	JGI10	Clas.
Grupo Activo															
Apigenin [344]	-0.273	-0.03	0.193	0.874	1.382	0.691	0.95	1.152	0.8	1.382	0.8	3.965	0.039	0.004	A
Artenimol [307]	-0.139	0.043	0.128	1.133	0	0.771	0.867	1.108	0.779	0	0.779	4.062	0.043	0	A
Camptothecin [311]	0.002	-0.097	0.045	1.056	1.345	0.779	0.734	1.003	1.009	1.351	1.028	4.534	0.035	0.006	A
Dexamethasone [371]	0.018	0.026	0.14	1.092	1.002	0.553	0.721	0.865	1.011	1.129	1.006	4.552	0.041	0.009	I
Etodolac [401]	-0.006	-0.073	-0.295	0.716	2.812	0.752	0.804	0.712	1.471	2.82	1.385	3.958	0.032	0	I
Fenbufen [402]	-0.05	0.009	-0.208	0.848	1.425	0.534	0.548	0.713	1.188	1.425	1.188	3.823	0.027	0.008	A
Hydrocortisone [403]	0.1	0.025	-0.043	0.974	1.639	0.534	0.645	0.682	1.032	1.639	1.032	4.418	0.035	0.011	I
Indole-3-Carbinol [324]	-0.163	-0.056	-1.241	1.327	0	0.645	0.59	0.985	4.819	0	4.12	3.093	0.03	0	A
Isoflavone [326]	-0.202	-0.046	-0.056	1.442	0	0.716	0.872	1.343	0.756	0	0.756	3.748	0.025	0	A
Lgk-974 [379]	-0.119	-0.182	-0.214	1.123	1.569	0.964	0.87	0.977	1.33	1.582	1.255	4.452	0.028	0.005	A
Nabumetone [383]	-0.014	-0.056	-0.15	0.756	1.943	0.756	0.756	0.591	1.133	1.943	1.133	3.576	0.02	0.011	A
Paclitaxel [357]	-0.024	-0.083	-0.023	1.235	0.961	0.811	0.82	0.953	1.119	0.961	1.112	5.22	0.037	0.008	A
PFK118-310 [332]	-0.372	-0.225	0.781	0.669	0	0.969	0.82	1.286	0.308	0	0.093	3.476	0.035	0	A
Piroxicam [388]	-0.186	-0.203	-0.212	1.057	0.79	0.906	0.649	1.114	1.066	1.066	1.096	3.901	0.03	0.004	A
Sulindac [362]	-0.017	-0.017	-0.205	0.441	2.351	0.569	0.559	0.545	1.204	1.395	0.906	3.928	0.038	0.01	A
Vincristine [343]	0.019	-0.138	0.027	0.833	0.936	0.886	0.665	0.823	1.022	0.935	1.006	5.183	0.032	0.008	I
Grupo Inactivo															
Aminolevulinicacid	-0.262	-0.095	0.296	1.377	0	0.878	1.011	1.045	0.554	0	0.199	2.811	0.022	0	I
Amsacrine	-0.04	-0.206	0.234	0.687	1.174	0.946	0.756	0.797	0.825	1.004	0.792	4.365	0.024	0.012	A
Chlorophyllide	-0.105	-0.077	-0.108	0.706	0.961	0.758	0.665	0.853	0.975	0.962	1.01	4.991	0.03	0.011	I
Colchicine	0.163	-0.183	-0.217	1.006	1.314	0.998	0.803	0.641	1.204	1.314	1.177	4.53	0.026	0.002	A
Cyclophosphamide	-0.089	-0.674	-0.142	0.442	0	1.58	0.51	1.492	0.973	0	0.1	3.241	0.017	0	I
Doxorubicin	-0.109	-0.062	0.023	1.115	1.039	0.802	0.887	1.009	0.97	1.038	0.971	4.977	0.034	0.008	I

Flurandrenolide	0.011	-0.038	-0.039	1.047	1.284	0.701	0.818	0.734	1.183	1.259	1.159	4.641	0.037	0.01	I
Flutamide	-0.297	0.096	-0.136	1.295	1.913	0.661	0.622	1.214	0.952	1.825	0.917	3.706	0.031	0	I
Halcinonide	0.04	-0.041	0.276	0.684	1.398	0.695	0.914	0.939	0.883	1.269	0.778	4.729	0.039	0.01	I
Hydroxyurea	0.429	-0.381	0	0	0	1.437	0.958	0.21	0	0	0	2.131	0	0	I
Ifosfamide	-0.089	-0.674	-0.466	0.26	0	1.58	0.51	1.492	1.217	0	0.125	3.207	0.018	0	I
Isotretinon	0.024	0	0	0.888	1.54	0.525	0.385	0.398	0.525	1.54	0.525	3.352	0.04	0.006	A
Streptozosin	-0.132	-0.187	-0.223	1.185	0.569	1.083	0.984	1.06	1.107	0.569	1.024	3.614	0.031	0	I
Suprofen	0.057	0.019	-0.117	0.916	1.809	0.529	0.517	1.106	0.875	0.725	0.739	3.912	0.024	0.01	I
Tamoxifencitrato	0.252	-0.089	-0.017	0.872	2.633	1.101	0.905	0.544	0.641	2.651	0.645	4.323	0.016	0.006	I
Thioguanine	-0.179	-0.457	0	2.047	0	1.234	0.647	1.028	0	0	0	3.147	0.04	0	I
Tolmetin	0.01	-0.071	-0.13	1.151	1.381	0.696	0.662	0.731	0.918	1.386	0.913	3.783	0.03	0.019	I
Topotecan	-0.043	-0.137	-0.034	0.985	1.282	0.841	0.743	1.004	0.961	1.283	1.022	4.774	0.032	0.01	I
Triamcinolone	0.02	0.032	0.286	1.107	1.128	0.58	0.745	0.854	0.878	1.259	0.882	4.552	0.041	0.009	I
Triamcinolonediacetate	0.021	-0.042	0.168	1.085	1.102	0.734	0.791	0.825	0.885	1.137	0.897	4.675	0.039	0.009	I
Trilostane	-0.003	-0.018	-0.168	0.756	1.453	0.634	0.664	0.94	1.047	1.45	1.087	4.095	0.035	0	I
Vinblastine	0.03	-0.141	-0.065	0.822	0.893	0.9	0.705	0.834	1.069	0.892	1.051	5.153	0.032	0.008	I

FD: Función discriminante.

nCIR: número de circuitos

nN: número de átomos de Nitrogeno

nR06: número de anillos de 6 enlaces

Wap: índice de Wiener de todos los caminos

S3K: modificación alfa del índice de triple camino de Kier

D/Dr12: índice que representa el cociente de la distancia/detour (o distancia desviada) para anillos de orden 12

T(N..Cl): suma de las distancias topológicas entre los átomos de nitrógeno y cloro

T(S..S): suma de las distancias topológicas entre los átomos de azufre

T(S..F): suma de las distancias topológicas entre los átomos de azufre y flúor

SRW09: número de caminos de auto-retorno de orden 9

MPC08: número total de caminos de orden 8

MPC09: número total de caminos de orden 9

MPC10: número total de caminos de orden 10

PCR: cociente entre el número de enlaces múltiples y el número total de enlaces

MATS3m: índice de autocorrelación de Moran de retardo 3 ponderado por la masa atómica

MATS1v: índice de autocorrelación Moran de retardo 1 ponderado por volumen de van der Waals

MATS6e: índice de autocorrelación de Moran de retardo 6 ponderado por la electronegatividad de Sanderson

GATS4m: índices de autocorrelación Geary de retardo 4 ponderado por la masa atómica

GATS8m: índices de autocorrelación Geary de retardo 8 ponderado por la masa atómica

GATS1v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 1 ponderados por volumen de van der Waals

GATS2v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 2 ponderados por volumen de van der Waals

GATS3v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 3 ponderados por volumen de van der Waals

GATS6e: índices de autocorrelación de Geary de retardo 6 ponderado por la electronegatividad de Sanderson

GATS8e: índices de autocorrelación de Geary de retardo 8 ponderado por la electronegatividad de Sanderson

GATS6p: índice de autocorrelación Geary de retardo 6 ponderado por la polarizabilidad atómica

VEA1: auto-vector suma de coeficientes de la matriz de adyacencia

JGI5: índice de carga ponderados por enlace de orden 5

JGI10: índice de carga ponderados por enlace de orden 10

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

Anexo V.15. Compuestos que conforman el grupo de validación del modelo 8 (parte I).

Compuestos	nCIR	nN	nR06	Wap	S3K	D/Dr12	T(N..CI)	T(S..S)	T(S..F)	SRW09	MPC08	MPC09	MPC10	PCR	Clas.
Grupo Activo															
2,4-diaminoquinazoline [365]	3	4	2	1151	0.909	0	0	0	0	0	21	18	6	1.393	A
Auraptene [366]	3	0	2	5295	3.126	0	0	0	0	0	54	55	46	1.44	A
Caffeic acid [346]	1	0	1	640	2.277	0	0	0	0	0	11	6	0	1.348	A
Calphostin [310]	24	0	7	695876	4.769	420.547	0	0	0	0	770	994	1182	1.594	A
Cardamonin [396]	2	0	2	3168	2.493	0	0	0	0	0	35	36	33	1.511	A
Curcumin [370]	2	0	2	7110	4.331	0	0	0	0	0	49	44	44	1.596	A
Emodin [400]	6	0	3	8034	1.281	0	0	0	0	0	124	120	112	1.392	A
FH535 [350]	2	2	2	3948	3.123	0	28	0	0	0	52	46	47	1.4	A
Gallic acid [320]	1	0	1	494	1.358	0	0	0	0	0	0	0	0	1.238	A
Gossypol [374]	6	0	4	62508	2.068	0	0	0	0	0	316	356	392	1.426	A
Ibuprofen [376]	1	0	1	905	1.466	0	0	0	0	0	20	8	0	1.221	A
Indoprofen [404]	4	1	2	7439	1.717	0	0	0	0	1134	94	91	93	1.366	I
Mitotane [405]	2	0	2	2135	2.902	0	0	0	0	0	38	26	18	1.4	A
Naringin [331]	6	0	5	97739	4.373	0	0	0	0	0	250	297	343	1.242	A
Pkf118-744 [358]	6	0	3	12339	1.538	0	0	0	0	0	162	169	151	1.396	A
Pyrvinium [389]	5	3	3	26085	1.877	0	0	0	0	1098	130	141	143	1.535	A
Rofecoxib [406]	3	0	2	7200	2.2	0	0	0	0	918	88	94	80	1.391	A
Tanshinone [339]	10	0	3	16961	0.965	0	0	0	0	936	184	201	185	1.415	A
Grupo Inactivo															
Alclometazonedipropionate	10	0	3	32490	1.319	0	0	0	0	1638	292	329	339	1.135	A
Altrenogest	10	0	3	21431	1.108	0	0	0	0	1386	203	232	235	1.246	I
Azaserine	0	3	0	235	4.29	0	0	0	0	0	2	0	0	1.21	A
Azathioprine	4	7	1	5496	1.639	0	0	0	0	1638	71	66	63	1.391	I

Azelaic acid	0	0	0	344	9.416	0	0	0	0	0	5	4	4	1.08	I
Betamethasone1721dipropionate	10	0	3	55399	1.886	0	0	0	0	1656	361	417	453	1.134	I
Betamethasoneacetate	10	0	3	41025	1.43	0	0	0	0	1638	303	347	372	1.144	I
Budesonide	15	0	3	73611	1.468	91.406	0	0	0	2862	386	469	533	1.127	I
Carbenoxolone	15	0	5	166629	2.007	0	0	0	0	0	459	576	675	1.091	A
Chlorambucil	1	1	1	1757	5.001	0	6	0	0	0	30	26	20	1.219	I
Cytarabine	2	3	1	2194	1.603	0	0	0	0	1098	40	35	22	1.184	I
Emetine	9	2	5	98805	2.402	0	0	0	0	0	265	320	344	1.264	A
Epirubicin	11	1	5	110532	2.973	0	0	0	0	0	387	485	568	1.288	I
Fenretinide	2	1	2	7894	3.843	0	0	0	0	0	42	41	43	1.578	A
Floxuridine	2	2	1	2206	1.78	0	0	0	0	900	42	37	23	1.125	I
Flumethasonepivalate	10	0	3	54765	1.595	0	0	0	0	1638	341	388	424	1.127	I
Fluorouracil	2	2	1	2206	1.78	0	0	0	0	900	42	37	23	1.125	I
Hecogenin	16	0	4	119347	1.251	88.942	0	0	0	2808	427	530	623	1.008	I
Methotrexate	4	8	3	23794	4.812	0	0	0	0	0	107	126	120	1.412	I
Mycophenolic	3	0	1	5357	2.021	0	0	0	0	936	76	66	54	1.324	I
Triamcinolone	10	0	3	31795	1.264	0	0	0	0	1638	288	321	332	1.135	I

FD: Función discriminante.

MATS3m: índice de autocorrelación de Moran de retardo 3 ponderado por la masa atómica.

MATS1v: índice de autocorrelación Moran de retardo 1 ponderado por volumen de van der Waals.

MATS6e: índice de autocorrelación de Moran de retardo 6 ponderado por la electronegatividad de Sanderson.

GATS4m: índices de autocorrelación Geary de retardo 4 ponderado por la masa atómica.

GATS8m: índices de autocorrelación Geary de retardo 8 ponderado por la masa atómica.

GATS1v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 1 ponderados por volumen de van der Waals.

GATS2v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 2 ponderados por volumen de van der Waals.

GATS3v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 3 ponderados por volumen de van der Waals.

GATS6e: índices de autocorrelación de Geary de retardo 6 ponderado por la electronegatividad de Sanderson.

GATS8e: índices de autocorrelación de Geary de retardo 8 ponderado por la electronegatividad de Sanderson.

GATS6p: índice de autocorrelación Geary de retardo 6 ponderado por la polarizabilidad atómica.

VEA1: auto-vector suma de coeficientes de la matriz de adyacencia.

JGI5: índice de carga ponderados por enlace de orden 5.

JGI10: índice de carga ponderados por enlace de orden 10.

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

V.15. Compuestos que conforman el grupo de validación del modelo 8 (parte II).

Compuestos	MATS3m	MATS1v	MATS6e	GATS4m	GATS8m	GATS1v	GATS2v	GATS3v	GATS6e	GATS8e	GATS6p	VEA1	JGI5	JGI10	Clas.
Grupo Activo															
2,4-diaminoquinazoline [365]	-0.382	-0.192	-1	1.203	0	0.952	0.458	1.213	2.063	0	2.063	3.268	0.029	0	A
Auraptene [366]	-0.173	-0.094	0.235	1.057	1.351	0.881	0.946	1.158	0.811	1.351	0.811	3.552	0.03	0.006	A
Caffeic acid [346]	-0.013	0	-0.794	1.083	0	0.667	0.765	0.867	1.857	0	1.857	3.203	0.029	0	A
Calphostin [310]	-0.073	-0.114	-0.14	1.041	1.172	0.881	0.734	0.894	1.084	1.172	1.084	5.238	0.03	0.008	A
Cardamonin [396]	-0.224	-0.048	0.103	0.88	0.99	0.707	0.848	1.126	0.873	0.99	0.873	3.663	0.025	0.009	A
Curcumin [370]	0.049	-0.082	-0.229	1.045	1.114	0.796	0.903	0.88	1.114	1.114	1.114	4.812	0.021	0.004	A
Emodin [400]	-0.214	0.03	0.098	1.267	1.52	0.576	0.745	1.039	1.043	1.52	1.043	4.03	0.039	0	A
FH535 [350]	-0.028	0.137	0.146	1.107	1.124	0.568	0.536	1.061	0.643	0.847	0.529	4.152	0.026	0.009	A
Gallic acid [320]	-0.213	0	1.4	1.543	0	0.786	0.887	1.109	0	0	0	3.202	0.034	0	A
Gossypol [374]	-0.012	0.02	-0.041	1.122	1.046	0.572	0.641	0.837	0.948	1.046	0.948	5.391	0.035	0.012	A
Ibuprofen [376]	-0.089	0	-0.176	1.01	1.346	0.538	0.404	0.85	1.154	1.346	1.154	3.489	0.034	0	A
Indoprofen [404]	-0.167	-0.052	-0.089	1.172	1.607	0.656	0.515	1.017	0.769	1.612	0.821	3.881	0.029	0.008	I
Mitotane [405]	-0.143	1	-0.357	1.261	1.366	0	0	0	1.366	1.366	1.366	3.824	0.019	0	A
Naringin [331]	0.049	-0.123	0.092	0.961	1.037	0.916	1.068	0.958	0.868	1.037	0.868	5.576	0.029	0.008	A
Pkf118-744 [358]	-0.084	0.02	-0.26	1.174	0.968	0.559	0.745	0.968	1.202	0.968	1.202	4.224	0.033	0.004	A
Pyrvinium [389]	-0.089	-0.198	0.138	0.726	0.964	1.464	1.358	0.956	1.104	0.964	1.104	4.806	0.025	0.007	A
Rofecoxib [406]	-0.053	-0.104	-0.192	0.465	1.842	0.76	0.629	0.831	1.047	1.154	0.928	4.12	0.028	0.009	A
Tanshinone [339]	0.028	-0.028	-0.263	1.197	0	0.648	0.736	0.926	1.433	0	1.433	4.162	0.032	0	A
Grupo Inactivo															
Alclometazonedipropionate	-0.023	0.021	0.05	1.139	0.627	0.53	0.632	0.697	1.041	1.37	1.255	4.525	0.038	0.009	A
Altrenogest	-0.068	0.011	-0.104	0.772	1.853	0.463	0.735	0.897	1.095	1.853	1.095	4.099	0.031	0.007	I
Azaserine	-0.214	-0.306	0.052	0.548	0.614	1.259	1.209	1.017	0.874	0.645	0.983	3.151	0.035	0	A
Azathioprine	-0.274	-0.103	-0.031	1.602	0.194	0.907	0.708	0.921	0.935	2.235	0.522	4.073	0.02	0	I

Azelaic acid	-0.133	-0.037	-0.381	0.963	1.733	0.722	0.667	0.867	1.238	1.733	1.238	3.479	0.021	0	I
Betamethasone-17,21-dipropionate	-0.025	-0.042	0.123	1.045	0.934	0.712	0.775	0.933	0.905	0.965	0.91	4.722	0.036	0.008	I
Betamethasoneacetate	0.015	-0.011	0.148	1.093	0.979	0.645	0.745	0.846	0.92	1.095	0.919	4.587	0.04	0.009	I
Budesonide	0.033	-0.043	0.011	1.048	1.343	0.709	0.761	0.797	0.989	1.343	0.989	4.556	0.035	0.009	I
Carbenoxolone	-0.025	-0.008	-0.123	0.712	1.209	0.613	0.453	0.66	0.94	1.209	0.94	5.032	0.039	0.009	A
Chlorambucil	0.096	-0.085	-0.239	0.947	1.176	0.741	0.687	0.687	1.365	1.334	1.034	3.61	0.027	0.008	I
Cytarabine	0.006	-0.278	-0.124	1.03	1.225	1.093	0.906	1.037	1.134	1.228	1.085	3.681	0.037	0	I
Emetine	0.158	-0.178	0.071	1.014	1.003	1.086	0.816	0.692	0.715	1.001	0.717	4.991	0.025	0.007	A
Epirubicin	-0.109	-0.062	0.023	1.115	1.039	0.802	0.887	1.009	0.97	1.038	0.971	4.977	0.034	0.008	I
Fenretinide	-0.063	-0.022	-0.029	1.131	1.047	0.603	0.684	0.841	0.7	1.045	0.683	3.372	0.034	0.006	A
Floxuridine	0.01	-0.254	-0.243	0.937	1.019	1.054	0.903	0.983	1.269	1.021	1.215	3.773	0.038	0	I
Flumethasonepivalate	-0.09	-0.009	0.056	1.186	0.655	0.644	0.732	1.028	1.092	0.718	1.084	4.68	0.041	0.011	I
Fluorouracil	0.01	-0.254	-0.243	0.937	1.019	1.054	0.903	0.983	1.269	1.021	1.215	3.773	0.038	0	I
Hecogenin	-0.114	-0.043	0.04	0.903	1.005	0.718	0.789	0.984	0.957	1.005	0.957	4.71	0.036	0.008	I
Methotrexate	-0.033	-0.211	0.405	0.974	1.073	0.974	0.705	0.833	0.732	1.069	0.679	4.238	0.027	0.008	I
Mycophenolic	-0.196	-0.098	-0.069	0.896	1.378	0.827	0.657	1.006	0.971	1.378	0.971	3.733	0.028	0.009	I
Triamcinolone	0.02	0.032	0.286	1.107	1.128	0.58	0.745	0.854	0.878	1.259	0.882	4.552	0.041	0.009	I

FD: Función discriminante.

nCIR: número de circuitos.

nN: número de átomos de Nitrógeno.

nR06: número de anillos de 6 enlaces.

Wap: índice de Wiener de todos los caminos.

S3K: modificación alfa del índice de triple camino de Kier.

D/Dr12: índice que representa el cociente de la distancia/detour (o distancia desviada) para anillos de orden 12.

T(N..Cl): suma de las distancias topológicas entre los átomos de nitrógeno y cloro.

T(S..S): suma de las distancias topológicas entre los átomos de azufre.

T(S..F): suma de las distancias topológicas entre los átomos de azufre y flúor.

SRW09: número de caminos de auto-retorno de orden 9.

MPC08: número total de caminos de orden 8.

MPC09: número total de caminos de orden 9.

MPC10: número total de caminos de orden 10.

PCR: cociente entre el número de enlaces múltiples y el número total de enlaces.

MATS3m: índice de autocorrelación de Moran de retardo 3 ponderado por la masa atómica.

MATS1v: índice de autocorrelación Moran de retardo 1 ponderado por volumen de van der Waals.

MATS6e: índice de autocorrelación de Moran de retardo 6 ponderado por la electronegatividad de Sanderson.

GATS4m: índices de autocorrelación Geary de retardo 4 ponderado por la masa atómica.

GATS8m: índices de autocorrelación Geary de retardo 8 ponderado por la masa atómica.

GATS1v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 1 ponderados por volumen de van der Waals.

GATS2v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 2 ponderados por volumen de van der Waals.

GATS3v: índices de autocorrelación de Geary de retardo 3 ponderados por volumen de van der Waals.

GATS6e: índices de autocorrelación de Geary de retardo 6 ponderado por la electronegatividad de Sanderson.

GATS8e: índices de autocorrelación de Geary de retardo 8 ponderado por la electronegatividad de Sanderson.

GATS6p: índice de autocorrelación Geary de retardo 6 ponderado por la polarizabilidad atómica.

VEA1: auto-vector suma de coeficientes de la matriz de adyacencia.

JGI5: índice de carga ponderados por enlace de orden 5.

JGI10: índice de carga ponderados por enlace de orden 10.

Clas.: clasificación del modelo para el compuesto.

A: activo; I: inactivo; N.C.: no clasificable.

ANEXO VI. AUTORIZACIÓN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL



DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIÓN AGRARIA Y GANADERÍA

Ciutat Administrativa 9 d'Octubre
Castán Tobeñas, 77. Edif. B3 P2 46018 VALENCIA



Unión Europea

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2015/VSC/PEA/00023

Vista la solicitud realizada en fecha **23/01/15** con nº reg. entrada **1147** por D/D^a. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora Investigació i Política Científica, centro usuario **ES460780001001**, para realizar el procedimiento:

"Efecto preventivo de la transformación neoplásica asociada a colitis ulcerosa mediado por productos fenólicos antiinflamatorios"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Sanidad y Bienestar Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2015/VSC/PEA/00023** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universidad de Valencia-Estudio General**

Responsable del proyecto: **Maria del Carmen Recio Iglesias**

Establecimiento: **Sección Producción Animal SCSIE Burjasot**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 11 de febrero de 2015

El director general de Producción Agraria y Ganadería


José Miguel Ferrer Arranz

SUMMARY

VIII. SUMMARY

INTRODUCTION

Today, computational methods play an essential role in the search and development of new drugs. Computer-aided drug design techniques (CADD) are defined as those "computer assisted techniques used to discover, design and optimize compounds with desired properties and structure" (Gálvez et al., 2012). One of the most common CADD techniques is Quantitative structure-activity relationship (QSAR), which relates the chemical structure of molecules under study with their physicochemical, biological or pharmacological activity, using mathematical models (Patel et al., 2014). These mathematical models are constructed by means of molecular descriptors. When the descriptors are topological, the methodology is called Molecular Topology (MT), a discipline based on graph theory, which studies the positions and interconnections of the elements of a set of connected points called graphs. A major advantage of the graphs, is that each one of them is represented by a matrix, A , namely topological or adjacency matrix. The matrix is a very versatile mathematical object that can be manipulated to obtain many mathematical descriptors. Our research group currently uses a large number of descriptors, allowing the design and selection of new lead compounds with different pharmacological activities: analgesic (Gálvez et al., 1994), antidiabetic (Anton Fos et al., 1994), lipid-lowering (Fences-Del Pozo et al., 1996), antineoplastic (Gálvez et al., 1996), antiviral (Julian-Ortiz et al., 1999), antihistaminic (Casaban-Ros al., 1999), antibacterial (Mishra et al., 2001), bronchodilator (Rios-Santamarina et al., 2004), antimalarial (Mahmoudi et al., 2006) and anti-Alzheimer (Gálvez et

al., 2010). The use of MT, along with the topological descriptors, led to the discovery of more than 200 new hits and leads, some of which have resulted in national and international patents (as shown in Table I.2).

In this work, the main aim is discovering new chemopreventive agents against cancer, using MT.

The very first clues about the relationship between inflammation and cancer come from the nineteenth century. The German physician Rudolf Virchow postulated the “Reiztheorie” (*Theory of inflammation*) where he identified the inflammation as a common element in several human cancer samples (Maiorov et al., 2013). The scientific evidence of the link between chronic inflammation and cancer is extensive (Shacter and Weitzman, 2002). Table I.3 shows how various chronic inflammatory episodes cause an increase in the susceptibility of cells against neoplastic transformations. One of the most representative cases relating inflammatory processes and cancer, is the association between inflammatory bowel disease (IBD) and colorectal cancer (CRC). It must be said that, in some cases, triggers of chronic inflammatory processes are known (bacteria, viruses, parasites, chemical irritants nondigestible particles), while in other cases they are unknown. This is precisely the case of inflammatory bowel disease (Shacter and Weitzman, 2002). The inflammatory mediators that contribute to neoplasms formation through different mechanisms are many. Among the proinflammatory mediators stand out the arachidonic acid metabolites (prostaglandins) such as PGE₂ (Mione and Zon, 2012); various cytokines such as IL-6 which acts as tumor growth factor and promotes angiogenesis process (Shacter and Weitzman, 2002); chemokines and free radicals (reactive oxygen species and

nitrogen). Chronic exposure to these mediators can cause an increased cell proliferation, mutagenesis, oncogene activation and ultimately angiogenesis. This may result in uncontrolled cell proliferation (Shacter and Weitzman, 2002).

Among the currently different approaches used in the fight against cancer, chemoprevention is a major challenge for the scientific community. Chemopreventive agents fall into two categories (Wattenberg, 1985):

- Blockers: Prevent carcinogens from reaching their targets.
- Suppressor: Inhibit the malignant transformation of cells during the stages of development or progression of the carcinogenic process.

Early detection and treatment of inflammatory stress could become key to combat multiple carcinogenic processes (Lee et al., 2013). Various inflammatory events share signaling pathways with carcinogenic processes, such as the signaling pathway of phosphoinositol-3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt)-target of rapamycin in mammalian cells (mTOR) (Roychowdhury et al., 2010; Kim et al., 2012) and Wnt/ β -catenin (Silva-Garcia et al., 2014). Activation of the signaling pathway PI3K/Akt/mTOR, involves a profound alteration of cellular growth control and survival, resulting ultimately in uncontrolled and metastatic growth, angiogenesis and resistance to therapy. Therefore, this complex signaling pathway is today one of the most attractive targets for the development of anticancer and chemopreventive agents (Garcia-Echeverria and Sellers, 2008). On the other hand, changes in the signaling pathway of Wnt/ β -catenin are also related to many cancerous processes (Table I.4), because it regulates important processes related to cancer progression, such as

tumor initiation and growth, senescence and cell death, as well as cell differentiation and metastasis (Anastas and Moon, 2013). When activated, the signaling pathway of Wnt/ β -catenin results in nuclear accumulation of β -catenin.

CRC is one of the most common cancers worldwide, with an incidence of more than one million new cases per year (Kumar et al., 2012). Despite the family inheritance, environmental factors such as mutagens associated with food, diseases such as chronic intestinal inflammation or intestinal disorders agents and specific pathogens, contribute to the development of the CRC (Kumar et al., 2012). Furthermore, prostate cancer (PC) is the second most common cancer in men worldwide.

Aberrant activation of signaling pathways PI3K/Akt/mTOR and Wnt/ β -catenin, have been associated with CRC tumorigenic process (Mattmann et al., 2011; Wang et al., 2014) and PC (Morgan et al., 2009). Moreover, aberrant activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway is related with the development of resistance to treatment of PC (Tang and Ling, 2014) and plays a key role in the development and maintenance of prostate cancer resistant to castration (CRPC). This is why the pathway is 100% altered in patients with CRPC (Edlind and Hsieh, 2014). Finally, although mTOR inhibitors are the most studied, well tolerated and effective, it has been found that they may cause activation of Akt as a result of inhibition of mTOR, so that finding dual inhibitors Akt/mTOR is a promising therapeutic challenge. To avoid this undesirable activation effect, nowadays they are given in combination with other cytotoxic agents in the CRC treatment (Francipane and Lagasse, 2014).

From all the above, the main objectives of the Thesis are:

- Discovering new chemopreventive agents using MT.
- Obtaining and validating mathematical-topological models for the identification of Akt/mTOR and β -catenin inhibitors.
- Identification of compounds with chemopreventive activity related to the inhibition of the aforementioned pathways.
- Experimental validation of the selected compounds through *in vitro* tests.
- Assessment of *in vivo* chemopreventive ability of selected compounds.

RESULTS

In silico

Eight models based on the use of topological and topochemical indices were built up by applying linear (linear discriminant analysis and analysis of multilinear regression) and nonlinear (neural networks) statistical techniques. Six of them were discriminant ones (Equation III.1-4 and 7-8), capable to distinguish between Akt and β -catenin inhibitors from not inhibitors. Finally, the remaining two models, were quantitative predictive ones, which predict IC_{50} for Akt and β -catenin inhibitors (Equation III.5-6). In Annex V it is reported all the additional information about the models. To determine the robustness and predictive power of the discriminant models, they were subject to external validation, based on the classification of Akt and β -catenin inhibitors others than those used to build up the model. For that purpose, 20% of the data were used. In all cases, except for DF_4 and DF_8 (Figure III.26), the discriminant models were able to identify more effectively compounds showing no Akt and β -catenin inhibition (Tables III.1-4; 7- 8); so that the risk of including "false active" is minimized given the high specificity of the models. This is reflected in the ROC curves (Figure III.2-3; 5-6; 8-9; 11-12; 22-24; 27-29), which illustrate the quality of the fit. The equations of IC_{50} against Akt (Equation III.5 and Table III.5) and β -catenin (Equation III.6 and Table III.6), adequately predict the property under study with values of $r^2= 0.958$ (Figure III.13) and $r^2= 0.873$ (Figure III.18), respectively. Both models were tested following the cross-validation (CV) method *leave-one-out*. After internal validation, Equation III.5 shows a loss of stability caused by the molecule of Perifosine (Table III.5 and Figure III.14). When this compound is removed from the model and the stability test repeated, it is observed

that the stability of Equation III.5 increases nearly to optimal values (Figure III.15). It is clear therefore that Perifosine causes instability in the model, what is reasonable considering the structural difference between Perifosine and all the rest of compounds of the training set (Table III.5).

When the cross-validation test to Equation III.6 is applied, an overall stability of the model can be seen and it manages to correctly predict all compounds of the data (Table III.6 and Figure III.19). In order to find possible *outliers* in Equations III.5 and III.6, it was determined whether there was any compound whose residual value exceeded $\pm 2 *SEE$ (Figures III.16 and 20). No *outliers* were identified in the models. Finally, the predictive models of Akt (Equation III.5) and β -catenin (Equation III.6) IC_{50} , were subjected to a randomness test (Figure III.17 and 21). In both cases the non-randomness of the model is confirmed as all the points obtained from the random series (10 series) are in the lower left quadrant of the graph, which correspond to small regression and correlation coefficient. On the contrary, the values for Equation III.5 ($r^2 = 0.958$) and Equation III.6 ($r^2 = 0.873$), are on the upper right quadrant and are much higher than those obtained randomly. Later on, a virtual screening based on the models 1-8 was carried out on two commercial chemical libraries from Specs. Finally, six potential inhibitors were selected (Figure III.30), presenting optimum characteristics from both a qualitative (1-4 and 7-8 models), and quantitative (IC_{50} values, models 5 and 6) points of view (Table III.9). Other models taking into account physicochemical parameters (ADME/Tox, water solubility, etc .) , were used also for the selection of these potential β -catenin and Akt inhibitors (data not shown here). Moreover, other issues such as economic cost, compounds'

commercial availability, etc. , were taken into account as well for the selection of the compounds.

In vitro

Cytotoxicity assay: HT-29 and PC3 cell line.

HT-29 cells were exposed to the selected Akt and β -catenin potential inhibitors, in order to determine cell viability. As shown in Table III.10, several among the selected compounds were better or similar to the reference β -catenin inhibitor (FH535), Akt inhibitor (LY294002) and multi-CDK inhibitor (AT7519). For instance, inhibitor 4 at 100 μ M is able to kill 48% of HT-29 cells. This compared with FH535, LY294002 and AT7519 at 100 μ M inhibition rates represent 38%, 51% and 36%, respectively.

Similar experiment was carried out on the proliferation of human prostate cancer cells. PC-3 cells were treated with different doses of inhibitors 1-6 for 48 h and cell viability was monitored by MTT. Results show that inhibitor 4 totally blocked the viability of prostate cancer cells (Table III.11) at 200 μ M. Inhibitors 1 and 6 also decreased cell viability although in a lesser extent (58% y 31%, respectively).

Effect of compounds over Akt and β –catenin activation

Akt inhibition.

Akt activation involves the phosphorylation of two residues: threonine 308 (Thr308) in the activation loop and serine 473 (Ser473) in the C-terminal hydrophobic motif. The phosphorylation of both of these regulatory sites leads to complete activation of the enzyme. To evaluate the inhibitory ability of the selected compounds against Akt it was measured the phosphorylation of the enzyme in serine 347. As shown in Figure III.31, inhibitor 4 after 1 hour of treatment induced a decrease in Akt phosphorylation at Ser473. This effect may be compared with the Akt inhibitor IV, a cell-permeable and reversible benzimidazole compound that inhibits Akt phosphorylation/activation. When cells were incubated with the compounds for 48 hours, this effect was even greater and was also observed for inhibitors 3 and 6 (Figure III.31).

To assess the impact of the compounds on downstream molecules of the Akt signaling pathway, it was used *Western blot* analysis to observe phosphorylation status and total protein expression of mTOR, a key effector downstream of Akt. As observed in Figure III.31, all tested agents except inhibitor 5, decreased mTOR phosphorylation, being inhibitors 2 and 4 the most effective at 1 hour and inhibitors 1, 2 and 4 at 48 hours.

These results indicate that all the compounds selected, except inhibitor 5, were able to inhibit Akt signaling pathway although with different efficacy.

β -Catenin inhibition

To investigate whether the compounds also inhibited β -catenin pathway it was measured β -catenin levels as well as its downstream well-characterized target gene cyclin D1.

In the basal situation, much of the cellular β -catenin is bound to E-cadherin on the cell membrane. Cytosolic β -catenin maintained in an inactive state through its interaction with a large protein complex with several proteins including the GSK-3 β . In this situation β -catenin is phosphorylated mainly by GSK-3 β and labelled for polyubiquitination and degradation into proteasome. Under these conditions, β -catenin targeted genes are repressed. When the pathway is activated, GSK-3 β is inhibited leading to the stabilization and accumulation of cytoplasmic β -catenin, which then enters the nucleus and induces the expression of its target genes. One of the better characterized β -catenin-regulated gene is cyclin D1 which promote cell cycle progression. To test the effect of selected compounds on the β -catenin pathway, β -catenin and cyclin D1 levels were determined by *Western blot* in PC-3 cells. Figure III.32 shows that inhibitors 4 and 6 were the most efficacious in suppressing the expression of cyclin D1, although inhibitors 1, 2 and 3 also exhibited a weak repression.

Immunofluorescence

To further investigate the inhibitor role of the selected compounds, PC-3 cells were stimulated with the well-established β -catenin/cyclin D1 pathway activator Wnt3a (Wnt). When cells were stimulated with Wnt, β -catenin was recruited by membrane adherens junctions and accumulated in the nucleus (Figure III.33). When cells were pre-treated with the selected compounds β -catenin redistribution was inhibited. This effect was well appreciated in inhibitors 2, 4 and 6 (Figure III.33). Furthermore, levels of β -catenin in inhibitor 6-treated cells almost disappeared (Figure III.33).

As seen in Figures III.32 and 33, the selected cancer chemotherapeutic agents were able to impact both the subcellular redistribution and the activity of β -catenin as they were able to inhibit its nuclear-cytoplasmic shuttling and its recruitment at plasma membrane as well as the expression of its target gene cyclin D1. Inhibitors 2, 4 and 6 were the most effective.

Notably, the compounds that inhibited both Akt and β -catenin, had the greatest impact on cell viability, so supporting the idea that dual inhibition of the Akt/mTOR and β -catenin pathways, may result in a potent anti-proliferative effect against human prostate cancer cells (PC-3), although the putative impact of the compounds in other signaling pathways is not ruled out.

In vivo

From the results obtained *in vitro* it can be concluded that inhibitors 4 and 6 are suitable to be studied *in vivo* as potential chemopreventive agents for CRC associated to CU. However, for reasons of availability, inhibitor 6 could not be tested.

Effect of inhibitor 4 on a DSS-induced acute ulcerative colitis model

Inhibitor 4 at the dose of 70 mg/kg showed no toxicity on mice. The inhibitor 4-treated mice showed weight loss, but normal stool consistency and slight or no visible blood in feces, resulting in a lower total DAI score as compared to DSS-group (Table III.13 y Figure III.34). In the eighth day of treatment there was a significant reduction of colon shortening on DSS-treated mice respect to non-DSS and inhibitor 4-treated mice ($6,6 \pm 0,5$ vs $10,0 \pm 0,1$ cm) as it can be seen in Table III.14. Inhibitor 4 alone had no effect on shortening colon. DSS and inhibitor 4-treated mice were protected compared to DSS-treated mice ($8,9 \pm 0,2$ vs $6,6 \pm 0,5$ cm, respectively).

The histological damage was evaluated in colonic hematoxylin and eosin samples of mice that received either fresh tap water, fresh tap water with 3 % DSS, inhibitor 4 (70 mg/kg) or inhibitor 4 (70 mg/kg) and fresh tap water with 3 % DSS. On Figure III.37 it can be seen that both, fresh tap water and inhibitor 4 mice group, show morphologic and typical sane bowel structure. However, in DSS-treated group (DSS) severe epithelial damage with cellular infiltration in the mucosal tissue, changes in the crypts, edema, epithelial erosion and ulceration, has been reported. Significant reductions in both severity and extent of inflammation were observed, as well as a decrease in crypt damage (Figure III.37).

Leukocyte infiltrate in the mucosa was indirectly measured as MPO activity. In Figure III.38, MPO values in colon tissue after inhibitor 4 treatment show a 41% reduction levels compared with DSS group (0.25 ± 0.025 U/mg). Infiltrating immune cells due to the increase of intestinal permeability by DSS administration, gives rise to an increase in proinflammatory cytokines production, such as IL-6.

The analysis of IL-6 levels showed that treatment with inhibitor 4, caused a 80% inhibition of the cited cytokine (Figure III.39). Inhibitor 4 also significantly reduced the expression of COX-2 (42%) and iNOS (55%) in the colon samples (Figure III.40). The reduction of the iNOS expression could be due to the inhibition of the activation of NF- κ B. Indeed, its activation has proven to be a key step in increasing COX-2 and iNOS levels (Abdullah et al, 2013;. Kojima et al., 2004;. Maihofner et al, 2003), so it is no wonder that our product reduces by 63% the activation of NF- κ B and p65 translocation to the nucleus compared to the control (Figure III.40).

Effect on colorectal cancer associated with chronic ulcerative colitis induced by AOM / DSS.

During the 64 days of the experiment no differences in water and food consumption were observed among animals of different groups who survived the first round of DSS. The average daily consumption of DSS was 4,7 ml per mouse providing DSS consumption of 1,8 g per animal after 64 days of treatment. The mice received orally a total of 24 doses of inhibitor 4 solution of 35 mg/kg in an administration volume of 0,2 ml water/dose. Table III.15 shows results based on the number of survived animals.

After the first cycle of DSS (2,5%), a considerable mortality occurred in the groups treated with DSS (40%), AOM/DSS (40%) and AOM/DSS + Inhibitor 4 (33%). Therefore, in following cycles, DSS dose was reduced to 2%. Despite this, inhibitor 4 shows a protective effect on DSS-treated mice with chronic CU, with 83% survival rate. These results suggest that the product may protect animals from the DSS chronic CU, although it would not prevent the effect caused by the combination of AOM/DSS.

While the study of the effect of I in chronic CU and CRC associated with chronic CU, is made simultaneously, the notable difference between them leads to describe their results separately.

First, it has been pointed out the chronic CU effects. As in acute CU, mild diarrhea and rectal bleeding occasionally occurs. Unlike what happened in the acute model, little change in the weight of the animals that surpassed the first cycle of DSS was observed, compared to DSS-treated mice and fresh tap water mice group. Animals receiving I, were protected respect bleeding and stool consistency (Table III.16).

Once mice were sacrificed and their colon extracted, visual inspection at macroscopical level revealed that gut wall was thinned with presence of ulcers, shortening of rectum length was also noted in DSS-treated mice compared to fresh tap water mice group (Table III.17). However, animals treated with Inhibitor 4, showed improvement features on macroscopical colonic analysis (Figure III.42).

The histopathological study of all groups related chronic CU model mice are shown in Figure III.44; where colon image from fresh tap water mice group (Figure III.43.A) shows a normal morphology, without inflammation or ulcers, with normal crypts and cellular infiltration discreet. Nevertheless, after three DSS cycles, changes in colon architecture typically related to inflammatory process can be observed (Figure III.43.B), such as damage to the crypts, edema, cellular infiltration and ulceration of the mucous membrane. On the contrary, samples from inhibitor 4-treated animals showed clinical improvement compared to those treated only with DSS, as shown in Figure III.43C.

Results link to the CRC associated CU prevention are presented below. Survival rates for animals treated with AOM/DSS and AOM/DSS + I are similar (40 and 33%, respectively). However, since chronic CU mice group exhibited good appearance and survival from first round of DSS after AOM administration, it was decided to continue the study until the end. Table III.18 shows data of each group related to survival, intestinal shortening and presence of tumors.

By analyzing intestines length and comparing the results with the fresh tape water mice group, a significant shortening of the colon in the control (AOM/DSS) group is observed, whereas animals treated with I were protected (they exhibited a colon length similar to fresh tape water group).

Regarding tumor appearance, the incidence was 100% in both, control receiving AOM/DSS and treated with inhibitor 4 groups, although inhibitor 4-treated group presented a decreased number of tumors (53%). Therefore, in our assay conditions, the dosage of drug received was not sufficient to prevent the occurrence of colorectal cancer even if the number of tumors and their size were reduced by inhibitor 4 (Figure III.44A).

Taking into account these results, inhibitor 4 is a non toxic and active molecule at the dosage assay. It can be considered as a promising anti-inflammatory agent for acute DSS induced UC and an interesting protector agent in chronic UC. On the other hand, inhibitor 4, in the condition of the assay, was not able to inhibit the development of CRC associated to UC.

DISCUSSION

Nowadays, chemoprevention and treatment of cancer is still a big challenge for researchers worldwide. Different approaches exist to address cancer, due to its complex and multifactorial nature and consequently, research costs are expensive. A key point is the search and development of new active molecules and, at this regard, QSAR methods are a common and economic tool for the identification of new hit and lead compounds. The versatility of QSAR allows the optimization of the ADME-Tox aspects of novel molecules, reducing animal experimentation and the economic burden for the development and marketing of new drugs. Many researchers have applied *in silico* methodologies for the search of new molecules in the field of treatment and cancer chemoprevention. Various signaling pathways, involved in the development of inflammatory and carcinogenic processes (JAK/STAT3, NF- κ B, p38a MAPK, Wnt/ β -catenin, PI3K/Akt/mTOR), are often the main target (Lin et al., 2014; Qian et al., 2009; Grossi et al., 2014; Mook Jr. et al., 2015; Gravina et al, 2015).

The principal objective of this Thesis is to identify new inhibitors of PI3K/Akt/mTOR and Wnt/ β -catenin pathways, since both of them are closely related with inflammation and cancer processes in prostate and colon, being a promising strategy for chemoprevention and treatment of colorectal cancer (Dong et al., 2015). With this purpose, a QSAR methodology based on Molecular Topology (MT) is applied. Substantially, MT has the great advantage to transform a given pharmacological activity into a mathematical-topological pattern (Gálvez y cols., 2012). Following this pattern, new active molecules (hits and leads) can be found. The pattern can be split into subpatterns, each one linked to a particular mechanism of action. This way it is possible to find out new drugs which

may follow a particular mechanism of action, or else, the reciprocal: Infer the mechanism of action from the topological pattern. To date, the role of MT as an effective QSAR method is consolidated.

In the inflammation and cancer area, the results over the last years have demonstrated the efficacy of the method in the identification of new hits and leads (Gálvez-Llompart et al., 2013). MT has also demonstrated its effectiveness in the identification of novel active compounds against UC, such as inhibitors of NF- κ B and IL-6 (Gálvez-Llompart et al., 2011; Gálvez-Llompart et al., 2013). The results of the last years have been recorded in a review that reflects the importance of the method followed in the search for new active drugs in IBD (Garcia-Domenech et al., 2013). It was therefore logical to go further: If the method enabled the identification of new agents against CU, why not exploit this potential to identify novel compounds capable of preventing the development of cancer and inflammation associated with it.

With this purpose, the present Thesis focuses on two key signaling pathways in the development of cancer and inflammatory processes related to UC associated CRC.

Other authors have used topological indices in the field of CRC (Munteanu et al., 2009; Aguiar-Pulido et al., 2012; Martinez-Romero et al., 2010). Moreover, there are records of the use of topological indices to the search for new active drugs in prostate cancer (Sharma et al., 2009). Other methods have been used (molecular docking, pharmacophoric model, 3D-QSAR, etc.), to find new therapeutic agents for colon and prostate cancers (Soon et al. *Cancer*, 2013;. Slynko et al. 2014; Kawkab et al., 2012;. Burnett and Gakh, 2009; Wang et al., 2004) and have been applied to the search of

new inhibitors of the Wnt/ β -catenin signaling pathway (Dong et al., 2015; Li et al., 2013; Kirubakaran and Karthikeyan, 2013) and the PI3K/Akt/mTOR pathway (Zhan et al., 2014; Jia et al., 2013; Ran et al., 2012; Du-Cuny et al., 2009; Forino et al., 2005).

However, the use of topological indices for the identification of novel therapeutic agents for the regulation of the Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways, has been developed for the first time in this Thesis, which resulted in a scientific paper (Zanni et al., 2015). The only work in literature dealing with the use of topological indices to analyze structural requirements of Akt 1 inhibitors, is the one by Ajmani et al., (Ajmani et al., 2010). By the way, in that work the authors do not applied the results to the discovery of any new potential inhibitor.

In general, all the models of the present Thesis are characterized by a high specificity for detecting false positives (compounds misclassified by the model as potential inhibitors of Akt or β -catenin). In other words, the models were highly specific, even at the cost of a lower sensitivity, to ensure as far as possible positive results.

By analyzing the results of the discriminant equations (not for natural products), values that disagree with terms of good predictive quality may be observed in facts, values next to the unit are generally associated with no discrimination, but in this case, it is appropriate to clarify that this parameter is influenced by the very high number of compounds containing the sample. In other words, a high number of compounds in the active/inactive overlap zone may point Wilks lambda's towards 1, despite the reliability of the model (<http://.ats.ucla.edu/stat/sas/notes2/>). This is confirmed by the analysis of the statistical parameter "Mahalanobis

distance" (data not shown), which describes the distance from the centroid (average DF value for compounds of a given class), of each of the compounds analysed in the topological space. In addition, the Mahalanobis distance gives a measure of the distance between the two centroids (active and inactive). This parameter shows how the high number of compounds causes a significant decrease in the distance between the two centroids and an overlap of several compounds for the models with Wilks' lambda values next to the unit (models 2 and 4). Therefore, despite the correct classification of compounds, a sharp spatial division is not appreciated. This fact is evident when analyzing the number of correctly classified compounds for models 2 (Table III.2) and 4 (Table III.4), where percentages of correct classification are 76% and 70%, respectively. Also, this fact is noteworthy when calculating the average of the Mahalanobis distance for model 2 with respect to model 1 (Wilks lambda value of 0.6). As a matter of fact, in model 2 the average value of Mahalanobis distance between the two centroids is 2.3, while for model 1, the value is almost twice: 4.45. Hence in models with a large number of compounds (> 600 approx), overlap is inevitable and there deviations of the Wilks' λ values appear.

Moreover, the use of artificial neural networks (ANN) has allowed achieving two objectives: First, detect possible non-linear relationships and second, be more restrictive in building models able to distinguish Akt or β -catenin inhibitors among antiinflammatory and antineoplastic molecules. The performance in distinguishing compounds belonging to the same pharmacological families, adds value to the search strategy of dualistic Akt and β -catenin inhibitors.

In general, qualitative models were very effective, making correct predictions for the inhibitory activity against the signaling pathways PI3K/Akt/mTOR and Wnt/ β -catenin for five of the six selected compounds, as subsequently confirmed by *in vitro* assays.

Furthermore, the interpretation of results in terms of structure-activity has also been addressed. Although our goal is not explaining in detail every structural feature related to inhibition of the studied pathways, however it has been discussed the type and nature of some outstanding structural characteristics influencing the activity of our novel compounds.

Thus, the presence of 6-5 aromatic condensed rings (indane), seems to be a key factor determining a major inhibitory activity on Akt. This is evident for the compounds selected (1-6), and it is consistent as well with the results of previous studies (Tiqing et al., 2007). For instance, compounds Akt00566 and Akt00576 (Figure IV.1), showed IC_{50} for Akt inhibition of 0.16 and 0.60 nM, respectively. Moreover, compounds with 6-6 condensed rings, such as Akt00241, showed higher IC_{50} values (IC_{50} = 69 nM) (Figure IV.2), whereas compounds with only one aromatic fused ring (pyrrolo pyrimidine), like Akt00723, show much larger values (IC_{50} = 1330 nM).

In conclusion, presence of condensed rings, particularly of type 6-5 (evaluated through nR09 descriptor), is important for Akt inhibition. Indeed, the six selected compounds (Figure III.30) have condensed rings. These rings are highly conjugated (aromaticity) and are attached to other single aromatic rings such as benzene, furan or thiophene. By comparing these data with *in vitro* tests for the Akt/mTOR signaling pathway (Figure III.31), it is pretty clear that compounds having condensed rings are those

showing significant inhibitory activity. In particular, the two molecules having 6-5 members aromatic fused rings are, in most cases, the most potent inhibitors (4 and 6) in both signaling pathways (Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt/mTOR) (Figure III.31 and Figure III.32). Specifically, inhibitor 4 significantly reduces p-Akt and p-mTOR levels at the 48 h, while β -catenin *in vitro* tests show how inhibitors 4 and 6 managed to reduce clearly its expression.

Inhibitor 4 has a dihydro-indolone ring while inhibitor 6 is a thiazol-pyrimidinone derivative (Figure III.30). In this regard, it is significant that the only molecule with no condensed rings (inhibitor 5) (Figure III.30) did not exhibit activity in either assay (Figure III.31), despite having two isolated rings of thiophene. Conversely, inhibitor 2, showing two hexagonal condensed rings, only exhibits significant activity in mTOR and moderate in β -catenin. Interestingly, the two less active compounds against β -catenin (inhibitors 1 and 3), contain three fused rings, namely amino-pyran-chromenone groups, which reinforces the idea that a double 6-5 condensed ring is necessary for optimal activity (Figure III.30). In summary, our results indicate that the presence of fused aromatic rings is a necessary but not sufficient condition for activity.

Moreover, in equations DF_1 to DF_4 appear indices directly or indirectly related to the existence of high conjugation and aromaticity (such as EEig11r, piPC02 or SCBO), which requests an interpretation. Thus, it is interesting the comparison between two molecules that show a similar structure: inhibitors 1 and 6. Both share the common skeleton of 2-amine-4-phenyl-4H-pyrano-chromenone (Figure IV.4), and both share electrophilic groups attached to the benzene ring: inhibitor 1 has a nitrile

and inhibitor 3 a nitro (a strong π acceptor) (Figure IV.5). In addition both have substituents on the same ring that have a mesomeric donor π effect (hydroxyl in inhibitor 1 and methoxy in inhibitor 3). The only difference is that these substituents are on *para* and *ortho* positions on the benzene ring, respectively. This difference determines that the first one displays more inhibitory activity against mTOR (Figure III.30), while the second does to Akt. A similar behavior can be observed for inhibitor 2, which has a benzene ring containing π donating groups such as methoxy and propynyloxi in *meta* and *para* positions, plus a tetrahydrocromenone moiety. As for inhibitor 1, it is significantly active on mTOR (Figure III.30).

In general, the presence of π donors occurs in compounds showing high inhibitory activity: For example, Inhibitor 4 has a bromine atom in position 5 of the dihydroindolonic ring. In summary, the results indicate that for compounds having chromenone-like scaffolds, peak activity occurs when the condensed rings are attached to π acceptors and the benzene ring (if any) are attached to π donors. As shown in Figures III.31 and III.32, the two compounds which show higher activity (inhibitors 4 and 6, Figure III.30) have a pyrrolidinone ring and a halogen (Br) at position 5 of the indole ring, respectively. The bromine induces a mesomeric effect π on the ring. The presence of bromine is already taken into account in the equation DF_2 through the index T (O ... Br) as a key factor for the Akt inhibitory activity. This index indicates that it is not only important the presence of halogen, but also its position with respect to the carbonilic oxygen of the fused ring. In this regard, it is noteworthy that the five active inhibitors tested have a carbonyl group attached to the double ring, suggesting that the nucleophilic character (electron donor) of the carbonyl is also relevant for activity. The fact that the presence of halogens is

adjuvant of activity, is consistent with what already described in the literature, where the presence of halogen is found in some of the more potent NSAIDs (diclofenac, celecoxib, diflunisal, indomethacin) (Hadjipavlou-lithia et al., 2000; Parisini et al., 2011). Observing the group of compounds selected by MT (Figure III.30) and the results obtained *in vitro* in both pathways (Figure III.31 and Figure III.32), stands out compound 4, which is the only one having an halogen (Br) in its structure. Other structural aspects to discuss, which are coherent with the literature (Ajmani et al, 2010), influencing the inhibitory activity against Akt are:

- Presence of hydrogen donors and acceptors. Thus, it appears that the presence of both hydrogen donors and acceptors, such as carbonyl and hydroxyl groups, respectively, is necessary to enhance activity. In fact, all active compounds have at least one donor, excepting inhibitor 6, in which the ester group must be hydrolyzed to thereby generate hydroxyl. Interestingly, for the inhibition of mTOR, the presence of hydrogen donors is essential. In fact, inhibitor 1 with two donor groups (OH and NH₂) is more potent than inhibitor 3, with only one donor group (NH₂). Furthermore, the power of the donor group is also important; thus, inhibitor 4 with a strong donor group (OH), inhibits at greater extent than inhibitor 2 (less potent NH₂) and this, in turn, is more potent than inhibitor 6, without any donor group.
- The number of rotatable bonds is another factor that influences the activity. According to Ajmani S. et al, the greater the number of rotatable bonds the lower the activity. This statement is consistent with the case of inhibitor 5, which contains 7 rotatable bonds and that resulted to be inactive. This same feature can be justified

because the molecules having fused rings are the most active and so it is consistent with the provisions of the Lipinski's "rule of 5", according to which the maximum number of freely rotatable bonds is 5 for optimal activity. However, the most potent compound (inhibitor 4) turned out to have 8 rotatable bonds, demonstrating that the rule may have exceptions.

- The presence of halogens has also been noted as factor of activity. Once again, this is consistent with the fact that the most potent inhibitor is the only one that contains an halogen.
- Likewise, the presence of a carbonyl group directly bonded to aromatic rings favors the activity. The only inactive, inhibitor (5) does not have this characteristic. It is also interesting that in all the active compounds, the separation between the carbonyl groups and π donors (such as NH_2 or Br) is 6 links, what appears to be a relevant factor in the inhibitory activity against Akt.

Another aspect of particular interest is the preponderant role played by our topological charge indices. Thus, a relationship between active compounds against mTOR (inhibitors 1-4 and 6), all containing condensed rings, and the JGI2 index, which evaluates the average charge transferred at two bonds away. In general, the higher the value of JGI2 index the merrier the inhibitory profile against mTOR. This fact can be interpreted as a measure of the conjugation and aromaticity of the compound.

Regarding β -catenin, it is interesting that the three most active compounds (inhibitors 2, 4 and 6) have π -donor groups, such as halogens, primary, secondary and tertiary amines, esters, hydroxyls, or methoxys. They all exert mesomeric effect + M, which favors the inhibitory activity.

Finally, it should be discussed the influence of chirality on the activity of our inhibitors, since all the six selected molecules include one chiral carbon. This is interesting since MT does not distinguish between optical isomers and it is hence likely that one enantiomer is more potent than the other. Therefore, in the future it might be worth to conduct tests on both enantiomers to determine which one (R or S) is more potent as inhibitor of the signaling pathways under study.

After this brief disclosure about the physicochemical aspects with relation to the inhibition of the two signaling pathways involved in inflammatory and cancerous processes, the results obtained *in vitro* are addressed.

In order to respect the principle of the 3Rs, the six compounds selected by MT were tested using two human cell lines: HT-29 (colon cancer) and PC-3 (prostate cancer). Since Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways are involved in abnormal cell proliferation of different cell tumors, such as colon or prostate cancer, the selected products (inhibitors 1-6) have been tested *in vitro* to validate their inhibitor activity.

Among the compounds tested against cell proliferation of HT-29 cells, at a final concentration of 100 μ M, stand out inhibitor 3 and 4. The intensity of the antiproliferative effect is comparable to reference inhibitors of β -catenin (FH535), PI3K (LY294002) and cyclin dependent kinase (AT7519). In fact, compound 4 exceeds FH535 and AT7519. Similar

behavior is observed in prostate cancer cell cultures (PC-3). At the final concentration of 100 μM it was found that all products, except 2 and 5, inhibited cell proliferation. Again, product 4 stands out with an antiproliferative effect higher than the reference drug, bicalutamide (Jing et al., 2015). Cell growth is virtually nullified when the compound is tested at 200 μM , with only 3% cell viability. The biochemical study has revealed an antiproliferative effect associated with the inhibition of PI3K/Akt/mTOR and/or Wnt/ β -catenin signaling pathways.

The effect of compounds on Akt and mTOR expression was measured, at both cytosolic and nuclear level, after 1 and 48 hours from PC-3 cells treatment at a final concentration of 50 μM . One hour after treatment, products 2 and 4 reduced substantially the degree of phosphorylation of p-mTOR (approximately 50%), what is similar to the reference Akt inhibitor labelled "inhibitor IV" (40%). Regarding the phosphorylation of Akt, some compounds inhibited it but not at significant degree. However, inhibition showed by compound 4 (45%) exceeded the one from inhibitor IV (25%). At 48 hours of treatment a significant reduction in Akt phosphorylation by compounds 3, 4 and 6 (with higher values than reference drug) is observed. Regarding p-mTOR, it can be said that all compounds except 5 and 6, significantly reduced PC-3 expression with comparable values to inhibitor IV (approximately 65%), thus highlighting again compound 4, exhibiting a 75% inhibition.

In basal conditions, β -catenin is mainly linked to E-cadherin at cell membrane. The cytosolic remains in an inactive state through its interaction with a large protein complex with several proteins, including GSK-3 β . In this situation β -catenin is mainly phosphorylated by GSK-3 β and tagged for proteasomal degradation. Under these conditions, the target of β -catenin genes are repressed. When the pathway is activated, GSK-3 β is inhibited, leading to stabilization and accumulation of cytoplasmic β -catenin, which at this time enters the nucleus and induces the expression of their target genes, including cyclin D1, which promotes cell cycle progression.

After 4 hours of treatment, only compound 6 showed a discrete inhibitor effect on β -catenin. Similar results were obtained at 48 h for compounds 2, 4 and 6. That is, under the study conditions, the compounds did not significantly reduce β -catenin expression. Although the β -catenin accumulation in the cytoplasm is not affected, compounds 4 and 6 reduced clearly the expression of cyclin D1. Thus, the interaction of β -catenin with the target gene cyclin D1 does not occur and the cell cycle is suspended, so leading to an antiproliferative effect.

In order to determine where the inhibition of β -catenin translocation occurs, PC-3 cells were treated with a GSK-3 β inhibitor, which allows the entry of β -catenin accumulates in the cell nucleus.

When cells were treated, compounds 2, 4 and 6 reduced the levels of β -catenin associated with membrane and cytosolic, which accumulates in a discrete juxtannuclear region and this way its translocation to the nucleus is avoided. Thereby the cyclin D1 gene is activated and consequently it is inhibited the cell proliferation. Analysis of the results shows that *in vitro*

compound 4 is the most active for its antiproliferative effect with a dualistic mechanism of inhibition on both pathways, which makes it an interesting hit with potential application in the treatment and chemoprevention of cancer.

Inflammatory bowel disease (IBD), mainly UC and Crohn's disease, is characterized by chronic inflammation of the gastrointestinal tract where crisis episodes alternate remission. Epidemiological studies have suggested that both diseases are important risk factors for the development of the CRC (Siegel et al., 2014). Chronic colitis causes a favorable environment for the initiation and promotion of tumor growth, progression and metastasis.

CRC incidence depends on the duration, severity and extent of colonic inflammation and treatment of disease and, it's also related to genetic and environmental factors. Approximately 25-40% of patients without prophylactic colectomy develop CRC after 40 years of disease (Grivennikov, 2013). Establish the effectiveness of new treatments in IBD and CRC requires *in vivo* models that reproduce the clinic of colitis and CCR in human. The induction model of CRC by the administration of AOM/DSS is one of the most common for this type of study. Continued exposure to DSS in animals with chronic inflammation causes cellular infiltration, erosion and loss of mucosal crypt, favoring histopathological changes in the intestinal epithelium, but tumor incidence is relatively low and appears only in the 15 -20% of the animals (Clapper et al., 2007). However, when the carcinogen AOM is injected and the mice were exposed to repeated cycles of DSS, the appearance of adenocarcinomas occurs rapidly and in all animals. The AOM behaves as a DNA alkylating

agent, leading to mutations and tumor promotion. The degree of inflammation and dysplasia is similar to that observed in lesions of patients with colon cancer associated to colitis. Therefore, it is an appropriate model to test the effect of chemopreventive agents against the CRC associated to colitis (Grivennikov, 2013). The AOM produces a mutation at codon 33 and the β -catenin, changing its cytoplasmic/nuclear distribution and increasing their presence in the cell nucleus, which is equivalent to the altered distribution of this protein in human CRC.

Some authors have shown that a deregulation of the PI3K/Akt/mTOR pathway is associated with the appearance of tumors in the colon. In fact, increased expression of Akt and Akt phosphorylation is an early sign of colon carcinogenesis, activating oncogenic cascade, promoting cell growth and proliferation and preventing apoptosis. The first step was to study compound 4 in a model of acute intestinal inflammation by the administration of DSS induced for 7 days. This is an excellent preclinical model showing some of the phenotypic characteristics of human CU and has been proven how the standard treatments in humans such as corticosteroids, metronidazole, cyclosporine, etc., are effective in this model (Sann y cols., 2013). The exact mechanism of how the DSS injury occurs in the intestinal epithelium of the colon is not clearly understood, although a toxic action on it has been implicated. DSS induced UC is characterized by increased infiltration of inflammatory cells, release of pro-inflammatory cytokines, increased expression of proinflammatory enzymes such as COX-2 and iNOS and activation of the nuclear transcription factors like NF- κ B and STAT3. These changes cause intestine erosion, bleeding, edema and ulcer, which leads to destruction of the intestinal mucosa (Solomon et al., 2010).

In this study, Balb/c mice received DSS (3% p/v) for 7 days, appearing in DSS-treated group diarrhea, rectal bleeding lighter and light weight loss. Animals treated with compound 4 were protected against inflammation induced by DSS, improving some clinical signs including diarrhea and bleeding (Figure III.34).

The severity of intestinal inflammation was reduced compared to control despite a greater weight loss (Table III.12). However, animals receiving only compound 4 in absence of DSS showed no significant change in body weight compared to mice that received no product and only drinking water. This suggests that our compound 4 is nontoxic, at least in acute dosage.

Macroscopic evaluation and subsequent histological analysis confirmed the beneficial effect of compound 4. One indicator of DSS intestinal inflammation is colon shortening (Table III.14). Treated animals are protected, as they present colon length values very similar to those of healthy animals. This improvement is also histologically corroborated, observing less inflammatory cell infiltration, a reduction in the severity and extent of inflammation and a lower degree of damage in the intestinal mucosa (Figure III.38). These results were confirmed with the determination of MPO activity in the homogenized samples colon. MPO is a member of the superfamily of peroxidases and it is stored in the azurophilic granules of leukocytes, and is involved in the production of oxidizing agents that damage tissue and perpetuate inflammation.

DSS increases leukocyte infiltration which is reduced by the effect of inhibitor 4 (41%). Furthermore, it is known that inflammatory cytokines have a leading role in the pathogenesis of UC. One of them is IL-6, key factor in modulating the inflammatory response so that high blood levels of this cytokine are correlated with some of the parameters of the CU. IL-6 exerts its effects through interaction with the IL-6 soluble receptor (sIL-6R). An increase in IL-6 and its receptor, results in an increased expression and translocation of STAT3 by inhibiting apoptosis of T lymphocytes of *lamina propria*. The accumulation of such cells results in a chronic inflammatory process that can be blocked by antibodies for IL-6 receptor (Sanchez-Munoz et al., 2008). So, it is important to highlight that compound 4 inhibited by 80% the production of IL-6 (Figure III).

In addition, it also significantly inhibits the expression of COX-2 (42%) iNOS (55%) in colon samples (Figure III.41). These inflammatory mediators are largely related to UC development and even deriving in colon cancer, particularly COX-2 (Setia et al, 2014;. Lee et al, 2014;. Kim et al, 2015). The cellular signaling pathway NF-kB is one of the mainly involved in intestinal inflammation. It is a factor which regulates the expression of proinflammatory genes. Generally, NF-kB is at rest in the cytoplasm, in form of a complexed heterodimer composed of two subunits p65/p50 combined in turn with the inhibitory protein IκB. Activation and translocation to the nucleus resulting in the expression of pro-inflammatory cytokines and enzymes such as mentioned above. *Western blot* analysis of samples of colon in animals treated with compound 4 showed a marked reduction in the activation of NF-kB and p65 translocation to the nucleus (63%) compared to control (Figure III. 41).

In summary, the results obtained *in vivo* with compound 4 in this model of acute inflammation, allowed it to be studied in the model of colorectal cancer associated with chronic ulcerative colitis AOM/DSS induced in C57BL/6 mice, described in earlier lines. The purpose of the experiment is the occurrence of colorectal cancer or dysplasia in animals, which is ensured by exposing mice to three repeated cycles of DSS after subcutaneous injection of AOM.

The administration of compound 4 during nine weeks of experiment at a rate of three weekly doses (30 mg/kg) did not reduce mortality compared to control group of AOM/DSS (about 40% casualties after the first cycle of DSS). For those who survived, the number of tumors was reduced by 50% but not the incidence of cancer development. Factors that may have influenced this result are not evident, but it could be think that dose and duration of treatment are key elements adversely influence the final result. Therefore, further studies are needed to demonstrate unequivocally the preventive effect of CRC.

Inhibitor 4 reduced mortality of mice after the first cycle of DSS (Table III.16), while casualties in the control group were remarkable. The oral administration of compound 4 during the 9 weeks of the experiment at three weekly doses, protected the animals from the alterations of the colon induced by DSS. No body weight loss compared to control, but an improved in stool consistency and blood absence is observed, which provides a DAI score much lower than the control and even better than the reference drug 5-ASA (Giner et al., 2013) (Table III.17). This improvement was accompanied by a protection of the shortening of the colon after 64 days of treatment (Table III.18).

Histological examination reveals that compound 4 can minimize damage in the crypts, along with reduction of the level of edema and cellular infiltration and ulceration of the intestinal mucosa (Figure III.44C).

All these data suggests the significant anti-inflammatory effect of compound 4 in acute and chronic CU. Data obtained at the molecular level in acute inflammation and in cancer cells *in vitro* studies suggest that compound 4 can prevent the onset and progression of cancer in the colon lesions, but the first approach has not had the desired success.

Today, it is known that the characteristic inflammatory processes of the CU is closely linked to the development of colorectal cancer by activating, among others, the PI3K/Akt/mTOR and Wnt/ β -catenin pathways, so reducing the inflammation or inhibiting these pathways could get a chemopreventive effect against the onset of cancer. Indeed, a recent publication underscores the importance of eliminating chronic inflammatory processes as they contribute to cancer development by generating an immunosuppressive microenvironment that favors the formation of tumors and cancer progression (Wang D and DuBois RN, 2015). This immunosuppressive environment allows tumor cells to evade the host immune surveillance promoting tumor growth, progression and spread. An example of this is found in the proinflammatory mediators IL-6 and PGE₂, which stimulate tumor initiation process by silencing tumor suppression and/or repair of genes by inducing DNA methylation. Also, the transcription factor NF- κ B activates the Wnt signaling pathway linked to tumor initiation processes (Schwitalla S et al., 2013).

In conclusion, a future study of ADME-tox properties of compound 4 would be necessary to begin the process that may transform this hit into a lead. Though of course, there is yet a long way ahead before compound 4 could move to the clinical trial stage, our results have fully confirmed that MT is a very effective method in finding new hit compounds as chemopreventive agents against cancer.

CONCLUSIONS

1. Eight QSAR models have been developed; those relate the inhibitory activity against the PI3K/Akt/mTOR and Wnt/ β -catenin pathways of various compounds with their topological descriptors. The models obtained showed very good statistical significance and predictive capability.
2. The models were used for a virtual screening of the Specs library, which includes about 280,000 molecules, in order to find new hits and leads with potential inhibitory activity against the PI3K/Akt/mTOR and Wnt/ β -catenin pathways. The result of the *in silico* study allowed the selection of six potentially active compounds, one of them with natural origin, which were subjected to experimental tests for pharmacological validation.
3. Compounds 4 and 6, an indole and thiazole-pyrimidine derivatives respectively, inhibited substantially the growth of two tumor cell lines (HT-29 and PC3). These compounds, such as mathematical models predict, were able to inhibit Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways. They also significantly inhibited the activation of cyclin D1, a protein responsible for cell cycle progression.

4. The availability of product 4 allowed *in vivo* assay in a CCR model associated with UC induced by AOM/DSS. Despite its remarkable anti-inflammatory effect in DSS induced UC, the product failed to stop the onset of colon tumors at the dose used (30 mg/kg), although it decreased the number and size thereof.
5. Based on the topological-mathematical models, experimental results have been discussed in terms of structure-activity relationship, demonstrating that factors such as high conjugation including condensed rings of 6-5 members, presence of hydrogen donors, as well as groups that stabilize by resonance (π electron donors and acceptors), among others, play an important role in the activity.
6. Moreover, the results obtained *in vitro* and *in vivo* allowed refining the predictive models, so that, for example, *in vitro* IC₅₀ values could be predicted more accurately.
7. Finally, this work is a clear example of the effectiveness of joint work of coordinated interdisciplinary teams, (in our case between a research group of pharmacology and another of drug design). The discovery of two new *hits*, such as compounds 4 and 6, not only corroborates Molecular Topology as a powerful tool for identifying Akt and β -catenin inhibitors, but it also enabled the identification of two new *scaffolds* which could be developed as potential *leads* and, hopefully, new drugs for the treatment of CRC associated with UC.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

IX. ARTÍCULOS PUBLICADOS

RESEARCH ARTICLE

Novel Cancer Chemotherapy Hits by Molecular Topology: Dual Akt and Beta-Catenin Inhibitors

Riccardo Zanni^{1,2*}, Maria Galvez-Llompart^{1,3*}, Cecilia Morell^{2‡}, Nieves Rodriguez-Henche^{2‡}, Inés Díaz-Laviada^{2*}, María Carmen Recio-Iglesias^{3‡}, Ramon García-Domenech^{1‡}, Jorge Galvez^{1*}

1 Department of Physical Chemistry, School of Pharmacy, University of Valencia, Valencia, Spain, **2** Department of System Biology, Biochemistry and Molecular Biology Unit, School of Medicine, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain, **3** Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Valencia, Valencia, Spain

* These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* jorge.galvez@uv.es



OPEN ACCESS

Citation: Zanni R, Galvez-Llompart M, Morell C, Rodríguez-Henche N, Díaz-Laviada I, Recio-Iglesias MC, et al. (2015) Novel Cancer Chemotherapy Hits by Molecular Topology: Dual Akt and Beta-Catenin Inhibitors. PLoS ONE 10(4): e0124244. doi:10.1371/journal.pone.0124244

Academic Editor: Yuan-Soon Ho, Taipei Medical University, TAIWAN

Received: December 16, 2014

Accepted: February 27, 2015

Published: April 24, 2015

Copyright: © 2015 Zanni et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: IDL is supported by grants from Spanish Ministerio (grant BFU2012-31444), Comunidad de Madrid (grant S2010/BMD-2308) Junta de Castilla-La Mancha (grant POII-2014-011-P), Fundación Taliana Pérez de Guzmán (grant 2013-001). MCR is supported by Valencia University (Especials Accions Grant UV-INV-AE13-139455). MGL is supported by University of Valencia (Attraction of Talent Grant UV-INV-PDOC11-39853). The funders had no role in

Abstract

Background and Purpose

Colorectal and prostate cancers are two of the most common types and cause of a high rate of deaths worldwide. Therefore, any strategy to stop or at least slacken the development and progression of malignant cells is an important therapeutic choice. The aim of the present work is the identification of novel cancer chemotherapy agents. Nowadays, many different drug discovery approaches are available, but this paper focuses on Molecular Topology, which has already demonstrated its extraordinary efficacy in this field, particularly in the identification of new *hit* and *lead* compounds against cancer. This methodology uses the graph theoretical formalism to numerically characterize molecular structures through the so called topological indices. Once obtained a specific framework, it allows the construction of complex mathematical models that can be used to predict physical, chemical or biological properties of compounds. In addition, Molecular Topology is highly efficient in selecting and designing new *hit* and *lead* drugs. According to the aforementioned, Molecular Topology has been applied here for the construction of specific Akt/mTOR and β -catenin inhibition mathematical models in order to identify and select novel antitumor agents.

Experimental Approach

Based on the results obtained by the selected mathematical models, six novel potential inhibitors of the Akt/mTOR and β -catenin pathways were identified. These compounds were then tested *in vitro* to confirm their biological activity.

study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusion and Implications

Five of the selected compounds, CAS n° 256378-54-8 (Inhibitor n°1), 863203-38-1 (Inhibitor n°2), 247079-73-8 (Inhibitor n°3), 689769-86-6 (Inhibitor n°4) and 431925-096 (Inhibitor n°6) gave positive responses and resulted to be active for Akt/mTOR and/or β -catenin inhibition. This study confirms once again the Molecular Topology's reliability and efficacy to find out novel drugs in the field of cancer.

Introduction

The US-National Institute of Health estimated the direct cost on oncology care to be \$89 billion in 2007 [1]. Surgery, hospitalization, physician visits, imaging, chemotherapy, radiation and biologic therapy are derived costs from oncology care [2]. In 2014, approximately 18% of US gross domestic product has been spent on healthcare and 5% of that keeps being for cancer care [3]. Ten to fifteen percent of total spending on oncology care is linked to cancer drugs [2]. Therefore, developing quality cost-saving strategies for cancer care is an imperative [3].

There are many approaches to fight cancer ranging from chemoprevention (strategy of blocking or slowing the onset of premalignant tumors with relatively nontoxic chemical substances [4]) to chemotherapy, radiotherapy or finally surgical oncology.

Ones of the most common and deadly forms of cancer, colorectal cancer (CRC) and prostate cancer (PtC) were selected as main targets for this study. In order to give an idea of the importance of these forms of cancer, a brief description of their incidence and burden is following.

Worldwide, about 2.1 million people were diagnosed with CRC in 2008, placing it second among the most frequent cancer in women and third in men [5]. Moreover, it is the third most common cause of cancer death worldwide, with more than 600,000 deaths per year [6]. The prevalence of CRC is expected to increase significantly in most developed countries as a result of the growing population belonging to the elderly, since the incidence of CRC increases with age [5].

On the other hand, prostate cancer is the second most common malignancy in men, with more than 900,000 newly diagnosed cancer cases and about 260,000 cancer deaths in 2008 [7]. The incidence of this deadly disease has significantly increased in recent years because of the widespread screening for prostate-specific antigen (PSA), which allows early detection of tumors that otherwise, might remain undetected. In the USA, 90% of patients with prostate cancer who presented localized lesions at the diagnosis, usually have a good prognosis after treatment. However, by 5 years, nearly 30% of treated patients exhibit a rise in PSA levels and evidence of recurrent disease [7].

Considering what has been said up to now, it is not difficult to understand the importance of trying to reduce the incidence and progression of CRC and PtC, so to prevent the inevitable health-spending burden that their treatment and follow-up of patients would imply. Again, the main objective of this work consists in try to discover novel drugs for cancer treatment.

There are many targets involved in CRC and PtC which could be potentially interesting in order to select novel chemotherapeutic compounds. This work focused on two fundamental signaling pathways: PI3K/Akt/mTOR and Wnt/ β -catenin (Fig 1).

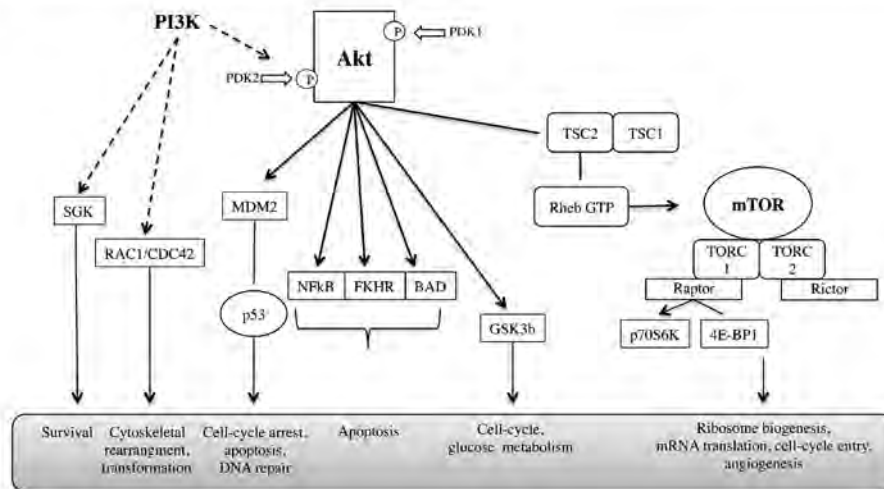


Fig 1. PI3K/Akt/mTOR pathway related to cancer onset and progression [11].

doi:10.1371/journal.pone.0124244.g001

The PI3K/Akt/mTOR Pathway

Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) is a key enzyme in the control of cell growth and proliferation. The most common form of this enzyme is activated by the actions of growth factors receptors. By forming triply phosphorylated inositols attracts Akt which becomes phosphorylated by phosphoinositide-dependent kinase (PDKs). Akt then proceeds to phosphorylate a variety of substrates, including the mammalian target of rapamycin (mTOR) regulating cell proliferation, survival and size.

Several studies have shown changes in Akt activity or expression in human precancerous tissues in precancerous prostatic intraepithelial neoplasia and neoplastic colonic epithelium [8]. Moreover, the PI3K/Akt and mTOR signaling pathways are demonstrated to be hyper-activated signaling pathways in CRC and PTC cancers [8–15]. Therefore, these signaling pathways are potent targets for inducing cancer cell death [12].

The Wnt/β-Catenin Pathway

In the absence of Wnt, β-catenin is associated with the multi-protein β-catenin destruction complex that includes constitutively active glycogen synthase kinase 3 (GSK3). GSK3 phosphorylates β-catenin, triggering its degradation through the ubiquitin-proteasome pathway. The presence of Wnt, induces β-catenin dissociation of the degradation complex and its translocation into the nucleus, where it binds to T-cell factor (TCF) transcription factors regulating the expression of many genes including Cyclin D1 (CycD1).

Deregulation of Wnt/β-catenin signaling is a hallmark of the majority of sporadic forms of colorectal cancer and results in increased stability of the protein β-catenin [16]. There are several reasons for targeting the Wnt/β-catenin pathway in CRC and PTC. Approximately 90% of colorectal cancers (CRCs) has mutations on the Wnt/β-catenin (canonical pathway). Those are

mainly found in the adenomatous polyposis coli (APC) and β -catenin genes and both lead to pathway activation, although other pathway components can also harbor mutations [16]. Accumulation of β -catenin in the nucleus can be detected in > 80% of CRC tumors [16]. Moreover, high levels of nuclear β -catenin have been correlated with a poor prognosis in CRC patients [16].

In PtC, it has been widely demonstrated how androgen receptor (AR) is the major therapeutic target. However, targeting AR alone can result in drug resistance and disease recurrence. Simultaneous targeting of multiple pathways could in principle be an effective approach to treating prostate cancer [17]. Growing evidence indicates that the canonical Wnt/ β -catenin pathway plays an important role in prostate tumor-genesis [18]. Especially because AR binds β -catenin directly to stimulate AR-mediated gene transcription, and importantly, the AR gene itself is a transcriptional target of β -catenin [17]. So, the inhibition of both the AR and β -catenin-signaling pathways that are often unregulated in prostate cancer may represent an effective way for PtC treatment.

Molecular Topology in Cancer

Once it is clear the importance to find new chemotherapy agents against CRC and PtC, the question to be asked is: how could it be done? In the field of Computer Aided Drug Design (CADD) and Quantitative structure-activity relationship (QSAR), the possibilities are many, but the results obtained are seldom satisfactory, especially in the field of cancer. Since, the Drug Design and Molecular Topology Research Unit at the University of Valencia (Spain), has a consolidated background of achievements in cancer drug discovery [19–26], including several patents [27–29], thanks to a computational methodology based on Molecular Topology. In addition to the identification of novel active molecules in PtC [26], our research unit also succeeded in finding new molecules active on the initial stages of colorectal cancer. Moreover, our team has obtained significant results in IBD (inflammatory bowel disease) treatment, by the identification of several compounds inhibiting inflammation mediators like IL-6, NF- κ B and COX-2 [30–34].

The use of QSAR with topological indices as regression variables has proved to be an excellent approach for a fast and accurate prediction of many physicochemical and biological properties [35–37]. Molecular Topology (MT) can be defined as a part of mathematical chemistry consisting of the topological description of molecular structures. Such description deals basically with the connectivity of the atoms forming the molecule that must yield numerical values which are invariant under deformation of the structure. Features such as bond lengths, dihedral angles, energies or any other sort of physical or geometrical magnitudes are not being considered in this scenario. Molecular descriptors are 'numbers that characterize a specific aspect of a molecule' [38]. That is, they are numbers containing information derived from the structural representation of the molecule.

MT's singularity lies in the following reasons:

- a. Molecular structure is described within a mathematical framework [39].
- b. It may find out new drugs, either by screening compound's databases or by designing novel compounds following the reverse process (properties \rightarrow structure).
- c. It can be easily computerized.

The use of MT as a tool for the design and selection of new drugs has been our team's task since the early 1980's [38–42].

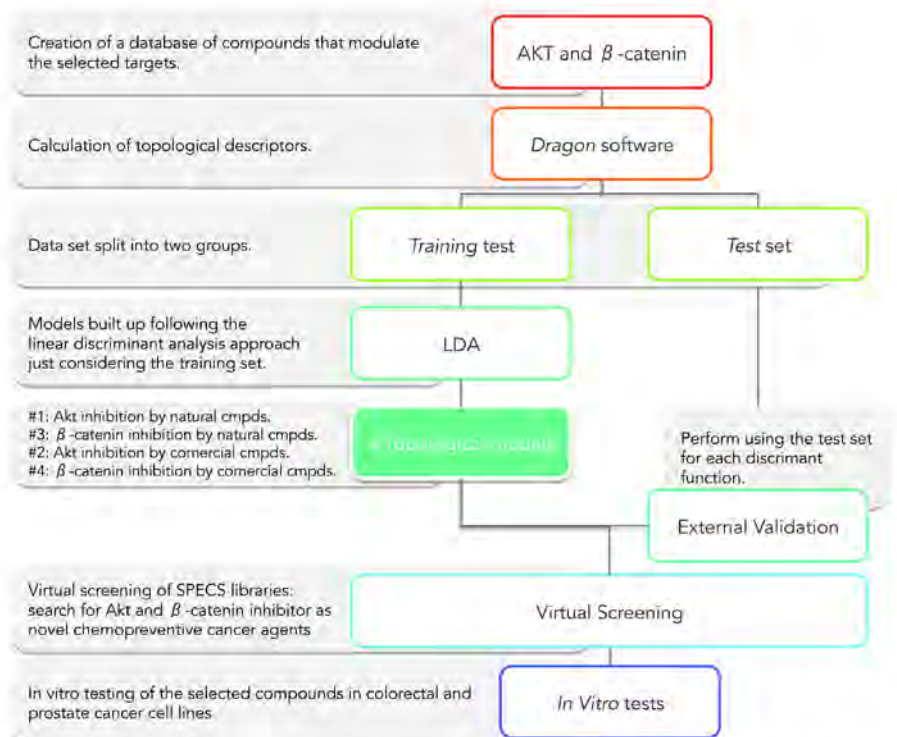


Fig 2. Scheme of Akt and β -catenin inhibitors research through Molecular Topology by virtual screening on SPECS databases.

doi:10.1371/journal.pone.0124244.g002

Materials and Methods

Molecular Topology Model

Obtaining a MT-QSAR model for the identification of novel cancer chemotherapeutic agents consists of the following steps (Fig 2):

- Step I: Creating an in-house database of compounds active on the selected targets (Akt and β -catenin).
- Step II: Calculation of topological descriptors using Dragon software [43].
- Step III: Splitting data set into two groups: *training* and *test set*.
- Step IV: Models were built up following the linear discriminant analysis (LDA) approachment just considering the *training set*. The model' labels were:
 - Model #1: Akt inhibition model for natural compounds.

- Model #2: Akt inhibition model for commercial compounds.
- Model #3: β -catenin inhibition model for natural compounds.
- Model #4: β -catenin inhibition model for commercial compounds.
- Step V: Development of an external model validation using the *test set* for each discriminant function.
- Step VI: Carrying out a virtual screening in SPECS libraries. Search for potential Akt and β -catenin inhibitors as novel chemotherapeutics cancer agents.
- Step VII: *In vitro* testing of the selected compounds in colorectal and prostate cancer cell lines.

Compound analysis

Model #1: Akt inhibition for natural compounds. The QSAR model was developed from a *training set* composed by 155 compounds (32 actives and 123 inactives) with heterogeneous molecular structures. This model was then tested against a set of 39 compounds consisting of 8 natural Akt inhibitors and 31 Akt-inactive compounds.

While we are confident that the active group compounds have been tested and exhibit pharmacological activity against Akt, regarding the inactive group compounds we don't know for sure if they have been tested against such pharmacological activity. However, given that the number of compounds in the inactive set is significantly large, the risk of misclassification is negligible.

All compounds were obtained from different sources [44–80] and from a database named MicroSource Pure Natural Products Collection [81].

Model #2: Akt inhibition for commercial compounds. The QSAR model was developed from a *training set* composed by 647 compounds (20 actives and 627 inactive) with significant structural heterogeneity. External validation of this model was performed with a set of 205 compounds consisting of 6 active on Akt inhibition and 199 inactive.

As mentioned above, whereas we cannot ensure inactivity for all compounds belonging to the inactive set, the risk of false inactive is very low.

All compounds were obtained from Akt Selleckchem database [82], literature [83–97] and MicroSource US Drugs Collection [98].

Model #3: β -catenin inhibition for natural compounds. The QSAR model was developed from a structurally heterogeneous *training set* made of 153 compounds (50 actives and 103 inactives). This model was validated against a set of 27 compounds consisting of 10 natural β -catenin inhibitors and 17 inactive.

All compounds were obtained from literature [99–159] and from a database named MicroSource Pure Natural Products Collection [81].

Model #4: β -catenin inhibition for commercial compounds. Finally, the last QSAR model developed was formed by a *training set* composed by 1047 commercial compounds (93 actives and 954 inactive). External validation of the model was made on a *test set* of 207 compounds consisting of 17 β -catenin inhibitors and 190 inactive compounds.

As in the previous cases, the probability of activity within the inactive set is negligible due to its size.

All compounds were obtained from β -catenin Selleckchem database [143], literature [160–201] and the database MicroSource US Drugs Collection [98].

Molecular descriptors

Topological descriptors codify information about molecular structure in a purely numerical way. This numerical format significantly eases the search of other molecules showing similar properties, thereby making easier the discovery of new drugs.

The 2D structure of each compound was drawn using the ChemDraw Ultra package (version 10.0) [202]. Every compound was characterized by a set of descriptors including constitutional and topological descriptors. Among the last stand the edge adjacency indices, walk and path counts, connectivity indices and topological charge indices [203]. Other graph-theoretical descriptors were also calculated but are not depicted here because their lack of effectiveness. All indices were calculated with Dragon software version 5.4 [43] and their values for every compound included in this study (*training*, *test*, and *virtual screening set*) are shown in the Supplementary Material.

Other complementary models (not shown here) were also applied to find molecules showing drug-like profiles. Among the properties considered in these models stand water solubility, toxicity, oral absorption, etc. (details on these additional models can be disclosed under request). Dragon software version 5.4 and in-house software were used to obtain the models.

Modeling techniques

Linear discriminant analysis (LDA) was used to distinguish between the active and inactive compounds. It is a statistical method to find the best linear combination of variables (TIs in our case) that better distinguish between two or more categories or objects (in our case active or inactive as Akt or β -catenin inhibition). We start from a *training set* of compounds in which everyone is classified either as active or inactive. LDA was then applied to these two groups to get the discriminant function (DF) that better separate the two categories. The software used was Statistica 9.0 [204].

TIs were used as the independent variables and the two groups were balanced so that both (active and inactive) show the same weight, regardless of the number of compounds in each one.

The discriminant capability was assessed as the percentage of correct classifications in each set of compounds. The classification criterion was based on the minimum Mahalanobis distance (distance of each case to the mean of all the cases in a category) [205] and the quality of the discrimination was evaluated using the Wilks' parameter, λ [206], which was obtained by multivariate analysis of variance that tests the equality of group means for the variable in the discriminant model. The shorter the Wilks' parameter value, the smaller the overlap of the active and inactive ($\lambda = 0$ would mean a perfect separation between the groups).

The descriptors' selection was carried out according to the value of the Fisher-Snedecor parameter (F) [207], which establishes the relevance of candidate variables. The descriptors input to compute the linear classification function are chosen in a stepwise-manner: at each step, the variable making the largest contribution to the division of the groups is introduced into the discriminant equation (or the variable that makes the smallest contribution is removed).

The validation of the selected function was done using an external *test set*. Approximately 20% of the data set was randomly selected as *test set* and therefore they were not used to create the model.

Pharmacological activity distribution diagrams

A pharmacological distribution diagram (PDD) is a graphical representation that provides a direct way of visualizing the zones of minimum overlap between active and inactive compounds, as well as the region in which the probability of finding active compounds is maximum [208].

From a different perspective, a PDD is a frequency distribution diagram of dependent variables in which the ordinate represents the expectancy (probability of activity) and the abscissa the DF values in the range. For an arbitrary range of values of a given function, the expectancy of activity can be defined as $Ea = a/(i+1)$, where a is the number of active compounds in the range divided by the total number of active compounds and i is the number of inactive compounds in the interval divided by the total number of inactive compounds. The expectancy of inactivity is defined likewise as $Ei = i/(a+1)$. By means of these diagrams, it is easy to visualize the intervals in which there is a maximum probability to find new active compounds as well as the minimum probability to find inactive compounds.

Topological virtual screening

Once the models are set up, it is possible to carry out a virtual screening in databases to select novel Akt and β -catenin inhibitors. Two commercial SPECS databases were screened, the first was made of some one thousand natural compounds and the second containing about 200 000 drug-like small molecules [209].

This screening led to the identification of 6 compounds showing potential chemotherapeutic activity as Akt and β -catenin inhibitors. Later on, the selected molecules underwent *in vitro* tests to confirm the expected activity.

In Vitro Assays

Reagents and antibodies. Chemicals compounds with CAS n° 256378-54-8 (Inhibitor n°1), 663203-38-1 (Inhibitor n°2), 247079-73-8 (Inhibitor n°3), 689769-86-6 (Inhibitor n°4), 15940-61-1 (Inhibitor n°5) and 431925-096 (Inhibitor n°6) were obtained from Specs (Zoetermeer, The Netherlands) and dissolved in DMSO. LY294002 and AT7519 were supplied by Deltaclon (Madrid, Spain) a Selleckchem supplier. Akt inhibitor IV and FH535 were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Recombinant Human Wnt-3a (R&D Systems, Minneapolis, USA) was reconstituted at 200 μ g/mL in sterile PBS containing 0.1% bovine serum albumin. The polyclonal antibodies against phospho-mTOR, mTOR, phospho-Akt-ser473, Akt and anti-rabbit IgG were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) and anti- β -catenin was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Bergheim, Heidelberg, Germany). Monoclonal antibody against cyclin D1 was from EMD Millipore (Darmstadt, Germany) and anti- β -tubulin and anti-mouse IgG were from Sigma (Madrid, Spain). Anti-rabbit IgG conjugated to Alexa488 was from Invitrogen (Life Technologies, Alcobendas, Spain).

Cell cultures. PC3 cell line derived from human prostate adenocarcinoma was obtained from ATCC (CRL-1435, Rockville, MD, USA) and maintained in RPMI medium containing 10% foetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Cells were used between passages 10 and 20 and seeded at a density of 20,000 cells/cm². Sixteen hours post-seeding, medium was changed to serum free medium and treatments were performed 24 hours later. HT-29 cell line derived from a human colon adenocarcinoma (ATCC, Rockville, MD), was used between passages 15 and 25 and cultured in DMEM glucose concentration 4.5 g/l, supplemented with 20% fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL) and streptomycin sulfate (100 μ g/mL) in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. According to the solubility, the compounds assayed were dissolved in a maximum DMSO concentration of 0.5%.

Cytotoxicity assay. The effect of compounds on cell viability was evaluated with the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay [210]. After 24 h seeding of HT-29 cells, the medium was replaced with fresh DMEM + 0.5% FBS. Two hours later, cells were exposed to compounds at the concentrations (1, 10, or 100 μ M) in a 96-well microplate at 37 °C for 24 h. Same protocol was applied to PC-3 cells but cells were seeded in

12-well plates and maintained 24 hours in a serum-free medium prior the treatments (20, 50, 100, 150 and 200 μ M).

The medium was then removed and 100 μ L per well of a 0.5 mg/mL solution of MTT was added. The resulting solution was incubated at 37 °C until blue deposits were visible and then, this colored metabolite was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Absorbance was measured at 490 nm with a Labsystems Multiskan EX plate reader (Helsinki, Finland). The results were expressed in absolute absorbance readings; a decrease in absorbance indicated a reduction in cell viability. The percentage of cell viability was determined as follows:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Optical density of treated cells}}{\text{Optical density of non-treated cells}} \times 100$$

The experiments were performed a minimum of three times with three replicates per concentration.

Western blot. After 1, 4 or 48 hours of treatments according to the experiments, cells were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 0.8 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 10 μ g/mL soybean trypsin inhibitor, 1 μ g/mL aprotinin, and 5 μ g/mL leupeptin), and cleared by microcentrifugation. Protein concentration was determined by the Bradford method and equivalent protein amounts of each sample were loaded onto SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membrane. Immunoblot analysis was performed followed by enhanced chemoluminescence detection as previously described [211–212].

Confocal microscopy. Cells seeded onto 1.5 mm glass coverslips were treated for 4 hours with 50 μ M of the some of the selected potential chemotherapy agents: Inhibitors n^o1–6. Then cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton X-100 and incubated with β -catenin antibody overnight at 4 °C. The cells were washed and incubated first with secondary antibody conjugated to Alexa488 and then with 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) as a nuclear counterstain. Cells were visualized in a Leica TCS SP5 laser-scanning confocal microscope with LAS-AF imaging software, using a 63X oil objective.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with a one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's t test. The results are presented as the mean \pm SEM. GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used for all calculations. Data related with PC3 cell lines are presented as the mean \pm S.D. of the number of experiments indicated.

Results and Discussion

Topological Models

Model #1: Akt inhibition for natural compounds. The discriminant function (DF_1) includes three variables, as shown below:

$$DF_1 = -2.046970 - 1.007164 * nR09 - 0.000005 * Wap + 2.276221 * EEig11r$$

The parameters accounting for the significance of this equation were:

$$N = 153, F = 28.628, \lambda = 0.6344, p < 0.00002$$

where N is the number of data compounds; F, Fisher-Snedecor parameter; λ , Wilks' lambda; p, statistical significance; nR09, number of 9-membered rings; Wap, all path Wiener index; EEig11r, eigenvalue 11 from edge adj. matrix weighted by resonance integrals.

According to DF_1 , a compound is classified as Akt natural inhibitor if DF_1 takes values from 0 to 4; on the other hand, a compound will be labelled as inactive when DF_1 takes values

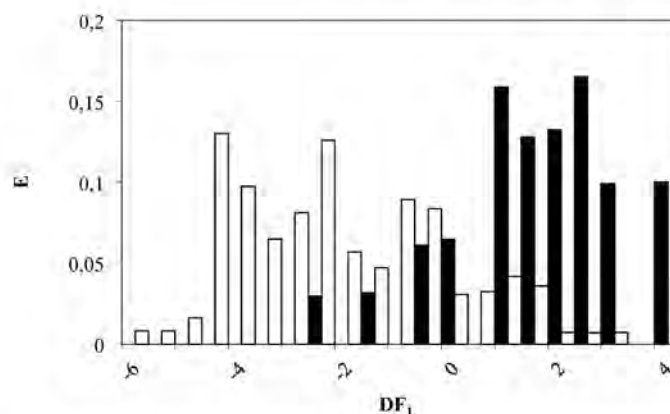


Fig 3. Pharmacological distribution diagram for natural Akt inhibitors obtained using the DF_1 (the black colour represents Akt inhibitors and the white colour, the compounds without Akt inhibition activity).

doi:10.1371/journal.pone.0124244.g003

between -0.5 and -6 (see Fig 3). Finally, molecules scoring $DF_1 > 4$ or $DF_1 < -6$ will be non-classified by this model. By applying this criterion to the *training set* composed by 153 compounds, 26 out of 30 natural Akt inhibitors were correctly classified (81% accuracy) while 101 out of 123 inactive compounds were also matched (82% accuracy), as can be seen in Table 1.

The best way to evaluate the quality of any DF is to apply it to an external validation group (*test set*). In our case, this group was made up of 39 compounds (8 active and 31 inactive as Akt inhibitors) which were not included in the *training set*. *Test set* was randomly selected with a percentage of 20 of all *data set*. The model enabled a correct classification of 63% of active group (5 out of 8 compounds) and 87% of the inactive set (27 out of 31 compounds), as outlined in Table 1.

Furthermore, although the strict DF application leads to the loss of some of the active compounds (37%), the important point is that 87% of the inactive compounds were correctly classified, so that the risk of including "false active" is minimized, which means that our model has a high specificity in discovering new Akt natural inhibitors.

Table 1. Classification matrix obtained through the selected DF_1 for training and test set.

	PERCENT-CORRECT CLASSIFICATION (%)	COMPOUNDS		
		Classified as active	Classified as inactive	Non-classified
TRAINING SET				
Active group	81	26	4	
Inactive group	82	22	101	
TEST SET				
Active group	63	5	3	
Inactive group	87	3	27	1

doi:10.1371/journal.pone.0124244.t001

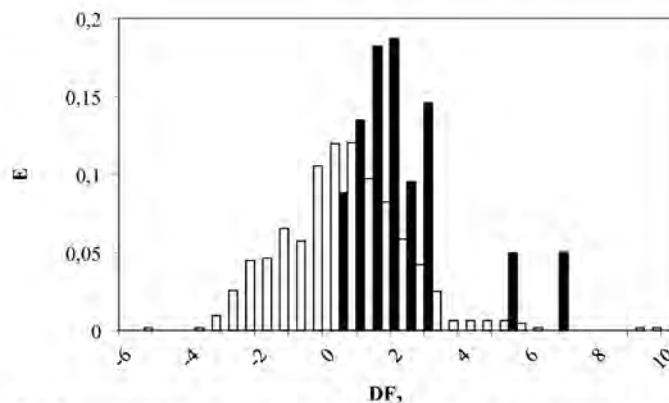


Fig 4. Pharmacological distribution diagram for Akt inhibitors obtained using the DF_2 (the black colour represents Akt inhibitors and the white colour, the compounds without Akt inhibition activity).

doi:10.1371/journal.pone.0124244.g004

Model #2: Akt inhibition for commercial compounds. A new discriminant function (DF_2) was used for Akt inhibition by commercial compounds. This function includes five variables as follows:

$$DF_2 = 13.835 + 0.073 * T(O \dots Br) - 0.002 * SRW08 + 0.137 * MPC04 + 6.256 * piPC02 - 1.712 * piPC05$$

Statistical data and parameters accounting for the significance of this equation were:

$$N = 647, F = 5.950, \lambda = 0.956, p < 0.00002$$

where N is the number of data compounds; F , Fisher-Snedecor parameter; λ , Wilks' lambda; p , statistical significance; $T(O \dots Br)$, topological distance between oxygen and bromide; $SRW08$, self-returning walk count of order 08; $MPC04$, molecular path count of order 04; $piPC02$, molecular multiple path count of order 02; $piPC05$, molecular multiple path count of order 05.

According to DF_2 , a compound is classified as Akt inhibitor if its DF_2 values range from 1.5 to 7.5. On the other hand, a compound will be labeled as inactive if DF_2 stands between 1.5 and -6 (see Fig 4). Finally, molecules scoring $DF_2 > 7.5$ or $DF_2 < -6$ are considered as non-classified by this model. By applying the model criterion to the training set composed by 647 compounds, 16 out of 20 (80%) were correctly classified as Akt inhibitors, while 452 out of 627 inactive compounds were also well classified (72% accuracy), as can be seen in Table 2.

An external validation of DF_2 was performed over 206 compounds (6 active and 200 inactive molecules as Akt inhibitors) not included in the training set. Twenty-percent of all data were used for test set. DF_2 was able to classify correctly 83% of the active group (5 out of 6 compounds) and 81% of inactive (161 out of 200 compounds) as illustrated in Table 2.

Therefore, application of DF_2 leads to discard just 17% of the active compounds and 19% of inactive compounds. In other words, this model has a high specificity and sensitivity.

Model #3: β -catenin inhibition for natural compounds. To select β -catenin natural inhibitors another discriminant function was developed (DF_3). This function includes five

Table 2. Classification matrix obtained through the selected DF_2 for training and test set.

	PERCENT-CORRECT CLASSIFICATION (%)	COMPOUNDS		
		Classified as active	Classified as inactive	Non-classified
TRAINING SET				
Active group	80	16	4	—
Inactive group	72	173	452	2
TEST SET				
Active group	83	5	1	—
Inactive group	81	38	161	1

doi:10.1371/journal.pone.0124244.t002

variables, as shown below:

$$DF_2 = -12.179 - 0.127 * Dz + 1.174 * S2K + 6.219 * PCR + 1.634 * X2sol + 79.748 * JGI4$$

Statistical data and parameters accounting for the significance of this equation were as follows:

$$N = 111, F = 7.656, \lambda = 0.733, p < 0.00002$$

where N is the number of data compounds; F , Fisher-Snedecor parameter; λ , Wilks' lambda; p , statistical significance; Dz , Pogliani index; $S2K$, 2-path Kier alpha-modified shape index; PCR , ratio of multiple path count over path count; $X2sol$, solvation connectivity index chi-2; $JGI4$, mean topological charge index of order 4.

According to DF_2 , a compound is classified as β -catenin natural inhibitor if it takes values between 0 and 5. On the other hand, a compound will be labeled as inactive when DF_2 adopt values from 0 to -5. Finally, molecules scoring $DF_2 > 5$ or $DF_2 < -5$ will be non-classified by this model (see Fig 5). Applying the above criteria to a training set composed by 111 compounds, 31 out of 40 natural β -catenin inhibitors were correctly classified for the model (78% correctly classified) while 52 out of 71 inactive compounds were also well classified (73% accuracy), as can be seen in Table 3.

The validation of the DF was performed on an external group (test set). The group was made up of 41 compounds (24 active and 17 inactive as β -catenin inhibitors) not previously included in the training set. The test set was randomly selected as 20% of all data set. In this case, the model was able to correctly classify 67% of active group (16 out of 24 compounds) and 88% of the inactive one (15 out of 17 compounds) as can be seen in Table 3.

As in previous cases, the strict DF application results in the loss of 33% of the active compounds but 88% of the inactive natural compounds were correctly classified, thereby minimizing the risk of including "false active" compounds. That confirms our model's high specificity to predict β -catenin natural inhibitors.

Model #4: β -catenin inhibition by commercial compounds. A discriminant function modeling β -catenin inhibition by commercial molecules was finally calculated (DF_4). This equation includes four variables, as shown below:

$$DF_4 = -0.381 + 0.254 * SCBO - 0.292 * nN - 0.075 * ZM1 + 1.159 * GGI4$$

Statistical data and parameters accounting for the significance of this equation were as follows:

$$N = 837, F = 15.498, \lambda = 0.931, p < 0.00002$$

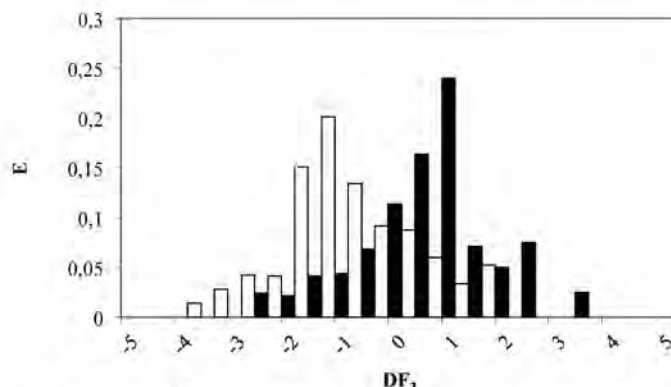


Fig 5. Pharmacological distribution diagram for natural β -catenin inhibitors obtained using the DF_3 (the black color represents natural β -catenin inhibitors and the white color, the compounds without β -catenin inhibition activity).

doi:10.1371/journal.pone.0124244.g005

where N is the number of data compounds; F , Fisher–Snedecor parameter; λ , Wilks’ lambda; p , statistical significance; SCBO, sum of conventional bond orders (H-depleted); nN , number of Nitrogen atoms; ZM1, First Zagreb index M1; GG14, topological charge index of order 4.

A compound is classified as β -catenin inhibitor if DF_3 takes values from 0 to 4.5, whereas a compound will be labeled as inactive if DF_3 adopt values between 0 and -4. Finally, molecules scoring $DF_3 > 4.5$ or $DF_3 < -4$ will be non-classified (see Fig 6). For the entire set of 840 compounds, 48 out of 73 β -catenin inhibitors (66%) were correctly classified by the model, whilst 570 out of 764 inactive compounds were also well classified (75% accuracy), as illustrated in Table 3.

In this case, the external validation set included 206 compounds (16 active and 190 inactive). Test set was a random selection of 20% of all data set. The model was able to correctly classify 88% of the active group (14 out of 16 compounds) and 74% of the inactive one (141 out of 190 compounds) as shown in Table 4.

According to this results, we can conclude that this model presents a higher sensitivity (88%) but a less satisfactory specificity since only 74% of the inactive compounds were

Table 3. Classification matrix obtained through the selected DF_3 for training and test set.

	PERCENT-CORRECT CLASSIFICATION (%)	COMPOUNDS		
		Classified as active	Classified as inactive	Non-classified
TRAINING SET				
Active group	78	31	9	—
Inactive group	73	19	52	—
TEST SET				
Active group	67	16	6	2
Inactive group	88	2	15	—

doi:10.1371/journal.pone.0124244.t003

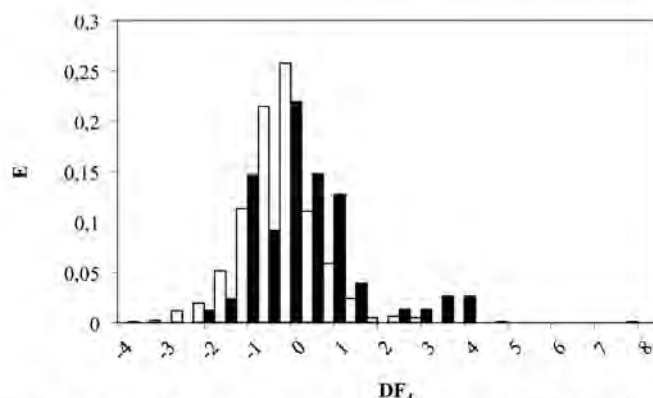


Fig 6. Pharmacological distribution diagram for β -catenin inhibitors obtained using the DF_4 (the black color represents β -catenin inhibitors and the white color, the compounds without β -catenin inhibition activity).

doi:10.1371/journal.pone.0124244.g006

recorded, missing the remaining 26%. This could lead to select "false active" compounds, but it can be avoided by applying the four models stepwise.

Topological virtual screening

Based on the four discriminant models described (DF_{1-4}), a *virtual screening* was carried out on two commercial chemical libraries from SPECS. Table 5 shows the compounds selected (natural and synthetic). DF_1 and DF_3 were applied only to the natural compounds.

In vitro assays

Cytotoxicity assay: HT-29 and PC3 cell line. HT-29 cells were exposed to the selected Akt and β -catenin potential inhibitors selected by the DF_{1-4} models, in order to determine cell viability. As shown in Table 6, several among the selected compounds were better or similar to the reference β -catenin inhibitor (FH535), Akt inhibitor (LY 294002) and multi-CDK inhibitor (AT7519). For instance, Inhibitor n°4 at 100 μ M is able to kill 48% of HT-29 cells. This

Table 4. Classification matrix obtained through the selected DF_4 for training and test set.

	PERCENT-CORRECT CLASSIFICATION (%)	COMPOUNDS		
		Classified as active	Classified as inactive	Non-classified
TRAINING SET				
Active group	66	48	25	
Inactive group	75	192	570	2
TEST SET				
Active group	88	14	2	
Inactive group	74	49	141	

doi:10.1371/journal.pone.0124244.t004

Table 5. Values of DF and probability of activity as Akt and β -catenin inhibitors of the selected anti-cancer agents after carried on a virtual screening of SPECS natural and screening compounds databases.

COMPOUNDS	CAS registry n°	Akt natural inh model		Akt inh. model		β -catenin natural inh. model		β -catenin inh. model	
		DF ₁	P. (Activ.)	DF ₂	P. (Activ.)	DF ₃	P. (Activ.)	DF ₄	P. (Activ.)
Inhibitor n°1*	256378-54-8	1.68	0.843	1.67	0.699	1.75	0.851	1.55	0.82
Inhibitor n°2	663203-38-1			3.97	0.67			1.31	0.781
Inhibitor n°3	247079-73-8			2.52	0.769			1.24	0.769
Inhibitor n°4	689769-86-6			3.02	0.921			0.36	0.582
Inhibitor n°5	15940-61-1			2.24	0.62			0.77	0.679
Inhibitor n°6	431925-09-6			4.28	0.914			0.19	0.539

DF: discriminant function; P.(Activ.): probability of being classified as active by the model.

*Natural compound.

doi:10.1371/journal.pone.0124244.t005

compared with FH535, LY294002 and AT7519 at 100 μ M inhibition rates represent 38%, 51% and 36%, respectively. It's quite a promising result in colorectal cancer cells inhibition.

It was investigated whether the selected cancer chemotherapeutics agents had any effect on the proliferation of human prostate cancer cells. PC-3 cells were treated with different doses of the Inhibitors n°1-6 for 48 h and cell viability was monitored by MTT. Results show that Inhibitor n°4 totally blocked the viability of prostate cancer cells (Table 7). Inhibitors n°1 and n°6 also decreased cell viability although in a lesser extent; Inhibitor n°3 exerted a slight decrease whereas compounds Inhibitor n°2 and n°5 didn't have any effect (Table 7).

Akt inhibition. Akt activation involves the phosphorylation of two residues: threonine 308 (Thr308) in the activation loop and serine 473 (Ser473) in the C-terminal hydrophobic motif. The phosphorylation of both of these regulatory sites leads to complete activation of the enzyme. To evaluate the inhibitory ability of the selected compounds against Akt we measured the phosphorylation of the enzyme in serine 347. As shown in Fig 7, Inhibitor n°4 at 1 hour of treatment, induced a decrease in Akt phosphorylation at Ser473. This effect may be compared with the well-known Akt inhibitor IV, a cell-permeable and reversible benzimidazole compound that inhibits Akt phosphorylation/activation. When cells were incubated with the compounds for 48 hours, this effect was even greater and was also observed for Inhibitors n°3 and n°6 (Fig 7).

To assess the impact of the compounds on downstream molecules of the Akt signaling pathway, we used Western blot analysis to observe phosphorylation status and total protein expression of the mammalian target of rapamycin (mTOR), a key effector downstream of Akt. As observed in Fig 7, all the agents tested except Inhibitor n°5, decreased mTOR phosphorylation, being the Inhibitors n°2, n°4 and n°6 the most effective at 1 hour and Inhibitors n°1, n°2 and n°4 at 48 hours.

These results indicate that all the compounds selected, except Inhibitor n°5, were able to inhibit Akt signaling pathway although with different efficacy.

β -Catenin inhibition. To investigate whether the compounds also inhibited β -catenin pathway we measured β -catenin levels as well as its downstream well-characterized target gene cyclin D1.

In the basal situation, much of the cellular β -catenin is bound to E-cadherin on the cell membrane. Cytosolic β -catenin maintained in an inactive state through its interaction with a large protein complex with several proteins including the GSK-3 β . In this situation β -catenin is phosphorylated mainly by GSK-3 β and labelled for polyubiquitination and degradation into

Table 6. Effect of selected anti-cancer agents on the HT-29 cell viability.

Group	Concentration (μM)	A \pm SEM	Cell viability (%)
Blank	0	0.88 \pm 0.02	-
Vehicule (DMSO)	1	0.86 \pm 0.01	97
	10	0.86 \pm 0.07	98
	100	0.80 \pm 0.10	91
Inhibitor N°1	1	0.84 \pm 0.10	95
	10	0.77 \pm 0.07	87
	100	0.86 \pm 0.06	98
Inhibitor N°2	1	0.87 \pm 0.13	99
	10	0.79 \pm 0.11	89
	100	0.82 \pm 0.11	93
Inhibitor N°3	1	0.84 \pm 0.10	95
	10	0.78 \pm 0.05	88
	100	0.63 \pm 0.08	72
Inhibitor N°4	1	0.77 \pm 0.05	87
	10	0.75 \pm 0.08	85
	100	0.46 \pm 0.06*	52**
Inhibitor N°5	1	0.85 \pm 0.12	96
	10	0.78 \pm 0.09	89
	100	0.71 \pm 0.07	80
FH535	1	0.80 \pm 0.02	91
	10	0.72 \pm 0.06	81
	100	0.55 \pm 0.08*	62*
LY294002	1	0.90 \pm 0.03	102
	10	0.71 \pm 0.04	81
	100	0.43 \pm 0.05***	49***
AT7519	1	0.59 \pm 0.05	67
	10	0.59 \pm 0.02	67
	100	0.56 \pm 0.01	64

Values were expressed in function of the blank (untreated cells) and represent mean absorbance \pm SEM, and are representative of at least three independent experiments per group. Differentiation with the blank group (untreated cells) were determined by mean of a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparisons test Dunnett's t test.

No significant difference with the blank group ($P > 0.05$);

*Significant difference with the blank group (P values from 0.01 to 0.05);

**Very significant (P values from 0.001 to 0.01);

***Extremely significant (P values from 0.0001 to 0.001) $n = 3$; Dunnett's t test).

doi:10.1371/journal.pone.0124244.t006

proteasome. Under these conditions, β -catenin targeted genes are repressed. When the pathway is activated, GSK-3 β is inhibited leading to the stabilization and accumulation of cytoplasmic β -catenin, which then enters the nucleus, and induces the expression of its target genes. One of the better characterized β -catenin-regulated gene is Cyclin D1 which promote cell cycle progression. To test the effect of selected compounds on the β -catenin pathway levels of β -catenin and Cyclin D1 were determined by Western blot. Fig 8 shows that the Inhibitors n°4 and n°6 were the most efficacious in inhibiting the expression of Cyclin D1, although Inhibitors n°1, n°2 and n°3 also exhibited a weak repression.

Table 7. Effect of selected anti-cancer agents on the PC-3 cell viability.

Group	Concentration (μM)	A ± SEM	Cell viability (%)
Blank	0	0.4 ± 0.02	
Vehicule (DMSO)	10	0.4 ± 0.03	100
Inhibitor N°1	50	0.35 ± 0.04	88
	100	0.24 ± 0.03	61**
	200	0.16 ± 0.03	42***
Inhibitor N°2	50	0.37 ± 0.02	101
	100	0.37 ± 0.02	101
	200	0.34 ± 0.02	92
Inhibitor N°3	50	0.32 ± 0.02	83**
	100	0.32 ± 0.03	83*
	200	0.28 ± 0.02	72**
Inhibitor N°4	50	0.22 ± 0.01	60***
	100	0.16 ± 0.01	44**
	200	0.01 ± 0.001	3***
Inhibitor N°5	50	0.34 ± 0.001	101
	100	0.36 ± 0.001	106
	200	0.36 ± 0.005	107
Inhibitor N°6	50	0.34 ± 0.06	88
	100	0.32 ± 0.05	83*
	200	0.27 ± 0.06	69*

Values were expressed in function of the vehicle-treated cells and represent mean absorbance ± SD, and are representative of at least two experiments performed in duplicate. Differentiation with the blank group (untreated cells) were determined by mean of a Student's T test. No significant difference with the blank group (P>0.05)

*Significant difference with the blank group (P values from 0.01 to 0.05)

**Very significant (P values from 0.001 to 0.01)

***Extremely significant (P values from 0.0001 to 0.001) n = 4)

doi:10.1371/journal.pone.0124244.t007

To further investigate the inhibitor role of the selected compounds, PC-3 cells were stimulated with the well-established β-catenin/Cyclin D1 pathway activator Wnt3a (Wnt). When cells were stimulated with Wnt, β-catenin was recruited by membrane adherens junctions and accumulated in the nucleus (Fig 9). When cells were pre-treated with the selected compounds β-catenin redistribution was inhibited. This effect was well appreciated in Inhibitors n°2, n°4 and n°6 (Fig 9). Moreover, levels of β-catenin in Inhibitor n°6-treated cells almost disappeared (Fig 9).

As seen in the Figs 8 and 9, the selected cancer chemotherapeutic agents were able to impact both the subcellular redistribution and the activity of β-catenin as they were able to inhibit its nuclear-cytoplasmic shuttling and its recruitment at plasma membrane as well as the expression of its target gene CyclinD1. The Inhibitors n°2, n°4 and n°6 were the most effective.

Notably, the compounds that inhibited both Akt and β-catenin had the greatest impact on cell viability supporting the idea that dual inhibitor of the Akt/mTOR pathway and β-catenin may result in a potent anti-proliferative effect against human prostate cancer PC-3 cells, although the putative impact of the compounds in other signaling pathways is not ruled out.

Therefore, after applying several models developed by Molecular Topology approach, six compounds has been selected as potential cancer chemotherapeutic agents. After *in vitro* study whether they inhibit Akt, mTOR, β-catenin and/or Cyclin D1 at different times of incubation; we can affirm that five out of these six compounds (see Fig 10) inhibit at least one of the studied

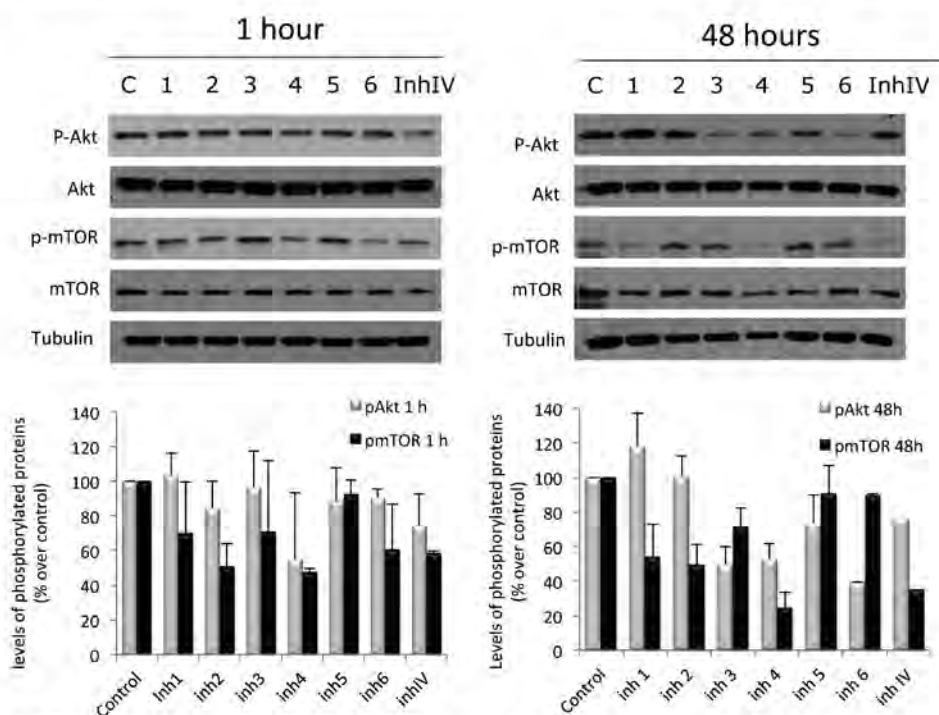


Fig 7. Effect of selected anti-cancer agents on Akt/mTOR signaling pathway. PC-3 cells were treated with vehicle (C) or 50 μ M of the selected compounds and proteins were detected by Western blot. Upper panel, a representative image of three different experiments. Lower panel, densitometric values represented as the mean \pm S.D. of the three experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0124244.g007

targets. We can also state that these five compounds affect PC3 cell viability with different potency. And, we can remark also that Inhibitor n°4 also reduce cell viability on HT-29 cell line.

Finally, we can confirm that this five selected compounds could be used as cancer agents interacting with Akt/mTOR and Wnt/ β -catenin pathways in colorectal and prostate human cancer cell lines.

Although it is evident that complex properties, such as inhibition of Akt or β -catenin, cannot be discussed in such simple "structural" terms, thanks to the QSAR study results, some interesting consequences can be pointed out.

Thus, in equations DF_1 to DF_6 , there are indices more or less explicitly related to the existence of high conjugation (as for instance EEig11r, piPC02 or SCBO). Other descriptors, such as nR09, evaluate the presence of condensed rings. It is noteworthy that most selected compounds show condensed ring with large conjugation due to aromatic rings such as benzene, furan or thiophene. In this regard, it is significant that the only molecule not showing condensed rings (Inhibitor n°5) is inactive despite having two highly aromatic thiophene rings.

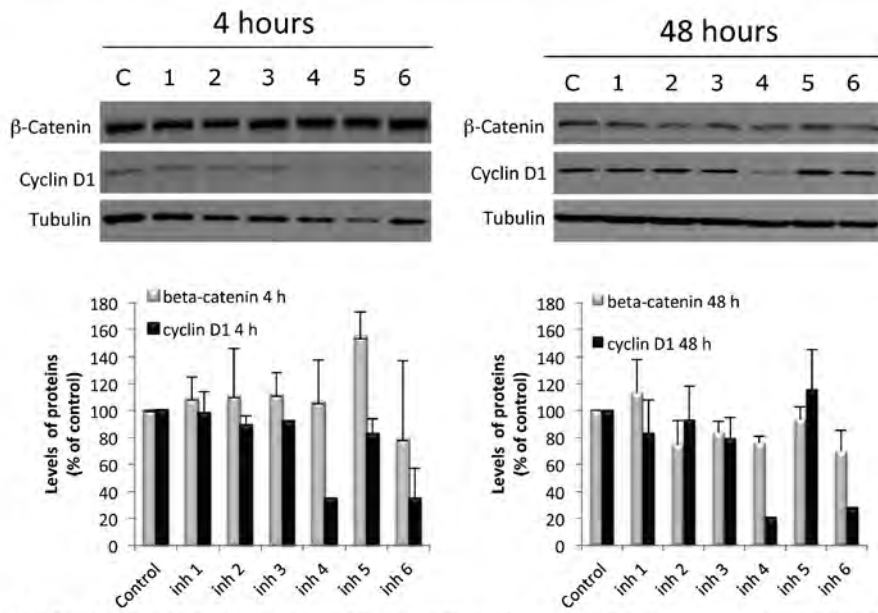


Fig 8. Effect of selected anti-cancer agents on β -Catenin/CyclinD1 signaling pathway. PC-3 cells were treated with vehicle (C) or 50 μ M of the selected compounds and proteins were detected by Western blot. Upper panel, a representative image of three different experiments. Lower panel, densitometric values represented as the mean \pm S.D. of the three experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0124244.g008

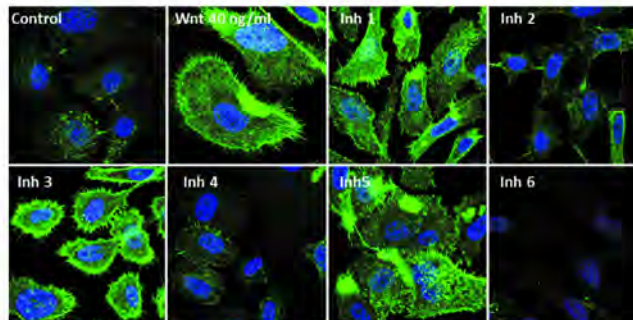


Fig 9. Effect of selected anti-cancer agents on β -catenin cellular distribution in PC-3 cells. PC-3 cells were seeded on glass coverslips and pre-treated for 30 min with 50 μ M of the inhibitors and then co-treated with 40 ng/ml Wnt3 (Wnt) for 4 h. Cells were stained with polyclonal antibody anti-beta-catenin followed by Alexa-Fluor488-conjugated anti rabbit IgG as described in methods. Confocal image shown is representative of two experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0124244.g009

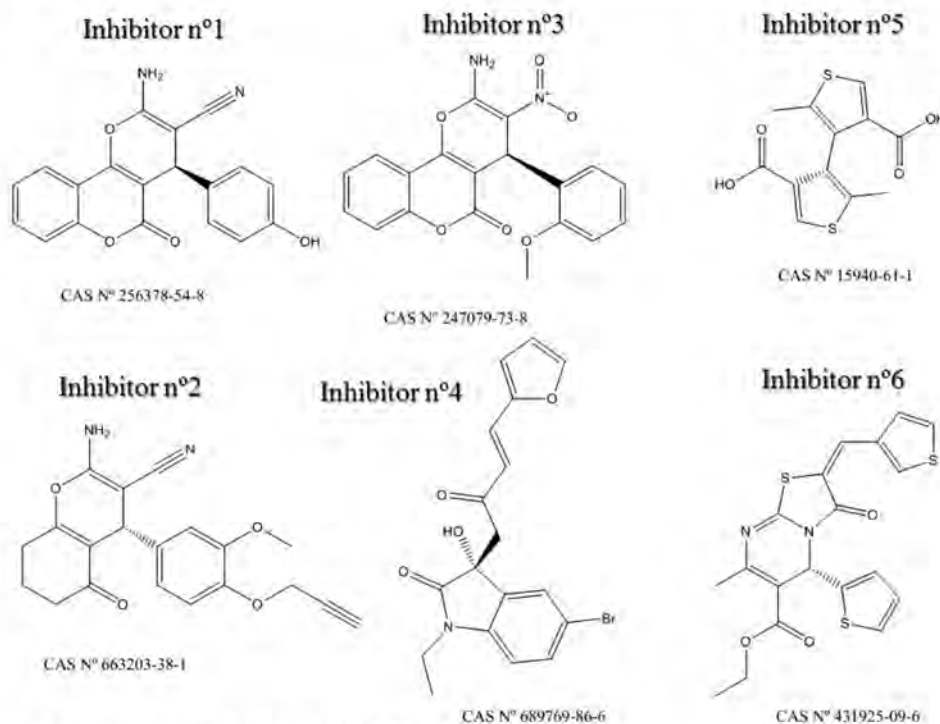


Fig 10. Cancer chemotherapeutic agents selected by Molecular Topology.

doi:10.1371/journal.pone.0124244.g010

Furthermore, the two molecules having six-five member condensed rings are by far the most potent ones. Indeed Inhibitor n°4 exhibits the dihydro-indolone moiety and Inhibitor n°6 the thiazolopyrimidinone ring. The next in the ranking of potency is Inhibitor n°2, which has two condensed six-member rings. Interestingly, the two less active compounds (Inhibitors n°1 and n°3) contain three condensed rings, namely the amino-pyrano-chromenone moiety, what points toward a maximum of two condensed rings for optimal activity.

It is also interesting to note that all selected molecules include one chiral carbon, which suggests that the activity of the enantiomers might not be as significant as predicted by the topological models, since these models do not take into account the chirality.

Conclusions

Molecular Topology has been used to select novel potential anti-cancer compounds with prevention or therapeutic activity. The *in vitro* evaluation of the selected compounds, CAS n° 256378-54-8 (Inhibitor n°1), 663203-38-1 (Inhibitor n°2), 247079-73-8 (Inhibitor n°3), 689769-86-6 (Inhibitor n°4), 15940-61-1 (Inhibitor n°5) and 431925-096 (Inhibitor n°6),

demonstrated significant activity as Akt and β -catenin inhibitors for all compounds except for Inhibitor n⁵. However, particularly Inhibitors n⁴ and n⁶, can be considered as novel chemotherapy *hits* by dually inhibit Akt and β -catenin. Moreover, they also have demonstrated activity over prostate cancer cell line (Inhibitors n⁴ and n⁶) and on a human colorectal cancer cell line (Inhibitor n⁴).

Topological Virtual Screening upon four discriminant models (DF₁₋₄) resulted in an overall accuracy of five out of six compounds which showed the predicted activity. Accordingly, it can be concluded that Molecular Topology is a reliable and useful tool in the search and discovery of novel chemotherapeutic agents acting on Akt and beta-catenin pathways. The presented exhaustive performance opens new horizons for MT as a time-cost effective resource. Finally, it must be point out that the next step could be perform rational drug design based on the structures and then, carry on *in vivo* test to confirm their effectiveness as potential cancer chemotherapeutic agents.

Supporting Information

S1 Table. Compounds used in the training set and corresponding values of the DF₁ to Akt natural inhibitors.

(DOCX)

S2 Table. Compounds used in the test set and corresponding values of the DF₁ to Akt natural inhibitors.

(DOCX)

S3 Table. Compounds used in the training set and corresponding values of the DF₂ to Akt inhibitors.

(DOCX)

S4 Table. Compounds used in the test set and corresponding values of the DF₂ to Akt inhibitors.

(DOCX)

S5 Table. Compounds used in the training set and corresponding values of the DF₃ to β -catenin natural inhibitors.

(DOCX)

S6 Table. Compounds used in the test set and corresponding values of the DF₃ to β -catenin natural inhibitors.

(DOCX)

S7 Table. Compounds used in the training set and corresponding values of the DF₄ to β -catenin inhibitors.

(DOCX)

S8 Table. Compounds used in the test set and corresponding values of the DF₄ to β -catenin inhibitors.

(DOCX)

S9 Table. Selected compounds as potential anti-cancer agents by the virtual screening of SPECS databases by applying DF₁₋₄.

(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RZ MGL MCR RGD JG. Performed the experiments: RZ MGL CM NRH IDL MCR. Analyzed the data: RZ MGL CM NRH IDL RGD JG. Wrote the paper: RZ MGL IDL JG.

References

- Meropol NJ, Schrag D, Smith TJ, Mulvey TM, Langdon RM Jr, Blum D, et al. American Society of Clinical Oncology guidance statement: the cost of cancer care. *J Clin Oncol* 2009; 27(23):3868–3874. doi: [10.1200/JCO.2009.25.1183](https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.1183) PMID: [19581533](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19581533/)
- Eagle D. The cost of cancer care: part I. *Oncology-NY* 2012; 26(10):818. PMID: [23176000](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23176000/)
- Scalo JF, Rascati KL. Trends and issues in oncology costs. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2014; 14(1):35–44. doi: [10.1586/14737167.2014.864561](https://doi.org/10.1586/14737167.2014.864561) PMID: [24328809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24328809/)
- Syrh Y. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(10):768–780. PMID: [14570043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14570043/)
- Yabroff KR, Borowski L, Lipscomb J. Economic studies in colorectal cancer: challenges in measuring and comparing costs. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2013; 2013(46):62–78. doi: [10.1093/jncimonographs/igt001](https://doi.org/10.1093/jncimonographs/igt001) PMID: [23962510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23962510/)
- Haug U, Engel S, Verheyen F, Linder R. Estimating Colorectal Cancer Treatment Costs: A Pragmatic Approach Exemplified by Health Insurance Data from Germany. *PLoS one* 2014; 9(2): e88407. doi: [10.1371/journal.pone.0088407](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088407) PMID: [24586324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24586324/)
- Edlind MP, Hsieh AC. PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian J Androl* 2014; 16(3):378–386. doi: [10.4103/1008-682X.122876](https://doi.org/10.4103/1008-682X.122876) PMID: [24759575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24759575/)
- Crowell JA, Steele VE, Fay JR. Targeting the AKT protein kinase for cancer chemoprevention. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(8):2139–2148. PMID: [1769713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1769713/)
- Seo BR, Min K, Cho JJ, Kim SC, Kwon TK. Curcumin Significantly Enhances Dual PI3K/Akt and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235-Induced Apoptosis in Human Renal Carcinoma Caki Cells through Down-Regulation of p53-Dependent Bcl-2 Expression and Inhibition of Mcl-1 Protein Stability. *PLoS one* 2014; 9(4):e95588. doi: [10.1371/journal.pone.0095588](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095588) PMID: [24743574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24743574/)
- Wang H, Duan L, Zou Z, Li H, Yuan S, Chen X, et al. Activation of the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K Pathway is Involved in S100A4-induced Viability and Migration in Colorectal Cancer Cells. *Int J Med Sci* 2014; 11(8):841. doi: [10.7150/ijms.8128](https://doi.org/10.7150/ijms.8128) PMID: [24936148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24936148/)
- Johnson SM, Gulhati P, Rampy BA, Han Y, Rychahou PG, Doan HQ, et al. Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *J Am Coll Surg* 2010; 210(5):767–776. doi: [10.1016/j.jamcollsurg.2009.12.008](https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2009.12.008) PMID: [20421047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20421047/)
- Baba Y, Noshio K, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, Chan AT, et al. Phosphorylated AKT expression is associated with PIK3CA mutation, low stage, and favorable outcome in 717 colorectal cancers. *Cancer* 2011; 117(7):1399–1408. doi: [10.1002/encr.25630](https://doi.org/10.1002/encr.25630) PMID: [21425139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21425139/)
- Xu Q, Wang L, Zhong M. Clinical significance of mTOR and p-mTOR protein expression in human colorectal carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12:2581–2584. PMID: [22320959](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22320959/)
- Nozawa H, Watanabe T, Nagawa H. Phosphorylation of ribosomal p70 S6 kinase and rapamycin sensitivity in human colorectal cancer. *Cancer Lett* 2007; 251(1):105–113. PMID: [17175097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17175097/)
- Gao N, Zhang Z, Jiang B, Shi X. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310(4):1124–1132. PMID: [14559232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14559232/)
- Yang Y, Yang J, Tao H, Jin W. New perspectives on β -catenin control of cell fate and proliferation in colon cancer. *Food Chem Toxicol* 2014; 74:14–19. doi: [10.1016/j.fct.2014.08.013](https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.08.013) PMID: [25193282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25193282/)
- Lee E, Madar A, David G, Garabedian MJ, Dasgupta R, Logan SK. Inhibition of androgen receptor and beta-catenin activity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(39):15710–15715. doi: [10.1073/pnas.1218168110](https://doi.org/10.1073/pnas.1218168110) PMID: [24019458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24019458/)
- Yardy G, Brewster S. Wnt signalling and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2005; 8(2):119–126. PMID: [15809669](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15809669/)
- Gálvez J, Gómez-Lechón M, García-Domenech R, Castell J. New cytostatic agents obtained by molecular topology. *Bioorg Med Chem Lett* 1996; 6(19):2301–2306.
- Gálvez J, García-Domenech R, Gómez-Lechón M, Castell J. Use of molecular topology in the selection of new cytostatic drugs. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 2000; 504(1):241–248.

21. Villagra S, Jáuregui E, Gálvez J. New Anti-Neoplastics Obtained by a Molecular Connectivity Method. *Molecules* 2000; 5(3):330–331.
22. Llocaer MT, Gálvez J, García-Domenech R, Gómez-Lechón M, Más-Arcas C, de Julian-Ortiz J. Topological virtual screening and pharmacological test of novel cytostatic drugs. *Internet Electron J Mol Des* 2006; 5:306–319. PMID: [16249936](#)
23. Jasinski P, Welsh B, Galvez J, Land D, Zwolak P, Ghandi L, et al. A novel quinoline, MT477: suppresses cell signaling through Ras molecular pathway, inhibits PKC activity, and demonstrates in vivo anti-tumor activity against human carcinoma cell lines. *Invest New Drugs* 2008; 26(3):223–232. PMID: [17957339](#)
24. Jasinski P, Zwolak P, Vogel Rl, Bodempudi V, Terai K, Galvez J, et al. MT103 inhibits tumor growth with minimal toxicity in murine model of lung carcinoma via induction of apoptosis. *Invest New Drugs* 2011; 29(5):846–852. doi: [10.1007/s10637-010-9432-4](#) PMID: [20396929](#)
25. López ME, Pitarresi VLF, Valero SS, Gálvez J, García-Domenech R. Application of Molecular Topology to the Prediction of the Reaction Yield and Anticancer Activity of Imidazole and Guanidine Derivatives. *IJCGE* 2013; 3(2):64–74.
26. Caboni L, Galvez-Llompарт M, Galvez J, Blanco F, Rubio-Martinez J, Fayne D, et al. Molecular topology applied to the discovery of 1-benzyl-2-(3-fluorophenyl)-4-hydroxy-3-(3-phenylpropanoyl)-2H-pyridol-5-one as a non-ligand binding pocket anti-androgen. *J Chem Inf Model* 2014; 54(10):2953–2966. doi: [10.1021/ci500324f](#) PMID: [25233256](#)
27. Galvez J, Llompарт J, Pal K, inventors. Spain, assignee. N,N-dicyclohexyl-(1S)-isoborneol-10-sulfonamide (MT103) and related compounds for the treatment of cancer. Patent Application Country: Application. US; US; Priority Application Country. US patent US20040266732. 2004 1230; Patent Application Date: 20040430.; Priority Application Date: 20020920.
28. Llompарт J, Galvez J, inventors. Medisyn Technologies I, Spain, assignee. N,N-dicyclohexyl-(1S)-isoborneol-10-sulfonamide MT103 family members as antitumor and other therapeutic agents and corresponding treatments and compositions. Patent Application Country: Application: US; US; Priority Application Country: US patent US20040059000. 2004 0325; Patent Application Date: 20020920.; Priority Application Date: 20020920.
29. Llompарт J, Galvez J, Pal K, inventors. Medisyn Technologies I, USA, assignee. Treatment of cancer with MT477 derivatives. Patent Application Country: Application: US; US; Priority Application Country: US patent US20060014770. 2006 0119; Patent Application Date: 20050711.; Priority Application Date: 20040709.
30. Galvez-Llompарт M, M Giner R, C Recio M, Candeletti S, Garcia-Domenech R. Application of molecular topology to the search of novel NSAIDs: Experimental validation of activity. *Lett Drug Des Discov* 2010; 7(6):438–445.
31. Gálvez-Llompарт M, Recio MC, García-Domenech R. Topological virtual screening: a way to find new compounds active in ulcerative colitis by inhibiting NF- κ B. *Mol Divers* 2011; 15(4):917–926. doi: [10.1007/s11030-011-9323-4](#) PMID: [21717125](#)
32. Gálvez-Llompарт M, Zanni R, Romualdi P, García-Domenech R. Selection of nutraceutical compounds as COX inhibitors by molecular topology. *Med Chem Res* 2013; 22(7):3466–3477.
33. Galvez-Llompарт M, María del Carmen Recio Iglesias, Gálvez J, García-Domenech R. Novel potential agents for ulcerative colitis by molecular topology: suppression of IL-6 production in Caco-2 and RAW 264.7 cell lines. *Mol Divers* 2013; 17(3):573–593. doi: [10.1007/s11030-013-9458-6](#) PMID: [23783777](#)
34. García-Domenech R, Gálvez-Llompарт M, Zanni R, Recio MC, Gálvez J. QSAR methods for the discovery of new inflammatory bowel disease drugs. *Expert Opin Drug Discov* 2013; 8(8):933–949. doi: [10.1517/17460441.2013.800043](#) PMID: [23668227](#)
35. Duart M, Antón-Fos G, de Julian-Ortiz J, Gozalbes R, Gálvez J, García-Domenech R. Use of molecular topology for the prediction of physico-chemical, pharmacokinetic and toxicological properties of a group of antihistaminic drugs. *Int J Pharm* 2002; 246(1):111–119.
36. Galvez J, Garcia-Domenech R. On the contribution of molecular topology to drug design and discovery. *Curr Comput Aided Drug Des* 2010; 6(4):252–268. PMID: [20883200](#)
37. Galvez J, Garcia-Domenech R, Castro E. Molecular topology in QSAR and drug design studies. QSPR-QSAR Studies on Desired Properties for Drug Design. *Research Signpost* 2010:63–94.
38. García-Domenech R, Gálvez J, de Julián-Ortiz JV, Pogliani L. Some new trends in chemical graph theory. *Chem Rev* 2008; 108(3):1127–1169. doi: [10.1021/cr0780005](#) PMID: [18302420](#)
39. Gálvez J, Gálvez-Llompарт M, García-Domenech R. Molecular topology as a novel approach for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2012; 7(2):133–153. doi: [10.1517/17460441.2012.652083](#) PMID: [22468915](#)

21. Villagra S, Jáuregui E, Gálvez J. New Anti-Neoplastics Obtained by a Molecular Connectivity Method. *Molecules* 2000; 5(3):330–331.
22. Llocaer MT, Gálvez J, García-Domenech R, Gómez-Lechón M, Más-Arcas C, de Julián-Ortiz J. Topological virtual screening and pharmacological test of novel cytostatic drugs. *Internet Electron J Mol Des* 2006; 5:306–319. PMID: [16249936](#)
23. Jasinski P, Welsh B, Galvez J, Land D, Zwolak P, Ghandi L, et al. A novel quinoline, MT477: suppresses cell signaling through Ras molecular pathway, inhibits PKC activity, and demonstrates in vivo anti-tumor activity against human carcinoma cell lines. *Invest New Drugs* 2008; 26(3):223–232. PMID: [17957339](#)
24. Jasinski P, Zwolak P, Vogel Rl, Bodempudi V, Terai K, Galvez J, et al. MT103 inhibits tumor growth with minimal toxicity in murine model of lung carcinoma via induction of apoptosis. *Invest New Drugs* 2011; 29(5):846–852. doi: [10.1007/s10637-010-9432-4](#) PMID: [20396929](#)
25. López ME, Pitarresi VLF, Valero SS, Gálvez J, García-Domenech R. Application of Molecular Topology to the Prediction of the Reaction Yield and Anticancer Activity of Imidazole and Guanidine Derivatives. *IJCCE* 2013; 3(2):64–74.
26. Caboni L, Galvez-Llompарт M, Galvez J, Blanco F, Rubio-Martinez J, Fayne D, et al. Molecular topology applied to the discovery of 1-benzyl-2-(3-fluorophenyl)-4-hydroxy-3-(3-phenylpropanoyl)-2H-pyrrol-5-one as a non-ligand binding pocket anti-androgen. *J Chem Inf Model* 2014; 54(10):2953–2966. doi: [10.1021/ci500324f](#) PMID: [25233256](#)
27. Galvez J, Llompарт J, Pal K, inventors. Spain, assignee. N,N-dicyclohexyl-(1S)-isoborneol-10-sulfonamide (MT103) and related compounds for the treatment of cancer. Patent Application Country: Application. US; US; Priority Application Country. US patent US20040266732. 2004 1230; Patent Application Date: 20040430.; Priority Application Date: 20020920.
28. Llompарт J, Galvez J, inventors. Medisyn Technologies I, Spain, assignee. N,N-dicyclohexyl-(1S)-isoborneol-10-sulfonamide MT103 family members as antitumor and other therapeutic agents and corresponding treatments and compositions. Patent Application Country: Application: US; US; Priority Application Country: US patent US20040059000. 2004 0325; Patent Application Date: 20020920.; Priority Application Date: 20020920.
29. Llompарт J, Galvez J, Pal K, inventors. Medisyn Technologies I, USA, assignee. Treatment of cancer with MT477 derivatives. Patent Application Country: Application: US; US; Priority Application Country: US patent US20060014770. 2006 0119; Patent Application Date: 20050711.; Priority Application Date: 20040709.
30. Galvez-Llompарт M, M Giner R, C Recio M, Candeletti S, Garcia-Domenech R. Application of molecular topology to the search of novel NSAIDs: Experimental validation of activity. *Lett Drug Des Discov* 2010; 7(6):438–445.
31. Gálvez-Llompарт M, Recio MC, García-Domenech R. Topological virtual screening: a way to find new compounds active in ulcerative colitis by inhibiting NF- κ B. *Mol Divers* 2011; 15(4):917–926. doi: [10.1007/s11030-011-9323-4](#) PMID: [21717125](#)
32. Gálvez-Llompарт M, Zanni R, Romualdi P, García-Domenech R. Selection of nutraceutical compounds as COX inhibitors by molecular topology. *Med Chem Res* 2013; 22(7):3466–3477.
33. Galvez-Llompарт M, María del Carmen Recio Iglesias, Gálvez J, García-Domenech R. Novel potential agents for ulcerative colitis by molecular topology: suppression of IL-6 production in Caco-2 and RAW 264.7 cell lines. *Mol Divers* 2013; 17(3):573–593. doi: [10.1007/s11030-013-9458-6](#) PMID: [23783777](#)
34. García-Domenech R, Gálvez-Llompарт M, Zanni R, Recio MC, Gálvez J. QSAR methods for the discovery of new inflammatory bowel disease drugs. *Expert Opin Drug Discov* 2013; 8(8):933–949. doi: [10.1517/17460441.2013.800043](#) PMID: [23668227](#)
35. Duart M, Antón-Fos G, de Julián-Ortiz J, Gozáitbes R, Gálvez J, García-Domenech R. Use of molecular topology for the prediction of physico-chemical, pharmacokinetic and toxicological properties of a group of antihistaminic drugs. *Int J Pharm* 2002; 246(1):111–119.
36. Galvez J, García-Domenech R. On the contribution of molecular topology to drug design and discovery. *Curr Comput Aided Drug Des* 2010; 6(4):252–268. PMID: [20883200](#)
37. Galvez J, García-Domenech R, Castro E. Molecular topology in QSAR and drug design studies. QSPR-QSAR Studies on Desired Properties for Drug Design. *Research Signpost* 2010:63–94.
38. García-Domenech R, Gálvez J, de Julián-Ortiz JV, Pogliani L. Some new trends in chemical graph theory. *Chem Rev* 2008; 108(3):1127–1169. doi: [10.1021/cr0780005](#) PMID: [18302420](#)
39. Gálvez J, Gálvez-Llompарт M, García-Domenech R. Molecular topology as a novel approach for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2012; 7(2):133–153. doi: [10.1517/17460441.2012.652083](#) PMID: [22468915](#)

40. Galvez J, Villar V, Galvez-Llompert M, Amigo J. Chemistry explained by topology: An alternative approach. *Comb Chem High Throughput Screen* 2011; 14(4):279–283. PMID: [21375503](#)
41. Galvez J, Galvez-Llompert M, Garcia-Domenech R. Introduction to molecular topology: basic concepts and application to drug design. *Curr Comput Aided Drug Des* 2012; 8(3):196–223. PMID: [22734705](#)
42. Galvez J, Galvez-Llompert M, Zanni R, Garcia-Domenech R. Molecular topology—dissimilar similarities. *Drug Discov Today Technol* 2013; 10(4):e475–e481. doi: [10.1016/j.ddtec.2013.05.001](#) PMID: [24451637](#)
43. Todeschini R, Consonni V, Mauri A, Pavan M. Dragon for windows (Software for Molecular Descriptor Calculations), version 5.4. Talete srl: Milan, Italy 2006.
44. Merla R, Ye Y, Lin Y, Manickavasagam S, Huang MH, Perez-Polo RJ, et al. The central role of adenosine in statin-induced ERK1/2, Akt, and eNOS phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(3):H1918–28. PMID: [17616749](#)
45. Wang S, Liu Q, Zhang Y, Liu K, Yu P, Liu K, et al. Suppression of growth, migration and invasion of highly-metastatic human breast cancer cells by berberine and its molecular mechanisms of action. *Mol Cancer* 2009; 8(1):81–96.
46. Lambert JR, Young CD, Persons KS, Ray R. Mechanistic and pharmacodynamic studies of a 25-hydroxyvitamin D 3 derivative in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361(1):189–195. PMID: [17658477](#)
47. Xiaonan W, Qing W, Xu Y, Liansheng Z, Yiping W, Yanwen S. Study of Celastrol on Akt Signaling Pathway and Its Roles in the Apoptosis of K562 Cells. *J Cancer Ther* 2011;2011.
48. Xie RH, Yin M, Yin CC, Cheng XG, Xu ZW, Cao XQ, et al. Mechanism of chlorogenic acid on apoptosis of rat nucleus pulposus cells induced by oxidative stress. *Zhong Yao Cai* 2014; 37(3):465–469. PMID: [25174114](#)
49. Jayasooriya Rajapaksha Gedara Prasad Tharanga, Dilshara MG, Park SR, Choi YH, Hyun J, Chang W, et al. 18β-Glycyrrhetic acid suppresses TNF-α induced matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor by suppressing the Akt-dependent NF-κB pathway. *Toxicol in Vitro* 2014; 28(5):751–758. doi: [10.1016/j.tiv.2014.02.013](#) PMID: [24613819](#)
50. Pandey MK, Kale VP, Song C, Sung S, Sharma AK, Talamo G, et al. Gambogic acid inhibits multiple myeloma mediated osteoclastogenesis through suppression of chemokine receptor CXCR4 signaling pathways. *Exp Hematol* 2014; 42(10):883–896. doi: [10.1016/j.exphem.2014.07.261](#) PMID: [25034231](#)
51. Woo KJ, Jeong Y, Park J, Kwon TK. Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325(4):1215–1222. PMID: [15555556](#)
52. Liu X, Zhao G, Yan Y, Bao L, Chen B, Qi R. Ginkgolide B reduces atherogenesis and vascular inflammation in ApoE^{-/-} mice. *PLoS one* 2012; 7(5):e36237. doi: [10.1371/journal.pone.0036237](#) PMID: [22682117](#)
53. Hwang T, Wang C, Kuo Y, Huang H, Wu Y, Kuo L, et al. The hederagenin saponin SMG-1 is a natural FcγR1 receptor inhibitor that suppresses human neutrophil activation. *Biochem Pharmacol* 2010; 80(8):1190–1200. doi: [10.1016/j.bcp.2010.08.028](#) PMID: [20599799](#)
54. Saiprasad G, Chitra P, Manikandan R, Sudhandiran G. Hesperidin induces apoptosis and triggers autophagic markers through inhibition of Aurora-A mediated phosphoinositide-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase-3 beta signalling cascades in experimental colon carcinogenesis. *Eur J Cancer* 2014; 50(14):2489–2507. doi: [10.1016/j.ejca.2014.06.013](#) PMID: [25047426](#)
55. Merhi F, Tang R, Piedfer M, Mathieu J, Bombarda J, Zaher M, et al. Hyperforin inhibits Akt1 kinase activity and promotes caspase-mediated apoptosis involving Bad and Noxa activation in human myeloid tumor cells. *PLoS one* 2011; 6(10):e25963. doi: [10.1371/journal.pone.0025963](#) PMID: [21998731](#)
56. Yoon SO, Shin S, Lee HJ, Chun HK, Chung AS. Isoginkgetin inhibits tumor cell invasion by regulating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(11):2666–2675. PMID: [17121913](#)
57. Dung TTM, Kim SC, Yoo BC, Sung G, Yang WS, Kim HG, et al. (5-Hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-yl) methyl 6-hydroxynaphthalene-2-carboxylate, a kojic acid derivative, inhibits inflammatory mediator production via the suppression of Syk/Src and NF-κB activation. *Int Immunopharmacol* 2014; 20(1):37–45. doi: [10.1016/j.intimp.2014.02.019](#) PMID: [24583147](#)
58. Shanmugam MK, Nguyen AH, Kumar AP, Tan BK, Sethi G. Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: potential role in prevention and therapy of cancer. *Cancer Lett* 2012; 320(2):158–170. doi: [10.1016/j.canlet.2012.02.037](#) PMID: [22406826](#)

59. Chen W, Huang Y, Yang M, Lee C, Chen C, Yeh C, et al. Protective effect of rutin on LPS-induced acute lung injury via down-regulation of MIP-2 expression and MMP-9 activation through inhibition of Akt phosphorylation. *Int Immunopharmacol* 2014; 22(2):409–413. doi: [10.1016/j.intimp.2014.07.026](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.07.026) PMID: [25091621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25091621/)
60. Monkawa K, Nonaka M, Mochizuki H, Handa K, Hanada H, Hirota K. Naringenin and hesperetin induce growth arrest, apoptosis, and cytoplasmic fat deposit in human preadipocytes. *J Agric Food Chem* 2008; 56(22):11030–11037. doi: [10.1021/jf601965n](https://doi.org/10.1021/jf601965n) PMID: [18980325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18980325/)
61. Bajzer MM, Kunze MM, Bleses JS, Bokesch HR, Chen H, Brau TF, et al. Characterization of pomiferin triacetate as a novel mTOR and translation inhibitor. *Biochem Pharmacol* 2014; 88(3):313–321. doi: [10.1016/j.bcp.2014.01.034](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.034) PMID: [24513322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24513322/)
62. Wolle D, Lee SJ, Li Z, Litan A, Barwe SP, Langhans SA. Inhibition of epidermal growth factor signaling by the cardiac glycoside ouabain in medulloblastoma. *Cancer medicine* 2014; 3(5):1146–1158. doi: [10.1002/csm.9.3.14](https://doi.org/10.1002/csm.9.3.14) PMID: [25052089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25052089/)
63. Kwak DH, Lee J, Kim D, Kim T, Lee KJ, Ma JY. Inhibitory effects of Hwangryunhaedok-Tang in 3T3-L1 adipogenesis by regulation of Raf/MEK1/ERK1/2 pathway and PDK1/Akt Phosphorylation. *Evid-Based Compl Alt* 2013; 2013 (Article ID 413906).
64. Xu H, Song J, Gao X, Xu Z, Xu X, Xia Y, et al. Paeoniflorin attenuates lipopolysaccharide-induced permeability of endothelial cells; involvements of F-actin expression and phosphorylations of PI3K/Akt and PKC. *Inflammation* 2013; 36(1):216–225. doi: [10.1007/s10753-012-9537-3](https://doi.org/10.1007/s10753-012-9537-3) PMID: [23053726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23053726/)
65. Do MT, Kim HG, Choi JH, Khanal T, Park BH, Tran TP, et al. Antitumor efficacy of piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. *Food Chem* 2013; 141(3):2591–2599. doi: [10.1016/j.foodchem.2013.04.125](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.125) PMID: [23870899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23870899/)
66. Deeb D, Gao X, Liu YB, Pindolia K, Gautam SC. Pristimerin, a quinomethide triterpenoid, induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the inhibition of pro-survival Akt/NF- κ B/mTOR signaling proteins and anti-apoptotic Bcl-2. *Int J Oncol* 2014; 44(5):1707–1715. doi: [10.3892/ijo.2014.2325](https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2325) PMID: [24603988](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24603988/)
67. Song NR, Chung M, Kang NJ, Seo SG, Jang TS, Lee HJ, et al. Quercetin suppresses invasion and migration of H-Ras-transformed MCF10A human epithelial cells by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase. *Food Chem* 2014; 142:66–71. doi: [10.1016/j.foodchem.2013.07.002](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.002) PMID: [24001813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24001813/)
68. ZHAO S, DUAN H, XU Y, LU Y, JIANG Z. Effects of rhaponticin on proliferation of SK-BR-3 breast cancer cells. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences* 2010; 5:017.
69. Raina K, Agarwal C, Wadhwa R, Serkova NJ, Agarwal R. Energy deprivation by silibinin in colorectal cancer cells: a double-edged sword targeting both apoptotic and autophagic machineries. *Autophagy* 2013; 9(5):697–713. doi: [10.4101/aut.23860](https://doi.org/10.4101/aut.23860) PMID: [23445752](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23445752/)
70. Esmaeili MA, Farimani MM. Inactivation of PI3K/Akt pathway and upregulation of gene are involved in daucosterol, isolated from *salvia sahendica*, induced apoptosis in human breast adenocarcinoma cells. *S Afr J Bot* 2014; 93:37–47.
71. Ou X, Liu M, Luo H, Dong LQ, Liu F. Ursolic Acid Inhibits Leucine-Stimulated mTORC1 Signaling by Suppressing mTOR Localization to Lysosome. *PLoS one* 2014; 9(4):e95393. doi: [10.1371/journal.pone.0085393](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085393) PMID: [24740400](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24740400/)
72. Hou L, Sun Y, Zhang X, Zhao D, Wu K. Vitamin E succinate induced protective autophagy in human gastric cancer cells SGC-7901 via the Akt/mTOR signaling pathway. *Aibian, Jibian, Tubian* 2013; 25(5):343–347, 351.
73. Jin K, Oh YN, Hyun SK, Kwon HJ, Kim BW. Betulinic acid isolated from *vitis amurensis* root inhibits 3-isobutyl-1-methylxanthine induced melanogenesis via the regulation of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in B16F10 cells. *Food Chem Toxicol* 2014; 68:38–43. doi: [10.1016/j.fct.2014.03.001](https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.001) PMID: [24532067](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24532067/)
74. Buitrago CG, Arango NS, Boland RL. 1 α , 25 (OH) 2D3-dependent modulation of Akt in proliferating and differentiating C2C12 skeletal muscle cells. *J Cell Biochem* 2012; 113(4):1170–1181. doi: [10.1002/jcb.23444](https://doi.org/10.1002/jcb.23444) PMID: [22095470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22095470/)
75. Choo EJ, Rhee Y, Jeong S, Lee H, Kim HS, Ko HS, et al. Anethole exerts antimetastatic activity via inhibition of matrix metalloproteinase 2/9 and AKT/mitogen-activated kinase/nuclear factor kappa B signaling pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2011; 34(1):41–46. PMID: [21212515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21212515/)
76. McGuire TF, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D(3)-induced apoptosis of murine squamous cell carcinoma cells. Selective induction of caspase-dependent MEK cleavage and up-regulation of MEKK-1. *J Biol Chem* 2001; 276(28):26365–26373. PMID: [11331275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11331275/)
77. Park H, Park K, Lee D, Kang S, Nagappan A, Kim J, et al. Polyphenolic extract isolated from Korean *lonicera japonica* thunb. induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. Involvements of PI3K/Akt and MAPKs. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(7):2407–2416. doi: [10.1016/j.fct.2012.04.034](https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.034) PMID: [22561882](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22561882/)

78. Huang M, Tang S, Upadhyay G, Marsh JL, Jackman CP, Shankar S, et al. Embelin Suppresses Growth of Human Pancreatic Cancer Xenografts, and Pancreatic Cancer Cells Isolated from KrasG12D Mice by Inhibiting Akt and Sonic Hedgehog Pathways. *PLoS one* 2014; 9(4):e92161. doi: [10.1371/journal.pone.0092161](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092161) PMID: [24694877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24694877/)
79. Oh JH, Kwon TK. Withaferin A inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules by inactivation of Akt and NF- κ B in human pulmonary epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 2009; 9(5):614–619. doi: [10.1016/j.intimp.2009.02.002](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.02.002) PMID: [19236958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19236958/)
80. Syed DN, Chamcheu J, Khan MI, Sechi M, Lall RK, Adhami VM, et al. Fisetin inhibits human melanoma cell growth through direct binding to p70S6K and mTOR: Findings from 3-D melanoma skin equivalents and computational modeling. *Biochem Pharmacol* 2014; 89(3):349–360. doi: [10.1016/j.bcp.2014.03.007](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.03.007) PMID: [24675012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24675012/)
81. MicroSource website (Pure natural products). Available: <http://www.msdiscovery.com/nalprod.html> Accessed 30 March 2015.
82. Selleckchem website (Akt inhibitors). Available: http://www.selleckchem.com/pathways_Akt.html?gclid=GLXsnIPgILMCFYXLIAdSWUAlw Accessed 30 March 2015.
83. Hu C, Solomon VR, Ulibarri G, Lee H. The efficacy and selectivity of tumor cell killing by Akt inhibitors are substantially increased by chloroquine. *Bioorg Med Chem* 2008; 16(17):7888–7893. doi: [10.1016/j.bmc.2008.07.076](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.076) PMID: [18691894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18691894/)
84. Prinz H, Chamásmani B, Vogel K, Böhm KJ, Aicher B, Gerlach M, et al. N-benzoylated phenoxazines and phenothiazines: synthesis, antiproliferative activity, and inhibition of tubulin polymerization. *J Med Chem* 2011; 54(12):4247–4263. doi: [10.1021/jm200430t](https://doi.org/10.1021/jm200430t) PMID: [21563750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21563750/)
85. Scartabelli T, Gerace E, Landucci E, Moroni F, Pellegrini-Giampietro DE. Neuroprotection by group I mGlu receptors in a rat hippocampal slice model of cerebral ischemia is associated with the PI3K–Akt signaling pathway: A novel postconditioning strategy? *Neuropharmacology* 2008; 55(4):509–516. doi: [10.1016/j.neuropharm.2008.06.019](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.019) PMID: [18606174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18606174/)
86. Garcia-Echeverria G, Sellers W. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 2008; 27(41):5511–5526. doi: [10.1038/onc.2008.246](https://doi.org/10.1038/onc.2008.246) PMID: [18794885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18794885/)
87. Toulany M, Minjee M, Saki M, Holler M, Meier F, Eicheler W, et al. ERK2-dependent reactivation of Akt mediates the limited response of tumor cells with constitutive K-RAS activity to PI3K inhibition. *Cancer biology & therapy* 2013; 15(3):0–1.
88. Ma L, Zhang G, Miao X, Deng X, Wu Y, Liu Y, et al. Cancer stem-like cell properties are regulated by EGFR/AKT/ β -catenin signaling and preferentially inhibited by gefitinib in nasopharyngeal carcinoma. *FEBS Journal* 2013; 280(9):2027–2041. doi: [10.1111/febs.12226](https://doi.org/10.1111/febs.12226) PMID: [23461855](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23461855/)
89. Böckmann S, Nebe B. The in vitro effects of H-89, a specific inhibitor of protein kinase A, in the human colonic carcinoma cell line Caco-2. *Eur J Cancer Prev* 2003; 12(6):469–478. PMID: [14639124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14639124/)
90. Krech T, Thiede M, Hilgenberg E, Schäfer R, Jürchott K. Characterization of AKT independent effects of the synthetic AKT inhibitors SH-5 and SH-6 using an integrated approach combining transcriptomic profiling and signaling pathway perturbations. *BMC Cancer* 2010; 10(1):287.
91. Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and-independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(2):187–197. PMID: [14985459](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14985459/)
92. Jeon SJ, Seo JE, Yang S, Choi JW, Wells D, Shin CY, et al. Cellular stress-induced up-regulation of FMRP promotes cell survival by modulating PI3K-Akt phosphorylation cascades. *J Biomed Sci* 2011; 18:17. doi: [10.1186/1423-0127-18-17](https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-17) PMID: [21314987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21314987/)
93. Li J, Davies BR, Han S, Zhou M, Bai Y, Zhang J, et al. The AKT inhibitor AZD5363 is selectively active in PI3KCA mutant gastric cancer, and sensitizes a patient-derived gastric cancer xenograft model with PTEN loss to Taxotere. *J Transl Med* 2013; 11:241-5876-11-241.
94. Tabernero J, Cervantes A, Saura C, Roda D, Yan Y, Lin K, et al. Targeting the PI3K-Akt-mTOR pathway with GDC-0068, a novel selective ATP competitive Akt inhibitor. *Ann Oncol* 2011; 22.
95. Jin X, Gossett D, Wang S, Yang D, Cao Y, Chen J, et al. Inhibition of AKT survival pathway by a small molecule inhibitor in human endometrial cancer cells. *Br J Cancer* 2004; 91(10):1808–1812. PMID: [15505622](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15505622/)
96. Meuillet EJ, Zuohe S, Lemos R, Ihle N, Kingston J, Watkins R, et al. Molecular pharmacology and anti-tumor activity of PHT-427, a novel Akt/phosphatidylinositol-dependent protein kinase 1 pleckstrin homology domain inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(3):706–717. doi: [10.1158/1535-7163.MCT-09-0985](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0985) PMID: [20197390](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20197390/)
97. Makhov PB, Golovine K, Kulikov A, Teper E, Canter DJ, Simhan J, et al. Modulation of Akt/mTOR signaling overcomes sunitinib resistance in renal and prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(7):1510–1517. doi: [10.1158/1535-7163.MCT-11-0907](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0907) PMID: [22532600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22532600/)

98. MicroSource website (US Drugs Collection). Available: <http://www.msdiscovery.com/usdrugs.html>. Accessed 30 March 2015.
99. Saif MS, Rempinski DR Jr, Rustum YM, Azrak RG. Targeting the oncogenic protein beta-catenin to enhance chemotherapy outcome against solid human cancers. *Mol Cancer* 2010; 9:310. doi: [10.1186/1476-4598-9-310](https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-310) PMID: [21126358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21126358/)
100. Yoshimitsu T, Ino T, Futamura N, Kamon T, Tanaka T. Total synthesis of the β -catenin inhibitor, (-)-agelastatin A: A second-generation approach based on radical aminobromination. *Org Lett* 2009; 11(15):3402–3405. doi: [10.1021/ol9012684](https://doi.org/10.1021/ol9012684) PMID: [19588910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19588910/)
101. Liu Y, Wang W, Xu J, Li L, Dong Q, Shi Q, et al. Dihydroartemisinin inhibits tumor growth of human osteosarcoma cells by suppressing Wnt/ β -catenin signaling. *Oncol Rep* 2013; 30(4):1723–1730. doi: [10.3892/or.2013.2658](https://doi.org/10.3892/or.2013.2658) PMID: [23917613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23917613/)
102. Kawabata K, Murakami A, Ohigashi H. Citrus auraptene targets translation of MMP-7 (matlysin) via ERK1/2-dependent and mTOR-independent mechanism. *FEBS Lett* 2006; 580(22):5288–5294. PMID: [16979634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16979634/)
103. Lin B, Wan S, Liu F, Cui Z, Zhang X, Li X. Effect of bergapten on cells cycle in nasopharyngeal carcinoma. *Zhongguo Yaoxue Zazhi* (Beijing, China) 2014; 49(10):837–842.
104. Chen RH, Ding WV, McCormick F. Wnt signaling to beta-catenin involves two interactive components. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition and activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 2000; 275(23):17894–17899. PMID: [10749878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10749878/)
105. Jia D, Yang W, Li L, Liu H, Tan Y, Ooi S, et al. β -Catenin and NF- κ B co-activation triggered by TLR3 stimulation facilitates stem cell-like phenotypes in breast cancer. *Cell Death Differ* 2015; 22(2):298–310. doi: [10.1038/cdd.2014.145](https://doi.org/10.1038/cdd.2014.145) PMID: [25257174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25257174/)
106. Park S, Gwak J, Han SJ, Oh S. Cardamonin suppresses the proliferation of colon cancer cells by promoting β -catenin degradation. *Biol Pharm Bull* 2013; 36(6):1040–1044. PMID: [23538439](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23538439/)
107. Cui L, Jia X, Zhou Q, Zhai X, Zhou Y, Zhu H. Curcumin affects β -catenin pathway in hepatic stellate cell in vitro and in vivo. *J Pharm Pharmacol* 2014; 66(11):1615–1622. doi: [10.1111/jphip.12283](https://doi.org/10.1111/jphip.12283) PMID: [24945564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24945564/)
108. Thamilselvan V, Menon M, Thamilselvan S. Anticancer efficacy of deguelin in human prostate cancer cells targeting glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin pathway. *Int J Cancer* 2011; 129(12):2916–2927. doi: [10.1002/ijc.25949](https://doi.org/10.1002/ijc.25949) PMID: [21472727](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21472727/)
109. Xiao D, Li M, Herman-Antosiewicz A, Antosiewicz J, Xiao H, Lew KL, et al. Diallyl trisulfide inhibits angiogenic features of human umbilical vein endothelial cells by causing Akt inactivation and down-regulation of VEGF and VEGF-R2. *Nutr Cancer* 2006; 55(1):94–107. PMID: [16965246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16965246/)
110. Chen B, Zhang Z, Liu Z, Zhao Q, Jiang K, Yang K, et al. EGCG inhibited the proliferation of NP69-LMP1 cells through Wnt1- β -catenin pathway. *Xiandai Shengwuyixue Jinzhan* 2012; 12(36):7034–7039.
111. Vanella L, Di Giacomo C, Acquaviva R, Barbagallo I, Cardile V, Kim DH, et al. Apoptotic markers in a prostate cancer cell line: Effect of ellagic acid. *Oncol Rep* 2013; 30(6):2804–2810. doi: [10.3892/or.2013.2757](https://doi.org/10.3892/or.2013.2757) PMID: [24085108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24085108/)
112. Way T, Huang J, Chou C, Huang C, Yang M, Ho C. Emodin represses TWIST1-induced epithelial-mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the β -catenin and Akt pathways. *Eur J Cancer* 2014; 50(2):366–378. doi: [10.1016/j.ejca.2013.08.025](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.08.025) PMID: [24157255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24157255/)
113. Lee SY, Lim TG, Chen H, Jung SK, Lee HJ, Lee MH, et al. Esculetin suppresses proliferation of human colon cancer cells by directly targeting beta-catenin. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013; 6(12):1356–1364. doi: [10.1158/1940-6207.CCRP-13-0241](https://doi.org/10.1158/1940-6207.CCRP-13-0241) PMID: [24104353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24104353/)
114. Su T, Lin J, Tsai C, Huang T, Yang Z, Wu M, et al. Inhibition of melanogenesis by gallic acid: Possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ β -catenin signaling pathways in B16F10 cells. *International journal of molecular sciences* 2013; 14(10):20443–20458. doi: [10.3390/ijms141020443](https://doi.org/10.3390/ijms141020443) PMID: [24129178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24129178/)
115. Pang X, Wu Y, Wu Y, Lu B, Chen J, Wang J, et al. (-)-Gossypol suppresses the growth of human prostate cancer xenografts via modulating VEGF signaling-mediated angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(5):795–805. doi: [10.1158/1535-7163.MCT-10-0836](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0836) PMID: [21372225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21372225/)
116. Liagre B, Vergne-Salle P, Leger DY, Beneytout J. Inhibition of human rheumatoid arthritis synovial cell survival by hecogenin and ligogenin is associated with increased apoptosis, p38 mitogen-activated protein kinase activity and upregulation of cyclooxygenase-2. *Int J Mol Med* 2007; 20:451–460. PMID: [17786275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17786275/)

117. Joo YN, Eun SY, Park SW, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. Honokiol inhibits U87MG human glioblastoma cell invasion through endothelial cells by regulating membrane permeability and the epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol* 2014; 44(1):187–194. doi: [10.3892/ijo.2013.2178](https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2178) PMID: [24247297](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24247297/)
118. Chinni SR, Li Y, Upadhyay S, Koppolu PK, Sarkar FH. Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* 2001; 20(23):2927–2936. PMID: [11420705](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11420705/)
119. Wang G, Fang Y, Lu Z, Pan Z, Wan D. Effects of indomethacin on the proliferation and invasion of colon cancer cell line hct116 and its mechanisms. *Shiyong Yixue Zazhi* 2012; 28(11):1756–1758.
120. Su Y, Simmen RC. Soy isoflavone genistein upregulates epithelial adhesion molecule E-cadherin expression and attenuates beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Carcinogenesis* 2009; 30(2):331–339. doi: [10.1093/carcin/bgn279](https://doi.org/10.1093/carcin/bgn279) PMID: [19073877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19073877/)
121. Wang N, Wang Z, Peng C, You J, Shen J, Han S, et al. Dietary compound isoliquiritigenin targets GRP78 to chemosensitize breast cancer stem cells via beta-catenin/ABC2 signaling. *Carcinogenesis* 2014; 35(11):2544–2554. doi: [10.1093/carcin/bgu187](https://doi.org/10.1093/carcin/bgu187) PMID: [25184164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25184164/)
122. Lee Y, Shin S, Jue S, Kwon I, Cho E, Cho E, et al. The Role of PIN1 on Odontogenic and Adipogenic Differentiation in Human Dental Pulp Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2013; 23(6):618–630. doi: [10.1089/scd.2013.0339](https://doi.org/10.1089/scd.2013.0339) PMID: [24219242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24219242/)
123. Kim M, Song Y, Kim C, Hwang J. Kirenoil inhibits adipogenesis through activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 445(2):433–438. doi: [10.1016/j.bbrc.2014.02.017](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.017) PMID: [24530909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24530909/)
124. Choi H, Gwak J, Cho M, Ryu M, Lee J, Kim SK, et al. Murrayaolone A attenuates the Wnt/ β -catenin pathway by promoting the degradation of intracellular β -catenin proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391(1):915–920. doi: [10.1016/j.bbrc.2009.11.164](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.164) PMID: [19962966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19962966/)
125. Li H, Yang B, Huang J, Xiang T, Yin X, Wan J, et al. Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting β -catenin signaling pathway. *Toxicol Lett* 2013; 220(3):219–228. doi: [10.1016/j.toxlet.2013.05.006](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.05.006) PMID: [23694763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23694763/)
126. Wei W, Chua M, Grepper S, So S. Small molecule antagonists of Tcf4/ β -catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2010; 126(10):2426–2436. doi: [10.1002/ijc.24810](https://doi.org/10.1002/ijc.24810) PMID: [19682654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19682654/)
127. Choi J, Jiang X, Jeong JB, Lee S. Anticancer Activity of Protocatechualdehyde in Human Breast Cancer Cells. *J Med Food* 2014; 17(8):842–848. doi: [10.1089/jmf.2013.0159](https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0159) PMID: [24712725](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24712725/)
128. Mojsin M, Vicentic JM, Schwirtlich M, Topalovic V, Stevanovic M. Quercetin reduces pluripotency, migration and adhesion of human teratocarcinoma cell line NT2/D1 by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling. *Food Funct* 2014; 5(10):2564–2573. doi: [10.1039/c4fo00484a](https://doi.org/10.1039/c4fo00484a) PMID: [25138740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25138740/)
129. Fu Y, Chang H, Peng X, Bai Q, Yi L, Zhou Y, et al. Resveratrol Inhibits Breast Cancer Stem-Like Cells and Induces Autophagy via Suppressing Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *PLoS one* 2014; 9(7):e102535. doi: [10.1371/journal.pone.0102535](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102535) PMID: [25068516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25068516/)
130. Lu W, Lin C, King TD, Chen H, Reynolds RC, Li Y. Silybinin inhibits Wnt/ β -catenin signaling by suppressing Wnt co-receptor LRP6 expression in human prostate and breast cancer cells. *Cell Signal* 2012; 24(12):2291–2296. doi: [10.1016/j.cellsig.2012.07.009](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.07.009) PMID: [22620499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22620499/)
131. Baskar AA, Ignacimuthu S, Paulraj GM, Al Numair KS. Chemopreventive potential of β -sitosterol in experimental colon cancer model-an in vitro and in vivo study. *BMC Complement Altern Med* 2010; 10(1):24.
132. Li Y, Zhang T, Korkaya H, Liu S, Lee HF, Newman B, et al. Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2010; 16(9):2580–2590. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-09-2937](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2937) PMID: [20388854](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20388854/)
133. Wang Y, Liu X, Zhou L, Zhu H, Fan Z, Li Q. Effect of tanshinone IIA on angiogenesis in nude mice with colorectal cancer. *Zhongguo Shiyan Fangjixue Zazhi* 2013; 19(3):167–171.
134. Lee I, Kamba A, Low D, Mizoguchi E. Novel methylxanthine derivative-mediated anti-inflammatory effects in inflammatory bowel disease. *WJG* 2014; 20(5):1127. doi: [10.3748/wjg.v20.i5.1127](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1127) PMID: [24574789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24574789/)
135. Antony L, van der Schoor F, Dairymply SL, Isaacs JT. Androgen receptor (AR) suppresses normal human prostate epithelial cell proliferation via AR/ β -catenin/TCF-4 complex inhibition of c-MYC transcription. *Prostate* 2014; 74(11):1118–1131. doi: [10.1002/pros.22828](https://doi.org/10.1002/pros.22828) PMID: [24913829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24913829/)
136. Kim J, Kim YH, Song G, Kim D, Jeong Y, Liu K, et al. Ursolic acid and its natural derivative corosolic acid suppress the proliferation of APC-mutated colon cancer cells through promotion of β -catenin degradation. *Food Chem Toxicol* 2014; 67:87–95. doi: [10.1016/j.fct.2014.02.019](https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.019) PMID: [24566423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24566423/)
137. Deng J, Miller SA, Wang H, Xia W, Wen Y, Zhou BP, et al. β -catenin interacts with and inhibits NF- κ B in human colon and breast cancer. *Cancer cell* 2002; 2(4):323–334. PMID: [12398846](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12398846/)

138. Li Q, Hannah SS. Wnt/ β -catenin signaling is downregulated but restored by nutrition interventions in the aged heart in mice. *Arch Gerontol Geriatr* 2012; 55(3):749–754. doi: [10.1016/j.archger.2012.06.013](https://doi.org/10.1016/j.archger.2012.06.013) PMID: [22795190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22795190/)
139. Dihlmann S, Klein S, Doeberitz Mv M. Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(6):509–516. PMID: [12813129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12813129/)
140. YuJun H, BaoHua L, DeBing X, JuXin Z. Effects of caffeic acid phenethyl ester on the colorectal cancer via the β -catenin pathway. *Chinese Journal of Digestive Surgery* 2009; 8(4):294–297.
141. Lu W, Jia G, Meng X, Zhao C, Zhang L, Ren Y, et al. Beta-catenin mediates the apoptosis induction effect of celastrol in HT29 cells. *Life Sci* 2012; 91(7):279–283.
142. Xia JJ, Pei LB, Zhuang JP, Ji Y, Xu GP, Zhang ZP, et al. Celecoxib inhibits beta-catenin-dependent survival of the human osteosarcoma MG-63 cell line. *J Int Med Res* 2010; 38(4):1294–1304. PMID: [20926002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20926002/)
143. Selleckchem website (β -catenin inhibitors). Available: <http://www.selleckchem.com/Wnt1.html> Accessed 30 March 2015.
144. Raju J, Bird RP. Diosgenin, a naturally occurring furostanol saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 2007; 255(2):194–204. PMID: [17556673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17556673/)
145. Liu J, Li G, Liu D, Liu J. FH535 inhibits the proliferation of HepG2 cells via downregulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol Med Rep* 2014; 9: 1289–1292. doi: [10.3892/mmr.2014.1928](https://doi.org/10.3892/mmr.2014.1928) PMID: [24482011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24482011/)
146. Syed DN, Afaq F, Maddodi N, Johnson JJ, Sarfaraz S, Ahmad A, et al. Inhibition of human melanoma cell growth by the dietary flavonoid fisetin is associated with disruption of Wnt/ β -catenin signaling and decreased Mitf levels. *J Invest Dermatol* 2011; 131(6):1291–1299. doi: [10.1038/ijd.2011.6](https://doi.org/10.1038/ijd.2011.6) PMID: [21346776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21346776/)
147. Lee M, Kim WK, Park HJ, Kang SS, Lee SK. Anti-proliferative activity of hydrocarpin, a natural lignan, is associated with the suppression of Wnt/ β -catenin signaling pathway in colon cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23(20):5511–5514. doi: [10.1016/j.bmcl.2013.08.065](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.065) PMID: [24018191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24018191/)
148. Liu Y, Zhou L, inventors. Nanfang Hospital, Southern Medical University, Peop. Rep. China, assignee. Application of compound ICG-001 in preparation of drugs for treating chronic kidney disease. Patent Application Country: Application: CN; CN; Priority Application Country: CN patent CN104055779. 2014 0924; Patent Application Date: 20140613.; Priority Application Date: 20140613.
149. Bliir B, Kucuk O, Moreno CS. Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *J Transl Med* 2013; 11:280–5876–11–280.
150. Arensman M, Kovochich A, Kulkauskas R, Lay A, Yang P, Li X, et al. WNT7B mediates autocrine Wnt/ β -catenin signaling and anchorage-independent growth in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* 2013; 33(7):899–908. doi: [10.1038/onc.2013.23](https://doi.org/10.1038/onc.2013.23) PMID: [23416979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23416979/)
151. Mao J, Hu X, Xiao Y, Yang C, Ding Y, Hou N, et al. Overnutrition stimulates intestinal epithelium proliferation through beta-catenin signaling in obese mice. *Diabetes* 2013; 62(11):3736–3746. doi: [10.2337/db13-0035](https://doi.org/10.2337/db13-0035) PMID: [23884889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23884889/)
152. Wang J, Zhou D, He X, Wang Y, Hu W, Jiang L, et al. Effect of downregulated beta-catenin on cell proliferative activity, the sensitivity to chemotherapy drug and tumorigenicity of ovarian cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2011; 57 Suppl.OL1606–13.
153. Leow P, Tian Q, Ong Z, Yang Z, Ee PR. Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/ β -catenin antagonists against human osteosarcoma cells. *Invest New Drugs* 2010; 28(6):766–782. doi: [10.1007/s10637-009-9311-2](https://doi.org/10.1007/s10637-009-9311-2) PMID: [19730790](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19730790/)
154. Matsuzaki S, Darcha C. Involvement of the wnt/ β -catenin signaling pathway in the cellula103r and molecular mechanisms of fibrosis in endometriosis. *PLoS one* 2013; 8: e76808. doi: [10.1371/journal.pone.0076808](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076808) PMID: [24124596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24124596/)
155. Pradhan A, Olsson PE. Juvenile ovary to testis transition in zebrafish involves inhibition of ptges. *Biol Reprod* 2014; 91(2):33. doi: [10.1095/biolreprod.114.119016](https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.119016) PMID: [24920039](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24920039/)
156. Lee H, Bae S, Kim K, Kim W, Chung S, Yang Y, et al. Shikonin inhibits adipogenesis by modulation of the WNT/ β -catenin pathway. *Life Sci* 2011; 88(7):294–301. doi: [10.1016/j.lfs.2010.12.004](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.12.004) PMID: [21146546](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21146546/)
157. Han A, Song Z, Tong C, Hu D, Bi X, Augenlicht LH, et al. Sulindac suppresses β -catenin expression in human cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2008; 583(1):26–31. doi: [10.1016/j.ejphar.2007.12.034](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.034) PMID: [18291362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18291362/)

158. Tenbaum SP, Ordóñez-Morán P, Puig I, Chicote I, Arqués O, Landolfi S, et al. [beta]-catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. *Nat Med* 2012; 18(6):892–901. doi: [10.1038/nm.2772](https://doi.org/10.1038/nm.2772) PMID: [22610277](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22610277/)
159. Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* 2007; 13(14):4042–4045. PMID: [17634527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17634527/)
160. Dehnhardt CM1, Venkatesan AM, Chen Z, Ayrat-Kaloustian S, Dos Santos O, Delos Santos E et al. Design and synthesis of novel diaminoquinazolines with in vivo efficacy for beta-catenin/T-cell transcriptional factor 4 pathway inhibition. *J Med Chem* 2010; 53(2):897–910. doi: [10.1021/jm901370m](https://doi.org/10.1021/jm901370m) PMID: [20025292](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20025292/)
161. Hara A, Sakata K, Yamada Y, Kuno T, Kitaori N, Oyama T, et al. Suppression of β -catenin mutation by dietary exposure of auroaptene, a citrus antioxidant, in N, N-diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinomas in rats. *Oncol Rep* 2005; 14(2):345–351. PMID: [16012713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16012713/)
162. Olivier-Van Stichelen S, Guinez C, Mir AM, Perez-Cervera Y, Liu C, Michalski JC, et al. The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of beta-catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302(4):E417–24. doi: [10.1152/ajpendo.00390.2011](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00390.2011) PMID: [22114026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22114026/)
163. Panno ML, Giordano F, Mastroianni F, Palma MG, Bartella V, Carpino A, et al. Breast cancer cell survival signal is affected by bergapten combined with an ultraviolet irradiation. *FEBS Lett* 2010; 584(11):2321–2326. doi: [10.1016/j.febslet.2010.04.001](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.001) PMID: [20371265](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20371265/)
164. Zeller J, Turbiak AJ, Powelson IA, Lee S, Sun D, Showalter HD et al. Investigation of 3-aryl-pyrimido 5, 4-[β] [1, 2, 4] triazine-5, 7-diones as small molecule antagonists of β -catenin/TCF transcription. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23:5814–5820. doi: [10.1016/j.bmcl.2013.08.111](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.111) PMID: [24060489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24060489/)
165. Sundram V, Chauhan SC, Ebeling M, Jaggi M. Curcumin attenuates β -catenin signaling in prostate cancer cells through activation of protein kinase D1. *PLoS one* 2012; 7(4):e35368. doi: [10.1371/journal.pone.0035368](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035368) PMID: [22523587](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22523587/)
166. Jiang S, Liang Z, Wei G, Liu Y. Wnt/ β -catenin pathway regulating glucocorticoids-mediated Alzheimer's disease-like pathological changes. *Zhonghua Shenjingke Zazhi* 2012; 45(7):500–504.
167. Anitha P, Priyadarsini RV, Kavitha K, Thiagarajan P, Nagini S. Ellagic acid coordinately attenuates Wnt/ β -catenin and NF- κ B signaling pathways to induce intrinsic apoptosis in an animal model of oral oncogenesis. *Eur J Nutr* 2013; 52(1):75–84. doi: [10.1007/s00394-011-0288-y](https://doi.org/10.1007/s00394-011-0288-y) PMID: [22160170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22160170/)
168. Lu D, Cottam HB, Corr M, Carson DA. Repression of beta-catenin function in malignant cells by non-steroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(51):18567–18571. PMID: [16352713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16352713/)
169. Kaza N. Mechanisms of AT101 [(-)-gossypol] induced cytotoxicity in malignant peripheral nerve sheath tumors. ProQuest Dissertations and Theses. 2014.
170. Singh T, Kalfiyar SK. Honokiol inhibits non-small cell lung cancer cell migration by targeting PGE2-mediated activation of β -catenin signaling. *PLoS one* 2013; 8(4):e60749. doi: [10.1371/journal.pone.0060749](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060749) PMID: [23590348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23590348/)
171. Greenspan EJ, Madigan JP, Boardman LA, Rosenberg DW. Ibuprofen inhibits activation of nuclear (beta)-catenin in human colon adenomas and induces the phosphorylation of GSK-3(beta). *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4(1):161–171. doi: [10.1158/1940-6207.CCRP-10-0021](https://doi.org/10.1158/1940-6207.CCRP-10-0021) PMID: [21205744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21205744/)
172. Blum CA, Xu M, Omer GA, Fong AT, Bailey GS, Stoner GD, et al. beta-Catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis* 2001; 22(2):315–320. PMID: [11191454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11191454/)
173. Fila C, Metz C, van der Sluijs P. Juglone inactivates cysteine-rich proteins required for progression through mitosis. *J Biol Chem* 2008; 283(31):21714–21724. doi: [10.1074/jbc.M710264200](https://doi.org/10.1074/jbc.M710264200) PMID: [18539601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18539601/)
174. Canter RJ, Kesmodel SB, Heiljan DF, Veeramachaneni NK, Mokadam NA, Drebin JA, et al. Suppression of β -Catenin by Antisense Oligomers Augments Tumor Response to Isolated Limb Perfusion in a Rodent Model of Adenomatous Polyposis Coli–Mutant Colon Cancer. *Annals of surgical oncology* 2005; 12(9):733–742. PMID: [16132380](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16132380/)
175. Brown JB, Lee G, Managlia E, Grimm GR, Dirisina R, Goretsky T, et al. Mesalamine inhibits epithelial β -catenin activation in chronic ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2010; 138(2):595–605. e3. doi: [10.1053/j.gastro.2009.10.038](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.10.038) PMID: [19879273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19879273/)
176. Wang Y, Zhang X, Wang H. Involvement of BMPR2 in the protective effect of fluoxetine against monocrotaline-induced endothelial apoptosis in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2011; 89(5):345–354. doi: [10.1159/ajp11-024](https://doi.org/10.1159/ajp11-024) PMID: [21619414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21619414/)

177. Watson S. Oncogenic targets of β -catenin-mediated transcription in molecular pathogenesis of intestinal polyposis. *The Lancet* 2001; 357(9256):572–573. PMID: [11558478](#)
178. Roy HK, Karolski WJ, Wali RK, Ralashak A, Hart J, Smyrk TC. The nonsteroidal anti-inflammatory drug, nabumetone, differentially inhibits β -catenin signaling in the MIN mouse and azoxymethane-treated rat models of colon carcinogenesis. *Cancer Lett* 2005; 217(2):161–169. PMID: [15617833](#)
179. Suh N, Reddy BS, DeCastro A, Paul S, Lee HJ, Smolarek AK, et al. Combination of atorvastatin with sulindac or naproxen profoundly inhibits colonic adenocarcinomas by suppressing the p65/ β -catenin/cyclin D1 signaling pathway in rats. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4(11):1895–1902. doi: [10.1158/1940-6207.CCRP-11-0222](#) PMID: [21764858](#)
180. Li J, Chen X, Ding X, Cheng Y, Zhao B, Lai Z, et al. LATS2 Suppresses Oncogenic Wnt Signaling by Disrupting β -Catenin/BCL9 Interaction. *Cell reports* 2013; 5(6):1650–1663. doi: [10.1016/j.celrep.2013.11.037](#) PMID: [24360864](#)
181. Wang C, Dai J, Sun Z, Shi C, Cao H, Chen X, et al. Targeted inhibition of dishevelled PDZ domain via NSC668036 Depresses fibrotic process. *Exp Cell Res* 2015; 331(1):115–22. doi: [10.1016/j.yexcr.2014.10.023](#) PMID: [25445788](#)
182. Piazza GA, Keeton AB, Tinsley HN, Whitt JD, Gary BD, Mathew B, et al. NSAIDs: old drugs reveal new anticancer targets. *Pharmaceuticals* 2010; 3(5):1652–1667.
183. Saini MK, Sanyal SN, Piroxicam and c-phycoyanin prevent colon carcinogenesis by inhibition of membrane fluidity and canonical Wnt/ β -catenin signaling while up-regulating ligand dependent transcription factor PPAR γ . *Biomed Pharmacother* 2014; 68(5):537–550. doi: [10.1016/j.biopha.2014.03.007](#) PMID: [24721324](#)
184. Mologni L, Bruscolo S, Ceccon M, Gambacorti-Passerini C. Synergistic effects of combined Wnt/KRAS inhibition in colorectal cancer cells. *PLoS one* 2012; 7(12):e51448. doi: [10.1371/journal.pone.0051449](#) PMID: [23227266](#)
185. Shan B, Wang M, Li R. Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Invest* 2009; 27(6):604–612. doi: [10.1080/07357900802337191](#) PMID: [19440833](#)
186. Xiong N, Cao X, Zhang Z, Huang J, Chen C, Zhang Z, et al. Long-term efficacy and safety of human umbilical cord mesenchymal stromal cells in rotenone-induced hemiparkinsonian rats. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2010; 16(11):1519–1529. doi: [10.1016/j.bbmt.2010.06.004](#) PMID: [20542126](#)
187. Muehe S, Kirschnick M, Schwarz M, Braeuning A. Synergistic effects of beta-catenin inhibitors and sorafenib in hepatoma cells. *Anticancer Res* 2014; 34(9):4677–4683. PMID: [25202044](#)
188. Bao-ying H, Luo-yuan C, Xian-guo F. Effects of tanshinone IIA on wnt/ β -catenin signaling pathway of high glucose induced renal tubular epithelial cell transdifferentiation. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine* 2012; 32(7):965–969. PMID: [23019958](#)
189. Stein U, Fleuter C, Siegel F, Smith J, Kopacek A, Scudiero D, et al. Impact of mutant β -catenin on ABCB1 expression and therapy response in colon cancer cells. *Br J Cancer* 2012; 106(8):1395–1405. doi: [10.1038/bjc.2012.81](#) PMID: [22460269](#)
190. Mao Y, Tian W, Huang Z, An J. Convenient Synthesis of Toxoflavin that Targets β -Catenin/Tcf4 Signaling Activities. *J Heterocycl Chem* 2014; 51(3):594–597.
191. Yadav VR, Prasad S, Aggarwal BB. Cardamomin sensitizes tumour cells to TRAIL through ROS- and CHOP-mediated up-regulation of death receptors and down-regulation of survival proteins. *Br J Pharmacol* 2012; 165(3):741–753. doi: [10.1111/j.1476-5381.2011.01603.x](#) PMID: [21797841](#)
192. Li L, Wang Z, Wang Z. Combination of IL-24 and Cisplatin Inhibits Cervical Cancer Growth in a Xenograft Nude Mice Model. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12:3293–3298. PMID: [22471469](#)
193. Suzuki M, Nakagawa-Goto K, Nakamura S, Tokuda H, Morris-Natschke SL, Kozuka M, et al. Cancer preventive agents. Part 5. anti-tumor-promoting effects of coumarins and related compounds on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Pharm Biol* 2006; 44(3):178–182.
194. Kaur J, Sanyal S. Oxidative stress and stress-signaling in chemoprevention of early colon cancer by diclofenac. *Am J Biomed Sci* 2010; 2(1):63–78.
195. Way T, Huang J, Chou C, Huang C, Yang M, Ho CT. Emodin represses TWIST1-induced epithelial-mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the β -catenin and akt pathways. *Eur J Cancer* 2014; 50(2):366–378. doi: [10.1016/j.ejca.2013.09.025](#) PMID: [24157255](#)
196. Behari J, Zeng G, Oribuwa W, Thompson MD, Muller P, Micsenyi A, et al. R-Etidolac decreases β -catenin levels along with survival and proliferation of hepatoma cells. *J Hepatol* 2007; 46(5):849–857. PMID: [17275129](#)

197. Tinsley HN, Grizzle WE, Abadi A, Keeton A, Zhu B, Xi Y, et al. New NSAID targets and derivatives for colorectal cancer chemoprevention. Prospects for chemoprevention of colorectal neoplasia: Springer, 2013, p.105–120.
198. Haegeler L, Ingold B, Naumann H, Tabatabai G, Ledermann B, Brandner S. Wnt signalling inhibits neural differentiation of embryonic stem cells by controlling bone morphogenetic protein expression. *Mol Cell Neurosci* 2003, 24(3):696–708. PMID: [14664819](#)
199. Gardner H, Hawcroft G, Hull MA. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on beta-catenin protein levels and catenin-related transcription in human colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. 2004; 91(1): 153–163. PMID: [15189006](#)
200. Hallett RM, Kondratyev MK, Giacomelli AO, Nixon AM, Girgis-Gabardo A, Ilieva D, et al. Small molecule antagonists of the Wnt/beta-catenin signaling pathway target breast tumor-initiating cells in a Her2/Neu mouse model of breast cancer. *PLoS one* 2012; 7(3):e33976. doi: [10.1371/journal.pone.0033976](#) PMID: [22470504](#)
201. Maier TJ, Janssen A, Schmidt R, Geisslinger G, Grosch S. Targeting the beta-catenin/APC pathway: a novel mechanism to explain the cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *FASEB J* 2005; 19(10):1353–1355. PMID: [15946892](#)
202. ChemDraw Ultra package (version 10.0). 2009. CambridgeSoft.
203. Todeschini R, Consonni V. Handbook of molecular descriptors.2008. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim. doi: [10.1002/9783527613106.ch2](#)
204. StatSoft I. Statistica (data analysis software system), version 9.2009. Tulsa, USA.
205. De Maesschalck R, Jouan-Rimbaud D, Massart D. The mahalanobis distance. *Chemom Intell Lab Syst* 2000; 50(1):1–18.
206. Klecka WR. Discriminant analysis. Sage University Paper Series on Quantitative Applications in the Social Sciences, 1980. Beverly Hills, CA: Sage Publications.
207. Furnival GM. All possible regressions with less computation. *Technometrics* 1971; 13:403–408.
208. Gálvez J, García-Domenech R, de Gregorio Alapont C, de Julián-Ortiz J, Popa L. Pharmacological distribution diagrams: a tool for de novo drug design. *J Mol Graph* 1996; 14:272–276. PMID: [8097233](#)
209. SPECS Database; SPECS NV: Delft. The Netherlands.
210. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55–63. PMID: [6006582](#)
211. Vara D, Salazar M, Olea-Herrero N, Guzmán M, Velasco G, Díaz-Laviada I. Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. *Cell Death & Differentiation* 2011; 18(7):1099–1111. doi: [10.1038/cdd.2011.32](#) PMID: [21475304](#)
212. Vara D, Morell C, Rodríguez-Henche N, Díaz-Laviada I. Involvement of PPARγ in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell death & disease* 2013; 4(5):e618.

**EXPERT
OPINION**

1. Introduction
2. Current progresses in MT-QSAR field
3. Conclusions
4. Expert opinion

Latest advances in molecular topology applications for drug discovery

Riccardo Zanni, Maria Galvez-Llompart, Ramón García-Domenech & Jorge Galvez¹

University of Valencia Asof, Molecular Connectivity and Drug Design Research Unit, Faculty of Pharmacy, Department of Physical Chemistry, Valencia, Spain

Introduction: Molecular topology (MT) has emerged in recent years as a powerful approach for the *in silico* generation of new drugs. In the last decade, its application has become more and more popular among the leading research groups in the field of quantitative structure–activity relationships (QSAR) and drug design. This has, in turn, contributed to the rapid development of new techniques and applications of MT in QSAR studies, as well as the introduction of new topological indices.

Areas covered: This review collates the main innovative techniques in the field of MT and provides a description of the novel topological indices recently introduced, through an exhaustive recompilation of the most significant works carried out by the leading research groups in the field of drug design and discovery. The objective is to show the importance of MT methods combined with the effectiveness of the descriptors.

Expert opinion: Recent years have witnessed a remarkable rise in QSAR methods based on MT and its application to drug design. New methodologies have been introduced in the area such as QSAR multi-target, Markov networks or perturbation methods. Moreover, novel topological indices, such as Bourgas' descriptors and other new concepts as the derivative of a graph or cliques capable to distinguish between conformers, have also been introduced. New drugs have also been discovered, including anticonvulsants, anineoplastics, antimalarials or antiallergics, just to name a few. In the authors' opinion, MT and QSAR have moved from an attractive possibility to representing a foundation stone in the process of drug discovery.

Keywords: drug discovery, molecular topology, quantitative structure–activity relationships, topological descriptors

Expert Opin. Drug Discov. [Early Online]

1. Introduction

In 1964, Corwin Hansch and Toshio Fujita [1] introduced the idea that the experimental properties of molecules could be expressed as a function of different physicochemical parameters capable to evaluate electronic and steric characteristics. This way they coined the concept of quantitative structure–activity relationships (QSAR). The concept overpasses the simple notion of structure–activity relationship (SAR) which was well known a long time ahead. Later, in 1988 Cramer [2] introduced the Comparative Molecular Field Analysis, enabling the development of three-dimensional (3D)-QSAR, what represented a breakthrough from both the conceptual and the operative viewpoints [2] and allowed a significant increase in the identification of new *hit* and *lead* drugs.

**informa
healthcare**

Article highlights.

- Molecular topology's (MT) applications are becoming more and more popular among the leading research groups in the field of quantitative structure-activity relationships (QSAR) and drug design, contributing to a quick increase of new techniques and applications, as well as the introduction of new topological indices.
- An exhaustive recompilation of the latest and noteworthy advances in MT's QSAR field is reported. Main topics are: current techniques (e.g., multi-target QSAR), novel topological descriptors and trends in drug design and discovery.
- Some of the most valuable and latest results of our research group (MT and Drug Design Unit) about the effectiveness of MT in QSAR are also briefly described.
- QSAR jointly with MT has been applied during the later years in drug design and discovery, demonstrating a remarkable efficacy in the identification of new *hit* and *lead* drugs.

This box summarizes key points contained in the article.

Afterward, other Comparative Molecular Field Analysis-like approaches such as Comparative Molecular Similarity Indices Analysis [3], Self-Organizing Molecular Field Analysis [5] and GRID/GOLPE [4] were also introduced.

A set of new techniques based on formalisms such as quantum mechanics [5], molecular mechanics [6], molecular dynamics [7], docking [8], scoring and pharmacophore analysis [9], also began to spread. Frequently referred to as 'rational design' approaches, although the expression 'directed design' techniques would be probably more accurate [10], they are now commonly used in drug discovery, especially for disclosing the information related to the drug-receptor interactions.

It is well known that a key issue to ensure the success of a QSAR approach is the selection of the adequate molecular descriptors. These descriptors, according to Basak *et al.* [11,12], can be classified as:

- Topostructural indices, which encode information about vertices connectivity, beyond their chemical nature.
- Topochemical indices, which consider also their chemical characteristics (types of bonds).
- Three-dimensional geometrical parameters.
- Quantum chemical descriptors, which take into account electronic features as well.

It is indeed surprising that the topostructural and topochemical information enables an accuracy of about 90% of the predicted properties, while the introduction of 3D properties results in a moderate increase of about 5% [13]. This can be explained by the fact that, contrary to the rest of QSAR methods, molecular topology (MT) only uses pure mathematical indices, allowing a fast and precise prediction of many biological and physicochemical properties [14-18].

MT is basically related to the assimilation between molecules and graphs [19]. Defined as a part of mathematical chemistry, it can depict molecular structures through graph theoretical indices [20]. Besides, it deals with connectivity of atoms in molecules and not with geometrical features such as angles, distances or tridimensional structure, which is common in standard/conventional approaches [21]. So, MT's advantages can be summarized as follows [22]:

- Molecular structure is depicted in single mathematical terms, that is as a set of elements (atoms) interacting by means of edges (bonds).
- It enables the fast and accurate analysis of large number of compounds as well as the design of novel ones by the reverse process (property \rightarrow structure).
- It is easy to transform into computer language.

This way, graph theory and surrounding disciplines stand as basic tools for MT development.

The use of MT-QSAR (MT-QSAR) has grown exponentially since the 1980s [19]. Some of the MT-QSAR's most important contributors are Basak [23,24], Randić [25,26], Kier [27-31], Hall [27-32] Balaban [33,34] and Bonchev [35,36].

Since the 1990s up to date, our research group has used effectively MT-QSAR in drug discovery [37] in fields like cancer [38,39], bronchodilation [40], analgesia [41] inflammation [16,42-44] and allergy [45]. Various patents were filled in areas so different as analgesia and inflammation [46,47], cancer [48,49], malaria [50] or Alzheimer [51]. Besides, Balaban *et al.* [52] patented novel nitric oxide donors for regulating different biological functions and Kier *et al.* [53] a novel antibacterial against *Staphylococcus aureus* and *Diplococcus pneumoniae*.

In the present review, a description of the MT-QSAR actual panorama such as new trends and techniques are fulfilled. All features considered significant progresses along with the main contributions from leading research groups are covered.

2. Current progresses in MT-QSAR field

In a 2009 book entitled 'Computational drug design' professor David C Young stated that the same term 'computational drug design' covers all of the major *in silico* techniques in use today [54], focusing on the process that pharmaceutical chemists follow to design a new drug molecule. The debates about which computational tools are the best and when and how to use them are very common in drug design/discovery. Young's paper includes the contribution of topological indices (TIs) in drug design and, in a suggestive assert, he express that 'some topological descriptors will give different values for each enantiomer, and may thus be considered 2.5D descriptors' [54]. Though in that context this idea is logical, in reality any graph topology is independent of its dimensionality, so that it is the same in 2D, 3D or any other dimension. Keeping this concept in mind is the key to fully understand the following review.

2.1 New trends in QSAR: multi-target QSAR, perturbation methods, Markov networks

2.1.1 Multi-target QSAR

Although the MT-QSAR-based approaches have largely demonstrated their efficacy in drug design and discovery during the last decades [55,56], it is necessary to figure out why. The main reason resides in its mathematical nature, which enables a direct and quantitative link between chemical structure and pharmacological properties. However, conventional MT-QSAR analysis generally includes only structurally related compounds acting over one single biological target, what makes necessary to build up as many QSAR models as the number of targets to study. To overcome this drawback, a group of researchers introduced a new QSAR approach that uses a single equation for multiple targets known as 'multi-target' or 'multi-tasking QSAR' [57,58].

The pioneers are the group of Speck-Planche and Cordeiro along with the one of Gonzalez-Diaz [59,60]. Their latest results are collected here as a clear example of the effectiveness of MT-QSAR. Speck-Planche *et al.* [61] introduced the first multi-target QSAR model, which integrates dissimilar kinds of chemical and biological data. The model created with the objective of concomitantly predicting bacterial activity along with predictions of absorption, distribution, metabolism, and excretion - toxicity parameters was constructed with a large and heterogeneous dataset of chemicals and displayed accuracies above 90% in both training and test sets.

The same year, Gonzalez-Diaz *et al.* published an innovative article [60], in which they introduced the first 'multi-target and multi-scale' QSAR model. It dealt with the prediction of inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway for drugs acting on different biological targets of various organisms in the ChEMBL database. The model showed high values of accuracy, sensitivity and specificity.

These recent advances demonstrate that multi-target MT-QSAR is an excellent approach for the robust and accurate prediction of many physicochemical, biological and pharmacological properties [56].

2.1.2 Perturbation methods

The perturbation methods consist in adding a measured increase to the independent variable and observing how the dependent one varies as a function of that increase [62]. First of all, the molecular descriptors are calculated using a descriptor, D_i , of a given hit compound employing different software. Then, the number of descriptors is broadened, including new variables of the type $\Delta D_{ij} = D_i - \langle D_j \rangle$. The final step consists of seeking the model by means of Statistics or Machine Learning software. So, the QSAR model achieved by moving averages and Linear Discriminant Analysis (LDA) shows the form:

$$s_j(m_i) = a_0 + \sum_i b_i \cdot D_i + \sum_{q=1}^r c_q \langle D_q \rangle + \sum_{m=1}^v d_m (D_i - \langle D_i \rangle) \quad (1)$$

Where S_{ij} represents a numerical score of the activity of a

given i th compound in the j th assay as by the set of conditions e_j . The average $\langle D_j \rangle = \langle D_i(e_j) \rangle$, is for D_i of different compounds, not within a time domain but on a set of molecular descriptors fitting a particular boundary condition e_j . This is inspired in the idea of moving averages, which is frequently used in time series analysis. Representative seminal works are the ones by Box and Jenkins [63]. More recently, Gonzalez-Diaz *et al.* [57] and Speck-Planche *et al.* [64,65] also employed moving average operators to construct QSAR models. In a recent paper [66], they introduce the first QSAR perturbation model for the analysis of different antibacterial groups of nanoparticles (NPs). After the construction of the dataset (300 NPs with heterogeneous physical and chemical properties), a QSAR perturbation model was carried out from 69,231 NP-NP pairs, previously randomly generated through a perturbation theory approach. The model gave excellent results, correctly classifying 98% of NPs as active or inactive, and also predicting the formation of a new copper-silver nano-alloy with an accuracy of 77.73%.

Moreover, in a previous work of 2014 [65], they developed a unified QSAR-perturbation model, able to verify at the same time the eco-toxicity and cytotoxicity of NPs under different experimental conditions with accuracies higher than 98%.

2.1.3 Markov networks

In the domain of physics and probability, a Markov random field (MRF), Markov network or undirected graphical model, is a set of random variables having a Markov property described by an undirected graph [66]. A MRF is close to Bayesian networks [67] except that Bayesian networks are directed and acyclic, whereas Markov networks are undirected and (sometimes) cyclic. Thus, a Markov network can handle particular relations that a Bayesian network cannot (as for instance cyclic dependencies); on the contrary, it fails to represent concrete dependencies that a Bayesian network can (as for example induced dependencies). Furthermore, in an MRF, every variable is not depending of the non-neighbor ones. If the global probability distribution of the random variables is positive, it is referred to as a Gibbs random field, since according to the Hammersley-Clifford theorem, it may be represented by a Gibbs measure of a locally defined energy function. The prototypical MRF is the Ising model [68]. In artificial intelligence, the MRF is used in image processing and computer vision [69]. Interesting applications of Markov networks are two relatively recent papers by Gonzalez-Diaz *et al.* [70,71] in which they used TIs to describe the connectivity patterns of different kinds of complex networks despite the nature of the object they represent. Galvez charge transfer indices [70] were used to build Galvez-Markov networks and give a precise prediction of perturbations in order to transfer the results of biochemical metabolic models to other species. A linear QSAR-perturbation theory model was built and it predicted more than 300,000 perturbations in metabolic networks with 85 - 99% of correct classification in training and validation series.

2.2 New trends in QSAR: novel topological descriptors

In an interesting paper entitled 'Six questions on topology in theoretical chemistry,' a group of prominent scientists aim to clarify the meaning and implications of the term 'topological approach' answering the following questions:

- What is the significance of topological approach?
- Can new chemical concepts be found by a topological approach?
- What is the status of a chemical concept within a topological approach?
- Should topological approaches provide measurable quantities?
- Is it possible to predict the outcome of a topological approach without performing a calculation on a computer?
- What are new domains for which topological approaches would be useful?

Several answers are given and the meaning of MT seemed to be differently intended by the scientists. While one group considered that the topology should be, strictly speaking, enrolled in the field of the mathematical application domain (e.g., analysis of functions in the Cartesian space or momentum, construction of Hamiltonians that use only atomic connectivity's as input (Huckel-like), others stated that it could be constituted as an autonomous field that might provide new theoretical basis for future development of chemistry [72-74]. Nevertheless, it is notable to note that many of them mentioned the field of drug design as one of the most interesting for future applications.

A study related to these ideas is the one by Nandi and Bagchi about the importance of Kier and Hall' indices in QSAR applied to the design of new anticancer drugs [75]. Based on the effectiveness of those indices in predicting activity of different compounds such as 2,5-bis (1-aziridinyl)-1,4-benzoquinone (BABQ), pyridopyrimidine, anilinoquinazoline and 4-2-phenylindoles, the authors explain the reason for this effectiveness by the fact that molecular structure is a concept that can be described at different independent levels, as for instance classical valence bond representations, chemical graph-theoretic approach, ball and spoke model, minimum energy conformation, semi-symbolic contour map, or quantum mechanical representation (Hamiltonian operators). All of them are models derived from different abstract concepts but dealing with the same chemical reality. The main conclusion is that in describing molecular structure we can use different approaches that may work depending on what we are looking for. After all, a basic assumption in science is that any theory or model is acceptable as far as it is capable to predict and/or explain the experimental facts.

Apart from the fundamental questions mentioned above, one of the most relevant aspects in the application of MT to

drug design and discovery is the introduction of novel molecular descriptors. Hence, some of the latest advances in this topic are now described.

First, Martinez-Santiago *et al.* [76], introduced the concept of derivative of a molecular graph (G) with respect to a given event (S), as its derivative over each pair of atoms, that is: $\partial G/\partial S(v_i, v_j) = (f_i - 2f_{ij} + f_j)/f_{ij}$, where f_i (or f_j) are the atom i (or j) frequencies, and f_{ij} is the reciprocal frequency of the atoms i and j . In other words, the derivative is a measure of the participation of atom pairs in the event S . The event space consists of all the subgraphs of the G scaffold that are complete (including all connected sub-graphs) or made of subgraphs of particular orders or types or combinations of them. The graph derivative index at atomic level, Δ_B is defined as a linear combination of all atom pair derivatives that include the node i . Global descriptors are obtained by applying the invariants over a set of Δ_B values. The novel indices were tested using a data set of 28 octane isomers proposed by the International Academy of Mathematical Chemistry for checking novel descriptors, whose boiling points were predicted. It was also tested the adrenergic blocking activity of N,N -dimethyl-2-bromo-phenethylamines as well as the physicochemical properties of polychlorinated biphenyls and octanes. The models showed a good predictive power as compared with other 0-3D indexes used by other researchers on the same properties and data sets. About the physicochemical meaning of the novel indices, it was investigated by predicting NMR parameters of a series of ethers and carbonyls, thereby deducing that the new descriptors encode electronic, topological and steric information [73]. As a fundamental conclusion, it can be established that the novel indices encode important structural information so that more interpretable and robust mathematical models can be constructed and used in QSAR and drug design studies.

Probably one of the most relevant contributions in novel descriptors is the introduction by Bonchev and Buck [77] of the Bourgas indices. Follow-up papers about these novel indices, such as the one from Dehmer *et al.*, added significant insight in their performance, particularly in the area of complex networks [78]. Bourgas indices are defined by introducing the simplest way to integrate the information on network connectivity and distances by using the ratio of the network total adjacency and total distance, A and D :

$$B1 = \frac{A}{D} \quad (2)$$

The rationale of this equation (2) is straightforward: the graph (or network) complexity increases along with the number of edges (links) E , where for undirected graphs $A = 2E$, and with the more compact 'small-world' type of structure organization (with a smaller graph radius, and smaller total graph distance D). The B1 index is a fast approximate measure of graph complexity, which is illustrated by some examples in Figures 1 and 2. However, due to the fact that both A and D are additive functions, the same values could emerge

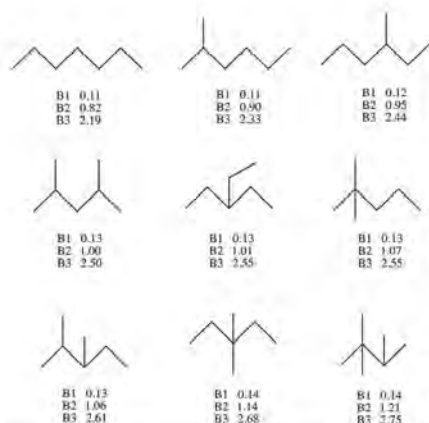


Figure 1. Nine acyclic graphs with seven nodes ordered according to their increasing complexity as characterized by the three Bourgas indices B1–B3.

Reproduced from [77] with permission of Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.

from different vertex degree and vertex distance distributions. This partial degeneracy of B1 can be avoided (or at least dramatically reduced) if instead of using directly A and D, one proceeds with such vertex degree/vertex distance ratios b_i for each graph vertex and then sums up over all vertices to define the second small-world connectivity index B2:

$$b_i = \frac{a_i}{d_i} \quad (3)$$

$$B_2 = \sum_{i \in V} b_i = \sum_{i \in V} \frac{a_i}{d_i} \quad (4)$$

The distribution of the vertex b_i descriptors, $B2\{b_1, b_2, b_3, \dots, b_n\}$, can then be considered an important integrated distribution of vertex connectivity and distances.

Finally but not less important, the introduction of *cis/trans* isomerism into the topological descriptors' framework area represents a significant advance. In 2014, Gutman *et al.* presented a simple graph-theory-based model, which allows the expression of the energy of geometrically non-equivalent forms of conjugated polyenes [79]. The procedure consists of a modification of the graph adjacency matrix and the inclusion of *cis/trans* constellation information in the form:

$$A(G) = A_1(G) + iA_2(G) \quad (5)$$

Where $i = \sqrt{-1}$ is the imaginary unit. In the previous formula, $A_1(G)$ is the ordinary adjacency matrix defined in the usual manner. If G is a molecular graph with vertices v_1, v_2, \dots, v_n ,

Latest advances in MT applications for drug discovery

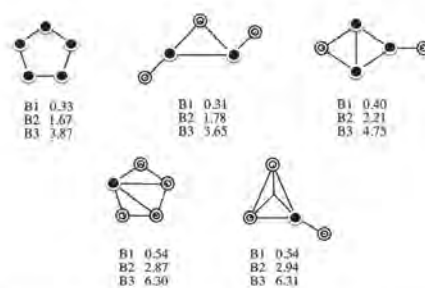


Figure 2. Five cyclic graphs with five nodes ordered according to their increased complexity as reflected by the values of three small-world connectivity indices. The black points mark the central vertices, as defined by the values of their b_i indices.

Reproduced from [77] with permission of Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.

then the (ij) entry of $A_2(G)$ is equal to 1 if the vertices v_i and v_j are adjacent, and is zero otherwise. The imaginary part of $A_1(G)$ is defined as follows. Let the topological distance (= the number of edges in a shortest path) between the vertices v_i and v_j of the graph G be denoted by $d(v_i, v_j|G)$. Then:

$$[A_2(G)]_{ij} = \begin{cases} +1 & \text{if } d(v_i, v_j|G) = 3 \text{ \& } v_i, v_j \text{ are in the } cis \text{ constellation} \\ -1 & \text{if } d(v_i, v_j|G) = 3 \text{ \& } v_i, v_j \text{ are in the } trans \text{ constellation} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (6)$$

2.3 New trends in QSAR: bioactivity and drug design

At this point, the importance of MT in QSAR is glaring. An excellent recompilation about it is a book by Basak *et al.* [80], which reports the latest advances in mathematical chemistry. Of the 26 chapters, several were written by scientists who stand among the pioneers of MT. Among the different topics addressed in the book are noteworthy: a description of the latest version of the computer program MOLGEN 5.0 for molecular generation [81]; a review on the beginnings and present status of graphical representations for DNA, RNA and protein sequences – the very essence of life on our planet [82]; an overall topological representation of molecular structure [83]; MT applied to drug design/discovery [80], which provides a pedagogical approach to the development and use of TIs for drug design; TIs for acyclic graphs with the allocated matrices that result from summing or multiplying local graph invariants (vertices or edges) [84]; a review of similarity-based virtual screening (VS) of molecules for bioactivity based on weighted 2D fingerprint fragments [85] and finally, a discussion over the factors that have led to the rapid development of discrete mathematics applications in chemistry during the last few decades [86].

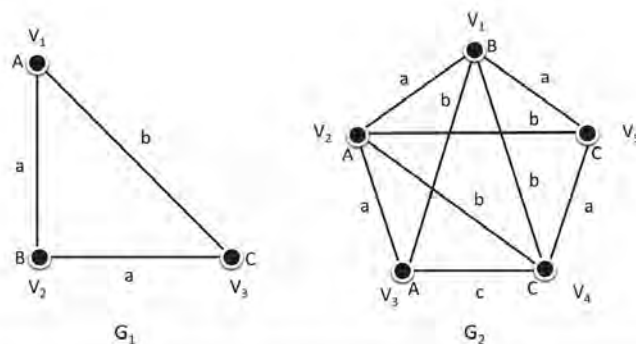


Figure 3. Example of graphs. G_1 is a clique, G_2 is not. Reproduced from [86], with permission of the American Chemical Society.

In terms of QSAR for drug design and discovery, the work of Podolyan and Karypis [86] is revolutionary. The entire pharmacophore identification is revisited through the use of frequent clique detection algorithm. The notion of clique is related to a fully connected graph, that is, for each pair of vertices in V there is an edge in E . The clique's size is given by its number of vertices, that is, $|V|$. A clique including n vertices is called an n -clique. Consequently, the number of edges in an n -clique is $n \times (n - 1)/2$. For example, in Figure 3 two graphs are depicted, G_1 and G_2 . G_1 is a clique because every node is connected to all others in the graph while G_2 is not, because it lacks any edge between nodes v_3 and v_5 .

From Figure 3, it is evident that the set of vertices v_1 , v_2 , and v_3 and the edges connecting them in G_2 , are isomorphic to G_1 (a clique) because they have one-to-one identically labeled vertices and edges. Thus, the vertices v_1 , v_2 and v_3 and their connecting edges, are the embedding of the clique G_1 in the graph G_2 .

Based on these concepts, the authors introduce two algorithms for pharmacophore identification using frequent clique mining in graphs representing low-energy conformations of active molecules. The algorithm – called MCM – is based on clique-mining of the conformer's graphs, using a depth-first approach and operating with edge-labeled graphs. It calculates the frequency of a given pharmacophore based on its embedding in the pharmacophore graphs of the different ligands. Another algorithm, namely UCM, improves the computational performance of MCM by taking advantage of the fact that there is a high level of structural similarity among the 3D conformations of a molecule. Both algorithms yield identical results and they only differ in the execution time. In this review, only MCM is described. It is an algorithm that uses a simple adjacency matrix M to record each conformer independently for each molecule. When a two-bin assignment is used, the two different labels (differing by 1) to the distance between these

two vertices, are stored in M_{ij} and M_{ji} . If a single-bin assignment is chosen, then all off-diagonal entries in the lower triangular matrix are assigned -1, that is, $\forall j < i: M_{ij} = -1$. Adjacency matrices for conformers depicted in Figure 4 are illustrated in Figure 5 (for visualization purposes, the numeric edge labels have been replaced by alphabetical ones).

In Vračko *et al.* [87] paper, authors analyze various crucial aspects of a robust QSAR study: the type of compound (organic or inorganic), structure (descriptors), model (the most applied method is multidimensional linear regression). The interesting question that the authors try to answer is: "How to test a model and how to express the quality of a model?" Today, the accepted idea is that a model should be tested on a set of compounds not used in the model's development process. Again, different strategies are possible: for example, a random selection or, alternatively, the equivocal selection of the objects for the test set from the entire model's domain [87]. When the definitive model is obtained it is submitted and verified with this test set. The quality of a model is usually expressed as the correlation coefficient between predicted and measured values for training and test sets: r^2 . Moreover, q^2 is often used in leave-out testing strategies. In binary classification, that is the response can be positive or negative, the model responses can be understood as true positive, true negative, false positive and false negative.

Another key step is the decision about which could be the optimal similarity criterion. About this, Willet [85] uses molecular fingerprints for chemical similarity searching. These fingerprints detect the presence of 2D substructure fragments in a molecule, being the similarity between a pair of molecules depending on the number of fragments that they share. In his study, the description of the most recent achievements in the field of data fusion and machine learning techniques are addressed. Different criteria such as Tanimoto or cosine indices, Euclidean distances and the concept of framework are also

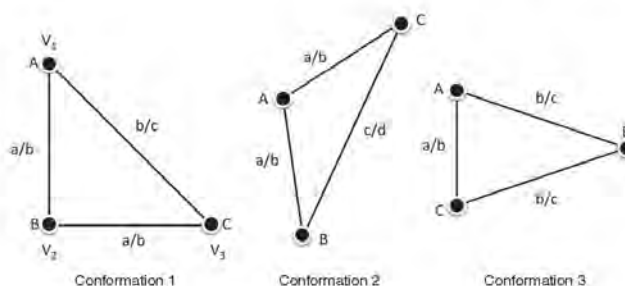


Figure 4. Three graphs representing three conformations of the same molecule. The edge labels represent two-bin assignment of the distances.

Reproduced from [86] with permission of the American Chemical Society.

A.

A	a	b	A	a	a	A	b	a
b	B	a	b	B	a	c	B	b
c	b	C	b	d	C	b	c	C

B.

A	a → {1,2} b → {-1} c → {3}	a → {2,3} b → {-1} c → {1,3}
	B	a → {1} b → {1,3} c → {2,3} d → {2}
		C

Figure 5. Representations of graphs in Figure 3: (A) adjacency matrices for each conformer and (B) unified conformational matrix.

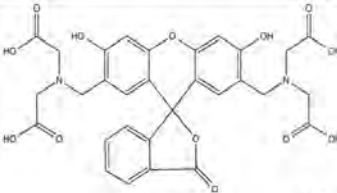
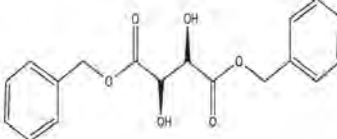
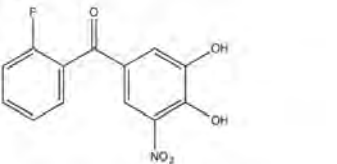
Reproduced from [86] with permission of the American Chemical Society.

given as fundamental features in depicting the concept of similarity.

Doubtless, one of the most enthralling studies about the importance of MT-QSAR in drug discovery is from Bruno-Blanch *et al.* [88]. In this work, they describe the different methodologies known as VS, with their advantages and disadvantages. Furthermore, in a subsequent work, they conducted a VS campaign to discover new anticonvulsant candidates for the treatment of refractory epilepsy [89]. A topological

discriminant equation to discover anti Maximal Electroshock Seizure compounds and a consecutive technique to create filter to discriminate P-glycoprotein substrates and non-substrates were synergistically applied to two important chemical databases. Initially, the model was applied into a three-model collection of 2D descriptors able to differentiate between Pgp-substrates and non-substrates. The importance of these results relies on the fact that one can seek for new drugs not binding to Pgp and hence not expected to be expelled by it.

Table 1. The three selected compounds that showed anti-IL-6 activity.

Compound	Structure
Calcein	
Dibenzyl-L-tartrate	
Ro 41-0960	

2.4 New trends in QSAR: molecular topology and drug design research unit main results

Since our research group (*Molecular Topology and Drug Design Unit*) at the University of Valencia (Spain) is one of the pioneers in the application of MT to drug design and possibly one of the main contributors in the field, some of the most valuable and latest results are briefly mentioned.

In 2013, along with an exhaustive review about QSAR for modeling new anti-histamines [90], a paper about the identification of anti-allergic activity of natural compounds was published [91]. In this work, by means of LDA and ANN, a broad group of heterogeneous compounds were probed. The QSAR model obtained, which showed a high percentage of correct classification (85%) for both training and test sets, was applied to screen an entire library of natural products. Thirty compounds with predicted activity were identified and interestingly, many of them were already referenced in literature as anti-allergic. The same year, a relevant paper on ulcerative colitis was also published [43], in which MT-QSAR was employed for the selection of novel IL-6 inhibitors. Four compounds were identified: alizarin-3-methylimino-N, N-diacetic acid, calcein, (+)-dibenzyl-L-tartrate and Ro 41-0960. After the *in vitro* tests on two cell lines (RAW 264.7 and Caco-2) inhibitory activity on IL-6 was measured,

confirming activity for three of the four compounds selected (Table 1).

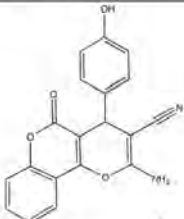
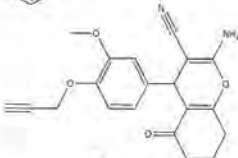
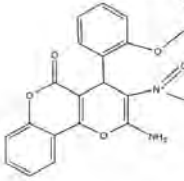
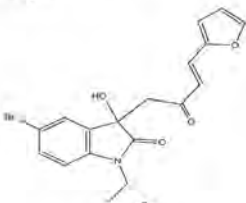
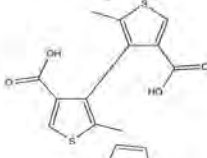
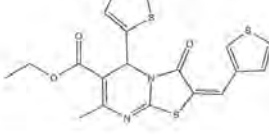
Among the most important results of our team, stand the ones of 2014 in the field of Alzheimer and cancer. To underline: the discovery of eight new compounds with dual mechanism of action against Alzheimer [92]. The dual activity was referred to the inhibition of both deposition of β -amyloid protein and the formation of oligomers. Four out of the eight hits were also leads.

With regard to cancer, MT-QSAR made possible the discovery of 1-benzyl-2-(3-fluorophenyl)-4-hydroxy-3-(3-phenylpropanoyl)-2H-pyrrole-5-one as a novel non-ligand-binding pocket (non-LBP) antagonist of the androgen receptor (AR) [59].

Furthermore, six novel cancer chemotherapeutic hits were discovered. These molecules have demonstrated their activity as inhibitors of Akt and/or β -catenin proteins, and could be virtually used for prostate and colorectal cancer treatment (two types of cancer related to Akt/mTOR and Wnt/ β -catenin pathways) [93]. After *in vitro* testing, five of the six selected compounds revealed Akt/mTOR and/or β -catenin inhibitory activity: CAS n^o 256378-54-8, 663203-38-1, 247079-73-8, 689769-86-6 and 431925-096 (Table 2).

Besides, another notable outcomes were the development of a multi-target model [94] for the prediction of the

Table 2. Selection of potential Akt and/or β -catenin inhibitors.

CAS number	Structure
256378-54-8	
663203-38-1	
247079-73-8	
689769-86-6	
15940-61-1	
431925-09-6	

susceptibility of Gram + and Gram - anaerobic bacteria, as well as a model for the prediction of antiprotozoal activity of a group of benzyl phenyl ether diamine derivatives [18]. This last predicted accurately the drug activity against three highly prevalent parasites in humans: *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Plasmodium falciparum* and *Leishmania donovani*.

An interesting example of MT's versatility is its application to human intestinal absorption (HIA) [95]. Here, a database of structurally heterogeneous compounds with their experimental HIA values were employed to build up robust and reliable models based on artificial neural networks.

Finally, our research group has used MT to the prediction of drug side effects and repurposing. In a joint work with L.B. Kier, topochemical descriptors were used for modeling two drug side effects: anorexia [96] and dyspnea [97]. In both cases, despite the complex nature of the property under study, the models were able to predict correctly around 80% of the compounds.

In the repurposing area, a paper in collaboration with L.B. Blanch [98] resulted in the identification of tripanocidal activity of three well-known drugs: clobazamine, benidipine and saquinavir. According to these outcomes, the biopharmaceutical, toxicological and physiopathological criteria were under discussion, contemplating the possibility to move clobazamine and benidipine into preclinical phase for acute infection.

3. Conclusions

After a thorough analysis of the main aspects that characterize the unicity of MT and its effectiveness as QSAR methodology, it is not difficult to understand why it is spreading so fast and so deep in the field of drug design and discovery. The ability to escape from dimensionality, giving to chemical structures a strict mathematical representation and the possibility to identify new *hit* and *lead* drugs without the need of any specific information about their mechanism of action, are exceptional features. All the articles recompiled in this review can be interpreted as a symptom of the changing future. If during the early 1980s, MT and QSAR were an attractive possibility, in 1990s an interesting innovation, nowadays they represents a foundation stone in the process of drug discovery.

4. Expert opinion

During the last few years, QSAR methods based on MT have experienced remarkable advances that have resulted in numerous international publications. Of great interest is their application to the field of drug design/discovery for the identification of new *hit* and *lead* drugs. Among these advances stand the introduction of new methodologies, such as multi-target QSAR, Markov's networks and perturbation methods, which have enabled a significant improvement in the predictive capability of the current QSAR studies. Specifically, the multi-target QSAR allows to use single equations with several outputs, each connected to a different biological

target. Markov networks have proven to be more effective than other statistics techniques, such as Bayesian networks, mostly because they allow predictions on possible cyclic relations. As for the perturbation methods, they also proved to be very effective in QSAR, due to the fact that they enable a standardization of the data coming from different sources, through the application of moving averages. Other remarkable progresses are the introduction of new (at least in the field of drug discovery application) indices. Among them stand out the Bourgas descriptors, the concept of 'derivative of a graph' and the use of cliques to distinguish between conformers. Bourgas indices make possible to introduce a simple way to integrate the information on network connectivity and distances, by using the ratio of the overall network adjacency and total distance. They represent a simple way of assessing the complexity of a graph. About the notion of 'derivative of a graph,' it is related to the frequency of occurrence of certain atoms in the graph and to the information content of the graph. Lastly, the capability of cliques to distinguish between conformers is illustrative, because not many algorithms can discriminate between structural isomers (such as *cis-trans* or optical) or conformers, since these spatial properties are fundamental for the biological and pharmacological activity. These developments have significantly contributed to enhancing the effectiveness of QSAR methods, particularly those based on MT.

Regarding the study of pharmacological properties, notable advances were made. Just to mention a few: side effects such as anorexia and dyspnea, antibacterial activity or enzyme inhibition constants. Moreover, novel drugs have been identified through the application of MT, especially by our research group.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (●) or of considerable interest (●●) to readers.

- Hamch C, Fujita T. p -sigma- π analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J Am Chem Soc* 1964;86(8):1616-26
- Cramer RD, Patterson DE, Bunce JD. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J Am Chem Soc* 1988;110(18):5959-67
- Myint KZ, Xie X. Recent advances in fragment-based QSAR and multi-dimensional QSAR methods. *Int J Mol Sci* 2010;11(10):3846-66
- Sippl W. 3D-QSAR using the GRID/GOLPE approach. *Mol Interact Fields* 2006;27:145-70
- Lepšik M, Řezáč J, Kolář M, et al. The semiempirical quantum mechanical scoring function for in silico drug design. *ChemPlusChem* 2013;78(9):921-31
- Rathore R, Sumakant M, Reddy MS, et al. Advances in binding free energies calculations: QM/MM-based free energy perturbation method for drug design. *Curr Pharm Des* 2013;19(26):4674-86
- Kerrigan JE. Molecular dynamics simulations in drug design. In: Sandhya Koragere, editor. *Silico models for drug discovery*. Humana Press, New York, USA; 2013. p 95-113
- Zhuo H, Caffisch A. Molecular dynamics in drug design. *Eur J Med Chem* 2015;91:4-14
- Caporuscio F, Tañ A. Pharmacophore modelling: A forty year old approach and its modern synergies. *Curr Med Chem* 2011;18(17):2543-53
- Fang Y. Ligand-receptor interaction platforms and their applications for drug discovery. *Expert Opin Drug Disc* 2012;7(10):969-88
- Basak SC, Mills D, Natarajan R, Gure BD. Predicting chemical reactivity and bioactivity of molecules from structure. Section title General physical chemistry; 2009. p 479-502
- Natarajan R, Basak SC, Mills D, et al. Quantitative structure-activity relationship modeling of mosquito repellents using calculated descriptors. *Croat Chem Acta* 2008;81(2):333-40
- Ivanciuc O. Topological indices. *Handbook of Chemoinformatics: From Data to Knowledge in 6 Volumes*. 2005. p 981-1003
- Gálvez J, Gálvez Llompарт M, García-Domenech R. Application of molecular topology for the prediction of the reaction times and yields under solvent-free conditions. *Green Chem* 2010;12(6):1050-61

Declaration of interests

M Gálvez-Llompарт acknowledges the 'Atraccio de talents' Fellowship provided by the University of Valencia to carry out this study. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

15. Gálvez J, Parreño M, Pla J, et al. Application of molecular topology to the prediction of water quality indices of alkylphenol pollutants. 2011
16. Gálvez-Llompарт M, Recio MC, García-Domenech R. Topological virtual screening: A way to find new compounds active in ulcerative colitis by inhibiting NF- κ B. *Mol Divers* 2011;15(4):917-26
17. Mérida S, Flustero S, M Villar V, et al. Efficacy and activity prediction by molecular topology of new drugs against the tetraonychus urticae plague. *Comb Chem High Throughput Screen* 2013;16(6):473-83
18. García-Domenech R, Zanni R, Gálvez-Llompарт M, Gálvez J. Predicting antiprotozoal activity of benzyl phenyl ether diamine derivatives through QSAR multi-target and molecular topology. *Mol Divers* 2015;19(2):357-66
19. Gálvez J, Gálvez-Llompарт M, García-Domenech R. Molecular topology as a novel approach for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2012;7(2):133-53
- **In this article is described the potential role of molecular topology in drug design/discovery.**
20. García-Domenech R, Gálvez J, de Julián-Ortiz JV, Pogliani L. Some new trends in chemical graph theory. *Chem Rev* 2008;108(3):1127-69
- **A complete review on graph theory and molecular topology.**
21. Gálvez J, Gálvez-Llompарт M, Zanni R, García-Domenech R. Molecular topology-dissimilar similarities. *Drug Discov Today: Technol* 2013;10(4):e175-81
22. Gálvez J, Gálvez-Llompарт M, García-Domenech R. Introduction to molecular topology: Basic concepts and application to drug design. *Curr Comput Aided Drug Des* 2012;8(3):196-223
23. Basak S, Ray S, Raychaudhury C, et al. Molecular topology and pharmacological action-a qsar study of tetrazoles using topological information-content (ic). *Ires Med Sci Biochem* 1982;10(2):145-6
24. Basak S. Binding of barbiturates to cytochrome P450: A QSAR study using log P and topological indices. *Med Sci Res* 1988;16(28):1-282
25. Trnajić N, Klein DJ, Randić M. On some solved and unsolved problems of chemical graph theory. *Int J Quantum Chem* 1986;30(S20):699-742
26. Randić M, Basak SC. A new descriptor for structure-property and structure-activity correlations. *J Chem Inf Comput Sci* 2001;41(3):650-6
27. Kier L, Hall L. The electrotopological state: Structure modeling for QSAR and database analysis. Topological indices and related descriptors in QSAR and QSPR 1999;491
28. Hall LM, Hall LH, Kier LB. Modeling drug albumin binding affinity with e-state topological structure representation. *J Chem Inf Comput Sci* 2003;43(6):2120-5
29. Kier LB, Hall LH. The generation of molecular structures from a Graph-Based QSAR equation. Quantitative Structure-Activity Relationships 1993;12(4):383-8
30. Hall LH, Maynard EL, Kier LB. QSAR investigation of benzene toxicity to fathead minnow using molecular connectivity. *Environ Toxicol Chem* 1989;8(9):783-8
31. Contrera JF, MacLaughlin P, Hall LH, Kier LB. QSAR modeling of carcinogenic risk using discriminant analysis and topological molecular descriptors. *Curr Drug Discov Technol* 2005;2(2):55-67
32. Hall L, Hall L. QSAR modeling based on structure-information for properties of interest in human health. SAR QSAR Environ Res 2005;16(1-2):13-41
33. Devillers J, Balaban A. Topological indices and related descriptors in QSAR and QSPR. Gordon and Breach, Amsterdam, 1999
34. Balaban AT. A personal view about topological indices for QSAR/QSPR. *ChemInform* 2001;32:30
35. Bonchev D. 8. overall connectivity and topological complexity: A new tool for qsprr/qsar. Topological Indices and Related Descriptors in QSAR and QSPAR 2000;361
36. Barigye SJ, Marreto-Ponce Y, Pérez-Giménez F, Bonchev D. Trends in information theory-based chemical structure codification. *Mol Divers* 2014;18(3):673-86
37. Gálvez J, García-Domenech R, de Julián-Ortiz JV, Soler R. Topological approach to drug design. *J Chem Inf Comput Sci* 1995;35(2):272-84
- **In this article is described for the first time the potential role of molecular topology in drug design/discovery.**
38. Gálvez J, Gomez-Lechón M, García-Domenech R, Castell J. New cytostatic agents obtained by molecular topology. *Bioorg Med Chem Lett* 1996;6(19):2301-6
39. Caboni L, Gálvez-Llompарт M, Gálvez J, et al. Molecular topology applied to the discovery of 1-benzyl-2-(3-fluorophenyl)-4-hydroxy-3-(3-phenylpropionyl)-2 H-pyrrole-5-one as a non-ligand-binding pocket antiandrogen. *J Chem Inf Model* 2014;54(10):2953-66
- **A significant work about the use of molecular topology on drug design in the field of prostate cancer.**
40. Rios-Santamarina I, García-Domenech R, Gálvez J, et al. New bronchodilators selected by molecular topology. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8(5):477-82
41. García-March F, García-Domenech R, Gálvez J, Antón-Fos G, Julián-Ortiz Jd, Giner-Pons R, et al. Pharmacological studies of 1-(p-Chlorophenyl) propanol and 2-(1-Hydroxy-3-butanyl) phenol: Two new Non-narcotic analgesics designed by molecular connectivity. *J Pharm Pharmacol* 1997;49(1):10-15
42. Gálvez-Llompарт M, Zanni R, García-Domenech R. Modeling natural anti-inflammatory compounds by molecular topology. *Int J Mol Sci* 2011;12(12):9481-503
43. Gálvez-Llompарт M, Del Carmen Recio Iglesias M, Gálvez J, García-Domenech R. Novel potential agents for ulcerative colitis by molecular topology: Suppression of IL-6 production in raco-2 and RAW 264.7 cell lines. *Mol Divers* 2013;17(3):573-93
44. Gálvez-Llompарт M, Zanni R, Romualdi P, García-Domenech R. Selection of nutraceutical compounds as COX inhibitors by molecular topology. *Med Chem Res* 2013;22(7):3466-77
45. García-Domenech R, Zanni R, Gálvez-Llompарт M, Vicente de Julián-Ortiz J. Modeling anti-allergic natural compounds by molecular topology. *Comb Chem High Throughput Screen* 2013;16(8):628-35
46. Gálvez J, García Domenech R, García March F, Moliner Lluar R. inventors; Spain, assignee. Derivados del 1-(2,4-dimetil) fenil etanoná. *Compuestos*

- con aplicaciones farmacológicas por su actividad analgésica y antiinflamatoria. Patent Application Country: Spain. Application: Universitat de Valencia (Estudi General), Spain; Priority Application Country: P.9101134. Patent Application Date: 1991
47. Galvez J, Garcia Domenech R, Garcia March F, Moliner Llusar R. inventors: Spain, assignee. Derivados del 2-(1-propenil) fenol. Compuestos con aplicaciones farmacológicas por su actividad analgésica y antiinflamatoria. Patent Application Country: Spain. Application: Universitat de Valencia (Estudi General), Spain; Priority Application Country: P.9101134. Patent Application Date: 1991
48. Galvez J, Llompart J, Pal K, inventors: Spain, assignee. N,N-dicyclohexyl-(1S)-isoborneol-10-sulfonamide (MT103) and related compounds for the treatment of cancer. Patent Application Country: Application: US; US; Priority Application Country: US patent. US20040266732. 2004. Patent Application Date: 20040430; Priority Application Date: 20020920
- **Patent of novel anticancer compound identified by molecular topology.**
49. Llompart J, Galvez J, Pal K, inventors: Medisyn Technologies I, USA, assignee. Treatment of cancer with MT477 derivatives. Patent Application Country: Application: US; US; Priority Application Country: US patent. US20060014770. 2006. Patent Application Date: 20050711; Priority Application Date: 20040709
- **Patent of novel anticancer compound identified by molecular topology.**
50. Mazier D, Mahmoudi N, Farhadi K, et al. inventors Université Pierre et Marie CURIE-Paris VI, Fr., Université Paris Diderot - Paris 7, Universitat de Valencia, Assistance Publique - Hopitaux de Paris, assignees. Monensin derivatives for preventing and treating plasmodium infections. Patent Application Country: Application: WO; WO; Priority Application Country: EP patent. WO2009074649. 2009 0618; Patent Application Date: 20081211; Priority Application Date: 20071211
51. Galvez J, Llompart J, Land D, Pasinetti G, inventors Mount Sinai School of Medicine of New York University, USA, Medisyn Technologies I, assignees. Compositions for treatment of alzheimer's disease using A β -reducing and/or A β -anti-aggregation compounds. Patent Application Country: Application: WO; WO; Priority Application Country: US patent. WO2010114636. 2010. Patent Application Date: 20100405; Priority Application Date: 20090403
52. Garfield RE, Balaban AT, Seitz WA, inventors University of Texas System, USA, Texas A & M University System, Garfield RE, Balaban AT, Seitz WA, assignees. Emulsions of perfluoro compounds as solvents for nitric oxide (NO). Patent Application Country: Application: WO; WO; Priority Application Country: US patent. WO9738579. 1997. Patent Application Date: 19970416; Priority Application Date: 19960417
53. Kier LB, inventor Ohio State University, assignee. Metaionic thiazazole bactericides. Patent Application Country: Application: US; US patent. US3337398. 1967. Patent Application Date: 19651112
54. Young DC. Computational drug design: A guide for computational and medicinal chemists. John Wiley & Sons: 2009
55. Aguiar-Pulido V, Gestal M, Cruz-Monteagudo M, et al. Evolutionary computation and QSAR research. *Curr Comput Aided Drug Des* 2013;9(2):206-25
56. Materi W, Wishart DS. Computational systems biology in drug discovery and development: Methods and applications. *Drug Discov Today* 2007;12(7):295-303
57. Prado-Prado FJ, González-Díaz H, Santana L, Uriarte E. Unified QSAR approach to antimicrobials, part 2: Predicting activity against more than 90 different species in order to halt antibacterial resistance. *Bioorg Med Chem* 2007;15(2):897-902
- **A very interesting multi-target QSAR study in the area of antibacterial resistance.**
58. Zanni R, Galvez-Llompart M, Galvez J, Garcia-Domenech R. QSAR multi-target in drug discovery: A review. *Curr Comput Aided Drug Des* 2014;10(2):129-36
59. Speck-Planche A, Kleandrova VV, Luan F, DS Cordeiro MN. Computational modeling in nanomedicine: Prediction of multiple antibacterial profiles of nanoparticles using a quantitative structure-activity relationship perturbation model. *Nanomedicine* 2015;10(2):193-204
- **In this paper perturbation methods has been applied to predict multiple antibacterial profiles of nanoparticles.**
60. Casañola-Martin GM, Le-Thi Thu H, Pérez-Giménez F, et al. Multi-output model with Box-Jenkins operators of linear indices to predict multi-target inhibitors of ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Divers* 2015;19(2):347-56
61. Speck-Planche A, Cordeiro M. Enabling virtual screening of potent and safer antimicrobial agents against noma: Mtk-QSBER model for simultaneous prediction of antibacterial activities and ADMET properties. *Mini Rev Med Chem* 2015;15(3):194-202
62. González-Díaz H, Arrascaé S, Gómez-Sanjuan A, et al. General theory for multiple input-output perturbations in complex molecular systems. I. linear QSFR electromagnetism models in physical, organic, and medicinal chemistry. *Curr Top Med Chem* 2013;13(14):1713-41
63. Box GE, Jenkins GM. Time series analysis: Forecasting and control, revised edition Holden-Day; 1976
64. Speck-Planche A, Kleandrova VV, Luan F, DS Cordeiro MN. Computational modeling in nanomedicine: Prediction of multiple antibacterial profiles of nanoparticles using a quantitative structure-activity relationship perturbation model. *Nanomedicine* 2015;10(2):193-204
65. Kleandrova VV, Luan F, González-Díaz H, et al. Computational tool for risk assessment of nanomaterials: Novel QSTR-perturbation model for simultaneous prediction of ecotoxicity and cytotoxicity of uncoated and coated nanoparticles under multiple experimental conditions. *Environ Sci Technol* 2014;48(24):14686-94
66. Allen GI, Liu Z. A local poisson graphical model for inferring networks from sequencing data. *NanoBioscience*. *IEEE Transactions on* 2013;12(3):189-98
67. Leifer M, Poulin D. Quantum graphical models and belief propagation. *Annals Physics* 2008;323(8):1899-946
68. Langfeld K. Computational methods in quantum field theory. arXiv preprint arXiv:0711.3004. 2007

69. Wu W, Yang X, Pang Y, et al. A multifocus image fusion method by using hidden markov model. *Opt Commun* 2013;287:63-72
70. Vergara-Galicia J, Prado-Prado F, Gonzalez-Diaz H. Galvez-markov network transferability indices: Review of classic theory and new model for perturbations in metabolic reactions. *Curr Drug Metab* 2014;15(5):557-64
71. Riera-Fernandez P, R Munteanu C, Marin-Romalde R, et al. Markov-Randic indices for QSPR re-evaluation of metabolic, parasite-host, fasciolosis spreading, brain cortex and legal-social complex networks. *Curr Bioinform* 2013;8(4):401-15
72. Cayley A. On the mathematical theory of isomers. *Philos Mag* 1874;67(5):444-6
73. Tudoran M, V Putz M. Molecular graph theory: From adjacency information to colored topology by chemical reactivity. *Curr Organic Chem* 2015;19(4):359-86
74. Rouvray D. Topological Indices as Chemical Behavior Descriptors. 1985
75. Nandi S, C Bagchi M. Importance of kier-hall topological indices in the QSAR of anticancer drug design. *Curr Comput Aided Drug Des* 2012;8(2):159-70
76. Martínez-Santiago O, Millán-Cabrera R, Marrero-Ponce Y, et al. Discrete derivatives for Amm-Pairs as a novel Graph-Theoretical invariant for generating new molecular descriptors: Orthogonality, interpretation and QSARs/QSPRs on benchmark databases. *Mol Inform* 2014;33(5):343-68
77. Bonchev D. A simple integrated approach to network complexity and node centrality. Analysis of complex networks: from biology to linguistics. John Wiley & Sons; 2009. p 47-53
78. Mueller LA, Kugler KG, Graber A, et al. Structural measures for network biology using QuACN. *BMC Bioinform* 2011;12:492
79. Furuta B, Lekishvili G, Gumán I. A graph theoretical approach to cis/trans isomerism. *J Serbian Chemi Soc* 2014;79(7):805-13
80. Barak SC, Restrepo G, Villaveces JL, et al. Advances in mathematical chemistry and applications. 2014
81. Braun J, Guggisch R, Kerber A, et al. MOLGEN.CID A canonizer for molecules and graphs accessible through the internet. *J Chem Inf Comput Sci* 2004;44(2):542-8
82. Ghosh A, Nandy A. Graphical representation and mathematical characterization of protein sequences and applications to viral proteins. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2011;83:1-43
83. Emmert-Streib F, Dehmer M, Varmuza K, Bonchev D. Statistical modelling of molecular descriptors in QSAR/QSPR. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA; 2012
84. Mekenyan O, Bonchev D, Trinajstić N. A topological characterization of cyclic structures with acyclic branches. *Commun Math Comput Chem (MATCH)* 1981;11:145-68
85. Willett P. Similarity searching using 2D structural fingerprints. In: Jürgen Bajorath, editor. *Cheminformatics and Computational Chemical Biology*. Humana Press, New York, USA; 2011. p. 133-58
86. Podolyan Y, Karpis G. Common pharmacophore identification using frequent clique detection algorithm. *J Chem Inf Model* 2008;49(1):13-21
87. Ghosh P, Vracko M, Chattopadhyay AK, Bagchi MC. On application of constitutional descriptors for merging of quinoxaline data sets using linear statistical methods. *Chem Biol Drug Des* 2008;72(2):155-62
88. Talevi A, Bruno-Blanch LE. Virtual screening: An efficient tool for the development of new drugs in latin america. *Latin Am J Pharm* 2009;28(1):141-50
89. Talevi A, Enrique AV, Bruno-Blanch LE. Anticonvulsant activity of artificial sweeteners: A structural link between sweet-taste receptor T1R3 and brain glutamate receptors. *Bioorg Med Chem Lett* 2012;22(12):4072-4
90. Galvez J, Galvez-Llomparr M, Zanni R, García-Domenech R. Advances in the molecular modeling and quantitative structure-activity relationship-based design for antihistamines. *Expert Opin Drug Discov* 2013;8(3):305-17
91. García-Domenech R, Zanni R, Galvez-Llomparr M, Vicente de Julián-Ortiz J. Modeling anti-allergic natural compounds by molecular topology. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2013;16(8):628-35
92. Wang J, Land D, Ono K, et al. Molecular topology as novel strategy for discovery of drugs with A β lowering and anti-aggregation dual activities for Alzheimer's disease. *PLoS One* 2014;9(3):e92750
- **A relevant paper that demonstrates the usefulness of molecular topology in the search of field of Alzheimer.**
93. Zanni R, Galvez-Llomparr M, Morell C, et al. Novel cancer chemotherapy hits by molecular topology: dual akt and Bcr-tyrosinase inhibitors. *PLoS One* 2015;10(4):e0124244
- **Latest molecular topology application in the field of cancer.**
94. García-Domenech R, Galvez-Llomparr M, Zanni R, Galvez J. Modelling susceptibility to multi-target anaerobic bacteria by Molecular Topology. 8th International Symposium on Anaerobic Microbiology (ISAM8) Innsbruck; June 12-15; Austria; 2013
95. Vicente de Julián-Ortiz J, Zanni R, Galvez-Llomparr M, García-Domenech R. The prediction of human intestinal absorption based on the molecular structure. *Curr Drug Metab* 2014;15(4):380-8
96. Galvez-Llomparr M, Gálvez J, García-Domenech R, Kier LB. Modeling drug-induced anorexia by molecular topology. *J Chem Inf Model* 2012;52(5):1337-44
97. Galvez-Llomparr M, Gálvez J, García-Domenech R, Kier LB. Predicting dyspepsia inducers by molecular topology. *J Chem* 2012;2013
98. Belletta CL, Balozar DE, Vantrell MC, et al. Computer-guided drug repurposing: identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir. *Eur J Med Chem* 2015;93:338-48

Affiliation

Ricardo Zanni, María Galvez-Llomparr, Ramón García-Domenech & Jorge Galvez¹
¹Author for correspondence
 University of Valencia Avd. Molecular Connectivity and Drug Design Research Unit, Faculty of Pharmacy, Department of Physical Chemistry, V.A. Estellés, s/n 46100-Burjassot, Valencia, Spain
 Tel: +34963544291;
 Fax: +34963544892;
 E-mail: jorge.galvez@uv.es

EXPERT OPINION

1. Introduction
2. CADD strategies and developments
3. Conclusions
4. Expert opinion

QSAR methods for the discovery of new inflammatory bowel disease drugs

Ramón García-Domenech[†], María Gálvez-Llompert, Riccardo Zanni, María C. Recio & Jorge Gálvez

[†]University of Valencia, Faculty of Pharmacy, Department of Physical Chemistry, Molecular Connectivity and Drug Design Research Unit, Burjassot, Valencia, Spain

Introduction: Inflammatory bowel disease (IBD) represents an important class of chronic gastrointestinal tract disease. And although there are already several useful treatments to reduce and control the symptoms, there is still no cure. One drug discovery technique used is the computer-aided (*in silico*) discovery approach which has largely demonstrated efficacy. Computational techniques, when used in combination with traditional drug discovery methodology, greatly increase the chance of drug discovery in a sustainable and economical fashion.

Areas covered: This review aims to provide the most recent and important advances of *in silico* IBD drug discovery. While this review is mainly focused on QSAR methods, especially those based on molecular topology (MT), additional topics, such as docking or comparative field analysis are also addressed.

Expert opinion: IBD is a worldwide growing health concern that can only be currently treated in symptomatic and palliative way; thus, the search for new drugs is imperative. Computer-aided methods, which focus on the drug-receptor interaction, are essential tool in this regard. It is noted, however that a major problem is that although there are many known receptors associated with IBD, none of these have yet been found essential. The use of other approaches, including QSAR methodology, is certainly a complementary and attractive alternative; especially QSAR methods based on MT, which has proven successful in other drug discovery.

Keywords: computer-aided drug design, Crohn's disease, inflammatory bowel diseases, linear discriminant analysis, molecular topology, QSAR, ulcerative colitis

Expert Opin. Drug Discov. [Early Online]

1. Introduction

1.1 Inflammatory bowel diseases

First clustered cases of inflammatory bowel disease (IBD) symptoms were identified toward the end of the 19th century. Nowadays, IBD plays a main role in the area of chronic inflammatory diseases, second only to rheumatoid arthritis. Every year the number of patients affected by IBD is increasing, with millions of cases all over the world [1]. The most important and relevant IBD diseases are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). These illnesses are characterized by a chronic clinical course of relapse and remission status, associated with self-destructive idiopathic inflammation of the gastrointestinal tract [2,3]. The diagnosis of IBD is normally accomplished with flexible sigmoidoscopy and colonoscopy [4].

Although CD and UC present many features in common (mainly because they are both chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract), there are numerous and significant differences that distinguish each other, which is essential at the time to provide the adequate treatment. Distribution of lesions, microscopic

informa
healthcare

R. García-Domenech *et al.***Article highlights.**

- Nowadays, inflammatory bowel diseases (IBD) play a main role in the area of chronic inflammatory diseases, second only to rheumatoid arthritis. A cure for IBD does not exist yet, so it is crucial to find one.
- The use of computer-aided drug design (CADD) represents an exhaustive 'in silico' method in order to search and develop new drugs in an effective and sustainable way.
- Quantitative structure-activity relationship (QSAR) methodologies are one of the most important *in silico* techniques. Among them, the application of the molecular topology (MT) allows to perform the study regardless of the drug-receptor interactions.
- QSAR MT has been widely applied in the field of IBD research with excellent results, thereby demonstrating its effectiveness in the discovery of new leads.

This box summarizes key points contained in the article.

histopathology and alteration of the immunological system are only few of such differences [3]. UC is an inflammatory disease mainly localized in the large intestine. One of the main hypotheses about the UC etiopathogenesis is based on a possible alteration of the immunological response of the intestinal mucosa, caused by defects in the protective function of the intestinal epithelium toward the flora [5]. It is a disease capable to destroy the inner layers of the intestinal tract, but whose inflammatory processes are not able to penetrate and infiltrate inside the intestinal wall, up to the outermost layers. During UC's course there are frequent disturbances of motility and secretion. Acute exacerbations are habitual as well as diarrhea, ulcer bleeding and discharge of mucus and pus. Analyzing the affected regions, lots of stretches may be observed in which the inflammation can be chronic or acute. On the other hand, CD is likely to cause deeper inflammation within the intestinal wall, up to the outermost layers. Furthermore, the distribution of inflammatory processes is presented along the entire gastrointestinal tract including affectation of mouth and anus [5]. Both CD and UC are described as autoimmune disease, but whereas in UC there is a predominance of Th2 cells, in CD disease there is an hyperactive behavior of macrophages, Th17 cells and Th1 cells [3].

From the outset, the heterogeneity of the etiopathogenesis in IBD represented a main obstacle to outline the clinical profile of the disease, with lots of differences among age, gender, ethnicity and geography [1]. The huge number of factors that were considered as possible triggering agents gives an idea of how complicate and uncertain is trying to define which or what elements could promote IBD. Bacteria, fungi, virus, protozoa, vaccines, parasites, microparticles of aluminum, titanium, silicon oxides, calcium phosphate from the diet, tooth paste, dust or soil, drugs such as oral contraceptives and non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) dietary components (protein, fat, sugar, fruits, vegetables, margarine, dairy products, coffee, coca cola, fast food or glycol alkaloids

in potato, carrageenan in seaweeds and artificial sweeteners (saccharin and sucralose) [1], smoking and other factors like refrigeration (cold chain) are the main factors that were studied as possible inducers. Although IBD etiopathology is not completely elucidated, many mediators that are involved in the development of these diseases were identified, as for instance: cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-23, IL-6) [6], chemokines (CXCL10, RANTES, CCL2/MCP) [3], mitogen-activated protein kinase (MAPK) such as ERK, JNK, p38 [7,8] and T/B cells inhibitors [9]. In both UC and CD, leukocyte infiltration into the intestine seems to be a key event for the development and progression of IBD. Chemokines and their receptors orchestrate the molecular mechanism of tissue-specific and cell type-selective trafficking and retention of leukocytes. No less important are the genetic aspects of IBD. Looking at the epidemiological data, the influence of genetic factors in the pathogenesis of IBD is more than evident. Family studies show a higher incidence of IBD in patients with a positive family history than in those without it. Furthermore, twins' studies show how monozygotic have a much higher rate of disease concordance than dizygotic ones [10]. A study conducted by Farmer at the Cleveland Clinic demonstrated that among 522 CD patients, 187 cases (35.2%) had a positive family history, in 87 cases (16.7%) this being a first-degree relative. For UC, 93 of 360 (29.4%) had a positive family history, with 50 (15.8%) being first-degree relatives [11]. Cho and Brant reported that several population studies demonstrated the key influence of genetic factors in the development of chronic intestinal diseases. Various genetic mutations have also been related with IBD, some of them more connected with UC while others with CD. Certain unusual autosomal recessive mutations in the IL-10 gene encoding and cytokine were identified and related to the expression of CD in consanguineous parents. Mutations on NOD2 gene (linked to innate immune system) is one of the most significant genetic causes of CD. These are few examples of genetic causes of IBD [12].

Today, IBDs are worldwide disorders with high incidence especially in the UK, the USA, northern Europe and Australia [13]. With the passing of time, age groups in which a higher IBD incidence has been observed were identified. The first group is represented by population between 15 and 30 years, and another smaller between 50 and 70 years [2,14]. Just to mention some relevant data, in the USA, according to a study of commercially insured patients in 2009, published by Kappelman *et al.*, CD and UC overall prevalence in the adult population were 241 and 263 per 100,000, respectively. In the pediatric population, the overall prevalence of CD and UC were 58 and 34 per 100,000, respectively [15]. Kappelman *et al.* estimated that 1,171,000 Americans had IBD (565,000 CD and 593,000 UC). Of these, 62,000 were children thus, 5% of all IBD cases in the USA were of pediatric age (< 20 years) [15].

Regarding the therapeutic aspect and the treatment of the IBD, due to the fact that today there is still no cure for IBD, the main therapy of these diseases is groped to reduce

and contain the abnormal inflammatory response and allow the intestinal tissues to heal. In particular, treatments for IBD are aimed at improving the quality of life of the patient and reducing relapses by first controlling abdominal pain and diarrhea and then controlling the disease on the whole. Several types of medications are used to control inflammation or reduce symptoms caused by UC. Table 1 shows the most commonly used drugs [4].

Despite the therapeutic arsenal available to treat IBD, this disease has still a really devastating impact on the lifestyle of patients. Moreover, it has been known that treating a chronic disease, like IBD, represents a considerable economic burden to the healthcare system. As pointed out above, IBD is one of the most prevalent gastrointestinal diseases in western countries. It costs > US\$1.7 billion only in the USA. Usually, IBD patients require a lifetime care. To cite some data, only in the USA, IBD requires > 700,000 physician visits, 100,000 hospitalizations and causes disability in 119,000 patients each year. Over the long term, up to 75% of patients with CD and 25% of those with UC will require surgery [16]. Taking an example of biological drug (the newest and most efficient drugs for the treatment of IBD) such as anti-TNF drugs, they are able to greatly improve the quality of life for the patients, but the cost of these drugs is impressive. Moreover, a third of the patients won't respond to this type of treatment and a 30–50% will become intolerant or unresponsive to these antibodies. Therefore, there is an urgent need to find new and more effective drugs in order to treat and hopefully heal these diseases [17]. As obvious, healthcare budget is limited, so it is extremely important to develop sustainable strategies resulting in the discovery and development of new drugs active in IBD [18].

The growing interest in IBD is evidenced by the increasing number of citations matching the keywords 'inflammatory bowel disease' from 121 in 1980 up to 2986 in 2012, as reported in Scifinder Scholar database.

1.2 Computer-aided drug design techniques

Nowadays, informatics and computational methods play an essential role in the process of research and development of new drugs. Computer-assisted tools provide a basic help during the whole process, since the drug identification up to the discovery of the pharmacological role and during the preclinical testing until the marketing [19].

The most critical step in drug discovery continues to be the identification and optimization of lead compounds in a rapid and cost-effective way. An estimate about the cost and time to get a new drug into the marketplace is around 7–12 years and 1.2 billion US dollars. Furthermore, 5 out of 40,000 compounds tested in animals reach human testing and only one out of five compounds reaching clinical studies is approved. This represents a tremendous burden in terms of time, money and human resources [20].

Therefore, the pharmaceutical industry promptly started to acknowledge the advantages of the computer-aided drug

discovery (CADD) methods. It can be stated that CADD involves 'all computer-assisted techniques used to discover, design and optimize compounds with desired structure and properties' [20].

Another great advantage of the *in silico* methods for pharmaceutical industry is that they may provide valuable information about effectiveness and absorption, distribution, metabolism and elimination (ADME)/Tox properties of drug candidates [19]. In addition, *in silico* approaches include the use of virtual screening, a technique that permits to probe to the bottom chemical libraries searching for chemical structures expected to perform as new drugs [20].

So, the steady progress in computer science, particularly the continuous progress in hardware and software, has made possible an increasing power for mathematical calculations. Hence, it is feasible running complex algorithms capable to determine in advance the physico-chemical and biological properties of the new drugs [19].

Today, the number of organic and inorganic compounds so far known overpass 70 million [21]. Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) has determined > 445,000 crystal structures of organic and metal-organic molecules. The DrugBank database [22] contains 6711 drug entries including 1447 Food and Drug Administration (FDA)-approved small molecule drugs, 131 FDA-approved biotech (protein/peptide) drugs, 85 nutraceuticals and 5080 experimental drugs. Additionally, 4227 non-redundant protein (i.e., drug target/enzyme/transporter/carrier) sequences are linked to these drug entries [20]. As we can see, we hardly know 0.6% of crystal structures from the overpass 70 million registered organic and inorganic compounds. Furthermore, just 1.5% of the crystallized structure compounds are registered as drug entries by DrugBank database [22].

In order to identify novel applications of these unexplored organic and inorganic compounds, the European program for the evaluation of chemicals (REACH: Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) [23,24] has realized the importance of alternative *in silico* approaches for predictive evaluation of chemical toxicity, just to reduce dramatically the need for animal testing and thereby saving time and expenses [20].

Altogether, we can classify the actual methods for drug discovery into two main types: those basically focused on target identification (*Bioinformatic approach*): genomics [25], proteomics [25], systems biology [26] and pathway analysis [27], and those devoted to "lead finding and optimization" (*Chemoinformatic approach*) [28], molecular databases, combinatorial chemistry, high-throughput screening (HTS), data mining, virtual screening, quantitative structure-activity relationship (QSAR), *in silico* ADME/Tox and bioisosteric design [29].

Computational methods based on the QSAR methodology have increased their importance in drug design and discovery since the formulation of the Crum-Brown and Fraser's paradigm in 1868. According to it, the physical, chemical and biological properties of compounds depend on their molecular structure [19]. Although this assumption seems evident to us

R. García-Domenech *et al.***Table 1. Most commonly used therapeutic arsenal to treat UC.**

Class	Drugs	Profile	Side effects
Aminosalicylates	5-Aminosalicylic acid Sulfasalazine Balsalazine Mesalamine Olsalazine	Anti-inflammatory agents, often used as the first-line treatment in early disease	Nausea, headache, rash, fever, dizziness, fatigue, reversible male infertility
Corticosteroids	Prednisone Budesonide Methylprednisolone	Powerful drugs which reduce the inflammation in the intestines and can aid in the treatment of fistulas	Diabetes mellitus, osteoporosis, high blood pressure, cataracts, thinning of skin, mental problems, acute psychosis, mood swings, infections, acne, hirsutism, gastritis and peptic ulcer disease
Immunomodulators	Azathioprine Mercaptopurine 6-Mercaptopurine Cyclosporin Methotrexate	These drugs control the immune response and can help maintain a remission and reduce the dose of corticosteroids	Anorexia, nausea, vomiting, infections, cancer, allergic reactions, pancreatitis, low white blood cell count, bone marrow suppression, liver dysfunction, kidney dysfunction, neuropathy, development of lymphomas
Monoclonal antibody	Infliximab Adalimumab Etanercept	Biopharmaceutical drugs that treats autoimmune diseases by interfering with TNF	Fever, chills, hives, decreased blood pressure or difficulty breathing, infections, cancer, abdominal pain, liver dysfunction, low white blood cell count, pain or itching at the injection site, hypersensitivity reactions
Antibiotic	Metronidazole	Antibiotic with immune system effects	Nausea, diarrhea, headache, rash, dizziness, loss of appetite

Based on [4].

nowadays, it was not at all at that time, among other reasons because the notion of chemical structure itself was – and at some extent continues to be so – fuzzy.

Moreover, as for its definition, QSAR applied to drug research could be defined as 'mathematical relationships linking chemical structure and pharmacological activity in a quantitative manner' [20].

Within this framework, molecular topology (MT) [30] used jointly to the QSAR methods has demonstrated to be an excellent approach for a rapid and accurate prediction of many physicochemical and biological properties [20,31–33].

MT can be defined as a part of mathematical chemistry consisting of the topological description of molecular structures under the graph-theory framework. Such description deals basically with the connectivity of the atoms forming the molecule and must be based on numerical descriptors, which are independent of the chemical structure's conformation or in general of three-dimensional (3D) features. Physical magnitudes as molecular descriptors are not being considered in this scenario [20].

Molecular descriptors are numbers that characterize the molecular structure or a part of it. That is, they are numbers which contain information derived from the structural representation of the molecule. Summarizing, MT's singularity can be drawn in the following terms [20]:

- 1) It is a pure mathematical framework in which molecular structure is profiled.

- 2) It is a very efficient approach for drug discovery, either by screening large databases of compounds or by designing novel compounds following the reverse process (property – structure). Furthermore, it is easy to computerize.

The use of MT approaches in QSAR has grown up along the later years in an exponential way. The topological topic covers over 20% of all papers on QSAR. A search carried out with the SciFinder Scholar database [34] disclosed that about 3466 out of 17,664 papers dealing with QSAR included topological descriptors [20].

This review will especially focus on the contribution, carried out along the later years, of QSAR and MT methodology in the design and discovery of new IBD drugs.

2. CADD strategies and developments

The process of Research and Development (R&D) for a new drug consists of several stages. The first is the identification of the biological target on which the drug will perform its action. The most common mechanism of action (MOA) is to activate or block a given function. Usually, the target site is a protein or a part of it, so that the best way to proceed is to collect a certain number of compounds selected from libraries or databases and test how they interact with that site. In order to achieve this goal, HTS methods are used. When a good candidate is found, it is improved in order to obtain best possible

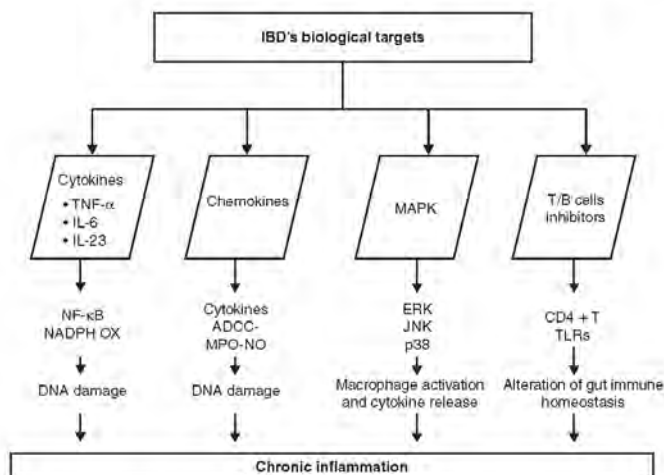


Figure 1. IBD biological targets [3,6-9,88].

fitting to the target and less side effects. Among CADD strategies, QSAR approach is one of the most relevant at the time to search and develop new drugs. A significant aspect of QSAR techniques is that they can be applied regardless of the actual drug-receptor interaction. In other words, it is possible to look for new drugs without explicit knowledge of the mechanisms of action. The second stage consists of getting the QSAR model. To do this, a set of selective descriptors are chosen so ensuring the model to distinguish whether a given compound will work or not. Descriptors can be defined as numeric variables that describe molecular structure or specific parts of it.

Afterward, the following step is validating the model to determine its reliability and efficiency and also to check the entire building process. To validate the model, some of the most common strategies are: internal validation or cross-validation with leave-one-out (LOO) or leave-some-out (LSO) [35], true external validation by application of the model to an external dataset and Y-randomization test [36].

One of the most used validation criteria is LOO cross-validated R^2 (LOO q^2). Often, a $q^2 > 0.5$ is considered as a proof of the high predictive ability of the model. However, this criterion is not always right. The high value of q^2 can be the necessary but not the sufficient condition for the model to have a high predictive power [37]. The true external validation is the most acceptable validation method for the predictive ability of a QSAR model, since the compounds of the test set are not included in the training set.

Y-randomization test also ensures the robustness of a QSAR model. The dependent variable (activity) is randomly

shuffled and a new QSAR model is developed using the original independent variables. The new QSAR models (after several repetitions) are expected to have low R^2 and q^2 values. If the opposite happens, then an acceptable QSAR model cannot be obtained for the specific modeling method and data [38].

The next step, once the model is validated, focuses on determining its applicability domain (AD), that is, the range of values in which the model is reliable. Again, four methods are used: range-based [39], geometric, distance-based and probability density distribution methods [40]. For more information see the references [41-43].

Finally, the last step consists of carrying out virtual screening to search for potential active compounds.

In the case of inflammatory diseases, such as IBD, it is somehow complex to identify a single or a particular hit target as a unique receptor. IBD involve a countless number of mediators which the disease can be related to (Figure 1). In such cases, when carrying out a pharmacological study, a drastic reduction of the scope of search is often necessary by selecting a unique target. Techniques such as the 'global QSAR' [44] and 'multi-tasking QSAR' [45] enable to find mathematical relations between huge number of lead compounds and different mechanisms of action or pharmacological targets, so allowing the creation of a direct link between a particular disease and a mathematical model. Frequently, in order to arrange an efficient QSAR model it is worthy considering that the training set might include compounds with unknown mechanism or even following multiple mechanisms. In other cases, a single global model may

R. García-Domenech *et al.*

1. Multilinear regression analysis (MLRA)
2. Linear discriminant analysis (LDA)
3. Four machine learning (ML) models \implies 3.1. Support vector machine (SVM)
 \implies 3.2. k-nearest neighbor (k-NN)
 \implies 3.3. Back-propagation neural network (BPNN)
4. C4.5 decision tree (C4.5 DT)
5. Genetic function approximation (GFA)
6. Partial least squares (PLS) analysis

Figure 2. Statistical modeling techniques applied to QSAR models.

not work if the structures in the training set are very different each other or if there are different and/or unknown mechanisms of action [46]. One of the main advantages of the QSAR methods is that they can be self-consistent in the sense that it is possible discarding the outliers. Moreover, to solve this problem, the so-called *locally weighted learning methods* are very useful. The base of learning algorithms is to accomplish function approximation with step-wise linear models, where the models are allocated as needed avoiding the risk of overfitting. The self-adaptation is particularly interesting when the operative space and complexity of the function to be approximated are not known in advance, as for instance the case of high dimensional control systems in which only unrealistic upper bounds of such values are employed [47].

Nowadays, the scene that a researcher faces when studying new potential IBD drugs candidates is extremely vast. Numerous statistical strategies are used in the CADD approach.

2.1 Statistical modeling techniques

Statistical techniques are necessary tools to QSAR models with highest performance. Following are some of the most significant (Figure 2).

2.1.1 Multilinear regression analysis

A regression containing two or more explanatory variables is called a multiple regression. The term linear refers to the fact that all the variables in the equations are linear, that is, nor raised to powers greater than one neither transformed into mathematic functions such as logarithms, sine, inverse, etc. [48].

Statistical parameters indicating the quality of the regression are, among others, the regression coefficient, r , as well as the F (Fisher-Snedecor) parameter. The main conceptual limitation of all regression techniques is that they obtain only mathematical *relationships*, but not necessarily disclose the underlying *causal mechanism*.

2.1.2 Linear discriminant analysis

Linear discriminant analysis is a statistical technique used to distinguish between two or more categories or objects. In our particular case, this technique permits to classify chemical compounds on the basis of their pharmacological activity; thanks to physical, chemical or topological variables descriptors. By using algorithms such as the Furnival-Wilson's, we get linear equations usually referred to as discriminant equations, which are capable of separating two or more objects into different metric or topological spaces [49]. One of the LDA limitations is that it implicitly assumes a Gaussian distribution of data and also that the discriminating factor is the mean and not the variance (r^2). This is why it is necessary to be careful to reduce the risk of overfitting data.

2.1.3 Four machine learning models

2.1.3.1 Support vector machine

Support vector machines (SVMs, also support vector networks) [50] are supervised learning models with associated learning algorithms that analyze data and recognize patterns, used for classification and regression analysis. It is based on finding a linear plane with maximum margin to separate two classes of objects. This way, categorical input can be transformed into numeric input (same as in LDA) and categorical outputs can be dealt as multiple binary outputs. The main limitation of SVM is represented by the fact that it employs a large amount of time to process the training set of huge databases [51].

2.1.3.2 k-Nearest neighbor

In pattern recognition, the k-nearest neighbor algorithm (k-NN) [35] is a method for classifying objects based on closest training examples in the feature space. The idea behind is finding a number K of similar data points from the training set and then interpolate the output value, which can be either the top value for categorical output or the average (weighted average) value for numeric output. K is a tunable parameter which needs to be cross-validated to pick the best value. The main advantage of k-NN is its simplicity because there is no

need to train the model. Instead, the weakness of k-NN is its inability to handle a large number of dimensions. Also, the weighting of different factors needs to be hand tuned (by cross-validation on different weighting combination), which is often a very tedious process [51].

2.1.3.3 Back-propagation neural network

Back-propagation neural network (BPNN) [52] is a common method of training artificial neural networks (ANNs) so as to minimize the objective function. BPNN are useful in certain situations as, for instance, when there are large amounts of input/output data. Typically, the ANNs use non-linear algorithms into three different information layers (input-hidden-output) in a similar way as the human brain processes information. ANN has gained a great popularity during the later years [53].

2.1.4 C4.5 decision tree

A decision tree is a decision support approach that uses a tree-like graph to take decisions. One of the most used algorithms is C4.5 [54], which was developed by Ross Quinlan. The essential learning pathway is to recursively divide the training data into buckets of homogeneous members, using the most possible discriminant criteria. The measurement of homogeneity is based on the output label: when it is a numeric value, the measurement will be the variance of the bucket and when it is a category, the measurement will be the entropy or Gini index of the bucket. The training process ends when there is no significant gain in homogeneity by further splitting the tree. The members of the bucket represented at leaf node, will decide the prediction so that majority wins when the output is a category and average wins when the output is numeric. The great advantage of trees is that they are very flexible in terms of the data type of input and output variables which can be categorical, binary or numeric. Also it only requires a short number of input data to carry out the analysis. The limitations are due to the fact that each decision boundary at each split point is a concrete binary decision. Moreover, the decision criteria only consider one input attribute at a time, so that it is impossible to combine multiple input variables. Another weakness of trees is that once learned it cannot be updated incrementally. When new training data come, you have to retrain every data from the start and then create a new tree [55].

2.1.5 Genetic function approximation

Genetic algorithms (GAs) are derived from an analogy with the evolution of DNA [56]. They are especially good at searching problem spaces with a large number of dimensions, as they conduct a very efficient directed sampling of the large space of possibilities, using not only linear polynomials but also higher-order polynomials, splines and Gaussians. GAs focus on three basic processes: crossovers, mutation and selection of individuals. Initially, many individual solutions are gathered together to make a randomly generated population. GAs are based on the Darwinian theory of 'survival of the

fittest'. Hence, depending on the fitness function, the best possible solutions are selected from the pool of individuals. The fitter individuals have greater chances of its selection and higher the probability that its genetic information will be passed over to future generations. The main problem of GAs is the complexity of the resource requirements. Often it can end as a wasting time process. GA practitioners often run many copies of the same code with the same inputs to get statistically reliable results [55,57].

2.1.6 Partial least squares analysis

Partial least squares (PLS) analysis [58,59] is a method for constructing predictive models when the factors are many and highly collinear. It is used typically when the number of data at our disposal is much smaller than the number of variables to correlate with; this is called overfitting. In such cases, although there may be many variables, only a few of them, called underlying or latent factors, account for most of the variation in the response. The PLS background is trying to extract these latent factors, accounting for as much of the manifest factor variation as possible while modeling the responses well. In PLS, the X- and Y-scores are chosen so that the relationship between successive pairs of scores is as strong as possible. In last analysis, it is a way to make depend the property Y with a set of variables that are linear combinations of others. Such a way we reduce X to a few main components [60].

2.2 Molecular modeling techniques applied to IBD

If the statistical modeling techniques must be efficient to optimize an IBD model, no less important are the molecular modeling techniques applied for the search and development of new IBD agents. Some of these techniques focus on two-dimensional (2D) or 3D features. QSAR approach represents one of the most important. Any QSAR technique must be able to reach an equation relating molecular descriptors (constitutional, molecular connectivity and shape indices, topological descriptors, electro-topological state descriptors, etc.) with the experimental property under study. Furthermore, predictive 2D-QSAR models, 3D-QSAR models and 3D target- and ligand-based approaches have also been developed for the search of IBD agents. Some of the approaches are discussed below.

2.2.1 Comparative molecular field analysis

It is a 3D-QSAR technique based on data from known active molecules which is usually applied when the 3D receptor structure is unknown. All the information requested are the activities and the 3D structures of the molecules [61]. The procedure consists of building, using PLS, contour maps showing favorable and unfavorable regions for electropositive, electro-negative or for steric substituents at given positions of molecular scaffold. Prediction for the test set can be made either by a qualitative inspection of the contour maps or quantitatively

R. García-Domenech *et al.*

by calculating the fields of these molecules and by inserting the grid values into the PLS model.

The comparative molecular field analysis (CoMFA) big dependence on molecular alignment is one of the most frequent criticisms from its detractors [62].

2.2.2 Comparative molecular similarity indices analysis

Comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA) is analogous to CoMFA [63] but it also provides values of hydrophobic (H), hydrogen bond (H-bond) donor (D) and H-bond acceptor (A) field information. CoMSIA is thought to be less affected by changes in molecular alignment than CoMFA. It also enables smoother contour maps by using the Gaussian-type distance dependence on the molecular similarity indices computed [62]. As pointed above, the principal drawback of both methods is that all molecules have to be aligned and such alignment can affect the final CoMFA/CoMSIA outcomes. A good alignment is necessary and quality of such alignment can be subjective and time-consuming, what results in models that are often non-reproducible. Despite the aforementioned drawbacks, many CoMFA/CoMSIA models have been developed for drug design and molecular modeling studies [64].

2.2.3 Computational docking simulations

The aim of the docking method is to detect the placement of a ligand in the binding site of a receptor, typically the binding pocket of a protein, and to estimate the binding affinity [65]. The methods can be performed in different ways as discussed below.

2.2.3.1 Fragment-based molecular docking in inhibitor discovery

The application of fragment docking to inhibitor screening, varies from probing binding hot spots with compounds at the level of given moieties, such as benzene, to screening more complex fragments from databases for low-affinity inhibitors. Later on, it is feasible docking and ranking drug-like molecules through fragment-based approach. Recently, there have been new developments in all of these areas, particularly in virtual screening of fragment databases, which has proven to be a reliable and successful procedure [66].

2.2.3.2 Probing protein binding sites by docking functional groups

Since the MCSS (multi-copy simultaneous search) method originally introduced by Karplus, fragment docking has been used to identify putative ligand binding pockets on the target proteins. The methods consist of placing copies of fragments on the protein surface and then identify the lowest-energy ones. Given the high computational cost, the fragments are small functional groups or moieties such as benzene and toluene. So, a map of the binding pocket can be obtained what may guide us on relevant features for protein-ligand interaction [66].

2.2.3.3 Virtual screening of fragment libraries

Docking has been also successfully used to screen fragment libraries and identify inhibitors with high efficiency (evaluated through the binding free energy per non-hydrogen atom) against the desired targets [66].

2.2.3.4 Fragment-based docking and scoring of drug-like molecules

The fragment-based divide-and-conquer formalism may be used either to dock and score existing drug-like molecules or to build up new compounds *in silico* [66].

Recently, fragment-based approaches and computational docking methods have come onto the main stage of drug discovery. The joint use of both provides new choices for efficiently screening chemical space and the search of novel inhibitors. Together with applications in *de novo* design, fragment docking has been successfully implemented in a wide range of techniques for *in silico* library screening. Furthermore, the development of fragment-based docking approaches will run parallel to advances in experimental fragment screening techniques and growth in structural and biochemical data of binding fragment and vice versa [66].

2.2.4 Ligand-based drug design approaches

This is probably one of the most relevant on pharmacophore profiling. The basic concept is to interpret ligand-receptor interaction in order to generate and visualize an advanced 3D structure [67]. The goal is establishing the adequate ligand conformations that best superimpose the mapping. Hence, SARs of structurally diverse and conformationally informative molecules are needed, so that we can identify common elements and generate the conformations that better align to the mapping. Originally, the automated pharmacophore generation methods were performed by comparing the generated pharmacophores with those previously published in the literature, either handcrafted and/or strongly supported by experimental data. An alternative approach consists of fitting compounds known to be active but not included in pharmacophore model generation. Ideally, the model should also explain inactive molecules as well; for instance, it would be possible to determine if the inactive compounds are covering regions outside the volume of the pharmacophore. The use of 3D databases enables the evaluation pharmacophore hypotheses by retrospective virtual screening. A database of compounds can be enriched with compounds showing the same activity as the ones used to profile the pharmacophore.

Afterward, the database can be either partitioned into those matching and those not matching the pharmacophore, or scored and ranked according to their fit to the pharmacophore. Ideally, all active compounds are retrieved or appear high in the ranked list. Database screening can also be used to decide between alternative hypotheses that may have been generated. The principal drawback is that pharmacophore queries often tend to produce large number of false-positive

hits, especially important features such as excluded volumes, are left out [68].

As mentioned above, IBD is characterized by the existence of numerous mediators, whose origin is yet unknown. The result from a bibliographic search with SciFinder Scholar: 'Inflammatory bowel disease and ligand-based' resulted in only six papers [1-6], what together with the heterogeneity of mediators, illustrates the lack of information in this field. Since the very first studies carried out on the mediators, the relevant role played by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is noteworthy [69,70].

However, as the mediators' research unfolded, new target raised and new pathways were identified, thereby increasing the number of therapeutic alternatives. For example, in 2009 Paradisi *et al.* described how nuclear factor-kappaB (NF- κ B) pathway activation in IBD may produce tumor formation by triggering anti-apoptotic survival signals to the epithelial cells [71].

Today, the number of mediators under investigation has increased significantly. So, in 2010 Shah *et al.* carried out a 3D-QSAR study as well as a pharmacophore identification of new compounds as inhibitors of p38 α mitogen-activated protein, via IL-1 β and TNF- α [72]. The most recent papers by Bai *et al.* and Moussa *et al.* clearly indicate that the development of many new targets is underway. Some of them are Th17 related retinoic acid receptor (RAR), Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) [73], macrophage migration inhibitory factor (MIF), IL-1 β and TNF- α , serine proteases activating protease-activated receptor 2 (PAR-2) and estrogen receptor (ER)-ligand [74].

2.3 Examples of application of molecular modeling and QSAR studies to potential IBD agents

The inhibition of TNF- α converting enzyme (TACE) has been explored by Yong *et al.* [75] as a feasible therapy for the treatment of rheumatoid arthritis and CD. This work is the first attempt for the classification prediction of TACE inhibitors on more diverse data set (1202 compounds), including different chemical classes of hydroxamic-acid based TACE inhibitors and also highly selective non-hydroxamate TACE inhibitors. In this work four machine learning (ML) models, SVM, k-NN, BPNN and C4.5 decision tree (C4.5 DT) were trained and tested by using a diverse set of 443 TACE inhibitors and 759 non-inhibitors for identifying novel TACE inhibitors. The molecular descriptors used include molecular connectivity and shape indices, electrotopological state descriptors, quantum chemical, geometrical and physicochemical properties.

In k-NN, the model gives the best prediction for TACE inhibitors (98.32%), and the SVM bears the best prediction for non-inhibitors (99.51%). Both the k-NN and SVM model give the best overall prediction accuracy (98.45%). This study suggests that ML methods, particularly SVM, are potentially useful for facilitating the discovery of TACE

inhibitors and for exhibiting the molecular descriptors associated with TACE inhibitors.

In addition, given that in this study a large group of structurally heterogeneous compounds (about 1200) was screened, the predictive models found can be particularly useful in the search for novel TACE inhibitors.

Moreover, a QSAR analysis using generic function approximation (GFA) and molecular descriptors was developed by Yang *et al.* [76] to predict the TNF- α inhibition of a series of coumarin derivatives. Twenty-six TACE inhibitors were included in the study. The biological activities of 26 molecules measured as IC₅₀ ranged from 1 nM to 40 μ M against human TACE enzyme. Different types of descriptors were calculated for every molecule in the study using Discover Studio 2.5 and pre-ADMET. These methods include constitutional, electrostatic, geometrical, physicochemical and topological descriptors.

The application of GFA algorithm allowed the construction of a high-quality predictive model and disclosed additional information not provided by standard regression techniques.

The regression equation selected was:

$$\begin{aligned} \text{pIC}_{50} = & -120.91 + 12.37(\text{Balaban_index_IX}) \\ & - 736.95(\text{FNSA3}) - 0.858(\text{LogD}) \\ & + 1.587(\text{Num_Atoms}) + 1.054(\text{Num_Chains}) \\ & + 0.0703(\text{WNSA2}) \end{aligned} \quad (1)$$

$$N = 26, r^2 = 0.9214, q^2 = 0.7978, \text{RMSE} = 0.2687$$

where appeared constitutional descriptors, such as Num_Atoms and Num_Chains, positively correlated with biological activity; electrostatic descriptors as FNSA3 and WNSA2; a topological descriptor weighted on relative electronegativity, namely the Balaban_index_IX and a physicochemical parameter, LogD, which represents the lipophilicity of the molecule.

The presence of six variables in the predictive model obtained with 26 compounds suggests the need of a comprehensive validation thereof to avoid overfitting problems. Validation is performed correctly, including external test, which makes this model useful for finding new coumarin TNF- α inhibitors.

Based on this QSAR analysis, 12 coumarin derivatives were synthesized and assayed for TNF- α inhibitor activity. Compound 15I (Figure 3), showed the most potent *in vitro* inhibitory activities, 0.28 and 60 nM of IC₅₀ values for TACE inhibition and the cellular TNF- α inhibition, respectively.

In another interesting work, Wu *et al.* [77] evaluated novel synthetic chalcone derivatives as anti-inflammatory agents (Figure 3). To study the effects of various substituents on the activity, a QSAR analysis was made with 54 synthetic chalcones. All compounds were evaluated for anti-inflammatory activity against TNF- α and IL-6.

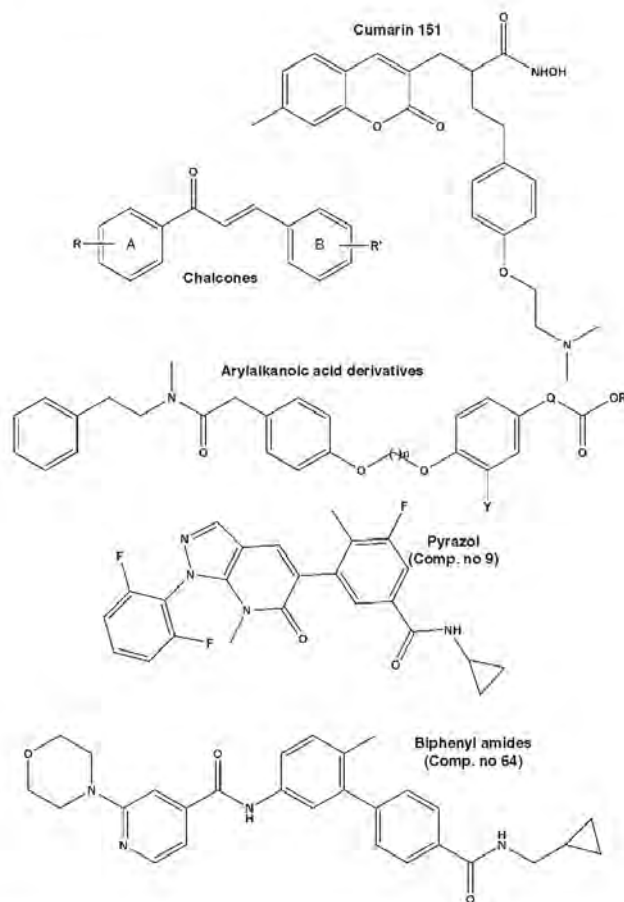
R. García-Domenech *et al.*

Figure 3. Chemical structures used in the QSAR analysis.

Adapted from [75-79,81,83]

The best statistically significant model for IL-6 was:

$$\begin{aligned} \text{IL-6} = & 1540.9(\text{R-GETAWAY1}) \\ & - 373.3(\text{R-GETAWAY2}) \\ & - 19.6(3\text{D-MoRSE}) - 12.6 \end{aligned} \quad (2)$$

$N = 49$ $r^2 = 0.74$ $r^2_{\text{adj}} = 0.72$ $s = 11.9$ $F(3,45) = 42.7$,
 $p < 0.00001$

where GETAWAY descriptors appear. It has a high adjusted squared regression coefficient ($r^2_{\text{adj}} = 0.72$) and it is capable to account for > 74% of the variance in the experimental activity.

The predictive function selected for IL-6 only contains the geometrical molecular descriptors. R-GETAWAY descriptors can be calculated with different atomic weightings, such as van der Waals volume, electronegativity, atomic mass and polarizability. R-GETAWAY1 (weighted by atomic van der

Table 2. MT models to predict potential repositioning of novel IBD drugs.

Property	Predictive equation	Equation no.
NF-κB inhibition	$DF_1 = 0.633 \times G1 + 24.29 \times {}^0C : 3.62 \times 2D + 2.094 \times D_0 + 0.288 \times V3 - 30.94$ N = 95, F = 9.5 and $\lambda = 0.354$	1
UC drugs*	$DF_2 = 3.15 \times Seige - 10.28 \times GAT56p - 261.66 \times X3A - 0.06 \times D/Dr_05 + 52.73$ N = 31, F = 13.3 and $\lambda = 0.328$	2

*Drugs active against UC.

λ , Wilks' lambda; DF, Discriminant function; F, F-Snedecor; MT, Molecular topology; N, Number of compounds employed in building the model; NF-κB, Nuclear factor-κappaB; UC, Ulcerative colitis.

Waal) and R-GETAWAY2 (weighted by atomic Sanderson electronegativity) [78]. The third variable, 3D-MorSE descriptor, reflects 3D structural information based on electron diffraction. Nevertheless, no statistically significant correlation was obtained with these descriptors for TNF- α , although the QSAR study revealed that the presence of electron-withdrawing groups in B-ring and electron-donating groups in A-ring (Figure 3) of chalcones was important for inhibition of IL-6. Despite the modest quality of the predictive model selected, the results suggest that some chalcones may be promising as anti-inflammatory agents.

The p38 α MAPK has become an attractive target for the treatment of many diseases such as rheumatoid arthritis, IBD and CD. In this way, different QSAR studies have been built:

Lan *et al.* [79], developed 3D-QSAR and molecular docking studies with 59 pyrazole derivatives p38 α MAPK inhibitors (Figure 3). CoMFA and CoMSIA were applied to determine the structural requirements for potency in inhibiting p38 α MAPK.

Both the CoMFA and CoMSIA models provided the significant correlations of biological activities with steric, electrostatic, hydrophobic, hydrogen bond donor and acceptor fields. In comparison with CoMSIA, the CoMFA method was found to afford a slightly better predictability. In the docking analysis to investigate the protein-ligand interactions, compound 9 (Figure 2), one of the most active compounds in the dataset, was docked into the ATP-binding site of p38 α MAPK. To visualize the binding mode between the protein and ligand, MOLCAD (molecular computer-aided design) program was employed. MOLCAD calculates and displays the surfaces of channels and cavities, as well as the separating surface between protein subunits [80].

Therefore, it is noteworthy that joint use of 3D-QSAR and docking is a good strategy for developing novel p38 α MAPK inhibitors.

Within this same framework, Ambure *et al.* [81] carried out a 3D-QSAR and molecular docking analysis of biphenyl amide derivatives as p38 α MAPK inhibitors. This study correlates the p38 MAP kinase inhibitory activities of 80 biphenyl amide derivatives. Compound 64 (Figure 3) was selected as a template molecule and was considered as a bioactive

conformation. Just to disclose the detailed intermolecular interactions between the biphenyl amide derivatives and p38 α MAP kinase, an automated docking program, namely Glide (5.5), was used [82]. The resulting model from CoMFA and CoMSIA exhibited excellent r^2 values of 0.979 and 0.942, and r^2_{cv} values of 0.766 and 0.748, respectively. Both 3D-QSAR and docking provided crucial clues that can guide a successful design of biphenyl derivative analogs highly active on p38 α MAP kinase.

Junek *et al.* [83] have realized a QSAR study with leukotriene B $_4$ (LTB $_4$), a potent pro-inflammatory mediator responsible for the biosynthesis of leukotrienes. LTB $_4$ plays an important role in various immune and inflammatory diseases including IBD. In this work, a series of arylalkanoic acid derivatives (Figure 3) were prepared and their inhibition of LTB $_4$ biosynthesis was evaluated. Regression analysis showed slightly different parabolic dependences of this activity on lipophilicity of α -methyl and α -unsubstituted alkanolic acid derivatives.

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = -15.62 + 6.574(\log P) - 0.524(\log P)^2 \quad (3)$$

N = 19, $r = 0.891$, $s = 0.102$, F = 36.6, $p = 0.005$

The QSAR analysis shows that the most active compounds belong to 2-arylpropanoic acids derivatives, with lipophilicity close to $\log P_{opt} = 6.97$. The results of UC inhibition have showed that 4 from 12 evaluated compounds were more active than the standard sulfasalazine. The shortcoming of this work is its application limited only to arylalkanoic acid derivatives.

The authors' research group, namely *Molecular Connectivity & Drug Design research unit* (MCDDRU) at the University of Valencia (Spain), has applied the MT-QSAR (QSAR using topological descriptors) approach to the search of novel IBD drugs. As per the authors' knowledge, this is the only work so far using only topological descriptors which has yielded new drugs in the field. Indeed, the results have been excellent since several of the compounds selected demonstrated anti-UC activity both *in vitro* and *in vivo*, in murine models (M. Gálvez-Llompert, private communication, work in progress).

R. García-Domenech *et al.*

Table 3. Descriptors used in selecting novel IBD drugs by MT.

Symbol	Name	Description	Equation no.
G1	Topological charge index of order 1		1
6C	Quotient of connectivity indices of order 0	$0\chi/0\chi^v$	
2D	Difference of connectivity indices of order 2	$2\chi - 2\chi^v$	
4D ₁	Difference of connectivity indices of order 4 and type path	$4\chi^p - 4\chi^v$	
V3	Number of vertices with topological valence 3		
Seige	Eigen value sum from electronegativity weighted distance matrix		2
SATS6p	Geary autocorrelation - lag 6/weighted by atomic polarizabilities		
X3A	Average connectivity index chi-3		
D/Dr05	Distance/detour ring index of order 5		

IBD: Inflammatory bowel disease, MT: Molecular topology.

In order to select novel IBD agents, two equations identifying NF- κ B inhibitors and anti-UC agents were obtained (Table 2) [84]. Different types of descriptors have been employed on these two models as mentioned in Table 3.

Once the models were arranged, a virtual screening on different databases was performed and several compounds were selected as potential anti-UC agents. The most representative ones are shown in Figure 4.

Some other authors applied MT-QSAR methodology for modeling TNF- α inhibitory activity. Jain and Agrawal [85] performed a QSAR study with a group of xanthines, pteridinediones and related compounds showing TNF- α inhibitory activity. The relationship between the inhibitory activity and the molecular descriptors calculated with the Dragon 3.0 software, was established by stepwise multiple regression analysis using Systat 10.2 and Valstat programs [86].

In a very recent work, Arab-Chamjangali and Ashrafi [87] developed a model for the prediction of inhibitory activity against TNF- α of thiazole and thiophene derivatives. In this case, a non-linear model based on ANN, was used. The chemical structure of each compound was characterized by more than a thousand molecular descriptors obtained from Dragon software. An ANN model with 7-4-1 architecture was proposed. Predictive capability of the selected model was evaluated by prediction of pEC₅₀ of the external test. The results obtained in this paper demonstrate that the combined use of non-linear models and molecular descriptors may be worthwhile in the search of new thiazole and thiophene derivatives active against TNF- α .

3. Conclusions

Under the term 'inflammatory bowel disease (IBD)', a set of gastrointestinal tract chronic diseases has been gathered showing a significant prevalence over general population worldwide. Considering that up to date there is not a definitive treatment for IBD, the use of *in silico* methods to seek for new effective drugs is a necessary strategy. Among these methods stand out three, namely those based on the drug-receptor interactions, the ones based on pharmacophore profiling and the so-called QSAR. Altogether, it is noteworthy that the

in silico approaches have allowed significant advances in the knowledge of IBD drugs during the last years. This is due principally to the progress in the knowledge of MOA. Thus, the two MOAs best studied, namely TACE and IL-6, have provided a base for the rational search and design of new drugs, being one of the most important discoveries that the joint use of 3D-QSAR and docking is a good strategy, as demonstrated, for example, by the works of Lan *et al.* [79] and Ambure *et al.* [81]. Altogether, the chemical features playing important role in the drug activity are the steric, electrostatic and hydrophobic ones. Also the presence of hydrogen donors and acceptors as well as electron withdrawing and donating groups, is shown to be important. This is what is expected from complex interactions of drug-receptor as the ones we are dealing with.

Furthermore, the QSAR method using topological indices as molecular descriptors (MT-QSAR) has demonstrated to be, also in this pharmacological field, a very effective tool. In fact, the work developed so far at MCDDRU has allowed obtaining not only of robust statistical models capable of accurate and reliable predictions, but also of new active compounds that are currently under further development. These compounds, which were active both *in vitro* and *in vivo*, will hopefully constitute a benchmark in the treatment of IBD and will enable the rising of novel drugs in the near future.

4. Expert opinion

Nowadays, the methods based on the use of computers (*in silico*) are fundamental for the search of more effective and less costly novel drugs. This also applies to the so-called IBD, which includes UC and CD and it is all the most important because the few active drugs that have been found hitherto, act on a variety of receptors that are not yet well known. Among the best-studied receptors stand TACE (TNF- α converting enzyme) and IL-6.

From the *in silico* studies of these receptors found in the literature, it stands that the joint use of methods such as 3D-QSAR and docking is particularly effective. Moreover, from other approaches, such as CoMFA and CoMSIA, it follows that there are relevant molecular features determining drug's

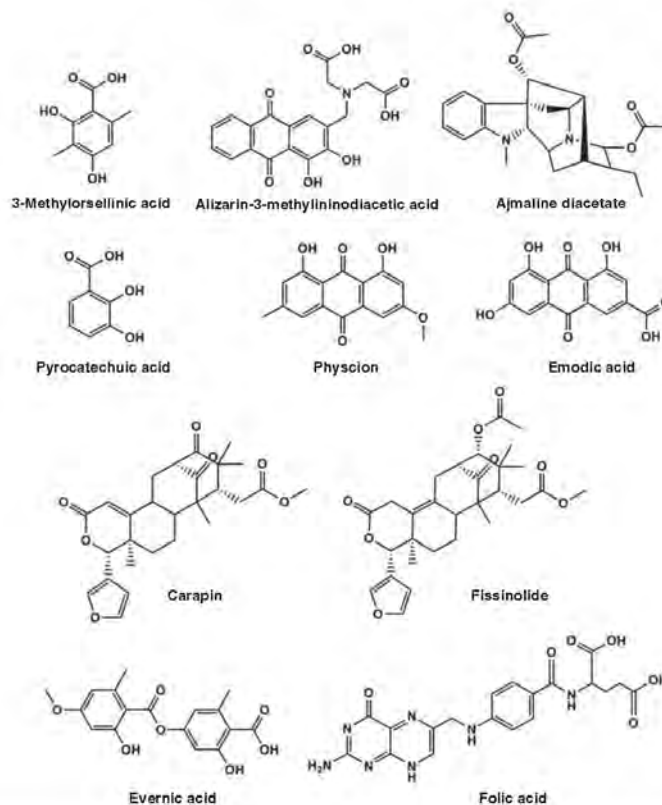


Figure 4. Compounds selected as potential candidates as IBD drugs by MT-QSAR approach [84].

activity as for instance steric, electronic and hydrophobic parameters as well as the presence of hydrogen and electron donors and acceptors.

Despite these significant achievements, the lack of detailed knowledge of the MOAs involved indicates that the methods based on drug-receptor interaction are less effective here as compared with those diseases where the receptors are well known. This is why the *in silico* formalisms that do not require an explicit knowledge of the actual MOA (drug-receptor interaction) are needed. This is the case of MT-QSAR, which, as mentioned above, has already yielded new IBD agents active *in vitro* and *in vivo*.

The MT-QSAR approach seeks a mathematical or topological pattern which is behind the structural features responsible for the activity (pharmacophore). This pattern has the

potential not only to disclose novel active compounds but also to identify the MOA involved. Furthermore, these methods enable predicting the properties of existing compounds potentially active on IBD as well as working in a reverse pathway, that is, the design of new lead drugs with the desired pharmacodynamic and pharmacokinetic profiles, in a tailor-made way. This is feasible because topological descriptors, contrary to physical or geometric ones, encode an algebraic description of molecular structure itself and hence represent a direct link between structure and activity. Furthermore, it is important to realize that, contrary to what's generally accepted, topological indices are not 2D descriptors, because the graph topology of any chemical compound, understood as the atom connectivity inside the molecule, is independent of the spatial dimensionality. This is so because topological

R. García-Domenech *et al.*

indices themselves are just mathematical variables that are outside any geometric or physical dimension. In other words, the topology of the graph is identical in one-dimension (1D), 2D or 3D and is also independent of time, provided that the graph remains connected, that is, that none of the bonds in the molecule is broken down. This notion is precisely defined in mathematics, where there is a net distinction between metric and topological spaces. Of course, the fact that very important 3D features cannot be profiled by MT is one of its clear weaknesses, but this drawback can be overcome by using alternative techniques such as docking and molecular dynamics. It is evident that, although this is not a minor issue, it is clearly outweighed by the great interest of its performance in generating big pipeline of new drug candidates with high probability of activity. The compounds resulting to be active might be refined later on by other techniques taking into account the 3D features, such as some of the techniques mentioned throughout this work.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (●) or of considerable interest (●●) to readers.

- Qin X. Etiology of inflammatory bowel disease: a unified hypothesis. *World J Gastroenterol* 2012;18(15):1708-22
- Yadav PK, Liu Z. Current strategies for the treatment of ulcerative colitis. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2009;3:65-72
- Nishimura M, Kuboi Y, Muramoto K, et al. Chemokines as novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. *Ann NY Acad Sci* 2009;1173:350-6
- Xu CT, Meng S, Pan BR. Drug therapy for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2004;10(16):2311-17
- Suresnder V, Sapna S, Mahima K, Aruna R. Colon: diseases and approaches: an overview. *IJPT* 2011;3(3):1197-213
- Rasimandresy RA, Rappaport J, Zagury JF. Anti-cytokine therapeutics: history and update. *Curr Pharm Des* 2009;15(17):1998-2025
- Feng YJ, Li YY. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Digest Dis* 2011;12(5):327-32
- Coskun M, Olsen J, Seidelin JB, Nielsen OH. MAP kinases in inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta* 2011;412(7-8):513-20
- Himmel ME, Hardenberg G, Piccirillo CA, et al. The role of T-regulatory cells and toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. *Immunology* 2008;125:145-53
- Zhang H, Massey D, Tremelling M, Parkes M. Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. *Br Med Bull* 2008;87:17-30
- Farmer G. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989;24(s170):64-5
- Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011;140:1704-12
- Xu C, Li S, Pan B. Current drug therapy in ulcerative colitis. *J Chin Clin Med* 2009;4(7):410-20
- Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(Suppl 1):S3-9
- Kappelman MD, Moore KR, Allen JK, Cook SF. Recent trends in the prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in a commercially insured US population. *Dig Dis Sci* 2012; Epub ahead of print
- Butcher L. Digestive diseases: epidemiology, economics, and the pipeline. *Biotechnol Healthc* 2008;5(4):12-13
- Marsal J, Agace WW. Targeting T-cell migration in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 2012;272(5):411-29
- Irving P. The future developments in inflammatory bowel disease care. *Frontline Gastroenterol* 2012;3(Suppl 1):42-6
- A recent work that analyzes the future scene in the field of IBD treatments.
- Cunningham MJ. Genomics and proteomics. The new millennium of drug discovery and development. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2006;44:291-300
- A paper reporting the importance of genomics and proteomics on drug discovery.
- Mareš W, Wishart DS. Computational systems biology in drug discovery and development: methods and applications. *Drug Discov Today* 2007;12:7-8
- Sivachenko AY, Yuryev A. Pathway analysis software as a tool for drug target selection, prioritization and validation of drug mechanism. *Expert Opin Ther Targets* 2007;11(3):411-21
- Velingkar VS, Polkharna G, Kolhe NS. Chemoinformatics: a novel tool in drug discovery. *Int J Curr Pharm Res* 2011;3(1):71-5

Declaration of interest

The authors are supported by the 'Ministerio de Economía y Competitividad', Spain (project SAF2009-13059-C03-02 and SAF2009-13059-C03-01). M Gálvez-Llompart acknowledges the 'Atracció de talents' Fellowship awarded by the University of Valencia to carry out this study. J Gálvez serves as an advisor to Medisyn Technologies, Inc.

23. Langdon SR, Ertl P, Brown N. Bioisosteric replacement and scaffold hopping in lead generation and optimization. *Mol Inform* 2010;29(5):366-85
24. Barril X, Luque FJ. Molecular simulation methods in drug discovery: a prospective outlook. *J Comput Aided Mol Des* 2012;26(1):81-6
25. Gálvez J, Gálvez-Llompарт M, García Domenech R. Molecular topology as a novel approach for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2012;7(2):133-53
- **This review describes the potential role of MT in drug design/discovery.**
26. Robinson JM. An introduction to early Greek philosophy: the chief fragments and ancient testimony with connecting commentary. Houghton Mifflin College Div; 1968
27. García-Domenech R, Gálvez J, et al. Some new trends in chemical graph theory. *Chem Rev* 2008;108(3):1127-69
- **A complete review on graph theory and MT.**
28. Gálvez-Llompарт M, Gálvez J, et al. Modelling drug-induced anorexia by molecular topology. *J Chem Inf Model* 2012;52(5):1337-44
- **Use of MT to search for drug-induced anorexia. It is the first time, as per the authors' knowledge, that MT is used to predict side effects of drugs.**
29. Gálvez J, Gálvez-Llompарт M, et al. Advances in the molecular modeling and quantitative structure-activity relationship based design for antihistamines. *Expert Opin Drug Discov [Early Online]* 2013;8(3):305-17
30. Dinuța MV, Guțman I, Lorente J. Molecular topology. "Babes Bolyai" University; Romania
31. CAS REGISTRY [Internet]. Available from: <http://www.cas.org/index.html>
32. Knox C, Law V, Jewison T, et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res* 2011;39(Database issue):D1035-41
33. Schoeters G. The REACH perspective: toward a new concept of toxicity testing. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2010;13(2-4):232-41
34. Worth AP, Bassan A, De Bruijn J, et al. The role of the European Chemicals Bureau in promoting the regulatory use of (Q)SAR methods. *SAR QSAR Environ Res* 2007;18(1-2):111-25
35. Mahobia NK, Patel RD, Sheikh NW, et al. Validation method used in quantitative structure activity relationship. *Dev Pharm Chem* 2010;2(5):260-71
36. Wold S, Eriksson L, Clemens S. Statistical validation of QSAR results. In: *Chemometric methods in molecular design*. 1995. p. 309-38
37. Golbraikh A, Tropsha A. Beware of q². *J Mol Graph Model* 2002;20:269-76
38. Tropsha A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Mol Informatics* 2010;29:476-88
39. Nikolova-Jeliazkova N, Jaworska J. An approach to determining applicability domain for QSAR group contribution models: an analysis of SRC KOWWIN. *Altern Lab Anim* 2005;33(5):461-70
40. Jaworska JS, Nikolova-Jeliazkova N, Aldenberg T. Review of methods for applicability domain estimation. Report, The European Commission - Joint Research Centre; Ispra; 2004
41. Sahigara F, Mansouri K, Ballabio D, et al. Comparison of different approaches to define the applicability domain of QSAR models. *Molecules* 2012;17:4791-810
42. Dimitrov S, Dimitrova G, Pavlov T, et al. Stepwise approach for defining the applicability domain of SAR and QSAR models. *J Chem Inf Model* 2005;45:839-49
43. Papa E, Kovarich S, Gramatica P. Development, validation and inspection of the applicability domain of QSPR models for physicochemical properties of polybrominated diphenyl ethers. *QSAR Comb Sci* 2009;28:790-6
44. Enoch SJ, Cronin MTD, Schultz TW, Madden JC. An evaluation of global QSAR models for the prediction of the toxicity of phenols to *Tetrahymena pyriformis*. *Chemosphere* 2008;71(7):1225-32
45. Liu Q, Zhou H, Liu L, et al. Multi-target QSAR modelling in the analysis and design of HIV-HCV co-inhibitors: an in-silico study. *BMC Bioinformatics* 2011;12:294-314
46. Liu R, Tawa G, Wallqvist A. Locally weighted learning methods for predicting dose-dependent toxicity with application to the human maximum recommended daily dose. *Chem Res Toxicol* 2012;25:2216-26
47. Nakanishi J, Farrell JA, Schaaf S. Composite adaptive control with locally weighted statistical learning. *Neural Netw* 2005;18:71-90
48. Howard M. Data analysis: multilinear regression and principal component analysis. *Pract Spectrosc* 2008;2007:151-88
49. Coomans D, Massart DL, Kaufman J.. Optimization by statistical linear discriminant analysis in analytical chemistry. *Anal Chim Acta* 1979;112(3):97-122
50. Han Lian Y, Zheng Chan J, Xie B, et al. Support vector machines approach for predicting druggable proteins: recent progress in its exploration and investigation of its usefulness. *Drug Discov Today* 2007;12(7-8):304-13
51. Yogesh S, Pradeep KB, Omprakash S. Machine learning: a review of classification and combining techniques. *Int J Comput Sci Sec* 1:1
52. Wichard JD, Bandholtz S, Groetinger C, Kuehne R. Topology preserving neural networks for peptide design in drug discovery. *Lecture notes in bioinformatics* 2009. p. 232-41
53. Howden WE, Eichhorst P. Proving properties of programs from program traces. In: Miller E, Howden WE, editors. *Tutorial: software testing and validation techniques*. IEEE Computer Society Press; New York: 1978
54. Quinlan JR. *C4.5: programs for machine learning*. Morgan Kaufmann; San Mateo, CA; 1993
55. Hamman F, Drewe J. Decision tree models for data mining in hit discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2012;7(4):341-52
56. Rogers D, Hopfinger AJ. Application of genetic function approximation to quantitative structure-activity relationships and quantitative structure-property relationships. *J Chem Inf Comput Sci* 1994;34(4):854-66

R. García-Domenech *et al.*

57. Dutton DM, Controy GV. A review of machine learning. *Knowl Eng Rev* 2000;12:341-67
- **A complete review about machine learning techniques.**
58. Van De Waterbeemd H. Chemometric methods used in drug discovery. Structure property correlations in drug research. 1996. p. 55-80
59. Desai PV, Coutinho EC. QSAR in drug discovery and development. *Asian Chem Lett* 2001;5(2):77-86
- **This paper reports how QSAR could be an efficient tool to the discovery and development of new drugs.**
60. Rajalabhi T, Kvalheim OM. Multivariate data analysis in pharmaceuticals: a tutorial review. *Int J Pharm* 2011;417(1-2):280-90
61. Sandip S, Farooqui NA, Easwari TS, Bishwabara R. CoMFA - 3D QSAR approach in drug design. *Int J Res Dev Pharm Life Sci* 2012;1(4):167-75
63. Klebe G, Üte A, Mierzner T. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J Med Chem* 1994;37:4130-46
62. Wei HY, Chen GJ, Chen CL, Lin TH. Developing consensus 3D-QSAR and pharmacophore models for several beta-secretase, farnesyl transferase and histone deacetylase inhibitors. *J Mol Model* 2012;18(2):675-92
64. Myini KZ, Xie XQ. Recent advances in fragment-based QSAR and multi-dimensional QSAR methods. *Int J Mol Sci* 2010;11(10):3846-66
65. Bienstock RJ. Computational drug design targeting protein-protein interactions. *Curr Pharm Des* 2012;18(9):1240-54
66. Chen Y, Pohlhaus DT. In silico docking and scoring of fragments. *Drug Discov Today Technol* 2010;7(3):e149-56
67. Sukumar N, Das S. Current trends in virtual high throughput screening using ligand-based and structure-based methods. *Comb Chem High Throughput Screen* 2011;14(10):872-88
- **A paper that describes the efficacy of virtual HTS to the search of new drugs.**
68. Leach AR, Gillet VJ, Lewis RA, Taylor R. Three-dimensional pharmacophore methods in drug discovery. *J Med Chem* 2010;53:539-58
69. Chinyu SG, Gary WD. The role of PPAR γ in inflammatory bowel disease: a potential therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2000;2(4):293-306
70. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, et al. Intestinal anti-inflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J Exp Med* 2005;201(8):1205-15
71. Paradisi A, Maitte C, Coisieux MM, et al. Nectin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(40):17146-51; S17146/1-S17146/3
72. Shah UA, Deokar HS, Kadam SS, Kulkarni VM. 3D-QSAR and pharmacophore identification of novel imidazolyl benzimidazoles and imidazo [4,5-b]pyridines as potent p38 α mitogen activated protein kinase inhibitors. *Int J Chem Tech Res* 2010;2(1):194-204
73. Bai A, Lu N, Zeng H, et al. All-trans retinoic acid ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by shifting Th1 to Th2 profile. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30(6):399-406
74. Moussa L, Bezirar V, Cartier SC, et al. A low dose of fermented soy germ alleviates gut barrier injury, hyperalgesia and faecal protease activity in a rat model of inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2012;7(11):e49547
75. Yong C, Xue-gang Y, Wei L, Ying X. Prediction of novel and selective TNF- α converting enzyme (TACE) inhibitors and characterization of correlative molecular descriptors by machine learning approaches. *J Mol Graph Model* 2009;28:236-44
76. Yang JS, Chun K, Park JE, et al. Structure based optimization of chromen based TNF- α converting enzyme (TACE) inhibitors on S10 pocket and their quantitative structure-activity relationship (QSAR) study. *Bioorg Med Chem* 2010;18:8618-29
77. Wu J, Li J, Cai Y, et al. Evaluation and discovery of novel synthetic chalcone derivatives as anti-inflammatory agents. *J Med Chem* 2011;54:8110-23
78. Consonni V, Todeschini R, Pavan M. Structure/response correlations and similarity/diversity analysis by GETAWAY descriptors I. Theory of the novel 3D molecular descriptors. *J Chem Inf Comput Sci* 2002;42:682-92
79. Lan P, Huang ZJ, Sun JR, Chen WM. 3D-QSAR and molecular docking studies on fused pyrazoles as p38 α mitogen-activated protein kinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 2010;11:5357-74
80. SYBYL X Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA
81. Ambure PS, Gangwal RP, Sangamwar AT. 3D-QSAR and molecular docking analysis of biphenyl amide derivatives as p38 α mitogen-activated protein kinase inhibitors. *Mol Divers* 2012;16:377-88
82. Glide, Version 5.5, (2009) Schrödinger, LLC, New York
83. Junek R, Kverka M, Jandera A, et al. Antileukotrienic phenethylamido-derivatives of arylalkanoic acids in the treatment of ulcerative colitis. *Eur J Med Chem* 2009;44:332-44
84. Gálvez-Llompart M, Recio MC, García-Domenech R. Topological virtual screening: a way to find new compounds active in ulcerative colitis by inhibiting NF- κ B. *Mol Divers* 2011;15(4):917-26
- **A work describing the application of MT to find novel active compounds against UC.**
85. Jain HK, Agrawal RK. Topological descriptors in modeling tumor necrosis factor alpha. Inhibitory activity of xanthines, pretetridinones and related compounds. *Internet Electron J Mol Des* 2007;6:218-28
86. Gupta AK, Babu MA, Kaskhedikar SG. VALSTAT: validation program for quantitative structure activity relationships studies. *Indian J Pharm Sci* 2005;46:396-402
87. Arab-Chamjangali M, Ashrafi M. QSAR study of necroptosis inhibitory activities (EC50) of [1,2,3]thiadiazole and thiophene derivatives using Bayesian regularized artificial neural network and calculated descriptors. *Med Chem Res* 2013;22:392-400
88. Pan MH, Lai CS, Wu JC, Ho CT. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:32-45

Affiliation

Ramón García-Domenech¹ PhD,
María Gálvez-Llompart^{1,3}, Riccardo Zanni^{1,3},
María C Recio² PhD & Jorge Gálvez^{1,3} PhD

¹Author for correspondence

¹Full professor in Physical Chemistry,
University of Valencia, Faculty of Pharmacy,
Department of Physical Chemistry,
Molecular Connectivity and Drug Design
Research Unit, Avda. V.A. Estellés,
s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain
E-mail: ramon.garcia@uv.es

²Full professor in Pharmacology,
University of Valencia, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmacology,
Avda. V.A. Estellés, s/n,
46100 Burjassot, Valencia, Spain

³Research Fellow,
University of Valencia, Faculty of Pharmacy,
Department of Physical Chemistry,
Molecular Connectivity and Drug Design
Research Unit, Burjassot, Valencia, Spain

