



Application of molecular topology for predicting the leishmanicidal activity of a group of compounds derived from pyrrolo [1,2- α] quinoxaline

Title in Spanish: *Aplicación de la Topología Molecular para la predicción de la actividad frente a leishmania de un grupo de compuestos derivados del pirrol [1,2- α] quinoxalina*

Alberto Jiménez Mateo¹, Rebeca Santano García¹, Aurora Martín Sarmiento¹, Lourdes García Guidet¹, Jorge Gálvez² y Ramón García-Domenech^{2,*}

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología, Facultad de Farmacia. Universitat de Valencia. Avd. V.A Estellés. s/n, 46100-Burjassot. Valencia, Spain. ²Departamento de Química Física, Facultad de Farmacia. Universitat de Valencia. Avd. V.A Estellés. s/n, 46100-Burjassot. Valencia, Spain.

ABSTRACT: Leishmaniasis is present among the six greatest diseases reported in the WHO's Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Nowadays, the available drugs show high toxicities or resistance has been developed. Therefore the search of new compounds that possess anti-leishmania activity is an attractive chemotherapeutic option. In the present study we have applied molecular topology and multilinear regression analysis to develop a QSAR model able to predict the activity of a series of pyrrolo [1,2- α] quinoxaline-derived compounds against *L. major* and *L. donovani*. Once validated the selected topological models, a molecular screening has been performed and new quinoxaline derivatives with potential anti-leishmania activity have been selected.

RESUMEN: La leishmaniasis se encuentra entre las seis enfermedades más importantes en el Programa Especial de Investigación y Adiestramiento en Enfermedades Tropicales (TDR) de la OMS. Los fármacos disponibles actualmente presentan altas toxicidades o se han desarrollado resistencias para los mismos, de modo que buscar nuevos compuestos que posean actividad anti-leishmánica es una opción quimioterapéutica atractiva. En el presente estudio hemos utilizado la topología molecular y el análisis de regresión multilínea para el desarrollo de un modelo QSAR capaz de predecir la actividad frente a *L. major* y *L. donovani* de un grupo de compuestos derivados del pirrol [1,2- α] quinoxalina. Validados los modelos topológicos seleccionados, se ha realizado un cribado molecular y se han seleccionado nuevos derivados de la quinoxalina con potencial actividad anti-leishmánica.

*Corresponding Author: ramon.garcia@uv.es

Received: October 3, 2016 Accepted: November 7, 2016

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 3 (2016), pp. 317-323

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leishmaniasis: enfermedad y epidemiología

Con el nombre de leishmaniasis se designa a un conjunto de enfermedades causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania* que engloba dos subgéneros: *Leishmania* (en el Viejo Mundo) y *Viannia* (en el Nuevo mundo) (1, 2). Su transmisión se produce exclusivamente por la picadura de dípteros flebotomos de los géneros *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (3). La enfermedad en humanos se presenta bajo cuatro formas: leishmaniasis cutánea (LC), cutánea difusa (LCD), visceral o kala-azar (LV) y mucocutánea (LMC) (4, 5). Cada año se estiman 1,3 millones de nuevos casos y entre 20.000 y 30.000 muertes, según datos de la Organización Mundial de la Salud (5). La LC está más ampliamente distribuida, con aproximadamente un tercio de los casos de leishmaniosis

totales (1, 6).

Cada especie de *Leishmania* tiene un perfil epidemiológico con diferentes vectores, huéspedes reservorios y distribución geográfica (3). Así la epidemiología de la leishmaniasis es extremadamente compleja y puede verse alterada por cambios en algún punto de la triada epidemiológica (humanos, reservorios y flebotomos) (5).

La quimioterapia sigue siendo el principal tratamiento para esta enfermedad debido a la poca disponibilidad de vacunas en un futuro cercano (7). De esta forma, es imprescindible la búsqueda de nuevos fármacos contra esta enfermedad para evitar resistencias.

1.2. Tratamiento para la leishmaniasis

El tratamiento para la leishmaniasis se ha basado desde la antigüedad en el empleo de metales pesados tóxicos, concretamente los antimoniales pentavalentes como el

antimoniato de meglumina y el estibogluconato de sodio (8, 9), sin embargo estos presentan una toxicidad hepática y cardíaca elevada (5) y han desarrollado resistencia derivada de su utilización durante seis décadas, sin embargo es en los últimos 15 años cuando se han evidenciado realmente estas resistencias clínicamente, actualmente, en las zonas no tratadas previamente los pacientes responden al tratamiento pero en zonas endémicas el tratamiento no es eficaz, zonas tales como India han prohibido su utilización (9, 10). Aun así, se siguen empleando como tratamientos de primera línea en zonas endémicas (9). La anfotericina B y sus derivados lipídicos surgieron como alternativa a las resistencias desarrolladas frente a los antimoniales. Ambos presentan toxicidad, aunque los derivados lipídicos tienen una toxicidad significativamente menor que la anfotericina B (5). Se emplean como tratamientos de segunda línea y aunque hay pocos reportes de resistencias, la aparición de estas es de esperar (9), por ejemplo se describen resistencias asociadas al cambio en la composición de esteroides de las membranas de los promastigotes (10). La paromomicina es un antibiótico aminoglucósido cuya toxicidad es muy reducida (WHO), es eficaz, presenta bajo coste y el tiempo de administración es corto, lo cual lo hace un buen candidato de tratamiento de primera línea para la leishmaniasis visceral (9). Isetionato de pentamidina se emplea raramente por sus efectos adversos graves (5) y por la aparición de resistencias se cree que debido a la presencia de transportadores de pentamidinas (8, 10). La miltefosina se desarrolló inicialmente como antineoplásico oral, pero después se demostró que posee actividad anti-leishmánica. Presenta toxicidad hepatorenal y es potencialmente teratogena, por lo que no debe emplearse en embarazadas (5, 9). Además, se han reportado los primeros casos de resistencias y hay riesgo de que aparezcan más casos (9, 10). Los derivados azólicos como el ketoconazol, fluconazol, itraconazol son antifúngicos orales que presentan una eficacia variable en función de las especies y además presentan hepatotoxicidad (5, 8).

1.3. Método QSAR

Para evitar laboriosos trabajos de laboratorio en búsqueda de nuevos fármacos anti-leishmánicos, nos

servimos de técnicas englobadas dentro de la topología molecular.

La topología molecular es una nueva disciplina dentro de la topología, que analiza cuáles son las posiciones de los átomos dentro de las moléculas pero no se ocupa del estudio de aspectos como la estructura tridimensional, tipos de enlaces o ángulos entre ellos. Mediante esta disciplina, se obtiene el cálculo de índices para caracterizar estructuralmente un compuesto y poder encontrar compuestos similares (11).

Dentro de esta disciplina encontramos los métodos QSAR, que relacionan cuantitativamente la actividad de una molécula con su estructura mediante una serie de descriptores (12). Estos descriptores son el resultado final de un procedimiento de la lógica matemática, que transforma la información química, codificada dentro de una representación simbólica de una molécula, en números útiles (13) y que nos permiten calcular la actividad de una molécula mediante su estructura molecular (12).

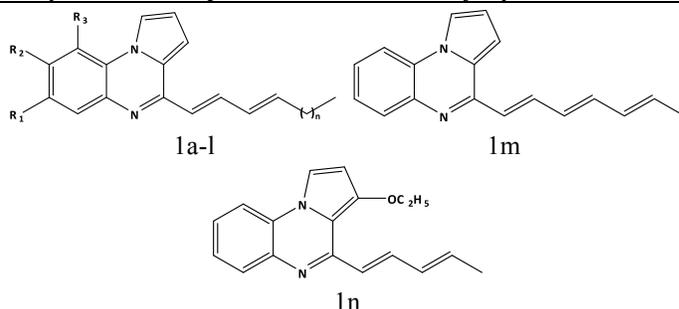
De esta forma la topología molecular ha resultado de gran utilidad para la búsqueda de nuevos fármacos antiparasitarios (14, 15) y compuestos activos frente a vectores transmisores de enfermedades parasitarias (16). Por este motivo la topología molecular es un campo muy atractivo para la búsqueda de nuevos fármacos en esta área terapéutica.

Así en este estudio se investigan las propiedades anti-leishmánicas de una serie de compuestos derivados de alcaloides quinolínicos frente a las especies de *Leishmania donovani* y *Leishmania major* con el objetivo de elaborar modelos QSAR predictivos de la actividad inhibitoria 50 (IC₅₀) mediante el empleo de la topología molecular y el análisis de regresión multilínea.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Compuestos analizados

En este estudio se trabaja con un grupo de compuestos derivados del pirrol [1,2- α] quinoxalina con propiedades anti-leishmánicas que ya han sido testadas experimentalmente de las cuales conocemos su concentración inhibitoria, IC₅₀, así como su estructura química (17) (Tabla 1).

Tabla 1. Estructura química y actividad antiparasitaria frente a *L. major* y *L. donovani* del grupo de compuestos estudiados.

Comp. N°	R ₁	R ₂	R ₃	n	IC ₅₀ (μM)	
					<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>
1a	H	H	H	0	4.7	9.8
1b	CH ₃ O	H	H	0	3	5.3
1c	H	CH ₃ O	H	0	2.7	5.4
1d	H	H	CH ₃ O	0	3.3	7.2
1e	H	H	H	2	3.9	7.6
1f	CH ₃ O	H	H	2	2.8	8.6
1g	H	CH ₃ O	H	2	7.4	7.6
1h	H	H	CH ₃ O	2	3.9	9.9
1i	H	H	H	3	3.7	13.7
1j	CH ₃ O	H	H	3	2.5	12.1
1k	H	CH ₃ O	H	3	4.4	14.7
1l	H	H	CH ₃ O	3	5.8	11.6
1m					1.2	10.5
1n					1.5	4
Pentamidine					4.3	5.5

2.2. Descriptores moleculares

Mediante el software de diseño de moléculas ChemDraw Professional 15.0 representamos la estructura molecular de los distintos compuestos citados anteriormente. A continuación importamos las moléculas al software DESMOL1 (18) y calculamos 62 descriptores topológicos tales como: índices de conectividad Randić-Kier-Hall hasta el cuarto orden (${}^m\chi_t$, ${}^m\chi_t^v$) (19, 20), índices de carga topológicos hasta el quinto orden (J_m , G_m , J_m^v , G_m^v) (11), cocientes y diferencias índices de conectividad de valencia y no valencia (mC_t , mD_t), índice de Wiener (W) (21), número de vértices (N), número de ramificaciones (R), pares de ramificaciones que están separados a distancias 1, 2 y 3 (PR_x), longitud máxima que se puede establecer entre distintos vértices (L) y número de vértices con valencias 3 y 4 (V_x) (22).

2.3. Algoritmos QSAR: Análisis de regresión multilínea

Utilizando los índices topológicos como variables independientes y la actividad anti-leishmánica, IC₅₀, en su transformación logarítmica, pIC₅₀ = -logIC₅₀, como variable dependiente, se realizó un análisis de regresión

multilínea utilizando el software STATISTICA 8.0. (23), para obtener los modelos topológicos de predicción de actividad frente a *L. donovani* y *L. major*. El criterio seguido para la selección de variables fue usar la agrupación con menos variables, coeficiente de correlación, R², más alto y el menor error estándar de estimación, EEE.

Para validar la función de predicción seleccionada realizamos un test de validación interna basado en una cros-validación del tipo "leave-one-out". Para ello, cada compuesto se elimina del modelo y se recalcula su valor de actividad pIC₅₀ con los restantes compuestos y los descriptores de la ecuación de regresión seleccionada. El proceso se repite tantas veces como compuestos se estudian. Con los valores predichos se determina el coeficiente de predicción Q² y se compara con el R². Valores de Q² > 0.700 son indicativos de una buena calidad del modelo seleccionado. Para el test de aleatoriedad, los valores de la propiedad se intercambian entre las moléculas de forma aleatoria y se recalculan R² y Q². El modelo se considera estable si se obtienen valores de R² y Q² muy bajos y lejanos a los del modelo de regresión seleccionado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Llevamos a cabo la búsqueda de un modelo topológico-matemático que permitiera predecir la actividad anti-leishmánica de un total de 14 compuestos (Tabla 1) en base a su estructura molecular. Las ecuaciones de predicción seleccionadas para pIC₅₀ de los 14 compuestos frente a *L. donovani* y *L. major* junto con la información estadística fueron:

$$\text{pIC}_{50} (L. donovani) = 6.35 + 1.03 \text{ }^2\chi - 2.03 \text{ }^3\chi_p^v \quad \text{Eq. 1}$$

$$N=14 \quad R^2=0.846 \quad Q^2=0.743 \quad \text{EEE}=0.070 \\ F=30.2 \quad p=0.00003$$

$$\text{pIC}_{50} (L. major) = -15.11 + 1.30 \text{ }^0\chi + 0.55 \text{ }G_2^v - 9.31 \text{ }G_4^v +$$

$$161.66 \text{ }J_4^v \quad \text{Eq. 2}$$

$$N=14 \quad R^2=0.869 \\ F=14.8$$

$$Q^2=0.765 \\ p<0.009$$

$$\text{EEE}=0.092$$

Como puede observarse, tanto para *L. donovani* como *L. major* los valores del coeficiente de predicción, R², son superiores a 0.800 y con errores estándar de estimación, SEE, entre el 11 y el 12 % del intervalo en el que se mueve pIC₅₀. Además ambos modelos presentan una significación estadística superior al 99 %.

Las Tablas 2 y 3 muestran el valor de los índices topológicos seleccionados así como los valores de predicción de pIC₅₀ obtenidos para cada compuesto. Como puede observarse, la predicción es bastante aceptable.

Tabla 2. Resultados de predicción obtenidos para *L. donovani*.

Comp. N°	² χ	³ χ _p ^v	pIC ₅₀ obs	pIC ₅₀ calc	pIC ₅₀ calc (vc)
1a	4.598	2.951	5.01	5.10	5.16
1b	5.286	3.252	5.28	5.20	5.19
1c	5.286	3.252	5.27	5.20	5.19
1d	5.243	3.248	5.14	5.16	5.16
1e	5.289	3.350	5.12	5.00	4.98
1f	5.977	3.651	5.07	5.10	5.11
1g	5.977	3.651	5.12	5.10	5.10
1h	5.934	3.647	5.00	5.06	5.07
1i	5.643	3.619	4.86	4.82	4.80
1j	6.331	3.920	4.92	4.92	4.92
1k	6.331	3.920	4.83	4.92	4.95
1l	6.287	3.916	4.94	4.88	4.87
1m	4.983	3.173	4.98	5.05	5.06
1n	5.639	3.332	5.40	5.40	5.41

Tabla 3. Resultados de predicción obtenidos para *L. major*.

Comp. N°	⁰ χ	G ₂ ^v	G ₄ ^v	J ₄ ^v	pIC ₅₀ obs	pIC ₅₀ calc	pIC ₅₀ calc(vc)
1a	10.506	11.759	1.743	0.103	5.33	5.33	5.33
1b	12.135	12.115	2.125	0.112	5.52	5.59	5.62
1c	12.135	12.115	2.236	0.118	5.57	5.50	5.48
1d	12.135	12.264	2.317	0.122	5.49	5.52	5.55
1e	11.920	11.870	1.894	0.100	5.41	5.36	5.34
1f	13.550	12.226	2.276	0.108	5.55	5.52	5.51
1g	13.550	12.226	2.387	0.114	5.13	5.34	5.37
1h	13.550	12.375	2.468	0.118	5.41	5.29	5.25
1i	12.627	11.870	1.934	0.097	5.43	5.42	5.42
1j	14.257	12.226	2.316	0.105	5.60	5.56	5.53
1k	14.257	12.226	2.427	0.110	5.36	5.34	5.34
1l	14.257	12.375	2.508	0.114	5.24	5.27	5.28
1m	11.660	13.537	1.886	0.099	5.92	5.94	6.07
1n	12.842	13.748	2.698	0.135	5.82	5.80	5.74

Las Figuras 1 y 2 muestran las representaciones gráficas de predicción de la actividad así como los residuales obtenidos para cada compuesto frente al valor experimental tanto para *L. donovani* como para *L. major*.

El intervalo de ordenadas corresponde con valores de $\pm 1\text{EEE}$, $\pm 2\text{EEE}$ y $\pm 3\text{EEE}$. Para *L. donovani*, todos los compuestos muestran residuales inferiores a $\pm 2\text{EEE}$, lo que significa que el modelo topológico seleccionado es predictivo para los 14 compuestos (ver Figura 1).

El modelo para *L. major*, no sería predictivo para el

compuesto **1g** al mostrar un residual ligeramente superior a 2EEE .

Todo ello viene reflejado por el número de variables incluidas en cada modelo. Para *L. donovani* sólo es necesaria la presencia de índices topológicos de conectividad (${}^2\chi$ y ${}^3\chi_p^v$) mientras que para *L. major* aparecen además, índices topológicos de carga (G_2^v , G_4^v y J_4^v) que tienen en cuenta la distribución de la carga intramolecular).

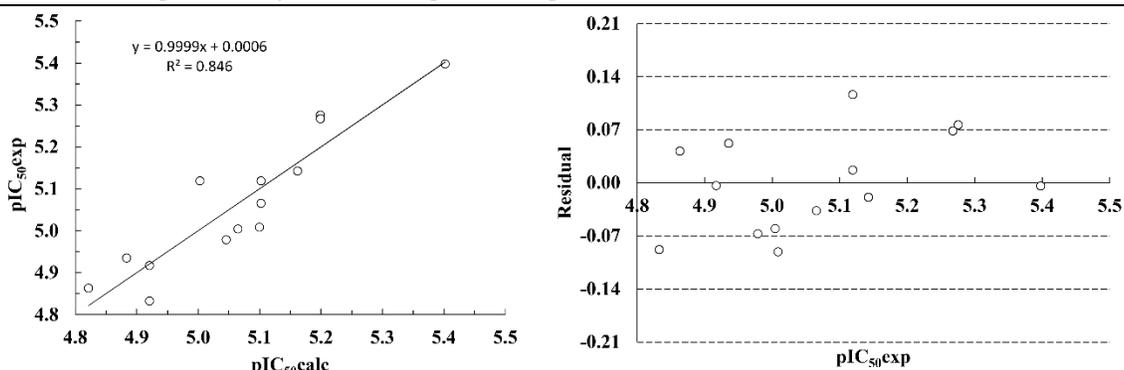


Figura 1. Representaciones gráficas de $\text{pIC}_{50}\text{exp}$ frente a $\text{pIC}_{50}\text{calc}$ y Residual frente a $\text{pIC}_{50}\text{exp}$ obtenidas a partir del modelo topológico seleccionado para *L. donovani*.

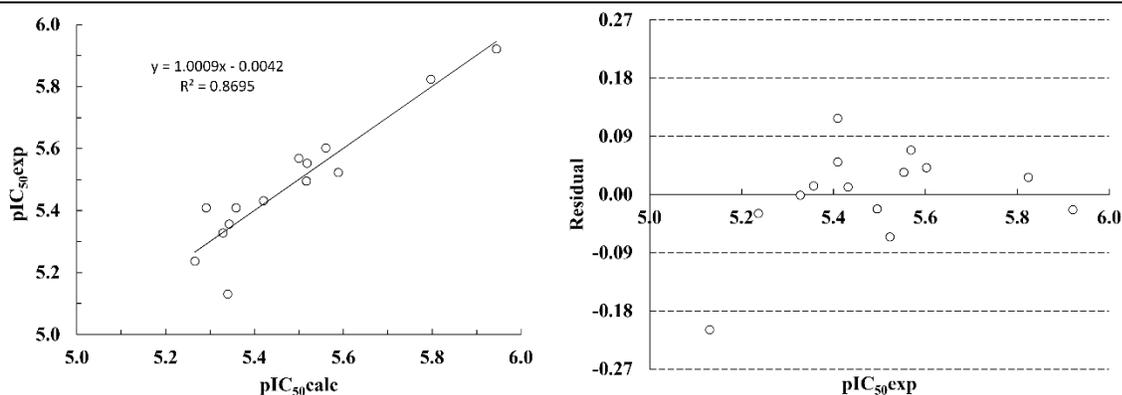


Figura 2. Representaciones gráficas de $\text{pIC}_{50}\text{exp}$ frente a $\text{pIC}_{50}\text{calc}$ y Residual frente a $\text{pIC}_{50}\text{exp}$ obtenidas a partir del modelo topológico seleccionado para *L. major*.

La validación de ambos modelos, Eq. 1 y Eq. 2 se ha realizado en dos etapas: una validación interna (validación cruzada tipo leave one out) y un test de aleatoriedad. La primera mostraba valores de Q^2 superiores a 0.70 (0.743 y 0.765 para *L. donovani* y *L. major*, respectivamente) lo que indica una buena calidad predictiva de ambos modelos. El test de aleatoriedad se muestra en la Figura 3.

Como puede observarse, ambos modelos son estables y no aleatorios. En ambos casos, sólo cuando a cada compuesto se le asigna el valor real de pIC_{50} los coeficientes de correlación y predicción (R^2 y Q^2) son elevados (ver punto negro en ambas gráficas). Cuando a cada compuesto se le asigna un valor arbitrario de pIC_{50} , la regresión obtenida es siempre muy baja (puntos blancos).

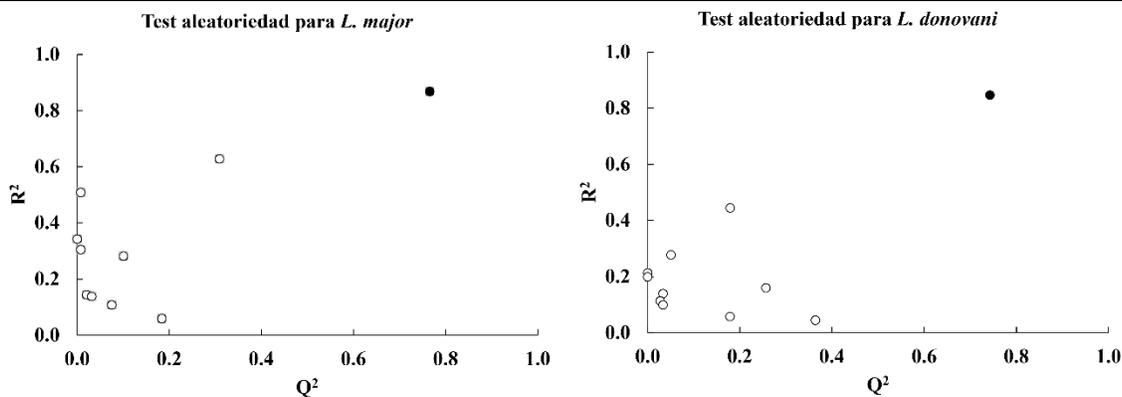
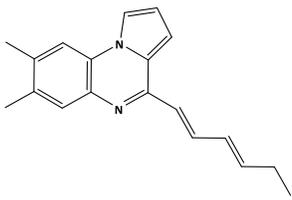
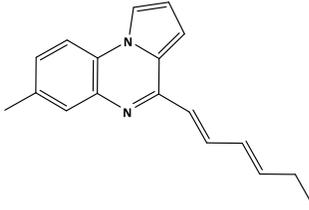
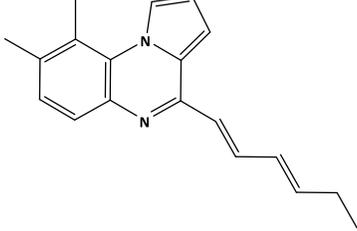
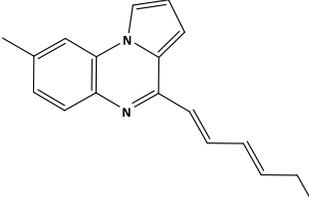


Figura 3. Test de aleatoriedad para los modelos de predicción seleccionados con *L. donovani* y *L. major*.

Una vez seleccionados los modelos de predicción de la actividad anti-leishmánica frente a *L. donovani* y *L. major*, y a la vista de los resultados obtenidos nos preguntamos si podíamos predecir la actividad anti-leishmánica de otros compuestos similares a los antes mencionados realizando pequeñas modificaciones sobre la estructura de partida. En este trabajo presentamos un pequeño cribado molecular realizado con nuevos derivados del pirrol [1,2-*a*] quinoxalina. La Tabla 4 muestra, como ejemplo, las estructuras químicas de cuatro moléculas junto con los

valores predichos de IC_{50} . Las modificaciones estructurales han sido simplificar la estructura molecular al sustituir los grupos metoxi por metilos. Frente a *L. major*, todas ellas son, teóricamente, bastante activos; $IC_{50} < 1 \mu\text{M}$. En cambio frente a *L. donovani* sólo se ha podido predecir actividad anti-leishmánica, $IC_{50} < 10 \mu\text{M}$ para las moléculas II y IV. El siguiente paso sería la síntesis de estos nuevos compuestos y realizarles los correspondientes ensayos de actividad frente a *L. donovani* y *L. major*.

Tabla 4. Estructura química de los nuevos compuestos seleccionados potencialmente activos frente a *L. donovani* y *L. major*.

 <p style="text-align: center;">N° I $IC_{50(L. donovani)}=27.3 \mu\text{M}$ $IC_{50(L. major)}=0.3 \mu\text{M}$</p>	 <p style="text-align: center;">N° II $IC_{50(L. donovani)}=8.8 \mu\text{M}$ $IC_{50(L. major)}=0.74 \mu\text{M}$</p>
 <p style="text-align: center;">N° III $IC_{50(L. donovani)}=43.3 \mu\text{M}$ $IC_{50(L. major)}=0.27 \mu\text{M}$</p>	 <p style="text-align: center;">N° IV $IC_{50(L. donovani)}=8.8 \mu\text{M}$ $IC_{50(L. major)}=0.90 \mu\text{M}$</p>

4. CONCLUSIONES

En este estudio hemos utilizado la topología molecular para la búsqueda de un modelo QSAR capaz de predecir la actividad anti-leishmánica de ciertos compuestos derivados de alcaloides quinolínicos. Todos los descriptores moleculares usados son gráfico-teóricos. El modelo matemático diseñado es capaz de predecir la IC_{50}

de los diferentes compuestos analizados frente a dos especies de *Leishmania* utilizando distintos índices topológicos que muestran una mayor correlación con la propiedad estudiada (IC_{50}). Por tanto, consideramos que se pueden aplicar a la búsqueda de nuevos compuestos. Finalmente, hemos aplicado el modelo matemático para la búsqueda de nuevos compuestos teóricamente activos.

Algunos de los cuales resultaron poseer una buena actividad anti-leishmánica para la especie *L. major*. Consideramos que estos resultados son alentadores y animan a proseguir con futuras investigaciones para la búsqueda de fármacos anti-leishmánicos.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Máster en Enfermedades Parasitarias Tropicales de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València por los medios y ayuda prestados en el desarrollo y preparación del trabajo.

6. REFERENCIAS

1. Ovalle CE, Porrás L, Rey M, Ríos M, Camargo YC. Distribución geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E., 1995-2005. *Biomédica* 2006;26:145-151.
2. Grimaldi G, Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993 Jul;6(3):230-250.
3. Barreto M, Burbano ME, Barreto P. Registros de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en nuevas localidades de Colombia. *Colomb Médica* 2006;37(1):39-45.
4. Desjeux P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q* 1992;45(2-3):267-275.
5. WHO. Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010.
6. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012;7(5):e35671.
7. Datta AK, Datta R, Sen B. Antiparasitic Chemotherapy: In: Majumder HK, editor. *Drug Targets in Kinetoplastid Parasites* New York, NY: Springer New York; 2008. p. 116-132.
8. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect* 2014 Nov;69 Suppl 1:S10-8.
9. Mohapatra S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Trop Parasitol* 2014 Jan;4(1):4-9.
10. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006 Jan;19(1):111-126.
11. Galvez J, Garcia R, Salabert MT, Soler R. Charge Indexes. New Topological Descriptors. *J Chem Inf Comput Sci* 1994 05/01;34(3):520-525.
12. Garcia-Domenech R, Galvez J, de Julian-Ortiz JV, Pogliani L. Some new trends in chemical graph theory. *Chem Rev* 2008 Mar;108(3):1127-1169.
13. Todeschini R, Consonni V. (2000) *Handbook of Molecular Descriptors*. Wiley-VCH: Weinheim, Germany 2000;11:1-667.
14. Mahmoudi N, Garcia-Domenech R, Galvez J, Farhati K, Franetich J.F, Sauerwein R, et. al. New active drugs against liver stages of *Plasmodium* predicted by molecular topology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52(4):1215-1220.
15. Guzmán Fernández B, Zanni R, Pellicer M, Galvez-Llompert M, García-Domenech R. Aplicación de la topología molecular en la búsqueda de nuevos compuestos derivados del 4-nitroimidazol activos frente al *Tripanosoma brucei*. *An Real Acad Nac F.* 2012; 78(4): 447-462.
16. García-Domenech R, Aguilera J, El Moncef A, Pocovi S, Gálvez J. Application of molecular topology to the prediction of mosquito repellents of a group of terpenoid compounds. *Molecular Diversity*. 2010;14: 321-329.
17. Ronga L, Del Favero M, Cohen A, Soum C, Le Pape P, Savrimoutou S, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-alkapolyenylpyrrolo[1,2- α]quinoxalines as antileishmanial agents--part III. *Eur J Med Chem* 2014 Jun 23;81:378-393.
18. DESMOL1 Software. Unidad de Investigación de Diseño de Fármacos y Conectividad Molecular. Facultad de Farmacia Universitat de Valencia, Spain.
19. Kier LB, Hall LH. Molecular connectivity VII: specific treatment of heteroatoms. *J Pharm Sci* 1976 Dec;65(12):1806-1809.
20. Kier LB, Hall LH. General definition of valence delta-values for molecular connectivity. *J Pharm Sci* 1983 Oct;72(10):1170-1173.
21. Wiener H J. Structural determination of paraffin boiling points. *Journal of the American Chemical Society* 1947;69(1): 17-20.
22. Galvez J, Garcia-Domenech R, De Julian-Ortiz V, Soler R. Topological approach to analgesia. *J Chem Inf Comput Sci* 1994 Sep-Oct;34(5):1198-1203.
23. Statistica 8.0 (2008) Statsoft Inc <http://www.statsoft.com>