



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOVIS INPONETUR VIRILISTOGA. 1948

Facultad de Química-Farmacia
Centro de Bioactivos Químicos

Estudios “*In-Silico*” del Transporte Epitelial Intestinal de Fármacos en Cultivo de Células Caco-2 Aplicando Descriptores *TOMOCOMD-CARDD*

Autora: Edith M. Vera González

Tutores: Prof. Inst., Lic. Yovani Marrero Ponce, M.Sc.

Prof. Asist., Lic. Miguel A. Cabrera Pérez, Ph.D.

Santa Clara
2004

CON SU ENTRANABLE TRANSPARENCIA



ABSTRACT

Novel topologic molecular descriptors have been applied to estimate the intestinal epithelial transport of drug in Caco-2 cell culture. Total and local quadratic indices used in this study were calculated by TOMOCOMD-CARDD software. Two QSPR models, through a multiple linear regression, were obtained to predict the P [apical to basolateral (AP→BL) and basolateral to apical (BL→AP)]. A leave-one-out cross-validation procedure revealed that the regression models, had a fairly good predictability. Furthermore, others 18 drugs were selected as a test set in order to assess the predictive power of the models and the accuracy of the final prediction was similar to achieve for the data set. Besides, the use of both regression models, in a combinative way, is possible to predict the Permeability Directional Ratio (PDR, BL→AP/ AP→BL) value. Linear discriminant analysis was used to obtain a quantitative model that discriminates the high absorption compounds ($P \geq 8 \times 10^{-6}$ cm/s) from those with moderate-poor absorption ($P < 8 \times 10^{-6}$ cm/s). A data set of 134 diverse structure drugs and two series of drugs-like compounds (12 compounds) were used as training and test set, respectively. The obtained model classified correctly 81.13% of compounds with moderate-poor absorption properties and the 96.30% of compounds with high absorption, showing a global good classification of 90.30% in the training set. Internal and external validation processes to demonstrate the robustness and predictive power of the obtained model were carried out. In this sense, this model classified correctly 79.24% and 92.52% of compounds of the training set belonging to the moderate-poor and high absorption groups in the leave-one-out cross-validation procedure, respectively; being the global classification of 87.31%. Also this model shown an 87.5, 85.6, 84.7, 85.0, 85.3, 83.5, 84.1, 86.2, 85.9 and 85.9% of global good classification when n varied from 2 to 11 in the leave- n -out cross validation procedure. The model was stabilized around 85.9% when n was > 9 . A data set of 7 HIV protease inhibitors (4 linear peptidomimetic and 3 new cyclic urea) and 5 new 6-fluoroquinolones derivatives was used as test set. The QSAR model classified correctly the 83.33% of compounds in this external prediction set. This approach permits us to obtain a good explanation of the experiment based on the molecular structural features, evidencing the main role of H-bonding and size properties in permeability process. Finally, the model developed was used in the virtual screening of 241 drugs with the percentage of human intestinal absorption (Abs %) values reported. A relationship between the predicted permeability coefficients in Caco-2 and the Abs % (145 compounds with good data quality) was established, with a percentage of good relation greater than 82 %. A comparison with results derived from other three theoretical studies shown a quite satisfactory behavior of the present method. All these results shown that quadratic indices can successfully predict intestinal permeability and suggest that the proposed methodology will be a good tool for studying the oral absorption of drug candidates during the drug development process.

RESUMEN

Nuevos descriptores moleculares han sido aplicados a la estimación del transporte intestinal de fármacos en cultivos de células Caco-2. Los índices cuadráticos totales y locales fueron calculados por el programa **TOMOCOMD-CARDD**. Utilizando la Regresión Lineal Múltiple, dos modelos QSPeR para la predicción del coeficiente de permeabilidad en células Caco-2 en ambas direcciones de absorción {P [apical a basolateral (AP→BL) y basolateral a apical (BL→AP)]} fueron obtenidos. El procedimiento de validación cruzada dejando uno fuera evidenció que los modelos de regresión tuvieron una adecuada estabilidad y un buen poder predictivo. En orden de desarrollar una validación más exhaustiva del poder predictivo de los modelos obtenidos, una serie de predicción externa fue utilizada; mostrándose un comportamiento similar al obtenido en la serie de exploración. El uso combinado de ambos modelos permite estimar el Radio Direccional de Permeabilidad (PDR, BL→AP/ AP→BL) y obtener conclusiones preliminares sobre la interacción del compuesto con la glicoproteína-P. Además, el análisis discriminante lineal fue usado para obtener una función de clasificación que discrimina los compuestos de elevada absorción ($\geq 8 \times 10^{-6}$ cm/s) de los de moderada o pobre absorción ($P < 8 \times 10^{-6}$ cm/s). Una base de datos de 134 compuestos con una gran diversidad estructural y dos series de compuestos tipo-fármacos (12 compuestos) fueron usados como series de entrenamiento y de predicción, respectivamente. Los modelos obtenidos clasificaron correctamente el 81.13% de compuestos con moderada o pobre absorción y el 96.30% de compuestos con elevada absorción, mostrando una buena clasificación general de 90.30% en la serie de entrenamiento. Los procesos de validación interna y externa demostraron la robustez y el poder predictivo de los modelos obtenidos. En este sentido, estos modelos clasificaron correctamente el 79.24% y el 92.52% de los compuestos de la serie de entrenamiento pertenecientes a los grupos de moderada o pobre absorción y a los de elevada absorción, respectivamente, en el proceso de validación cruzada dejando uno fuera; siendo la clasificación global de 87.31%. Este modelo también muestra un 87.5, 85.6, 84.7, 85.0, 85.3, 83.5, 84.1, 86.2, 85.9 y 85.9% de buena clasificación cuando n varía de 2 a 11 en el procedimiento de validación cruzada dejando n -compuestos fuera en cada ciclo. El modelo se estabilizó alrededor de un 85.9% de buena clasificación global, para $n > 9$. Siete inhibidores de la proteasa del VIH (4 peptidomiméticos lineales y 3 ureas cíclicas) y 5 nuevos derivados 6-fluoroquinolónicos se usaron como serie de predicción externa. El modelo QSAR mostró un 83.33% de buena clasificación global en esta serie de predicción. Esta aproximación nos permite obtener una buena explicación en términos estructurales del proceso de absorción, evidenciando el rol fundamental de los H-unidos a heteroátomos y del tamaño molecular. Finalmente, el modelo desarrollado fue usado en la evaluación *in silico* de 241 fármacos con valores reportados de porcentaje de absorción intestinal experimental (Abs %). Se estableció una relación (extrapolación) entre los resultados teóricos *in vitro* (Caco-2) y los experimentales *in vivo* Abs % (145 compuestos con datos de buena calidad), con porcentaje de buena relación mayor del 82%. Una comparación con resultados derivados de otros tres estudios teóricos mostraron un satisfactorio comportamiento del presente método. Todos estos resultados muestran que los índices cuadráticos pueden predecir exitosamente la permeabilidad intestinal y sugieren que la metodología propuesta será una gran herramienta para el estudio de la absorción oral de candidatos a fármacos durante los procesos de desarrollo.

GLOSARIO	
NEM	Nueva Entidad Molecular
ITs	Índices Topológicos
TOMOCOMD	TOpological MOlecular COMputer Design
$q_k(x)$	k -ésimo Índice cuadrático de la matriz de adyacencia entre vértices de un pseudografo molecular
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationships
QSPeR	Quantitative Structure Permeability Relationships
SE	Serie de entrenamiento
SP	Serie de predicción
ADL	Análisis Discriminante Lineal
λ	Lambda de Wilks
D^2	Distancia de Mahalanobis al cuadrado
Fexp	Razón de Fisher experimental
RLM	Regresión Lineal Múltiple
R	Coeficiente de correlación
R^2	Coeficiente de determinación o coeficiente de correlación al cuadrado
s	Desviación estándar
q^2	Coeficiente de correlación al cuadrado del procedimiento de validación cruzada LOO
s_{cv}	Desviación estándar del procedimiento de validación cruzada LOO
MAE	Error medio absoluto
LOO	Procedimiento de validación interna cruzada 'leave-one-out'
LGO	Procedimiento de validación interna cruzada 'leave-group-out'
LNO	Procedimiento de validación interna cruzada 'leave-n-out'
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
F	Biodisponibilidad
AIH	Absorción Intestinal en Humanos
Caco-2	Células de carcinoma de Colon
P_{Caco-2}	Coeficiente de permeabilidad en células Caco-2

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
GLOSARIO	
1 INTRODUCCIÓN	1
Objetivos	4
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Estudios farmacocinéticos. Aspectos generales	6
2.1.1 Introducción	6
2.1.2 Procesos ADME. Valoración general	6
2.1.2.1 Absorción	6
2.2 Absorción de fármacos	7
2.2.1 Factores que influyen en la absorción de los fármacos por vía oral	7
2.2.1.1 Factores físico-químicos de la formulación que influyen en la absorción	8
2.2.1.2 Factores físico-químicos del fármaco que influyen en la absorción	8
2.2.1.3 Factores fisiológicos y patológicos que influyen en la absorción de fármacos	8
2.3 Morfología del intestino	9
2.4 Mecanismos de transporte de membrana	10
2.4.1 Transporte pasivo transcelular	10
2.4.2 Transporte paracelular	10
2.4.3 Transporte mediado por transportador y por eflujo	11
2.5 Modelos “ <i>in vivo</i> ” para la predicción del transporte a través de la membrana intestinal	12
2.5.1 Partición en sistemas isotrópicos	12
2.5.2 Transporte a través de sacos intestinales evertidos	13
2.5.2.1 Cultivos celulares Caco-2	14
2.6 Modelos “ <i>in silico</i> ” para la predicción de la permeabilidad intestinal	15
2.6.1 Modelos cualitativos de la permeabilidad de la membrana intestinal	16
2.6.2 Modelos cuantitativos de la permeabilidad de la membrana intestinal	16
2.6.3 Células Caco-2, propiedades físico-químicas para la absorción “ <i>in vitro</i> ” y estudios de relación cuantitativa estructura-permeabilidad (QSPeR)	19
2.7 Método computacional TOMOCOMD-CARDD Software	20
2.7.1 Índices cuadráticos moleculares	21
2.8 Conclusiones parciales de la Revisión Bibliográfica	27
3 PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Cálculo de los nuevos ITs. TOMOCOMD-CARDD Software	28
3.2 Análisis estadístico de los datos	30
3.2.1 Introducción	30
3.2.2 Quimiometría	30
3.2.3 Análisis de Regresión Lineal Múltiple (RLM)	31
3.2.4 Desarrollo de FDs usando ADL	32
3.2.5 Procedimiento de selección de “ <i>outliers</i> ”. El role de los “ <i>outliers</i> ”	33
3.2.6 Datos experimentales de permeabilidad en células Caco-2 utilizados en los estudios teóricos.	34

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de los modelos QSPeR-RLM para la predicción del $P_{\text{Caco-2}}$ (AP-BL) y $P_{\text{Caco-2}}$ (BL-AP)	35
4.2 Desarrollo del modelo QSPeR-ADL	36
4.3 Comparación con otros métodos computacionales	43
4.4 Fuerzas que dirigen la permeabilidad de fármacos en células Caco-2	46
4.5 “Screening” virtual de $P_{\text{Caco-2}}$ (“ <i>in vitro</i> ”) y extrapolación a la predicción de la absorción (“ <i>in vivo</i> ”) intestinal en humanos	47

5 CONCLUSIONES

6 RECOMENDACIONES

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

1 INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el rol de las propiedades biofarmacéuticas en las investigaciones relacionadas con el descubrimiento de nuevos fármacos, se ha incrementado vertiginosamente (Zhu y col., 2002). La biodisponibilidad oral es una de estos componentes biofarmacéuticos que han sido ampliamente estudiados, debido a que la administración oral es una de las vías más importantes por sus conveniencias, bajo costo y gran comodidad para el paciente.

Históricamente, de 250 compuestos que entran a la fase preclínica de desarrollo como nuevos fármacos para la investigación, solamente 5 son evaluados en la clínica y finalmente sólo 1 es aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para su uso en humanos (Caldwell, 2000; PhaRMA Industry Profile, 2000). En esta gran desproporción los procesos de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME) y la toxicidad, juegan un papel significativo en el 70 % de las fallas (Egan y col., 2000; Kennedy, 1997; Dimasi, 2001).

Para que un fármaco sea efectivo después de la administración oral, una parte significativa de la dosis administrada debe alcanzar de forma inalterada la circulación sistémica, por lo que la solubilidad y absorción del compuesto son dos de las propiedades de mayor influencia en la extensión de la absorción desde el tracto gastrointestinal. Es por ello que es de vital importancia, en una primera etapa, identificar compuestos cuyas estructuras químicas aseguren una suficientemente alta permeabilidad o al menos ser capaces de delimitar eficientemente aquellos compuestos cuyas permeabilidades son demasiado bajas (Yoshida y Topliss, 2000; Yu y col., 2000).

Por esta razón, la estimación de la absorción oral para nuevos candidatos es muy útil en la etapas tempranas de proceso de desarrollo de fármacos (Lipinski y col., 1997; Anonymous, 2000), pues permite un ahorro de recursos considerable. Es decir, los esfuerzos recientes se han dirigido a la reducción del número de candidatos que posteriormente fallan en el proceso, intentando identificar tempranamente a los potencialmente problemáticos (Sinko, 1999).

En orden de obtener una rápida estimación de la absorción en humanos utilizando el procedimiento de “screening” experimental masivo (Rodríguez, 1998), muchos cultivos celulares han sido investigados como potenciales modelos *in vitro* para el estudio de la

absorción de fármacos y del metabolismo (Artursson, 1991; Quaroni y Hochman, 1996). Entre estos, las monocapas de células de Carcinoma de Colon (Caco-2), es el modelo *in vitro* más avanzado, debido a que esta línea celular expresa varias de las propiedades de las membranas biológicas (Artursson, 1991; Quaroni y Hochman, 1996; Yazdanian y col., 1998). En este sentido, se ha incrementado considerablemente el uso del coeficiente de permeabilidad apical-basolateral a través de las células Caco-2 [$P_{\text{Caco-2}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$] para estimar la absorción oral en humanos de NEQ (Yazdanian y col., 1998; Artursson y Karlsson, 1991; Camenisch y col., 1998).

Sin embargo, el modelo celular Caco-2 tiene varias desventajas (Marrero y col., 2003): a) la permeabilidad de los compuestos que son transportados mediados por un ‘carrier’ es más baja que en el intestino humano y los compuestos hidrofílicos con transporte paracelular tienen pobre permeabilidad (Artursson y col., 1996), b) las células Globet, endocrinas y M no son expresadas en esta línea celular, c) el origen cancerígeno de esta línea celular produce una sobreexpresión de la Glicoproteína-P con la consecuente baja permeabilidad en la dirección absorbiva (Anderle y col., 1998), d) la pérdida de estandarización en los cultivos celulares y en los procedimientos de mediciones y e) el largo período de los cultivos celulares (21-24 días), lo cual constituye la mayor dificultad de esta aproximación experimental, con el consecuente costo extensivo (Artursson y col., 1996; Delie y Rubas, 1997; Anderle y col., 1998).

Dentro de las últimas tendencias de las grandes compañías farmacéuticas se destacan la obtención y utilización de modelos teóricos capaces de predecir las propiedades de absorción basadas enteramente en la información químico-estructural, propiciando un tamizaje masivo de fármacos sin la necesidad de sintetizar las moléculas físicamente (van de Waterbeemd, 2002). Este enfoque está siendo muy utilizado en la actualidad pues la significación de las fallas de nuevos candidatos en el estado de desarrollo de nuevos fármacos ha evidenciado la necesidad de herramientas predicativas que permitan eliminar los compuestos inapropiados y evitar consecuentemente el gasto de dinero en pruebas de investigación (Sugawara y col., 1998; Clark y Pickett, 2000).

Varios enfoques teóricos han aparecido como alternativas para la predicción ‘*in silico*’ de la absorción en humanos de NEQ obtenidos por metodologías de química combinatoria (Dressman y col., 1985; Hamilton y col., 1995; Palm y col., 1996; Abraham y col., 1994;

Potts y Guy, 1995; Yoshida y Topliss, 1996; Gobburu y Shelver, 1995; Wessel y col., 1998). Además, es esperado un uso incrementado de los métodos QSPeR (Quantitative Structure Permeability Relationships) en la estimación de los parámetros de absorción de NEQ potencialmente bioactivas. En las investigaciones de desarrollo de fármacos, varias propiedades computacionales han sido usadas para acceder a la absorción de candidatos a fármacos (Andrews y col., 2000; Feng y col., 2000; Lesko y col., 2000; Breitzkreutz, 1998; Platts y col., 2000; Riley y col., 2001; Ekins y Rose, 2002). Varios investigadores han explorado estudios QSPeR relacionados con la permeabilidad de fármacos en células de Caco-2. Algunos tipos de descriptores moleculares han sido introducido en estos estudios, donde están incluidos descriptores de talla y capacidad de enlace de hidrógeno (van de Waterbeemd y Camenisch, 1996), área superficial polar (PSA) (Artursson y col., 1996; Van de Waterbeemd y Kansy, 1992; Krarup, y col., 1998), Descriptores Molsurf-derivados (Norinder y col., 1997), MO-cálculos (Fujiwara y col., 2002), y análisis de interacción de solutos-membranas (Kulkarni y col., 2002). No obstante, todos estos estudios fueron llevados a cabo con un número limitado de compuestos.

Recientemente, varios ITs han sido definidos y validados en estudios QSAR (Diudea, 2001; Ivanciuc, 2000, 2002; Ivanciuc y col., 2000, 2001; Balaban y col., 2000; Rios-Santamarina y col., 2002; Marino y col., 2002; Estrada, 1996, 1999; Estrada y col., 1998). En este sentido, nuestro grupo ha desarrollado un novedoso método químico-computacional conocido por sus siglas acrónimas en inglés: ***TOMOCOMD*** (***TO***pological ***MO***lecular ***COM***puter ***D***esign) (Marrero-Ponce, 2003; Marrero-Ponce y Col., 2003; Marrero-Ponce y Col., 2004; Marrero-Ponce y Romero, 2002). Este programa permite el cálculo de varias familias de nuevos descriptores moleculares. Una de estas familias han sido definidas como índices cuadráticos en analogía a las formas cuadráticas matemáticas. Los índices cuadráticos de la matriz de adyacencia entre vértices del pseudografo molecular han sido usados en varios estudios QSAR/QSPR (Marrero-Ponce, 2003; Marrero-Ponce y Col., 2003). Este método es muy flexible y permite el estudio de pequeñas y grandes moléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos (Marrero-Ponce y Col., 2004).

Tomando en consideración la relevancia de los resultados sintéticos alcanzados en el CBQ, así como la demostrada validez de los métodos grafo-teóricos desarrollados por el grupo de Diseño de Fármacos (Estrada, 1996; Marrero-Ponce, 2003; González y col., 2003), consideramos factible la utilización de el método **TOMOCOMD-CARDD** (Computed-Aided 'Rational' Drug Design) a estudios farmacocinéticos “*in silico*”, para la temprana predicción de la adecuada absorción de nuevos candidatos a fármacos.

Por todo lo anterior se plantea el siguiente problema científico:

La caracterización farmacocinética del proceso de absorción es una de las etapas principales en el desarrollo de medicamentos para la administración oral, sin embargo la mayoría de los nuevos candidatos a fármacos no logran sobrepasar la fase clínica debido a inapropiadas propiedades de absorción, siendo además la caracterización experimental de este proceso costosa y prácticamente imposible de implementar en el estudio masivo de nuevos candidatos a fármacos.

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

Si es posible a través del uso de descriptores *TOMOCOMD-CARDD* obtener funciones que relacionen adecuadamente la estructura química con sus propiedades farmacocinéticas de absorción en células Caco-2.

Para cumplimentar la anterior hipótesis y dar respuesta a la problemática científica planteada, se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo general

Desarrollar Estudios *In-Silico* del transporte epitelial intestinal de fármacos en células Caco-2 aplicando descriptores ***TOMOCOMD-CARDD***.

Objetivos específicos

- ✓ Recolectar una gran base de datos de la literatura de compuestos a los que se les ha reportado experimentalmente el coeficiente de permeabilidad en células Caco-2 ($P_{\text{Caco-2}}$) para acceder al análisis y la modelación confiable de la data.
- ✓ Obtener modelos QSPeR utilizando descriptores ***TOMOCOMD-CARDD*** que permitan la descripción del coeficiente de permeabilidad en células Caco-2

- ✓ Desarrollar un exhaustivo proceso de validación interna y externa de los modelos encontrados, para demostrar la robustez y el poder predictivo de los mismos.
- ✓ Interpretar en términos estructurales los modelos obtenidos.

La **novedad científica** de este trabajo se fundamenta en la aplicación por vez primera y acorde con las últimas tendencias mundiales, de un método “*in silico*” (**TOMOCOMD-CARDD**) para la predicción de propiedades farmacocinéticas de absorción en células Caco-2. La utilización de esta metodología conlleva a un resultado final totalmente aplicable a la estrategia de trabajo del CBQ en su inmediato devenir, siendo también de posible utilización por otras instituciones científicas y académicas de nuestro país cuyo principal objetivo sea la racionalidad en la obtención de nuevos potenciales candidatos a fármacos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y BASAMENTO TEÓRICO

2.1 Estudios Farmacocinéticos. Aspectos Generales

2.1.1 Introducción

La Farmacocinética constituye una ciencia surgida como consecuencia del impulso que experimentaron en todo el mundo los estudios farmacológicos. El término Farmacocinética fue introducido por Dost (1953), aunque los antecedentes reales de esta ciencia deben buscarse a finales del siglo XIX y principios del XX (Alonso y col., 1990).

Para muchos su origen se sitúa en la década del 1930 a raíz de los trabajos publicados por Torsten Teorell (1937a; 1937b), sin embargo su ulterior desarrollo fue lento y no es hasta la década del 1960 cuando la Farmacocinética se desarrolla como ciencia, junto con la Biofarmacia (Alonso y col., 1990).

Aunque existen numerosas definiciones, de una manera simplificada se puede considerar la Farmacocinética como la encargada del estudio de las velocidades de cambio de concentración de fármaco y/o sus metabolitos en los fluidos biológicos, tejidos y excretas, así como de la cinética de las respuestas biológicas correspondientes y de la construcción de modelos adecuados para la interpretación de los datos experimentales (Wagner, 1983).

2.1.2 Procesos ADME. Valoración General

Las siglas ADME agrupan al conjunto de procesos que un fármaco es susceptible de experimentar en su tránsito por el organismo, ellos son: **A**bsorción, **D**istribución, **M**etabolismo y **E**xcreción. Los estudios ADME caracterizan la farmacocinética básica del fármaco y por lo tanto, juegan un importante rol en la interpretación de estudios farmacológicos y toxicológicos (Bonal y Domínguez, 1992).

2.1.2.1 Absorción

La **absorción** se define como el fenómeno de paso de un principio activo o metabolito a través de una barrera fisiológica que separa al medio interior, fundamentalmente la sangre, del lugar de administración (Aïache y col., 1983).

Si bien la absorción por difusión pasiva transcelular suele ser el mecanismo más habitual, un fármaco puede absorberse por otros mecanismos, tales como transporte activo,

pinocitosis o el paso a través de pares de iones (Hillgren y col., 1995). Este proceso está condicionado por las propiedades físico-químicas del fármaco, por factores de la formulación, fisiopatológicos y por otros entre los que se destaca la interacción entre medicamentos (Hillgren y col., 1995).

Desde el punto de vista cinético, la absorción suele ser de primer orden, aunque cuando intervienen procesos de carácter saturable puede ser caracterizada por una cinética no lineal del tipo Michaelis-Menten (Broddie, 1989; Bonal y Domínguez, 1992).

Uno de los parámetros directamente relacionado con la absorción es la **biodisponibilidad** (F), la cual se define como la velocidad y la magnitud con las que se absorbe el ingrediente activo o parte terapéutica de un medicamento desde la forma de dosificación y resulta disponible a nivel del lugar de acción (FDA, 1977; CPMP, 1992).

Respecto a la velocidad, la biodisponibilidad puede definirse utilizando diversos parámetros como son: **concentración plasmática máxima de fármaco** ($C_{\text{máx}}$), **tiempo en alcanzar la concentración máxima** ($T_{\text{máx}}$) y **constante de velocidad de absorción** (K_a) (Gibaldi y Perrier, 1982; Wagner, 1983). Este último parámetro no está afectado por cambios en la distribución y eliminación del medicamento, por lo que refleja con gran precisión la velocidad de absorción.

Como es un tema esencial del presente trabajo, la absorción será analizada con mayor profundidad posteriormente.

2.2 Absorción de Fármacos

2.2.1 Factores que Influyen en la Absorción de los Fármacos por Vía Oral

La administración oral es la vía más natural y por lo tanto, la ruta de aplicación preferida para la mayoría de los agentes terapéuticos orientados a una acción sistémica (Aïache y col., 1983; Chien, 1995). Cuando el fármaco es administrado por esta vía, son varios los factores que pueden influir en su paso a la circulación sistémica y por consiguiente, en la obtención de un efecto terapéutico óptimo. Dentro de estos se destacan los factores físico-químicos de la formulación y del fármaco, y los biológicos (fisiológicos y patológicos) (Ferraito y col., 1992). Todos ellos, en su conjunto, van a desempeñar un papel fundamental en el proceso de absorción de fármacos.

2.2.1.1 Factores Físico-Químicos de la Formulación que Influyen en la Absorción

En la actualidad existen diversos tipos de formulaciones que se utilizan por vía oral, dentro de las que se destacan los comprimidos, granulados, cápsulas, polvos, etc. Debido a esto, son varios los factores, especialmente relacionados a los procesos de velocidad, que afectan la absorción del fármaco en el organismo, como son: la velocidad de desintegración, disgregación, liberación y disolución del fármaco desde la forma farmacéutica (Añache y col., 1983). La velocidad de cada uno de estos procesos será el paso limitante para lograr la absorción del fármaco.

2.2.1.2 Factores Físico-Químicos del Fármaco que Influyen en la Absorción

Una vez que el fármaco es liberado de la forma farmacéutica, existen varios factores desde el punto de vista físico y químico que limitan su absorción. Dentro de los factores físicos se debe resaltar la *solubilidad* del principio activo, debido a la estrecha relación con la velocidad de absorción, la cual se pone de manifiesto en la ecuación de Noyes y Whitney (Ansel y Popovich, 1990). También, la *polaridad* y el *grado de ionización* del fármaco son muy importantes para su adecuada solubilidad así como la dependencia del pH (Añache y col., 1983). Finalmente, el *tamaño de partícula*, la *forma cristalina* y la *constante de disociación* del fármaco son factores que influyen en su disolución y por consiguiente, en su absorción (Amidon y col., 1980; Lachman, 1986).

Dentro de los factores químicos, las propiedades *lipofílicas* o *hidrofílicas* relativas de la molécula, descritas por el coeficiente de partición, determinan si la misma experimenta una difusión pasiva a través del tracto gastrointestinal o de sus membranas biológicas (Wadke y col., 1989). Otro de los factores es la *estabilidad* química la cual debe ser mantenida hasta que el compuesto sea liberado en su sitio de absorción o de aplicación (Wadke y col., 1989).

2.2.1.3 Factores Fisiológicos y Patológicos que Influyen en la Absorción de Fármacos

Dentro de los fisiológicos se destacan la *velocidad de vaciamiento gástrico* y el *peristaltismo intestinal*, los cuales influyen, fundamentalmente, en la velocidad de absorción del fármaco (Barr y Riegelman, 1970; Jiménez-Torres y col., 1998). Debido a que los medicamentos no están destinados a personas sanas, sino a aquellas que sufren

alguna alteración que da lugar a la aparición de enfermedades, los factores patológicos también van a tener una marcada influencia en la absorción, siempre que exista una patología gastrointestinal.

La absorción gastrointestinal de fármacos puede estar modificada como consecuencia de enfermedades de la cavidad oral (*Escleroderma*), del esófago (*Chagas y Acalasia*), del estómago (*Aclorhidria e Hipoaclorhidria*), del intestino delgado (*Enfermedad Celíaca, Inflamatoria del intestino, Infecciones gastrointestinales, Cirugías*), cardiovasculares (*Cardiopatía isquémica*), hepáticas y renales (Busto y col., 1992; Ritschel, 1993; Goldfinger, 1992).

2.3 Morfología del Intestino

El intestino delgado es el encargado de la absorción selectiva de la mayoría de los nutrientes como azúcares y aminoácidos, de la digestión terminal y además, sirve como una barrera a las enzimas digestivas, compuestos ingeridos y bacterias (Walker, 1987; Madara y Trier, 1987; Carr y Toner, 1984). Esta característica multifuncional hace que su epitelio sea estructuralmente complejo, tal como se representa en el Anexo 2.

Las células epiteliales son una población heterogénea de células que incluyen: enterocitos o células absortivas; células de copas (goblet), encargadas de la secreción de mucina; células endocrinas; células M, las cuáles transportan antígenos presentes en el lumen intestinal a la linfa; células de *paneth*, encargadas de la producción de factores de crecimiento; células de *tuft*, las cuales posiblemente exhiben actividad absortiva, secretora y quimiorreceptiva; y las células de *cup*, las cuales pueden atraer bacterias que se adhieren por mecanismos específicos y son los sitios de enlazamiento para los componentes de la superficie celular de la bacteria (Fenoglio y col., 1999).

La célula epitelial más común es el enterocito, el cual está altamente polarizado con definidas membranas basolaterales y apicales, que se encuentran separadas por estrechas uniones, según se representa en la Figura 2.1 (ver Anexo). Estas membranas presentan diferencias en la composición proteica y lipídica, lo que justifica sus diferentes propiedades de permeabilidad.

2.4 Mecanismos de Transporte de Membrana

Varias son las barreras secuenciales que un soluto tiene que atravesar durante su transporte desde el lumen intestinal hacia la sangre. Se asume, de forma general, que la permeabilidad del fármaco a través del epitelio intestinal, es el paso de velocidad limitante (Artursson y Karlsson, 1991; Fagerholm y Lennernas, 1995) y puede ocurrir tanto por mecanismos paracelulares como transcelulares, según se representa en el Esquema 2.1 (ver Anexo). Todas estas rutas y procesos son diferentes, al igual que las propiedades moleculares que influyen en el transporte de fármacos.

2.4.1 Transporte Pasivo Transcelular

La membrana celular está compuesta por una doble capa de fosfolípidos y proteínas embebidas y ha sido tradicionalmente bien descrita por el modelo de “mosaico fluido” (Singer y Nicolson, 1972), y más recientemente por uno más complejo, el “modelo de super-enrejado” (Somerharju y col. 1999). La presencia de estos compuestos, brinda propiedades únicas a las membranas celulares del organismo.

El primer paso durante el transporte pasivo transcelular es la penetración del soluto en la membrana apical seguido de su difusión a través del citoplasma de la célula intestinal y finalmente su salida por la membrana basolateral (Esquema 2.1, ruta A). La difusión de solutos pequeños en el citoplasma es normalmente un proceso rápido y por lo tanto, la velocidad de permeabilidad pasiva transcelular está determinada por la velocidad de transporte a través de la membrana apical (Muranishi, 1990). Así, procesos bastante complejos de permeabilidad intestinal de fármacos pueden ser descritos, considerando solamente el transporte pasivo a través de la membrana apical. Debido a ello, los modelos experimentales y teóricos que describen el transporte por este mecanismo han recibido una particular atención (Kramer, 1999; Clark y Pickett, 2000).

2.4.2 Transporte Paracelular

El transporte a través de los poros acuosos de las células epiteliales intestinales, es un proceso conocido como transporte paracelular (Esquema 2.1, ruta C). Diversos estudios refieren los mecanismos saturables y sustrato-específicos que operan durante el transporte por esta ruta (Gan y col., 1998; Lee y Thakker, 1999). Sin embargo, éste se considera

como un proceso pasivo que sigue la ley de Fick. El transporte por esta vía es mínimo debido a la presencia de estrechas uniones intercelulares (Diamond, 1977; Madara, 1989); solamente pequeñas moléculas hidrofílicas pueden pasar (Esquema 2.1, ruta F), si están presentes moduladores de estas uniones (Hillgren y col., 1995).

2.4.3 Transporte Mediado por Transportador y por Eflujo

Cuando los solutos son transportados, en la dirección apical-basolateral, por proteínas de la membrana celular (Esquema 2.1, ruta B), a través de mecanismos mediados por transportadores, el proceso de transporte es activo y/o facilitado. Esta vía presenta características específicas como son: especificidad de sustrato, saturabilidad y variabilidad regional (Tanaka y col., 1998). De forma general, los mecanismos mediados por transportadores mejoran la permeabilidad transcelular a un limitado número de fármacos, y su magnitud depende no solamente de la similitud entre el principio activo y el sustrato natural del transportador, sino de la concentración del fármaco y de factores fisiológicos.

Otro proceso de permeabilidad es cuando el soluto se enlaza al receptor en la superficie de la membrana y es luego internalizado por endocitosis (Esquema 2.1, ruta D). Este mecanismo es conocido como transcitosis mediada por receptores. Una vez formada la vesícula, esta se desplaza a la superficie de la membrana opuesta. Esta ruta tiene muy baja capacidad de transporte y es solamente significativa para fármacos macromoleculares que son efectivos a bajas concentraciones (Swaan, 1998).

Contrario a otros mecanismos que promueven la permeabilidad el de flujo polarizado, tiene la potencialidad de limitar la permeabilidad general por bombeo del fármaco en la dirección basolateral-apical (Esquema 2.1, ruta G). La salida del principio activo hacia el intestino es, con frecuencia, atribuida a la Glicoproteína-P y las proteínas asociadas a la resistencia multifármaco (MRP2) en la membrana celular apical (Hunter y Hirst, 1997; Borst y col., 2000; Suzuki y Sugiyama, 2000). La función de este sistema es evitar la incorporación de sustratos tóxicos y facilitar su excreción a través de la mucosa del tracto intestinal (Ambudkar y col., 1999). Aunque un incremento en el número de investigaciones señala el papel del eflujo en la permeabilidad de los fármacos, su relevancia “*in vivo*” aún no ha sido demostrada (Sandstrom y col., 1997).

Resumiendo lo anterior, cuando se diseña un fármaco para que se distribuya ampliamente en el organismo, este debe ser lo suficientemente pequeño para difundir paracelularmente o lo suficientemente lipofílico para pasar a través de las células o ser transportado a lo largo del enterocito intestinal por un mecanismo transportador adecuado (Hillgren y col., 1995).

2.5 Modelos "*in vitro*" para la Predicción del Transporte a Través de la Membrana Intestinal

Los estudios "*in vivo*" de permeabilidad a través de la membrana intestinal en humanos, para nuevos compuestos, son costosos y pueden ser potencialmente dañinos para los voluntarios, si se realizan con productos con una parcial caracterización farmacológica y toxicológica. Tales estudios deben ser desarrollados en animales de experimentación, pero el costo y la capacidad de evaluación restringen el uso de estos experimentos. Varios modelos "*in vitro*", capaces de predecir la permeabilidad a través de la membrana intestinal para grandes bases de datos de compuestos, han sido desarrollados, brindando un buen entendimiento de los diferentes pasos del proceso de absorción (Ungell, 1997; Artursson y Borchardt, 1997). Su adecuada aplicación dependerá de cuán estrechamente el modelo "*in vitro*" imite las características de la barrera biológica "*in vivo*". Dentro de los modelos "*in vitro*" descritos en la literatura, aparecen desde los más simples de determinación del coeficiente de partición de un fármaco entre un solvente acuoso y uno orgánico (Smith y col., 1975; Paterson y col., 1994), hasta los más complejos basados en cultivos celulares (Artusson, 1990; Artusson y Karlsson, 1991). Algunos de ellos han sido utilizados para desarrollar modelos computacionales y para predecir la permeabilidad intestinal (Artusson y Karlsson, 1991; Yazdanian y col., 1998). Una breve descripción de algunos de estos métodos se muestra a continuación.

2.5.1 Partición en Sistemas Isotrópicos.

La estructura del *n*-octanol se parece a la de la mayoría de los lípidos de la membrana celular, los cuales pueden ser descritos como una cadena alquílica con un grupo polar al final de la misma. Esto sugiere, que el transporte de soluto desde el agua hacia el octanol puede modelar el proceso de transporte de soluto hacia la membrana celular. De hecho, el

logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua ($\text{Log } P_{\text{oct/agua}}$) correlaciona adecuadamente con la permeabilidad de membrana celular y por lo tanto, ha sido ampliamente utilizado para predecir la velocidad de transporte de membrana (Martin, 1981; Artusson y Karlsson, 1991; ter-Laak y col., 1994; Buur y col., 1996; Ranaldi y col., 1996; Palm y col., 1996; Rubas y Cromwell, 1997; Yazdanian y col., 1998). Su amplio uso lo ha convertido en la referencia de la lipofilidad de un soluto, aunque no describe de forma adecuada la capacidad de formación de puentes de hidrógeno de un compuesto.

Antes de que un soluto penetre al interior de la membrana biológica se necesita una completa desolvatación, por lo que la habilidad de permeabilidad del mismo dependerá del número y la fortaleza de los enlaces por puentes de hidrógeno con las moléculas de agua (Stein, 1967; Diamond y Wright 1969). Ya que el $\text{Log } P_{\text{oct/agua}}$ es un pobre descriptor de esta propiedad, se ha evaluado la determinación del coeficiente de partición en un sistema de dos solventes (heptano / etilenglicol), donde uno de ellos pueda formar enlaces por puentes de hidrógeno (Seiler, 1974; Young y col., 1988; Tayar y col., 1992). Aunque algunos intentos exitosos han considerado el valor del $\text{Log } P_{\text{oct/agua}}$ para predecir el transporte de membrana, estos descriptores frecuentemente fallan cuando se utilizan datos experimentales con gran diversidad estructural (Martin, 1981; Artursson y Karlsson, 1991; ter-Laak y col., 1994; Rubas y Cromwell, 1997; Yazdanian y col., 1998).

El coeficiente de partición puede ser también obtenido por métodos computacionales (Sjoberg y col., 1997; Buchwald y Bodor, 1998) y la racionalidad en el uso de este descriptor, para predecir el transporte de membrana, será posteriormente discutida.

2.5.2 Transporte a Través de Sacos Intestinales Evertidos

Varios modelos “*in vitro*” han sido utilizados en la Industria Farmacéutica para evaluar la absorción y su mecanismo en potenciales candidatos a fármacos. Dentro de los modelos empleados se destacan los de tejido excindido (segmentos intestinales aislados, sacos intestinales evertidos, aros intestinales, láminas mucosales con y sin corteza / Cámaras Ussing), las células aisladas, las vesículas de membrana y los modelos de cultivo celular tales como Caco-2, células HT-29 y T84 (Hillgren y col., 1995; Stewart y col., 1997; Barthe y col., 1998, 1999; Le Ferrec y col., 2002). A continuación se muestra una

detallada descripción de la aplicación del modelo de cultivo celular Caco-2, debido a su implicación directa en este trabajo.

2.5.2.1 Cultivos Celulares Caco-2

Las monocapas de células de Carcinoma de Colon (Caco-2), es el modelo *in vitro* más avanzado, debido a que como hemos planteado anteriormente (ver introducción), esta línea celular expresa varias de las propiedades de las membranas biológicas (Artursson, 1991; Quaroni y Hochman, 1996; Yazdanian y col., 1998), tales como (Quaroni y Hochman, 1996; Yazdanian y col., 1998; Artursson y Karlsson, 1991; Hidalgo y col., 1989): 1) vellosidades en la superficie “apical”, 2) Expresión de las proteínas transportadoras (sistemas de transporte mediados), 3) todo el conjunto de enzimas intestinales, entre otras. Todas estas propiedades permiten el uso de estos cultivos celulares para la comprensión de los mecanismos de permeabilidad celular y la identificación de las propiedades químico-físicas responsables de la permeabilidad celular.

En este sentido, se ha incrementado considerablemente el uso del coeficiente de permeabilidad apical-basolateral a través de las células Caco-2 [$P_{\text{Caco-2}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$] para estimar la absorción oral en humanos de NEQ (Yazdanian y col., 1998; Artursson y Karlsson, 1991; Camenisch y col., 1998).

La permeabilidad intestinal puede ser considerada como un predictor de la fracción absorbida. La relación teórica entre la fracción absorbida de fármaco (F_a) y la permeabilidad ha sido descrita por Amidon y col. (Amidon y col., 1988):

$$F_a = (1 - e^{-AP \times 10^{-6}})100[\%] \quad (2.1)$$

Una buena correlación entre la absorción oral en humanos y ratas y la velocidad de transporte a través de monocapas de células Caco-2 fue obtenida por Artursson y Karlsson (Artursson y Karlsson, 1991). No obstante, existen varios ejemplos de la aplicación de modelo de células Caco-2 a la predicción o correlación con la absorción oral en humanos donde los resultados obtenidos en los coeficientes de permeabilidad están influenciados por diferencias inter-laboratorio (Artursson y col., 1996; Delie y

Rubas, 1997). En conexión, en la literatura existen varios criterios sobre el uso de la permeabilidad en células de caco-2 en la predicción de la absorción oral. Así por ejemplo, Yazdanian y col. reportaron que compuestos con valores $P_{\text{Caco-2}}$ menores que 0.4×10^{-6} cm/s exhibieron una pobre absorción oral, mientras que compuestos con valores de $P_{\text{Caco-2}}$ mayores que 7×10^{-6} cm/s tuvieron una excelente absorción (Yazdanian y col., 1998). En otras publicaciones Artursson y col. (Artursson y Karlsson, 1991) y Rubas y col. (Rubas y col., 1993) reportaron que compuestos con valores de $P_{\text{Caco-2}}$ superiores a 1×10^{-6} y 70×10^{-6} cm/s fueron completamente absorbidos en humanos, respectivamente. En adición, Chong y col. concluyeron que compuestos con un $P_{\text{Caco-2}}$ mayor que 1×10^{-6} cm/s deben tener una aceptable absorción en humanos ($>20\%$) (Chong y col., 1997). En cambio, Yee determinó que solo los compuestos con un $P_{\text{Caco-2}}$ mayor que 10×10^{-6} cm/s fueron bien absorbidos en humanos (70-100%) (Yee, 1997). Basados en estos criterios, Chaturvedi y col. han sugerido que los compuestos con los siguientes coeficientes de permeabilidad aparente: $<1 \times 10^{-6}$ cm/s, $1-10 \times 10^{-6}$ cm/s, $>10 \times 10^{-6}$ cm/s pueden ser considerados o clasificados como fármacos pobres (0-20%), moderados (20-70%) y bien (70-100%) absorbidos en humanos (Chaturvedi y col., 2001).

2.6 Modelos “*in silico*” para la Predicción de la Permeabilidad Intestinal

En secciones anteriores hemos visto que los modelos “*in vitro*”, al igual que los modelos “*in situ*” e “*in vivo*” pueden ser útiles para la estimación de la permeabilidad intestinal de fármacos. Sin embargo, prácticamente ninguno de ellos es capaz de predecir de forma rápida esta propiedad para una gran cantidad de nuevos candidatos. Una solución a esta problemática se puede lograr aplicando métodos computacionales apropiados, capaces de establecer relaciones estructura-permeabilidad, los cuales pueden ser utilizados en cualquier etapa del proceso de descubrimiento y desarrollo de un principio activo.

Durante los últimos 5 años, diversos modelos computacionales (cuantitativos y cualitativos) han sido desarrollados para la predicción de la permeabilidad intestinal pasiva (Stenberg y col., 2000; Clark y Pickett, 2000), los cuales han sido construidos utilizando diferentes aproximaciones, permitiendo realizar diferentes tipos de predicciones.

2.6.1 Modelos Cualitativos de la Permeabilidad de Membrana Intestinal

Cuando un compuesto o fármaco ha alcanzado los estudios clínicos Fase II, podemos considerar que es lo suficientemente bien absorbido como para encontrar una demanda clínica y tener otras propiedades comunes a los medicamentos. Tales compuestos pueden ser definidos como *similares a fármacos* (Ajay y col., 1998). Varios modelos cualitativos han sido desarrollados examinando estos compuestos, encontrándose patrones sistemáticos en sus estructuras (Lipinski y col., 1997; Ajay y col., 1998; Sadowsky y Kubinyi, 1998; Gillet y col., 1998; Kelder y col., 1999; Frimurer y col., 2000; Wagener y van Geerestein, 2000; Oprea, 2000).

El modelo cualitativo, probablemente más conocido, es la “Regla de los 5” (Lipinsky y col., 1997). En este modelo se analizaron 2245 compuestos en Fase II de ensayos clínicos y se identificaron 4 descriptores calculados fácilmente, que no excedieron ciertos límites para la mayoría de los compuestos. Estos descriptores fueron el número de enlaces donadores y aceptores de hidrógeno (no más de 5 y de 10 respectivamente), el peso molecular (no mayor de 500) y el coeficiente de partición (no mayor de 5). La “Regla de los 5” establece que si dos o más de estos límites son excedidos, el compuesto en cuestión no será un fármaco (Lipinsky y col., 1997). El mérito de este modelo es la facilidad de determinación e interpretación de los descriptores, lo que justifica su amplio uso. Sin embargo, la relevancia de esta “regla” ha sido cuestionada recientemente debido a la no dependencia de las propiedades evaluadas (Oprea, 2000).

2.6.2 Modelos Cuantitativos de la Permeabilidad de Membrana Intestinal

Los modelos cuantitativos han sido desarrollados relacionando la permeabilidad experimental con uno o más descriptores moleculares calculados. Estas relaciones han sido obtenidas utilizando varios métodos estadísticos, que van desde la regresión lineal simple (Palm y col., 1996) hasta los métodos más complejos que involucran redes neuronales (Wessel y col., 1998).

El cálculo de la lipofilidad, la capacidad de formación de puentes de hidrógeno y el tamaño molecular derivado de fragmentos y átomos, fueron de los primeros descriptores utilizados para la predicción de la permeabilidad de membrana (Hansch y col., 1965; Stein, 1967) y han sido, subsecuentemente, correlacionados con algún éxito (Palm y col.,

1996; van de Waterbeemd y col., 1996; Oprea y Gottfries, 1999; Raevsky y col., 2000; Platts y col., 2000).

Otros descriptores basados en fragmentos y conteos de átomos, han sido empleados para la descripción del transporte de membrana incluyendo parámetros de solubilidad (Martini y col., 1999), índices electrotopológicos (Norinder y Östesberg, 2001) y un conjunto de propiedades físico-químicas (Östesberg y Norinder, 2001). Los resultados obtenidos, usando estos métodos simples, fueron adecuados y comparables a los alcanzados utilizando otros de mayor demanda computacional (Norinder y col., 1997; Norinder y col., 1999).

Las propiedades de superficie molecular, derivadas de cálculos mecánico-moleculares, han sido utilizadas para describir varias propiedades físico-químicas, tales como lipofilidad (Barlow y Satoh, 1994; Testa y col., 1996), energía de solvatación (Ooi y col., 1987), y solubilidad (Amidon y col., 1975). Las propiedades de superficie molecular y en particular, el área de superficie molecular polar (PSA), han recibido mucha atención como un descriptor para la velocidad de transporte de membrana (Palm y col., 1996; van de Waterbeemd y col., 1996; Krarup y col., 1998; Winiwarter y col., 1998; Palm y col., 1998; Kelder y col., 1999; Clark, 1999; Goodwin y col., 1999; Ertl y col., 2000). El PSA fue introducido como un descriptor para el transporte pasivo de membrana por van der Waterbeemd y Kansy (1992). Este descriptor está relacionado con la capacidad de formación de puentes de hidrógeno, y se define como aquella parte del área de la molécula formada por átomos de nitrógeno y oxígeno, más el área de los átomos de hidrógeno unidos a estos heteroátomos (Palm y col., 1996). Este parámetro ha sido modificado para considerar no solamente el PSA de una simple conformación molecular sino, el de todas las conformaciones de baja energía (Palm y col., 1996). El PSA dinámico (PSAd) obtenido por este procedimiento, fue considerado como el mejor reflejo de la flexibilidad conformacional de la molécula y su significación en el incremento de la representación molecular ha sido señalada en varios estudios (Kelder y col., 1999; Clark, 1999). Sin embargo, este parámetro requiere una mayor demanda computacional que el PSA.

El PSA, la lipofilidad y la capacidad de formación de puentes de hidrógeno han sido utilizadas para construir modelos de permeabilidad intestinal en humanos, basados en

mínimos cuadrados parciales (PLS) (Winiwarter y col., 1998), redes neuronales (Wessel y col., 1998), etc.

Por otro lado, está bien establecido que sustituyentes no polares facilitan el transporte de membrana, y que los compuestos que son más hidrofóbicos generalmente tienen mayor permeabilidad de membrana que los compuestos hidrofílicos con propiedades similares de entrelazamiento de hidrógeno (Lundahl y Beige, 1997). Debido a esto, el área de superficie no polar dinámica ha sido considerada en los estudios de permeabilidad de membrana; incluso se han encontrado relaciones de combinación entre el área superficial polar y no polar, con la permeabilidad de membrana (Hidalgo y col., 1989; Conradi y col., 1994).

Otros métodos han sido desarrollados para predecir la permeabilidad a partir de descriptores derivados de estructuras 3D. Uno de ellos es el conocido como MS-WHIM (invariante molecular ponderada con la superficie molecular). Este método utiliza la información contenida en la estructura molecular 3D y condensa esta hacia los descriptores, los que están relacionados con propiedades físico-químicas fundamentales. Un modelo PLS que describe la permeabilidad en células Caco-2 de 17 fármacos estructuralmente diversos, ha sido desarrollado utilizando el método MS-WHIM (Bravi y Wikel, 2000).

Otro método, basado en lo que se conoce como *hashkeys* moleculares (vectores que capturan información acerca de las propiedades de superficie de la molécula), se ha utilizado para relacionar la información de la estructura molecular con la absorción intestinal de 20 compuestos estructuralmente diversos, usando para ello redes neuronales (Ghuloum y col., 1999).

Descriptores moleculares generados por métodos más complejos, que involucran cálculos mecánico-cuánticos, han sido también empleados para describir la permeabilidad de membrana. Varios descriptores relacionados con propiedades físico-químicas, se han calculado usando tales métodos y luego han sido correlacionados con la permeabilidad en células Caco-2 (Norinder y col., 1999).

En conclusión, un gran número de métodos computacionales se han desarrollado para la predicción de la permeabilidad intestinal de membrana y la absorción intestinal. Sin embargo, la mayoría de los modelos cuantitativos publicados, han sido aplicados sobre

pequeños conjuntos de datos, conteniendo compuestos de diversidad estructural limitada, por lo que se hace difícil señalar cuáles de estos modelos proveen las predicciones más precisas de la permeabilidad de membrana intestinal. La selección dependerá de la naturaleza de la información que se requiera, de cuanto esfuerzo computacional se necesite y de la potencia de cómputo con que se cuente.

2.6.3 Células Caco-2, Propiedades Físico-Químicas para la Absorción “*in vitro*” y Estudios de Relación Cuantitativa Estructura Permeabilidad (QSPeR)

En la actualidad es conocido que la absorción oral está influenciada por diferentes tipos de interacciones. En algunos estudios, ha sido demostrado que el coeficiente de permeabilidad para el transporte de fármacos a través de monocapas de células de Caco-2 está relacionado con la lipofilia del compuesto (Yazdanian y col., 1998; Artursson y Karlsson, 1991; van de Waterbeemd y Camenisch, 1996; Ren y Lien, 2000), mientras en otros se ha discutido sobre el rol de los enlaces de hidrógeno y la carga (Yazdanian y col., 1998; Artursson y Karlsson, 1991; van de Waterbeemd y Camenisch, 1996; Artursson y col., 1996; Camenisch y col., 1998). Waterbeemd y col. han usado una función que representa la relación entre el coeficiente de permeabilidad y las propiedades físico-químicas (van de Waterbeemd y Camenisch, 1996):

$$\text{Permeabilidad} = f(\text{lipofilia, talla molecular, capacidad de enlace de H, carga}) \quad (2.2)$$

Sin embargo, ninguna de estas propiedades es independiente (van de Waterbeemd y col., 2001) y existen rangos limitados como han sido establecidos en la regla de los cinco (Lipinski y col., 1997).

En las investigaciones de desarrollo de fármacos, varios investigadores han explorado estudios QSPeR relacionados con la permeabilidad de fármacos en células de Caco-2. Algunos tipos de descriptores moleculares han sido introducidos en estos estudios. Así por ejemplo, Fujiwara y col. obtuvieron un coeficiente de regresión 0.790 usando RNs y un coeficiente de correlación de 0.74 y 0.76, aplicando RLM (Fujiwara y col., 2002). Waterbeemd y col. usando un conjunto representativo de descriptores relacionados con el peso molecular y la capacidad de enlace de hidrógeno, obtuvieron trece modelos

aplicando RLM y MCP. Además, en este mismo trabajo estos autores obtuvieron un coeficiente de correlación de 0.88 ($s = 0.52$), donde dos componentes principales fueron utilizados como variables en los modelos de RLM (van de Waterbeemd y Camenisch, 1996). En otro reporte, Ren y Lien desarrollaron un análisis QSAR donde un adecuado coeficiente de correlación de 0.79 para una data de 51 compuestos fue obtenido (Ren y Lien, 2000). Finalmente, un estudio reciente fue llevado a cabo por Kulkarni y col. donde seis modelos predictivos fueron obtenidos usando RLM y los valores de R estuvieron entre 0.86 y 0.92, pero solo el 74% de la data original fue seleccionada para el análisis (Kulkarni y col., 2002).

2.7 Método Computacional. TOMOCOMD-CARDD Software

TOMOCOMD (Marrero-Ponce y Romero, 2002) es un programa interactivo para el diseño molecular e investigaciones bioinformáticas. El programa esta compuesto por cuatro módulos o subprogramas. Cada uno de estos módulos consta de una interfaz gráfica que facilita al investigador la representación de las moléculas (drawing mode) y el cálculo de varias familias de descriptores moleculares (calculation mode). Los módulos han sido denominados con las siguiente siglas acrónimas: CARDD (Computed-Aided 'Rational' Drug Design), CAMPS (Computed-Aided Modeling in Protein Science), CANAR (Computed-Aided Nucleic Acid Research) y CABPD (Computed-Aided Bio-Polymers Docking). En este trabajo, nosotros solo demostraremos los rasgos sobresaliente de uno de estos subprograma: CARDD. Este modulo fue desarrollado basado en una filosofía amigable para el usuario, el cual no tiene que tener *a priori* ningún conocimiento de programación.

Los principales pasos para desarrollar un estudio QSPR/QSAR utilizando el enfoque topológico molecular **TOMOCOMD-CARDD**, son resumidos brevemente a continuación:

1. Representar el seudografo molecular de cada una de las moléculas de la base de datos a analizar, usando el módulo de dibujo del software. Este procedimiento es llevado a cabo seleccionando el átomo deseado perteneciente a diferentes grupos de la tabla periódica en el momento de representar las moléculas,

2. Usar un ‘peso’ apropiado (etiqueta) de átomo, en orden de diferenciar cada tipo de átomo en la molécula. En este estudio hemos utilizado la electronegatividad de Mulliken (Cotton, 1970),
3. Computar los índices cuadráticos totales y locales “de la matriz de adyacencia entre vértices del seudografo molecular”. Este proceder es llevado a cabo en el módulo de cálculo del programa, el cual permite seleccionar la propiedad atómica y la familia que se desea calcular. Este programa genera una tabla en la cual las filas corresponden a los compuestos (casos) y las columnas a los índices moleculares calculados (variables).
4. Encontrar una o varias ecuaciones QSPR/QSAR usando técnicas estadísticas o de inteligencia artificial adecuadas, tales como Regresión Lineal Múltiple (RLM), Análisis Discriminante Lineal (ADL), Redes Neuronales (RN), entre otras. Es decir, nosotros encontramos una relación cuantitativa entre una propiedad **P** y la estructura química codificada con los descriptores calculados. Así por ejemplo, la ecuación obtenida con los índices cuadráticos tomaría la siguiente apariencia:

$$\mathbf{P} = a_0q_0(x) + a_1q_1(x) + a_2q_2(x) + \dots + a_kq_k(x) + c \quad (2.3)$$
 donde **P** es la medida de la propiedad, $q_k(x)$ [o $q_{kL}(x)$] es el k^{th} índice cuadrático total [o local], y los términos a_k ’s son los coeficientes obtenidos por el análisis estadístico multivariable.
5. Probar la robustez y demostrar el poder predictivo de las ecuaciones QSPR/QSAR obtenidas usando procedimientos de validación interna y externa.
6. Desarrollar una interpretación estructural de los modelos QSAR/QSPR obtenidos, que permita interpretar la propiedad **P** estudiada.

2.7.1 Índices Cuadráticos Moleculares

En orden de obtener los descriptores **TOMOCOMD-CARDD**, un vector molecular (**X**) es construido. Los componentes de este vector son valores numéricos de una propiedad que caracterizan cada tipo de átomo presente en la molécula (tales como la electronegatividad, densidad, radio atómico, etc) (Marrero-Ponce, 2003; Marrero-Ponce y col., 2003; Marrero-Ponce y col., In Press; Marrero-Ponce y Romero, 2002).

Dado una molécula constituida por n átomos (vector de $\Re^n$), los k^{th} índices cuadráticos moleculares, $q_k(x)$ son calculados como una forma cuadrática ($q: \Re^n \rightarrow \Re$) en las bases canónicas como se muestra en la Ec. 2.4 (Marrero-Ponce, 2003; Marrero-Ponce y Col., 2003; Marrero-Ponce y Romero, 2002),

$$q_k(x) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n {}^k a_{ij} X_i X_j \quad (2.4)$$

donde ${}^k a_{ij} = {}^k a_{ji}$ (Matriz cuadrada y simétrica), n es el número de átomos de la molécula y $X_1, \dots, X_n$ son las coordenadas del vector molecular $\mathbf{X}$ en un sistema de vectores bases de $\Re^n$. Los valores de las coordenadas del vector dependen de la base escogida (Browder, 1996; Axler, 1996; Maltsev, 1976). En la llamada base canónica (natural), e_j las coordenadas de cualquier vector coinciden con los componentes del vector (Browder, 1996; Axler, 1996; Ross y Wright, 1990; Maltsev, 1976). Por esta razón, las coordenadas de los vectores pueden ser consideradas como pesos o etiquetas de átomos, permitiendo diferenciar entre heteroátomos.

Los coeficientes ${}^k a_{ij}$ son los elementos a_{ij} de la k^{th} potencia de la matriz de adyacencia entre vértices ($\mathbf{M}^k$) del pseudografo molecular (G), la cual es utilizada como la matriz de la forma con respecto a la base canónica. Luego, $\mathbf{M}(G) \equiv \mathbf{M} = [a_{ij}]$, donde n es el número de vértices, y los elementos a_{ij} se definen como sigue (Marrero-Ponce, 2003; Marrero-Ponce y Col., 2003; Marrero-Ponce y Col., 2004; Marrero-Ponce y Romero, 2002):

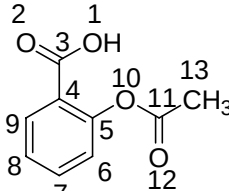
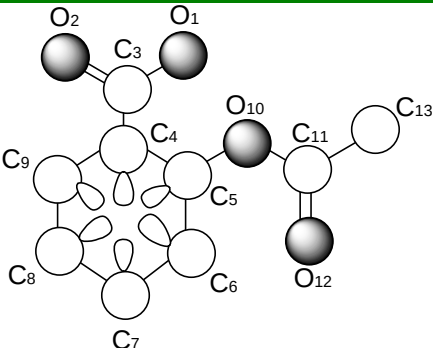
$$\begin{aligned} a_{ij} &= P_{ij} \text{ si } i \neq j \text{ y } \exists e_k \in E / e_k \sim v_i, v_j \\ &= L_{ii} \text{ si } i = j \\ &= 0 \text{ de otra forma} \end{aligned} \quad (2.5)$$

donde $E(G)$ representa el conjunto de las aristas. P_{ij} es el número de aristas entre los vértices v_i y v_j . L_{ii} es el número de lazos en v_i .

Los elementos a_{ij} ($a_{ij} = P_{ij}$) de la matriz $\mathbf{M}$ representan los enlaces entre un átomo v_i y otro v_j . La matriz $\mathbf{M}^k$ provee el número de *camino de longitud k* que une los vértices de v_i y v_j . Por esta razón, cada arista representa dos electrones del enlace covalente entre dos átomos v_i y v_j ; y esto puede ser apreciado en las entradas a_{ij} y a_{ji} igual a 1, 2 y 3 de la matriz $\mathbf{M}$ ($k = 1$) cuando entre los átomos (vértices) v_i y v_j existe un simple, doble o triple enlace, respectivamente. Las moléculas aromáticas como piridina, naftaleno, quinoleína,

etc; donde existen más de una estructura canónica, los electrones de los orbitales PI (π) son representados como lazos sobre los átomos del anillo.

Tabla 2.1. Definición y cálculo de seis ($k = 0-5$) índices cuadráticos totales de la matriz de adyacencia entre vértices del pseudografo molecular (G) de la molécula de ácido acetilsalicílico.

 Ácido Acetilsalicílico	 Seudografo Molecular (G) (Átomos de Hidrógenos Suprimidos)	$\mathbf{X} = [\text{O}_1 \text{ O}_2 \text{ C}_3 \text{ C}_4 \text{ C}_5 \text{ C}_6 \text{ C}_7 \text{ C}_8 \text{ C}_9 \text{ O}_{10} \text{ C}_{11} \text{ O}_{12} \text{ C}_{13}]$ Vector Molecular: $\mathbf{X} \in \mathbb{R}^{13}$ En la definición de $\mathbf{X}$, como vector molecular, los símbolos químicos de los elementos son usados para indicar el valor de electronegatividad correspondiente. Es decir, si nosotros escribimos O esto significa $\chi(\text{O})$, electronegatividad de Mulliken del oxígeno o alguna otra propiedad atómica, que caracterice cada átomo en la molécula. Por tanto, si nosotros utilizamos las bases canónicas de $\mathbb{R}^{13}$, las coordenadas del vector $\mathbf{X}$ coincide con los componentes del propio vector molecular ($\mathbf{X}$).
Estructura Molecular		$[\mathbf{X}]^t = [3.17 \ 3.17 \ 2.63 \ 2.63 \ 2.63 \ 2.63 \ 2.63 \ 2.63 \ 2.63 \ 2.63 \ 3.17 \ 2.63 \ 3.17 \ 2.63]$
$q_0(x) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n {}^0 a_{ij} X_i X_j = [\mathbf{X}]^t \mathbf{M}^0 [\mathbf{X}] = 102.4472$	$[\mathbf{X}]^t$ = transpuesto de $\mathbf{X}$ y este es el vector de coordenadas de el vector molecular, $\mathbf{X}$, en la base canónica de $\mathbb{R}^{13}$ (una matriz fila) $\mathbf{X}$: vector de coordenadas del vector molecular, $\mathbf{X}$ en la base canónica de $\mathbb{R}^{13}$ (una matriz columna)	
$q_1(x) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n {}^1 a_{ij} X_i X_j = [\mathbf{X}]^t \mathbf{M}^1 [\mathbf{X}] = 268.8912$	$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 2 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{bmatrix}$	
$q_2(x) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n {}^2 a_{ij} X_i X_j = [\mathbf{X}]^t \mathbf{M}^2 [\mathbf{X}] = 373.5982$	$\mathbf{M}^1(\mathbf{G})$: Matriz de adyacencia entre vértice (átomos) del pseudografo molecular	
$q_3(x) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n {}^3 a_{ij} X_i X_j = [\mathbf{X}]^t \mathbf{M}^3 [\mathbf{X}] = 2566.8034$		
$q_4(x) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n {}^4 a_{ij} X_i X_j = [\mathbf{X}]^t \mathbf{M}^4 [\mathbf{X}] = 8381.1414$		
$q_5(x) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n {}^5 a_{ij} X_i X_j = [\mathbf{X}]^t \mathbf{M}^5 [\mathbf{X}] = 25593.6122$		

Los anillos aromáticos con una sola estructura canónica tales como el furano, tiofeno, pirrol, entre otros, son representados como *multigrafos*. Además, los $q_k(x)$ pueden ser obtenidos mediante la expresión matricial representada en la Ec. 2.5 (Marrero-Ponce, 2003; Marrero-Ponce y col., 2003; Marrero-Ponce y Romero, 2002):

$$q_k(x) = \begin{bmatrix} X_1 & \cdots & X_n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_{11} & \cdots & a_{1n} \\ \vdots & & \vdots \\ a_{n1} & \cdots & a_{nn} \end{bmatrix}^k \begin{bmatrix} X_1 \\ \vdots \\ X_n \end{bmatrix} \quad (2.5)$$

o de forma más sencilla,

$$q_k(x) = [X]^t \mathbf{M}^k [X] \quad (2.6)$$

donde $[X]$ es el vector columna (una matriz de $n \times 1$) de coordenadas de $\mathbf{X}$ en la base canónica de $\mathfrak{R}^n$, $[X]^t$ es la matriz transpuesta de $[X]$ (una matriz de $1 \times n$) y $\mathbf{M}^k$ la k^{th} potencia de la matriz $\mathbf{M}$ de el pseudografo molecular G (Matriz de la forma cuadrática). En la Tabla 2.1 el cálculo de los primeros 6 índices cuadráticos moleculares es ejemplificado.

Uno de los criterios importantes de la lista de propiedades deseables para un nuevo IT es la posibilidad de definir localmente los descriptores (Randić, 1991). Este atributo se refiere al hecho de que el índice no sea obtenido solamente de forma global para una estructura, sino que también puedan ser definidos sobre determinados fragmentos de la propia estructura.

Es por ello que se ha propuesto una definición local (para átomos o tipos de átomos) de los índices cuadráticos moleculares. Estos descriptores moleculares han sido denominados como *índices cuadráticos locales* de la matriz de adyacencia entre vértices de un pseudografo molecular, $q_{kL}(x)$ en donde se ha mantenido la generalización a “análogos superiores” (como una secuencia de números) (Randić, 1991). La definición de estos descriptores, invariantes grafo-teóricas para un fragmento F_R dado, dentro de un pseudografo específico (G) es la siguiente (Marrero-Ponce, 2003; Marrero-Ponce y Col., 2003; Marrero-Ponce y Col., 2004; Marrero-Ponce y Romero, 2002):

$$q_{kL}(x) = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^m {}^k a_{ijL} X_i X_j \quad (2.7)$$

donde m es el número de átomos del fragmento de interés y ${}^k a_{ijL}$ es el elemento de la fila “ i ” y columna “ j ” de la matriz $\mathbf{M}_{\mathbf{L}}^k = \mathbf{M}^k(G, F_R)$ [$q_{kL}(x) = q_k(x, F_R)$]. Esta matriz se

extrae de la matriz k^{th} potencia de $\mathbf{M}$ y contiene la información referida a los vértices del fragmento F_R de interés y también de su entorno molecular.

La matriz $\mathbf{M}^k_L = [{}^k a_{ijL}]$ y los elementos ${}^k a_{ijL}$ son definidos como se muestra a continuación:

$$\begin{aligned} {}^k a_{ijL} &= {}^k a_{ij} \text{ si tanto } v_i \text{ como } v_j \text{ son vértices contenidos en el fragmento de interés.} \\ &= 1/2 {}^k a_{ij} \text{ si } v_i \text{ o } v_j \text{ están contenidos en el fragmento de interés pero no ambos} \\ &= 0 \text{ de otra forma} \end{aligned} \quad (2.8)$$

siendo ${}^k a_{ij}$ los elementos de la k^{th} potencia de $\mathbf{M}$. Estos análogos locales también pueden ser expresados de forma matricial mediante la siguiente expresión:

$$\mathbf{q}_{kL}(x) = [\mathbf{X}]^t \mathbf{M}^k_L [\mathbf{X}] \quad (2.9)$$

Nótese que si una molécula es particionada en Z fragmentos moleculares, la matriz $\mathbf{M}^k$ puede ser particionada en Z matrices locales $\mathbf{M}^k_L$, $L = 1, \dots, Z$. La matriz k^{th} potencia de $\mathbf{M}$ es exactamente la suma de las k^{th} potencia de las Z matrices locales,

$$\mathbf{M}^k = \sum_{L=1}^Z \mathbf{M}^k_L \quad (2.10)$$

o lo que es lo mismo $\mathbf{M}^k = [{}^k a_{ij}]$ donde,

$${}^k a_{ij} = \sum_{L=1}^Z {}^k a_{ijL} \quad (2.11)$$

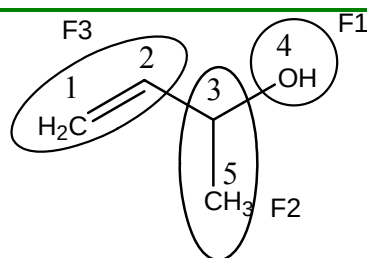
y los índices cuadráticos totales son iguales a la suma de los índices cuadráticos locales de los Z fragmentos,

$$\mathbf{q}_k(x) = \sum_{L=1}^Z \mathbf{q}_{kL}(x) \quad (2.12)$$

Cada orden de los índices cuadráticos locales tiene un significado particular, especialmente para los primeros valores de k , contienen información sobre la estructura del fragmento F_R en sí, para valores mayores, contiene información sobre el entorno del fragmento F_R considerado dentro del pseudografo molecular (G).

Tabla 2.2. Matriz de adyacencia entre vértices (átomos) del pseudografo molecular de orden cero, uno y dos y matrices locales de estos órdenes de cada uno de los tres fragmentos

mostrados en la molécula de alcohol 1-metilalílico (But-3-en-2-ol).



Estructura Molecular del Alcohol 1-metilalílico (But-3-en-2-ol)

$X = [C_1 C_2 C_3 O_4 C_5]$ Vector Molecular: $X \in \mathfrak{R}^5$ y $\mathfrak{R}^5 \in E$;

E: Espacio vectorial Molecular

En la definición de X , como vector molecular, los símbolos químicos de los elementos son usados para indicar el valor de electronegatividad correspondiente. Es decir, si nosotros escribimos O esto significa $\chi(O)$, electronegatividad de Mulliken del oxígeno o alguna otra propiedad atómica, que caracterice cada átomo en la molécula. Por tanto, si nosotros utilizamos las bases canónicas de R^5 , las coordenadas del vector X coinciden con los componentes del propio vector molecular (X).

$X^t = [2.63 \ 2.63 \ 2.63 \ 3.17 \ 2.63]$

X^t = transpuesto de X y este es el vector de coordenadas de el vector molecular, X , en la base canónica de R^5 (una matriz fila)

X : vector de coordenadas del vector molecular, X , en la base canónica de R^5 (una matriz columna)

Matriz de Adyacencia entre Vértices (Átomos) del Seudografo Molecular de Orden Cero, Uno y Dos

$$M^0(G) = I(G) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad M^1(G) = \begin{bmatrix} 0 & 2 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad M^2(G) = \begin{bmatrix} 4 & 0 & 2 & 0 & 0 \\ 0 & 5 & 0 & 1 & 1 \\ 2 & 0 & 3 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

Matrices Locales de Orden cero, uno y dos de cada uno de los tres Fragmentos Mostrados en la Molécula de Alcohol 1-metilalílico (But-3-en-2-ol).

$$\begin{aligned} M^0(G, F_1) &= \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} & M^1(G, F_1) &= \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1/2 & 0 \\ 0 & 0 & 1/2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} & M^2(G, F_1) &= \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1/2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1/2 & 0 & 1 & 1/2 \\ 0 & 0 & 0 & 1/2 & 0 \end{bmatrix} \\ M^0(G, F_2) &= \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} & M^1(G, F_2) &= \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1/2 & 0 & 0 \\ 0 & 1/2 & 0 & 1/2 & 1 \\ 0 & 0 & 1/2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{bmatrix} & M^2(G, F_2) &= \begin{bmatrix} 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1/2 \\ 1 & 0 & 3 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1/2 \\ 0 & 1/2 & 0 & 1/2 & 1 \end{bmatrix} \\ M^0(G, F_3) &= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} & M^1(G, F_3) &= \begin{bmatrix} 0 & 2 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 1/2 & 0 & 0 \\ 0 & 1/2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} & M^2(G, F_3) &= \begin{bmatrix} 4 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 5 & 0 & 1/2 & 1/2 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1/2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1/2 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \end{aligned}$$

Ahora nosotros consideremos la molécula del alcohol 1-metilalílico (But-3-en-2-ol) como un simple ejemplo para mostrar cómo se computan los índices cuadráticos totales y

locales. Para ello tomemos su representación en teoría de grafos (en este caso un multigrado) y su matriz de adyacencia entre vértices. La matriz de orden (potencia) cero, uno y dos del multigrado (G) y de las matrices locales de cada una de estas potencias de cada uno de los tres fragmentos mostrados en la molécula, son dados en la Tabla 2.2.

2.8 Conclusiones Parciales de la Revisión Bibliográfica

- ✚ Del estudio bibliográfico del tema se puede plantear que de los procesos farmacocinéticos, la absorción es una de las etapas que con mayor peso limita la conversión de una nueva entidad molecular en un medicamento de administración oral.
- ✚ Del estudio bibliográfico se aprecia que existen variados métodos experimentales para el estudio del proceso de absorción. Sin embargo, con ninguno de ellos es posible evaluar masivamente y de forma rápida las nuevas entidades moleculares obtenidas por métodos de tamizaje masivo.
- ✚ Existen varios modelos “*in silico*”, cualitativos y cuantitativos, para la predicción de la absorción y la permeabilidad intestinal, sin embargo la mayoría de los modelos publicados han sido aplicados sobre pequeños conjuntos de datos, conteniendo compuestos de diversidad estructural limitada.
- ✚ Del estudio bibliográfico se desprende que la aproximación **TOMOCOMD-CARDD** es uno de los métodos topológicos “*in silico*” con más potencialidades de aplicación en la predicción computacional del proceso de absorción de fármacos.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

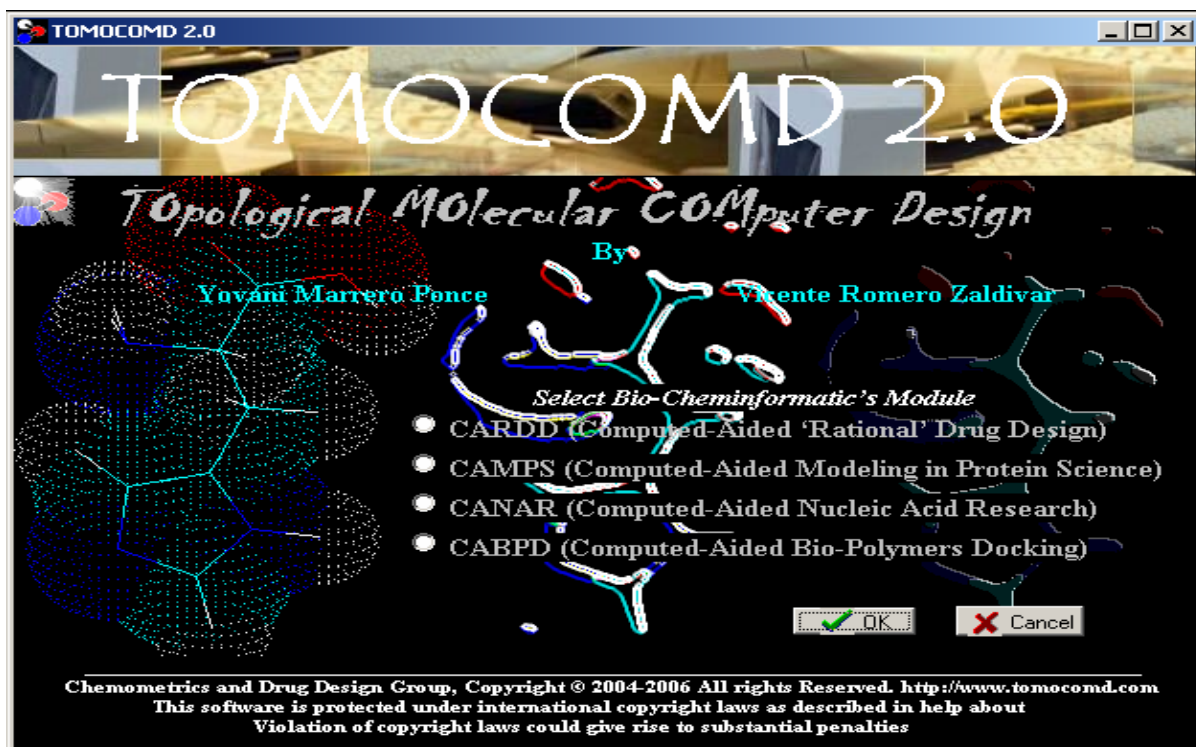
3.1 Cálculo de los nuevos ITs. *TOMOCOMD-CARDD* Software

En el paquete computacional *TOMOCOMD* (Marrero y Romero, 2002) se han implementado varias familias de descriptores moleculares, basados en la matriz de adyacencia entre vértices de un pseudografo molecular no dirigido o de combinaciones con otras matrices topológicas. Este software consta de una interfaz gráfica que facilita al investigador la representación de las moléculas, posteriormente su cálculo y por último el manejo de los datos. Específicamente, en este trabajo hemos computado los índices cuadráticos totales y locales de la matriz de adyacencia entre vértices del pseudografo molecular, los cuales han sido empleados en varios estudios QSPR/QSAR, utilizando el ADL y la RLM como técnicas estadísticas. La Figura 3.1 muestra la ventana para seleccionar el modulo de trabajo y la interfaz gráfica del subprograma (CARDD) de diseño de fármacos.

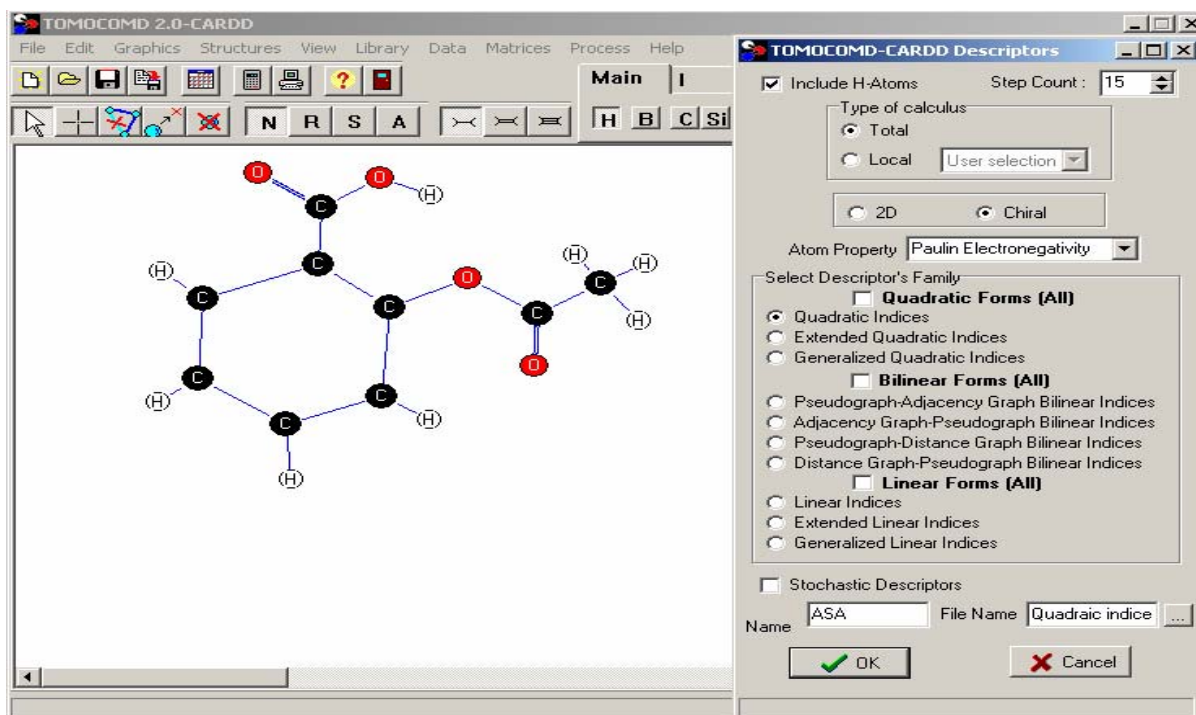
De forma general, en este trabajo los índices cuadráticos de la matriz de adyacencia entre vértices del pseudografo molecular calculados fueron los siguientes:

- 1) $q_k(x)$ [$q_k^H(x)$]; k^{th} índices cuadráticos totales sin considerar los átomos de hidrogeno en el pseudografo molecular [Considerando H-átomos].
- 2) $^E q_{kl}(x)$ [$^E q_{kl}^H(x)$]; k^{th} índices cuadráticos locales (considerando el cálculo sobre heteroátomos: oxígeno, nitrógeno y azufre).
- 3) $^H q_{kl}(x)$; k^{th} índices cuadráticos locales [considerando el cálculo sobre hidrógenos unidos a heteroátomos, (X-H siendo X = O, N, S).
- 4) $^A q_{kl}(x)$; k^{th} índices cuadráticos locales [considerando el cálculo sobre anillos aromáticos.

El conjunto de índices cuadráticos totales y locales computados es una caracterización única de cada compuesto y fueron utilizadas como variables independientes (parametrizando la estructura química) para el desarrollo de los modelos QSPeR.



A



B

Figura 3.1. TOMOCOMD-CARDD Software: **A**, Ventana para seleccionar el modulo de trabajo. **B**, Interfaz gráfica del subprograma de diseño de fármacos.

3.2 Análisis Estadístico de los Datos

“Models are to be used, not believed”

Menger, F.M *J.Am.Chem.Soc.* 107 (1985) 3105

3.2.1 Introducción

Los estudios QSPR/QSAR constituyen un enfoque que permite entender como la variación estructural afecta la propiedad/actividad biológica de un conjunto de compuestos. En los estudios QSPR/QSAR, los descriptores moleculares (X) son correlacionados con una variable respuesta (Y). Es decir, el análisis QSPR/QSAR puede ser definido como una aplicación de métodos matemáticos y estadísticos al problema de encontrar una ecuación empírica de la forma $Y_i = f_i(X_1, X_2, \dots, X_n)$, donde Y_i son las propiedades y/o actividades biológicas de la molécula, y $X_1, X_2, \dots, X_n$ son propiedades estructurales experimentales o calculadas (descriptores moleculares) de los compuestos. En este sentido, cada compuesto puede ser representado como un punto en un espacio multidimensional, en los cuales los descriptores $X_1, X_2, \dots, X_n$ son coordenadas independientes del compuesto. El objetivo de este análisis usualmente es incrementar el

entendimiento del sistema biológico bajo investigación o predecir la propiedad estudiada a un objeto (compuesto) no utilizado en la obtención del modelo; el cual inclusive puede no tener existencia física aún, o al menos no le ha sido medida experimentalmente la propiedad/actividad que se está modelando. De forma general, todos los enfoques QSPR/QSAR implementan, directa o indirectamente, un simple principio de similaridad, el cual por un largo tiempo ha proveído una fundamentación para los experimentos de la química farmacéutica (Golbraikh y Tropsha, 2002):

«Compounds with similar structure are expected to have similar biological activities. This implies that points representing compounds with similar activities in multidimensional descriptor space should be close to each other».

3.2.2 Quimiometría

El término *quimiometría*, surgió en la década del 70 y se define como la disciplina química que usa métodos estadísticos y matemáticos para seleccionar y optimizar los métodos analíticos y preparativos, así como procedimientos para el análisis e interpretación de la data (van de Waterbeemd, 1995). Dos revistas específicas se dedican al desarrollo y aplicación de los *métodos quimiométricos*: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (1986) y *The Journal of Chemometrics* (1987). Una serie de libros sobre *quimiometría* han comenzado a comercializarse desde hace algún tiempo (Walters y col, 1991; Deming y Morgan, 1993). Usando esencialmente las técnicas quimiométricas, los químicos farmacéuticos y los especialistas en el diseño de fármacos, le han dado un desarrollo adicional al campo de los estudios QSPR/QSAR (Topliss, 1983; Tute, 1990; Martin, 1978).

3.2.3 Análisis de Regresión Lineal Múltiple (RLM)

Los modelos QSPR-RLM fueron obtenidos con el paquete de programas estadísticos STADISTICA (STATISTICA, 1999). El método de selección de variables utilizado fue el de “*paso hacia adelante*” (forward stepwise). En todos los casos la *F* y la *tolerancia* fueron estadísticos usados para el control del proceder de selección. En este sentido, la *colinealidad* entre variables fue chequeada utilizando las *matrices de correlaciones* entre

las variables incluidas en el modelo. Siempre se utilizó, por defecto, como mínimo aceptable de *tolerancia* el valor de 0.01.

Los estadísticos usados para evaluar la *calidad del modelo* y el ajuste del mismo a los datos experimentales fueron el *coeficiente de correlación múltiple* (R) y el cuadrado de su valor (R^2 , *coeficiente de determinación*). La *desviación estándar*, la F de Fischer (y/o el *nivel de significación* del modelo y de cada variable, $p \leq 0.05$) también fueron tenidos en cuenta a la hora del ajuste y selección de los modelos desarrollados.

La *calidad predictiva* de las ecuaciones desarrolladas fue evaluada utilizando los estadísticos del proceso de validación cruzada (VC). En este sentido, fueron aplicados el procedimiento de VC “*dejando uno fuera*” (**LOO**: Lease-One-Out) y “*dejando grupos fuera*” [**LGO**: Lease-Group-Out (q^2 y MAE, respectivamente)]. Además, en cada caso se utilizaron series de predicción (series de validación ‘cruzada’) y series de validación externas, para acceder a la *estabilidad* y al *poder predictivo* de los modelos QSPeR obtenidos.

3.2.4 Desarrollo de FDs usando ADL

A pesar de que existen varias *técnicas quimiométricas* para generar FD, tales como SIMCA o RNs, nosotros hemos seleccionado el ADL en orden de obtener *funciones de clasificaciones* sobre la base de la simplicidad del método. Además, la contribución de fragmentos a la actividad farmacológica estudiada puede ser fácilmente derivada a partir de la FD lineal, lo cual es difícil o imposible a partir de relaciones no lineales tales como las derivadas utilizando RNs.

El análisis discriminante es una técnica multivariada de dependencia, como la regresión lineal múltiple. La diferencia inicial consiste en que la variable dependiente o criterio es una variable no métrica (categórica). Este análisis se usa para determinar qué variables diferencian dos o más grupos mutuamente excluyentes.

En orden de probar la *calidad* y *robustez* de los modelos obtenidos nosotros siempre evaluamos varios parámetros estadísticos, tales como la λ de Wilks, el valor de F y el cuadrado de la distancia de Mahalanobis (D^2). Otro factor que tuvimos en consideración para evaluar la habilidad (poder discriminante) de las FD obtenidas, fueron los

porcentajes de buena clasificación en cada uno de los grupos y del modelo en general en la serie de entrenamiento (SE). La clasificación de los casos es desarrollada por medio de la *probabilidad de clasificación posterior*. Usando la D^2 para la clasificación, se pueden derivar probabilidades. La probabilidad que un caso pertenezca a un grupo particular es básicamente ‘proporcional’ a la D^2 al centroide del grupo. En resumen, la *probabilidad posterior* es la probabilidad, basada en el conocimiento de los valores de otras variables, que el respectivo caso pertenece a un grupo en particular.

En algunos casos, los resultados de las probabilidades de clasificación para cada compuesto son dados con el siguiente parámetro: $\Delta P\% = [P(\text{actv}) - P(\text{inactv})] \times 100$, donde $P(\text{actv})$ es la probabilidad con que la ecuación clasifica un compuesto como activo. Contrariamente, $P(\text{inactv})$ es la probabilidad con que el modelo clasifica un compuesto como inactivo. Cuando $\Delta P\%$ está en el rango $-5 < \Delta P\% < 5$ los compuestos fueron considerados como *no clasificados*.

Para acceder al *poder predictivo* de los modelos QSPeR-ADL obtenidos, se desarrollaron procedimientos de *validación interna* y *externa*. En la *validación interna*, se llevó a cabo en cada caso un proceder de VC ‘dejando n compuestos fuera’ (leave- n -out), análogo al LGO. Esta técnica de validación fue implementada en el módulo de *árboles de clasificación* del software STADISTICA. En este módulo, el usuario puede seleccionar varias variables a la hora de desarrollar el análisis. Esta metodología remueve sistemáticamente un compuesto de la SE y construye el modelo con la data reducida y la función obtenida es utilizada para predecir el compuesto que ha sido extraído. Este proceder es repetido hasta que todos los casos han sido removidos una vez y predichos por el modelo generado con las respectivas datas reducidas. Este procedimiento puede hacerse para más de un compuesto a la vez según tome n valores reales enteros. Para $n = 2$ se necesitan evaluar todas las posibles combinaciones de dos compuestos y así sucesivamente.

Para una exhaustiva prueba del *poder predictivo* de los modelos obtenidos, en cada caso se utilizó una serie de validación cruzada (o también denominadas series de predicción, SP). En conexión, en cada caso se utilizaron SP externa para validar el espectro de aplicación de los modelos encontrados.

3.2.5 Procedimiento de Selección de ‘outliers’. El Role de los ‘outliers’

La detección de ‘outliers’ estadísticos es una tarea importante en la *validación* de un modelo que puede además aportar importantes evidencias sobre características importantes de ciertos compuestos de la muestra. Los ‘outliers’ son puntos que se desvían significativamente del modelo encontrado (no se ajustan al modelo) o son pobremente predichos por estos, afectando los parámetros estadísticos del mismo (Egan y Morgan, 1998). Existen varias razones que explican la presencia de ‘outliers’ en los estudios QSAR. Así por ejemplo, estos compuestos pueden ser activos por un mecanismo de acción diferentes a los restantes compuestos que son bien modelados.

Generalmente, la identificación de ‘outliers’ busca un mejoramiento cualitativo del modelo. Un buen ejemplo ha sido mostrado por Cronin y col. en la modelación de la toxicidad de compuestos carbonílicos alifáticos para *T. Piriformis* (Cronin y col., 2001). En este estudio, para un total de 140 compuestos solo un moderado ajuste estadístico fue obtenido ($r^2 = 0.753$). Sin embargo, al remover cinco ‘outliers’ aumentó hasta $r^2 = 0.853$ (Cronin y col., 2001). Existen varias técnicas para detectar la presencia de ‘outliers’: los análisis de los residuales estandarizados, los residuales studentizados, el método de *Leverage*, la estadística DFITS y la distancia de Cook (STATISTICA, 1999).

3.2.6 Datos Experimentales de Permeabilidad en Células de Caco-2 Utilizados en los Estudios Teóricos

La aplicabilidad y la representatividad del presente método dependen de forma crítica de la selección de los compuestos que son utilizados como SE para construir los modelos QSPeR. El aspecto más crítico en la construcción de la SE es garantizar la gran diversidad molecular de la data. En orden de asegurar esta diversidad molecular nosotros hemos seleccionado una data compuesta por una gran cantidad de entidades moleculares. Dos series de compuestos fueron utilizadas para el desarrollo de dos estudios diferentes, cada uno con objetivos específicos. El primer estudio fue llevado a cabo estuvo basado en una SE compuesta por 33 fármacos estructuralmente diversos, los cuales fueron estudiados experimentalmente por Liang y col. (Liang y col., 2000). Este autor usó el modelo tradicional y acelerado de permeabilidad en células de Caco-2 y los valores experimentales de $P_{\text{Caco-2}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ y $P_{\text{Caco-2}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$ son mostrados en la Tablas 4.1 y

4.2, respectivamente (ver Resultados y discusión). Los coeficientes de permeabilidad de la SP de 18 fármacos fueron tomados de un estudio desarrollado por Yazdanian y col. (Yazdanian y col., 1998). Los compuestos usados por Liang y col. fueron tomados del trabajo anterior. Ambos estudios fueron llevados a cabo bajo las mismas condiciones experimentales. El coeficiente de permeación de estos 51 compuestos fueron modelados usando RLM.

Una segunda base de datos de 134 compuestos estructuralmente diversos fue compilada de diferentes fuentes y fue utilizada como SE para desarrollar una FD entre compuestos con alta y pobre-moderada absorción. Los valores experimentales de P_{Caco-2} (AP→BL) son ilustrados en la Tabla 4.3 (ver Resultados y discusión). Esta data presenta compuestos con diversos pesos moleculares y cargas, además de tener representación de todos los tipos de mecanismos de absorción intestinal. Una SP compuesta por dos series de compuestos (Inhibidores de la proteasa del VIH-1 y Quinolonas derivadas del ciprofloxacina) fue seleccionada de la literatura más actual (Aungst y col., 2000; Ruiz-García y col., 2002).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de los Modelos QSPeR-RLM para la Predicción del $P_{\text{Caco-2}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ y $P_{\text{Caco-2}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$

Con el ánimo de predecir la permeabilidad de fármacos en células de Caco-2, nosotros desarrollamos dos modelos cuantitativos que relacionan los índices cuadráticos de las moléculas con el $P_{\text{Caco-2}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL})$ y $P_{\text{Caco-2}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$. Los mejores modelos de regresión obtenidos con el proceder ‘forward stepwise’ son dados a continuación junto con sus parámetros estadísticos:

$$\begin{aligned} P_{\text{Caco-2}}(\text{AP} \rightarrow \text{BL}) = & 28.3222 - 2.619 \times 10^{-4} q_8(x) + 2.1 \times 10^{-5} q_9(x) - 0.0555^E q_{3L}^H(x) \\ & - 2.2045 \times 10^{-8} q_{14L}^A(x) - 4.8761 \times 10^{-7} q_{11}^H(x) + 0.03^E q_{3L}(x) \end{aligned} \quad (4.1)$$

$$N = 33 \quad R = 0.8417 \quad F(6.26) = 10.534 \quad s = 6.6438 \quad s_{\text{CV}} = 8.5654 \quad p < 0.00001$$

$$P_{\text{Caco-2}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP}) = 32.44068 - 0.30871^E q_{1L}^H(x) + 7.97 \times 10^{-8} q_{12}(x) \quad (4.2)$$

$$N = 16 \quad R = 0.8896 \quad F(2.13) = 24.647 \quad s = 6.8420 \quad s_{\text{CV}} = 7.3052 \quad p < 0.00004$$

donde N es la cantidad de compuestos, R el coeficiente de correlación múltiple, F es la F-de Fischer y s (s_{CV}) es la desviación estándar de la regresión (y del proceso de validación cruzada dejando-1-fuera; LOO). En las Tablas 4.1 y 4.2 se muestran los valores experimentales y calculados del coeficiente de permeabilidad para las datas. En el desarrollo del modelo cuantitativo para la descripción de $P_{\text{Caco-2}}(\text{BL} \rightarrow \text{AP})$ uno de los compuestos fue detectado como ‘outlier’ estadístico (Cafeína). Además, una serie externa de 18 compuestos fue utilizada para acceder al poder predictivo del modelo 4.1. Los resultados son mostrados en la parte inferior de la Tabla 4.1. Los estadísticos para esta serie estuvieron en el mismo orden que los obtenidos para la serie de ajuste y para el procedimiento de validación cruzada LOO: N = 18, R = 0.73, s = 8.68 y F = 18.277.

Tabla 4.1. Valores experimentales (modelo tradicional y acelerado) y calculados del coeficiente de permeabilidad (AP→BL) en células Caco-2 de 33 compuestos, así como los residuales y los residuales de la validación cruzada LOO.

		$\times 10^6$ (cm/s)			Δ^c	CV- Δ^d	$P_{\text{acel.}}/P_{\text{obsd}}$	$P_{\text{calc.}}/P_{\text{obsd.}}$			
no	Compuesto	$P_{\text{tradicional}}^a$.(obsd)	$P_{\text{acelerado}}^a$	$P_{\text{tradicional}}$ (calc)							
<i>Serie de Entrenamiento</i>											
1	Aminopyrine	36.5	65.2	29.78	6.72	8.25	1.8	0.8			
2	Caffeine	30.8	51.9	25.45	5.35	7.81	1.7	0.8			
3	Nevirapine	30.1	66.7	21.77	8.33	9.43	2.2	0.7			
4	Phenytoin	26.7	53.6	19.31	7.39	8.90	2.0	0.7			
5	Testosterone	24.9	61	23.44	1.46	1.68	2.4	0.9			
6	Phencyclidine	24.7	50.6	21.84	2.86	3.16	2.0	0.9			
7	Desipramine	24.4	39.3	23.16	1.24	1.39	1.6	0.9			
8	Progesterone	23.7	39	24.55	-0.85	-1.03	1.6	1.0			
9	Clonidine	21.8	46.2	26.45	-4.65	-6.32	2.1	1.2			
10	Propranolol	21.8	34.3	12.63	9.17	10.34	1.6	0.6			
11	Chlorpromazine	19.9	32.5	25.22	-5.32	-6.05	1.6	1.3			
12	Meloxicam	19.5	39.5	16.93	2.57	25.83	2.0	0.9			
13	Nicotine	19.4	54.6	18.91	0.49	0.53	2.8	1.0			
14	Pindolol	16.7	31.2	3.77	12.93	15.57	1.9	0.2			
15	Telmisartan	15.1	21.1	18.02	-2.92	-11.96	1.4	1.2			
16	Hydrocortisone	14	22.5	14.47	-0.47	-0.55	1.6	1.0			
17	Timolol	12.8	25.4	3.24	9.56	12.29	2.0	0.3			
18	Scopolamine	11.8	20.9	10.34	1.46	1.69	1.8	0.9			
19	Dopamine	9.33	17.5	15.41	-6.08	-7.33	1.9	1.7			
20	Labetalol	9.31	15.3	7.71	1.60	2.16	1.6	0.8			
21	Bremazocine	8.02	19.1	14.67	-6.65	-7.92	2.4	1.8			
22	Urea	4.56	7.78	11.80	-7.24	-8.70	1.7	2.6			
23	Uracil	4.24	6.86	13.89	-9.65	-10.69	1.6	3.3			
24	Cimetidine	1.37	2.29	5.54	-4.17	-4.60	1.7	4.0			
25	Methyl scopolamine	0.69	1.56	7.76	-7.07	-8.85	2.3	11.2			
26	Hydrochlorothiazide	0.51	0.93	-2.54	3.05	4.63	1.8	-5.0			
27	Acebutolol	0.51	1.81	4.75	-4.24	-4.66	3.5	9.3			
28	Ranitidine	0.49	1.17	-4.10	4.59	5.91	2.4	-8.4			
29	Pirenzepine	0.44	1.34	11.56	-11.12	-11.74	3.0	26.3			
30	Mannitol	0.38	1.24	-1.01	1.39	1.81	3.3	-2.7			
31	Sulfasalazine	0.3	0.92	5.62	-5.32	-7.12	3.1	18.7			
32	Acyclovir	0.25	2.13	5.47	-5.22	-5.96	8.5	21.9			
33	Chlorothiazide	0.19	1.11	-0.60	0.79	1.17	5.8	-3.1			
<i>Serie de Predicción</i>											
no	Compuesto	$P_{\text{OBS.}}^a$	$P_{\text{CAL.}}^b$	no	Compuesto	$P_{\text{OBS.}}^a$	$P_{\text{CAL.}}^b$	no	Compuesto	$P_{\text{OBS.}}^a$	$P_{\text{CAL.}}^b$
34	Griseofulvin	36.60	52.62	40	Salicylic acid	22.00	23.76	46	Zidovudine	6.93	-14.30
35	Piroxicam	35.60	32.55	41	Warfarin	21.10	40.20	47	Nadolol	3.88	7.80
36	Diazepam	33.40	26.55	42	Indomethacin	20.40	27.62	48	Sucrose	1.71	-26.62
37	Alprenolol	25.30	15.21	43	Estradiol	16.90	21.45	49	Atenolol	0.53	3.92
38	Metoprolol	23.70	9.66	44	Dexamethasone	12.2	24.67	50	Terbutaline	0.47	8.49
39	Corticosterone	21.20	17.07	45	Acetylsalicylic acid	9.09	24.84	51	Ganciclovir	0.38	0.67

^atomado de Liang y col., 2000. ^bCalculado con la Ec. (4.1). ^cResidual, definido como $P_{\text{tradicional}}(\text{obsd})$

- $P_{\text{tradicional}}$ (calc). ^dResidual de la validación cruzada LOO.

Tabla 4.2. Valores experimentales (modelo tradicional y acelerado) y calculados del coeficiente de permeabilidad (BL→AP) en células Caco-2 de 17 compuestos, así como los residuales y los residuales de la validación cruzada LOO.

no Compuesto	$\times 10^6$ (cm/s)		Δ^c	CV- Δ^d	$P_{\text{acel.}}/P_{\text{obsd}}$	$P_{\text{calc.}}/P_{\text{obsd}}$
	$P_{\text{tradicional}}^a$ (obsd)	$P_{\text{acelerado}}^a$	$P_{\text{tradicional}}$ (calc)			
2 Caffeine*	27.7	59.8	--	--	2.16	--
5 Testosterone	39.1	66.9	25.85	13.2	15.64	1.71
8 Progesterone	20.3	40.6	25.96	-5.66	-6.65	2.00
9 Clonidine	27.1	41	24.18	2.92	3.28	1.51
10 Propranolol	33.2	32.2	28.26	4.94	5.74	0.97
15 Telmisartan	42.5	35.4	40.83	1.67	4.86	0.83
16 Hydrocortisone	15.9	28.8	12.49	3.41	3.74	1.81
18 Scopolamine	14.2	19.5	11.69	2.51	2.74	1.37
21 Bremazocine	19.1	20.3	25.80	-6.70	-7.62	1.06
22 Urea	7.91	9.84	17.28	-9.37	-10.74	1.24
24 Cimetidine	1.67	1.94	1.26	0.41	0.49	1.16
25 Methyl scopolamine	1.78	2.31	10.03	-8.25	-9.07	1.30
26 Hydrochlorothiazide	1.46	1.21	0.37	1.09	1.66	0.83
27 Acebutolol	10.70	6.22	10.12	0.58	0.63	0.58
28 Ranitidine	3.49	1.36	-4.99	8.48	11.40	0.39
29 Pirenzepine	2.12	1.73	10.62	-8.50	-9.26	0.82
33 Chlorothiazide	2.64	3.03	3.42	-0.78	-1.24	1.15

*Outlier. ^atomado de Liang y col., 2000. ^bCalculado con la Ec. (4.2). ^cResidual, definido como

$P_{\text{tradicional}}(\text{obsd}) - P_{\text{tradicional}}(\text{calc})$. ^dResidual de la validación cruzada LOO.

4.2 Desarrollo del Modelo QSPeR-ADL

En orden de desarrollar una FD, el ADL fue aplicado a una data conformada por 81 compuestos con alta absorción ($P_{\text{Caco-2}} \geq 8 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) y 53 compuestos con moderada-pobre absorción ($P_{\text{Caco-2}} < 8 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) (ver Tabla 4.3). El mejor modelo discriminante obtenido fue el siguiente:

$$f_{(H-M,P)} = 4.1493 + 0.07622 \cdot q_0(x) - 0.00475 \cdot q_2(x) - 0.00462 \cdot q_2^H(x) + 2.08 \times 10^{-7} \cdot q_{10}^H(x) - 0.1099 \cdot q_{3L}^H(x) + 0.03735 \cdot q_{4L}^H(x) - 9.6 \times 10^{-5} \cdot q_{8L}^H(x) - 0.02427 \cdot q_{1L}^H(x) \quad (4.3)$$

$$N = 134 \quad \lambda = 0.48 \quad D^2 = 4.518 \quad F(8.125) = 16.878 \quad p < 0.0000$$

El modelo clasifica correctamente el 81.13% de los compuestos con moderada-pobre absorción y el 96.30% de los compuestos con alta absorción. El porcentaje global de buena clasificación para esta serie de 134 compuestos fue de 90.30%. Solo 13 compuestos fueron mal clasificados, tres de ellos con alta absorción fueron clasificados

Tabla 4.3. Permeabilidad en células Caco-2 de 134 compuestos estructuralmente diversos.

Compounds	Ref	P _{OBS.} ^a	Compounds	Ref	P _{OBS.} ^a	Compounds	Ref	P _{OBS.} ^a
Acebutolol	69	4.47	Telmisartan	7	15.14	Sulphasalazine	70	0.13
	7	0.51		7	0.47		7	0.3
Acebutolol ester	69	77.62		76	0.97		7	0.3
Acetylsalicylic acid	70	2.4	Terbutaline	70	0.38	Taurocholic acid	17	34.67
	17	30.9		75	1.04	Ibuprophen	17	52.5
	7	9.12	Chlorpromazine	7	19.95	Amiloride	72	0.78
Aciclovir	17	2	Clonidine	17	30.2	Alfentanil	72	310
	7	0.25		7	21.88	Cumarin	9	77.62
Alprenolol	70	40.74	Chlorothiazide	7	0.19	Theophylline	9	44.67
	8	40.74	Corticosterone	70	54.95	Epinephrine	9	0.95
	69	75.86		7	21.38	Guanoxan	9	19.5
	7	25.12		8	54.5	Guanabenz	9	72.44
	71	38.3	Desipramine	17	21.38	Lidocaine	9	61.66
	72	242		7	24.55	Tiactrilast	9	12.59
Alprenolol ester	69	107.15	Dexamethasone	70	12.59	Nitrendipine	9	16.98
Aminopyrine	7	36.31		75	26.92	Fleroxacin	9	15.49
Artemisinin	73	30.4		17	23.44	Diltiazem	9	48.98
Artesunate	73	4		7	12.3	Verapamil	9	26.3
			Dexamethasone-β-					
Atenolol	70	0.2	D-glucoside	75	0.44	Mibefradil	9	13.49
	8	0.2	Dexamethasone-β-	75	1.15	Bosentan	9	1.05
	74	0.47	D-glucuronide	17	70.79	Proscillaridin	9	0.63
	7	0.52	Diazepam	7	33.11	Ceftriaxone	9	0.13
	9	0.23		72	756	Remikiren	9	0.74
	73	0.13		7	33.4	Squinavir	9	0.55
	16	4	Dopamine	7	9.33	Olsalazine	70	0.11
	75	1.16	Doxorubicin	17	0.16	Glycine	17	80
	76	0.19	Erithromycin	17	3.72	Amoxicillin	75	0.33
	71	0.2	Estradiol	7	19.95	Enaprilate	75	0.62
	72	1	Felodipine	8	22.91	Lisinopril	75	0.05
Azithromycin	17	1.05	Fluconazole	17	29.51	Gabapentin	77	4.33
Penicillin G	17	1.95	Ganciclovir	15	2.69		77	1.5
Betaxolol	69	95.5		7	0.38	Raffinose	72	0.05
Betaxolol ester	69	95.5		7	0.38	Sildenafil	72	87
Tenidap	17	51.29	Gliseofulvin	7	36.31	Antipyrine	76	47.23
Bremazocine	7	7.94	H216/44	8	0.91		72	2.15
Caffeine	17	50.5		71	1.14	Ciprofloxacin	72	1.9
	7	30.9	Hidrochlorothiazid	74	1.51	Imipramine	17	14.13
	75	84		7	0.51	Indomethacin	7	25.12
	16	21.4	Oxazepam	72	246	Lactulose	72	0.27

Tabla 4.3. Cont.

Compounds	Ref	P _{OBS.} ^a	Compounds	Ref	P _{OBS.} ^a	Compounds	Ref	P _{OBS.} ^a
Labetalol	7	7	Nordazepam	72	307	Testosterone	8	51.8
Mannitol	70	0.18	Metolazone	72	6.1		7	24.9
	15	3.24	Oxprenolol	69	66.07		75	44.5
	17	0.65		72	120		9	58.88
	7	0.38	Oxprenolol ester	69	97.72	Timolol	69	44.67
	9	2.63	Phencyclidine	7	24.55		7	12.88
	76	0.12	Phenytoin	7	26.92	Timolol ester	69	79.43
	16	0.5	Pindolol	7	16.6	Trovafloxacin	17	30.2
	75	0.17	Pirenzepine	7	0.44	Uracil	7	4.27
	77	0.83	Piroxicam	7	35.48	Urea	7	4.57
Meloxicam	7	19.95		76	46.25	Valproic acid	17	48
Methanol	15	131.83	Practolol	70	0.89	Warfarin	70	38.02
Methotrexate	17	1.2		8	0.89		7	20.89
Methylscopolamine	7	0.79		9	1.38		9	53.7
Metoprolol	70	26.92		71	0.92	Ziduvudine	7	6.92
	8	26.92		72	3.5	Ziprasidone	17	12.3
	76	18.8	Prazocin	17	43.65	Cephalexin	73	0.18
	71	26.71	Progesterone	15	78.23	Gly-Pro	76	6.1
	72	92		7	23.7	D-glucose	76	17.53
Nadolol	7	3.89	Propranolol	70	41.69	L-Phenylalanine	76	18.37
	16	4.5		8	41.69	Ketoprofen	76	23.15
Naloxone	17	28.18		69	83.18	Furosemide	76	0.29
Naproxen	15	74.13		17	27.54	Sulpiride	72	0.39
Nevirapine	7	30.2		7	21.88	SB 209670	72	8.8
Nicotine	7	19.5		73	11.2	SB 217242	72	70
D-Phe-L-Pro	17	44.3		71	43.03	Cimetidine	74	0.5
BvaraU	16	4		16	14.8		17	3.09
Pravastatin	16	2.3	Sumatriptan	17	3.02		7	1.37
L-Glutamine	75	0.85	Propranolol ester	69	104.71		76	0.35
SQ-29852	16	0.02	Quinidine	17	20.42	Hydrocortisone	8	21.38
Foscarnet	72	0.05	Ranitidine	7	0.49		15	35.4
Sucrose	7	1.7	Salicylic acid	70	12.02		7	15.85
	75	0.71		7	21.88		77	44.67
Chloramphenicol	17	20.42	Scopolamine	7	11.75		75	12.9

^aCoefficiente de permeabilidad: $P_{\text{caco-2}}$ (AP→BL)×10⁻⁶cm/s, obtenido de diferentes fuentes (Ref): ^aHovgaard y col., 1995; ^bYazdanian y col., 1998; ^cArtursson, 1990; ^dYee, 1997; ^eArtursson y Karlsson, 1991; ^fArtursson y Magnusson, 1990; ^gStenberg y col., 2001; ^hGrès y col., 1995; ⁱHilgendorf y col., 2000; ^jAugustijns y col., 1996; ^kRubas y col., 1993; ^lCamenisch y col., 1998; ^mCollett y col., 1996; ⁿChong y col., 1997; ^oStewart y col., 1995.

Tabla 4.4. Resultados de la clasificación de los compuestos en la SE y en la SP externa usando la FD obtenida con los índices cuadráticos totales y locales.

Compuestos	Prob ^a	Prob-cv ^b	Compuestos	Prob ^a	Prob-cv ^b	Compuestos	Prob ^a	Prob-cv ^b
Serie de Entrenamiento								
Grupo de alta absorción (H)								
Acebutolol ester	0.54	0.52	Meloxicam	0.66	0.61	Valproic acid	0.88	0.87
Acetylsalicylic acid	0.89	0.89	Methanol	0.94	0.94	Warfarin	0.98	0.98
Alprenolol	0.92	0.91	Metoprolol	0.91	0.91	Ziprasidone	0.91	0.90
Alprenolol ester	0.91	0.91	Naloxone	0.94	0.94	D-glucose	0.18*	0.14*
Aminopyrine	0.97	0.97	Naproxen	0.98	0.98	L-Phenylalanine	0.82	0.80
Artemisinin	0.93	0.92	Nevirapine	0.87	0.87	Ketoprofen	0.98	0.98
Betaxolol	0.84	0.84	Nicotine	0.97	0.97	SB 209670	0.96	0.95
Betaxolol ester	0.89	0.88	Oxprenolol	0.83	0.83	SB 217242	0.98	0.98
Bremazocine	0.94	0.94	Oxprenolol ester	0.88	0.88	Sildenafil	0.73	0.70
Caffeine	0.91	0.90	Phencyclidine	0.98	0.98	Oxazepam	0.97	0.96
Chloramphenicol	0.51	0.49*	Phenytoin	0.68	0.65	Nordazepam	0.96	0.96
Chlorpromazine	0.99	0.99	Pindolol	0.69	0.66	Antipyrine	0.98	0.98
Clonidine	0.86	0.86	Piroxicam	0.79	0.76	Alfentanil	0.81	0.78
Corticosterone	0.71	0.69	Prazocin	0.83	0.82	Cumarin	0.99	0.99
Desipramine	0.97	0.97	Progesterone	0.97	0.97	Theophylline	0.75	0.72
Dexamethasone	0.73	0.72	Propranolol	0.96	0.96	Guanoxan	0.70	0.63
Diazepam	0.99	0.99	Propranolol ester	0.97	0.97	Guanabenz	0.82	0.78
Dopamine	0.65	0.63	Quinidine	0.96	0.96	Lidocaine	0.89	0.89
Estradiol	0.93	0.93	Salicylic acid	0.80	0.79	Tiarcilast	0.89	0.88
Felodipine	0.98	0.98	Scopolamine	0.87	0.87	Nitrendipine	0.95	0.95
Fluconazole	0.88	0.87	Taurocholic acid	0.00*	0.00*	Fleroxacin	0.98	0.98
Gliseofulvin	0.99	0.99	Telmisartan	1.00	1.00	Diltiazem	0.97	0.97
Hydrocortisone	0.51	0.49*	Tenidap	0.84	0.83	Verapamil	0.99	0.99
Ibuprofen	0.94	0.94	Testosterone	0.93	0.93	Mibefradil	0.96	0.96
Imipramine	0.99	0.99	Timolol	0.60	0.57	Squinavir	0.68	0.23*
Indomethacin	0.98	0.98	Timolol ester	0.59	0.53	Glycine	0.84	0.81
Labetalol	0.16*	0.11*	Trovaflaxacin	0.92	0.91	D-Phe-L-Pro	0.59	0.59
Grupo de moderada-pobre absorción (M-P)								
Acebutolol	0.79	0.77	Nadolol	0.37*	0.33*	Lactulose	1.00	0.99
Aciclovir	0.97	0.97	Olsalazine	0.83	0.81	Foscarnet	0.97	0.97
Artesunate	0.08*	0.05*	Pirenzepine	0.27*	0.10*	Ciprofloxacin	0.23*	0.21*
Atenolol	0.58	0.55	Practolol	0.45*	0.43*	Amiloride	0.97	0.94
Azithromycin	0.96	0.94	Ranitidine	0.67	0.62	Epinephrine	0.69	0.66
Penicilina G	0.67	0.66	Sucrose	1.00	1.00	Bosentan	0.67	0.57
Chlorothiazide	1.00	1.00	Sulphasalazine	0.97	0.96	Proscillaridin	0.56	0.51
Cimetidine	0.40*	0.33*	Sumatriptan	0.86	0.85	Ceftriaxone	1.00	0.99
Dexamethasone								
-β-D-glucoside	0.93	0.92	Terbutaline	0.60	0.56	Remikiren	0.99	0.99
Dexamethasone								
-β-D-glucuronide	0.96	0.96	Uracil	0.03*	0.02*	Gabapentin	0.25*	0.11*
Doxorubicin	0.71	0.62	Urea	0.47*	0.38*	BVaraU	0.94	0.94
Erythromycin	0.99	0.99	Ziduvudine	0.99	0.99	Pravastatin	0.88	0.87
Ganciclovir	0.96	0.96	Cephalexin	0.88	0.87	Amoxicillin	0.96	0.96
H216/44	0.22*	0.16*	Gly-Pro	0.63	0.61	Enaprilate	0.51	0.49*

Tabla 4.4. Cont.

Compuestos	Prob ^a	Prob-cv ^b	Compuestos	Prob ^a	Prob-cv ^b	Compuestos	Prob ^a	Prob-cv ^b
Hydrochlorothiazide	0.97	0.95	Furosemide	1.00	1.00	Lisinopril	0.97	0.96
Mannitol	0.95	0.87	Sulpiride	0.99	0.99	SQ-29852	0.91	0.90
Metthotrexate	1.00	1.00	Raffinose	1.00	1.00	Glutamine	0.82	0.79
Methylscopolamine	0.85	0.75	Metolazone	0.94	0.94			

Serie de Predicción Externa

(Simulación de un 'screening' virtual de compuestos anti-VIH)

Compuestos	Ref.	P Obs. ^c	Class ^d	Prob ^a	F (%) ^e
DMP450	78	36.8	H	0.56	NA
DMP850	78	12.4	H	0.54	NA
DMP851	78	5.2	M-P	0.68	NA
Indinavir	78	6.0	M-P	0.76	65
Ritonavir	78	3.9	M-P	0.99	60-80
Nelfinavir	78	3.4	M-P	0.80	20-80
Amprenavir	78	21.6	M-P	0.68*	NA

(Simulación de un 'screening' virtual de 6-fluoroquinolonas)

Compuestos	Ref.	P Obs. ^c	Class ^d	Prob ^a	P(BL-AP) x10 ⁻⁶ cm/s	'Efflux Ratio' P _{BL-AP} /P _{AP-BL}
CNV 97100	79	3.6	H	0.81*	14.0	3.88
CNV 97101	79	21.8	H	0.93	25.4	1.17
CNV 97102	79	16.8	H	0.93	21.1	1.25
CNV 97103	79	15.2	H	0.92	17.5	1.15
CNV 97104	79	13.9	H	0.92	17.8	1.28

^aProbabilidad calculada para cada subconjunto. ^bProbabilidad calculada para cada subconjunto usando el proceder de validación cruzada LOO. ^cCoefficiente de permeabilidad: P_{caco-2} (AP→BL)x10⁻⁶cm/s, obtenido de la literatura (Aungst y col., 2000; Ruiz-García y col., 2002). ^dResultados de la clasificación de los compuestos anti-VIH y de los derivados de 6-fluoroquinolonas obtenidos por la Ec. 4.3; H: Grupo de alta absorción ($P \geq 8 \times 10^{-6}$ cm/s) y M-P: Grupo de moderada-pobre absorción ($P < 8 \times 10^{-6}$ cm/s). ^eBiodisponibilidad oral en humanos (%). Clasificaciones incorrectas están marcadas con un asterisco (*).

como de moderada-pobre (2.24%, falsos negativos) y diez pertenecientes al grupo de moderada-pobre absorción fueron erróneamente clasificados como fármacos con alta penetración (7.46%, falsos activos). Si la diferencia de clasificación entre el grupo de alta y moderada-pobre absorción no difiere más del 5%, estos compuestos fueron entonces tomados como no clasificados. Tomando en cuenta esta relación, el porcentaje de buena clasificación para los grupos de alta y moderada-pobre absorción fue de 93.82% y 79.25%, respectivamente. Sin embargo, estos compuestos mal clasificados fueron mal predichos en el procedimiento de validación cruzada LOO.

Desde un punto de vista práctico, en el desarrollo de la FD, es considerado más importante la predicción (menor %) de falsos negativos porque ellos son compuestos que

podrían ser rechazados por la pobre permeabilidad predicha y entonces ellos nunca serían evaluados experimentalmente y su verdadera absorción nunca se descubriría.

Por el contrario, los falsos activos eventualmente pueden ser detectados. En la Tabla 4.4 se muestran los resultados de la clasificación y las probabilidades posteriores para los 134 compuestos de la SE.

Para acceder a la predictibilidad de la FD el proceso de validación cruzada ‘leave-one-out’ fue llevado a cabo. Usando este enfoque, el modelo discriminante clasifica correctamente el 79.24% y 92.52% de los compuestos en la SE pertenecientes a los grupos de moderada-pobre y alta absorción, respectivamente. La clasificación global del procedimiento de validación cruzada LOO fue 87.31%. Varios compuestos (17) fueron mal clasificados, 6 con alta absorción fueron clasificados como de moderada-pobre (4.47%, falsos negativo) y 11 perteneciente al grupo de moderada-pobre absorción fueron erróneamente clasificados como fármacos de alta (8.20%, de falsos positivos). Si el criterio de no clasificados es aplicado al proceso de validación cruzada desarrollado, solo 14 compuestos fueron mal clasificados, incrementándose el porcentaje de buena clasificación global de la validación cruzada a 89.55%.

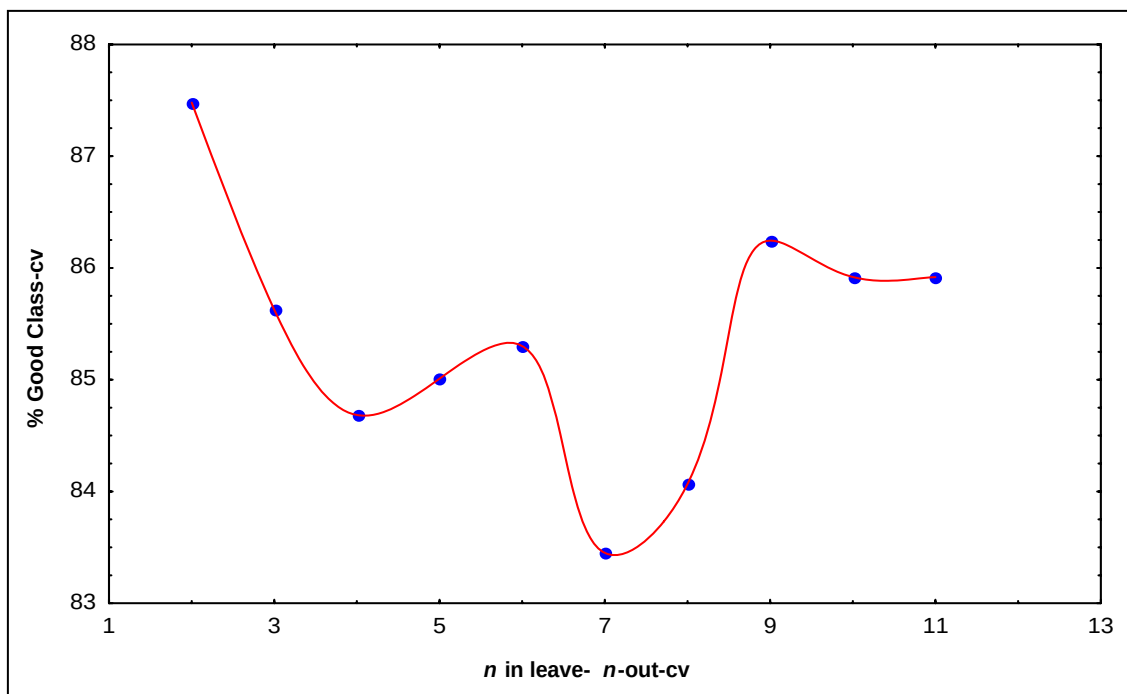


Figura 4.1. Comportamiento del porcentaje de buena clasificación global cuando n varía en el procedimiento de validación cruzada LOO.

Para un exhaustivo análisis del poder predictivo de la FD obtenida un segundo procedimiento de validación cruzada fue llevado a cabo. La validación interna ‘leave-*n*-out’ fue desarrollada en el módulo de árboles de clasificación como se ha descrito anteriormente. El modelo mostró un 87.5, 85.6, 84.7, 85.0, 85.3, 83.5, 84.1, 86.2, 85.9 y 85.9% de buena clasificación global cuando *n* fue de 2 a 11 en el procedimiento de validación cruzada. El modelo se estabilizó alrededor del 85.9% cuando *n* fue > 9 (ver Figura 4.1).

También, para examinar el poder predictivo del modelo encontrado, una SP externa de 12 compuestos fue evaluada. Esta serie de compuestos está conformada por dos sub-series, previamente reportadas como agentes antivirales y antimicrobianos, los cuales han sido evaluados por las ecuaciones de clasificación. El primer conjunto de fármacos está compuesto por 4 péptidos lineales y 3 nuevos análogos cíclicos de urea inhibidores de la proteasa (Aungst y col., 2000). El segundo conjunto está conformado por 5 nuevos derivados de fluoroquinolonas (Ruiz-García y col., 2002). En la parte inferior de la Tabla 4.4 aparecen los resultados de la SP externa.

Como puede ser observado, en ambas series, la predictibilidad y robustez del modelo fueron probadas ya que solo dos compuestos fueron mal clasificados, uno en cada grupo de prueba (Amprenavir y CNV 97100 con P_{Caco-2} de 21.6 y 3.6, respectivamente). El porcentaje de buena clasificación global en esta SP fue de 83.33%. Si nosotros consideramos la SE y la SP como una sola serie, el porcentaje de buena clasificación global fue de 89.72 %.

4.3 Comparación con otros Métodos Computacionales

Finalmente, para demostrar el verdadero mérito de este enfoque, nosotros desarrollamos una comparación directa con otras aproximaciones teóricas. En conexión, tres experimentos virtuales fueron llevados a cabo: 1) con una data de 17 compuestos estructuralmente diversos estudiados por Waterbeemd y Camenisch., donde fueron usados 26 descriptores moleculares que describen la lipofilia, la capacidad de enlace de Hidrógeno y la talla molecular, entre otros rasgos estructurales (van de Waterbeemd y Camenisch, 1996), 2) con una data de 30 fármacos estructuralmente diversos estudiados por Kulkarni y col., donde varios descriptores derivados de la interacción soluto-

Tabla 4.5. Resultados de los modelos QSPeR desarrollados, usando los índices cuadráticos, para las diferentes datas y comparación con los modelos reportados para la predicción de $P_{\text{Caco-2}}$.

Ec. o fuente ^a	Modelos	n	R	R _{CV}	s	F
Primer experimento virtual: 17 compuestos (van de Waterbeemd y Camenisch, 1996)						
Ec. 4.4	$\text{Log } P_{\text{Caco-2}} = -4.553 - 0.00247^{\text{H}} q_{5\text{L}}(\text{x}) + 0.001618^{\text{H}} q_0^{\text{H}}(\text{x})$	17	0.920	0.860	0.436	38.692
van de Waterbeemd y col. ^a	Ecuación (4) en referencia a	17	0.884	0.836	0.520	25.2
Segundo experimento virtual: 30 compuestos (Kulkarni y col., 2002)						
Ec. 4.5	$P_{\text{Caco-2}} = 31.2842 - 0.72^{\text{H}} q_{0\text{L}}(\text{x}) - 5.7841 \times 10^{-3\text{E}} q_{5\text{L}}^{\text{H}}(\text{x}) + 0.017693^{\text{E}} q_{4\text{L}}(\text{x})$	30	0.877	0.841	4.974	28.737
Ec. 4.6	$P_{\text{Caco-2}} = 31.42089 - 1.5847^{\text{H}} q_{0\text{L}}(\text{x}) - 5.438 \times 10^{-3\text{E}} q_{5\text{L}}^{\text{H}}(\text{x}) + 0.01617^{\text{E}} q_{4\text{L}}(\text{x}) + 0.12^{\text{H}} q_{3\text{L}}(\text{x})$	30	0.887	0.839	4.874	22.959
Kulkarni y col. ^b	Ecuación (4) en referencia b	30	0.894	0.860	-	-
Kulkarni y col. ^b	Ecuación (5) en referencia b	30	0.905	0.866	-	-
Tercer experimento virtual: Data completa, 51 compuestos (Ren y Lien, 2000)						
Ec. 4.7	$\text{Log } P_{\text{Caco-2}} = 1.849 - 3.326 \times 10^{-5\text{H}} q_7^{\text{H}}(\text{x}) + 7.48 \times 10^{-4\text{H}} q_{3\text{L}}(\text{x}) - 0.031^{\text{E}} q_{1\text{L}}(\text{x}) + 1.906 \times 10^{-3\text{E}} q_{3\text{L}}(\text{x}) - 1.309 \times 10^{-4\text{H}} q_{7\text{L}}(\text{x}) + 1.485 \times 10^{-8\text{H}} q_{14\text{L}}(\text{x})$	51	0.800	0.761	0.471	13.068
Ec. 4.8	$\text{Log } P_{\text{Caco-2}} = 1.907 + -4.12 \times 10^{-6\text{H}} q_7^{\text{H}}(\text{x}) + 9.423 \times 10^{-4\text{H}} q_{3\text{L}}(\text{x}) - 0.0387^{\text{E}} q_{1\text{L}}(\text{x}) + 2.25 \times 10^{-3\text{E}} q_{3\text{L}}(\text{x}) - 1.12 \times 10^{-4\text{H}} q_{7\text{L}}(\text{x}) + 1.478 \times 10^{-8\text{H}} q_{14\text{L}}(\text{x})$	49	0.849	0.75	0.414	18.107
Ren y Lien ^c	Ecuación (6) en referencia c	51	0.797	-	0.465	19.98
Ren y Lien ^c	Ecuación (8) en referencia c	50	0.749	-	0.506	14.40
Data dividida según la carga (Ren y Lien, 2000)						
Ec. 4.9 (NC)	$\text{Log } P_{\text{Caco-2}} = 0.809 - 0.0224^{\text{H}} q_{2\text{L}}(\text{x}) + 1.222 \times 10^{-3\text{H}} q_1^{\text{H}}(\text{x})$	17	0.915	0.854	0.324	35.768

Tabla 4.5. Cont.

Ec. o fuente ^a	Modelos	n	R	R _{CV}	s	F
Ec. 4.10 (NC)	$\text{Log } P_{\text{Caco-2}} = 1.335 - 0.0718^{\text{H}} q_{2\text{L}}(\text{x}) + 0.0183^{\text{H}} q_{3\text{L}}(\text{x}) + 1.1069 \times 10^{-3} q_1^{\text{H}}(\text{x}) - 4.202 q_2(\text{x})$	17	0.967	0.894	0.219	43.830
Ren y Lien ^c	Ecuación (11) en referencia c	17	0.968	-	0.217	44.54
Ec. 4.11 (CC)	$\text{Log } P_{\text{Caco-2}} = 1.0249 - 0.137^{\text{E}} q_{0\text{L}}^{\text{H}}(\text{x}) + 2.875 \times 10^{-3} q_1(\text{x}) + 0.0997^{\text{E}} q_{0\text{L}}(\text{x})$	26	0.833	0.784	0.438	16.618
Ec. 4.12 (CC)	$\text{Log } P_{\text{Caco-2}} = 1.463 - 0.0184^{\text{E}} q_{1\text{L}}(\text{x}) + 4.315 \times 10^{-8} q_{10\text{L}}(\text{x}) + 7.416 \times 10^{-3} q_1(\text{x}) - 3.367 \times 10^{-3} q_0^{\text{H}}(\text{x}) - 1.433 q_2(\text{x}) - 7.272 \times 10^{-3} q_{2\text{L}}^{\text{H}}(\text{x})$	23	0.936	0.894	0.299	19.053
Ren y Lien ^c	Ecuación (17) en referencia c	26	0.901	-	0.352	22.60
Ren y Lien ^c	Ecuación (16) en referencia c	25	0.915	-	0.325	35.87
Ec. 4.13 (AC)	$\text{Log } P_{\text{Caco-2}} = 1.186 - 0.115^{\text{H}} q_{3\text{L}}(\text{x}) + 0.359^{\text{H}} q_{2\text{L}}(\text{x})$	8	0.975	0.94	0.172	48.591
Ren y Lien ^c	Ecuación (20) en referencia c	8	0.931	-	0.284	16.38

^avan de Waterbeemd y Camenisch, 1996; ^bKulkarni y col., 2002; ^cRen y Lien, 2000.

membrana y solvatación y disolución intermolecular fueron utilizados (Kulkarni y col., 2002) y, 3) con una data de 51 fármacos no relacionados estructuralmente estudiados por Ren and Lien donde varias propiedades físico-químicas fueron introducidas (Ren y Lien, 2000). Los resultados de la regresión para las diferentes datas, usando los índices cuadráticos totales y locales, y la comparación con los modelos reportados de $P_{\text{Caco-2}}$ son dados en la Tabla 4.5.

Los parámetros estadísticos de estas ecuaciones evidencian la alta calidad estadística de los modelos desarrollados usando los índices cuadráticos, los cuales son similares a los computados con otros enfoques. En el primer experimento virtual, los estadísticos de la Ec. 4.4 fueron superiores que los obtenidos por van de Waterbeemd y col., el cual utilizó dos componentes principales (extraído de 26 parámetros físico-químicos) como variables para la descripción del $\text{Log } P_{\text{Caco-2}}$.

En la segunda comparación, los estadísticos obtenidos por nuestro enfoque (Ec. 4.5 y Ec. 4.6) son ligeramente más bajos que los obtenidos por Kulkarni y col. (Kulkarni y col., 2002). Esto es lógico si tenemos en cuenta que los descriptores utilizados en esos

estudios tienen en cuenta la estructura tridimensional de las moléculas y su interacción directa con las membranas biológicas, o sea, que son índices específicos para este tipo de propiedades.

Finalmente, los modelos obtenidos con nuestro enfoque para la misma data de 51 compuesto reportada por Ren y Lien (Ec. 4.7 y Ec. 4.8) y cuando estos compuestos fueron divididos en tres subgrupos según su carga neta: compuestos neutros (NC: Ec. 4.9 y Ec. 4.10), compuestos catiónicos (CC: Ec. 4.11 y Ec. 4.12) y compuestos aniónicos (AC: Ec. 4.13), tuvieron parámetros estadísticos superiores a los obtenidos a estos autores. Es importante destacar, que la división de la data en sub-series según su carga neta provee una información valiosa, es decir, permite entender la contribución de varias propiedades anulando el efecto de la carga. Como puede ser observado en la Ec. 3.1, la carga de la molécula es uno de los efectos que influye sobre la permeabilidad de los fármacos, lo cual está en relación con la carga negativa de las membranas biológicas (Conradi y col., 1996). El efecto de la carga en la permeabilidad puede estar evidenciado en la mejora significativa de los parámetros estadísticos de las ecuaciones que modelan los tres conjuntos por separado.

4.4 Fuerzas que Dirigen la Permeabilidad de Fármacos en Células de Caco-2

Como puede ser observado, tanto en los modelos de regresión como en la FD, se incluyen variables que están muy relacionadas con los factores que influyen en la permeabilidad (ver Ec. 2.2). Todos estos factores están muy relacionados con rasgos estructurales de las moléculas. Por ejemplo, en la FD (Ec. 4.3), las variables ${}^Hq_{3L}(x)$, ${}^Hq_{4L}(x)$ y ${}^Hq_{8L}(x)$ tienen influencia de la capacidad de enlace de hidrógeno (átomos donadores de átomos de hidrógeno), mientras que la variable ${}^E q_{1L}^H(x)$ contiene información sobre el número de átomos aceptores de hidrógeno y de la carga de la molécula. Esta última variable también influye en la capacidad de enlace de hidrógeno. Si la contribución total de todos estos descriptores es analizada, un valor negativo es obtenido lo cual es razonable ya que cuando el número de heteroátomos y hidrógenos unidos a heteroátomos en la molécula se incrementa, la permeabilidad de las mismas a través de las membranas biológicas decrece. Este efecto está muy relacionado con el decrecimiento de la lipofilia de la molécula y con la posibilidad de ionización y desarrollo de altas densidades electrónicas.

Ya hemos comentado que la influencia de la carga, además de influir en la lipofilia de la molécula, también influye en la permeabilidad debido a la carga negativa de las membranas biológicas (Conradi y col., 1996).

Otro descriptor incluido en la FD es $q_0(x)$, el cual presenta contribución positiva a la propiedad. Como ya hemos comentado, esta variable tiene información del peso molecular (composición) y consecuentemente de la talla molecular. Por esta razón, si el número de heteroátomos aumenta en una molécula (contribución negativa al coeficiente de permeabilidad) la influencia cuadrática de estos en $q_0(x)$, puede incrementar la absorción intestinal por aumento de la talla molecular. Tomando este análisis en consideración, podemos decir que para una buena absorción intestinal de un nuevo candidato a fármaco, este debe estar caracterizado por un rango óptimo de su capacidad de enlace de hidrógeno, de lipofilia y de talla molecular (Stenberg y col., 2000).

En el caso de los modelos de regresión lineal, los índices cuadráticos totales y locales de diferentes órdenes contribuyen de forma similar a la propiedad que en la FD. En cambio, en la Ec. 4.1 aparece una variable [$^Aq_{14L}(x)$] que indica la presencia y talla de los sistemas aromáticos. Finalmente, en orden de describir los valores de $P_{\text{caco-2}}$ (AP→BL) y $P_{\text{caco-2}}$ (BL→AP) los descriptores seleccionados en el proceso de regresión, en ambas ecuaciones no son los mismos. Este hecho sugiere que el proceso de transporte es diferentes en las dos direcciones, ya que por ejemplo algunos compuestos pueden ser sustratos de bombas celulares, denominadas en la literatura anglosajona como ‘cellular efflux pumps’ (Liang y col., 2000). Durante los últimos años el modelo celular Caco-2 ha sido utilizado para determinar si las NEQ son sustratos de bombas celulares como la glicoproteína-P, la cual está sobreexpresada en estos cultivos celulares. Los compuestos que son sustratos de alguna proteína/mecanismo de bomba celular tiene valores $P_{\text{caco-2}}$ (BL→AP) mayores que $P_{\text{caco-2}}$ (AP→BL) y para compuestos que no son sustratos la razón entre estos valores es aproximadamente uno (Liang y col., 2000). Esta razón es denominada *razón de permeabilidad direccional* [PDR, Permeability Directional Ratio, $\text{PDR} = \text{BL} \rightarrow \text{AP} / \text{AP} \rightarrow \text{BL}$]]. Por ello, el uso de los modelos QSperR-RLM en forma combinada, permite predecir el valor de PDR para cualquier compuesto. Este enfoque teórico aparece como una nueva alternativa para el estudio de las bombas celulares.

4.5 ‘Screening’ Virtual de $P_{\text{Caco-2}}$ (“*in vitro*”) y Extrapolación a la Predicción de la Absorción (“*in vivo*”) Intestinal en Humanos

Varios estudios QSAR han mostrado la importancia de la predicción de la absorción intestinal en humanos (Wessel y col., 1998; Clark, 1999; Palm y col., 1997; Chiou y Barve, 1998; Zhao y col., 2001) y la llamada regla de los cinco ha probado ser un método rápido de ‘screening’ de compuestos que presentan pobre absorción (Lipinski y col., 1997). En el presente estudio nosotros simularemos una búsqueda virtual del perfil de absorción de 241 compuestos (Zhao y col., 2001), usando la FD obtenida. El objetivo fundamental de este enfoque es evaluar la capacidad de la FD en la predicción de la absorción intestinal en humanos. Como los compuestos seleccionados para el ‘screening’ virtual fueron obtenidos de diferentes fuentes, solo los primeros 145 compuestos (data de mejor calidad, clasificada como OK y Good por Zhao y col., 2001) deben ser usados como un mejor criterio de comparativo, aunque los restantes compuestos también fueron evaluados pero sus valores de absorción en humanos (Abs%) son considerados ‘menos reales’ (Zhao y col., 2001). Los valores experimentales de Abs% y los resultados de la evaluación de los compuestos en la FD son mostrados en la Tabla 4.6. En esta Tabla nosotros damos los valores de probabilidad posterior calculada a partir de la distancia de Mahalanobis [$P(H)$ and $P(M-P)$] para cada compuesto; $\Delta P\% = [P(H) - P(M-P)] \times 100$, donde $P(H)$ es la probabilidad con que la ecuación clasifica un compuesto con $P_{\text{Caco-2}} \geq 8 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$. Contrariamente, $P(M-P)$ es la probabilidad con que el modelo clasifica un compuesto con $P_{\text{Caco-2}} < 8 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$. Este valor ($\Delta P\%$) toma valores positivos cuando $P(H) > P(M-P)$ y negativo de otra forma. Por tanto, cuando el $\Delta P\%$ es positivo (negativo) el compuesto es clasificado como de alta absorción (Moderada-Pobre).

Como puede observarse en la Tabla 4.6, de los 123 compuestos con alta absorción en humanos [$\text{Abs \%} \geq 70$; ver columna ocho con su data de absorción o valores promedios extraídos de la literatura], el modelo (Ec. 4.3) clasifica 103 compuestos en el grupo de alta absorción ($P_{\text{Caco-2}} \geq 8 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) para un 83.74% de correspondencia de los valores predichos “*in vitro*” de permeabilidad (Caco-2) y los valores reportados de absorción humana. Para los 22 compuestos con moderada-pobre absorción ($\text{Abs \%} < 70$), 17 compuestos fueron bien clasificados por la Ec. 4.3, para un 77.27% de correspondencia

Tabla 4.6. Resultados del ‘screening’ virtual de 241 fármacos.

Compuesto	Prob H ^a	Prob M-P ^b	ΔP% ^c	%Abs. ^d	%Abs. ^e	%Bio. ^f	%Abs. ^g
1-Cisapride	0.65	0.35	30.20	100		100	100
2-Valproic acid	0.88	0.12	75.35	100	~100	90(68-100)	100
3-Salicylic acid	0.80	0.20	60.62	100	100		100
4-Diazepam	0.99	0.01	97.79	97-100	100		100
5-Sudoxicam	0.67	0.33	33.14		100		100
6-Glyburide	0.02	0.98	-96.46				100
7-Gallopamil	0.99	0.01	98.20		~100	15	100
8-Mexiletine	0.97	0.03	94.07		100	88	100
9-Nefazodone	0.93	0.07	85.33		100	15-23	100
10-Naproxen	0.98	0.02	96.25	94-99	100	99	99
11-Lamotrigine	0.78	0.22	56.90	70		98	98
12-Tolmesoxide	0.99	0.01	98.03	100		85	98
13-Disulfiran	0.91	0.09	82.59		91		97
14-Torasemide	0.03	0.97	-94.36			96	96
15-Metoprolol	0.91	0.09	82.94	95-100	>90	50	95
16-Naloxone	0.00	1.00	-100.00				91
17-Terazocin	0.79	0.21	57.18	91	~100	90	90
18-Sulindac	0.00	1.00	-100.00		90		90
19-Sultopride	0.82	0.18	63.56	100	~100		89
20-Topiramate	0.00	1.00	-99.12			81-95	86
21-Tolbutamide	0.09	0.91	-82.98				85
22-Propiverine	0.99	0.01	97.96		84		84
23-Digoxin	0.02	0.98	-96.95			67	81
24-Mercapto ethane sulfonic acid	0.75	0.25	50.49				77
25-Cimetidine	0.60	0.40	20.22	62-98		60	64
26-Furosemide	0.00	1.00	-99.26	61	61	61	61
27-Metformin	0.40	0.60	-19.57			50-60	53
28-Rimiterol	0.41	0.59	-17.69				48
29-Cymarin	0.46	0.54	-8.44		47		47
30-Ascorbic Acid	0.80	0.20	59.87				35
31-Fosfomycin	0.08	0.92	-84.11				31
32-Fosmidomycin	1.00	0.00	99.91		30		30
33-k-Strophanthoside	0.99	0.01	98.20		16		16
34-Adefovir	0.00	1.00	-99.57	12		12	16
35-Acarbose	0.00	1.00	-100.00		1-2.		2
36-Ouabain	0.97	0.03	94.07		1.4		1.4
37-Kanamycin	0.00	1.00	-99.99				1
38-Lactulose	0.00	1.00	-99.53	0.6	0.6		0.6
39-Camazepan	0.99	0.01	98.53	99		100	100
40-Indomethacin	0.98	0.02	96.62	100		100	100
41-Levomorgestrel	0.97	0.03	93.03			100	100
42-Tenoxicam	1.00	0.00	99.91			100	100
43-Theophylline	0.75	0.25	49.05	96		100	100
44-Oxatomide	0.91	0.09	81.18	100			100
45-Desipramine	0.97	0.03	93.61	95-100	>95	40	100
46-Fenclofenac	0.97	0.03	93.22	100			100
47-Imipramine	0.99	0.01	98.67	95-100	>95	22-67	100
48-Lormetazepan	1.00	0.00	99.26	100	100	80	100
49-Diclofenac	0.91	0.09	81.58	100		90	100

Tabla 4.6. Cont.

Compuesto	Prob H ^a	Prob M-P ^b	ΔP% ^c	%Abs. ^d	%Abs. ^e	%Bio. ^f	%Abs. ^g
50-Granisetron	0.92	0.08	84.75	100	100		100
51-Testosterone	0.93	0.07	86.27	100	100		100
52-Caffeine	0.91	0.09	82.30	100	100		100
53-Corticosterone	0.71	0.29	41.91	100	100		100
54-Ethinyl estradiol	0.97	0.03	93.07	100	~100	59	100
55-Isoxicam	0.73	0.27	45.81		100		100
56-Lornoxicam	1.00	0.00	99.90		100		100
57-Nicotine	0.97	0.03	94.91	100	100		100
58-Ondansetron	0.99	0.01	97.89	100	100	60	100
59-Piroxicam	0.79	0.21	58.00	100	100		100
60-Verapamil	0.99	0.01	98.20	100	>90	10-52.	100
61-Progesterone	0.97	0.03	94.07	91-100	91		100
62-Stavudine	0.29	0.71	-41.62			100	100
63-Toremifene	1.00	0.00	99.89			100	100
64-Cyproterone acet.	0.99	0.01	98.19			100	100
65-Praziquantel	0.96	0.04	92.64		100		100
66-Cicaprost	0.69	0.31	38.42		100		100
67-Aminopyrine	0.97	0.03	93.79	100			100
68-Nordazepam	0.96	0.04	92.58	99		99	99
69-Carfecillin	0.06	0.94	-87.04	100			99
70-Prednisolone	0.61	0.39	21.45	99		70-100	99
71-Propranolol	0.96	0.04	91.58	90-100	>90	30	99
72-Viloxazine	0.91	0.09	82.45	100	~100	61-98	98
73-Warfarin	0.98	0.02	96.88	98	~100	93-98	98
74-Atropine	0.88	0.12	76.86		90		98
75-Minoxidil	0.78	0.22	55.17		95		98
76-Clofibrate	0.98	0.02	95.78	96		95-99	97
77-Trimethoprim	0.75	0.25	50.53	97		92-102	97
78-Venlafaxine	0.95	0.05	90.49	92			97
79-Antipyrine	0.98	0.02	95.26	100	~100	97	97
80-Bumetanide	0.01	0.99	-98.81	100	100	~100	96
81-Trapidil	0.92	0.08	84.09			96	96
82-Fluconazole	0.88	0.12	76.60	95-100		>90	95
83-Sotalol	0.05	0.95	-89.61	95	~100	90-100	95
84-Codeine	0.98	0.02	96.99	95		91	95
85-Flumazenil	0.98	0.02	97.00	95	>95	16	95
86-Ibuprofen	0.94	0.06	88.38	100			95
87-Labetalol	0.16	0.84	-68.70	90-95	>90	33	95
88-Oxprenolol	0.83	0.17	66.92	97	90	50	95
89-Practolol	0.55	0.45	10.51	95	~100		95
90-Timolol	0.60	0.40	19.08	72	>90	75	95
91-Alprenolol	0.92	0.08	83.35	93-96	>93		93
92-Amrinone	0.74	0.26	48.93		93		93
93-Ketoprofen	0.98	0.02	95.23	100	~100	>92	92
94-Hydrocortisone	0.51	0.49	2.85	89-95	84-95		91
95-Betaxolol	0.84	0.16	68.82	90	90	80-89	90
96-Ketorolac	0.98	0.02	96.14	100	Well	80-100	90
97-Meloxicam	0.66	0.34	31.42	90		90	90
98-Phenytoin	0.68	0.32	35.01	90	90	90	90
99-Amphetamine	0.89	0.11	77.18				90
100-Chloramphenicol	0.51	0.49	1.33	90		80	90
101-Felbamate	0.09	0.91	-82.38		90-95	102	90
102-Nizatidine	0.29	0.71	-41.42	99		>90	90

Tabla 4.6. Cont..

Compuesto	Prob H^a	Prob M-P^b	ΔP%^c	%Abs.^d	%Abs.^e	%Bio.^f	%Abs.^g
103-Alprazolam	0.99	0.01	98.83			80-100	90
104-Tramadol	0.96	0.04	91.50			65-75	90
105-Nisoldipine	0.96	0.04	92.96				89
106-Oxazepam	0.97	0.03	93.08	97	~100	92.8	89
107-Tenidap	0.84	0.16	68.23	90		89	89
108-Dihydrocodeine	0.99	0.01	97.80			20	88
109-Felodipine	0.98	0.02	96.10	100	100	16	88
110-Nitrendipine	0.95	0.05	89.75			23	88
111-Saccharin	0.52	0.48	3.68	97	88		88
112-Mononidine	0.63	0.37	25.07			88	87
113-Bupropion	0.92	0.08	84.73	87		87	87
114-Pindolol	0.69	0.31	37.54	92-95	>90	87	87
115-Lamivudine	0.12	0.88	-76.60			86-88	85
116-Morphine	0.96	0.04	91.17	100	~100	20-30	85
117-Lansoprazole	1.00	0.00	99.89			85	85
118-Oxyfedrine	0.90	0.10	80.63			85	84
119-Captopril	0.51	0.49	1.18	77	71	62	84
120-Bromazepam	0.95	0.05	89.68	84		84	84
121-Acetylsalicylic acid	0.89	0.11	78.05				82
122-Sorivudine	0.06	0.94	-88.69	82	82	61	82
123-Methylprednisolone	0.01	0.99	-97.13	82		82	82
124-Mifobate	0.90	0.10	80.95				81
125-Flecainide	0.94	0.06	88.15			81	81
126-Quinidine	0.96	0.04	92.41	80	81	81	81
127-Piroximone	0.58	0.42	15.56			81	80
128-Acebutolol	0.21	0.79	-58.53	90	90	50	80
129-Ethambutol	0.23	0.77	-53.61		75-80		80
130-Acetaminophen	0.80	0.20	60.27	80-100	80	68.95	80
131-Dexamethasone	0.73	0.27	46.17	92-100		80	80
132-Guanabenz	0.82	0.18	63.42	75			80
133-Isoniazid	0.60	0.40	19.97				80
134-Omeprazole	0.92	0.08	84.85				80
135-Methadone	0.99	0.01	98.82			80	80
136-Fanciclovir	0.49	0.51	-2.53			77	77
137-Metolazone	0.06	0.94	-88.71	64	62-64		64
138-Fenoterol	0.43	0.57	-13.23		60		60
139-Nadolol	0.63	0.37	26.80	20-35	34	34	57
140-Atenolol	0.42	0.58	-16.90	50-54	50	50	50
141-Sulpiride	0.01	0.99	-98.62	36		30	44
142-Metaproterenol	0.56	0.44	11.12		44	10	44
143-Famotidine	0.00	1.00	-99.95			37-45	28
144-Foscarnet	0.03	0.97	-93.98	17	17(12-22)		17
145-Cidofovir	0.32	0.68	-35.32			<5	3
146-Isradipine	0.97	0.03	94.44	92	90-95	17	92
147-Terbutaline	0.40	0.60	-20.16	60-73	50-73	16	62
148-Reproterol	0.08	0.92	-84.97		60		60
149-Lincomycin	0.04	0.96	-92.92		20-35		28
150-Streptomycin	0.00	1.00	-100.00		poor		1

Tabla 4.6. Cont.

Compuesto	Prob H^a	Prob M-P^b	ΔP%^c	%Abs.^d	%Abs.^e	%Bio.^f	%Abs.^g
151-Fluvastatin	0.95	0.05	90.94	100	>90	19-29	100
152-Urapidil	0.70	0.30	40.00			68	78
153-Propylthiouracil	0.67	0.33	34.07	75		76(53-88)	76
154-Recainam	0.33	0.67	-33.16				71
155-Cycloserine	0.83	0.17	66.46				73
156-Hidrochlorothiazide	0.03	0.97	-93.76	67-90	65-72		69(65-72)
157-Pirbuterol	0.21	0.79	-57.49				60
158-Sumatriptan	0.14	0.86	-72.95	55-75	>57	14	57
159-Amiloride	0.03	0.97	-93.08				50
160-Mannitol	0.05	0.95	-89.03	16-26			16
161-Ganciclovir	0.04	0.96	-92.95	3-3.8	3	3	3
162-Neomycin	0.00	1.00	-100.00				1
163-Raffinose	0.00	1.00	-99.98	0.3			0.3
164-Phenglutarimide	0.83	0.17	65.50	100			100
165-Bornaprine	0.79	0.21	58.67	100			100
166-D-Phe-L-Pro	0.59	0.41	18.69	100			100
167-Scopolamine	0.87	0.13	74.35	90-100			95
168-Naloxone	0.94	0.06	87.42	91			91
169-Ziprasidone	0.91	0.09	81.69	60			60
170-Guanoxan	0.70	0.30	40.08		50		50
171-Netivudine	0.13	0.87	-74.27		28		28
172-Gentamicin-C1	0.00	1.00	-99.90	0	poor		poor
Zwitterionic drugs							
173-Cefadroxil	0.04	0.96	-91.09			100	100
174-Ofloxacin	0.98	0.02	95.45			100	100
175-Pefloxacin	0.99	0.01	97.61			100	100
176-Cephalexin	0.12	0.88	-75.82	98	100		100
177-Loracarbef	0.22	0.78	-56.73	100	100		100
178-Glycine	0.84	0.16	67.41	100			100
179-Amoxicillin	0.04	0.96	-92.76	94		93	93
180-Tiagabine	0.92	0.08	83.85			90	90
181-Telmisartan	1.00	0.00	99.28	90	rapid	43	90
182-Trovafloxacin	0.92	0.08	83.44	88		88	88
183-Acrivastine	0.97	0.03	94.20	88			88
184-Nicotinic acid	0.88	0.12	75.94				88
185-Levodopa	0.36	0.64	-27.61	100	80-90	86	86
186-Cefatrizine	0.01	0.99	-98.51			75	75
187-Ampicilin	0.10	0.90	-80.30				62
188-Vigabatrin	0.66	0.34	32.52				58
189-Tranexamic acid	0.54	0.46	8.32	55			55
190-Eflurnithine	0.95	0.05	89.86				55
191-Metyldopa	0.50	0.50	0.16		41		41
192-Ceftriaxone	0.00	1.00	-99.77	1	1		1
193-Distigminebromide	0.87	0.13	74.89			47	8
194-Ziduvudine	0.01	0.99	-98.72	100	100	63	100
195-Ximoprofen	0.80	0.20	59.41	100		98	98
196-Clonidine	0.86	0.14	72.24	85-100	100	75-95	95

Tabla 4.6. Cont.

Compuesto	Prob H^a	Prob M-P^b	ΔP%^c	%Abs.^d	%Abs.^e	%Bio.^f	%Abs.^g
197-Viomycin	0.00	1.00	-100.00				85
198-Ceftizoxime	0.01	0.99	-97.70				72
199-Capreomycin	0.00	1.00	-100.00				50
200-AAFC	0.46	0.54	-7.46		32		32
201-Bretvlum tosilate	0.98	0.02	96.45	23		23	23
<i>Dose-limited, dose-dependent, and formulation-dependent drugs</i>							
202-Spironolactone	0.93	0.07	87.00		>73		73
203-Etoposide	0.83	0.17	65.54	50		50(25-75)	50(25-75)
204-Cefetamet pivoxil	0.02	0.98	-95.34			47	47
205-Cefuroximeaxetil	0.15	0.85	-70.25	36		36-58	44(36-52)
206-Azithromycin	0.04	0.96	-91.43	35-37		37	37
207-Fosinopril	0.48	0.52	-3.48		36	25-29	36
208-Pravastatin	0.12	0.88	-75.90	34	34	18	34
209-Cyclosporin	0.00	1.00	-99.99	35		10-60	28(10-65)
210-Bromocriptine	0.18	0.82	-63.87	28	28	6	28
211-Doxorubicin	0.29	0.71	-42.87	5	trace	5	12(0.7-23)
212-Cefuroxime	0.01	0.99	-98.58				1
213-Iothalamate sodium	0.15	0.85	-69.64	1.9	1.9		1.9
214-Sulphasalazine	0.03	0.97	-94.60	12-13.			59(56-61)
215-Benazepril	0.72	0.28	43.63	37	>37		≥37
216-Lisinopril	0.03	0.97	-93.39	25	25	25-50	28(25-50)
217-Esalaprilat	0.19	0.81	-62.46	9-10.	10-40.		25(10-40)
218-Anfotericina	0.00	1.00	-100.00	5	poor		3(2-5)
219-Aztreonam	0.00	1.00	-99.96		<1	<1	1
220-Mibefradil	0.96	0.04	92.12			37-109	69(37-100)
221-Ranitidine	0.33	0.67	-34.45	50-61		50(39-88)	64(39-88)
222-Chlorotiazide	0.00	1.00	-99.32	13-56			49(36-61)
223-Aciclovir	0.03	0.97	-94.91	20-30		15-30	23(15-30)
224-Norfloxacin	0.77	0.23	53.66	35	30-40	~70	71
225-Metthotrexate	0.00	1.00	-99.35	20-100	100		70(53-83)
226-Gabapentin	0.75	0.25	50.14	50	well	60A(36-64)	59(43-64)
227-Prazocin	0.83	0.17	66.16	100		44-69	86(77-95)
228-Olsalazine	0.17	0.83	-65.21	2.3		2.3	24(17-31)
<i>Drugs expected to have higher absorption</i>							
229-Ciprofloxacin	0.77	0.23	53.94	69-100		69	≥69
230-Ribavirin	0.02	0.98	-95.20			33	≥33
231-Pafenolol	0.21	0.79	-57.69			28	≥29
232-Azosemide	0.00	1.00	-99.54			10	≤10
233-Xamoterol	0.12	0.88	-75.51			5	≥5
234-Enalapril	0.50	0.50	0.99	66	60-70	29-50	66(61-71)
235-Phenoxymethyl penicillin	0.19	0.81	-61.16	45	45(31-60)		59(49-68)
236-Gliclazide	0.08	0.92	-84.02				≥65
237-Benzylpenicillin	0.33	0.67	-34.22	30	15-30		≥30
238-Thiacetazone	0.38	0.62	-23.02				≥20

Tabla 4.6. Cont.

Compuesto	Prob H ^a	Prob M-P ^b	$\Delta P\%$ ^c	%Abs. ^d	%Abs. ^e	%Bio. ^f	%Abs. ^g
239-Lovastatin	0.86	0.14	72.39	30	31		≥ 10
240-Cromolym sodium	0.55	0.45	10.94				≥ 0.4
241-Erythromycin	0.03	0.97	-93.89	35		35	≥ 35

Resultados de la clasificación (Probabilidad calculada para cada subconjunto) de los compuestos obtenida por la Ec. 4.3; ^aH: Grupo de alta absorción ($P \geq 8 \times 10^{-6}$ cm/s), y ^bM-P: grupo de moderada-pobre absorción ($P < 8 \times 10^{-6}$ cm/s). ^c $\Delta P\% = [P(\text{grupo de alta absorción}) - P(\text{grupo de moderada-pobre absorción})] \times 100$. ^dLa data usada en el estudio QSPeR fue tomada de Clark (Clark, 1999) y Wessel y col. (Wessel y col., 1998), Palm y col. (Palm y col., 1997), Yazdanian y col. (Yazdanian y col., 1998), Yee (Yee, 1997), y Chiou y Barve (Chiou y Barve, 1998). ^eDatos de absorción obtenidos de artículos originales y ‘review’ de la literatura. ^fBiodisponibilidad de la administración oral. ^gDatos de absorción (o valores promedios) tomados de la referencia de Zhao y col., basado en el análisis de la literatura (Zhao y col., 2001).

con la absorción reportada. El porcentaje de buena extrapolación (de “*in vitro*” para “*in vivo*”) global fue de 82.76%.

Los compuestos en el rango de 146 a 172, de acuerdo a la clasificación de Zhao y col. (Zhao y col., 2001), fueron considerados como ‘uncertain’ y ‘unchecked’ data. Para los 11 compuestos con altos valores de Abs%, 10 fueron bien clasificados con una alta permeabilidad “*in vitro*” en células de Caco-2 y solo dos, con moderada-pobre absorción fueron mal clasificados. La buena clasificación global del modelo en este rango de compuestos fue de 88.89%.

De la misma forma, los 20 fármacos reportados por Zhao y col. (Zhao y col., 2001) como ‘zwitterionic drugs’ fueron evaluadas en el modelo. Para este tipo de fármacos, el modelo solo mostró 50% de correspondencia entre la clasificación “*in vitro*” y los resultados “*in vivo*”.

Los compuestos de 193-201 (grupo de ‘missing fragments’, acorde con Zhao y col., 2001) fueron mal predichas por nuestro modelo, para un solo 44.4% de correspondencia. Para el grupo de dosis limitada, dosis dependiente y fármacos dependiente de la formulación la correspondencia entre los valores de permeabilidad “*in vitro*” y los valores de absorción reportados fue de 81.5%. Finalmente, del análisis de los fármacos que se esperan que tengan alta absorción según Zhao y col., 2001; nuestro modelo explica el 84.61% de correspondencia.

Si los compuestos del 146-241 son considerados como un solo grupo, donde los valores de Abs% reportados son menos reales, el porcentaje de correspondencia entre la data de permeabilidad “*in vitro*” (Caco-2 predicha por el modelo 4.3) y la absorción intestinal en

humanos es de 73.78% (70/95). Este grupo tuvo un menor por ciento de correspondencia que el primer grupo de 145 compuestos previamente analizados.

Considerando la serie completa de 241 compuestos, la FD mostró un 78.84% de explicación de los valores de absorción en humanos, lo cual es adecuado considerando la variabilidad estructural de la data y la multitud de factores que influyen en la propiedad biológica estudiada. Además, se ha reportado ampliamente la influencia de los mecanismos de transporte en la predicción de esta importante propiedad biofarmacéutica, por ejemplo: el methotrexate es absorbido por un proceso mediado por transportadores, zidovudine es absorbida por transporte activo, amoxicillin y cefatrizine son absorbida a través del sistema de transportador de dipéptidos y en el caso del etoposide se ha sugerido que su distribución dentro del cerebro es parcialmente controlada por un proceso de transporte activo (Clark, 1999). También el cefadroxil, digoxin y el cepahalexin son compuestos con transporte activo (Benet y col., 1996). Otros compuestos con el esqueleto base β -lactámico de cefalosporinas (cefatrizine y ceftizoxime), glicósido cardiotónicos (ouabain) y análogo de nucleósidos antivirales (stavudine, lamivudine, sorivudine) aparecen mal clasificados (no existe correspondencia entre lo predicho en Caco-2 y los valores de absorción humana), sugiriendo un transporte activo para estos fármacos. Además en el caso del viomycin, con una apropiada absorción intestinal (Abs % = 85), su peso molecular 685gMol^{-1} (> 500), similar a los fármacos con pobre absorción intestinal, por lo que pudiéramos sugerir que este compuesto puede ser transportado activamente, como ha sido descrito por Egan y col. en el caso del rifampicin (Egan y col., 2000). Es obvio que la calidad de las predicciones permite acceder a poder predictivo de la FD y justifican su uso en la predicción de esta importante propiedad biofarmacéutica.

5 CONCLUSIONES

El diseño molecular asistido por computadoras se ha convertido en una importante herramienta en el desarrollo de nuevos compuestos químicos usados en diferentes áreas de la vida humana. El enfoque moderno del descubrimiento de fármacos en la actualidad no solo se basa en la actividad farmacológica, sino también en propiedades favorables de absorción, distribución metabolismo y excreción (Benet y col., 1996; Lauritsen y col., 1990; Walker y Patsalos, 1995), El crecimiento en la selección de fármacos utilizando química combinatoria, donde un gran número de candidatos a fármacos son sintetizados y evaluados farmacológicamente en serie, ha incrementado dramáticamente la demanda de modelos (experimentales o teóricos) rápidos y eficientes para la estimación de la absorción en humanos.

Por tanto, la continua definición de nuevos descriptores moleculares que permitan explicar diferentes propiedades biológicas a través de estudios QSPeR es necesario. Consecuentemente, nosotros hemos desarrollados modelos ADL que permiten predecir de una forma rápida la permeabilidad intestinal de compuestos químicos y brindar algunas conclusiones preliminares sobre el posible comportamiento de la absorción intestinal en humanos.

Estos resultados demostraron también que los índices cuadráticos moleculares (totales y locales) aparecen como una promisorio invariante molecular y permitieron el desarrollo de un modelo QSPeR adecuado para la correcta clasificación de la permeabilidad intestinal para fármacos estructuralmente diversos. Aceptable eficiencia y buena predictibilidad fue archivada en la predicción de la absorción, especialmente si tenemos en cuenta la gran variedad de literatura utilizada en la recopilación de los datos y la simplicidad de los cálculos usados; lo cual están en relación con la facilidad de interacción del usuario con el método computacional **TOMOCOMD-CARDD**.

Este enfoque computacional permite que estos índices puedan ser aplicados a grandes conjuntos de NEQ sintetizadas por química combinatoria. La comparación con otros enfoque bioinformáticos mostró un comportamiento satisfactorio para nuestro método. Además, esta aproximación posibilita obtener una interpretación significativa de los resultados experimentales en términos estructurales de las moléculas estudiadas.

6 RECOMENDACIONES

- ✓ Utilizar otras familias de nuevos descriptores moleculares implementados computacionalmente en el programa **TOMOCOMD-CARDD** en la modelación del proceso de absorción.
- ✓ Desarrollar un tamizaje “*in silico*”, a través de los modelos teóricos de absorción intestinal obtenidos, a los más de 700 nuevos compuestos con los que cuenta el CBQ e identificar tempranamente los más adecuados desde el punto de vista de la absorción.
- ✓ Realizar los ensayos biológicos de absorción intestinal que permitan corroborar experimentalmente los resultados teóricos.
- ✓ Desarrollar nuevos modelos “*in silico*”, con la utilización del enfoque **TOMOCOMD-CARDD**, para la predicción de propiedades farmacocinéticas de distribución, metabolismo y eliminación, en aras de extender la metodología utilizada en el presente trabajo al resto de los procesos farmacocinéticos.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham M. H.; Chadha H. S.; and Mitchell R. C. Hydrogen Bonding. 33. Factors that Influence the Distribution of Solutes between Blood and Brain, *J. Pharm. Sci.* **1994**, 83, 1257-1268.
- Aïache J.M.; Devissaguet J.Ph; Guyot-Hermann A.M. Biofarmacia. El Manual Moderno. México, **1983**
- Ajay W.; Walters P.; Murcko M.A. Can we learn to distinguish between “drug-like” and “nondrug-like” molecules? *J. Med. Chem.*, 41:3314-3324, **1998**.
- Alonso I.G.; Lanao J.M.; Domínguez-Gil A. “Evaluación histórica de la Biofarmacia y Farmacocinética, una nueva disciplina farmacéutica”. *Industria Farmacéutica*. 2:151-156, **1990**.
- Ambudkar S.V.; Dey S.; Hrycyna C.A.; Ramachandra M.; Pastan I.; Gottesman M.M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:361-398, **1999**.
- Amidon G.L.; Leesman G.D.; Elliott R.L. Improving Intestinal Absorption of Water-Insoluble Compounds: A Membrane Metabolism Strategy. *J. Pharm. Sci.*, 69(12):1363-1368, **1980**.
- Anderle P.; Niederer E.; Rubas W.; Hilgendorf C.; and Spahn-Langguth P. P-Glicoprotein (P-gp) Mediated Efflux in Caco-2 Cell Monolayers: The Influence of Culturing Condition and Drug Exposure on P-gp Expression Levels, *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 757-762.
- Andrews C. W.; Bennett L.; and Yu L. X., Predicting Human Oral Bioavailability of a Compound: Development of a Novel Quantitative-Structure-Bioavailability Relationship, *Pharm. Res.* **2000**, 17, 639-644.
- Anonymous. Waiver of in vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, **2000**. Available from http://www.fda.gov/cder/OPS/BCS_guidance.htm
- Ansel H.C; Popovich NG. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Quinta edición. Philadelphia, London: Lea & Febiger, **1990**.

- Artursson P. and Karlsson J. Correlation between Oral Drug Permeability Coefficients in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 175, 880-885.
- Artursson P. Epithelial Transport of Drug in Cell Culture I: A Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs over Intestinal Absorption (Caco-2) Cells. *J. Pharm. Sci.*, 79:476, **1990**.
- Artursson P.; Borchardt R.T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm. Res.* 14:1655-1658, **1997**.
- Artursson P.; Palm K.; and Luthman K. Caco-2 Monolayer in Experimental and Theoretical Predictions of Drug Transport, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, 22, 67-84.
- Artursson, P.; Magnusson. *J Pharm Sci.* **1990**, 79, 595-600.
- Artusson P. Cell Cultures as Models for Drug Absorption Across the Intestinal Mucosa, *Cri. Rev. Ther. Carrier. Syst.* **1991**, 8, 305-330.
- Augustijns, P.; D'Hulst, A.; Daele, J., V.; Kinget, R. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, 577.
- Aungst, B., J.; Nguyen, N., H.; Bulgarelli, J., P.; Oates-Lenz, K. *Pharm. Res.* **2000**, 17, 1175.
- Aungst, B., J.; Nguyen, N., H.; Bulgarelli, J., P.; Oates-Lenz, K. *Pharm. Res.* **2000**, 17, 1175.
- Axler, S. *Linear Algebra Done Right*. Springer-Verlag: New York, 37-70 (**1996**)
- Bal ban T.; Mills D.; Ivanciuc O. and Basak S. C. Reverse Wiener Indices, *Croat. Chem. Acta.* **2000**, 73, 923.
- Barlow D.; Satoh T. The design of peptide analogues for improved absorption. *J. Contr. Rel.* 29:283-291, **1994**.
- Barr W.H.; Riegelman S. Intestinal Drug absorption and Metabolism I: Comparison of Methods and Models to Study Physiological Factors of In Vitro and In Vivo Intestinal Absorption. *J. Pharm. Sci.*, 59(2):154–163, **1970**.
- Barthe L.; Woodley J.F.; Kenworthy S.; Houin G. An improved everted gut sac as a simple and accurate technique to measure paracellular transport across the small intestine. *Eur. J. Drug. Metabol. Pharmacok.* 23(2):313-323, **1998**.
- Benet, L. Z.; Øie, S. and Schwartz, J. B., Design and Optimisation of Dosage Regiments; Pharmacokinetic Data; in: *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed., Eds. J. G.

- Hardman, L. E. Limbird, and A.G. Gilman, McGraw-Hill, New York, **1996**, pp. 1707-1793.
- Benet, L., Z.; Øie, S.; Schwartz, J., B. *Design and optimisation of dosage regiments; pharmacokinetic data*. In: *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed.; Hardman, J., G.; Limbird, L., E.; Gilman, A., G., Eds.; McGraw-Hill: New York, **1996**; p. 1707-1793.
- Bonal J.; Domínguez G.A. "Farmacia Hospitalaria". *Ed. Medicina Internacional SA*, pp.436-38, **1992**.
- Bravi G.; Wikel J.H. Application of MS-WHIM descriptors: 3. Prediction of molecular properties. *Quant. Struct. Act. Relat.* 19:39-49, **2000**.
- Breitkreutz J., Prediction of Intestinal Drug Absorption Properties by Three-Dimensional Solubility Parameters, *Pharm. Res.* **1998**, 15, 1370-1375.
- Broddie B.B. Kinetics of absorption, distribution, excretion and metabolism of drug. *J. Pharmacol. Tech. Drug Eval.*, 7:69-88, **1989**.
- Browder, A. *Mathematical Analysis. An Introduction*. Springer-Verlag, New York, Inc., 176-296 (**1996**)
- Buchwald P. and Bodor N. Octanol-water partition: searching for predictive models. *Curr. Med. Chem.* 5:353-380, **1998**.
- Busto U.E.; du Couch P.; Erill S.; Navajos C.A.; Ogilvie R.I. Farmacocinética Clínica: abstraction de tarmac's. In: Naranjo C.A., di Souich P., Busto UTE., (Eds.). *Métodos en la Farmacología Clínica*. Toronto: OPS, pp. 95-103, **1992**.
- Buur A.; Trier L.; Magnusson C.; Artursson P. Permeability of 5-fluorouracil and prodrugs in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.* 129:223-231, **1996**.
- Caldwell G.W. Compound optimisation in early-and late-phase drug discovery: Acceptable pharmacokinetic properties utilizing combined physicochemical, in vitro and in vivo screens. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, 3:30-41, **2000**.
- Camenisch G.; Alsenz J.; van de Waterbeemd H.; and Folkers G. Estimation of Permeability by Passive Diffusion Through Caco-2 Cell Monolayer Using the Drugs' Lipophilicity and Molecular Weight, *Eur. J. Pharm. Sci.* **1998**, 6, 313-319.
- Carr K.E., Toner P.G. Morphology of the Intestinal Mucosa. In: Csaky JZ, (Ed.). *Pharmacology of the Intestine*. New York: Spriger-Verlag, pp.1-50, **1984**.

- Chaturveldi, P. R.; Deker, C. J.; Odinecs, A. *Curr Opin chem boil.* **2001**, 5, 452.
- Chien Y.W. Biopharmaceutics basis for transmucosal delivery. *S.T.P. Pharm. Sci.*, 5(4):257-275, **1995**.
- Chiou, W., L.; Barve, A. *Pharm Res.* **1998**, 15, 1792.
- Chong, S.; Dando, S., A.; Morrison, R. *Pharm Res.* **1997**, 14, 1835.
- Chong, S.; Dando, S., A.; Morrison, R. *Pharm Res.* **1997**, 14, 1835.
- Clark D.E. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 1. Prediction of intestinal absorption. *J. Pharm. Sci.*, 88:807-814, **1999**.
- Clark D.E.; Pickett S.D. Computational methods for the prediction of drug-likeness. *Drug Discov. Today.* 5:49-58, **2000**.
- Collett, A.; Sims, E.; Walker, D.; He, Y-L.; Ayrton, J.; Rowland, M.; Warhurst, G. *Pharm Res.* **1996**, 13, 216.
- Conradi R.A.; Hilgers A.R.; Burton P.S.; Hester J.B. Epithelial-cell permeability of a series of peptidic HIV protease inhibitors-aminoterminal substituent effects. *J. Drug Target.* 2:167-171, **1994**.
- Conradi, R., A.; Burton, P., S.; Borchardt, R., T. In: Pliska, B.; Testa, H.; van de Waterbeemd, Eds. *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, VCH, Weinheim, **1996**; p. 233-252.
- Cotton, F. A. *Advanced Inorganic Chemistry*. Ed. Revolucionaria: Habana, Cuba. 103 (**1970**)
- Cotton, F. A. *Advanced inorganic Chemistry*; Ed., Revolucionaria: Havana. **1966**; p. 103.
- Cronin, M., T., D.; Links, G., D.; Schultz, T., Z. In: *Forecasting the Enviromental Fate and Effects of Chemicals*, Rainbow, P., S.; Hopkins, S., P.; Crane, M., (Eds.), Wiley, Chichester, **2001**; p.111.
- Delie F.; and Rubas W. A. Human Colonic Cell Line Sharing Similarities with Enterocytes as a Model to Examine Oral Absorption. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1997**, 14, 221-286.
- Deming, S., N.; Morgan, S., L. *Experimental Design: A Chemometrics Approach*, Elsevier, Amsterdam, **1993**.

- Diamond J.M. Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist*. 20:10-18, **1977**.
- Diamond J.M.; Wright E.M. Molecular forces governing non-electrolyte permeation through cell membranes. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 172:273-316, **1969**.
- Dimasi J.A. Risks in New Drug Development: Approval Success Rates for Investigational Drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 69:297-307, **2001**.
- Dressman J. B.; Amidon G. L.; and Fleisher D. Absorption Potential: Estimating the Fraction Absorbed for Orally Administered Compounds, *J. Pharm. Sci.* **1985**, 74, 588-589.
- Egan W.; Lauri G. Prediction of intestinal permeability. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:273-289, **2002**.
- Egan, W., J.; Morgan, S., L. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2372.
- Ekins S. and Rose J. *In silico* ADME/Tox: the State of the Art, *J. Mol. Graphics Mod.* **2002**, 20, 305–309.
- Ertl P.; Rohde B.; Selzer P. Fast calculation of molecular Polar Surface Area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem.*, 43:3714-3717, **2000**.
- Estrada E. Edge-Connectivity Indices in QSPR/QSAR Studies. 2. Accounting for Long-Range Bond Contributions, *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1999**, 39, 1042-1048.
- Estrada E. Spectral Moment of Edge Adjacency Matrix in Molecular Graphs.1. Definition and Application to the Prediction of Physical Properties of Alkanes, *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1996**, 36, 846-849.
- Estrada E.; Guevara N.; and Gutman I. Extension of Edge Connectivity Index. Relationships to Line Graph Indices and QSPR Applications, *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1998**, 38, 428-431.
- Fagerholm U.; Lennernas H. Experimental estimation of the effective unstirred water layer thickness in the human jejunum, and its important in oral-drug absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 3:247-253, **1995**.
- Feng M. R.; Richard X. L.; Brown R.; and Hutchaleelaha A. Allometric Pharmacokinetic Scaling: Towards the Prediction of Human Oral Pharmacokinetics, *Pharm. Res.* **2000**, 17, 410-418.

- Fenoglio-Preiser C.M.; Noffsinger A.E.; Stemmermann G.N.; Lantz P.E.; Listrom M.B.; Rilke F.D. The normal anatomy of the small intestine. In: *Gastrointestinal Pathology- An Atlas and Text*; lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore, new York, London, Buenos Aires, Hongkong, Sydney, Tokyo, Edn. II: 275-308, **1999**.
- Ferraito B.L.; Gloff C.A.; Mohler M.A. Protein Pharmacokinetics and Metabolism. New York: *Plenum*, **1992**.
- Frimurer T.M.; Bywater R.; Naerum L.; Lauritsen L.N.; Brunak S. Improving the odds in discriminating “Drug-like” from “Non Drug-like” compounds. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **40**:1315-1324, **2000**.
- Fujiwara S. I.; Yamashita F.; Hashida M. Prediction of Caco-2 Cell Permeability Using a Combination of MO-Calculation and Neural Network, *Inter J. Pharm.* **2002**, *237*, 95-105.
- Gan L.S.; Yanni S.; Thakker D.R. Modulation of the tight junctions of the Caco-2 cell monolayers by H₂-antagonists. *Pharm. Res.*, *15*:53-7, **1998**.
- Ghuloum A.M.; Sage C.R.; and Jain A.N. Molecular haskeys: A novel method for molecular characterization and its application for predicting important pharmaceutical properties of molecules. *J. Med. Chem.*, *42*:1739-1748, **1999**
- Gibaldi M. y Perrier D. “Farmacocinética”. *Reverté*. Barcelona, **1982**.
- Gilles V.J.; Willett P.; Bradshaw J. Identification of biological activity profiles using substructural analysis and genetic algorithms. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, *38*:165-179, **1998**.
- Gobburu J.V.S. and Shelper W.H. Quantitative Structure-Pharmaco-kinetic Relationships (QSPR) of Beta Blockers Derived Using Neural Networks, *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 862-865.
- Golbraikh, A.; Tropsha, A. *J. Comp. Aided Mol. Des.* **2002**, *16*, 357.
- Goldfinger S.E. Celiac disease: A cereal mystery. *Harvard Health Setter*. *17*:6-8. Feb. **1992**.
- González, D. H.; Marrero, Y.; Hernández, I.; Bastida, I.; Tenorio, I.; Nasco, O.; Uriarte, E.; Castañedo, N.; Cabrera, M.; Aguila, E.; Marrero, O.; Morales, A. and Pérez, M. 3D-MEDNEs: An Alternative "In Silico" Technique for Chemical Research in

- Toxicology. 1. Prediction of Chemically Induced Agranulocytosis, *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 1318 – 1327 (**2003**).
- Goodwin J.T.; Mao B.; Vidmar T.J.; Conrado R.A.; Burton P.S. Strategies toward predicting peptide cellular permeability from computed molecular descriptors *J. Pept. Res.*, 53:355-369, **1999**.
- Grès, M.; Julian, B.; Bourrié, M.; Meunier, V.; Roques, C.; Berger, M.; Boulenc, X.; Berger, Y.; Fabre, G. *Pharm Res.* **1998**, 15, 726.
- Hamilton H. W.; Steinbaugh B. B.; Stewart A. H.; Chan O. H.; Schmid H.L.; Schroeder R.; Ryan M. J.; Keiser J.; Taylor M. D.; Blankley C. J.; Kalttenbronn J. S.; Wright J.; and Hicks J. Evaluation of Physicochemical Parameters Important to the Oral Bioavailability of Peptide-Like Compounds: Implications for the Synthesis of Renin Inhibitors, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1446-1455.
- Hansch C.; Steward A.R.; Iwasa J. The correlation of localization rates of benzenboronicacids in brain and tumor tissue with substituent constants. *Mol. Pharmacol.*, 1:87-92, **1965**.
- Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt, R. T. Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Permeability. *Gastroenterology*. **1989**, 96, 736-749.
- Hillgren K.M.; Kato A.; Borchardt R.T. In Vitro Systems for Studying Intestinal Drug Absorption. *Med. Res. Rev.*, 15(2):83-109, **1995**.
- Hunter J.; Hirst B.H. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related druf efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25:129-157, **1997**.
- Ivanciuc O. QSAR Comparative Study of Wiener Descriptors for Weighted Molecular Graphs, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, 40, 1412–1422.
- Ivanciuc O.; Building–Block Computation of the Ivanciuc–Balaban Indices for the Virtual Screening of Combinatorial Libraries, *Internet Electron. J. Mol. Des.* **2002**, 1, 1–9, <http://www.biochempress.com>.
- Ivanciuc O.; Ivanciuc T.; Cabrol–Bass D., and Balaban A. T. Evaluation in Quantitative Structure–Property Relationship Models of Structural Descriptors Derived from Information–Theory Operators, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, 40, 631–643.

- Ivanciuc O.; Ivanciuc T.; Klein D. J.; Seitz W. A.; and Balaban A. T. Wiener Index Extension by Counting Even/Odd Graph Distances, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 536–549.
- Jiménez-Torres N.V.; Plá-Delfina J.M.; Martín-Villodre A. Factores fisiológicos en la absorción gastrointestinal (I). En: Domenech, J., Martínez Lanao, J. y Plá Delfina, J.M. (Ed). *Biofarmacia y Farmacocinética*. Vol. II. "Biofarmacia". Editorial Síntesis. Madrid. pp. 145-161, **1998**.
- Kelder J.; Grootenhuis, P.D.J.; Bayada D.M.; Delbressine L.P.C.; Ploemen J. Polar Molecular Surface as a Dominating Determinant for Oral Absorption and Brain Penetration of Drugs. *Pharm. Res.*, *16*:1514-1519, **1999**.
- Kennedy T. Causes of Attrition. *DDT*, *2*:436-444, **1997**.
- Konkani, A.; Han, Y.; Hopfinger, J. Predicting Caco-2 Cell Permeation Coefficients of Organic Molecules Using Membrane-Interaction QSAR Analysis, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 331-342.
- Kramer S.D. Absorption prediction from physicochemical parameters. *Pharm. Sci. Technol. Today*. *2*:373-380, **1999**.
- Krarpup H.; Christensen T. I; Hovgaard L.; and Frokjaer S. Predicting Drug Absorption from Molecular Surface Properties Based on Molecular Dynamics Simulations, *Pharm Res.* **1998**, *15*, 972-978.
- Kulkarni, A.; Han, Y.; Hopfinger, J. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 331
- Kulkosky, J.; Jones, K., S.; Katz, R., A.; Mack, J., P.; Skalka, A., M. *Mol. Cel*
- Lachman L. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, pp. 221-23, **1986**.
- Lauritsen, K.; Laursen, L. S. and Raskmadsen, J. Clinical Pharmacokinetics of Drugs Used in the Treatment of Gastrointestinal Diseases Part (I), *Clin Pharmacokinet.* **1990**, *19*, 11-31.
- Lee K.; Thakker D.R. Saturable transport of H₂-antagonists ranitidine and famotidine across Caco-2 cell monolayers. *J. Pharm. Sci.*, *88*:680-687, **1999**.
- Le-Ferrec E. ; Chesne Ch. ; Artursson P. ; Brayden D. ; Fabre G. ; Gires P. ; Guillou F. ; Rousset M. ; Rubas W. ; Scarino M-L. In vitro models of the intestinal barrier. *ATLA* *29*: 649-668, **2002**.

- Lesko L. J.; Rowland M.; Peck C. C.; Blaschke T. F. Optimizing the Science of Drug Development: Opportunities for Better Candidate Selection and Accelerated Evaluation in Humans, *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 1335- 1344.
- Liang, E.; Chessic, K.; Yazdanian, M. *J Pharm Sci.* **2000**, *89*, 336.
- Liang, Y., S., Coles. G., C., Doenhoff, M., J. *Trop. Med. Int. Health.* **2000**, *5*, 72.
- Lipinski C.A.; Lombardo F.; Dominy B.W.; Feeney P.J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 23:3-25, **1997**.
- Lundahl P.; Beigi F. Immobilized liposome chromatography of drugs for model analysis of drug-membrane interactions. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 23:221-227, **1997**.
- Madara J.L. Loosening tight junctions. Lessons from the intestine. *J. Clin. Invest.*, 83:1089-1094, **1989**.
- Madara J.L.; Trier J.S. Functional Morphology of the Mucosa of the Small Intestine. In: Johnson L.R., (Ed.). *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven, pp.1271-1289, **1987**.
- Marino D. J. G.; Peruzzo P. J.; Castro E. A.; Toropov A. A.. QSAR Carcinogenic Study of Methylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Based on Topological Descriptors Derived from Distance Matrices and Correlation Weights of Local Graph Invariants, *Internet Electron. J. Mol. Des.* **2002**, *1*, 115–133, <http://www.biochempress.com>.
- Marrero, Y. *Molecules* **2003**, *8*, 687. <http://www.mdpi.org>
- Marrero, Y.; Cabrera, M. A.; Romero, V.; Ofori, E.; and Montero, L. A., Total and Local Quadratic Indices of the “Molecular Pseudograph’s Atom Adjacency Matrix”. Application to Prediction of Caco-2 Permeability of Drugs, *Int. J. Mol. Sci.* **2003**, *4*, 512-536. www.mdpi.org/ijms/
- Marrero-Ponce, Y. and Romero, V. **TOMOCOMD** software. Central University of Las Villas. **TOMOCOMD** (**TO**pological **MO**lecular **COM**puter **D**esign) for Windows, version 1.0 is a Preliminary Experimental Version; in Future a Professional Version will be Obtained upon Request to Y. Marrero., (2002) yovanimp@qf.uclv.edu.cu; ymarrero77@yahoo.es

- Marrero-Ponce, Y. Total and Local Quadratic Indices of the Molecular Pseudograph's Atom Adjacency Matrix: Applications to the Prediction of Physical Properties of Organic Compounds. *Molecules.*, **8**, 687-726 (2003) <http://www.mdpi.org>
- Marrero-Ponce, Y.; Cabrera, M. A.; Romero, V.; González, D. H.; Torrens, F. A New Topological Descriptors based Model for Predicting Intestinal Epithelial Transport of Drugs in Caco-2 Cell Culture. *J. Pharm. & Pharm. Sci.* In Press.
- Marrero-Ponce, Y.; Cabrera, M. A.; Romero, V.; Ofori, E. and Montero, L. A. Total and Local Quadratic Indices of the "Molecular Pseudograph's Atom Adjacency Matrix". Application to Prediction of Caco-2 Permeability of Drugs. *Int. J. Mol. Sci.*, **4**, 512-536 (2003) www.mdpi.org/ijms/
- Marrero-Ponce, Y.; Nodarse, D.; González-Díaz, H.; Ramos de Karmas, R.; Romero-Zaldivar, V.; Torrens, F. and Castro, E. Nucleic Acid Quadratic Indices of the "Macromolecular Graph's Nucleotides Adjacency Matrix". Modeling of Footprints after the Interaction of Paromomycin with the HIV-1 Ψ -RNA Packaging Region. *CPS: Physchem.* (2004)
- Martin Y.C. A practioner's perspective of the role of quantitative structure-activity analysis in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.*, 24:229-237, **1981**.
- Martin, Y., C. *Quantitative Drug Design. A Critical Introduction*, Marcel Dekker, New York, **1978**.
- Martini L.G.; Avenue P.; George A.; Willson R.J.; Crowley P.J. Solubility parameter and oral absorption. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 48:259-263, **1999**.
- Muranishi S. Absorption enhancers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 7:1-33, **1990**.
- Norinder U., and Östesberg T. Theoretical calculation and prediction of drug transport processes using simple parameters and PLS statistic. The use of electrotopological state indices. *J. Pharm. Sci.*, 90:1076-1085, **2001**.
- Norinder U.; Osterber T. and Artursson P. Theoretical Calculation and Prediction of Caco-2 Cell Permeability Using MolSurf Parameterization and PLS Statistics, *Pharm Res.* **1997**, 14, 1786-1791.
- Norinder U.; Osterberg T.; Artusson P. Theoretical calculation and prediction of intestinal absorption of drugs in humans using MolSurf parametrization and PLS statistics, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 8:49-56, **1999**.

- Ooi T.; Oobatake M.; Némethy G.; Scheraga H.A. Accessible surface areas as a measure of the thermodynamic parameters of hydration peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:3086-3090, **1987**.
- Oprea T. Property distribution of drug-related chemical databases. *J. Comput. Aided Mol. Design.* **14**:251-264, **2000**.
- Oprea T.; Gottfries J. Toward minimalistic modelling of oral drug absorption. *J. Mol. Graph. Model.* **17**:261-274, **1999**.
- Palm K.; Luthman K.; Ungell A. L.; Strandlund G.; and Artursson P. Correlation of Drug Absorption with Molecular Surface Properties, *J. Pharm. Sci.* **1996**, **85**, 32-39.
- Paterson D.A.; Conradi R.A.; Hilgers A.R.; Vidmar T.J.; Burton P.S. A non-aqueous partitioning system for predicting the oral absorption potential of peptides. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **13**:4-10, **1994**.
- PhARMA Industry Profiles, Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, **2000**.
- Platts J. A; Abraham M. H.; Hersey A.; and Butina D. Estimation of Molecular Linear Free Energy Relationship Descriptors. 4. Correlation and Prediction of Cell Permeation, *Pharm. Res.* **2000**, **17**, 1013-1018.
- Potts R. O. and Guy R. H. A Predictive Algorithm for Skin Permeability: The Effects of Molecular Size and Hydrogen Bond Activity, *Pharm. Res.* **1995**, **12**, 1628-1663.
- QSPR/QSAR Studies by Molecular Descriptors*, Ed. M. V. Diudea, Nova Science, Huntington, N.Y., **2001**.
- Quaroni A and Hochman J. Development of Intestinal Cell Culture Models for Drug Transport and Metabolism Studies, *Abv. Drug. Del. Rev.* **1996**, **22**, 3-52.
- Raevsky O.A.; Faison V.I.; Trepalina E.P.; Mcfarland J.W.; Schaper K.J. Quantitative estimation of drug absorption in humans for passively transported compounds on the basis of their physico-chemical parameters. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **19**:366-374, **2000**.
- Ranaldi G.; Seneci P.; Guba W.; Islam K.; Sambuy Y. Transport of the antibacterial agent oxazolidin-2-one and derivatives across intestinal (Caco-2) and renal (MDCK) epithelial cell lines. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **40**:652-658, **1996**.
- Randić M. Generalized Molecular Descriptors, *J. Math. Chem.* **1991**, **7**, 155-168.

- Ren, S.; Lien, E., J. *Prog. drug res.* **2000**, 54, 3.
- Riley R. J.; Parker A. J.; Trigg S.; and Manners C. N. Development of a Generalized, Quantitative Physicochemical Model of CYP3A4 Inhibition for Use in Early Drug Discovery, *Pharm. Res.* **2001**, 18, 652-655.
- Rios-Santamarina I.; García-Domenech R.; Corticoid J.; Santamaria P.; Morcillo E. J. Gálvez J. Natural Compounds with Bronchodilator Activity Selected by Molecular Topology, *Internet Electron. J. Mol. Des.* **2002**, 1, 70-79, <http://www.biochempress.com>.
- Ritschel W.A. Enfermedades y situaciones patológicas que influyen en la absorción gastrointestinal de fármacos. *An. Real. Acad. Farm.* 60:289-318, **1993**.
- Rodríguez, A. D. Rational High Throughput Screening in Preclinical Drug Metabolism, *Med Chem Res.* **1998**, 8, 422-433.
- Rubas W.; Cromwell M.E.M. The effect of chemical modifications on octanol/water partition (Log D) and permeabilities across Caco-2 monolayers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23:157-162, **1997**.
- Rubas, W.; Jezyk, N.; Grass, G., M. *Pharm. Res.* **1993**, 10, 113.
- Ruiz-García, A.; Lin, H.; Plá-Delfina, J., M.; Hu, M. *J Pharm Sci.* **2002**, 12, 2511.
- Sadowsky J.; Kubinyi H. A scoring scheme for discriminating between drugs and nondrug. *J. Med. Chem.*, 41:3325-3329, **1998**.
- Sandstrom R.; Karlsson A.; Knutson L.; Lennernas H. Jejunal absorption and metabolism of R/S-verapamil in humans. *Pharm. Res.*, 14:1655-1658, **1997**.
- Seiler P. Interconversion of lipophilicities from hydrocarbon/water systems into octanol/water system, *Eur. J. Med. Chem.*, 9:473-479, **1974**.
- Singer S.J.; Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Sciences*, 175:720-731, **1972**.
- Sinko P.J. Drug selection in early drug development: screening for acceptable pharmacokinetic properties using combined *in vitro* and computational approach. *Curr. Opin. Drug.Discov.* 2:42-48, **1999**.
- Sjoberg P. In.; van der Waterbeemd H.; Folkers T.B. and Folkers G. (eds). Computer-Assisted Lead Finding and Optimization, Verlag Helvetica Chemical Acta, Basel, pp.81-92, **1997**.

- Smith R.N.; Hansch C.; Ames M.M. Selection of a reference partitioning system for drug design work. *J. Pharm. Sci.*, 64:599-606, **1975**.
- Somerharju P.; Virtanen J.A.; Cheng K.H. Lateral organization of membrane lipids. The superlattice view. *Biochim. Biophys. Acta.* 1440:32-48, **1999**.
- STATISTICA ver. 5.5, Statsoft, Inc. **1999**
- Stein W.D. The molecular basis of diffusion across cell membranes. *Academic Press Inc.*, New York, **1967**.
- Stenberg, P.; Luthman, K.; Artursson, P. *J. Contr. Rel.* **2000**, 65, 231.
- Stewart B.H.; Chan O.H.; Jezyk N.; Fleisher D. Discrimination between drug candidates using models for evaluation of intestinal absorption. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 23:27-45, **1997**.
- Sugawara, M.; Takekuma, Y.; Yamada, H.; Kobayashi, M.; Iseki, K.; Miyazaki, K. *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87, 960.
- Swaan P.W. Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor-mediated transport pathway. *Pharm. Res.*, 15:826-834, **1998**.
- Tanaka H.; Miyamoto K.I.; Morita K.; Haga H.; Segawa H.; Shiraga T.; Fujioka A.; Kouda T.; Taketani Y.; Hisano S.; Fukui Y.; Kitagawa K.; Takeda E. regulation of the PepT1 peptide transporter in the rat small intestine in response to 5-fluorouracil-induced injury. *Gastroenterology.* 114:714-723, **1998**.
- Tayar N.; Testa B.; Carrupt P.A. Polar intermolecular interactions encoded in partition coefficients: an indirect estimation of hydrogen-bond parameters of polyfunctional solutes. *J. Phys. Chem.*, 96:1455-1459, **1992**.
- ter Laak A.M.; Tsai R.S.; Donné-Op de Kelder G.M.; Carrupt P.A.; Testa B.; Timmerman H. Lipophilicity and hydrogen-bonding capacity of H₁-antihistaminic agents in relation to their central sedative side-effects. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2:373-384 **1994**.
- Testa B.; Carrupt P.A.; Gaillard P.; Billois F.; Weber P. Lipophilicity in molecular modeling. *Pharm. Res.*, 13:335-343, **1996**.
- Topliss, J., D. (Ed.). *Quantitative Structure-Activity Relationships of Drugs*, Academic Press, New York, **1983**.

- Tute, M., S. *History and Objectives of Quantitative of Drugs Design*. In: Quantitative Drug Design (Comprehensive Medicinal Chemistry, vol. IV), Hansch, C.; Sammes, P., G.; Taylor, J., B. (Eds.), Pergamon Press, Oxford, **1990**; p. 1-31.
- Ungell A.L. In vitro absorption studies and their relevance to absorption from the GI tract. *Drug. Devel. Ind. Pharm.*, 23:879-892, **1997**.
- Van de Waterbeemd H. and Camenisch G. Estimation of Caco-2 cell Permeability Using Calculated Molecular Descriptors, *Quant Struct-Act Relat.* **1996**, 15, 480-490.
- Van de Waterbeemd H. and Kansy M. Hydrogen-Bonding Capacity Permeability Using Calculated Molecular Descriptors, *Quant. Struct.-Act Relat.* **1992**, 15, 480-490.
- Van de Waterbeemd H. High-throughput and in silico technique in drug metabolism and pharmacokinetics, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, 5(1):33-43, **2002**.
- van de Waterbeemd, H. (Ed.); *Chemometric Methods in Molecular Design (Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Vol. 2)*, John Wiley & Sons: New York. **1995**.
- van de Waterbeemd, H.; Smith, D., A.; Jones, B., C. *J. Comp-Aided Mol. Des.* **2001**, 15, 273.
- Wadke D.A.; Serajuddin A.M.T.; Jacobson H. Preformulation testing. En: Lieberman HA; Lachman L; Schwartz JB; editores. *Pharmaceutical Dosage Forms. Tablets*, v.1. 2^{da} ed., revisada y expandida: New York and Basel: Marcel Dekker Inc.; pp.1-73, **1989**.
- Wagener M.; van Geerestein V.J. Potential drugs and nondrugs: Prediction and identification of important structural features. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 40:280-292, **2000**.
- Wagner J.G. "Farmacocinética Clínica". *Reverté*. Barcelona, **1983**
- Walker W.A. Intestinal Transport of Macromolecules. In: Johnson LR, (Ed.). *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven, pp.1271-1289, **1987**.
- Walker, M. C. and Patsalos, P. N. Clinical Pharmacokinetics of New Antiepileptic Drugs, *Pharmacol Ther.* **1995**, 67, 351-384.
- Walters, F., H, Parker, L., R.; Morgan, S., L.; Deming, S., N. *Sequential simplex optimization: A technique for Improving Quality and Productivity in Research, Development and Manufacturing*, CRF Press Inc., Boca Raton, **1991**.

- Wessel M. D.; Jurs P. C.; Tolan J. W.; Muskal S. M. Prediction of Human Intestinal Absorption of Drug Compounds from Molecular Structure, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1998**, *38*, 726-735.
- Winiwarter S.; Bonham N.M.; Ax F.; Hallberg A.; Lennernas H.; Karlen A. Correlation of human jejunal permeability (in vivo) of drug with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. *J. Med. Chem.*, *41*:4939-4949, **1998**.
- Yazdanian M.; Glynn S. L.; Wright J. L.; and Hawi A. Correlating Partitioning and Caco-2 Cell Permeability of Structurally Diverse Small Molecular Weight Compounds, *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1490-1494
- Yee, S. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 763.
- Yoshida F.; Topliss J.G. QSAR Model for drug human oral bioavailability. *J. Med. Chem.*, *43*:2575-2585, **2000**.
- Young R.C.; Mitchell R.C.; Brown T.H.; Ganellin C.R.; Griffiths R.; Jones M.; Rana K.K.; Saunders D.; Smith I.R.; Sore N.E.; Wilks T.J. Development of a new physicochemical model for brain penetration and its application to the design of centrally acting H₂ receptor histamine antagonists. *J. Med. Chem.*, *31*:656-671, **1988**.
- Yu L.X.; Gatlin L.; Amidon G.L. Predicting oral drug absorption in humans. *Drugs Pharm. Sci.*, *102*:377-409, **2000**.
- Zhao, Y., H.; Le, J.; Abraham, M., H.; Hersey, A.; Eddershaw, P., J.; Luscombe, C., N.; Boutina, D.; Beck, G.; Sherborne, B.; Cooper, I.; Platts, J., A. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 749.
- Zhu, C.; Jiang, L.; Chen, T., M.; Hwang, K., K. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 399–407.

ANEXOS

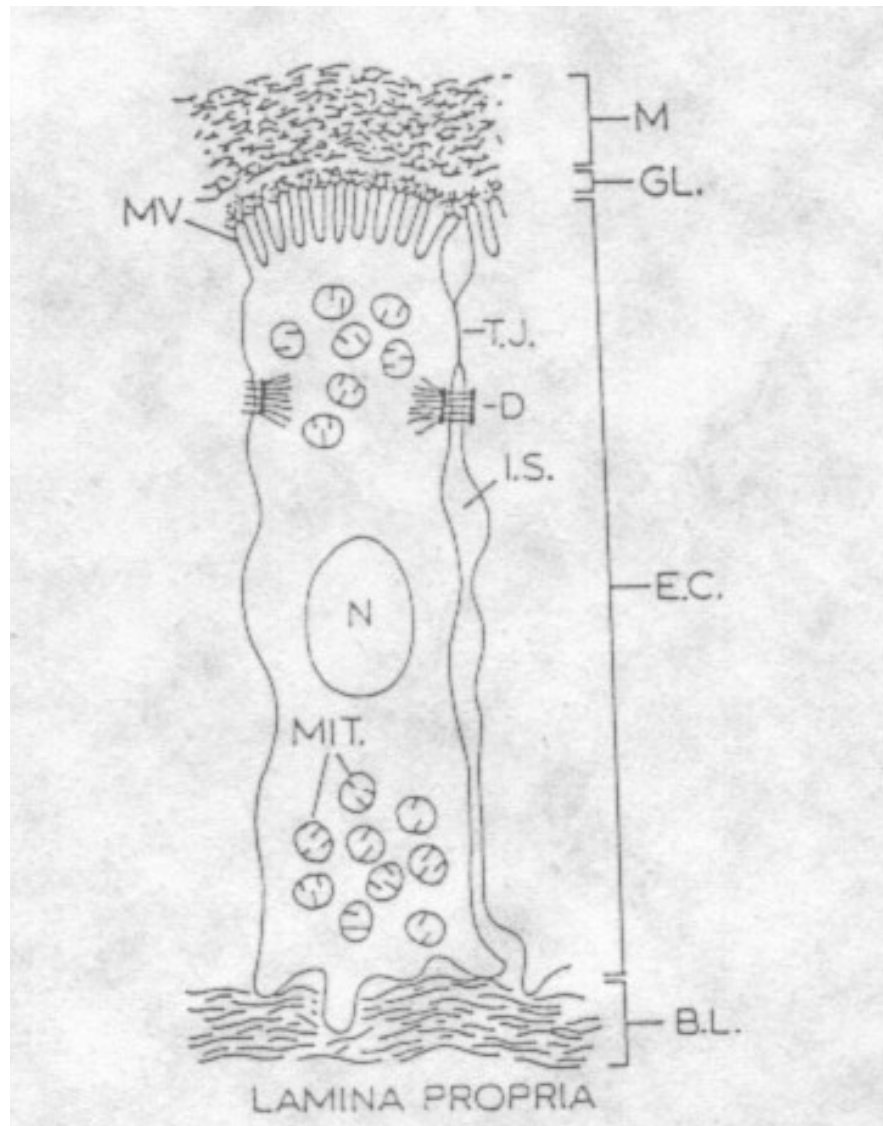
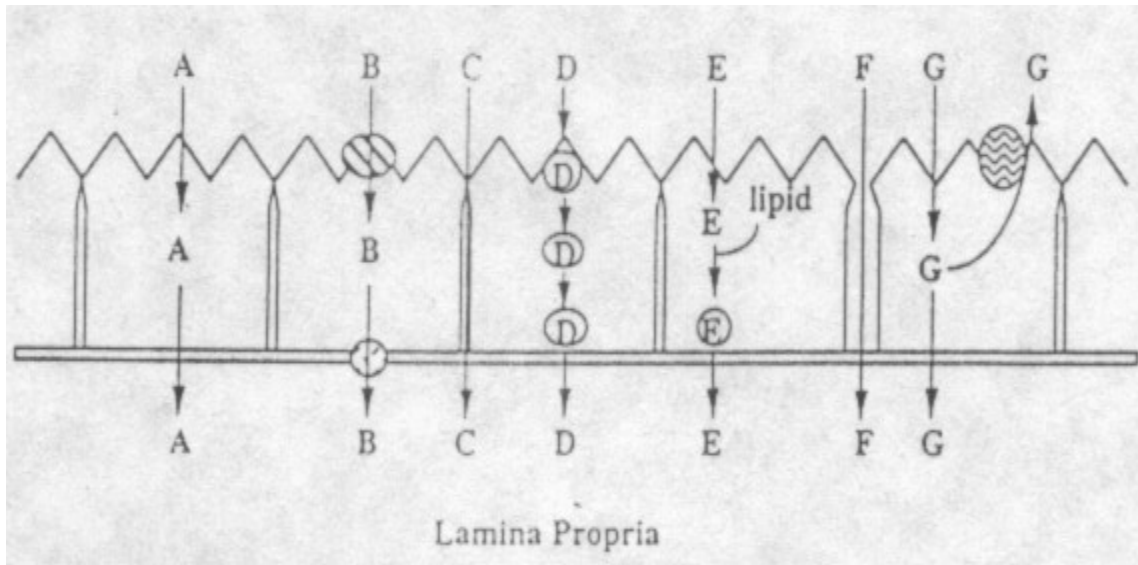


Figura 2.1. Enterocito intestinal. M: mucina; GL: glicocalix; MV: microvellosidades; TJ: uniones estrechas; D: desmosoma; IS: espacio intercelular; N: núcleo; MIT: mitocondria; EC: célula enterocítica; BL: membrana basolateral.



Esquema 2.1. Rutas de Absorción Intestinal. A: Difusión pasiva transcelular. B: Difusión transcelular mediada por transportadores. C: Difusión paracelular. D: Difusión transcelular por endocitosis. E: Difusión transcelular e incorporación hacia partículas lipídicas. F: Difusión paracelular con modulador de las uniones estrechas. G: Difusión transcelular modificada por mecanismos de flujo polarizado apical.