

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

TRABAJO DE DIPLOMA

Título Identificación computacional y corroboración experimental de nuevos compuestos con actividad analgésica.

Autores Naylén González González.

Tutores Msc. Arellys López Sacerio.

Msc. Yudith Cañizares Carmenate.

Dr. Juan Alberto Castillo Garit.

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

Pensamiento

Quien sabe de dolor, todo lo sabe.

Dante

Dedicatoria

A todas las personas que contribuyeron de una forma u otra a mi formación como futura profesional farmacéutica.

Resumen

En la actualidad el dolor está estrechamente vinculado a patologías de alta incidencia a nivel mundial. Los métodos “*in silico*” engloban todas las técnicas asistidas por ordenadores usadas en el diseño/descubrimiento de compuestos con propiedades deseadas, evitando los altos costos para las actuales tareas de síntesis y bioensayos. En este sentido, el objetivo fundamental del presente trabajo es la identificación de nuevos candidatos analgésicos a través del cribado virtual “*in silico*” empleando árboles de clasificación. Con este propósito primeramente se recolecta una base de datos de la literatura a los que se le ha reportado experimentalmente actividad analgésica. A través del software DRAGON se calcularon una serie de descriptores moleculares y posteriormente se realizó un Análisis de Conglomerados Jerárquicos (CAs) en el software STATISTICA, permitiendo la separación de la base de datos inicial en serie de entrenamiento y serie de predicción. Luego se procedió a la obtención y validación del modelo utilizado (*Tree J48*) a través del software WEKA. Finalmente se cribaron ocho compuestos aislados de *Boldoa purpurascens* y 12 productos de la hidrólisis de estos, para un total de 20 compuestos. De ellos tres compuestos fueron evaluados experimentalmente “*in vivo*” con excelentes resultados como fármacos analgésicos. De forma general podemos concluir que el empleo de estas herramientas computacionales genera un gran ahorro de recursos con respecto a los métodos tradicionales de análisis y además permite realizar una identificación rápida de compuestos con una alta probabilidad de que sean potenciales analgésicos.

Abstract

Currently, pain is closely linked to pathologies of high incidence worldwide. The "in silico" methods encompass all computer-aided techniques used in the design of compounds with desired properties, avoiding the high costs for the current tasks of synthesis and bioassays. In this sense, the fundamental objective of the present work is the identification of new analgesic candidates through virtual "in silico" screening using classification trees. For this purpose, a database of the literature is initially collected and analgesic activity has been reported experimentally. Through the DRAGON software, a series of molecular descriptors were calculated and a Hierarchical Conglomerate Analysis (CAs) was performed in the STATISTICA software, allowing the separation of the initial database in training series and prediction series. Then we proceeded to obtain and validate the model used (Tree J48) through the WEKA software. Finally, eight isolated compounds of *Boldoa purpurascens* and 12 products of the hydrolysis of these were screened for a total of 20 compounds. Of these three compounds were evaluated experimentally "in vivo" with excellent results as analgesic drugs. In general, we can conclude that the use of these computational tools generates a great saving of resources with respect to traditional methods of analysis and also allows a rapid identification of compounds with a high probability that they are potential analgesics.

Índice

Introducción	8
Capítulo 1 Revisión Bibliográfica	11
1.1 Dolor. Concepto.	11
1.2 Farmacología del dolor. Fármacos analgésicos	14
1.2.1 Mecanismos de acción	16
1.2.2 Propiedades farmacológicas	17
1.2.3 Reacciones adversas	18
1.2.4 Relación estructura- actividad.....	19
1.2.5 Antiinflamatorios no esteroideos.....	24
1.2.6 Otros fármacos analgésicos	25
1.3 Estudios QSPR/QSAR y análisis quimiométrico de los datos	25
1.3.1 Descriptores del software DRAGON	27
1.3.2 Software empleado para los estudios “ <i>in silico</i> ”	27
1.3.3 Métodos de Clasificación	28
1.3.4 Selección del número óptimo de predictores. Principio de la Parsimonia	30
1.3.5 Cribado virtual basado en ligandos	31
1.3.6 Modelación de la actividad analgésica	32
Capítulo 2. Materiales y Métodos.	34
2.1 Base de datos de compuestos analgésicos	34
2.1.1 Cálculo de los descriptores moleculares. DRAGON	35
2.1.2 Diseño de las series de entrenamiento y predicción	36
2.2 Obtención y Validación del Modelo de Clasificación	37

2.2.1 Obtención del Modelo. WEKA.....	37
2.2.2 Árbol de Clasificación J48.....	38
2.3 Calidad estadística y Validación de los modelos QSAR.	38
2.4 Cribado Virtual	39
2.5 Corroboración experimental <i>in vivo</i> de la actividad analgésica. Test de Placa Caliente	40
2.5.1 Determinación de la actividad analgésica “in vivo”. Test de Placa Caliente.	40
2.5.2 Eutanasia.....	42
2.5.3 Consideraciones éticas	42
Capítulo 3 Resultados y Discusión.....	43
3.1 Gestión de la data.	43
3.2 Obtención del modelo: Árbol de Clasificación.	45
3.3 Cribado Virtual	47
3.4 Corroboración experimental in vivo. Test de Placa caliente	51

Introducción

El dolor es un síntoma que ha estado ligado al hombre desde el surgimiento de la humanidad y acompaña al mismo durante todo el trayecto de su vida ya que ¿Quién no ha experimentado alguna vez la sensación dolorosa? El dolor se define como una experiencia sensorial desagradable que se asocia con una lesión tisular o que se describe como si esta hubiera ocurrido (1). Nos encontramos dentro de los 50 millones de americanos que sufren dolor persistente, entre las 25 millones de personas que experimentan dolores agudos a consecuencia de una herida o cirugía, o dentro de un millón de individuos diagnosticados con cáncer cada año (2).

El dolor es la causa más frecuente de consulta médica al tener alta prevalencia y un gran impacto social por sus repercusiones en el ámbito familiar, laboral y social debido a que impide el desarrollo de las actividades cotidianas con normalidad, además de que presenta un costo económico muy elevado (3, 4). En la actualidad el dolor está estrechamente vinculado a patologías de alta incidencia a nivel mundial como son las enfermedades osteomusculares, neuropatías, infarto del miocardio entre otras, un ejemplo de ello es que el dolor agudo asociado al cáncer es la primera causa de invalidez adulta en los EE.UU, afectando así de manera considerable al paciente (5). Por tanto el tratamiento del dolor adquiere elevada importancia y se convierte en uno de los problemas más frecuentes en un paciente, uno de los más difíciles de evaluar y de eliminar.

Adicionalmente la terapéutica analgésica actual presenta muchos inconvenientes o efectos adversos. Los AINES que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) son el primer paso en la escala analgésica presentan muchos efectos indeseados ya que tienen la capacidad de lesionar la mucosa gástrica o duodenal causando úlceras, además reducen la función renal pudiendo desencadenar diversas nefropatías de carácter agudo (6). Favorecen la retención de Na^{2+} y como consecuencia de esto pueden provocar edemas, agravar una insuficiencia cardíaca o una hipertensión, o desencadenar una insuficiencia renal aguda en pacientes con insuficiencia renal moderada. Por otra parte pueden provocar fenómenos de hipersensibilidad, reacciones

hematológicas y toxicidad hepática, esta última está relacionada específicamente con el paracetamol (7).

Los fármacos opiáceos, que son el siguiente escalón en dicha escalera analgésica, también presentan inconvenientes como retención urinaria, hipertonía muscular, hipertensión endocraneal e hipotensión postural, pero sin duda la complicación principal del consumo de opioides es la sobredosis la cual es potencialmente mortal a causa de la depresión respiratoria, edema agudo del pulmón y coma. Además el uso continuo de opioides crea tolerancia y dependencia (8). Por todo lo anteriormente mencionado es necesario el descubrimiento y caracterización de nuevas entidades moleculares con actividad analgésica, útiles en el tratamiento del dolor y que minimicen al máximo los efectos adversos que presentan los fármacos analgésicos ya existentes. Hasta el momento, no se han encontrado nuevos compuestos con la potencia, seguridad y selectividad deseadas por lo que las investigaciones en esta rama de la ciencia continúa siendo un reto para la industria farmacéutica, la cual hasta el momento desarrolla sus investigaciones fundamentalmente a través de los métodos tradicionales de “prueba-error” que involucran altos costos y tiempo.

El enfoque de diseño/descubrimiento de fármacos asistido por computadoras ofrece una alternativa más económica y rápida para el mundo de síntesis y evaluación (9). Estos métodos llamados “*in silico*” engloban todas las técnicas asistidas por ordenadores usadas en el diseño/descubrimiento y optimización de compuestos con propiedades deseadas y ha jugado un rol fundamental en el desarrollo de un número de fármacos que están ahora en el mercado (10). Este tipo de procedimiento ‘*in silico*’ evita los altos costos para las actuales tareas de síntesis y bioensayos, que se hacen solamente después de la exploración de los conceptos iniciales con modelos de Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad/Propiedad [conocidos internacionalmente por su siglas en inglés QSAR/QSPR (*Quantitative Structure Activity/Property Relationships*)] (9).

En ese sentido, la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas dirige sus investigaciones al desarrollo de nuevos principios activos para la industria farmacéutica en las ramas de la medicina veterinaria, humana y la sanidad vegetal. El Grupo de Diseño Molecular Asistido por Computadora y de Investigaciones Bioinformáticas

(CAMD-BIRUnit, por sus siglas en inglés) perteneciente a la Facultad de Química y Farmacia de la propia Universidad ha presentado resultados relevantes en este campo empleando como método computacional, el programa TOMOCOMD-CARDD (11); así como otros entre los que se destaca el WEKA (12) y el DRAGON (13).

Teniendo en cuenta los resultados alcanzados en la búsqueda/descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos consideramos adecuado desarrollar un modelo QSAR que permita el cribado virtual capaz de identificar/seleccionar nuevos compuestos con actividad analgésica. *Por todo lo anterior se plantea el siguiente problema científico:*

La baja efectividad en la identificación de compuestos líderes con actividad analgésica, hace necesaria la utilización de métodos más eficaces para la identificación de nuevas entidades moleculares potencialmente analgésicas a partir de compuestos aislados de *Boldoa purpurascens*.

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

El empleo de árboles de clasificación, basados en la aplicación de diferentes familias de descriptores moleculares, pudiera permitir la identificación de nuevos compuestos con actividad analgésica a través del cribado virtual de compuestos aislados de *Boldoa purpurascens* y el posterior ensayo experimental de los compuestos más prometedores.

Objetivo General

Identificar nuevos candidatos analgésicos a través del cribado virtual “*in silico*” empleando árboles de clasificación.

Objetivos Específicos

- Describir la actividad analgésica mediante árboles de clasificación implementados en el WEKA.
- Realizar procesos de validación del modelo desarrollado para demostrar la robustez y el poder predictivo del mismo.
- Identificar nuevos compuestos con actividad analgésica mediante el cribado virtual.
- Realizar la corroboración experimental “*in vivo*” a través del Test de Placa Caliente.

Capítulo 1 Revisión Bibliográfica

1.1 Dolor. Concepto.

El dolor según la *International Association for the Study of Pain* (IASP) es definido como una experiencia sensorial o emocional desagradable asociada a daño tisular real o potencial, o bien descrita en términos de tal daño (1). El dolor es, por tanto, subjetivo y existe siempre que un paciente diga que algo le duele.

La definición de la IASP destaca que el dolor está asociado a daño tisular o que se describe como producido por este, pero no refiere claramente que el dolor este producido por el mismo. Esto permite considerar que incluso en aquellas formas de dolor en las que no hay daño tisular que las ocasione, generalmente como consecuencia de lesiones neurológicas, los pacientes describen el dolor como si estuviera producido por una lesión periférica (14, 15).

El dolor tiene una alta prevalencia y un gran impacto individual, familiar, laboral, social y económico. Se considera que aumenta con la edad, llegando a presentarse en el 42,6% de los mayores de 65 años, en estos casos es un dolor crónico. La mujer está más afectada que el hombre y de forma general hasta el 61,7% de las personas con dolor toman algún fármaco con un 29% de auto prescripción (14, 16, 17).

El dolor constituye un mecanismo fundamentalmente protector que previene la aparición de lesiones permanentes del organismo y aumenta las posibilidades de supervivencia. Sin embargo, no siempre es así, existen numerosas situaciones clínicas en las que el dolor pierde su capacidad protectora y se convierte en una fuente de sufrimiento inútil, incluso en la propia enfermedad (18). El dolor es uno de los problemas del paciente que se encuentra de forma más frecuente, uno de los más difíciles de evaluar y uno de los más inflexibles al tratamiento (15).

1.1.1 Tipos de dolor

La clasificación del dolor la podemos hacer atendiendo a su duración, patogenia, localización, curso, intensidad, factores pronóstico de control del dolor y, finalmente, según la farmacología (19, 20).

A. Según su duración

Agudo: Limitado en el tiempo, con escaso componente psicológico. Ejemplos lo constituyen la perforación de víscera hueca, el dolor neuropático y el dolor músculo esquelético en relación a fracturas patológicas.

Crónico: Limitado en su duración, se acompaña de componente psicológico. Es el dolor típico del paciente con cáncer.

B. Según su patogenia

Neuropático: Está producido por estímulo directo del sistema nervioso central o por lesión de vías nerviosas periféricas. Se describe como punzante, quemante, acompañado de parestesias y disestesias, hiperalgesia, hiperestesia y alodinia. Son ejemplos de dolor neuropático la plexopatía braquial o lumbo-sacra post-irradiación, la neuropatía periférica post-quimioterapia y/o post-radioterapia y la compresión medular.

Nociceptivo: Este tipo de dolor es el más frecuente y se divide en somático y visceral que detallaremos a continuación.

Psicógeno: Interviene el ambiente psico-social que rodea al individuo. Es típico la necesidad de un aumento constante de las dosis de analgésicos con escasa eficacia.

C. Según la localización

Somático: Se produce por la excitación anormal de nociceptores somáticos superficiales o profundos (piel, músculo esquelético, vasos, etc). Es un dolor localizado, punzante y que se irradia siguiendo trayectos nerviosos. El más frecuente es el dolor óseo producido por metástasis óseas. El tratamiento debe incluir un antiinflamatorio no esteroideo (AINE).

Visceral: Se produce por la excitación anormal de nociceptores viscerales. Este dolor se localiza mal, es continuo y profundo. Asimismo puede irradiarse a zonas alejadas al lugar donde se originó. Frecuentemente se acompaña de síntomas neurovegetativos.

Son ejemplos de dolor visceral los dolores de tipo cólico, metástasis hepáticas y cáncer pancreático. Este dolor responde bien al tratamiento con opioides.

D. Según el curso

Continuo: Persistente a lo largo del día y no desaparece.

Irruptivo: Exacerbación transitoria del dolor en pacientes bien controlados con dolor de fondo estable. El dolor incidental es un subtipo del dolor irruptivo inducido por el movimiento o alguna acción voluntaria del paciente.

E. Según la intensidad

Leve: Puede realizar actividades habituales.

Moderado: Interfiere con las actividades habituales. Precisa tratamiento con opioides menores.

Severo: Interfiere con el descanso. Precisa opioides mayores.

F. Según factores pronósticos de control del dolor

El dolor difícil (o complejo) es el que no responde a la estrategia analgésica habitual (escala analgésica de la OMS). El Edmonton *Staging System* pronostica el dolor de difícil control.

G. Según la farmacología:

Responde bien a los opiáceos: dolores viscerales y somáticos.

Parcialmente sensible a los opiáceos: dolor óseo (además son útiles los AINE) y el dolor por compresión de nervios periféricos (es conveniente asociar un esteroide).

Escasamente sensible a opiáceos: dolor por espasmo de la musculatura estriada y el dolor por infiltración-destrucción de nervios periféricos (responde a antidepresivos o anticonvulsivos).

1.2 Farmacología del dolor. Fármacos analgésicos

La palabra analgésico se deriva del griego an- que significa "sin" y -algesia que significa "dolor", por lo que un analgésico es cualquier miembro del grupo de fármacos utilizados para aliviar el dolor. La analgesia se caracteriza por una alteración en la respuesta del comportamiento frente al dolor y una inferior capacidad para la percepción de los impulsos dolorosos sin pérdida de la conciencia (21, 22). Los fármacos analgésicos se clasifican en varios grupos (21, 22):

- Analgésicos opiáceos.
- Antiinflamatorios no esteroideos
- Analgésicos no opioides de acción central:
 - Antidepresivos Tricíclicos.
 - Drogas Antiepilépticas.
- Analgésicos locales y disociativos.

Analgésicos opiáceos

El término opiáceo se refiere estrictamente a los productos obtenidos de la adormidera del opio y por extensión a los productos químicamente derivados de la morfina que incluye péptidos y análogos sintéticos. Sin embargo, al conjunto de cualquier sustancia exógena o endógena que por tener afinidad hacia el receptor específico, interactúa con él de manera estereoespecífica y es desplazable por el fármaco, se denomina opioide (8, 23).

Los analgésicos opioides constituyen un grupo de fármacos que se caracterizan por poseer afinidad selectiva por los receptores opioides. Como consecuencia de la activación de los receptores causan analgesia de elevada intensidad, producida sobre el SNC, así como otros efectos subjetivos que tienden a favorecer la instauración de la conducta de autoadministración denominada farmacodependencia. Los opioides

ejercen su acción, al igual que los péptidos endógenos, al actuar sobre receptores opioides específicos (24-26). El representante principal de este grupo es la morfina, alcaloide pentacíclico existente en el opio, que es un extracto del jugo de la adormidera (*Papaver Somniferum*), el cual ha sido usado con propósitos sociales y medicinales por miles de años como un agente que produce euforia, analgesia y sueño y que previene la diarrea (27, 28). La morfina se denomina como 17 metil-7.8 didehidro-4.5 α – epoximorfinano-3.6 α – diol, y es un derivado fenantrénico con dos anillos planos (A y B) y dos estructuras alifáticas (C y D). Poseen cinco centros asimétricos (los carbonos 5,6,9,13 y 14) donde los átomos 10 y 12 deben ser cis y por tanto, 1,3-diaxiales con respecto al anillo de piperidina (D) (22, 29).

Si la morfina activa un tipo de receptor (μ) para producir analgesia se dice que es un agonista opioide. Puede ocurrir que otro opioide active un receptor diferente mediante el cual produce analgesia, pero en cambio se comporta como antagonista competitivo por el receptor μ . En tal caso, cuando este segundo opioide actúe solo producirá un tipo de analgesia, pero si actúa en presencia de otro agonista μ interferirá la acción analgésica de este y el resultado analgésico neto dependerá de la afinidad que presente por ambos tipos de receptores. Es un analgésico que se comporta al mismo tiempo como agonista y antagonista. En función de esto los fármacos opiáceos se clasifican en (22, 30):

A- Agonistas Puros: son los opiáceos que se comportan como agonistas muy preferentes y en ocasiones selectivos sobre receptores μ , mostrando la máxima actividad intrínseca. Pertenecen a este grupo la morfina, heroína, petidina, metadona y sufentanilo.

B- Agonistas-Antagonistas mixtos: son los opioides capaces de actuar sobre más de un tipo de receptor opioide, concretamente sobre el μ y el κ , pero sobre el κ se comportan como agonistas mientras que sobre el μ lo hacen como agonistas parciales o incluso como antagonistas. Puesto que la analgesia se consigue tanto por la activación de μ como κ , estos fármacos serán analgésicos en función de su actividad intrínseca sobre receptores μ , aunque también deprimirán la respiración.

Pero si existe un agonista puro (μ) se comportarán como antagonistas tanto más cuanto menor sea su actividad intrínseca sobre el receptor μ . Los fármacos pertenecientes a este grupo son: nalorfina, pentazocina, butorfanol y nalbufina.

C- Agonistas parciales: son los opiáceos que actúan sobre el receptor μ con actividad intrínseca inferior a los agonistas puros, pueden comportarse también como antagonistas. El fármaco más característico es la buprenorfina.

D- Antagonistas puros: son opiáceos que tienen actividad por los receptores opioides pero carecen de actividad intrínseca. Su afinidad se extiende a los tres principales tipos de receptores si bien es mayor por μ que por κ y δ .

1.2.1 Mecanismos de acción

La analgesia inducida por los opioides se debe a sus acciones tanto a nivel celular como en diferentes sitios del SNC así como en múltiples sitios espinales y supraespinales (30). Los receptores opioides se diferencian entre sí por su configuración, distribución y afinidad de los fármacos. Aunque todos ellos producen antinocicepción al ser activados por agonistas, aparentemente los receptores modulan diferentes tipos de dolor. La mayoría de los receptores actúan a través de la proteína G de la membrana, inhibiendo la adenilato ciclasa. Entonces se produce una disminución de los niveles intracelulares de segundos mensajeros (AMPC). Secundariamente se afecta la fosforilación de proteínas intracelulares. Como consecuencia tienen lugar efectos a nivel de los canales iónicos. Los opiáceos promueven la apertura de los canales de K^+ e inhiben los canales de Ca^{2+} localizados en la membrana sináptica. Estos efectos reducen la excitabilidad neuronal (debido al incremento de la conductancia del K^+ que causa hiperpolarización de la membrana) y la liberación del neurotransmisor (debido a la inhibición de la entrada del Ca^{2+}). En conjunto estos efectos provocan una inhibición a nivel celular. Sin embargo, los opiáceos incrementan la actividad a nivel neuronal por supresión de la descarga de interneuronas inhibitorias (30, 31).

Los receptores opioides están ampliamente distribuidos en el cerebro en relación con las vías del dolor. La morfina al ser inyectada en la región del PAG produce una analgesia marcada la cual puede ser prevenida por la interrupción de las vías descendentes del NMR o por bloqueo de las síntesis de serotonina. Esto produce más tarde bloqueo de la vía serotoninérgica desde el NMR a la médula espinal. Sin embargo la morfina sistémica es poco efectiva en la supresión del reflejo doloroso espinal y de la descarga de las neuronas está asociado con las vías descendientes inhibitorias (30, 31). A nivel espinal la morfina inhibe la transmisión de los impulsos nociceptivos a través de la médula espinal y de la supresión del reflejo espinal nociceptivo. También puede inhibir la liberación de sustancia P a partir de las terminales aferentes primarias en la médula espinal, aunque estos efectos no aparecen en ratas a las cuales se les ha administrado por vía sistémica dosis analgésica. Además existen evidencias que los opiáceos inhiben la descarga de las terminales nociceptivas aferentes en la periferia en condiciones inflamatorias debido al incremento de la expresión de los receptores opioides por las neuronas sensoriales. Esta observación plantea la hipótesis de que la analgesia opiácea no es exclusiva a nivel central (30, 31).

1.2.2 Propiedades farmacológicas

La analgesia inducida por los opioides se produce sin pérdida de la conciencia y no altera otras modalidades sensoriales como la vista y el oído. La acción tiene lugar a nivel espinal y supraespinal, inhibiendo tanto la transmisión del dolor como el componente emocional y afectivo asociado (30). La acción en el SNC conduce también a sedación, somnolencia, vértigo, euforia y disminución de la sensibilidad del centro respiratorio al CO₂, con depresión de la frecuencia respiratoria. Los opioides activan al centro del vómito, también sensibilizan al sistema vestibular (VIII par) a vómitos inducidos por movimientos. Probablemente, también por acción central, pueden producir rigidez muscular del abdomen y tórax, efecto que aparece generalmente tras dosis elevadas y/o de una administración intravenosa rápida (30).

En el sistema gastrointestinal, por acción central y periférica, los opioides disminuyen el vaciamiento gástrico y el peristaltismo intestinal, la secreción gástrica y pancreática y el agua en las deposiciones, condicionando así el desarrollo de constipación. También aumenta la presión del colédoco y el tono del esfínter de Oddi (30). Una muestra de algunos de los efectos farmacológicos asociados con los diferentes tipos de receptores opioides aparece en la Tabla 1.

Tabla1. Efectos Farmacológicos asociados con los tipos de receptores opioides.

Tipos de Analgesia	μ	δ	K
Supraespinal	+++	-	-
Espinal	+	++	+
Periférica	+	-	++
Depresión respiratoria	+++	++	-
Constricción de la pupila	+	-	+
Reducción de la motilidad	+	++	+
Euforia	+++	-	-
Disforia	-	-	++
Sedación	+	-	++
Dependencia física	+++	-	+

1.2.3 Reacciones adversas

Se deducen claramente de sus acciones farmacológicas. Pueden aparecer inicialmente náuseas y vómitos que se evidencian en cerca del 50% de los pacientes, también aparecen somnolencia e inestabilidad y estados confusionales. En uso continuo, lo más frecuente es el estreñimiento. En ocasiones aparece retención urinaria, hipertonía muscular, mioclonias, hipertensión endocraneal e hipotensión postural (30, 32).

Las principales complicaciones del consumo crónico de opioides es la sobredosis, la cual es potencialmente mortal a causa de la depresión respiratoria, edema agudo del pulmón y coma. Además los opioides desarrollan tolerancia a muchos de sus efectos con relativa rapidez; se manifiesta por el acortamiento de la duración de la acción o por una disminución en la intensidad de la respuesta, lo que obliga a

aumentar la dosis. Se desarrolla tolerancia más fácilmente a las acciones depresoras (analgesia, depresión respiratoria, euforia, sedación e hipotensión) y en menor grado a la miosis y la acción gastrointestinal. La rapidez con la que aparece la tolerancia es tanto mayor cuanto más intensamente actúa el opioide (25, 31, 32).

Cuando una persona recibe de forma crónica morfina u otro opioide por vía sistémica, la suspensión brusca del fármaco o la administración de un antagonista desencadena un síndrome de abstinencia, con intensa sintomatología central y vegetativa mayoritariamente simpática que demuestra la existencia de un estado de dependencia física (30).

1.2.4 Relación estructura- actividad.

La morfina es el prototipo opioide siendo selectiva sobre receptores μ . La estructura de la morfina está constituida por cinco anillos fusionados que presentan cinco centros quirales absoluta electroquímica 5 (R), 6 (S), 9(R), 13 (S) y 14 (R). A partir de la morfina se han sintetizado y desarrollado un grupo de analgésicos y otros opioides (33). El menor cambio en la estructura de la morfina puede provocar cambios en la afinidad y la actividad intrínseca de estos nuevos compuestos en función de cada tipo de receptor opioide. El anillo A y el N básico, el cual existe predominantemente en la forma ionizada o protonada de la morfina son los dos elementos estructurales que más comúnmente se presentan en todos los compuestos con actividad opioide. El anillo aromático A y el nitrógeno catiónico pueden conectarse por un enlace etil al anillo B (posición 9,10) o un enlace propil (junto con el anillo piperidina que forma con el anillo D). A pesar de la alta importancia del anillo A y del nitrógeno básico para la potencia de los agonistas μ , estos dos elementos estructurales no son suficientes. El grupo hidroxilo en posición 3 y el N terciario incrementan la actividad (33, 34).

La sustitución del N en la morfina es vital para el grado y tipo de actividad. El tamaño del N-sustituyente determina la potencia del agonista. El incremento de tres a cinco carbonos (especialmente insaturados o con anillos carboxílicos pequeños)

proporciona compuestos antagonistas de algunos o todos los receptores opioides. Sin embargo largos sustituyentes en el N producen propiedades agonistas (22, 33).

La codeína constituye un 3-metoxi derivado de la morfina, es un agonista débil μ pero presenta trastornos en el metabolismo de desmetilación. Es un potente agente antitusivo. La heroína por su parte es un derivado 3,6-diacetil de la morfina, presenta baja afinidad por los receptores μ pero su alta lipofilia comparada con la morfina resulta en una mayor penetración de la barrera hematoencefálica. Una vez en el organismo las esterasas tisulares y séricas hidrolizan el grupo 3-acetil morfina. Este compuesto es un agonista μ mayor que la morfina. Sin embargo produce tolerancia, dependencia física y adquisición de hábitos (33, 34). Los cambios en el anillo C de la morfina puede conllevar a compuestos con mayor actividad. La hidromorfona es un derivado 7,8-dihidroxi-6-keto de la morfina que es de 8 a 10 veces más potente que la misma. La hidroxycodona que es un 3-metoxi derivado es considerada más activo que la codeína (33, 34).

El grupo 14 β -hidroxi incrementa las propiedades agonistas μ y disminuye la actividad antitusiva aunque la actividad varía cuando se sustituye completamente en la estructura. La oximorfona es un 3-hidroxi-N-metil derivado 10 veces más potente que la morfina, al reducir el grupo 6-keto de la oximorfona a 6 β -OH se obtiene la nalbufina que actúa a través de los receptores κ que producen la mitad de la potencia analgésica de la morfina, además este fármaco es un antagonista de los receptores μ . La naloxona (N-alil) y naltrexona (N-ciclopropil noroximorfona) son ligeramente selectivos sobre receptores μ y antagonistas de todos los receptores opioides (33, 34). Al remover el enlace 3,4-epoxi en la estructura de la morfina se obtienen compuestos denominados morfinaños. Los dos morfinaños registrados en los E.U son levorfanol y butorfanol, el primero es 8 veces más potente que la morfina. Este incremento de la actividad se debe a la alta afinidad por los receptores μ de este compuesto debido a la gran lipofilidad que alcanza a nivel cerebral. El butorfanol es un antagonista μ y un agonista κ (33, 34).

Los compuestos sintéticos que pierden el anillo epóxido y el anillo C de la morfina mantienen su actividad opioide. Los compuestos que solo presentan anillos A, B y D son llamados 6,7-benzomorfanos. El único fármaco registrado es la pentazocina que resulta agonista κ y antagonista μ . El derivado fenazocina (N-feniletil) es cerca de 10 veces más potente que la morfina como agonista μ . Las aminotetralinas son análogos que presentan anillos A y B a partir de las cuales se han obtenido compuestos con actividad analgésica pero solo la dezocina, un agonista-antagonista, ha sido registrado (33, 34).

Otro grupo de compuestos analgésicos está representado por la 4-fenilpiperidina que presenta anillos A y D, análogos a la morfina. El primer derivado sintetizado fue la meperidina (1937) el cual es un agonista μ que tiene una cuarta parte de la potencia de la morfina y es usado para algunos procedimientos médicos debido a su corto tiempo de acción. Los ésteres de la meperidina tienen una gran potencia como por ejemplo el 3-metilester de la meperidina, α y β -prodina pero producen un compuesto neurotóxico MPTP. Otro ejemplo de analgésicos es la trimeperidina (γ -promedol). Modificaciones estructurales realizadas a la 4-fenilpiperidina permitieron el descubrimiento de la 4-anilidopiperidina o grupo del fentanilo. Estos analgésicos son antagonista μ y producen la analgesia típica de la morfina y sus efectos adversos. Las variantes estructurales del fentanilo que han dado lugar a compuestos activos son: sustitución de un anillo isostérico al grupo fenil, adición de un oxígeno que forme parte del grupo en posición 4 del anillo piperidínico e introducción de un grupo metilo en la posición 3 del propio anillo, ejemplos son : alfentoniil y sufentaniil. Estos compuestos producen analgesia a bajas dosis que las necesarias para causar depresión respiratoria (33, 34).

La metadona es la mayor droga de una serie de compuestos que se caracterizan por su actividad oral y larga duración de la acción. Estas propiedades permiten su uso en la terapia de la adicción opioide y en la supresión del dolor en enfermos terminales de cáncer. Las variaciones a la estructura de la metadona incluyen la reducción del keto y la acetilación obteniendo grupos hidroxilo en acetilmetadol.

Cambios en la estructura de la metadona han permitido el descubrimiento de opioides útiles antidiarreicos como el difenoxilato y la loperamida. El propoxifeno es un agonista μ obtenido a partir de la metadona pero que solo presenta una quinta parte de la actividad de esta (33).

Todos los compuestos antagonistas μ presentan un grupo 3-fenoxi y N-alil, N-ciclopropilmetil (CPM) o N-ciclobutilmetil (CBM) remplazando el N-metil de la estructura opioide. El hecho de que estos compuestos tengan actividad antagonista implica que pueden ser agonistas sobre otro tipo de receptor opioide. La única excepción es la buprenorfina que presenta un sustituyente N-CPM y que es un potente agonista parcial (o antagonista parcial) de receptores μ . Solo dos compuestos son antagonistas puros (antagonizan todos los receptores opioides) estos son: N-alil (naloxona) y el N-CPM (naltrexona). Se piensa que el grupo 14 β -OH es importante para el antagonismo puro de estos compuestos. No se entiende como un simple cambio del grupo N-metil al grupo N-alil produce un cambio del opioide de agonista a antagonista. La respuesta puede darse a la capacidad del receptor opioide de acoplarse de manera efectiva a la proteína G produciendo una señal de traducción al unirse a un agonista lo que no sucede cuando se une a un antagonista. Se plantea que los opioides que presentan N-sustituyentes de 3 a 4 átomos de carbono inducen un cambio conformacional en el receptor que bloquea la interacción de este con las proteínas de transducción (33).

En resumen los compuestos N-metil-4-fenilpiperidina, N-metil-6,7-benzomorfanos han mostrado buena actividad antagonista μ . Además del hecho de que los antagonistas κ se ha encontrado que esta actividad se incrementa si existe un oxígeno en posición 8 (ejemplo, etilketazocina) o dentro de los sustituyentes del N (ejemplo: bremazocina) este grupo como sustituyente N-furanilmetil también incrementa la actividad agonista κ . Existen evidencias de la unión selectiva de los derivados arilacetamida a κ 1 y de los compuestos benzomorfanos a los subtipos κ 2 y κ 3 (33, 34).

Miles de derivados relacionados con los péptidos opioides endógenos se han preparado desde el descubrimiento de las encefalinas en 1975. Las principales tendencias que han surgido con relación a la relación estructura-actividad de péptidos opioides son (33):

1. Todos los péptidos opioides endógenos, a excepción de la morfina tienen Leu o Met-enkefalinas como uno de los cinco primeros residuos de aminoácidos.
2. La tirosina es el primer residuo de aminoácido (posición 1) de todos los péptidos opioides endógenos lo cual es esencial para la actividad. La eliminación de los hidroxilos fenólicos o el nitrógeno básico (grupo amino terminal) suprimirá la actividad. El grupo amino Tyr libre puede ser alquilado (grupos metil o alil para obtener agonistas y antagonistas), pero debe conservar su carácter básico. La semejanza estructural entre la morfina y la Tyr grupo de péptidos opioides es obvia.
3. Además del grupo fenol y el grupo amina de Tyr la fracción más importante en la estructura de las encefalinas es el grupo fenilo de PHE. La supresión de este grupo o cambios en la distancia de Tyr resultan en la pérdida sustancial de la actividad.
4. Las encefalinas tienen varias conformaciones de baja energía y estas diferentes conformaciones están vinculadas a diferentes tipos y subtipos de receptores opioides.
5. La sustitución de los L-aminoácidos naturales con los D-aminoácidos no naturales puede conducir a la resistencia de estos péptidos a las acciones de varias peptidasas que en general degradan rápidamente las endorfinas naturales. La utilización de una D-Ala, en lugar de Gly ha sido de gran utilidad para la protección de los péptidos de la acción de aminopeptidasas no selectivas. La colocación de grandes grupos en la estructura (por ejemplo, la adición de N-Me PHE) puede también disminuir la acción de las peptidasas. Al evaluar los nuevos péptidos opioides para la actividad, es difícil saber si los cambios se deben a la estabilidad metabólica o a la afinidad por el receptor.
6. La conversión del grupo carboxilo Terminal en un grupo alcohol o en una amida puede proteger estos compuestos de la acción de las peptidasas carboxílicas.
7. Cualquier introducción de un D- o L-aminoácido no natural o grupos voluminosos en la estructura de la encefalina puede afectar su estabilidad conformacional. Los péptidos resultantes tendrán un aumento o disminución de la afinidad para cada uno de los tipos de receptores opioides. La correcta combinación de elevada y/o baja afinidad por el

receptor tendrá como resultado una mayor selectividad por un tipo específico de receptores.

8. Los cambios estructurales que restringen la movilidad conformacional de los péptidos (por ejemplo, la sustitución de la prolina para Gly o ciclización del péptido), han sido especialmente útil para el descubrimiento de péptidos opioides selectivos para un receptor.

1.2.5 Antiinflamatorios no esteroideos

Los AINES son efectivos contra el dolor leve y moderado especialmente si está asociado a la inflamación y daño tisular (35). Los principales efectos terapéuticos y muchas de las reacciones adversas de los AINES pueden explicarse por su efecto inhibidor de la actividad de las ciclooxigenasas (COX), enzimas que convierten el ácido araquidónico que se encuentra en las membranas celulares en endoperóxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas y tromboxanos. Algunos de estos eicosanoides participan en grado diverso en los mecanismos patogénicos de la inflamación el dolor y la fiebre, por lo que la inhibición de su síntesis por los AINES sería responsable de su actividad terapéutica aunque, dada su participación en determinados procesos fisiológicos dicha inhibición sería también responsable de diversas reacciones adversas característica de estos fármacos (35).

La actividad analgésica de los AINES es de intensidad moderada o media, alcanzándose un techo analgésico claramente inferior al de los analgésicos opioides, pero frente a estos presentan la ventaja de no alterar el sensorio o la percepción, lo cual resulta, en conjunto, en una utilización clínica menos comprometida (35).

Actualmente se acepta que la acción analgésica de los AINES tiene lugar tanto en los tejidos periféricos como en el SNC. A nivel periférico, mediante inhibición de la síntesis de las PG producidas, por ambas isoformas de la COX, en respuesta a una agresión o lesión tisular; impiden de ese modo que las PG contribuyan, mediante su acción sensibilizadora sobre las terminaciones nerviosas nociceptivas, a aumentar la acción estimulante dolorosa de otros mediadores allí liberados (histamina, bradiquinina, etc). En presencia de inflamación la inhibición de la COX-2 parece desempeñar un papel más importante. En el SNC, en aquellas situaciones que originan sensibilización

espinal como consecuencia de una estimulación sostenida de aferencias nociceptivas periféricas, preferentemente de la forma constitutiva de la COX-2 (36). En combinación con los opioides puede disminuir el dolor postoperatorio. El antiinflamatorio no esteroideo más utilizado como analgésico es el paracetamol (acetaminofen) el cual inhibe a nivel del SNC una isoforma de la ciclooxigenasa conocido como COX-3 (36). La mayoría de las reacciones adversas conocidas para los AINES incluyen: náuseas, dispepsias, vómito, insuficiencia renal, desórdenes hepáticos, broncoespasmos, úlcera péptica, diarrea y reacciones en la piel (36).

1.2.6 Otros fármacos analgésicos

Varios fármacos pueden ser utilizados como analgésicos particularmente en el tratamiento del dolor neuropático el cual no responde adecuadamente a los analgésicos convencionales. En este grupo se incluyen los Antidepresivos Tricíclicos (ADP), los anestésicos locales y disociativos y algunos fármacos antiepilépticos (37).

1.3 Estudios QSPR/QSAR y análisis quimiométrico de los datos.

Los estudios QSPR/QSAR (de sus siglas en inglés, *Quantitative Structure-Property Relationships/Quantitative Structure-Activity Relationships*) o en español, Relaciones Cuantitativas Estructura-Propiedad/Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad, constituyen enfoques cuantitativos orientados a encontrar relaciones entre la estructura molecular y las propiedades/actividades moleculares medidas o calculadas. Los estudios QSPR/QSAR datan desde el año 1868 y desde entonces se han aplicado a la modelación de disímiles propiedades moleculares de naturaleza física, química y biológica (38-40). Este análisis puede definirse 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. El objetivo más usual de este análisis es incrementar el entendimiento del sistema biológico bajo investigación o predecir la propiedad estudiada a un compuesto no utilizado en la obtención del modelo.

Los Descriptores o Índices Moleculares (DMs o IMs) juegan un papel fundamental y en la actualidad se definen como: el resultado final de un procedimiento lógico-matemático el cual transforma la información química, codificada dentro de una representación simbólica de una molécula, en un número (o conjunto de estos) útil (o útiles) en el resultado de alguno de los experimentos ya estandarizados. En la actualidad, existe un gran número de descriptores moleculares (DMs) que pueden ser usados en estudios QSAR (41). La naturaleza de los DMs, depende de cual haya sido el proceder utilizado para la definición de los mismos, pudiendo tener en cuenta rasgos topológicos (que aquí llamaremos bidimensionales o 2D), geométricos (3D), y electrónicos de las moléculas.

Los principios de la metodología QSAR pueden describirse mediante los siguientes pasos comunes: 1) Formulación del problema, en la cual se determina el objeto de análisis y el nivel de información requerido; 2) Parametrización cuantitativa de la estructura molecular de los compuestos químicos orgánicos/secuencia de biopolímeros; 3) Medición de la propiedad de interés (efectos biológicos u otros); 4) Elección del tipo de modelo QSAR que se va a desarrollar; 5) Selección de los compuestos (diseño estadístico de la serie); 6) Análisis matemático de los datos y validación interna y externa de los modelos obtenidos; 7) Interpretación de los resultados y aplicación de los modelos desarrollados al diseño/descubrimiento de un nuevo compuesto líder, desarrollando procedimientos de cribado virtual. Sin embargo, el desarrollo de cualquier estudio QSPR/QSAR, es un ciclo iterativo (41).

La quimiometría es una disciplina que colecciona instrumentos matemáticos y estadísticos para tratar con datos químicos complejos. Siendo el instrumento más útil en estudios QSAR y QSPR, debido a que proporciona una batería de métodos disímiles y por tanto una base firme para el análisis de datos y el modelado en general. Además, un aspecto relevante de la filosofía quimiométrica es la atención que esta pone al poder predictivo estimado de los modelos (usando técnicas de validación), a la complejidad de los modelos, y a la continua búsqueda de parámetros adecuados para evaluar la calidad de los mismos, tales como los parámetros de clasificación y parámetros de regresión (42).

1.3.1 Descriptores del software DRAGON

El DRAGON es un software profesional para el cálculo de descriptores moleculares. Entre ellos, descriptores constitucionales, topológicos, de autocorrelación, geométricos así como descriptores *3DMoRSE*, *RDF*, *WHIM*, *GETAWAY*, grupos funcionales, fragmentos centrados en átomos, son calculados (43). En este software podemos encontrar más de 3000 descriptores moleculares en familias 0D-3D. La naturaleza y magnitud de los descriptores incluidos en este software computacional lo convierten en una poderosa herramienta de la química computacional propiciando la generación de sistemas con una amplia aplicación en la investigación experimental, tanto para la interpretación de los resultados obtenidos y la planificación de futuros, así como para deducir información no asequible experimentalmente (43).

1.3.2 Software empleado para los estudios “*in silico*”

En este trabajo se empleará el WEKA (*Waikato Environment for Knowledge Analysis*, en español «Entorno para análisis del conocimiento, de la Universidad de Waikato») para la clasificación de compuestos con potencial actividad analgésica. Este es una plataforma de software para el aprendizaje automático y la minería de datos escritos en Java. WEKA es software libre distribuido bajo la licencia GNU-GPL (12). En 1993, la Universidad de Waikato de Nueva Zelanda inició el desarrollo de la versión original de WEKA (en TCL/TK y C). En 1997, se decidió reescribir el código en Java incluyendo implementaciones de algoritmos de modelado. En 2005, WEKA recibe de SIGKDD (*Special Interest Group on Knowledge Discovery and Data Mining* por sus siglas en inglés) el galardón "*Data Mining and Knowledge Discovery Service*". En 2006, *Pentaho Corporation* adquirió una licencia exclusiva para usar WEKA para Inteligencia de negocio (*Business Intelligence*), dando lugar al componente de minería de datos y análisis predictivo del paquete de software *Pentaho Business Intelligence* (44).

El paquete WEKA contiene una colección de herramientas de visualización y algoritmos para análisis de datos y modelado predictivo, unidos a una interfaz gráfica de usuario para acceder fácilmente a sus funcionalidades. La versión original de WEKA fue un *front-end* en TCL/TK para modelar algoritmos implementados en otros lenguajes de programación, más unas utilidades para preprocesamiento de datos desarrolladas en C

para hacer experimentos de aprendizaje automático. Esta versión original se diseñó inicialmente como herramienta para analizar datos procedentes del dominio de la agricultura, pero la versión más reciente basada en Java (WEKA 3), que empezó a desarrollarse en 1997, se utiliza en muchas y muy diferentes áreas, en particular con finalidades docentes y de investigación (12). WEKA soporta varias tareas estándar de minería de datos, especialmente, preprocesamiento de datos, clasificación, regresión, visualización, y selección. Todas las técnicas de WEKA se fundamentan en la asunción de que los datos están disponibles en un fichero plano (*flat file*) o una relación, en la que cada registro de datos está descrito por un número fijo de atributos (normalmente numéricos o nominales, aunque también se soportan otros tipos) (45). No puede realizar minería de datos multi-relacional, pero existen aplicaciones que pueden convertir una colección de tablas relacionadas de una base de datos en una única tabla que ya puede ser procesada con WEKA (46).

Investigadores que compararon el WEKA con otras herramientas plantean que el uso de WEKA es sustancialmente mayor que el de *scikit-learn* o *Rapidminer* en los últimos años, quedando en segundo lugar de predilección de uso *Rapidminer*, resultando claro que WEKA es el software de minería de datos más utilizado (47). En términos generales, desde 2011 la cantidad de citas obtenidas en trabajos con WEKA oscila en valores alrededor del doble de publicaciones hechas y se observa que la relación citas-artículos aumenta escuetamente con el tiempo (47).

1.3.3 Métodos de Clasificación

Los métodos de clasificación son métodos de aprendizaje supervisado a partir de una serie de casos con variables predictivas y función “objetivo” o variable dependiente también conocida (esta serie de entrenamiento es el “maestro o supervisor”). En los problemas de clasificación la función objetivo o variable dependiente es discreta (nominal u ordinal), o sea una clase (48). El objetivo de tales técnicas es calcular una regla de clasificación (y, posiblemente, límites de clases, o probabilidades de pertenencia a una clase), basados en los objetos de la serie de entrenamiento y aplicar esta regla para asignar una de estas clases, a objetos de clases previamente desconocidas. Los Métodos de Clasificación son apropiados para modelar varias

respuestas QSAR, como por ejemplo: compuestos activos/no-activos, compuestos de toxicidad baja/mediana/alta, compuestos mutagénicos/no-mutagénicos, etc (48).

Los Métodos de Clasificación de origen estadístico más populares son: Análisis Discriminante Lineal o LDA (de sus siglas en inglés, *Linear Discriminant Analysis*); Análisis Discriminante Cuadrático o QDA, (de sus siglas en inglés, *Quadratic Discriminant Analysis*); Análisis Discriminante Regularizado o RDA (de sus siglas en inglés, *Regularized Discriminant Analysis*) ; k -ésimos Vecinos más Cercanos o KNN (de sus siglas en inglés, *kth Nearest Neighbours*) ; Métodos de Árboles de Clasificación o CTM (de sus siglas en inglés, *Classification Tree Methods*, también conocidos en la literatura como DT, acrónimo de *Decision Trees*) (49).

En particular los llamados árboles de decisión constituyen un método de aproximación de funciones objetivos de valores discretos, en el cual la función aprendida se representa por un árbol en el cual intervienen las posibles variables predictivas y sus interacciones. Este procedimiento lo propusieron Breiman, Friedman, Olshen y Stone (1984) en el libro titulado *Classification and Regression Trees*. Los árboles obtenidos pueden ser representados como conjuntos de reglas “si-entonces” (*if-then*). Un árbol de decisión es un grafo acíclico donde cada nodo especifica una prueba de algún rasgo y cada arco que sale del nodo corresponde a alguno de los valores posibles del rasgo que representa ese nodo. Estos árboles clasifican casos no conocidos comenzando por la raíz del árbol, probando el rasgo especificado en el nodo y en dependencia del valor de ese rasgo se mueve al próximo nodo. Este proceso es repetido entonces hasta alcanzar un nodo hoja o terminal que define la clasificación (50).

Según la literatura el algoritmo más clásico para construir árboles de decisión es el ID3 (51) pero este algoritmo no trabajaba para atributos continuos y el propio autor sugiere una variante, el C4.5, que usa puntos de corte e introduce varias medidas para evitar el sobre entrenamiento, en particular los criterios de parada de la división y de poda del árbol. El criterio básico de parada de la división se basa en detener el desglose del árbol cuando el número de objetos asignados al nodo hijo están por debajo de determinado umbral. El segundo criterio, poda, simplifica el árbol eliminando

subárboles que conducen a una misma conclusión sobre la clasificación, técnica también conocida como *reduced error pruning*. Hoy en día existen muchos otros algoritmos e implementaciones, de construcción de árboles de decisión; CHAID (*Chi-square Automatic Interaction Detector*), *Exhaustive CHAID*; y también existen muchos otros criterios de parada o poda. Ellos han sido utilizados con bastante eficiencia en la solución de problemas bioinformáticos.

1.3.4 Selección del número óptimo de predictores. Principio de la Parsimonia

La exactitud de un modelo de clasificación aumenta en la medida en que se añaden variables a la ecuación; pero a partir de cierto punto el incremento de esta para cada nueva variable que se añade, es insignificante. Un buen modelo no debe presentar ni demasiadas variables, ni debe olvidar las que sean verdaderamente relevantes. Es decir, debe cumplir el principio de la *parsimonia*, según el cual un fenómeno debe ser descrito con el número mínimo de elementos posibles.

Diversos procedimientos se han propuesto para seleccionar el número óptimo de variables a incluir en la ecuación, como por ejemplo dentro de los métodos de selección de atributos incorporado al software WEKA encontramos varios evaluadores de atributos como:

- *WrapperSubsetEval*: Evalúa y establece atributos mediante el uso de un esquema de aprendizaje. La validación cruzada se utiliza para estimar la exactitud del sistema de aprendizaje para un conjunto de atributos (52).
- *CfsSubsetEval*: Evalúa el valor de un subconjunto de atributos considerando la capacidad de predicción individual de cada característica, junto con el grado de redundancia entre ellos. (53).
- *SVMAttributeEval*: Evalúa el valor de un atributo mediante el uso de un clasificador SVM. Los atributos se clasifican por el cuadrado del peso asignado por la SVM. Atributo de selección de problemas multiclase es manejado por la clasificación de atributos para cada clase por separado utilizando un método de uno -contra- todos y luego " hacer frente " de la parte superior de cada pila para dar una clasificación final (54).

Además se incluyen varios métodos de búsqueda específicos para cada técnica de clasificación como:

- *BestFirst*
- *GeneticSearch*
- *LinearForwardSelection*
- *RankSearch*
- *SubsetSizeForwardSelection*

1.3.5 Cribado virtual basado en ligandos

La identificación de nuevos compuestos con una actividad farmacológica determinada es uno de los pasos críticos en el proceso de descubrimiento de fármacos. El uso de técnicas de cribado virtual en bases de datos de la industria farmacéutica para la búsqueda de nuevos compuestos líderes se ha incrementado en los últimos años. Entre los métodos disponibles, la búsqueda por similitud es uno de los métodos más baratos y ampliamente usados para seleccionar conjuntos de compuestos con potenciales actividades a partir de grandes bases de datos. Este método se basa en el principio de similitud, uno de los principios más importantes en el diseño racional de fármacos, el cual postula que los compuestos estructuralmente similares, deben tener las mismas propiedades fisicoquímicas, y biológicas, y por ende, pudieran tener efectos similares en los experimentos in vivo (49).

Las técnicas de cribado virtual pueden ser clasificadas según su modelado particular de reconocimiento molecular y el tipo de algoritmo usado en la base de datos investigada. El diseño racional de fármacos se puede conseguir mediante métodos indirectos (basados en ligandos), que se basan en el análisis y comparación de propiedades moleculares y datos de afinidad por el receptor para moléculas conocidas, sin tener en cuenta la estructura de dicho receptor (49).

A menudo se combinan las aproximaciones basadas en la estructura y en ligandos, de manera que se intentan superar las limitaciones particulares de cada uno de estos métodos; no sólo a través de la comparación/complementación de los resultados

obtenidos por cada uno de ellos, sino también incorporando la información procedente de uno en la metodología del otro. Además, desde un punto de vista teórico, se sigue avanzando en la comprensión de las interacciones proteína-ligando, aunque todavía los métodos no se encuentran lo suficientemente desarrollados. Básicamente, el problema reside en la implementación de modelos físicos válidos para analizar en un tiempo asequible cientos de miles de posibles compuestos (49).

1.3.6 Modelación de la actividad analgésica

Muchos investigadores se han enfocado en el uso de métodos computacionales para la predicción de la actividad biológica. Con este objetivo emplean bases de datos compuestas por diferentes moléculas a las cuales se les ha determinado la actividad de interés, ejemplo de esto son los estudios QSAR.

La modelación de la actividad analgésica se ha desarrollado a través de diversos métodos computacionales. Dentro de los estudios de relación estructura actividad, el análisis de regresión ha sido utilizado para la predicción de la actividad antiinflamatoria–analgésica de 11 compuestos derivados del selenotiazol (55). Además se han empleado estudios HQSAR para predecir la actividad analgésica-antiinflamatoria de 20 derivados del naproxeno y diclofenaco (56). Se han usado los descriptores topológicos con vistas a evaluar la actividad analgésica “*in silico*” (57) y métodos de análisis comparativo de campos moleculares (CoMFA) e índices de similitud estructural (CoMSIA) para 26 análogos del orvinol (58), así como 49 compuestos derivados del ácido gálico (59). Otros investigadores han empleado el *Docking* para la modelación de la actividad analgésica, a través del uso de diversos software como: *internal coordinate mechanics* (ICM)-Pro (60) y enfocados a dianas farmacológicas como la ciclooxigenasa 1 y 2 (61).

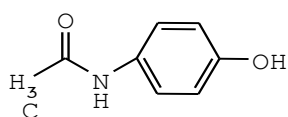
En la Universidad Central “Marta Abreu de las Villas” se desarrolló el programa TOMOCOMD CARDD que permitió el desarrollo de modelos de clasificación de nuevas moléculas analgésicas empleando una base de datos obtenida a partir del *Negwer Handbook* y *Merck Index* obteniéndose modelos que permitieron el cribado virtual de

bases de datos de compuestos orgánicos de origen natural y sintético (62, 63). Teniendo en cuenta el interés de continuar la búsqueda de nuevas moléculas analgésicas y las posibilidades que brinda el software WEKA de libre distribución en el presente trabajo se desarrollaran árboles de clasificación con vistas al cribado de nuevas moléculas.

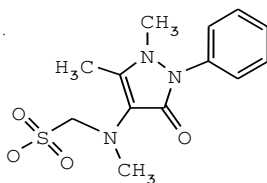
Capítulo 2. Materiales y Métodos.

2.1 Base de datos de compuestos analgésicos

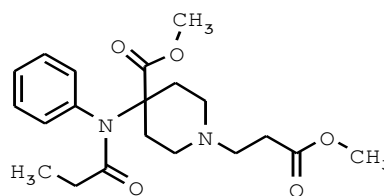
La base de datos utilizada en este trabajo está formada por 1128 compuestos provenientes de *Negwer Handbook* y *Merck Index*. Los compuestos activos son 560, dentro de los cuales están incluidos representantes de cada familia de fármacos analgésicos con diversos modelos estructurales y mecanismos de acción. El resto de los compuestos está representado por 568 estructuras que tienen diferentes usos clínicos y fueron seleccionadas como inactivas al no disponer de reportes de estudios de actividad analgésica. De este conjunto se seleccionaron al azar algunos representantes de cada actividad farmacológica. Estos fármacos incluyen, antivirales, antihipertensivos, vasodilatadores, antineoplásicos, cardiotónicos, antihistamínicos, sedativos, antidepresivos, etc. Está claro que la declaración de estos compuestos como 'inactivos' no garantiza que alguno de ellos pueda presentar alguna actividad analgésica aún no detectada. En ambos casos (compuestos activos e inactivos) fue considerada la diversidad estructural de las moléculas (observada en la Fig. 1) como un objetivo importante para asegurar la calidad del estudio QSAR.



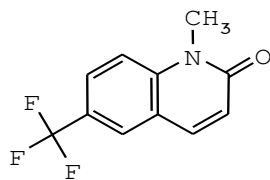
Paracetamol



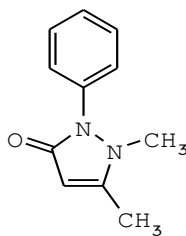
Remifentanil



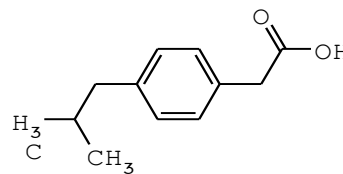
Dipyrone



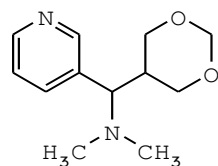
Flucarbriil



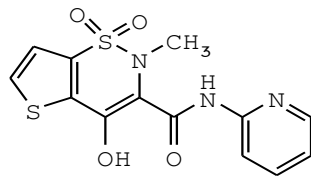
Phenazone



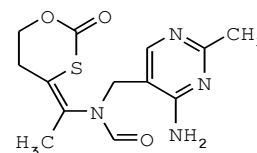
Ibufenac



Doxipicomine hydrochloride



Cycotiamine



Tenoxicam

Figura 1: Diversidad Estructural de la data de analgésicos.

2.1.1 Cálculo de los descriptores moleculares. DRAGON

El software DRAGON (Figura 2) ha sido concebido para proporcionar al usuario una variedad de descriptores moleculares derivados de diferentes representaciones moleculares, lo que permite al usuario elegir los descriptores moleculares que son más adecuados para su investigación específica (64). Mediante el uso de este software fueron calculados 3224 descriptores moleculares. El DRAGON contiene descriptores moleculares simples derivados al contar algunos tipos de átomos o fragmentos estructurales en la molécula, otros derivados de algoritmos aplicados a una representación topológica, generalmente denominados descriptores topológicos o 2D (65), y descriptores moleculares derivados de una representación geométrica llamados descriptores geométricos o 3D. Ejemplo de estos descriptores calculados son: descriptores constitucionales (0D); descriptores unidimensionales (1D) como Conteo de Grupos Funcionales y Fragmentos Centrados en átomos; descriptores bidimensionales (2D) como los Descriptores Topológicos, Conteo del Camino Molecular, Índices de conectividad, Índices de información, Autocorrelaciones 2D, Índices Topológicos de Carga, Índices basados en autovalores, entre otros; descriptores tridimensionales (3D) como los Perfiles Moleculares de *Randic*, Descriptores Geométricos, *RDF*, *3D-MoRSE*, *WHIM* y *GETAWAY*; y otros como los Descriptores de carga y Propiedades moleculares (66).

Luego de calcular los descriptores se realiza una proceso de filtrado, con el objetivo de reducir el número de los mismos y conservar los descriptores que más se ajustan al estudio que se está desarrollando. De este modo se excluyen:

- Variables constantes: los descriptores con una desviación estándar inferior a 0,0001 o todos los valores faltantes.
- Variables casi constantes: los descriptores con un solo valor diferente de los restantes.
- Correlación de pares: uno de los dos descriptores con un coeficiente de correlación igual o superior al valor de umbral seleccionado; en este caso el valor límite fue de 0.90. Para cada par de descriptores correlacionados, se excluye el que muestra la correlación de par más alta con los otros descriptores.



Figura 2. Software DRAGON 5.5 utilizado para calcular los descriptores moleculares.

2.1.2 Diseño de las series de entrenamiento y predicción

Posteriormente se dividió la base de datos inicial para el desarrollo de los modelos con vista a la predicción de la actividad. En este sentido se siguió la metodología empleada en estudios anteriores, en los mismos se realizó un Análisis de Conglomerados Jerárquicos (CAs) a los compuestos de las series activas e inactivas, donde se evidenció la diversidad estructural de la base de datos, a partir de su distribución en diferentes grupos. Esto es posible teniendo en cuenta que este tipo de técnica agrupa los objetos (casos) de acuerdo a la similitud entre ellos. Este procedimiento fue realizado a través del software STATISTICA versión 10.0 (figura 3) que permite el análisis comprensivo de datos integrados y contiene gráficos, dirección de la base de

datos y posee un sistema de desarrollo de aplicación personalizada que ofrece una amplia selección de elementos para el análisis estadístico y procedimientos analíticos avanzados (67).



Figura 3. Software Statistica versión 10.0

Para obtener una división adecuada de la base de datos en Serie de Entrenamiento (SE) y Serie de Predicción (SP) se realizaron dos análisis de *cluster* de partición (no-jerárquicos) llamados también *k*-MCA. La idea principal de este procedimiento consistió en hacer una partición de las series activas e inactivas en diferentes subconjuntos de compuestos estadísticamente representativos. Este procedimiento asegura que cualquiera de estos subconjuntos (determinado por los conglomerados derivados del *k*-MCA) estará representado en ambas series (entrenamiento y predicción).

2.2 Obtención y Validación del Modelo de Clasificación

Para la obtención del modelo de clasificación fue seleccionado el software WEKA. Como método Evaluador de Atributos se eligió el *Wrapper Subset Evaluator* y dentro de este se evaluó un clasificador: *Trees J48*. En este clasificador se utilizaron cinco métodos diferentes de búsqueda: *Best First*, *Genetic Search*, *Linear Forward*, *Rank Search* y *Subset Size*.

2.2.1 Obtención del Modelo. WEKA

El paquete WEKA (Figura 4) contiene una colección de herramientas de visualización y algoritmos para análisis de datos y modelado predictivo, unidos a una interfaz gráfica de usuario para acceder fácilmente a sus funcionalidades (68).

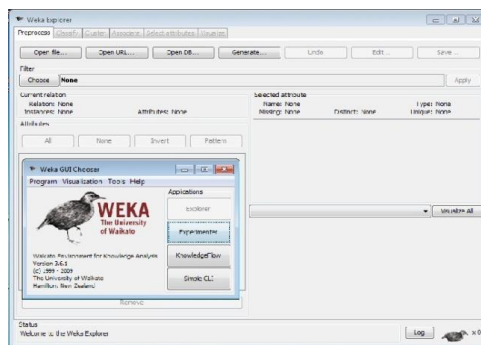


Figura 4. Plataforma de software para el aprendizaje automático y la minería de datos escrito en Java.

El método de "envoltorio" o *Wrapper Subset Evaluator* envuelve un clasificador en un ciclo de validación cruzada: busca entre todos los atributos y utiliza el clasificador para encontrar un buen conjunto de estos. La búsqueda puede ser hacia adelante, hacia atrás o bidireccional, comenzando desde cualquier subconjunto.

2.2.2 Árbol de Clasificación J48

En este estudio se empleó el árbol de clasificación J48 implementado en el WEKA el cual constituye un algoritmo, cuyo parámetro más importante es el factor de confianza (c) que controla el tamaño del árbol de decisión construido. Se variaron parámetros tales como el número de casos en cada hoja, este parámetro para nuestro estudio fue de dos (68, 69).

2.3 Calidad estadística y Validación de los modelos QSAR.

La calidad de los modelos de clasificación se chequeo a partir de los valores obtenidos para los parámetros estadísticos recomendados en la literatura médico-estadística (57). En este sentido la calidad de los modelos obtenidos fue igualmente expresada a través del coeficiente de correlación de Matthews (C), la exactitud (Q), la sensibilidad, la especificidad y la relación de falsos positivos (RFP) (70).

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

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

$$\text{Sensibilidad} = 100 * VP / (VP + FN)$$

$$\text{Especificidad} = 100 * VP / (VP + FP)$$

$$\text{RFP} = 100 * FP / (FP + VN)$$

Donde VP y VN son los verdaderos positivos y negativos, respectivamente y FP y FN son los falsos positivos y negativos, correspondientemente.

Para probar la robustez de los modelos y demostrar el poder predictivo de los mismos, fueron efectuados ejercicios de validación interna y externa. En la validación interna, se llevó a cabo una estrategia de validación cruzada (VC) empleando la estrategia *10-fold-cross validation*. Esta estrategia consiste en dejar el 10% de los compuestos fuera generando nuevos modelos con el 90% restante de la serie de entrenamiento y luego evaluar el 10% que se extrajo en primer lugar. Este proceder se repite hasta que todos los casos han sido retirados una vez y predichos por el modelo generado con las respectivas bases de datos reducidas. Finalmente se reportan como valores de los estadísticos el promedio de todas las iteraciones.

La condición necesaria y suficiente para decir que un modelo tiene un adecuado poder predictivo es a través de una validación externa. Para ello empleamos la SP conformada a partir del análisis de conglomerados, la cual fue evaluada para el modelo obtenido con el árbol de clasificación. De igual manera que para la SE reportamos los parámetros estadísticos antes descritos para la SP (70).

2.4 Cribado Virtual

Los ejercicios de validación descritos para los modelos de clasificación, permiten probar su eficacia para la aplicación de los mismos en la identificación y/o selección de nuevos compuestos con actividad analgésica. Los modelos obtenidos por las técnicas descritas fueron empleados en el cribado virtual de ocho moléculas y 12 productos de la hidrólisis de estas, derivadas de *Boldoa purpurascens* Cav aisladas en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad Central Marta Abreu de las Villas. Las moléculas aisladas de la planta *Boldoa purpurascens*, también conocida como nitro blanco tienen efecto analgésico comprobado en extracto acuoso. Tres de estos compuestos fueron

sometidos posteriormente a ensayos “*in vivo*” teniendo en cuenta la disponibilidad de los mismos para medir la actividad analgésica.

2.5 Corroboración experimental *in vivo* de la actividad analgésica. Test de Placa Caliente

Modelo Biológico

Se emplearon ratones NMRI de ambos sexos provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorios con su correspondiente Certificado de Calidad.

Condiciones Experimentales:

Los animales fueron proporcionados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Los mismos fueron mantenidos durante 7 días en adaptación a las condiciones experimentales con una temperatura ambiente, humedad relativa de $60\pm 5\%$ y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas. Recibieron alimentación controlada (Alimento concentrado EMO 1002 en forma de pellet con su correspondiente Certificado de Calidad emitido por el CENPALAB (Anexo 1), y agua potable apta para consumo *ab libitum*. Se alojaron en jaulas de polietileno con rejilla metálica a razón de 6 animales por jaula. Fueron privados de alimentación 18 horas antes de iniciar el experimento y de agua potable 1 hora antes.

2.5.1 Determinación de la actividad analgésica “*in vivo*”. Test de Placa Caliente.

El material biológico a evaluar fueron ratones NMRI, con un peso en el rango de 18-30 g y de ambos sexos. Se usó como disolvente agua destilada a fin de solubilizar los compuestos evaluados, usando la misma como control negativo y como control positivo el compuesto analgésico de referencia (morfina 7.5 mg/kg). La vía de administración en el caso de la morfina fue intraperitoneal (i.p.), usando para ello jeringuillas de 1-ml. Los compuestos de origen natural y el vehículo fueron administrados por vía oral. El agente algésico empleado: placa caliente (*Hot-plate*) Marca UGO BASILE a $55 \pm 10^{\circ}\text{C}$. El tiempo de reacción fue medido con un cronómetro.

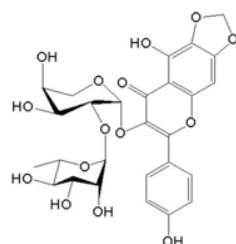
Grupos control:

Morfina a 7.5 mg/kg, i.p

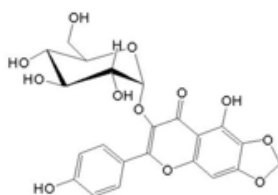
Vehículo Agua p.o

Grupos experimentales:

Compuesto 1



Compuesto 3



Compuesto 4

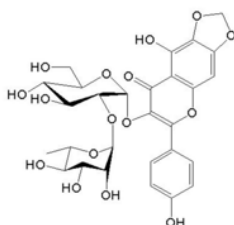


Figura 5. Compuestos evaluados en el Test de Placa Caliente.

Proceder experimental:

Los compuestos a evaluar y el vehículo se administran por vía oral y el fármaco de referencia por vía intraperitoneal (Morfina) en un volumen de 0.25 ml. Como agente analgésico se emplea un aparato termostático con una temperatura de $(55 \pm 10^\circ\text{C})$, provisto de un cilindro de plástico transparente que permitió la observación de incomodidad del animal (lamerse las patas traseras e incluso saltar). Cada animal fue su propio control. Antes del tratamiento se realizaron dos mediciones espaciadas de 10

min y se calculó la media, considerando este valor como tiempo de reacción (segundos) antes del tratamiento, constituyendo así el tiempo antes (T antes). Luego de administrar el compuesto a evaluar se efectuaron varias mediciones espaciadas de 30 min, hasta los 120 min, constituyendo estos valores (seg) el tiempo después (T después), denominado el mismo como tiempo que tarda el animal en reaccionar al dolor. Para cada grupo se calculó la media de los tiempos de reacción expresando los porcentajes de analgesia aplicando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Analgesia} = \frac{(T \text{ después} - T \text{ antes})}{T \text{ antes}} \times 100.$$

2.5.2 Eutanasia

La eutanasia se realizó a las 24 horas de culminado el estudio, los animales fueron sacrificados, anestesiados con éter dietílico y posterior dislocación cervical, cumpliendo con los procedimientos internacionales bioéticos establecidos para ello (71).

2.5.3 Consideraciones éticas

Todos los investigadores respetaron los principios éticos que rigen la experimentación animal, garantizando el bienestar y la protección de los mismos, tanto por la sensibilidad humana ante el sufrimiento animal, como por garantizar la validez de los resultados obtenidos, cumpliéndose con las Normas de Bioética y Bioseguridad establecidas (72-74).

Capítulo 3 Resultados y Discusión.

En este capítulo se presentan los resultados de la generación de un modelo de clasificación (árbol de clasificación) a partir de la base de datos obtenida del *Martin Negwer y Merck Index*, el cálculo de DMs y la identificación de nuevos compuestos potencialmente analgésicos mediante el cribado virtual de bases de datos y compuestos de origen natural. Finalmente se evalúa experimentalmente “*in vivo*” tres de los compuestos que fueron predichos en el cribado virtual.

3.1 Gestión de la data.

La calidad de los métodos QSAR dependen de forma crítica de la selección de los compuestos que son utilizados como serie de entrenamiento (SE) para construir el modelo de clasificación, resultando importante garantizar la adecuada diversidad estructural de la data; lo cual permite abarcar, en la medida de las posibilidades, la mayor amplitud del espacio experimental. Se calcularon 3224 DMs en el software DRAGON, luego de haber realizado un proceso de filtrado, con el objetivo de reducir el número de los mismos y conservar los descriptores que más se ajustan al estudio que se está desarrollando trabajamos con un total de 1974 DMs. Posteriormente se realizó un análisis de conglomerados (AC) implementado en el paquete de procesamiento STATISTICA 10.0, como vía de evaluación de la distribución y diversidad estructural existente dentro de los grupos de observaciones activas e inactivas respectivamente.

Del total de 1128 compuestos, la base de datos quedó dividida en 560 activos y 568 inactivos. Los compuestos activos incluyeron los diferentes mecanismos de acción y patrones estructurales. Los compuestos activos e inactivos se dividieron a su vez en diferentes subconjuntos mediante dos análisis de conglomerados del tipo k-MCA (siglas en inglés de Análisis de Conglomerados de k-Medias, también llamado análisis de agrupaciones) como se muestra en la Figura 6.

El primer k-MCA I a la data de compuestos analgésicos permitió la división de compuestos activos en ocho conglomerados y otro análisis del mismo tipo k-MCA II a los compuestos inactivos permitió dividirlos en 12 conglomerados. Después de esto, se seleccionaron los compuestos de la SE y SP, tomando de forma aleatoria compuestos

de cada uno de los conglomerados. Del total de 1128 compuestos, se escogieron de forma aleatoria dentro de cada conglomerado para formar la SE la cual quedó conformada por 839 compuestos, de ellos 417 activos (analgésicos) y 422 inactivos. La gran variabilidad estructural de esta SE seleccionada posibilita el descubrimiento de nuevos compuestos líderes no presentes dentro de la base de datos. Los compuestos restantes, 143 activos y 146 inactivos, fueron utilizados para conformar la SP. Estos 289 compuestos no se usaron nunca para la confección de los modelos, además se tuvo en cuenta que la SP constituyera un 25 o 30 % del total de la base de datos. De este modo quedó asegurada la representatividad de elementos del mismo dominio en los subconjuntos obtenidos en cada caso.

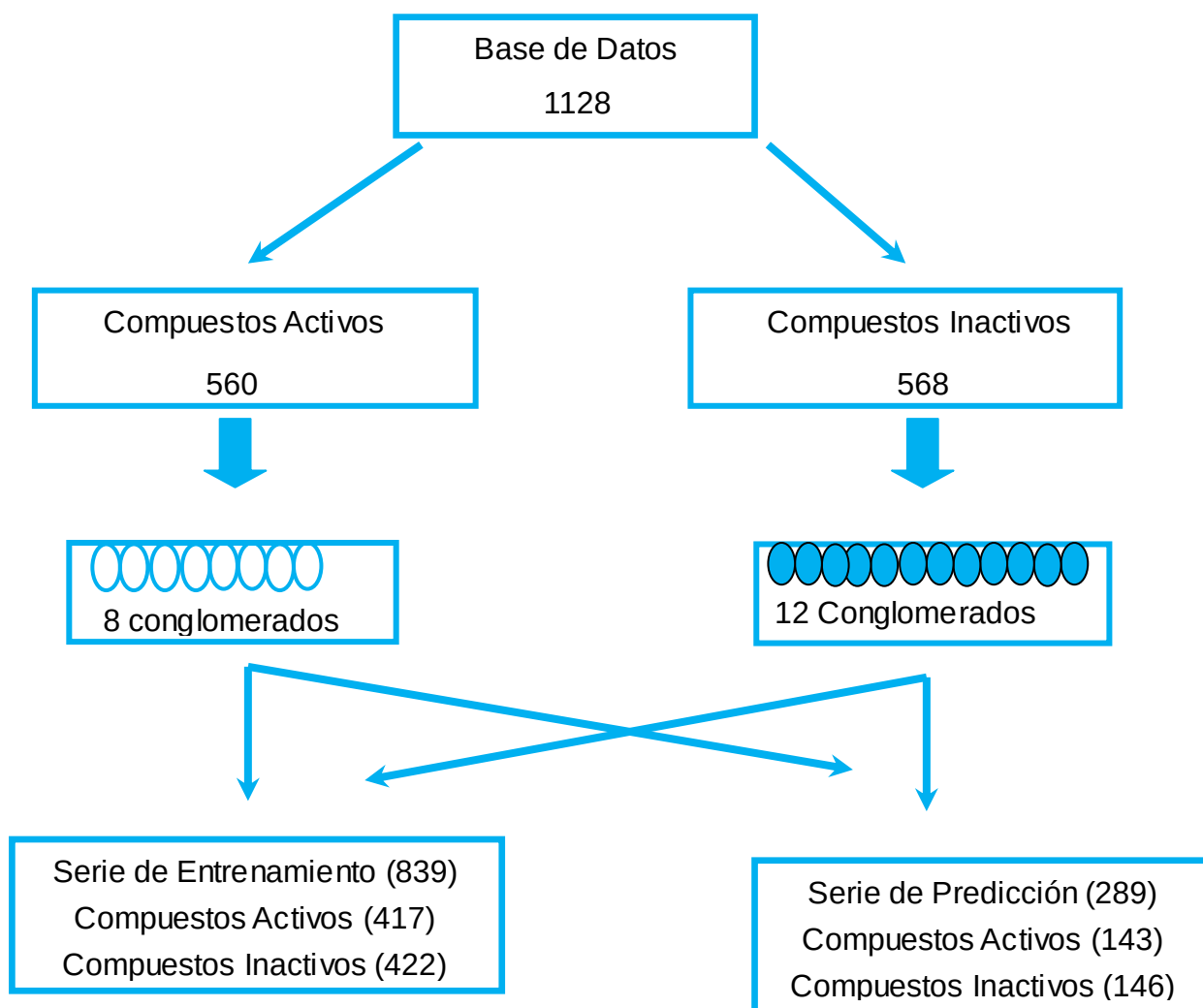


Figura 6. Distribución de la base de datos en serie de entrenamiento y predicción.

Finalmente la base de datos quedo conformada por 1044 compuestos: 513 moléculas activas y 531 inactivas, a partir de la exclusión de 84 compuestos *outliers*. El porcentaje comúnmente aceptado de *outliers* es de menos de un 10%. En el caso del presente trabajo fue del siete por ciento quedando este por debajo del límite establecido en la literatura especializada (75, 76).

3.2 Obtención del modelo: Árbol de Clasificación.

Tras la selección de atributos en WEKA con el empleo de varios evaluadores, filtros y métodos de búsqueda específicos a partir de los descriptores calculados en el DRAGON; se realizó la reducción de las variables obteniendo seis variables. Las variables empleadas fueron: EEig01d (autovalor de orden 1 de la matriz de adyacencia de enlace ponderadas con momento dipolar), Espm11d (momento espectral orden 11 de la matriz de adyacencia de enlace ponderadas con momento dipolar), Espm12d (momento espectral orden 12 de la matriz de adyacencia de enlace ponderadas con momento dipolar), G(N..O) (suma de las distancias geométricas entre el nitrógeno-oxígeno), C-0.40 (descriptor de fragmento centrado en átomo de carbono) y O-058 (descriptor de fragmento centrado en átomo de oxígeno).

Para obtener el árbol de clasificación se empleó la serie de entrenamiento; esta permitió '*enseñar*' al modelo a reconocer los casos según su pertenencia a activos o inactivos. Con el objetivo de optimizar el modelo, se exploraron varias opciones variando los parámetros siguientes: factor de confianza utilizado para la poda y número mínimo de instancias por hoja. El árbol final obtenido tiene un factor de confianza de 0.3 y el número mínimo de casos por hoja fue de dos, como se muestra en la figura 7. Luego se evaluó el desempeño del modelo en la serie de predicción (estos compuestos son nuevos para el modelo) y en dependencia de cómo se clasifiquen se estima si el modelo tiene, o no, un adecuado poder predictivo.

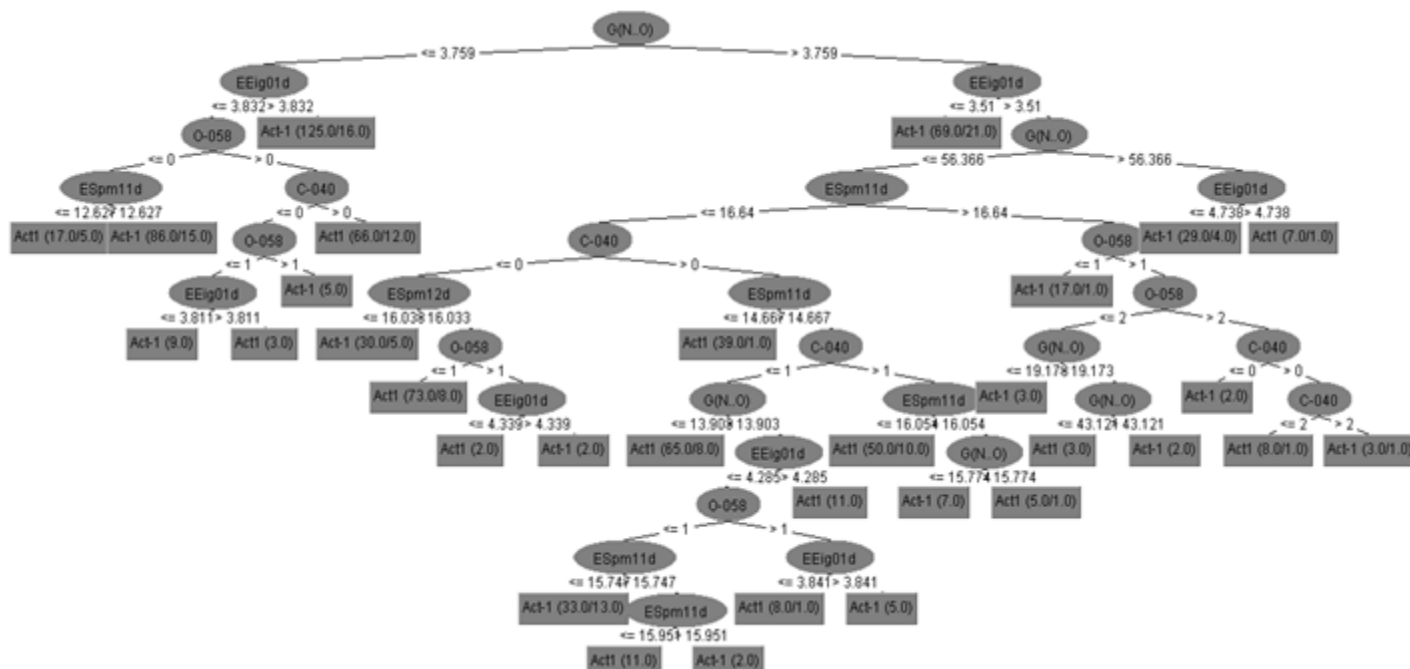


Figura 7. Árbol de clasificación.

En la Tabla 2 se muestran los parámetros estadísticos del desempeño del árbol J48 para las series de entrenamiento, predicción y la validación cruzada (VC). El parámetro exactitud se refiere a la cantidad de compuestos que el modelo clasificó correctamente siendo de un 84.69 % para la SE y 83.40% para la SP. El modelo mostró valores de sensibilidad de 80.80% y 82.90% para SE y SP respectivamente; este indicador representa el número de compuestos activos que el modelo reconoce como activos, es decir de cada 10 compuestos activos clasifica bien ocho. La especificidad se refiere a aquellos compuestos que el modelo clasificó como activos y que realmente son activos, para la SE de 87.43 % y 82.20 % en la SP. La diferencia entre los valores de cada serie es pequeña, correspondiéndose con lo que se puede encontrar en publicaciones internacionales especializadas en la temática.

La razón de falsos positivos hace referencia a la probabilidad de seleccionar un compuesto negativo (no analgésico) como positivo (analgésico), o sea un falso activo, en la serie de entrenamiento fue de 11.47% mientras que para la serie de predicción fue de 16.15%. Aunque es deseable que el número de los compuestos falsos activos sea lo más pequeño posible se debe tener en cuenta que los compuestos empleados

como inactivos, en este estudio, en realidad solo son compuestos a los que no se les conoce actividad como analgésica. Es decir, que algunos de los compuestos inactivos ‘*erróneamente*’ predichos como activos pueden ser compuestos que tengan la acción analgésica pero que aún no se han identificado como tales. A su vez, el CCM (Coeficiente de correlación de Matthews) cuantifica la fuerza de la relación lineal entre los descriptores moleculares y las clasificaciones (los valores están sobre 0.69 y 0.66), proporcionando a menudo una evaluación mucho más equilibrada de la predicción que, por ejemplo, los porcentajes globales de clasificación correcta.

Como validación interna se empleó la estrategia *10-fold-cross validation*, la cual realiza perturbaciones sucesivas del 10% a la serie de entrenamiento hasta que todas las instancias sean predichas al menos una vez. Como se puede observar en la tabla 2 los parámetros de la validación interna del modelo mostró valores ligeramente inferiores a los de la serie de entrenamiento y predicción; la exactitud fue de 75.15% mientras los valores de sensibilidad y especificidad mostraron valores alrededor de 74% y 75% respectivamente; teniendo esto en cuenta se puede decir entonces que el modelo es estable y robusto.

Tabla 2. Parámetros estadísticos para el modelo J48 (Árbol de clasificación).

J48	CCM	Exactitud (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad(%)	RFP(%)
Entrenamiento	0.696	84.693	80.808	87.432	11.471
Predicción	0.667	83.401	82.906	82.203	16.154
VC	0.503	75.157	73.99	75.515	23.691

3.3 Cribado Virtual

El modelo se empleó en el cribado virtual de compuestos aislados de *Boldoa Purpurascens*. Se cribaron ocho compuestos aislados y los 12 productos de la hidrólisis de estos, para un total de 20 compuestos. En la tabla 3 se observan los resultados del cribado de las moléculas. El modelo predijo que 10 compuestos presentan actividad como potenciales analgésicos.

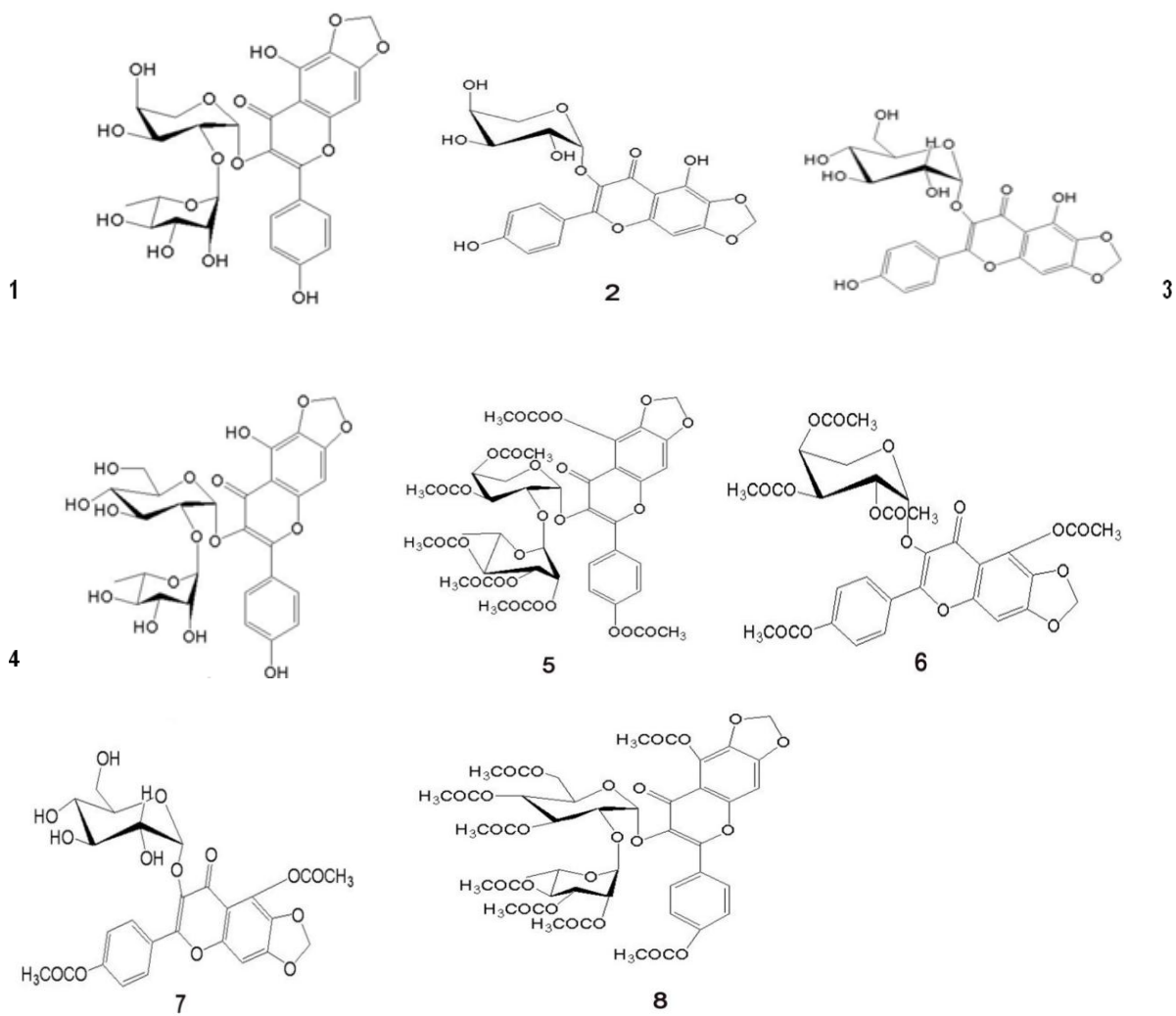
Tabla 3 Resultados del cribado de las moléculas.

Compuestos	Predicho	Compuestos	Predicho
1	Inactivo	11	Activo
2	Inactivo	12	Activo
3	Activo	13	Activo
4	Inactivo	14	Activo
5	Inactivo	15	Inactivo
6	Inactivo	16	Inactivo
7	Activo	17	Activo
8	Activo	18	Inactivo
9	Inactivo	19	Activo
10	Activo	20	Inactivo

Todos los compuestos identificados “*in silico*” como potenciales analgésicos deben ser evaluados con estudios “*in vitro*” e “*in vivo*” para corroborar experimentalmente esta actividad. El empleo de estas herramientas computacionales permiten una identificación rápida con una alta probabilidad de que sean potenciales analgésicos generando un gran ahorro de recursos con respecto a los métodos tradicionales ya que solo se evaluarán aquellos compuestos predichos como activos.

Anteriormente fue empleado el programa TOMOCOMD CARDD para el cribado de bases de datos de compuestos de síntesis con una buena correlación entre los resultados teóricos y de evaluación experimental. Por otra parte el software WEKA ha permitido la selección/identificación de promisorios antileishmaniasicos empleando varios métodos de clasificación incluyendo los arboles de clasificación (70).

Moléculas base.



Productos de hidrólisis

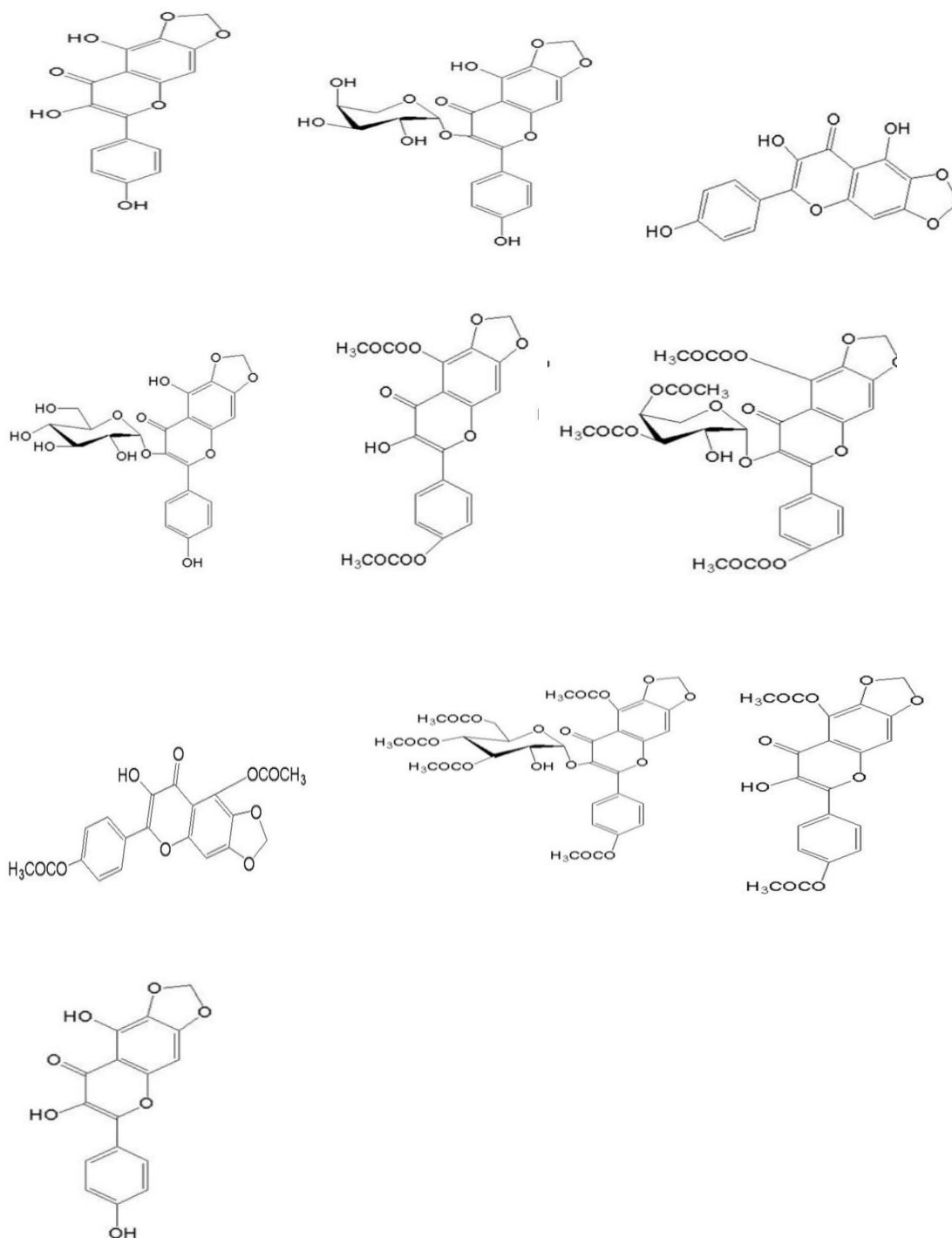


Figura 8 Moléculas base con sus productos de hidrólisis.

3.4 Corroboración experimental in vivo. Test de Placa caliente

En la tabla 4 aparecen los valores de tiempo antes y tiempo de reacción (tiempo después) para cada compuesto evaluado (1,3 y 4), morfina y vehículo a las dosis de 50, 100 y 150 mg/kg. Se calculó la desviación estándar y el por ciento de analgesia en cada caso.

Tabla 4. Tiempo de reacción en el modelo de Placa Caliente para los compuestos aislados de *Boldoa purpurascens* Cav, Morfina y el vehículo.

		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Morfina	7.5	7.84 ± 0.24	18.66 ± 0.45	16.38 ± 0.40	14.56 ± 0.41	12.78 ± 0.21
Vehículo	100	8 ± 0.55	9.06 ± 0.20	8.88 ± 0.26	8.98 ± 0.37	9 ± 0.25
DMR 1	50	7.08 ± 2.98	9.56 ± 4.20*	8.98 ± 3.83*	9.38 ± 3.89*	11.46 ± 4.94*
DMR 1	100	6.28 ± 2.91	7.52 ± 3.12	9.48 ± 3.88*	11.38 ± 4.75*	12.42 ± 5.30*
DMR 1	150	5.88 ± 2.48	9.72 ± 4.13*	10.94 ± 4.59*	11.7 ± 4.82*	14 ± 5.83*
DMR 2	50	6.76 ± 2.94	9.42 ± 3.97*	10.6 ± 4.37*	11.44 ± 4.70*	14.38 ± 5.88*
DMR 2	100	6.21 ± 2.55	9.68 ± 4.02*	12.98 ± 5.34*	14.1 ± 5.77*	15.26 ± 6.27*
DMR 2	150	6.4 ± 2.70	9.84 ± 4.15*	13.48 ± 5.56*	14.28 ± 5.84*	14.76 ± 6.03*
DMR 3	50	7.65 ± 3.35	11.12 ± 4.76*	12.38 ± 5.21*	13.14 ± 5.52*	13.58 ± 5.71*
DMR 3	100	5.79 ± 2.37	12.28 ± 5.05*	13.16 ± 5.44*	14.18 ± 5.88*	15.1 ± 6.35*
DMR 3	150	5.8 ± 2.39	12.5 ± 5.12*	13.26 ± 5.44*	14.32 ± 5.87*	15.78 ± 6.52*
DMR 4	50	6.06 ± 2.92	9.04 ± 3.78*	10.82 ± 4.42*	11.38 ± 4.65*	11.94 ± 4.88*
DMR 4	100	5.57 ± 2.33	9.5 ± 4.00*	11.12 ± 4.55*	11.62 ± 4.76*	12.16 ± 4.97*
DMR 4	150	5.48 ± 2.34	9.54 ± 3.95*	11.18 ± 4.57*	11.9 ± 4.86*	12.2 ± 4.98*

En las figuras 9, 10 y 11 se muestran los por cientos de analgesia para los compuestos aislados de *Boldoa purpureascens* (1, 3 y 4), Morfina (fármaco de referencia) y vehículo. A una dosis de 50 mg/kg (Figura 9) se observan diferencias entre todos los compuestos y el vehículo. A los 60 minutos existen diferencias significativas entre el compuesto 1 y el resto, a esta dosis, así como entre los compuestos 3 y 4. El compuesto 4 no presenta diferencias con respecto a la Morfina a esta dosis a los 90 min. Los compuestos, 3 y 4 superan a la Morfina a los 120 min.

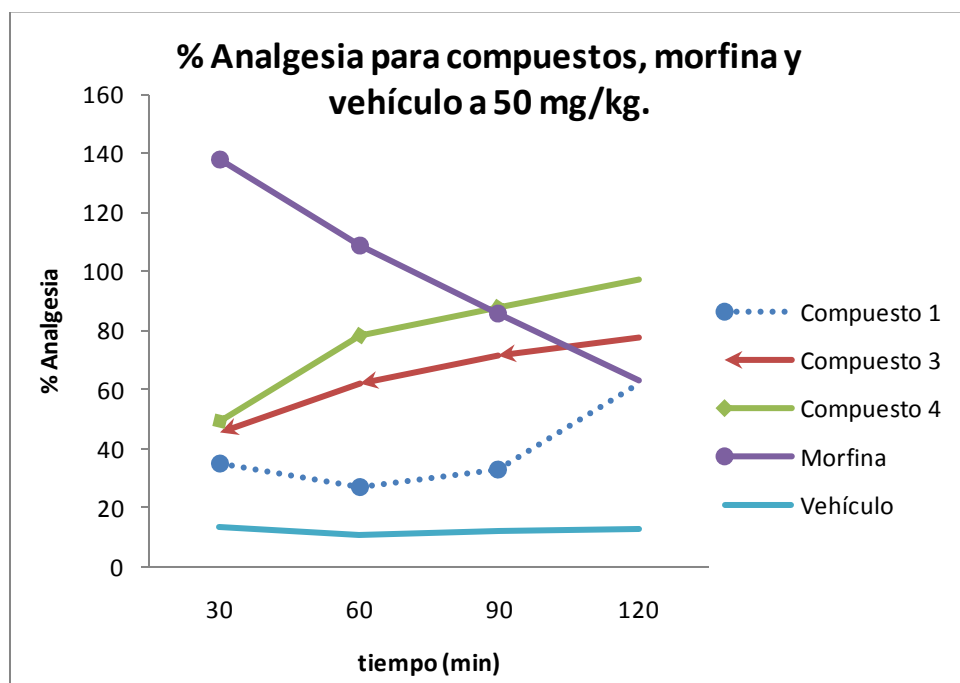


Figura 9. Por ciento de analgesia para compuestos, morfina y vehículo a 50 mg/kg.

A una dosis de 100 mg/kg (Figura 10) todos los compuestos presentan diferencias significativas con respecto al vehículo, excepto el 1 a los 30 min. Con respecto a la Morfina (fármaco de referencia) los compuestos 3 y 4 presentan por cientos de analgesia superiores a partir de los 90 min. (126.3 y 99.5% respectivamente). A dicha dosis se aprecian diferencias significativas entre el compuesto 3, 1 y 4.

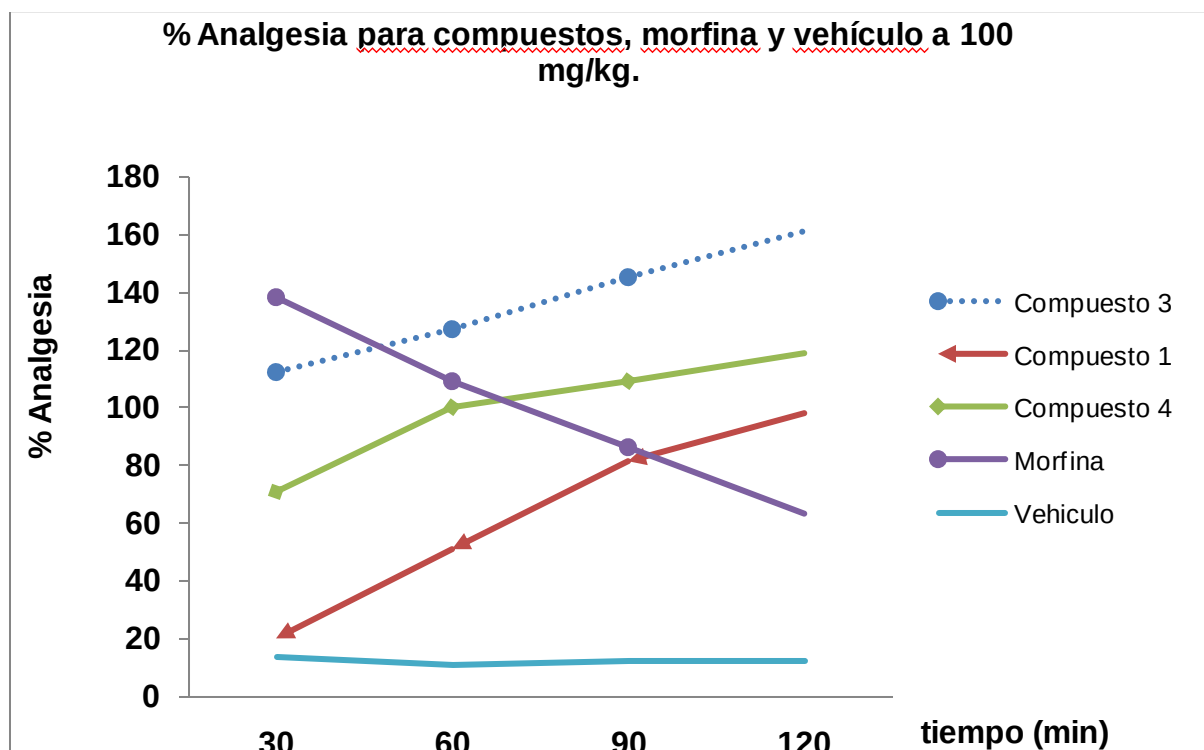


Figura 10. Por ciento de analgesia para compuestos, morfina y vehículo a 100 mg/kg.

En la figura 11, se presentan los por cientos de analgesia de los compuestos evaluados para una dosis de 150 mg/kg. Todos estos compuestos presentan diferencias a todos los tiempos con respecto al vehículo. A partir de los 60 min el compuesto 3 supera la Morfina (fármaco de referencia) y el compuesto 4 mantiene un comportamiento similar a este tiempo. El compuesto 3 muestra el mayor por ciento de analgesia (146,5) siendo significativamente superior al resto. Se aprecia a partir de los 90 min que todos los compuestos presentan por cientos de analgesia superiores a la morfina.

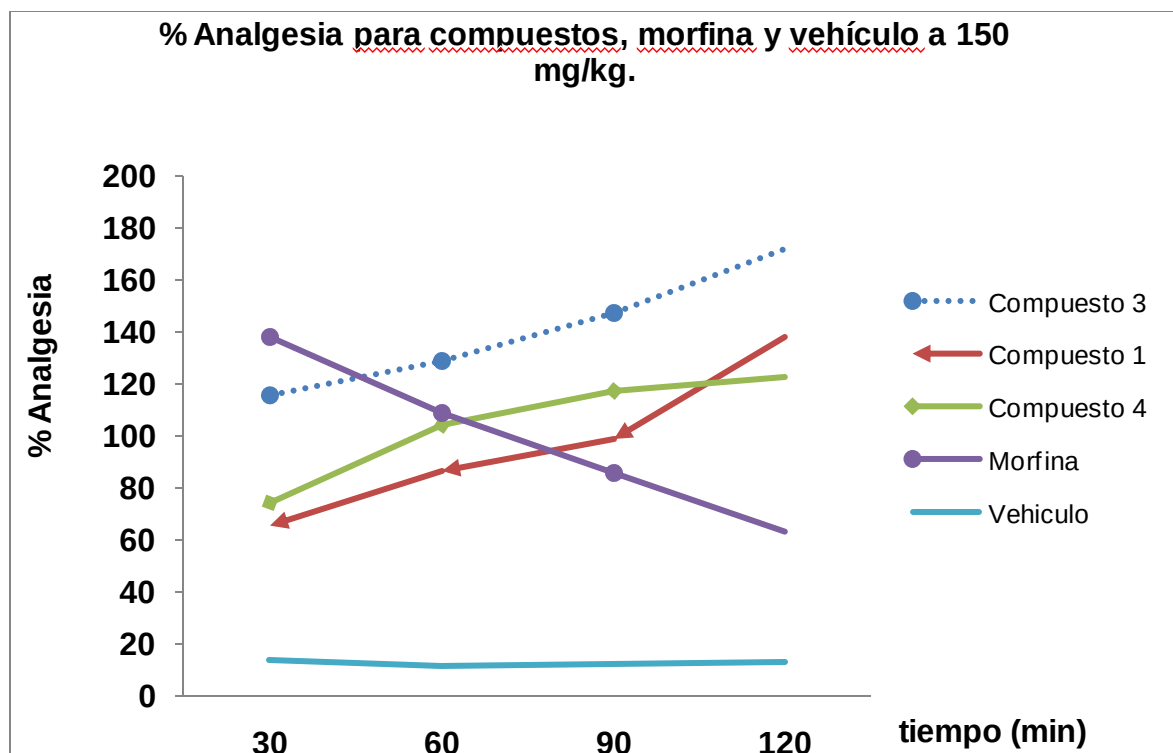


Figura 11. Por ciento de analgesia para compuestos, morfina y vehículo a 100 mg/kg.

A la dosis de 150 mg/kg se alcanza la mayor analgesia para todos los compuestos (1,3 y 4) con porcentos de analgesia de 138.09 %, 172.06 % y 122.6 % respectivamente. De forma general al comparar los tres compuestos de origen natural el compuesto 3 es el que alcanza un mayor efecto analgésico a la dosis de 150 mg/kg (172.06 %). Estos flavonoides constituyen nuevas estructuras aisladas a partir de la *Boldoa purpurascens* Cav, que pueden ser candidatos a fármacos analgésicos. Existen otros flavonoides aislados de esta planta pero son éstos los que resultan por vez primera con efectos analgésicos. Algunos flavonoides han mostrado efecto analgésico en diferentes modelos animales (77-79). En su estructura se evidencia la presencia de grupos hidroxilos y aromaticidad que resultan importantes para la actividad analgesica.

Se evidencia la buena correlación teórica con los resultados experimentales obtenidos. De esta manera quedan evidenciadas las potencialidades del software WEKA en la predicción de la actividad analgésica. No obstante, se hace necesaria la corroboración

in vitro para dilucidar el mecanismo de acción por el cual se explica el efecto analgésico observado.

Conclusiones

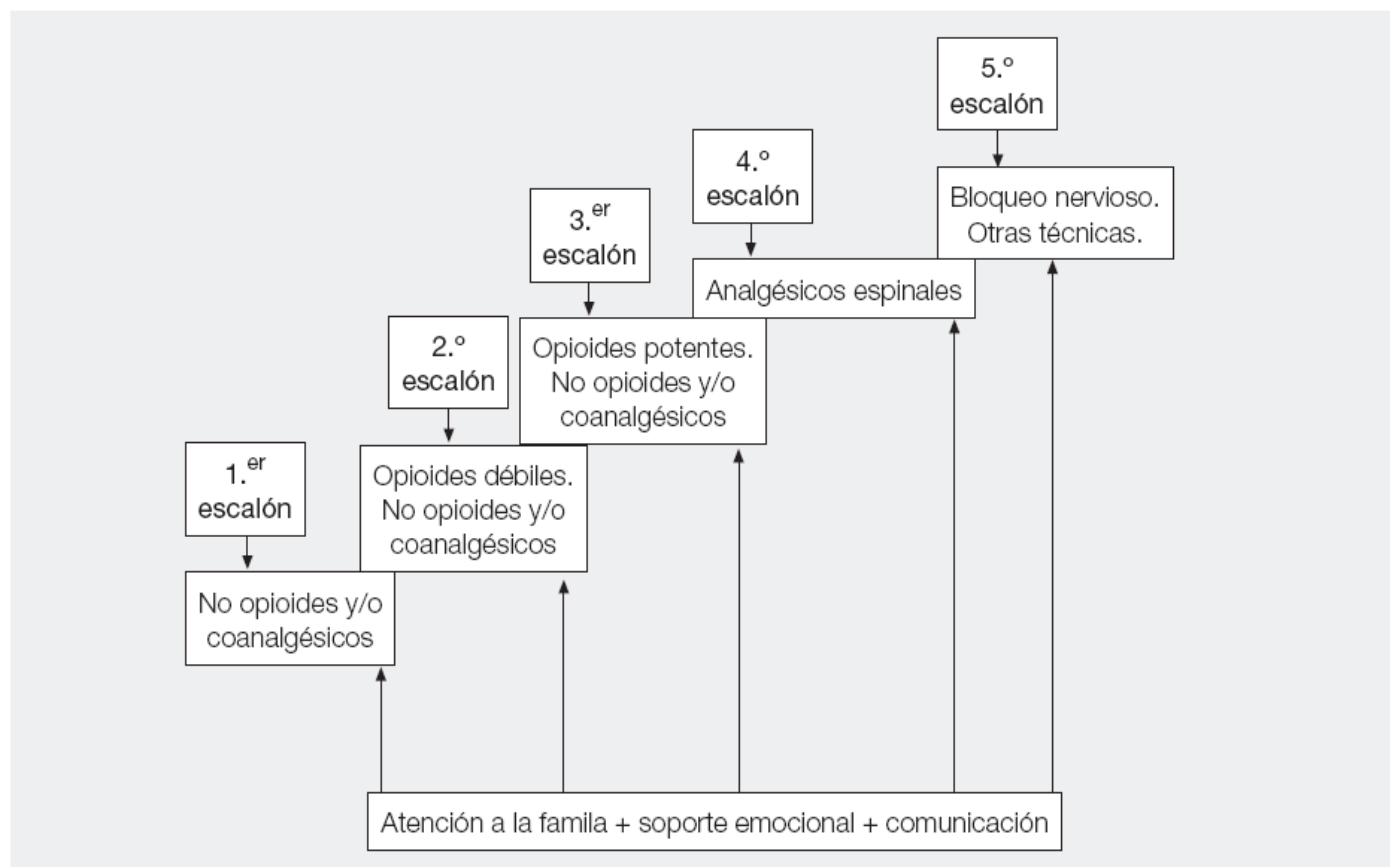
- ✓ Se obtuvo un modelo QSAR utilizando descriptores moleculares implementados en el programa WEKA con buenos parámetros estadísticos.
- ✓ Se validó el modelo empleando estrategias de validación interna y externa.
- ✓ Se realizó un cribado virtual a moléculas aisladas de *Boldoa purpuracens* identificándose 10 compuestos como prometedores analgésicos.
- ✓ Se demostró la actividad analgésica *in vivo* mediante el Test de Placa Caliente de tres de los compuestos identificados en el cribado virtual.

Recomendaciones

Evaluar experimentalmente los siete compuestos restantes identificados en el cribado virtual.

Anexos

Anexo 1. Escalera analgésica modificada para el tratamiento del dolor (OMS).



Anexo 2. Certificado de salud de roedores SPF. Salud y Zootecnia.

GC.CC.09.09 Dirección de Aseguramiento de la Calidad

Folio: 1 de 1

CERTIFICADO DE CALIDAD DE ROEDORES SPF. Salud y Zootecnia



CENPALAB
CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ROEDORES DE LABORATORIO

Especie	Banco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cajas
Ratón	BG1/ RG045	-	CP2/ RG057	Cenp: NMRI	07001811	4
Machos/Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición	Hora
75	75	180	13-15 g	3-4 sem Univ. Ctra. de Las Villas	13/2/11	2:30 pm

Dictamen Zootécnico e Inspección Clínica

Los animales en el momento de la expedición se encuentran clínicamente sanos, sus características morfológicas, fisiológicas y reproductivas se corresponden con la especificación de calidad de este producto. Proceden de una colonia con ambiente controlado y mantenidos en un sistema de producción intensivo aprobados para la línea; la alimentación se realiza con alimentos concentrados fórmulas **ALYco** EMO 1002 y EAO 1004 esterilizables a razón de 3.40 a 6 g diarios. Dicha producción se encuentra bajo las BPP y un Sistema de Gestión de la Calidad que garantiza el estado higiénico sanitario de los animales que se expiden.

Resultados de Bacteriología *

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Salmonella spp.	Cult/ Sert		X		13/10/10	Streptococcus pneumoniae	Cult/ Sert		X		13/10/10
Streptococcus β hemolítico	Cult/ Sert		X		13/10/10	Pasteurella pneumotropica	Cult/ ELISA		X		13/10/10
Bordetella bronchiseptica	Cult/ ELISA		X		13/10/10	Clostridium piliforme	Insp. Clínica		X		10/10
Corynebacterium kutscheri	Cultivo		X		13/10/10	Leptospira sp	ELISA		X		16/4/10
Haemobacter sp.	Cultivo		X		10/10	Cyrobacter freundii	Cultivo		X		10/10
Streptobacillus moniliformis	Cultivo		X		-	Mycoplasma pulmonis	Cult/ ELISA		X		13/10/10
Dermatofitos	Insp. Clínica/Cultivo		X		7/10/10						

Resultados de Parasitología *

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Endoparásitos	DIR-FLOT		X		6/10/10
Toxoplasma gondii	ELISA		X		28/5/10
Ectoparásitos	INSPECCIÓN		X		6/10/10

Resultados de Virología ** (Serología)

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Virus de la Hepatitis (MHV)	ELISA/IFA		X		10/5/10	Coniemiervirus inf. (LCM)	ELISA/IFA		X		-
Reovirus Reo Tipo 3 (REQ 3)	IFA		X		-	Sendai	ELISA/IFA		X		-
Encefalomyelitis (TEMV)	IFA		X		-	Polyoma	IFA		X		24/6/10
Pneumonia del ratón (PVM)	ELISA/IFA		X		10/5/10	Arterivirus (MAD)	ELISA/IFA		X		24/6/10
Virus diminuto del ratón (MVM)	ELISA/IFA		X		-	Citomegalovirus (MCMV)	IFA		X		24/6/10
Rotavirus (EDIM)	ELISA/IFA		X		-	Deshidrogenasa Láctica (LDH)	Test LDH Plasma		X		-
Ectromioma	ELISA/IFA		X		24/6/10	Virus K	IFA		X		24/6/10
Hantavirus	IFA		X		-	Virus Torneo (MTV)	IFA		X		-

* Según lo certificado por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los expedientes de la línea archivados en la Dirección de Calidad. Documento de referencia "Recomendaciones del monitoreo microbiológico para Roedores mantenidos y criados en condiciones controladas".

Válido a partir de Noviembre/2010 hasta Febrero/2011

Este certificado es el original que se elabora a partir de la liberación de la línea para su comercialización.

Cargo	Realizado por	Revisado por	Aprobado por
Firma	Dirección Animales Gnotobióticos	Inspector de Aseguramiento de la Calidad	Española Litografía de Aseg. Calidad

Anexo 3. Certificado de calidad de los alimentos concentrados.



División de Alimentación y Nutrición
CENPALAB
CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO

Certificado de Calidad de los Alimentos Concentrados

FP.CC.01.95

Folio: 196

Fórmula	Lote	Ciclo Prod.	Fecha de prod.	Presentación	Cantidad bulto	Centro Destino
CMO 1000	3672100	EU	5/1/01	Pellet	5	203 Villas

Especificaciones para su uso

Dieta completa concentrada para la alimentación de rata convencional. Todo propósito. No esterilizable. No requiere suplemento dietético. Conservar en lugar fresco y ventilado, protegido de la humedad y de vectores. Este alimento conserva sus propiedades nutritivas durante 45 días a partir de la fecha de fabricación

Componentes

Trigo, cebada, harina de soya, aceite vegetal, sal común, fosfato de calcio, carbonato de calcio, pre-mezcla minero-vitaminica. Esta fórmula no contiene antibióticos.

Características de Fabricación	Dosificación	+/- 1 Kg	Pelletización	Veloc. 1 Temp. 39 °C																																																				
Control de Calidad de los Parámetros Físicos* <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Descripción</th> <th>UM</th> <th>Valor emitido</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Diámetro medio del pellet</td> <td>mm</td> <td>16.0</td> </tr> <tr> <td>Longitud media del pellet</td> <td>mm</td> <td>23.5</td> </tr> <tr> <td>Peso medio del pellet</td> <td>g</td> <td>10.55</td> </tr> <tr> <td>Polución</td> <td>%</td> <td>0.8</td> </tr> <tr> <td>Abrasión</td> <td>%</td> <td>97.5</td> </tr> <tr> <td>Granulometría</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td> Partículas grandes</td> <td>%</td> <td rowspan="3">NP</td> </tr> <tr> <td> Partículas medianas</td> <td>%</td> </tr> <tr> <td> Partículas pequeñas</td> <td>%</td> </tr> </tbody> </table> Parámetros Bromatológicos* <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Descripción</th> <th>UM</th> <th>Valor emitido</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Materia Seca</td> <td>%</td> <td>86.73</td> </tr> <tr> <td>Humedad</td> <td>%</td> <td>13.37</td> </tr> <tr> <td>Proteína Bruta</td> <td>%</td> <td>24.13</td> </tr> <tr> <td>Cenizas</td> <td>%</td> <td>7.17</td> </tr> <tr> <td>Calcio</td> <td>%</td> <td>2.40</td> </tr> <tr> <td>Fósforo</td> <td>%</td> <td>0.71</td> </tr> <tr> <td>Calcio/ Fósforo</td> <td>relación</td> <td>3.39</td> </tr> </tbody> </table>					Descripción	UM	Valor emitido	Diámetro medio del pellet	mm	16.0	Longitud media del pellet	mm	23.5	Peso medio del pellet	g	10.55	Polución	%	0.8	Abrasión	%	97.5	Granulometría			Partículas grandes	%	NP	Partículas medianas	%	Partículas pequeñas	%	Descripción	UM	Valor emitido	Materia Seca	%	86.73	Humedad	%	13.37	Proteína Bruta	%	24.13	Cenizas	%	7.17	Calcio	%	2.40	Fósforo	%	0.71	Calcio/ Fósforo	relación	3.39
Descripción	UM	Valor emitido																																																						
Diámetro medio del pellet	mm	16.0																																																						
Longitud media del pellet	mm	23.5																																																						
Peso medio del pellet	g	10.55																																																						
Polución	%	0.8																																																						
Abrasión	%	97.5																																																						
Granulometría																																																								
Partículas grandes	%	NP																																																						
Partículas medianas	%																																																							
Partículas pequeñas	%																																																							
Descripción	UM	Valor emitido																																																						
Materia Seca	%	86.73																																																						
Humedad	%	13.37																																																						
Proteína Bruta	%	24.13																																																						
Cenizas	%	7.17																																																						
Calcio	%	2.40																																																						
Fósforo	%	0.71																																																						
Calcio/ Fósforo	relación	3.39																																																						

Parámetros Microbiológicos**

Microorganismos viables	UFC/ ml	10 ¹
Coliformes totales	UFC/ ml	10 ²
Coliformes fecales	UFC/ ml	NP
Microorganismos proteolíticos	UFC/ ml	NP
Salmonellas	UFC/ ml	No detectable
Shigellas	UFC/ ml	No detectable
Hongos	UFC/ ml	10 ⁵

Elementos minerales de interés*

Cobre	ppm	12.55
-------	-----	-------

Según lo certificado por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del CENPALAB y que consta en los archivos de nuestra institución. Este Certificado es válido para el presente ciclo.

	Nombre y Apellidos	Cargo	Firma
Realizado por	Ing. Cándida Forte Miranda, Inv. Aux.	-Esp. Control de Proceso de la Industria	
Aprobado por	Dra. MV. Iliana Sosa Testé, Msc.	Director de Aseguramiento de la calidad	



Bibliografía

1. Anand KJ, Craig KD. New perspectives on the definition of pain. *Pain-Journal of the International Association for the Study of Pain*. 1996;67(1):3-6.
2. López-Gómez M, Malmierca E, de Górgolas M, Casado E. Cancer in developing countries: the next most preventable pandemic. The global problem of cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2013;88(1):117-22.
3. Wilsey BL, Fishman SM, Tsodikov A, Ogden C, Symreng I, Ernst A. Psychological comorbidities predicting prescription opioid abuse among patients in chronic pain presenting to the emergency department. *Pain Medicine*. 2008;9(8):1107-17.
4. Lema MJ, Foley KM, Hausheer FH. Types and epidemiology of cancer-related neuropathic pain: the intersection of cancer pain and neuropathic pain. *The oncologist*. 2010;15(Supplement 2):3-8.
5. de Leon CFM, Freedman VA. Measuring disability, physical functions and cognitive abilities of adults: Survey enhancements and options for a new panel study. *Journal of Economic and Social Measurement*. 2015;40(1-4):397-425.
6. Romero J, Gálvez R, Ruiz S. ¿ Se sostiene la Escalera Analgésica de la OMS? *Revista de la Sociedad Española del Dolor*. 2008;15(1):1-4.
7. Modi C, Mody S, Patel H, Dudhatra G, Kumar A, Avale M. Toxicopathological overview of analgesic and anti-inflammatory drugs in animals. 2012.
8. Inturrisi CE. Clinical pharmacology of opioids for pain. *The Clinical journal of pain*. 2002;18(4):S3-S13.
9. Hann M, Green R. Chemoinformatics—a new name for an old problem? *Current Opinion in Chemical Biology*. 1999;3(4):379-83.
10. Ooms F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. *Current medicinal chemistry*. 2000;7(2):141-58.
11. Estrada E. Spectral moments of the edge adjacency matrix in molecular graphs. 1. Definition and applications to the prediction of physical properties of alkanes. *Journal of chemical information and computer sciences*. 1996;36(4):844-9.
12. Hall M, Frank E, Holmes G, Pfahringer B, Reutemann P, Witten IH. The WEKA data mining software: an update. *ACM SIGKDD explorations newsletter*. 2009;11(1):10-8.
13. Todeschini R, Consonni V, Mauri A, Pavan M. DRAGON 5.5 for Windows. Talete srl, Milan, Italy. 2008.
14. Forniés AL, de Diego FIG, Sierra MC, de Landázuri JGO. Concepto de dolor. *Tratado de geriatría para residentes* Capítulo.71:721-31.
15. Evans C, Hoggarth A, Lanigan C. Pharmacology of pain management in general practice. *InnovAiT*. 2016;9(12):742-52.
16. Dionne CE, Dunn KM, Croft PR. Does back pain prevalence really decrease with increasing age? A systematic review. *Age and Ageing*. 2006;35(3):229-34.
17. Fillingim RB. Sex, gender, and pain. *Principles of Gender-Specific Medicine (Third Edition)*: Elsevier; 2017. p. 481-96.
18. Rioufol M-O. Fisiología del dolor. *Nosocomio: revista para el técnico en cuidados de Enfermería*. 2009(59):20-1.
19. Puebla Díaz F. Tipos de dolor y escala terapéutica de la OMS: Dolor iatrogénico. *Oncología (Barcelona)*. 2005;28(3):33-7.

20. Kumar KH, Elavarasi P. Definition of pain and classification of pain disorders. *Journal of Advanced Clinical & Research Insights*. 2016;3:87-90.
21. Goodman Gilman A, Hardman JG, Limbird LW. Goodman & Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica: McGraw-Hill; 2003.
22. Flórez J, Amijo JA, Mediavilla Á. *Farmacología humana*: Elsevier Masson; 2008.
23. Center MP. Pharmacology of opioids in the treatment of chronic pain syndromes. *Pain physician*. 2011;14:E343-E60.
24. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. *Pain physician*. 2008;11(2 Suppl):S133-53.
25. Ricardo Buenaventura M, Rajive Adlaka M, Nalini Sehgal M. Opioid complications and side effects. *Pain physician*. 2008;11:S105-S20.
26. Porreca F, Ossipov MH. Nausea and vomiting side effects with opioid analgesics during treatment of chronic pain: mechanisms, implications, and management options. *Pain medicine*. 2009;10(4):654-62.
27. Jaschek C, D'Arcangelis S. ¿ Mitos o prejuicios de la morfina? *MEDPAL, Interdisciplina y domicilio*. 2009;1.
28. Baños J-E. *Historiofarmacoetimología de la morfina*. farmacología y terapéutica. 2018.
29. Aspe RG, editor *Aislamiento de la morfina: 200 años de un descubrimiento fundamental para la química moderna*. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*; 2006: Real Sociedad Española de Química.
30. Florez J. *Farmacología Humana*. 6 ed. Espana: Elsevier; 2014.
31. Marcelo JrRJ, Haylin CNN, Rojas JMJ. *Propiedades farmacológicas y aproximación clínica de la Morfina*. 2010.
32. Martínez-Guadarrama E, Guevara-López U, Serratos-Vázquez MC, Mejía-Espinosa R, Roa-Aguirre L. Reacciones adversas con la administración de opiáceos en pacientes hospitalizados. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 2013;36(2):98-104.
33. García PC, Cruz SV, Mirón CE. *Química farmacéutica I: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona*; 2010.
34. Foye WO. *Principios de química farmacéutica*: Reverté; 1983.
35. Feria M. Fármacos analgésicos antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos. In: Florez J, editor. *Farmacología Humana*. 4 ed. Barcelona: MASSON,SA; 2005. p. 355-8.
36. Rang HP, Dale MM, Ritter J, Flower R. *Anti-inflammatory and immunosuppressant drugs*. *Pharmacology*. 6 ed. Philadelphia: ELSEVIER; 2007. p. 226-47.
37. Rio Jd. Fármacos antidepresivos y antimaníacos. In: Florez J, editor. *Farmacología Humana* 4ed. Barcelona: MASSON,SA; 2005. p. 579-94.
38. Marković S, Gutman I. Dependence of spectral moments of benzenoid hydrocarbons on molecular structure. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 1991;235(1-2):81-7.
39. Marrero-Ponce Y, Torrens F, Alvarado YJ, Rotondo R. Bond-based global and local (bond, group and bond-type) quadratic indices and their applications to computer-aided molecular design. 1. QSPR studies of diverse sets of organic chemicals. *Journal of computer-aided molecular design*. 2006;20(10-11):685-701.
40. Edwards C, Penney D. *Elementary Linear Algebra*. 1988. Prince-Hall, Englewood Cliffs.
41. Estrada E, Uriarte E, Montero A, Teijeira M, Santana L, De Clercq E. A novel approach for the virtual screening and rational design of anticancer compounds. *Journal of medicinal chemistry*. 2000;43(10):1975-85.
42. Castillo-Garit J. *Parametrización de la estructura química empleando formas lineales: Aplicaciones al Diseño Molecular Asistido por Ordenador [En opción al grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas]*. Santa Clara, Cuba: Universidad Central Marta Abreu de las Villas. 2008.

43. Todeschini R, Consonni V, Mauri A, Pavan M. DRAGON—Software for the calculation of molecular descriptors, version 5.5 for Windows; Talet SRL: Milan, Italy, 2007. There is no corresponding record for this reference.
44. Bonet I, Rodríguez A, García MM, Grau R. Combinación de clasificadores para bioinformática. *Computación y Sistemas*. 2012;16(2):191-201.
45. Aler R, Galván IM, Valls JM. Improving classification for brain computer interfaces using transitions and a moving window. 2009.
46. Alonso Atienza F. Estudio de los mecanismos de las arritmias cardiacas mediante modelado y procesado robusto digital de señal. 2008.
47. ALARCÓN-PAREDES A, FELICIANO-MORALES A, CUEVAS-VALENCIA RE, CATALÁN-VILLEGAS A, ALONSO GA. ANÁLISIS DE LAS TENDENCIAS Y PERSPECTIVAS DE LAS HERRAMIENTAS DE APRENDIZAJE DE MÁQUINA ACTUALES.
48. Marrero-Ponce Y, Siverio-Mota D, Gálvez-Llompart M, Recio MC, Giner RM, García-Domènech R, et al. Discovery of novel anti-inflammatory drug-like compounds by aligning in silico and in vivo screening: the nitroindazolinone chemotype. *European journal of medicinal chemistry*. 2011;46(12):5736-53.
49. O. C. Identificación "in silico" y corroboración "in vitro" de nuevos compuestos con actividad analgésica. St. Clara, Villa Clara, Cuba.: Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas.; 2009.
50. Mitchell TM. Does machine learning really work? *AI magazine*. 1997;18(3):11.
51. Quinlan JR. Induction of decision trees. *Machine learning*. 1986;1(1):81-106.
52. Kohavi R, John GH. Wrappers for feature subset selection. *Artificial intelligence*. 1997;97(1):273-324.
53. Hamilton NZ. Correlation-based feature subset selection for machine learning. 1998.
54. Guyon I, Weston J, Barnhill S, Vapnik V. Gene selection for cancer classification using support vector machines. *Machine Learning*. 2002;46(1-3):389-422.
55. Sherif E, Gouda A. Quantitative structure structure-activity relationship (QSAR) for 2-amino-5-selenothiazole derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents. *Der Pharm Chemica*. 2014;6(2):1-6.
56. Ilango K, Valentina P, Kumar G, Dixit D, Nilewar S, K Kathiravan M. Design, Synthesis and QSAR Studies on a Series of 2, 5-Disubstituted-1, 3, 4-oxadiazole Derivatives of Didofenac and Naproxen for Analgesic and Anti-inflammatory Activity. *Medicinal Chemistry*. 2015;11(8):753-63.
57. Datar P. QSAR and Synthesis of a Novel Biphenyl Carboxamide Analogue for Analgesic Activity. *Modern Chemistry & Applications*. 2015.
58. Li W, Tang Y, Xie Q, Sheng W, Qiu Z-B. 3D-QSAR studies of orvinol analogs as κ -opioid agonists. *Journal of molecular modeling*. 2006;12(6):877-84.
59. Huang H, Ou W, Zhao J, Chen D, Wang L. A comparative study of quantitative structure-activity relationship methods based on gallic acid derivatives. *SAR and QSAR in Environmental Research*. 2004;15(2):83-99.
60. Ismail MA, Lehmann J, El Ella DAA, Albohy A, Abouzid KA. Lonazolac analogues: molecular modeling, synthesis, and in vivo anti-inflammatory activity. *Medicinal chemistry research*. 2009;18(9):725.
61. Banerjee AG, Das N, Shengule SA, Srivastava RS, Shrivastava SK. Synthesis, characterization, evaluation and molecular dynamics studies of 5, 6-diphenyl-1, 2, 4-triazin-3 (2H)-one derivatives bearing 5-substituted 1, 3, 4-oxadiazole as potential anti-inflammatory and analgesic agents. *European journal of medicinal chemistry*. 2015;101:81-95.
62. Domínguez Martínez L. Identificación computacional y corroboración experimental de nuevos compuestos líderes con actividad analgésica: Universidad Central " Marta Abreu" de las Villas; 2009.

63. Shangoo E, Martín GMC. Identificación computacional de nuevos compuestos líderes con actividad analgésica. Santa Clara: Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. 2007.
64. Mauri A, Consonni V, Pavan M, Todeschini R. Dragon software: An easy approach to molecular descriptor calculations. *Match*. 2006;56(2):237-48.
65. Helguera AM, Combes RD, González MP, Cordeiro M. Applications of 2D descriptors in drug design: a DRAGON tale. *Current topics in medicinal chemistry*. 2008;8(18):1628-55.
66. Carrera G, Aires-de-Sousa J. Estimation of melting points of pyridinium bromide ionic liquids with decision trees and neural networks. *Green Chemistry*. 2005;7(1):20-7.
67. StatSoft I. STATISTICA for Windows Operating System (Version 10.0). 2011. Tulsa (OH): StatSoft.
68. Bhargava N, Sharma G, Bhargava R, Mathuria M. Decision tree analysis on j48 algorithm for data mining. *Proceedings of International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering*. 2013;3(6).
69. Patil TR, Sherekar S. Performance analysis of Naive Bayes and J48 classification algorithm for data classification. *International Journal of Computer Science and Applications*. 2013;6(2):256-61.
70. R SS. Empleo de estudios "in silico" en la identificación de nuevos compuestos con potencial actividad contra *Leishmania infantum*. Santa Clara, Cuba: Universidad Central Marta Abreu de las Villas; 2017.
71. Close MB, Banister K, Baumans V, Bernoth E-M, Bromage N, Bunyan J, et al. Recomendaciones para la Eutanasia de los Animales de Experimentación: Parte 2.
72. Garcés Giraldo LF, Giraldo Zuluaga C. Bioética en la experimentación científica con animales: cuestión de reglamentación o de actitud humana. *Revista lasallista de investigación*. 2012;9(1).
73. Giraldo LFG, Zuluaga CG. La responsabilidad profesional y ética en la experimentación con animales: Una mirada desde la prudencia como virtud. *Revista Lasallista de Investigación*. 2013;10(1).
74. Rodríguez Yunta E. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioethica*. 2007;13(1):25-40.
75. Castillo-Garrit JA, Abad C, Casañola-Martin GM, Jones Barigye S, Torrens F, Torreblanca A. Prediction of Aquatic Toxicity of Benzene Derivatives to *Tetrahymena pyriformis* According to OECD Principles. *Curr Pharm Des* 2016;22(33):5085-94.
76. Canizares-Carmenate Y, Hernandez-Morfa M, Torrens F, Castellano G, Castillo-Garrit JA. Larvicidal activity prediction against *Aedes aegypti* mosquito using computational tools. *J Vector Borne Dis*. 2017;54(2):164-71.
77. Morón Rodríguez F, Amador V, del Carmen M, Morejón Rodríguez Z, López Barreiro M, García Hernández AI, et al. Tamizaje fitoquímico, actividad analgésica y antiinflamatoria de decocción de *Costus pictus* D. Don. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2008;13(4):0-.
78. Zulfiker A, Rahman MM, Hossain MK, Hamid K, Mazumder M, Rana MS. In vivo analgesic activity of ethanolic extracts of two medicinal plants-*Scoparia dulcis* L. and *Ficus racemosa* Linn. *Biol Med*. 2010;2(2):42-8.
79. Owoyele BV, Oguntoye SO, Dare K, Ogunbiyi BA, Aruboula EA, Soladoye AO. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities from flavonoid fractions of *Chromolaena odorata*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013;2(9):219-25.

