



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

CENTRO DE BIOACTIVOS QUÍMICOS

Identificación de nuevos compuestos con potencial actividad antileishmaniásica mediante estudios in silico.

Tesis para optar por el grado científico de Máster en Ciencias en Investigación y desarrollo de medicamentos.

Autor: Lic. Naiví Flores Balmaseda

Tutor: Dr. Juan Alberto Castillo Garit

2015





Universidad Central Marta Abreu de las Villas

Facultad de Química y Farmacia

CENTRO DE BIOACTIVOS QUÍMICOS

Identificación de nuevos compuestos con potencial actividad antileishmaniásica mediante estudios *in silico*.

Tesis para optar por el grado de Máster en Ciencias en Investigación y desarrollo de medicamentos.

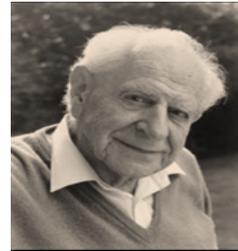
Autor: Lic. Naiví Flores Balmaseda

Tutor: Dr. Juan Alberto Castillo Garit

Santa Clara

2015

Exergo



La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada. -Karl Popper-

Dedicatoria

A mis hijos, tesoros invaluableles

A la memoria de mi padre y abuela

A mi madre y hermana

Ya Jorge, mi otro yo.

Agradecimientos

Es un placer para mí expresar mis sinceros agradecimientos a todas aquellas personas de una forma u otra me ha ayudado a culminar exitosamente mis estudios y este trabajo.

Quisiera agradecer especialmente por todo el apoyo y el amor que me han brindado durante todo el transcurso de mi formación y mi vida

A mi tutor Juan Alberto por su perseverancia y apoyo, ánimo y dirección durante el desarrollo de este trabajo.

Al Grupo de Diseño de Fármacos por toda la ayuda que me ha brindado para el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros de Departamento de Farmacia.

A mi madre ejemplo de amor y sacrificio y a mi hermana siempre presente.

A mi esposo e hijos, inspiración en momentos difíciles.

A todos muchas gracias.

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica causada por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania*. Forma parte de las patologías tropicales olvidadas o desatendidas relacionadas con la pobreza y la desventaja social. *Leishmania amazonensis* es una de la especies de mayor importancia médica para el continente americano, pues es la causante de una gran variedad de manifestaciones clínicas, algunas de ellas potencialmente mortales. La quimioterapia empleada para tratarlas presenta una alta frecuencia de efectos citotóxicos serios, reacciones adversas e incidencia creciente de resistencia. Esto hace necesaria la identificación rápida de nuevas alternativas terapéuticas, y los estudios *in silico* han demostrado ser capaces de disminuir los altos costos de los procesos de síntesis y bioensayos, así como el tiempo empleado en la identificación de compuestos efectivos contra diversas dianas terapéuticas. En la presente investigación se realiza un estudio donde se emplean técnicas de Inteligencia Artificial para dar solución a esta problemática, empleando WEKA y descriptores moleculares 0D-2D implementados en el software Dragón. Se confeccionó una base de datos y se empleó el análisis de conglomerados para diseñar las series de entrenamiento y predicción. Se obtuvieron ocho modelos con las técnicas: k vecinos más cercanos, árboles de clasificación, perceptrón multicapas y máquina vectorial de soporte (IBk, J48, MLP y SVM, respectivamente), los cuales alcanzaron porcentajes de clasificación entre 80 y 92 % para las series de entrenamiento y predicción y cuyo poder predictivo se constató a través de procedimientos de validación externa. Los sistemas multclasificadores ensamblados de voto empleados en la predicción de compuestos contra el parásito mostraron mejores resultados de exactitud (91,33 y 96,77 %) que los modelos por separado y permitieron la identificación de forma óptima de 8 compuestos con potencial actividad contra *Leishmania amazonensis* a través del cribado virtual de la base de datos internacional DrugBank.

GLOSARIO

QSAR	Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad
QSPR	Relaciones Cuantitativas Estructura-Propiedad
Q	Exactitud ó Porcentaje global de buena clasificación
VC	Validación cruzada
SE	Serie de Entrenamiento
SP	Serie de Predicción
IC	Indice Cuadrático
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
FP_r	Razón de Falsos Positivos
DM	Descriptores Moleculares
IM	Indices Moleculares
C	Coefficiente de Correlación de Matthews
IBk	Técnica de k-vecino más cercano
SVM	Técnica de Máquina vectorial de soporte
SMO	Técnica de Optimización Secuencial Mínima
MLP	Técnica de Perceptrón multicapas
J48	Técnica de Árbol de clasificación
AC	Análisis de conglomerados
k-MCA	Análisis de conglomerados k-medias
0D	Descriptores constitucionales
2D	Descriptores bidimensionales
ADL	Análisis Discriminante Lineal
ADM	Análisis Discriminante Múltiple
IFA	Ingrediente Farmacéutico Activo
DA	Dominio de Aplicación
µg /mL	microgramos/mililitro

mg/kg	miligramos/kilogramo
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
ATP	Trifosfato Adenosina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
LCD	Leishmaniasis Cutáneo Difusa
LMC	Leishmaniasis Mucocutánea
LDPKL	Leishmaniasis Dérmica Post-kala-azar
LV	Leishmaniasis Visceral
LCL	Leishmaniasis Cutáneo Localizada
LTA	Leishmaniasis Tegumentaria Americana
LCA	Leishmaniasis Cutánea Atípica
MCL	Leishmaniasis Cutánea Multifocal
LCD	Leishmaniasis Cutáneo Difusa
LPG	Lipofosfoglicano
CAMD-BIR	Grupo de Diseño Molecular Asistido por Computadora e Investigaciones Bioinformáticas
CMV	Citomegalovirus
NETs	Trampas Extracelulares de Neutrófilos
SIGKDD	Grupo Interesado en el Descubrimiento de Conocimientos y Minería de Datos.
OMS	Organización Mundial de la Salud
OECD	Organización para el Desarrollo y la Cooperación Económica
FDA	(por sus siglas en inglés Food and Drug Administration),

MW	Peso molecular
PCA	Análisis de Componentes Principales
IA	Inteligencia Artificial
DO	Densidad Óptica
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl bromuro de tetrazolium
DMSO	Dimetilsulfóxido
CBQ	Centro de Bioactivos Químicos

INDICE

Introducción	15
1.Revisión bibliográfica	20
1.1.Leishmaniasis. Generalidades	20
1.2. Agente etiológico	20
1.2.1 Filogenia y clasificación taxonómica de <i>Leishmania spp.</i>	20
1.2.2 Morfología básica de la <i>Leishmania</i> .	22
1.2.3 Ciclo biológico.	23
1.3.Vector	25
1.4. Reservorios	27
1.5. Leishmania amazonensis. Generalidades.	28
1.5.1 Formas clínicas de la leishmaniasis causadas por <i>L. amazonensis</i> .	29
1.6. Tratamiento de la leishmaniasis.	33
1.7. Estudios in silico	34
1.7.1 Estudios QSPR/QSAR	35
1.7.2 Descriptores o Índices Moleculares	36
1.7.3 Algunos softwares empleados en los estudios in silico	38
1.7.3.1 WEKA	38
1.7.3.2 ChemAxon	39
1.7.3.3 JChem	39
1.7.4 Métodos quimiométricos en estudios QSAR	40
1.7.5 Diseño experimental	40
1.7.6 Análisis de Conglomerados (AC).	41
1.7.7 Métodos de Clasificación	42
1.7.8 Selección del número óptimo de predictores. Principio de la Parsimonia.	43
1.7.9 Regulaciones de los métodos QSAR	44
1.7.10 Métodos de cribado virtual basados en ligandos.	46
2. Materiales y métodos	48
2.1 Gestión de la data y parametrización de la estructura química.	48
2.2 Estrategias computacionales. Análisis estadístico de los datos	50
2.1 Obtención y validación de los modelos	51
2.2 Cribado de base de datos internacional.	53
2.3 Sistema multclasificador ensamblado basado en modelos QSAR	53
3. Resultados y discusión	56
3.1 Gestión de la data. Parametrización de la estructura química.	56
3.2 Estrategias computacionales. Análisis estadístico de los datos.	58
3.2.1 Obtención de modelos empleando datos en promastigotes.	60
3.2.2 Obtención de modelos empleando los datos en amastigotes	63
3.3 Validación de los modelos obtenidos.	65
3.4. Cribado de Base de datos internacional.	67
3.5 Sistema multclasificador ensamblado basado en modelos QSAR	68
Conclusiones	74
Recomendaciones	76
Referencias bibliográficas	78
Anexos	

Introducción

INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis constituyen un amplio espectro de formas clínicas cuya causa es la infección por protozoos parásitos del género *Leishmania*, transmitidos al hombre y los animales a través de la picadura de insectos de la familia *Psychodidae*.(1, 2) Han sido incluidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la categoría I de enfermedades infecciosas (situación emergente e incontrolada) y forman parte de las patologías tropicales olvidadas o desatendidas, relacionadas con la pobreza y desventaja social. Se encuentra entre las más relevantes enfermedades infecciosas a nivel mundial si se tiene en cuenta el ascendente número de personas en riesgo (más de 350 millones),(3) la ausencia de tratamientos totalmente efectivos y el marcado incremento en su incidencia en las últimas décadas.(3)

En América Latina se ha observado en los últimos años un aumento en el número de casos reportados, particularmente en Brasil, Bolivia, Perú y Colombia.(2) Nuestro país a pesar de no haber detectado casos autóctonos de la enfermedad, manifiesta un gran interés en el estudio de los mismos dada la importancia de la leishmaniasis en el contexto internacional, la posición geográfica de Cuba y el principio internacionalista de nuestro sistema social, así como los avances científico-técnicos de la última década, que en muchos casos, han impuesto novedades en el manejo de aspectos esenciales de la enfermedad no resueltos aún.(4)

Los signos y síntomas clínicos que presentan los pacientes varían en relación con las especies responsables de la infección, y las distintas características de la interacción parásito-hospedero(5) Las manifestaciones clínicas clásicas de la leishmaniasis han sido etiquetadas como leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea y van desde úlceras en la piel que cicatrizan espontáneamente, hasta formas fatales en las cuales se presenta inflamación severa del hígado y el bazo, pudiendo afectarse otros órganos como los riñones y la médula ósea.

Han sido reportadas más de 20 especies de *Leishmania* y entre ellas la *Leishmania amazonensis* tiene una importancia vital para el continente americano pues es la causante de una gran variedad de manifestaciones clínicas, algunas de ellas potencialmente mortales para las cuales la

quimioterapia es el procedimiento terapéutico generalmente empleado; sin embargo existe una alta frecuencia de efectos citotóxicos serios y reacciones adversas inherentes a la mayoría de los fármacos empleados, así como una incidencia creciente de resistencia a ello.(6) Los compuestos con actividad antileishmaniásica son objeto de estudio a nivel mundial, pero dada la diversidad de especies del género *Leishmania*, el complejo ciclo de vida del parásito, y la variedad de manifestaciones clínicas que presenta la enfermedad se hace muy engorroso encontrar nuevos compuestos efectivos.(7)

El enfoque de diseño/descubrimiento de fármacos asistido por computadoras ofrece una alternativa más económica y rápida en el campo de la síntesis y evaluación de compuestos con determinada actividad farmacológica(8). 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 actualmente se encuentran en el mercado. Los procedimientos "*in silico*" disminuyen los altos costos de los procesos de síntesis y bioensayos; los cuales se realizan 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, 10)

Actualmente la Facultad de Química y Farmacia y el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas realizan investigaciones dirigidas al desarrollo de nuevos principios activos para la industria farmacéutica en las ramas de la medicina veterinaria, humana y la sanidad vegetal. Dentro de ellas, el Grupo de Diseño Molecular Asistido por Computadora e Investigaciones Bioinformáticas (CAMD-BIR Unit, por sus siglas en inglés) y el CBQ, han presentado resultados relevantes en este campo empleando métodos computacionales cuya aplicación en estudios QSAR ha permitido el desarrollo de nuevos métodos grafo-teóricos para el diseño molecular de compuestos orgánicos potencialmente bioactivos.(11)

Por todo lo anterior podemos identificar el siguiente **Problema científico**:

En la actualidad no existen fármacos totalmente efectivos para el tratamiento de las formas de leishmaniasis causadas por *Leishmania amazonensis*.

Como vía para darle solución se formula la siguiente **hipótesis**:

Es posible la identificación de nuevos compuestos con potencial actividad contra *Leishmania amazonensis* mediante el empleo de métodos QSAR.

Teniendo en cuenta lo anterior, se propone como **objetivo general**:

Identificar nuevos compuestos antileishmaniásicos mediante métodos *in silico*.

Siendo nuestros **objetivos específicos**:

1. Confeccionar una base de datos de compuestos a los que se les ha evaluado experimentalmente su actividad contra promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis*.
2. Obtener modelos QSAR que permitan, tras su validación, predecir la actividad de compuestos frente a ambas formas del parásito utilizando descriptores moleculares.
3. Identificar nuevos compuestos con potencial actividad contra este parásito mediante el cribado virtual de bases de datos.

Revisión bibliográfica

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Leishmaniasis. Generalidades

Las leishmaniasis constituyen un amplio espectro de formas clínicas (figura 1) cuya causa es la infección por protozoos parásitos del género *Leishmania*, transmitidos al hombre y los animales a través de la picadura de insectos de la familia *Psychodidae* géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*.(6) Es endémica en cerca de 88 países, de ellos al menos 24 del continente americano, y se estima que el número de personas en riesgo de infección a nivel mundial asciende aproximadamente a 350 millones.(3) Su incidencia ha aumentado desde los años ´80s, y ha ganado una posición relevante en el mundo entre las causas de muerte por este tipo de enfermedades.(6) Forma parte de las patologías tropicales olvidadas o desatendidas, que generalmente se asocian a pobreza y desventaja social. Existe muy poco interés en los campos investigativo y de desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas, medicamentos o vacunas para tratarla por parte de las grandes compañías farmacéuticas dada la carencia de recursos de los grupos sociales que la padecen.(12, 13)

En Cuba no se han detectado casos autóctonos de la enfermedad, no obstante, la magnitud que ha alcanzado en el contexto internacional así como el principio internacionalista de nuestro sistema social, apoyan el interés en esta patología siendo vital el conocimiento actualizado sobre ella por parte de los médicos cooperantes, colaboradores de la salud y educación sanitaria que llevan a cabo misiones en los diferentes países en los que esta resulta endémica(14) Por nuestra posición geográfica y la afluencia de una gran cantidad de personas provenientes de dichos países a nuestro territorio resulta de interés el estudio de esta patología para profesionales, higienistas, epidemiólogos o salubristas con responsabilidad en la conducción y manejo de posibles casos importados a nuestro país.(14)

1. 2. Agente etiológico

1.2.1 Filogenia y clasificación taxonómica de *Leishmania spp*

Clasificación taxonómica de *Leishmania*:

A) Phylum: PROTOZOO

B) Subphylum: SARCOMASTIGOSPHORA

1) Clase: FLAGELADOS

1.1) Orden: PROTOMONADINA

1.2) Familia: TRYPANOSOMATIDAE

1.3) Género: LEISHMANIA

Leishmania contempla más de 20 especies y se divide en 3 subgéneros, de acuerdo al sitio de desarrollo del parásito en el insecto transmisor: *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*) y *Leishmania* (*Sauroleishmania*), este último de lagartos, de acuerdo a estudios de filogenia molecular. Las especies y subespecies se agrupan dentro de complejos en constante revisión. Asimismo, se reconocen paraleishmanias.(15, 16) Todos los miembros del género *Leishmania* son parásitos de mamíferos. Los subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, están separados en base a su localización en el intestino del vector.(17)

Inicialmente, la clasificación de las especies se basó en distintos criterios extrínsecos, como características biológicas, geográficas y clínicas; por ejemplo, *L. guyanensis* (aislada en Guayana), *L. peruviana* (aislada en Perú), *L. infantum* (aislada de un niño en Túnez) y *L. gerbilis* (aislada de un gerbo).(17) Desde los años setenta, se comenzaron a utilizar criterios intrínsecos basados en datos genéticos, bioquímicos e inmunológicos para definir las especies.(18) La utilización de estas técnicas moleculares condujo a que la OMS publicara un esquema taxonómico actualizado (Anexo1).(19) La aparición de nuevos métodos de detección, aislamiento e identificación genética condujo a un incremento sustancial en el número de especies descritas. Hoy en día se conocen alrededor de 30 especies, siendo más de 20 patogénicas para el hombre. Generalmente, las especies del parásito presentan diferentes características clínicas y epidemiológicas, en función de los distintos perfiles genéticos y fenotípicos.

Listado de especies de *Leishmania*: *Leishmania aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. arabica*, *L. archibaldi*, *L. aristedes*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*, *L. colombiense*, *L. deanei*, *L. donovani*, *L. enriettii*, *L. equatorensis*, *L. forattinii*, *L. garnhami*, *L. gerbilli*, *L. guyanensis*, *L. herreri*, *L. hertigi*, *L. infantum*, *L. killicki*, *L. lainsoni*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. pifanoi*, *L. shawi*, *L. turanica*, *L. tropica*, *L. venezuelensis*.(20)

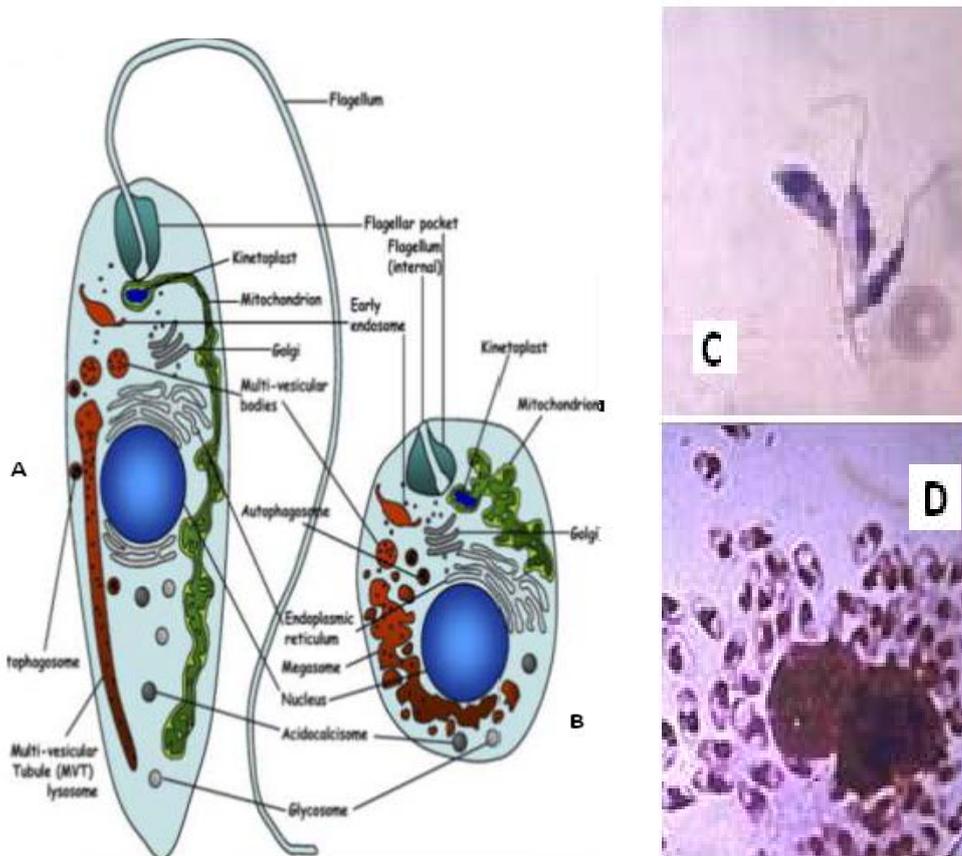
Se han centrado debates acerca de la clasificación taxonómica de las especies *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. chagasi*, *L. infantum*, *L. archibaldi*, *L. garnhami*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis* y *L. Forattinii*. Diferentes estudios han esclarecido el estatus de algunas de ellas, por ejemplo: *L. chagasi* es aceptado como sinónimo de *L. infantum* y *L. peruviana* ha sido validada como una especie independiente. El resto de especies mencionadas están todavía en discusión.(20)

1.2.2 Morfología básica de la *Leishmania*.

Para comprender el ciclo de vida de la *Leishmania* es necesario conocer que implica esencialmente el paso alternativo de un hospedador vertebrado a otro invertebrado, y viceversa, con dos formas morfológicas principales, la intracelular o amastigote en las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedero vertebrado y la extracelular o promastigote, en el tracto intestinal de los flebótomos (Figura1).

Los amastigotes, son inmóviles y se observan al microscopio óptico como cuerpos ovals, de una longitud entre 3-5 μm y anchura que va de 1,5-2,5 μm . En su citoplasma, se observa un núcleo esférico, voluminoso generalmente excéntrico, y próximo a este un kinetonúcleo de aspecto bacilar o bastoniforme.(21) Estos son exclusivamente intracelulares (macrófagos) pero pueden encontrarse en el intersticio cuando el parásito se replica y produce la ruptura de la célula huésped.(21)

Los promastigotes son fusiformes, móviles y extracelulares, con un tamaño que varía entre los 10-30 μm de largo y los 1,5-3 μm de ancho. Para su desplazamiento emplean un largo flagelo libre ubicado en su región anterior. Destaca en ellos la presencia de un núcleo oval central y un kinetonúcleo en forma de bastón claramente pre nuclear.(22)



A y B Fuente: <http://ars.sciedirect.com/content/image/1-s2.0-S0020751907001038-gr1.jpg>
 C,D Tomados de: Aspectos dermatológicos de la leishmaniasis.pdf Prof. Dr. José Roberto Morales

Figura 1. Morfología básica de la *Leishmania*. A y B Representación esquemática en la formas promastigote y amastigote, respectivamente. C promastigotes, D Amastigotes

1.2.3 Ciclo biológico.

La *Leishmania* es heterogénea y completa su ciclo biológico usando dos huéspedes uno invertebrado que es el vector o flebótomo y uno vertebrado. Figura 2. El ciclo puede completarse de diferentes formas: una, principalmente silvestre, en la que la *Leishmania* circula entre los reservorios naturales y los vectores propios de la zona endémica, otra donde los flebótomos infectados pueden atacar al hombre y a los animales domésticos o peri domésticos y una tercera en la que el propio hombre infectado transmite, a través del vector, el parásito a otro hombre.(22)

El ciclo comienza cuando el vector pica a un vertebrado infectado, adquiriendo los parásitos ya sea de la sangre o de lesiones de la piel. En la sangre ingerida se encuentran macrófagos con amastigotes en su interior ocurriendo su transformación a promastigotes dentro del flebótomo en las siguientes 24 a 48 horas(22) (Figura 3).

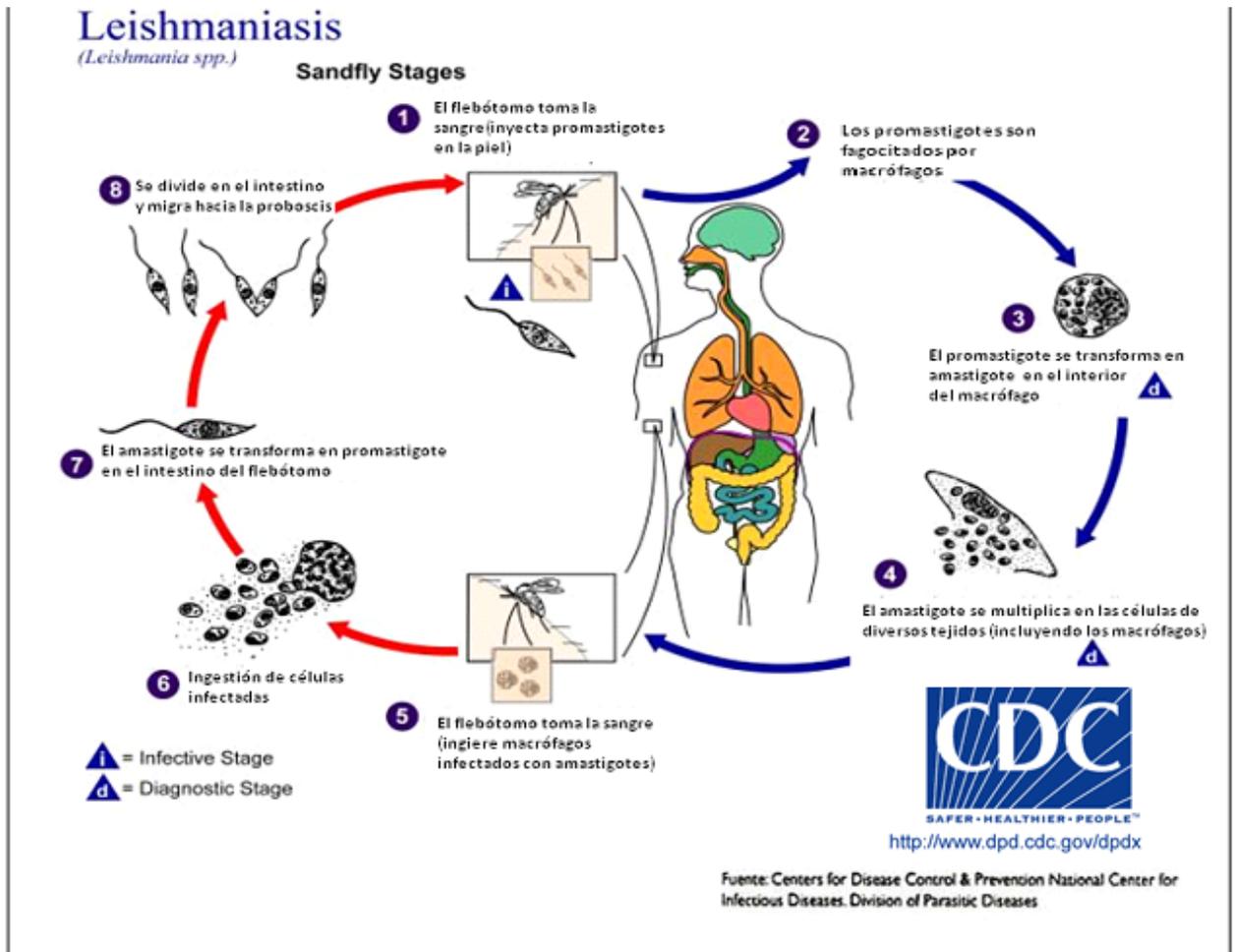
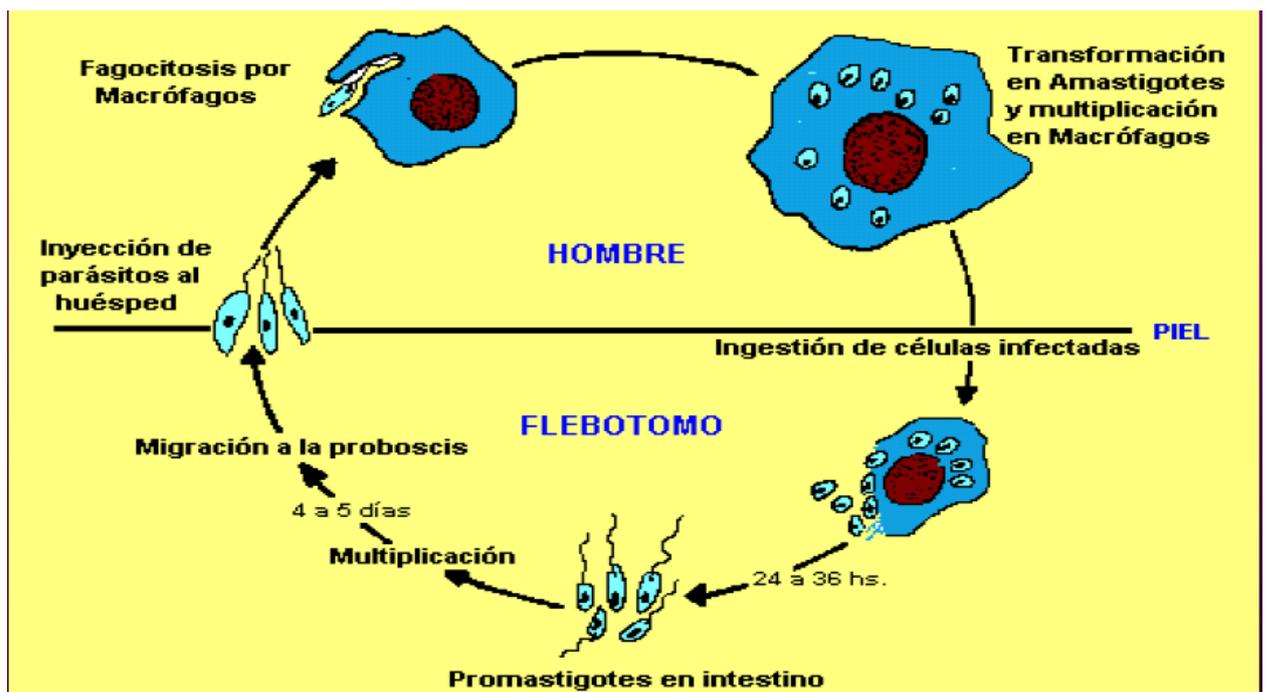


Figura 2. Ciclo biológico de la *Leishmania*.

Dentro del flebótomo vector los promastigotes se multiplican activamente por división binaria longitudinal. Algunos quedan libres desde el inicio en el lumen intestinal; otros se adhieren a la pared por hemidesmosomas. La localización del parásito en el intestino varía de acuerdo a cada especie del vector y de *Leishmania*. Después de la replicación en el intestino, los promastigotes migran al esófago y la faringe donde se aglutinan al secretar una sustancia en forma de gel, obligando al flebótomo a regurgitarlos mientras se alimenta de la sangre de un nuevo huésped.(23, 24)

Cuando el vector infectado pica a un huésped le inocula entre 10 y 100 promastigotes presentes en la proboscis y que penetran en la dermis. En los vectores excesivamente infectados, la proboscis está congestionada, dificultando su alimentación, por lo que el flebótomo realiza múltiples picaduras e inoculaciones. La picadura del vector es muy dolorosa y se describe

popularmente como "pringadura de manteca hirviente". Después de un período de incubación que varía entre dos semanas y dos meses o más, aparece la lesión inicial que puede ser única o múltiple.(25) Muchos de los promastigotes inoculados al nuevo huésped son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares antes de alcanzar el sistema retículo endotelial. Esta forma del parásito activa el complemento por una vía que inicia la acumulación de neutrófilos y macrófagos,(26) facilitando su entrada al interior de estos últimos, una vez dentro ocurre un anclaje o adherencia del parásito a estructuras celulares y se inicia un complejo proceso de multiplicación que luego dará lugar a la lisis celular y la liberación de amastigotes capaces de invadir otros macrófagos. Estas formas del parásito han desarrollado varios mecanismos para resistir la actividad digestiva y antimicrobiana de las células fagocíticas.



Confeccionado por Prof. Dr. José Roberto Morales. Argentina. Tomado de: Aspectos dermatológicos de la leishmaniasis.pdf

Figura 3. Transformaciones sufridas por el parásito dentro del huésped (hombre) y del vector (flebotomo).

1.3. Vector

Se reconoce como vectores transmisores de las *Leishmanias* a las hembras de dípteros hematófagos de la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* y los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo) (figura 4).

Se han sugerido otros vectores invertebrados como por ejemplo pulgas y garrapatas, aunque no existen pruebas experimentales que respalden estos planteamientos.(27)

En América, existen más de 400 especies diferentes de flebótomos de los cuales solo una pequeña parte ha sido incriminada como vector de la leishmaniasis. La singular y compleja biología de cada especie abarca todos los aspectos de la reproducción, alimentación, dispersión, hábitos, etc. y repercute directamente en la epidemiología de la leishmaniasis así como en los métodos que se emplean para el control de los vectores. La comprensión de la complicada interacción existente entre vector, parásito y hospederos constituye una herramienta fundamental en la prevención e intervención en esta enfermedad.(27)

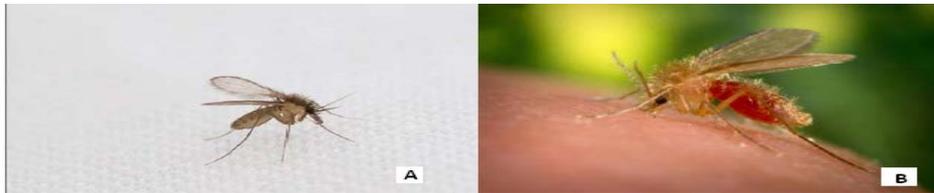


Foto del Laboratorio de entomología del PECET. Universidad de Antioquia, Colombia
http://www.vectorbase.org/Image/organism_papatasi

Figura 4. Hembras adultas de flebótomos en estado óptimo para transmitir *Leishmania* spp. **A:** *Lutzomyia longipalpis* y **B:** *Phlebotomus papatasi*.

Aspectos patológicos relacionados con el vector.

La *Leishmania* ha desarrollado mecanismos adaptativos únicos para asegurar su supervivencia en este complejo ciclo de vida. Estas incluyen, dentro del flebótomo, la producción de proteoglicanos que la protegen de la actividad proteolítica de las secreciones del tracto digestivo, su unión o anclaje a este que impide su excreción junto a los residuos de la alimentación y la acumulación en la probóscide que asegura la ingurgitación mientras se produce la picadura.(23) Se ha sugerido que el anclaje al tracto digestivo medio del flebótomo está mediado por un lipofosfoglicano presente en el parásito y que varía en las diferentes especies de *Leishmania*. Los vectores deben poseer ligandos apropiados en las células del tracto digestivo medio para sostener el anclaje del parásito.

La saliva del flebótomo juega un rol muy importante en el establecimiento de la infección, la supervivencia y proliferación de *Leishmania* spp. En el momento

de la picadura, junto a los promastigotes, se depositan en el torrente sanguíneo del hospedero vertebrado componentes de la saliva que incluyen sustancias vasodilatadoras, anti-hemostáticas, antiinflamatorias o con actividad inmunosupresora, que incrementan el riego sanguíneo en el sitio de la picadura e inhiben los mecanismos microbicidas de los macrófagos receptores y actúan además como difusores y potenciadores de la infectividad del parásito;(28) entre estos factores están la apirasa, el maxadilán,(29) la adenosina y su precursor 5´AMP,(30) la hialuronidasa y desintegrinas.(31-34)

1.4. Reservorios

Para asegurar que un animal constituye un reservorio es necesario corroborar que este se relaciona tanto con los hábitos hematófagos del flebótomo como con el mantenimiento de poblaciones naturales del parásito, otro aspecto importante es que deben constituir portadores asintomáticos y mantener durante un tiempo prolongado la infección.(24) Los perros y humanos, además de algunos equinos y gatos son afectados por la leishmaniasis, mostrando una variedad de síntomas dermatológicos y/o patológicos de órganos internos relacionados con la especie de *Leishmania* por la que son infectados. Dentro de los reservorios demostrados para este parásito encontramos animales domésticos y silvestres como: zarigüeyas, coatíes, osos hormigueros, ratas, zorros, lobos, mulos, perezosos, simios, puerco espines, entre otros (figura 5), Se han sugerido al menos 100 especies de mamíferos que actúan como potenciales reservorios del parásito.(3, 24, 35) Su variedad es una muestra de la gran adaptabilidad y plasticidad de las especies de *Leishmania*.



Imágenes tomadas de wikipedia: Versión Kiwix 0.9 alpha6

Figura 5. Algunos animales identificados como reservorio de *Leishmania spp.*

1.5. *Leishmania amazonensis*. Generalidades.

La *Leishmania amazonensis* se encuentra dentro del complejo de *Leishmania mexicana* conjuntamente con *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis*, *L. garnhami*.(1) Su distribución geográfica abarca países de América como Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guayana Francesa, Panamá, Perú, Suriname y Venezuela.

Esta especie ha sido aislada de roedores silvestres de los géneros *Proechymis* e *Oryzomys* los cuales han sido estudiados como reservorios. Los flebótomos vectores incluyen a *Lu. flaviscutellata*, *Lu. reducta*, *Lu. olmeca nociva* y *Lu. ovallesi*, estas especies son poco antropofílicas, lo que justifica una menor frecuencia de infección humana por *L. amazonensis*.(36)

Fernando Real y colaboradores presentaron la secuenciación y anotación del genoma de la *Leishmania amazonensis* como agente etiológico de leishmaniasis cutánea humana en la región amazónica de Brasil.(37) Estos investigadores definen que *L. amazonensis* comparte características con *Leishmania (L.) mexicana*, pero también presenta características únicas con respecto a la distribución geográfica y las manifestaciones clínicas de las lesiones cutáneas (por ejemplo: la leishmaniasis cutánea diseminada).(37) Los genes relacionados con la carboxipeptidasa, aminotransferasa y 3'-nucleotidasa así como los dominios ATPasa, tiorredoxina están presentes en abundancia en *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) mexicana*. Un análisis filogenético reveló que estas dos especies comparten grupos de proteínas de superficie únicos del género que podrían estar relacionados con las características patológicas específicas de las leishmaniasis provocadas por esta especie así como de las interacciones ente el parásito y la célula hospedera.(37)

La *L. amazonensis* se relaciona en muchos casos con formas anérgicas de la enfermedad, se piensa que la respuesta inmune del huésped infectado con esta especie parásita juega un papel muy importante en las manifestaciones clínicas que se presentan y en su gravedad.(38) Existe una interacción entre una proteína de choque térmico de *L. (L.) amazonensis* y receptores de mamíferos implicada en la inhibición de respuestas inmunitarias importantes, tales como la producción de citoquinas y de óxido nítrico.(37)

Es importante hacer hincapié en que los mecanismos genéticos que determinan susceptibilidad y/o resistencia a la infección dependen en al menos dos componentes: uno asociado a la capacidad de los macrófagos para apoyar o inhibir la multiplicación del parásito y otro al control de la magnitud, calidad, y reacción del sistema inmunológico contra antígenos del parásito.(39) Las infecciones por *Leishmania amazonensis* y *Leishmania braziliensis* disminuyen la producción de óxido nítrico (NO) por macrófagos activados, constituyendo este uno de los mecanismos empleados por el macrófago para eliminar el parásito, esto contribuye a disminuir la respuesta inmune del huésped y la eliminación del parásito. Los promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis* son capaces de inducir la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Las NETs constituyen trampas formadas por proteínas granulosas, ADN e histonas liberadas por los propios neutrófilos para combatir agentes infecciosos como bacterias y hongos pero que a su vez causan la muerte de los propios neutrófilos.(40)

1.5.1 Formas clínicas de la leishmaniasis causadas por *L. amazonensis*.

L. amazonensis tiene la capacidad de causar gran parte de las formas clínicas conocidas de leishmaniasis, por lo que podría considerarse una especie atípica en este sentido. Estas incluyen las tres formas clínicas básicas (leishmaniasis cutánea (LC), mucocutánea (LMC) y visceral (LV) y algunas otras más específicas como leishmaniasis cutáneo difusa (LCD) y post kala-azar (LDPK) ambas de muy difícil tratamiento.(38, 41)

Leishmaniasis cutánea

En nuestro continente las lesiones cutáneas provocadas por *Leishmania* son denominadas en general leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) o leishmaniasis cutánea americana. Las lesiones sintomáticas pueden dividirse en: leishmaniasis cutánea localizada, leishmaniasis cutánea difusa y leishmaniasis dérmica post kala-azar y leishmaniasis mucocutánea.(42)

- *Leishmaniasis cutánea localizada*

La LCL puede presentarse como una o múltiples lesiones ulcerosas a nivel de la piel (figura 6). Pueden ser de diferentes formas (cromomicoide, furunculoide, esporotricoide, lupoide, de tipo tumoral, etc). Tienden a autolimitarse y curar espontáneamente. Después de que la hembra de *Lutzomyia* pica al huésped para alimentarse de sangre, aparecen unas machas eritematosas con ligero tinte violáceo, que en el paciente produce una sensación de quemadura y prurito. Luego de tres a ocho días después de la picadura aparece una pequeña pápula indurada que puede o no ser eritematosa con una vesícula en su vértice, esta crece hasta formar una pústula que a los pocos días se ulcera con la aparición de una costra central evidente. Hacia la tercera semana la lesión toma su forma típica, con una superficie roja granulosa limpia con bordes duros ligeramente levantados.(43, 44)



Figura 6. Pacientes afectados por leishmaniasis cutánea localizada

- *Leishmaniasis cutánea difusa*

Fue descrita por primera vez por Barrientos en Bolivia. La LCD difusa es una enfermedad crónica, caracterizada por la presencia de anticuerpos no protectores y respuesta inmune celular casi nula frente al parásito de *Leishmania* (anergia), este hecho conduce a la reproducción incontrolada del parásito y a su diseminación a través de la piel en un paciente susceptible. Las especies *amazonensis*, *mexicana*, *aethiopica* y *braziliensis* son las que han sido identificadas en pacientes con esta enfermedad. La respuesta inmune predominante es de tipo Th2 (tipo humoral). Por la característica de las lesiones es importante hacer el diagnóstico diferencial de otras etiologías como linfomas, de la xantomatosis múltiple, la blastomycosis sudamericana, la sífilis terciaria y la paracoccidioidomicosis.(45, 46)

Después de la picadura clínicamente pueden aparecer pápulas, placas o nódulos eritematosos del color de la piel, estas lesiones no se ulceran a no ser que sufran traumatismos (figura 7) Las lesiones pueden ser simétricas o asimétricas y pueden experimentar periodos de cicatrización y recaída o permanecer con modificaciones escasas por meses o años y diseminarse por toda la superficie corporal respetando cuero callado, planta de los pies y palmas de las manos. El compromiso mucoso es transitorio y no produce inflamación severa. Histopatológicamente, se observa epidermis generalmente atrófica en algunos casos con hiperqueratosis e infiltrado de polimorfonucleares. En la dermis se observan infiltrados macrofágicos con gran cantidad de parásitos fagocitados, así como escasos linfocitos y plasmocitos.(46, 47) Puede existir daño a los tejidos profundos que persiste indefinidamente y resulta incurable en algunos casos.



Figura 7. Pacientes afectados por leishmaniasis cutánea difusa

- *Leishmaniasis dérmica post kala-azar*

Esta forma clínica es una secuela de la leishmaniasis visceral, es poco frecuente, se presenta entre seis meses y varios años después de la curación aparente de la leishmaniasis visceral o kala-azar requiriendo un tratamiento prolongado.

Se caracteriza por una erupción macular, papular o nodular localizada habitualmente en la cara, los brazos, el tronco y otras partes del cuerpo. Se considera que las personas afectadas son una fuente potencial de infección. Figura 8.(27, 41, 48)



Figura 8. Pacientes que presentan leishmaniasis dérmica post kala –azar.

Leishmaniasis mucocutánea

La LMC es un proceso inflamatorio crónico que resulta como complicación de la LC que por diseminación del parásito por vía sanguínea y linfática compromete la mucosa del tracto respiratorio alto (mucosa nasal, faríngea y laríngea) produciendo destrucción tisular y desfiguración. En otros casos puede afectar labios y mejillas (figura 9). Si la patología no se trata puede conducir a la muerte del paciente. La destrucción del tejido mucoso es debida la respuesta inmune más que a efectos tóxicos del parásito. Se conoce que en procesos inflamatorios crónicos, los macrófagos y fibroblastos, bajo el estímulo de citoquinas proinflamatorias producidas por linfocitos, secretan metalo proteinasas (proteasas) que degradan el cartílago y colágeno. El mecanismo exacto de cómo el parásito evade al sistema inmune, logrando diseminarse en el tejido mucoso aún no se conoce(49) Esta patología es de difícil tratamiento y al igual que la LC se pueden presentar co-infecciones bacterianas y micóticas.

La enfermedad nasal puede causar la perforación de la región cartilaginosa septal, progresando en extensión y profundidad, determinando una periostitis cartilaginosa y ósea de la nariz, región palatina y macizo facial originando la nariz de tapir y la cruz espundia.(45) A nivel de la faringe puede producirse pérdida de la úvula, pegamiento del velo del paladar a la pared faríngea posterior y estrechamiento faríngeo debido a fibrosis amigdalina. A nivel laríngeo puede causar ronquera, aspiración y sofocación.



Figura 9. Pacientes afectados por leishmaniasis mucocutánea

Leishmaniasis visceral

Los síntomas pueden aparecer de una forma muy gradual o abruptamente. Al picar el flebótomo el parásito invade las células del sistema retículo–histiocitario, se reproduce y se disemina por vía linfática o sanguínea hasta los macrófagos de médula ósea, hígado y bazo. La leishmaniasis visceral es cada vez más frecuente como infección oportunista en pacientes infectados por el VIH. Los síntomas predominantes son fiebre intermitente, malestar general, astenia, anorexia, enflaquecimiento progresivo, palidez y hemorragias. Los signos clínicos son hepatoesplenomegalia, micropoliadenopatías, anemia y signos de desnutrición (figura 10). Frecuentemente hay enfermedades intercurrentes como neumonía y tuberculosis. El diagnóstico y tratamiento oportuno y adecuado son de importancia para evitar las complicaciones y la mortalidad.(50)



Figura 10. Pacientes afectados por leishmaniasis visceral

1.6. Tratamiento de la leishmaniasis.

El tratamiento de esta parasitosis varía de acuerdo al tipo de leishmaniasis, la severidad de la enfermedad, el lugar donde se infecta el individuo y el estado nutricional e inmunológico del paciente. Debido a que la respuesta ante la terapia no es la misma y varía entre uno u otro individuo, existen varios esquemas terapéuticos que incluyen a fármacos de primera y segunda línea.(51, 52)

Fármacos de primera línea:

Son aquellos basados en antimonio pentavalente (SbV) tales como estibogluconato sódico (Pentostam ®) usado principalmente en Europa y el antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime ®) en el nuevo mundo, considerándose equivalentes en términos de eficacia clínica, efectos secundarios, farmacocinética y mecanismos de acción(53) (Anexo 2).

Fármacos de segunda línea:

Entre estos se encuentran el isotionato de pentamidina, la anfotericina B, la paramomicina y la miltefosina. (Anexo 2)

1.7. Estudios *in silico* ref ensayos *in vivo* e *in silico*

La modelación de los fenómenos naturales es una práctica que se inició hace ya algunos años. Con el avance de la tecnología, la posibilidad de modelar los fenómenos naturales se ha hecho cada vez más común, debido a la velocidad a la que se pueden resolver los modelos con la ayuda de las ciencias informáticas. La interrelación de las ciencias biológicas con las ciencias de la computación y la ingeniería han permitido construir y resolver modelos matemáticos que permiten llevar a una computadora un determinado fenómeno.

Podría decirse que los modelos matemáticos computacionales o modelos *in silico* no tienen desventajas, no producen grandes gastos y permiten progresar intelectualmente sobre un determinado fenómeno, pensando en las variables que podrían influir sobre él. Estos modelos permiten simular situaciones reales, modificando los valores de las variables involucradas en un amplio rango de valores y contrastarlos con los valores reales. De esta manera nos mostrarán comportamientos que quizá llevaría décadas obtener de la observación o de la experimentación. La deficiencia actual de estos modelos radica en el escaso conocimiento necesario que existe a nivel biológico de los fenómenos y la interacción de estos con otros fenómenos.(39, 40)

El avance de los modelos *in silico* ha sido importante y ya hay quienes plantean el reemplazo de experimentos con animales por experimentos en simuladores. A modo de conclusión podríamos decir que el modelo que se va a utilizar para

estudiar un fenómeno natural no es ajeno al principio de las tres Rs que rige en las áreas básicas de las ciencias biomédicas donde la experimentación con animales es corriente. Las tres Rs propuestas por este principio: Reemplazar modelos *in vivo* cuando sea posible, Refinar las técnicas y metodologías de manera de obtener resultados más fiables y Reducir el número de animales para trabajos *in vivo* sin duda abren más aún las puertas a los modelos *in silico*. No hay duda de que, con el avance de la informática, la tecnología y la mayor cantidad de científicos en el área de la modelación *in silico*, el progreso de estos modelos los llevará a ocupar un lugar de elección entre los investigadores.(40, 54)

1.7.1 Estudios QSPR/QSAR

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 son herramientas de gran valor y constituyen enfoques cuantitativos cuya finalidad es encontrar relaciones entre la estructura molecular y las propiedades/actividades moleculares medidas o calculadas.(46) Datan de 1868 y desde entonces se han aplicado a la modelación de disímiles propiedades moleculares de naturaleza física, química y biológica.(55, 56)

Los métodos QSAR/QSPR se basan en la representación de la estructura molecular a través de descriptores moleculares, los cuales son relacionados con la actividad o propiedad biológica mediante técnicas quimioinformáticas (37). Los principios de la metodología QSAR pueden describirse mediante los siguientes pasos comunes: (40, 57)

- 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.(40)

1.7.2 Descriptores o Índices Moleculares

Los Descriptores o Índices Moleculares (DMs o IMs) definidos 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). Juegan un papel fundamental en los estudios *in silico* pues pueden brindar una visión más amplia en la interpretación de las propiedades moleculares y/o son capaces de tomar parte en un modelo para la predicción de notables propiedades moleculares (46).

Los DMs pueden ser clasificados de acuerdo a la naturaleza en su definición y la complejidad de los rasgos moleculares estructurales que codifican, de forma general según las dimensiones que abarcan en:

- DMs-0D (Descriptores Constitucionales) se obtienen directamente de la fórmula molecular y son independientes de cualquier conocimiento sobre la estructura molecular, ej. número de átomos (A), el peso molecular (MW), conteo de átomos-tipo (Nx) o cualquier función de las propiedades atómicas.
- DMs-1D (Descriptores Unidimensionales) que están basados en la representación unidimensional de la molécula (o representación que consiste en una lista de fragmentos estructurales de la molécula), aunque no requieren del conocimiento completo de la estructura molecular, por ejemplo descriptores de búsqueda y análisis subestructural, como los Descriptores de Conteo de Fragmentos.
- DMs-2D (Descriptores Bidimensionales, Invariantes de Grafos) que son índices basados en la representación bidimensional o topológica de la molécula, o sea, que consideran la conectividad de los átomos (vértices) en la molécula (pseudografo) en términos de la presencia y naturaleza de los

enlaces químicos (aristas), por ejemplo Perfiles Moleculares, Índices de Información Topológica

- DMs-3D (Descriptores Tridimensionales) que constituyen índices basados no solo en la naturaleza y conectividad de los átomos, sino también en la configuración espacial de la molécula, por ejemplo Descriptores WHIM, MoRSE-3D, Índices de Similitud, Descriptores de Superficie/Volumen, Químico-Quánticos.

- DMs-4D (Descriptores Tetradimensionales) que son descriptores basados no solo en la configuración espacial de la molécula, sino también en los campos escalares de interacción que se originan como consecuencia de la distribución electrónica en dicha entidad química, por ejemplo Valores de la Energía de Interacción.(46)

Descriptores del software DRAGON.

El DRAGON es un software profesional para el cálculo de descriptores moleculares (figura 11).(57) En él podemos encontrar más de 3000 descriptores moleculares en familias 0D, 1D, 2D así como 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.



Figura 11. Software DRAGON 5.5 utilizado para calcular los descriptores moleculares.

1.7.3 Algunos softwares empleados en los estudios *in silico*

1.7.3.1 WEKA

WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis, o en español «Entorno para análisis del conocimiento, de la Universidad de Waikato») (figura 12) es una plataforma de software libre para el aprendizaje automático y la minería de datos escrito en Java.(58)



Figura 12. WEKA. Plataforma de software para el aprendizaje automático y la minería de datos.

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. WEKA soporta varias tareas estándar de minería de datos, especialmente, pre-procesamiento 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 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).(10) 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.(59)

1.7.3.2 ChemAxon

ChemAxon es una plataforma integrada de programas y herramientas para tareas quimioinformáticas fundamentalmente. Incluye un conjunto de componentes especializados en la búsqueda en bases de datos químicos, la edición y visualización de las estructuras químicas, la predicción de las propiedades físico-químicas de moléculas y otras herramientas para la

manipulación de estructuras químicas. Varios de estos componentes pueden ser accedidos a través de la Interfaz gráfica de usuarios, la Interfaz para la programación de aplicaciones o la línea de comandos.(60)

1.7.3.3 JChem

JChem para Office integra el manejo de estructuras y capacidades de visualización de dentro de un entorno de Microsoft Office. Incluye JChem para Excel que es una integración con el Excel. Con JChem para Office, la química se realiza en vivo en su aplicación de Office y las estructuras son totalmente compatibles dentro de hojas de cálculo, documentos, diapositivas y correos electrónicos. Su implementación es robusta con carga rápida / desplazamiento de miles de filas de estructura y copiar y pegar en toda la suite Microsoft Office. Su funcionalidad más avanzada incluye: cálculos basados en estructuras, la descomposición de grupos R y enumeración de bibliotecas.(60)

Las principales características de JChem para Excel son

- Estructuras de importación y los datos de las bases de datos y archivos.
- Exportar datos a archivos.
- Añadir, estructuras de edición.
- Ordena, estructuras de filtro y los datos asociados.
- Descomposición R- grupos.
- Funciones de Excel personalizada químicos para el cálculo de las propiedades de la estructura.(60)

1.7.4 Métodos quimiométricos en estudios QSAR

La quimiometría es una disciplina que colecciona instrumentos matemáticos y estadísticos para tratar con datos químicos complejos. Las estrategias de caracterización principales son: los enfoques multivariados al problema en cuestión, la búsqueda de información relevante, la validación de los modelos para derivar objetos matemáticos con alto poder predictivo, la comparación de los resultados obtenidos usando diferentes métodos, y la definición y uso de índices capaces de medir la calidad de la información extraída y los modelos obtenidos.

La quimiometría es el instrumento más útil en estudios QSAR y QSPR, en los cuales 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 predictiva de los modelos (estimado 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.(61)

1.7.5 Diseño experimental

Los procedimientos estadísticos para planear un experimento, es decir coleccionar datos apropiados que, después del análisis por métodos estadísticos, causan conclusiones válidas es a lo que se le conoce como diseño experimental. El diseño incluye la selección de unidades experimentales, así como la especificación de las condiciones de estas unidades, (es decir la especificación de factores cuyo efecto será estudiado en el resultado del experimento), la especificación del nivel de los factores implicados y la combinación de tales factores, la selección de respuesta para ser medida, y la opción del modelo estadístico para ajustarlos.(46, 62)

1.7.6 Análisis de Conglomerados (AC).

Además de las técnicas de aprendizaje supervisado, se utilizan técnicas de aprendizaje no supervisado, en la cual se conforman “clases” a partir de variables predictivas conocidas sin que haya un conocimiento previo (maestro o supervisor) sobre la clase a que pertenece cada instancia, a veces, ni siquiera, sobre el número de clases a considerar. Se trata de “agrupar” o más bien “separar en grupos”, a instancias similares entre sí y diferentes de otros grupos. Las técnicas estadísticas clásicas fueron denominadas técnicas de detección de “agrupamientos” o de “conglomerados”, en inglés cluster. Estos métodos representan un caso especial del análisis exploratorio de datos, enfocados a agrupar objetos similares en el mismo conglomerado y objetos menos similares en conglomerados diferentes.(46) El Análisis de Conglomerados está basado en la evaluación de la similitud/disimilitud de todos los pares de objetos del conjunto de datos.

Esta información se reúne en la matriz de similitud o en la matriz de distancia de datos. Los métodos estadísticos de análisis de conglomerados incrementan indefinidamente su variedad por dos factores: las infinitas posibles formas de considerar las “distancias” o “similitud” entre casos y las formas de “aglomerar”. Las distintas variantes de distancias son objeto de muchas investigaciones actuales. Los métodos de aglomerar más populares son los Métodos Aglomerantes Jerárquicos (ej. de Unión Promedia, de Unión Completa, de Unión Simple, de Unión Promedia Ponderada, etc.), los cuales son más ampliamente usados que los Métodos Divisivos Jerárquicos. Otros métodos populares son los Métodos no-Jerárquicos, tales como el Método de las K-medias y el Método de Jarvis-Patrick. Las técnicas de Análisis Factorial, en particular el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis de Componentes Principales Categóricos, son métodos “traspuestos” al análisis de AC. En lugar de unir casos en AC ellos unen variables en “factores”, “dimensiones”, “constructos”, “variables latentes” o “componentes principales”, de manera que se reduce el número de variables a considerar a la vez, sustituyéndolas por estas nuevas variables, no directamente observables, pero que expresan las dimensiones principales de la muestra y mantienen la mayor parte de la varianza de la misma.(46)

1.7.7 Métodos de Clasificación

Las técnicas de inteligencia artificial (IA) se desarrollan para simular el intelecto humano en la computadora. En la IA no se “calcula una solución” como el caso de las técnicas estadísticas sino se “busca una solución” (heurística) mediante los procedimientos computacionales automáticos que aprenden de las series de ejemplos. Los métodos de clasificación se utilizan para la asignación de objetos a una de varias clases basado en una regla de clasificación. Son métodos de aprendizaje supervisado, pues se “aprende” 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”). Tal es el caso también del clásico método de regresión; solo que en los problemas de clasificación la función objetivo o variable dependiente es discreta (nominal u ordinal), es una clase. 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. (6). Los Métodos de Clasificación de origen estadístico más populares son: Análisis Discriminante Lineal, Análisis Discriminante Cuadrático, Análisis Discriminante Regularizado, K-ésimos Vecinos más Cercanos, Métodos de Árboles de Clasificación, entre otros.(63)

Se pueden encontrar además varios métodos de clasificación o de análisis supervisado dentro de la IA, en particular las redes neuronales, con muchas posibilidades de aplicación en nuestro campo por su capacidad de tratar problemas con niveles mucho más libres de las variables predictivas y cuya función objetivo representa combinaciones esencialmente no lineales de ellas difíciles de representar por una ecuación de regresión, por complicado que se plantee el modelo no lineal de la misma. Las Redes Neuronales Artificiales representan un conjunto de métodos matemático-computacionales, modelos y algoritmos diseñados para imitar los métodos de adquisición del conocimiento y procesamiento de la información del cerebro humano. Son especialmente apropiadas para tratar con relaciones y tendencias no-lineales y se han propuesto para enfrentar una gran variedad de problemas tales como: la exploración de datos, reconocimiento de patrones, modelación de respuestas continuas y categorizadas, problemas de respuesta múltiple, etc.(63)

Se plantea que no es posible lograr con un único clasificador la respuesta óptima y se plantea entonces la necesidad de “multiclasificadores” que combinen de alguna manera, las respuestas de varios clasificadores. La calidad de los modelos de clasificación se evalúa por los parámetros de clasificación, para ambos, para propósitos de ajuste y predicción.(40) Existe toda una teoría, y técnicas concretas para el análisis y la comparación de diferentes modelos de clasificación ante problemas específicos.(63)

1.7.8 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 atributo establece 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).(64)
- 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).(65)
- 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.(48)

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

- BestFirst: Búsquedas del espacio de subconjuntos de atributos por hillclimbing codiciosos aumentada con una instalación de retroceso. Ajuste del número de nodos, la búsqueda hacia adelante y hacia atrás, y la búsqueda en ambas direcciones (considerando todas las posibles adiciones y supresiones de atributos individuales en un momento dado)
- GeneticSearch: Realiza una búsqueda usando el algoritmo genético simple descrito en Goldberg (1989).(66)

- LinearForwardSelection (Extensión de BestFirst. Toma un número restringido de k atributos en cuenta. Fija -set selecciona un número k fijo de atributos, mientras que k va aumentando en cada paso cuando se selecciona de ancho fijo. La dirección de búsqueda puede ser hacia delante, o flotando hacia adelante la selección (con opciones atrasadas para pasos de búsqueda).(67)

- RankSearch: Utiliza un evaluador atributo / subconjunto para clasificar todos los atributos. Se informa el mejor conjunto de atributos.(67)

- SubsetSizeForwardSelection: Ampliación de LinearForwardSelection. La búsqueda realiza una validación cruzada interior (se pueden especificar semilla y número de pliegues).(67)

1.7.9 Regulaciones de los métodos QSAR

Las políticas recientes para el desarrollo de nuevos compuestos químicos, están poniendo un desafío enorme en los QSAR, y ha surgido la necesidad de desarrollar una guía internacional para la aceptación de las buenas prácticas en la modelación QSAR, con el ánimo de promover la disponibilidad de QSARs válidos para su uso regulatorio en toxicología, y más recientemente en la identificación de actividades biológicas.(61) En noviembre del 2004, los países miembros de la OECD (siglas acrónimas en ingles de Organization for Economic Cooperation and Development) adoptaron cinco principios para la validación de modelos QSAR para principios regulatorios, los cuales son conocidos actualmente como los Principios de la OECD para la Validación de los QSAR. De acuerdo con estos principios, y en aras de facilitar su consideración para principios regulatorios, un modelo QSAR debería ser asociado con la siguiente información:

1. Un punto de medición definido.
2. Un algoritmo no ambiguo.
3. Un dominio de aplicación definido.
4. Medidas apropiadas de bondad de ajuste, robustez y predictibilidad.
5. Una interpretación mecanística, si es posible.(68)

El aspecto 3 de estos principios de la OECD, el dominio de aplicación (DA), es de una importancia considerable en las tres fases del ciclo de vida de un QSAR (desarrollo, validación y aplicación). Este concepto debe ser aplicado durante el desarrollo del modelo para asegurar que el dominio es definido lo más ampliamente posible para un nivel deseado de predictibilidad. En general un modelo debe ser generalmente construido con una gran aplicabilidad, sacrificando en alguna medida el nivel de predictibilidad, (modelos globales) o en otro caso, modelos con poca aplicabilidad y una gran predictibilidad (modelos locales), estos últimos por ejemplo, para clases específicas de compuestos químicos. Un problema crucial de cualquier estudio QSAR es la identificación del dominio de aplicación (DA) de un modelo de clasificación o de regresión. Pues, en efecto solo son válidas las predicciones para aquellos compuestos que estén dentro del dominio de aplicación. El DA es aquella región teórica en el espacio químico, definido por los descriptores del modelos y la respuesta modelada, y por todo esto a su vez por la naturaleza de los compuestos de la serie de entrenamiento, representado en cada modelo por descriptores moleculares específicos. Se puede decir por lo tanto, que el DA de un modelo QSAR es “el rango dentro del cual es tolerada una nueva molécula. El dominio de aplicación de un modelo QSAR es la respuesta y el espacio químico estructural en el cual el modelo realiza predicciones con una fiabilidad dada, por ejemplo, un compuesto registrado en REACH (Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals) que se encuentre dentro del DA del modelo. Por lo que no se puede pretender extrapolar el uso de los modelos QSAR para aquellos tipos de compuestos que están fuera del dominio de aplicación.(63)

Actualmente, existen varios enfoques para evaluar el DA de los modelos QSAR. (Para la RLM (Regresión Lineal Múltiple), es usado el *leverage* (h), una medida basada en distancias. A través del enfoque del *leverage* es posible verificar si un nuevo compuesto está dentro del dominio de aplicación del modelo, el valor de h de un compuesto mide la influencia de este en el modelo. Los valores de *leverage* pueden ser calculados para los compuestos de la SE y nuevos compuestos. En el primer caso, son útiles para encontrar aquellos compuestos que influyen los parámetros del modelo, y que lo convierten en

un modelo inestable. En el segundo caso, son útiles para chequear el dominio de aplicación del modelo.(46) El *leverage* crítico es el valor de corte realizado para el modelo en una base de datos. Valores por encima de este *leverage* crítico son considerados no fiables. Solo las estructuras químicas predichas que pertenezcan al dominio de aplicación deben ser propuestas.

1.7.10 Métodos de cribado virtual basados 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*.(63) 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.(69)

Materiales y métodos

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se describe todo el proceso realizado como parte de la investigación hasta identificar nuevos compuestos con potencial actividad contra *Leishmania amazonensis* a través del cribado virtual de una base de datos internacional. Se parte de la de la construcción minuciosa de una base de datos, la representación química de los compuestos y el cálculo de descriptores moleculares; continuando con el desarrollo de los modelos y su empleo en la predicción e identificación final de compuestos que potencialmente podrían presentar acción antileishmaniásica.(70)

2.1 Gestión de la data y parametrización de la estructura química.

Todos los compuestos incluidos en la investigación, al igual que su perfil biológico, fueron recopilados de bioensayos publicados en PubChem,(71) los cuales consisten en estudios realizados en específico para promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis* reportados por varias revistas de alto impacto en la *Web of Sciences*,(72-78) en el período (1983-2015).(13, 71, 79, 80)

Al inicio fueron recopilados un total de 423 compuestos, probados contra promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis*. Poner también Los compuestos que aparecían en más de un artículo se analizaron detenidamente tomando los valores obtenidos en aquellos experimentos cuya metodología era más precisa. Además se extrajeron los datos relacionados con la forma del parásito en que se realizó cada experimento, el valor reportado de IC₅₀, las características del procedimiento llevado a cabo en el ensayo, así como la masa molar y la estructura química a partir de los SMILE canónicos.

El proceder tenido en cuenta para la evaluación de compuestos en promastigotes de *L. amazonensis* se describe a continuación:(81-84) Se mantuvieron los promastigotes a 26°C en medio Schneider suplementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich S.A., St. Louis, MO, EE.UU.). Las pruebas se realizaron en platos de 96 pozos para 72 h a 26°C con el inóculo inicial a diferentes concentraciones, la viabilidad del parásito fue evaluada un ensayo de tinción-reducción empleando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl bromuro del tetrazolium (MTT). Después de la incubación por 30

minutos se midieron las densidades ópticas (DO) en el espectrómetro a 570 nm.(74)

El procedimiento seleccionado para la evaluación de la actividad de los compuestos sobre la forma amastigote del parásito fue el siguiente:(85-87) Se sembraron 100µL de amastigotes axénicos en platos de 96 pozos de fondo plano. Se probaron los compuestos puros a diferentes concentraciones en DMSO. Después de 72 h de incubación se agregó a cada uno MTT (10 mg/mL. incubando 4 h. La reacción enzimática fue detenida entonces con 100µL de 50% 2-propanol-10% dodecilsulfato de sodio e incubado 30min adicionales bajo la agitación a la temperatura del cuarto. Finalmente, se leyó la densidad óptica (DO) a 570nm. El % de inhibición de ambas formas del parásito se calculó a través de la fórmula:

$\% \text{ de inhibición} = (\text{DO control} - \text{DO compuesto}) \times 100 / \text{DO control}.$

El parámetro empleado para clasificar a los compuestos en activos e inactivos fue la IC₅₀; considerándose como activos contra promastigotes aquellos que tras su evaluación presentaban un valor de IC₅₀ menor o igual a 1,5 µM, e inactivos los que no cumplían dicho requisito. Por otra parte para el caso de los compuestos probados contra amastigotes fueron considerados activos aquellos con valor de IC₅₀ menor o igual a 15 µM. La base de datos quedó conformada por 373 compuestos ensayados contra ambas formas del parásito de los cuales 116 compuestos habían sido ensayados contra promastigotes y los restantes 257 compuestos contra amastigotes respectivamente.

En nuestro estudio todos los cálculos se efectuaron en un ordenador (PC) Intel(R) Core™ i5-2500 CPU @ 3.30GHz. Todas las estructuras (373 en total) fueron representadas usando el módulo Chemdraw Ultra del software ChemOffice 2005 ver. 9.0(76) y luego exportadas como fichero con extensión .mol del tipo MDL. Antes de proceder al cálculo de las variables las estructuras fueron curadas y estandarizadas utilizando el módulo Standardizer del paquete ChemAxon para añadir hidrógenos explícitos, neutralizar cargas y remover sales que pudiesen afectar el cálculo. La eliminación de compuestos repetidos se llevó a cabo con el programa ISIDA(78) y el módulo EdiSDF versión 5.03 para Windows.

Una vez realizados estos procedimientos, los ficheros obtenidos en formato SDF se empleó el programa DRAGON(78) donde se calcularon las diferentes familias de descriptores moleculares de 0-2D, obteniendo un conjunto de más de 2000 DMs, eliminando las variables constantes, cercanas a constantes y con una correlación mayor al 90%. Los datos se almacenaron en matrices del Excel auxiliándonos para ello de JChem para Office que integra el manejo de estructuras y capacidades de visualización de dentro de un entorno de Microsoft Office y la herramienta JChem para Excel. Las filas representan los compuestos químicos (casos) y las columnas a los DMs (variables).

2.2. Estrategias computacionales. Análisis estadístico de los datos.

Como regla general un modelo QSAR intenta establecer una correlación matemática entre la estructura de un grupo de compuestos químicos y su actividad biológica mediante el empleo de DMs. La figura 13 muestra la estrategia general para el desarrollo de estudios QSAR.



Figura 13. Esquema general para la obtención de un modelo QSAR.

Para verificar la diversidad estructural de los compuestos de la base de datos se realizaron Análisis de Conglomerados (AC) implementados en el paquete de procesamiento *STATISTICA 8.0*. Este grupo de técnicas permite evaluar la distribución y diversidad estructural existente dentro de los grupos de compuestos activos e inactivos.

Como primer paso se realizó un análisis de conglomerados jerárquico que nos permitió conocer el número óptimo de conglomerados necesario para subdividir

los compuestos incluidos en la base de datos. Con posterioridad, los conjuntos de 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).(88-90)

De cada conglomerado se seleccionaron, de forma aleatoria, los compuestos para la conformación de la serie de entrenamiento (SE) y serie de predicción (SP) en una razón 3:1, respectivamente. Este procedimiento asegura que las clases químicas (determinadas por los conglomerados derivados de *k*-MCA) estén representadas en ambas series de compuestos.(88-90) Los compuestos incluidos en la SP nunca fueron usados en el desarrollo de los modelos cuantitativos.

Para la selección de atributos y el análisis estadístico se utilizó el WEKA 3.6 del 2009 para Windows.(59) Se emplearon varios evaluadores de atributos y métodos de búsqueda específicos para cada técnica de clasificación. Los mejores atributos seleccionados por cada método se introdujeron en el Big-DataSets Manager(91) mediante el cual pudimos obtener los ficheros finales que se emplearían para el desarrollo de los modelos por cada una de las técnicas de clasificación.

Las técnicas empleadas para obtener los modelos de clasificación fueron: *k* vecinos más cercanos (IBk), árboles de clasificación (J48), red neuronal artificial (MLP por sus siglas en inglés MultiLayer Perceptron) y máquina de soporte vectorial (SMO por sus siglas en inglés Sequential Minimal Optimization)(92) para obtener los mejores modelos capaces de predecir la actividad de los compuestos incluidos en las series de entrenamiento y predicción.

2.1 Obtención y validación de los modelos

La obtención de los modelos finales se llevó a cabo empleando los atributos seleccionados teniendo en cuenta la ley de parsimonia (*lex parsimoniae*) ó Rasurador de Ockham: “*Numquam ponenda est pluralitas sine necessitate*” o “La pluralidad nunca se debe postular sin necesidad (de ello)”, a la hora de seleccionar el mejor modelo por cada técnica, este debía poseer la significación

estadística más alta con la menor cantidad de variables posible pues cuando las explicaciones múltiples están disponibles para un fenómeno, se prefiere la versión más simple).(93, 94)

Se calcularon los parámetros estadísticos más utilizados en la literatura médico- estadística: la exactitud (**Q**), el coeficiente de correlación de Matthews (**C**), la sensibilidad (**Sens**), la especificidad (**Espec**) y la razón de falsos positivos (**FPr**)

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

$$FPr = 100 * FP / (FP +VN)$$

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

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

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

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

Para demostrar el poder predictivo de los modelos se desarrollaron procedimientos de validación externa, empleándose las series de predicción obtenidas mediante el análisis de conglomerados descrito en el epígrafe anterior (para compuestos evaluados en promastigotes y amastigotes respectivamente). En cada caso se determinaron los parámetros estadísticos antes mencionados los cuales nos permitieron promover la aceptación de estos modelos QSAR a favor de los órganos regulatorios.(65)

Posteriormente se realizó una búsqueda para obtener una serie de 'validación externa' para evaluar el desempeño de los modelos. Se revisaron nuevas publicaciones en el PubChem que fueran posteriores a la fecha de recopilación de los datos empleados para este trabajo; siguiendo los procedimientos de inclusión antes descritos. Desafortunadamente no se obtuvieron nuevos datos de compuestos evaluados contra amastigotes que cumplieran estos requisitos. Mientras tanto para los compuestos evaluados contra promastigotes si se consiguió recopilar un grupo de 22 compuestos (6 de ellos activos y 16 inactivos) que cumplieran los requerimientos de nuestro trabajo. Estos fueron

empleados para validar el desempeño de los modelos obtenidos para promastigotes.

2.2 Cribado de base de datos internacional.

El DrugBank es una base de datos internacional disponible en la Universidad de Alberta, que engloba en una fuente única, información bioinformática y quimioinformática, además de proporcionar datos sobre fármacos.(95) Se ha utilizado ampliamente con el objetivo de facilitar el descubrimiento *in silico*, el diseño de compuestos, la predicción del metabolismo de los fármacos y sus interacciones, así como para la educación farmacéutica en general (70). Contiene cerca de 4800 entradas, incluyendo más de 1480 pequeñas moléculas y 128 fármacos bióticos, todos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration por sus siglas en inglés), más de 3.200 fármacos experimentales y adicionalmente cerca de 2.500 secuencias de proteínas (70). Cada tarjeta de fármaco (DrugCard) contiene más de 100 campos de datos, la mitad de ellos en relación con la estructura química y la otra con la diana terapéutica. Los usuarios pueden realizar consultas de distintas formas. (69).Esta base de datos internacional fue cribada por los modelos obtenidos para identificar compuestos potencialmente activos contra promastigotes y amastigotes.

2.3 Sistema multclasificador ensamblado basado en modelos QSAR.

Cada modelo capta por separado una gran fracción de la información química contenida en la base de datos a través de los DMs que usa, esta fracción de información necesita complementariedad del resto de los modelos para su completitud. En el presente trabajo además de las técnicas individuales, se utilizó el sistema ensamblado de voto mayoritario personalizado con el fin de mejorar los resultados de los modelos obtenidos(96, 97) puesto que los multclasificadores ensamblados a partir de la combinación adecuada de varios clasificadores tienen una tendencia general a mejorar los resultados a obtener.(98, 99)

En esta técnica cada clasificador tiene un voto que tiene igual valor. En esencia, la clasificación más popular es la que resulta elegida por el conjunto

como decisión final. La variante más básica es el voto de la pluralidad, donde la clase con la mayoría de los votos gana.(100, 101)

Tras el cribado de la base de datos DrugBank y el ensamblado se procedió a la identificación, análisis y reporte de todas las estructuras de los compuestos identificados como potencialmente activos contra los promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis*, los cuales podrán ser empleados en futuras investigaciones para el tratamiento de las leishmaniosis causadas por esta especie de *Leishmania*.

Resultados y discusión

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados de la generación de los modelos a partir de la construcción de una nueva base de datos, el cálculo de DMs y la identificación de nuevos compuestos potencialmente activos contra promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis* mediante el cribado virtual de una base de datos internacional.

3.1 Gestión de la data. Parametrización de la estructura química.

De un total de 423 compuestos obtenidos a partir de ensayos del PubChem 375 cumplían el requisito de haber sido ensayados por el procedimiento antes mencionado en el epígrafe 2.1 por lo que fueron empleados para construir la base de datos inicial, de los cuales 117 son compuestos evaluados contra promastigotes y 258 ensayados contra amastigotes. El hecho de que todos hayan sido probados experimentalmente a través de ensayos en los que se emplearon procedimientos muy similares posibilita la obtención de una mayor veracidad en los resultados evitando la futura clasificación “errónea” de compuestos.

Los compuestos incluidos en la base de datos fueron obtenidos por síntesis química, otros a partir de extractos de plantas, mientras que otros son fármacos ya conocidos con propiedades farmacocinéticas y toxicológicas ya definidas. Presentan un alto grado de variabilidad estructural (figura 14), entre ellos encontramos familias estructurales fusionadas que incluyen a derivados del naftaleno, furano, piridina fosfatos, fenoles, cicloalcanos, grupos esteroidales, derivados del ácido salicílico, diamidinas aromáticas, arilquinuclidinas, pirimidinas sustituidas, sistemas heterocíclicos y cíclicos tanto saturados como insaturados, entre otros.

Se procedió a la curación y estandarización de la base de datos añadiendo hidrógenos explícitos, neutralizando cargas y removiendo a los que pudiesen afectar el cálculo. Luego empleamos el programa ISIDA(75) y el módulo EdiSDF, lo que permitió detectar dos compuestos repetidos, quedando entonces conformada la base de datos por finalmente por 116 y 257 compuestos evaluados contra promastigotes y amastigotes respectivamente

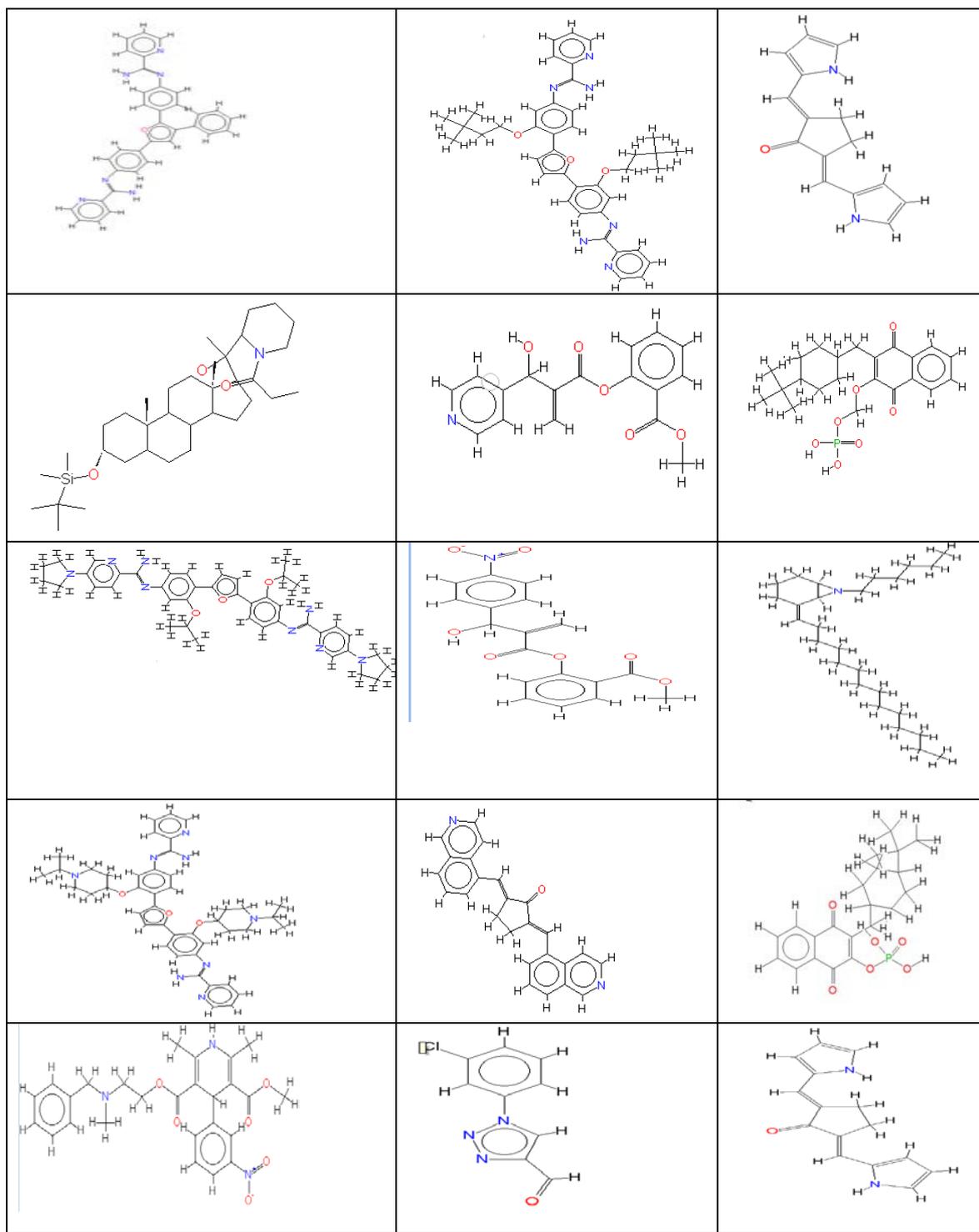


Figura 14. Representación de la variabilidad estructural de los compuestos incluidos en la base de datos.

Atendiendo al parámetro (IC_{50}) empleado para clasificar a los compuestos, la base de datos para promastigotes incluyó 53 compuestos activos y 63 inactivos, mientras para amastigotes la división presentó 128 inactivos y 129 activos; teniendo en cuenta en ambos casos los diferentes modos de acción y diversos patrones estructurales. Para establecer el valor de nos basamos en lo

establecido por otros autores para la determinación de la actividad de los compuestos ensayados tanto *in vivo* como *in vitro* para promastigotes y amastigotes, así como el valor de IC₅₀ que poseen en los diferentes ensayos los compuestos de referencia que son empleados usualmente en la terapéutica contra las formas de leishmaniasis causadas por *L. amazonensis*. Finalmente empleamos el programa DRAGON(78) para calcular las diferentes familias de descriptores moleculares de 0-2D obteniéndose 2489 variables.

3.2 Estrategias computacionales. Análisis estadístico de los datos.

La calidad de los modelos QSAR depende de forma crítica de la selección de los compuestos que son utilizados como SE para construir los modelos de clasificación. El aspecto más importante en la construcción de la SE es garantizar adecuada diversidad estructural de la data; lo cual permite explicar, en la medida de las posibilidades, lo mejor posible el espacio experimental.

Los compuestos activos e inactivos se dividieron a su vez en diferentes subconjuntos mediante dos análisis de conglomerados del tipo *k*-MCA.(88, 102, 103) Varios autores emplean este procedimiento para separar de la forma más homogénea y representativa posible los compuestos que conformarán las SE y SP respectivamente.(58, 62)El procedimiento empleado se refleja en la figura 15.

Como puede observarse en la figura 15-A la SE para promastigotes la SE quedó conformada por 86 compuestos de los cuales 39 son activos y 47 inactivos y la SP por 30 (14 activos y 16 inactivos). De igual manera se procedió para los compuestos probados experimentalmente contra amastigotes, (figura 15-B) donde la SE quedó constituida por 196 compuestos 98 activos y 98 inactivos y la SP por 61 compuestos (30 activos y 31 inactivos).

Para la selección de atributos el WEKA permite el uso de varios evaluadores de atributos, filtros y métodos de búsqueda específicos para cada técnica de clasificación Los resultados de los métodos y sus filtros correspondientes fueron filtrados empleando el Big-Datasets manager(91) el cual permite identificar las variables comunes en todos los archivos; las cuales se emplearon para desarrollar los modelos finales con las técnicas correspondientes.

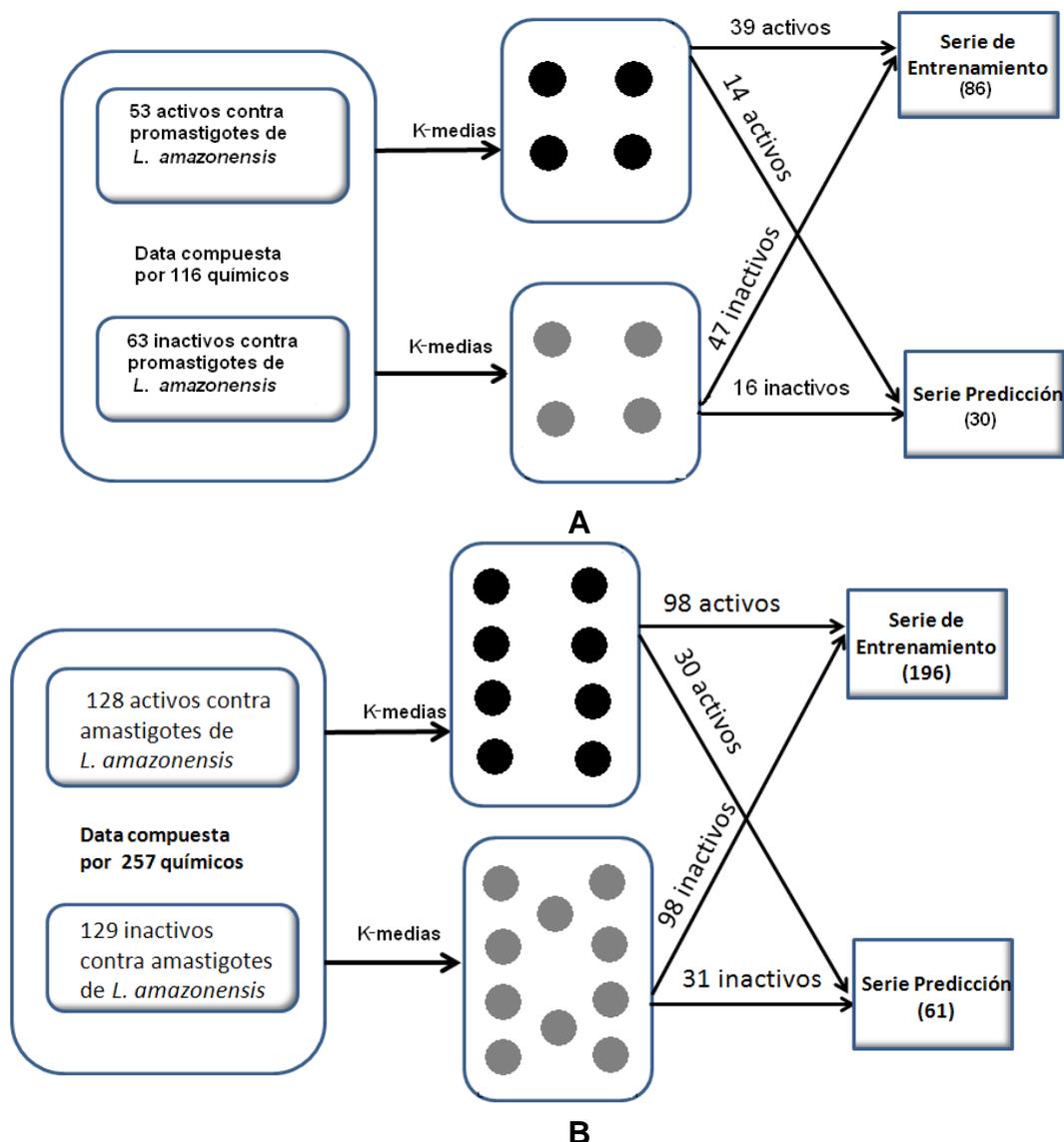


Figura 15. Algoritmo general utilizado para diseñar las series de entrenamiento y predicción empleando k-MCA. **A** promastigotes y **B** amastigotes.

A pesar de realizar una extensa revisión bibliográfica no encontramos en la literatura reportes de investigaciones en los que se empleen las técnicas de clasificación empleadas en nuestro trabajo para obtención de los modelos capaces de predecir la actividad antileishmaniásica en *L. amazonensis*, por lo que no tenemos referente de comparación en este sentido. Algunos autores han empleado técnicas QSAR para la obtención de modelos de regresión lineal y ADL en la especie de *Leishmania major*, obteniendo buenos resultados. Otros emplean métodos *in silico* para el descubrimiento de fármacos capaces de

inhibir determinada enzima presente en especies del parásito mediante docking,(1) o emplean métodos *in silico* que contribuyen al evaluar la farmacocinética y toxicidad de los compuestos a los que se les midió su actividad mediante ensayos *in vitro* o *in vivo* empleando como parámetro de medición de la actividad la IC₅₀.

3.2.1 Obtención de modelos empleando datos en promastigotes.

A continuación reportaremos los resultados relacionados con la obtención de modelos para promastigotes mostrando el algoritmo obtenido para el mejor modelo en cada caso y los parámetros estadísticos correspondientes a cada uno de ellos.

IBk: El modelo obtenido para 7 variables utilizó el siguiente algoritmo de clasificación para Weka:[-K 2 -W 0 -A neighboursearch.LinearNNSearch -A *ManhattanDistance* -R *first-last*] donde K es el número de vecinos más cercanos y W (*windowSize* o en español *tamaño de ventana*) obtiene el número máximo de instancias permitidas en la SE, (un valor de 0 significa que no hay límite para el número de instancias de formación, la adición de nuevos casos por encima de este valor se traducirá en casos viejos siendo removidos)

Este modelo clasificó correctamente un 89.53 % de las instancias para la serie de entrenamiento y un 83.33 % para la serie de predicción. En la tabla 1 se observan los valores obtenidos para la exactitud, sensibilidad, especificidad, coeficiente de correlación de Matthews, razón de falsos positivos y para las SE y SP destacándose el 100 % de sensibilidad reportado para la serie de entrenamiento.

Tabla 1: Parámetros estadísticos obtenidos en el modelo IBk

Serie	C	Q (%)	Sens(%)	Espec(%)	FP _r (%)
Entrenamiento	0.81	89.53	100.00	81.25	19.15
Predicción	0.68	83.33	92.86	76.47	25.00

Q exactitud; C coeficiente de correlación de Matthews; Sens Sensibilidad; Espec Especificidad; FPr Razón de falsos positivos.

J48: El modelo de clasificación de árbol con 8 variables tuvo como esquema algorítmico utilizado por Weka[-C 0.24 -M 3] teniendo que C (factor de confianza utilizado para la poda) donde valores menores incurren en un

incremento de la poda, M (*minNumObj*: número mínimo de instancias por hoja). Este árbol de clasificación mostró el valor más bajo de instancias clasificadas correctamente para la SE alcanzado por las cuatro técnicas con un 82.56 % y 76.67 % para la SP. En la tabla 2 se presentan los diferentes parámetros estadísticos obtenidos en este modelo reportándose como valor más significativo un 97.44 % de sensibilidad.

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

Serie	C	Q(%)	Sens(%)	Espec(%)	FP _r (%)
Entrenamiento	0.69	82.56	97.44	73.08	29.79
Predicción	0.55	76.67	85.71	70	31.25

Q exactitud; C coeficiente de correlación de Matthews; Sens Sensibilidad; Espec Especificidad; FPr Razón de falsos positivos.

MLP: La red neuronal artificial (*Multi-Layer Perceptron* por sus siglas en inglés o perceptrón multicapas) mostró mejores resultados en cuanto a número de instancias clasificadas correctamente con un 91.86 % en la serie de entrenamiento y un 80 % para la serie de predicción. Esta técnica utilizó 7 variables y su esquema algorítmico fue [-L 0.9 -M 0.4 -N 500 -V 0 -S 0 -E 20 -H 8] siendo L (*earningRate* o *intervalo de incremento*) que constituye la suma actualizada de los pesos, H (*hiddenLayers* o capas ocultas), define las capas ocultas de la red neuronal conformando una lista de números enteros positivos uno para cada capa oculta, separados por comas y 0 si no existen capas ocultas. El resultado final del modelo mostró valores satisfactorios en los diferentes parámetros estadísticos obtenidos los cuales se representan en la tabla 3 entre los que resalta una razón de falsos-positivos de 4.26 % para la serie de entrenamiento y cero para la serie de predicción.

Tabla 3 Parámetros estadísticos obtenidos para modelo MLP (Perceptrón Multicapas).

Serie	C	Q(%)	Sens(%)	Espec(%)	FP _r (%)
Entrenamiento	0.84	91.86	87.18	94.44	4.26
Predicción	0.64	80.00	57.14	100.00	0.00

Q exactitud; C coeficiente de correlación de Matthews; Sens Sensibilidad; Espec Especificidad; FPr Razón de falsos positivos.

SMO: El modelo final para la técnica máquina vectorial de soporte estuvo conformado por 8 variables y utilizó un esquema algorítmico [-C 90.0 -L 0.001 -P 1.0E-12 -N 0 -V -1 -W 1 -K.RBFKernel -C 250007 -G 0.9], en la cual C es

complejidad, *numFolds(-1)* (o incremento numérico) nos indica el número de pliegues de validación cruzada utilizados para generar datos de entrenamiento para modelos logísticos y *G* es el valor gamma. La serie de entrenamiento reportó un 91.86 % de instancias clasificadas correctamente como activas e inactivas con respecto al total y la serie de predicción o un 86.67 % siendo este modelo el de mejor ajuste en el presente parámetro. El resto de los parámetros estadísticos quedaron plasmados en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros estadísticos para el modelo máquina vectorial de soporte.

Serie	C	Q(%)	Sens(%)	Espec(%)	FPr(%)
Entrenamiento	0.84	91.86	89.74	92.11	6.38
Predicción	0.74	86.67	78.57	91.67	6.25

Q exactitud; C coeficiente de correlación de Matthews; Sens Sensibilidad; Espec Especificidad; FPr Razón de falsos positivos.

En la figura 16 se muestran los porcentajes obtenidos para los modelos. de clasificación para las series de entrenamiento y predicción de los modelos basados en los compuestos ensayados para promastigotes, resultando superiores los resultados en SVM seguidos por IBK y MLP respectivamente.

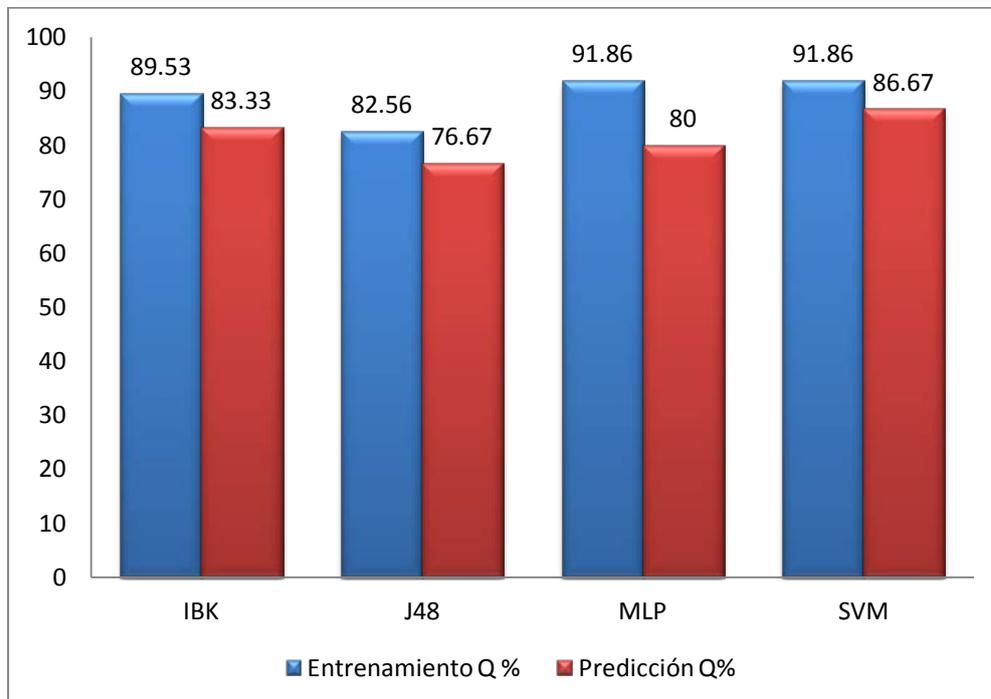


Figura 16. Porcentajes de clasificación para las series de entrenamiento y predicción en los modelos finales obtenidos.

Todos los modelos presentaron buenos estadísticos para la SP lo cual demuestra su alta predictibilidad. Los valores de exactitud para esta serie

fueron superiores en el modelo de máquina de soporte vectorial (86,67%), seguidos por IBk y MLP con 83,33 % y 80.00 % respectivamente.

3.2.2 Obtención de modelos empleando los datos en amastigotes

Los algoritmos y parámetros estadísticos correspondientes a los modelos obtenidos para la base de datos de amastigotes se describen a continuación.

IBk: El modelo utilizó el siguiente algoritmo de clasificación para Weka: [weka.classifiers.lazy.IBk-K3-W0-Aweka.core.neighboursearch.LinearNNSearch -A"weka.core.ManhattanDistance-Rfirst-last" -t IBk_training.arff -T IBk_Test.arff -o] para 7 variables siendo k el número de vecinos más cercano igual a 3 y con W=0 lo que significa que no hay límite para el número de instancias de formación. El modelo clasificó correctamente un 83.16 % de las instancias para la serie de entrenamiento y un 85.25 % para la serie de predicción (Tabla 5).

Tabla 5: Parámetros estadísticos obtenidos en el modelo IBk (Clasificador K-vecino más cercano).

Serie	C	Q (%)	Sens(%)	Espec(%)	FP _r (%)
Entrenamiento	0,66	83,16	84,69	82,18	18,37
Predicción	0,71	85,25	83,33	86,21	12,90

Q exactitud; C coeficiente de correlación de Matthews; Sens Sensibilidad; Espec Especificidad; FPr Razón de falsos positivos.

Si comparamos este modelo con el obtenido para la base de datos 1 podemos decir que aunque ambos poseen similares valores de exactitud y especificidad la razón de falsos positivos resulta en este caso ligeramente menor lo cual consideramos que puede estar relacionado con el valor de corte empleado en para la clasificación de los compuestos en activos e inactivos empleado en ambas bases de datos.

J48: El modelo de clasificación de árbol para amastigotes presentó 8 variables y el siguiente esquema algorítmico [weka.classifiers.trees.J48 -C 0.23 -M 3 -t J48_training.arff -T J48_Test.arff -o], alcanzado un 88,78% de clasificación correcta para la SE y 81,97% para la SP reportándose como valor más significativo un 91,84% de sensibilidad para el entrenamiento, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros estadísticos para el modelo J48 (Árbol de clasificación)

Serie	C	Q(%)	Sens(%)	Espec(%)	FP _r (%)
Entrenamiento	0,78	88,78	91,84	86,54	14,29
Predicción	0,64	81,97	83,33	80,65	19,35

Q exactitud; C coeficiente de correlación de Matthews; Sens Sensibilidad; Espec Especificidad; FPr Razón de falsos positivos.

MLP: La red neuronal artificial con algoritmo [weka.classifiers.functions.MultilayerPerceptron -L 1.0 -M 0.8 -N 500 -V 0 -S 0 -E 20 -H 10 -t MLP_training.arff -T MLP_Test.arff -o] para 8 variables mostró un número de instancias clasificadas correctamente de 80,10 % en la SE y 77,05 % para la SP, siendo el modelo de más bajos resultados en cuanto a exactitud y porcentaje de falsos positivos (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros estadísticos obtenidos para modelo MLP (Perceptrón Multicapas).

Serie	C	Q(%)	Sens(%)	Espec(%)	FP _r (%)
Entrenamiento	0,60	80,10	82,65	78,64	22,45
Predicción	0,55	77,05	83,33	73,53	29,03

Q exactitud; C coeficiente de correlación de Matthews; Sens Sensibilidad; Espec Especificidad; FPr Razón de falsos positivos.

SMO: El modelo final para la técnica máquina vectorial de soporte estuvo conformado por 7 variables y utilizó como esquema algorítmico [weka.classifiers.functions.SMO -C 100.0 -L 0.001 -P 1.0E-12 -N 0 -V -1 -W 1 -K weka.classifiers.functions.supportVector.RBFKernel -C 250007 -G 4.0 -t SVM_training.arff -T SVM_Test.arff -o] con complejidad C=100, reportándose para la serie de entrenamiento un 84,69% de instancias clasificadas correctamente y la para la SP un 86,89 %. Los valores de falsos positivos son muy buenos lo que evidencia la calidad del modelo (ver tabla 8).

Tabla 8. Parámetros estadísticos para el modelo máquina vectorial de soporte.

Serie	C	Q(%)	Sens (%)	Espec(%)	FP _r (%)
Entrenamiento	0,70	84,69	80,61	87,78	11,22
Predicción	0,74	86,89	83,33	89,29	9,68

Q exactitud; C coeficiente de correlación de Matthews; Sens Sensibilidad; Espec Especificidad; FPr Razón de falsos positivos.

En la figura 17 se muestran los porcentajes de clasificación para las series de entrenamiento y predicción en los modelos finales obtenidos para amastigotes resultando superiores los obtenidos en el SVM seguidos por el IBK y J48 respectivamente.

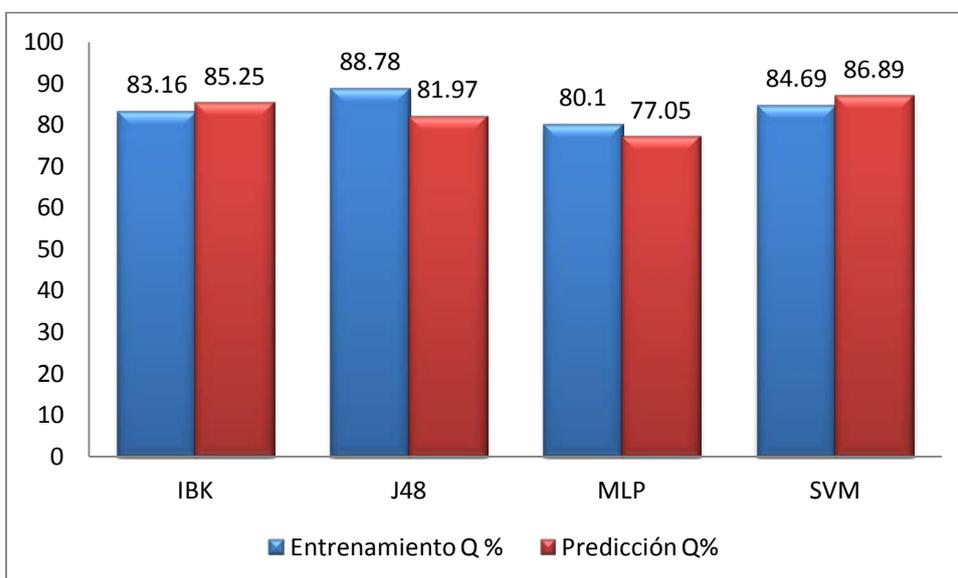


Figura 17. Porcentajes de clasificación para las series de entrenamiento y predicción en los modelos finales obtenidos para amastigotes.

Al evaluar por cada una de las técnicas las SP obtenidas podemos observar que MLP presenta los más bajos porcentajes de exactitud siendo en el resto de los modelos el valor de este parámetro estadístico superior a 80 %, alcanzándose los mejores resultados con el modelo de SVM y J48 respectivamente. Lo antes expuesto permitió validar la predictibilidad de dichos modelos.

3.3 Validación de los modelos obtenidos.

EL empleo de una serie de predicción es la condición necesaria y suficiente para evaluar el poder predictivo de cualquier modelo. En este sentido todos los modelos fueron evaluados empleando las series de predicción correspondientes (para promastigotes o amastigotes) según se definió en epígrafes anteriores. Los resultados alcanzados al evaluar los compuestos de la SP por los modelos obtenidos en cada una de las técnicas denotaron que estos presentan un adecuado poder predictivo. Estos resultados fueron comentados con más detalle en los acápites 3.2.1 y 3.2.2 por la conveniencia

de la comparación de estos datos con los obtenidos para la SE por cada modelo. De manera general podemos resumir que se alcanzaron para la SP valores de exactitud adecuados para la totalidad de los modelos, como se explicó en los epígrafes anteriormente citados; siendo ligeramente superiores los resultados alcanzados en los modelos de amastigotes respecto a los de los modelos de promastigotes.

La validación externa de los 4 modelos para promastigotes empleando la nueva serie de 22 compuestos evaluados previamente en bioensayos del PubChem arrojó resultados positivos. Los parámetros estadísticos resultantes para cada uno de los modelos pueden observarse en la tabla 9 y la figura 18 donde se aprecian los resultados globales de la validación. Los valores de exactitud que se obtienen resultan mayores para los modelos SVM y J48 y el valor de falsos positivos más bajo (44, 104, 105) se alcanza con el modelo de árboles.

Tabla 9. Resultados de la validación externa para modelos de promastigotes.

Técnica de clasificación	C	Q	Sens%	Espec%	FPr %
IBk	0,49	77,42	78,26	90	25
J48	0,569	80	78,27	94,74	14,28
MLP	0,47	77,42	81,81	85,71	33,33
SVM	0,65	85,71	90	90	25

Q exactitud; C coeficiente de correlación de Matthews; Sens Sensibilidad; Espec Especificidad; FPr Razón de falsos positivos.

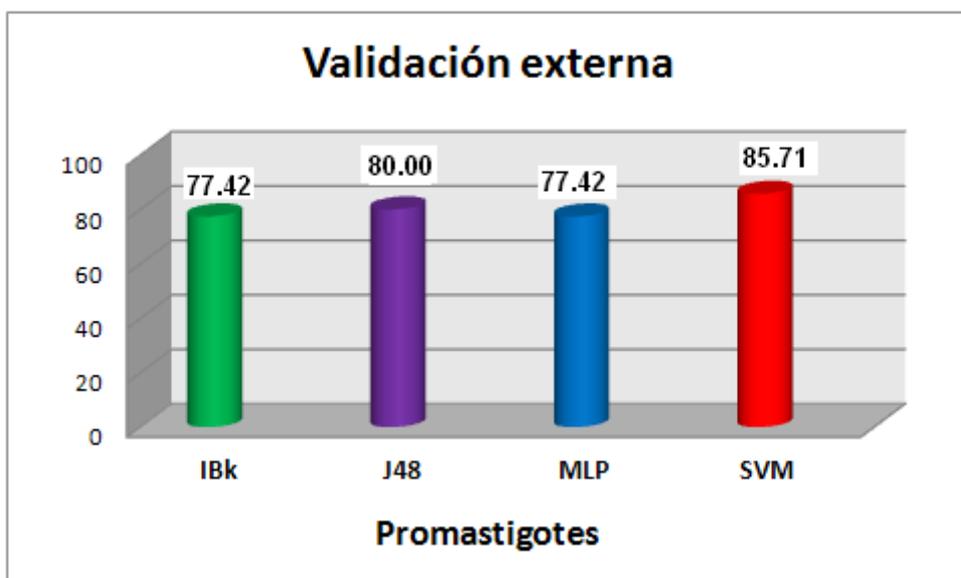


Figura 18. Porcentajes de clasificación para la validación externa de modelos finales obtenidos para promastigotes.

3.4. Cribado de Base de datos internacional.

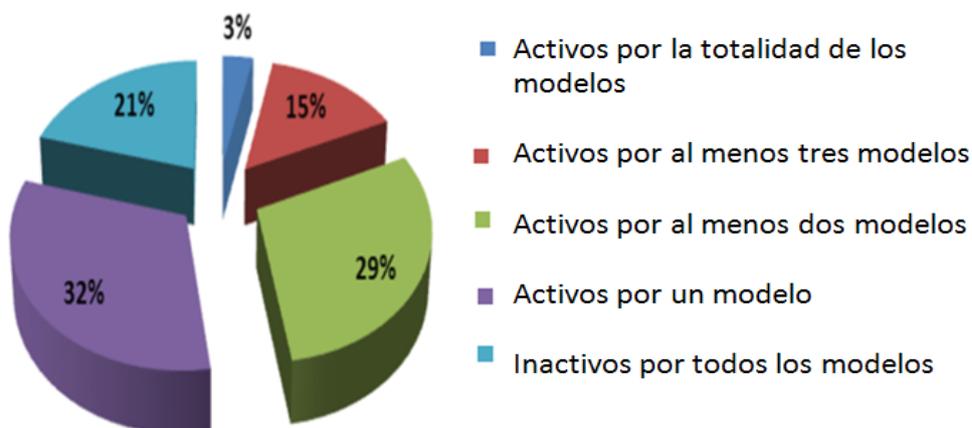
Para la identificación de nuevos compuestos con potencial actividad contra promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis* se evaluaron un total de 4662 estructuras del DrugBank obteniéndose como resultado del empleo de cada uno de los modelos compuestos con una amplia variedad estructural por cada uno de los modelos (IBK, J48, MLP, SVM). El número de compuestos clasificados como activos e inactivos por cada modelo individual puede observarse en la tabla 10 a continuación:

Tabla 10. Resultado del cribado del DrugBank por modelos individuales.

Clasificación de compuestos del DrugBank	IBk	J48	MLP	SVM
Promastigotes				
Identificados como inactivos	3076	2954	2873	2820
Identificados como activos	1586	1708	1789	1842
Amastigotes				
Identificados como inactivos	1908	2607	3076	2525
Identificados como activos	2754	2055	1586	2137
Total de compuestos	4662	4662	4662	4662

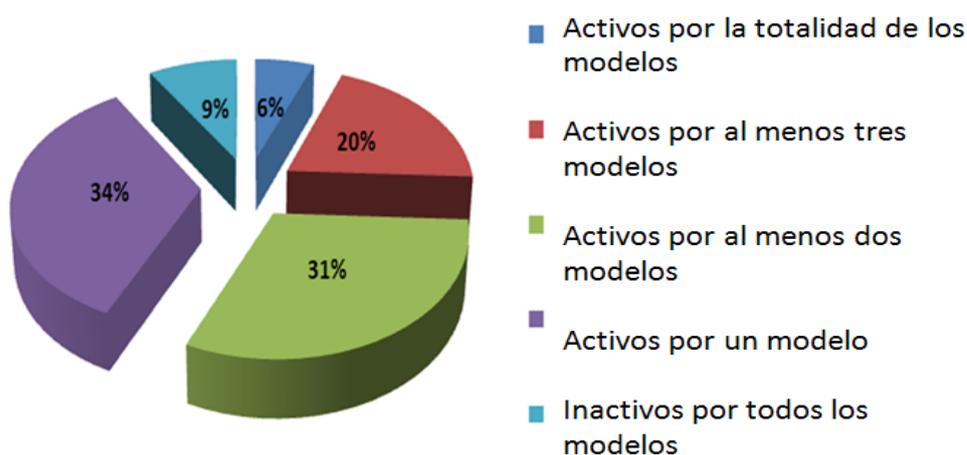
El resultado del cribado teniendo en cuenta los porcentajes de compuestos identificados como activos e inactivos por los modelos puede apreciarse en la figura 19. En el caso de los promastigotes el 3% de los 4662 compuestos pertenecientes al DrugBank es identificado como activo por la totalidad de los modelos, un 15% por tres modelos, 29% activos por dos y un 32% por uno, mientras que el 21% del total es hallado inactivo por todos ellos, En el cribado para amastigotes se clasifican como activos un 6%, 20%, 31%, 34 % y 9% respectivamente.

Resultado del cribado del DrugBank para promastigotes



A

Resultados del cribado del DrugBank para amastigotes



B

Figura 19. Resultado del cribado del DrugBank para promastigotes y amastigotes. **A** promastigotes, **B** amastigotes.

3.5 Sistema multclasificador ensamblado basado en modelos QSAR.

Los resultados del empleo de un sistema de ensamblado o multclasificador con el fin de mejorar los resultados obtenidos en la modelación se muestran en este acápite.

Como cada modelo capta por separado una gran fracción de la información química contenida en la base de datos a través del empleo de los DMs, esta información necesita complementariedad del resto de los modelos para su completitud. Por ello se utilizó un clasificador ensamblado a partir de los modelos QSAR que utiliza el voto mayoritario simple. En esta técnica cada

clasificador tiene un voto que posee igual valor. En esencia, la clasificación más popular es la que resulta elegida por el conjunto como decisión final. La variante más básica es el voto de la pluralidad, donde la clase con la mayoría de los votos gana.

En la tabla 11 se puede apreciar el comportamiento de los parámetros estadísticos obtenidos para la serie de predicción con el mejor modelo para promastigotes (SVM) y el ensamblado por voto.

Tabla 11. Parámetros estadísticos obtenidos para la serie de predicción con el modelo SVM para promastigotes y el ensamblado.

Técnica de clasificación	C	Q	Sens%	Espec%	Falsos Positivos %
Ensamblado	0,94	96,77	93,33	100	0
SVM	0,74	86,89	83,33	89,29	9,68

Q exactitud; C coeficiente de correlación de Matthews; Sens Sensibilidad; Espec Especificidad; FPr Razón de falsos positivos.

Puede observarse que se obtienen con el ensamblado valores muy superiores obteniéndose 100 % de especificidad, y un valor de falsos positivos igual a cero. Este ensamblado por voto incluyó en la clasificación como compuestos activos a aquellos que fueron identificados como tal por al menos 2 de las cuatro técnicas para promastigotes.

La matriz de confusión obtenida para el ensamblado fue:

===Matriz de confusión ===

a b <-- clasificados como

13 1 | a = Act1

0 16 | b = Act-1

Donde Act1 son los compuestos clasificados como activos y Act-1 los clasificados como inactivos.

Mientras que la obtenida para la técnica SVM fue:

===Matriz de confusión ===

a b <-- clasificados como

11 3| a = Act1

1 15| b = Act-1

El comportamiento alcanzado por el ensamblado para amastigotes fue similar al anterior, lo cual demuestra un mayor poder de predicción con respecto al mejor modelo obtenido para esta forma del parásito (SVM). Tabla 12. Ambos procedimientos alcanzan un porcentaje de falsos positivos igual a 9,68 sin embargo el ensamblado logra superiores valores de coeficiente de correlación de Matthews, exactitud, sensibilidad y especificidad.

Tabla 12. Parámetros estadísticos obtenidos para la serie de predicción con el modelo SVM para amastigotes y el ensamblado.

Técnica de clasificación	C	Q	Sens%	Espec%	Falsos Positivos %
Ensamblado	0,84	91,80	93,33	90,32	9,68
SVM	0,74	86,89	83,33	89,29	9,68

Q exactitud; C coeficiente de correlación de Matthews; Sens Sensibilidad; Espec Especificidad; FPr Razón de falsos positivos.

La matriz de confusión obtenida para el ensamblado fue:

===Matriz de confusión ===

a b <-- clasificados como

28 2 | a = Act1

4 28| b = Act-1

La técnica SVM para amastigotes presentó la siguiente matriz de confusión:

===Matriz de confusión ===

a b <-- clasificados como

25 5| a = Act1

3 28| b = Act-1

Machado en el 2013 obtuvo un valor de exactitud de 91,73 % y una razón de falsos positivos de 4,01 al emplear un sistema de ensamblado multclasificador de voto para evaluar la actividad de compuestos contra la malaria, también causada por la infección de un protozoo parásito; estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio.(106)

Tras el cribado de la base de datos internacional DrugBank se identificaron como activos un gran número de compuestos por cada técnica individual como pudo apreciarse en el acápite anterior. Teniendo en cuenta que en la práctica debe obtenerse un compuesto capaz de inhibir a la *Leishmania amazonensis* tanto en la forma promastigote como amastigote se realizaron varios ensamblados que nos permitieran obtener el menor número posible de compuestos clasificados como activos como resultado final (conservando siempre los criterios empleados en los ensamblados anteriores por sus buenos resultados).

De esta forma se clasifican como activos por al menos 2 modelos de promastigotes 2360 compuestos mientras que por al menos dos modelos de amastigotes se predicen 2808. Al proceder al ensamblado de los compuestos predichos como activos por al menos dos modelos de promastigotes y amastigotes al unísono obtenemos un total de 540 lo que reduce sustancialmente el resultado. Figura 21

Por otra parte, de 4662 compuestos contenidos en la base de datos DrugBank los compuestos identificados como activos por la totalidad de los modelos de promastigotes resultaron 156 para un (4%), mientras que en el caso de los de amastigotes fueron 273 (6%) respectivamente. El consenso logrado al enlazar todos estos resultados y determinar aquellos identificados como activos por la totalidad de los modelos obtenidos reduce considerablemente el número de compuestos identificados. De esta forma fueron reconocidos un total de ocho compuestos como potencialmente activos contra *L. amazonensis* por el 100 % de los modelos empleados (Figura 21). Las estructuras de estos compuestos pueden verse en el anexo 3.



Figura 21. Resumen de los resultados obtenidos por el ensamblaje de los ocho modelos finales.

El empleo del ensamblado por el voto mayoritario personalizado nos permitió la reducción de los compuestos cribados identificados como potencialmente activos. Estos compuestos podrán ser evaluados experimentalmente para corroborar su actividad contra *Leishmania amazonensis* y su pequeño número repercute de manera favorable en el un ahorro de tiempo y empleo de reactivos.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Se confeccionó una base de datos inicial que incluyó 375 compuestos evaluados experimentalmente contra *Leishmania amazonensis* con una amplia variabilidad estructural la cual fue subdividida en dos para la confección de los modelos, una con 116 compuestos evaluados contra promastigotes y otra con 257 compuestos probados contra amastigotes
2. Se obtuvieron ocho modelos QSAR desarrollados con técnicas de inteligencia artificial alcanzando buenos porcentajes de clasificación, sensibilidad y especificidad tanto para las series de entrenamiento como las de predicción.
3. La validación externa de los modelos obtenidos para promastigotes demostró su alto grado de predictibilidad.
4. Los sistemas multclasificadores ensamblados de voto empleados en la predicción de compuestos contra el parásito mostraron mejores resultados que los modelos por separado permitiendo su identificación de forma óptima a través del cribado virtual de grandes bases de datos.
5. Se identificaron 8 compuestos con potencial actividad contra *Leishmania amazonensis* a través del cribado virtual de la base de datos internacional DrugBank empleando el ensamblado de voto mayoritario de todos los modelos obtenidos.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Evaluar experimentalmente los compuestos identificados por el ensamblado para corroborar su actividad.
2. Trabajar en la obtención de nuevos modelos por otras técnicas que permitan complementar los resultados obtenidos hasta el momento.

*REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moreno Mateos D. Estrategias celulares y moleculares en el cribado de nuevos agentes anti-Leishmania. Alcalá: Universidad de Alcalá; 2010.
2. OMS. Informe de la Reunión de Expertos de la OMS sobre el Control de la Leishmaniosis. Ginebra: Nuevo Informe OMS; 2011
3. Salud. OPdl. Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de leishmaniasis. . Protección Mdl, editor 2013.
4. Montalvo AM. Leishmaniasis: Interesting features on exotic parasitism for Cuba. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 2010;48:78-92.
5. Aguilar CMF E, Fernández R, Cannova DC, Ferrer E, Z. C, Souza WJ, et al. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93:15-6.
6. Available OldIRdEdIOseCdILGNIOFcn.
7. Bejarano E. Lista actualizada de los psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. Folia Entomol Mex. 2006;45:47-56.
8. 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.
9. Hann M, Green R. ChemBiol Curr Opin. 1999.
10. GONZÁLEZ DC. Nouveaux ligands de quadruplexes. Approches in silico et in vitro: Université de Bordeaux, France; 2013.
11. Marrero-Ponce Y, Siverio-Mota D, Gálvez-Llompart M, Recio MC, Giner RM, García-Domènech R. 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;46:5736-53.
12. Flores Balmaseda N. Flebotomos relacionados con la leishmaniasis. Aspectos biológicos y patológicos. Distribución en las Américas y control vectorial. . Grin publications. 2015.
13. Juliana Q. Reimão MTS, André G. Tempone. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: In vitro evaluation and structure-activity relationship study. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2010;18:8044-53.
14. Montalvo M. Leishmaniasis. Aspectos de interés sobre un parasitismo exótico para Cuba Leishmaniasis: Interesting features on exotic parasitism for Cuba. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 2010;48(1):78-92.
15. Schönian G MI, Cupolillo E. . Is it time to revise the nomenclature of Leishmania? Trends Parasitol. 2010;26:466-9.
16. Fraga J MA, De Doncker S, Dujardin J-C, Van der Auwera G. Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. Infection, Genetics and Evolution. March 2010;;10(2):238-45.
17. Barral A, D. Pedral-Sampaio, G. Grimaldi, Jr. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that Leishmania amazonensis produces a wide spectrum of clinical disease. . Am J Trop Med Hyg. 1991;44:536-46.
18. Banuls AL DJ, Guerrini F, De Doncker S, Jacquet D, Arevalo J, Noel S, Le Ray D, Tibayrenc M. . Is Leishmania (viannia) peruviana a distinct species? A MLEE/RAPD evolutionary genetics answer. J Eukaryot Microbiol. 2000 May-Jun;47(3):197-207.
19. Mauricio IL SJ, Miles MA. The strange case of Leishmania chagasi. . Parasitol Today. 2000 May:188-9.
20. salud OMdl. Nuevo Informe OMS: Informe de la Reunión de Expertos de la OMS sobre el Control de la Leishmaniosi. Ginebra 3 Febrero 2011.
21. Steve M. Leishmania infection on: Leishmania infection_ Causes, symptoms, treatment. 2009 [noviembre 2014]; Available from: Available from: <http://leishmaniainfection.mht>.

22. Vannier-Santos MA MA, De Souza W. . Cell Biology of *Leishmania* spp. invading and evading. *Curr Pharmaceutical Design*. 2002;8:297-318.
23. Rotureau B. Ecology of the *Leishmania* species in ecoregion complex. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;74:81-96.
24. Killick-Kendrick R. The biology and control of Plebotomine sand flies. *Clin Dermatol*. 1999;17:279-89.
25. Lima Sorto K, Márquez Lizama M. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea en habitantes del Cantón Loma Larga, municipio y Departamento de la Unión 2011.
26. Warburg AS, Lanzaro G, Titus R, Neva F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Phil Trans R Soc Lond, Serie B*. 1994;345:223-30.
27. OMS. Leishmaniasis. 2015; Available from: <http://www.OMS.com/Leishmaniasis.htm>.
28. Neto AA, Costa JM, Vinholis AHC, Souza GHB, unha WR. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal in vitro activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. *Phytomedicine* 2004;662-5.
29. Schönian G NA DN, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. . PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2003;47:349-58.
30. RICET. Redes de investigación en medicamentos. Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales. 2005; updated 2 Junio:[Available from: <http://www.ricet.es/>].
31. Charlab RV J, Rowton E, Ribeiro J. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1999;15:155-60.
32. Guerin J, Sundar S, Boelaert M, Croft S, Desjeux P. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, a proposed research and development agenda. *Lancet* 2002;2:494-501.
33. Lewis D, Fairchild G, Minter D. Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *System Entomol*. 1977;2:319 -32.
34. Feliciangeli M. Sobre los flebotomos conocidos en Venezuela. Sobre los flebotomos (diptera: psychodidae: phlebotominae), con especial referencia a las especies conocidas en venezuela. *Acta Biol Venez*. 2006 26:61-80.
35. Lucientes JC, García M, Peribañez M. Flebotomos, de la biología al contro. 2005; Available from: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080805.html>.
36. SAÚDE MD. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Série A Normas e Manuais Técnicos. 2.ª edição atualizada ed. Brasília - DF: Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica; 2010.
37. Real F, Vidal RO, Carazzolle MF, Mondego JMC, Costa GGL, Herai RH, et al. The genome sequence of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA research*. 2013;20(6):567-81.
38. Académica V. Leishmaniasis. Colombia 2010; Available from: <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/medicina/2010828/lecciones/cap9/cap9-5b.htm>.
39. de Oliveira Cardoso F, de Souza CdSF, Mendes VG, Abreu-Silva AL, da Costa SCG, da Silva Calabrese K. Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. *Journal of Infectious Diseases*. 2010;201(12):1933-40.
40. Anderson B. Guimarães-Costa MTCN, Giselle S. Fromenta, Rodrigo P. P. Soares, Fernanda N. Morgado, Fátima Conceição-Silvac and Elvira M. Saraiva, . *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 106(16): 6748–53.
41. Salud O. Informe final segunda reunión de gerentes de programas de leishmaniasis de las Américas. Ciudad de Panamá 2013.
42. Freire A, Cristian F. . Determinación de los factores de riesgo y su relación con Leishmaniasis Cutanea en los pacientes que acuden al laboratorio del Centro de Salud Satelital

Central del Tena Provincial de Napo en el periodo diciembre 2012-julio 2013: Universidad Técnica de Ambato; 2014.

43. Gállego MR. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniasis. Revista Ciencia y tecnología Off int Epiz. 2004:661-76.
44. Chuquisengo R. Leishmaniasis. 2012; Available from: <http://www.monografias.com/trabajos62/leishmaniasis/leishmaniasis.shtml>.
45. Cetina LGM. Mitos y realidades de la leishmaniasis en el Nuevo Mundo. Biomédica. 2011;31(sup3. 1):229-30.
46. Louvina Sayers J. Identificación de nuevos compuestos líderes con actividad Antileishmaniásica a través de estudios "in silico: Universidad Central Marta Abreu de las Villas; 2010.
47. Sánchez E, Legaza C, Murga Montserrat A, Pérez Pérez R, Melendez B. Leishmaniasis visceral con manifestaciones en lengua. 2003.
48. Alvarez González OFBN. Identificación de compuestos con potencial actividad antileishmaniásica a través de métodos in silico: UCLV; 2015.
49. Pérez C, Solías Y, Rodríguez G. Leishmaniasis cutánea difusa en un paciente con sida. Biomédica. 2006;26(4):485-97.
50. Pilar Z. Vigilancia y análisis del riesgo en salud pública, protocolo de vigilancia en salud pública y leishmaniasis. 2014
51. Montalvo A. Leishmaniasis. Aspectos de interés sobre un parasitismo exótico para Cuba. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 2010:4.
52. Rojas Alvarez D. Guía de Atención Integral de Leishmaniasis. Bogotá: Ministerio de la Protección Social República de Colombia, Dirección General de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Organización Panamericana de la Salud OPS/OMS; 2010.
53. Ramos M, Segivia M. Estado actual del tratamiento farmacológico de la Leishmaniasis. Revista española de Quimioterapia. 1997;10:26-35.
54. Brito-Sánchez Y, Castillo-Garit J, Le-Thi-Thu H, González-Madariaga Y, Torrens F, Marrero-Ponce Y, et al. Comparative study to predict toxic modes of action of phenols from molecular structures. SAR and QSAR in Environmental Research. 2013;24(3):235-51.
55. Marrero-Ponce Y, Siverio-Mota D, Gálvez-Llompert 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.
56. Sánchez PL, Fernández-Baza A, Fernández-Avilés F. ¿ Qué son las redes temáticas de investigación cooperativa en salud (RETICS)? Cardiacore. 2011;46(4):131-5.
57. María DD. Resistencia a múltiples drogas. Un mecanismo de evasión celular ante los tratamientos quimioterapéuticos. Casa del tiempo. 2003:124.
58. Pham-The H, González-Álvarez I, Bermejo M, Garrigues T, Le-Thi-Thu H, Cabrera-Pérez MÁ. The Use of Rule-Based and QSPR Approaches in ADME Profiling: A Case Study on Caco-2 Permeability. Molecular Informatics. 2013;32(5-6):459-79.
59. 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.
60. Bonet I, Rodríguez A, García MM, Grau R. Combinación de clasificadores para bioinformática. Computación y Sistemas. 2012;16(2):191-201.
61. Aler R, Galván IM, Valls JM. Improving classification for brain computer interfaces using transitions and a moving window. 2009.
62. Morales Helguera A. Computational Prediction of Rodent Carcinogenicity and Identification of 'Structural Alerts' in Chemical Carcinogens. Porto: University of Porto; 2009.
63. Alonso Atienza F. Estudio de los mecanismos de las arritmias cardíacas mediante modelado y procesamiento robusto digital de señal. 2008.
64. Martínez EA, Perez-Riverol DY. Estimación del punto isoeléctrico de péptidos empleando descriptores moleculares y máquinas de soporte vectorial. 2012.

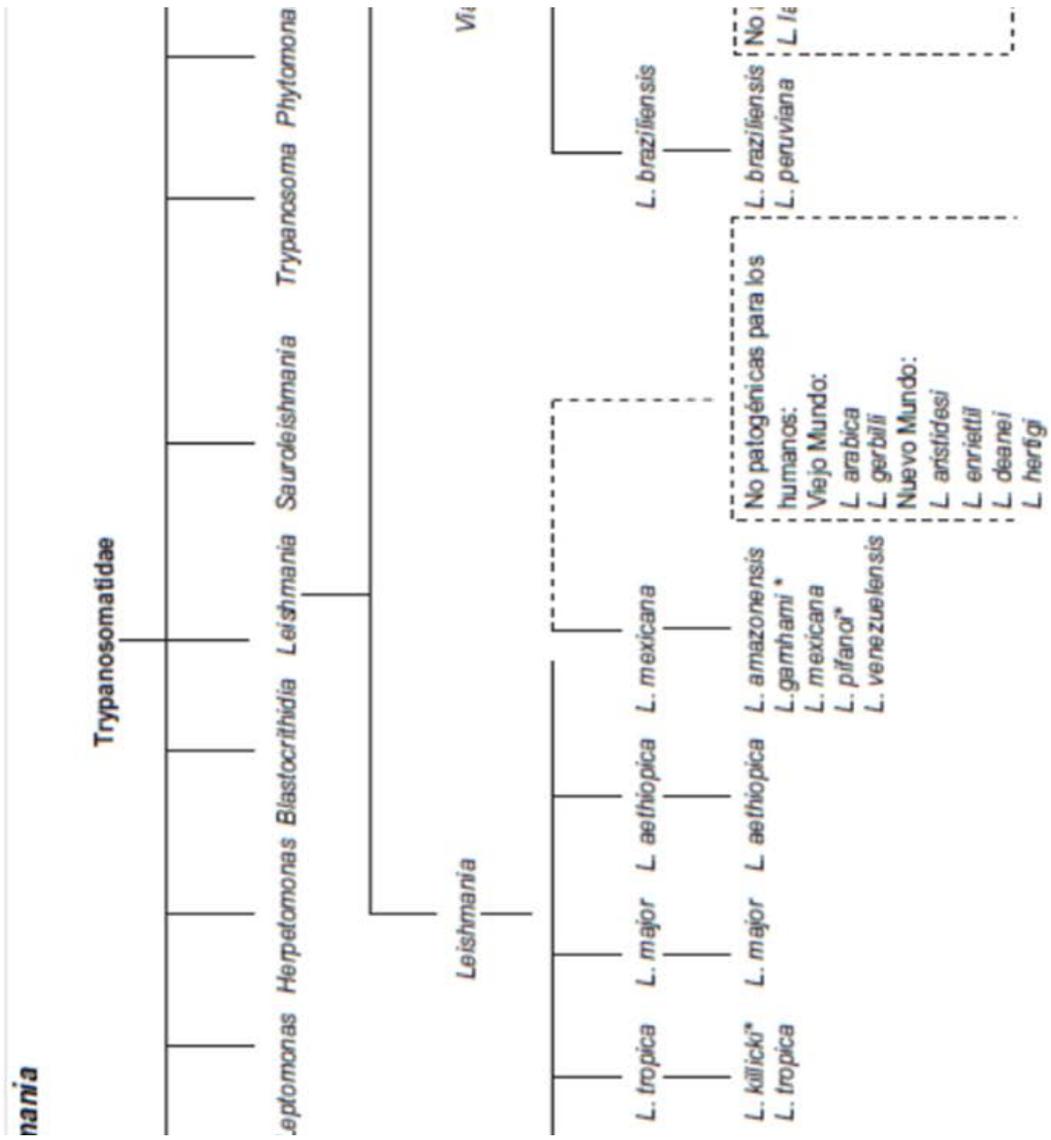
65. Castillo-Garit JA. Parametrización de la estructura química empleando formas lineales: Aplicaciones al Diseño Molecular Asistido por Ordenador [En opción al grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas]. Santa Clara, Cuba: Universidad Central Marta Abreu de las Villas; 2008. .
66. Kohavi R, John GH. Wrappers for feature subset selection. *Artificial intelligence*. 1997;97(1):273-324.
67. Hamilton NZ. Correlation-based feature subset selection for machine learning. 1998.
68. 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.
69. Alfredo MM, Yanetsy MT, Yosvani MP, Vicente Jesús AR, José Antonio EG-T, Alicia GB, et al., editors. Tamizaje farmacológico en la búsqueda de potenciales fármacos antimaláricos integrando nuevos modelos in silico y corroboración experimental. 8th Cuban Congress on Microbiology and Parasitology, 5th National Congress on Tropical Medicine and 5th International Symposium on HIV/aids infection in Cuba; 2014.
70. Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic acids research*. 2011;39(suppl 1):D1035-D41.
71. Wang Y, Suzek T, Zhang J, Wang J, He S, Cheng T, et al. PubChem BioAssay: 2014 update. *Nucleic acids research*. 2014;42(D1):D1075-D82.
72. Casd H. Antileishmanial activity against *Leishmania amazonensis* IFLA/BR/1967/PH-8 promastigotes infected in mouse peritoneal macrophages assessed as parasite growth inhibition after 48 hrs by MTT assay *Eur J Med Chem*. 2014;282(9):71.
73. Delfín D. Antileishmanial activity against beta-lactamase transfected *Leishmania amazonensis* promastigotes infected in macrophages after 72 hrs by spectrophotometric analysis. *Bioorg Med Chem* 2009;15(2): 820-9.
74. Sabrina B. Ferreira, Marilia S. Costab, Núbia Boechatc, Rômulo J.S. Bezerrad, Marcelo S. Genestrada, Marilene M. Canto-Cavalheirod, et al. Synthesis and evaluation of new difluoromethyl azoles as antileishmanial agents. *Eur J Med Chem*. 2007 Synthesis and evaluation of new difluoromethyl azoles as antileishmanial agents 42(11-12):1388–95.
75. Ricardo M. Santa-Rita, Andréa Henriques-Pons, and HSB, Castro* SLd. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *J Med Chem*. 2004 46(22):4714-27.
76. Bahar M DY, Zhu X, He S, Pandharkar T, Drew ME, Navarro-Vázquez A, Anklin C, Gil RR, Dskotch RW, Werbovetz KA, Kinghorn AD. Potent antiprotozoal activity of a novel semi-synthetic berberine derivative. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;2606(10):1;21(9).
77. Muro M. Antileishmanial activity against *Leishmania amazonensis* IFLA/BR/67 promastigotes at pH 8.0 after 72 . . . *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;184(7):18(1).
78. Beledo G. Antiparasitic activity against *Leishmania amazonensis* MHOM/BR /77/LTB0016 after 24 hr *Med Chem*. 2012 21(7):1524-32.
79. José C. Aponte DC, Yannick Estevez, German Gonzalez, Jorge Arevalo, Gerald B. Hammond, Michel Sauvain. In vitro and in vivo anti-*Leishmania* activity of polysubstituted synthetic chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010;20:100-3.
80. Hernández P, Rojas R, Gilman RH, Sauvain M, Lima LM, Barreiro EJ, et al. Hybrid furoxanyln-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;59:64-74.
81. Moloy B, Abdelbasset A, Farahat A, Kumar T, Wenzler R, Brun M, et al. Synthesis, DNA binding and antileishmanial activity of low molecular weight bis-arylimidamides. *European journal of medicinal chemistry*. 2012;55:449-54.
82. Nure N. Synthesis and evaluation of the antiparasitic activity of bis-(arylmethylidene) cycloalkanones. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;71:282-9.
83. Barbosa TP, Sousa SCO, Amorim FM, Rodrigues YKS. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: A molecular hybridization approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011;19:4250-6.

84. Francisco J. Prado-Prado XG-M, Humberto González-Díaz. Multi-target spectral moment QSAR versus ANN for antiparasitic drugs against different parasite species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010;18:2225-31.
85. Mark Bahara YD, Xiaohua Zhu SH, Pandharkar ME, Drew DW. Potent antiprotozoal activity of a novel semi-synthetic berberine derivative. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011; Letters 21:2606-10.
86. Anne-Cécile Le Lamer DC, Jorge Arevalo, Rosario Rojas. Caffeic Acid Esters and Lignans from *Piper sanguineispicum*. *J Nat Prod*. 2010;73:1884-90.
87. Donald A. Patrick MAI, Reem K. Arafa, Tanja Wenzler, Xiaohua Zhu. Synthesis and Antiprotozoal Activity of Dicationic - Terphenyl and 1,3-Dipyridylbenzene Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013.
88. Xu J, Hagler A. Chemoinformatics and drug discovery. *Molecules*. 2002;7(8):566-600.
89. Johnson RA, Wichern DW. *Applied multivariate statistics*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall; 1988.
90. Van de Waterbeemd H, Rose S, Butler S. Quantitative approaches to structure-activity relationships. *The practice of medicinal chemistry*. 1996;3.
91. Martínez-Pérez E, Castillo-Garit JA, B. R-BY. Big-Datasets Manager: Una herramienta libre para la manipulación de ficheros de datos con número elevado de instancias y atributos. *Nereis*. 2015.; 7:59-66.
92. Nascimento DS, Coelho AL. Bagging heterogêneo evolutivo: Caracterização e análise comparativa com ensembles homogêneas de redes neurais RBF. *Anais do IX Simpósio Brasileiro de Automação Inteligente*. 2009:6.
93. Ariew R. *Maquinilla de afeitar de Ockham: Un análisis histórico y filosófico del principio de parsimonia de Ockham*. Universidad de Illinois: Champagne-Urbana 1976.
94. Wold S, Eriksson, L. *Statistical Validation of QSAR Results*. *Chemometrics Methods in Molecular design*. Weinheim (Germany): van de Waterbeemd, H., VCH; 1995. p. 309-18.
95. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic acids research*. 2008;36(suppl 1):D901-D6.
96. Opitz D, Maclin R. Popular ensemble methods: An empirical study. *Journal of Artificial Intelligence Research*. 1999:169-98.
97. Goebel K, Yan W, editors. *Choosing classifiers for decision fusion*. *Proceedings of the Seventh International Conference on Information Fusion*; 2004.
98. Hansen RA, Deutscher T. *An empirical investigation of attribute importance in retail store selection*: College of Administrative Science, Ohio State University; 1976.
99. Baldi P, Brunak S, Chauvin Y, Andersen CA, Nielsen H. Assessing the Accuracy of Prediction Algorithms for Classification: an Overview. *Bioinformatics*. 2000;16:412-24.
100. Bauer E, Kohavi R. An empirical comparison of voting classification algorithms: Bagging, boosting, and variants. *Machine Learning*. 1999;36(1-2):105-39.
101. Dietterich TG. *Ensemble methods in machine learning*. *Multiple classifier systems*: Springer; 2000. p. 1-15.
102. Johnson RA, Wichern DW. *Applied multivariate statistical analysis*: Prentice hall Englewood Cliffs, NJ; 1992.
103. Jurs P, Dixon S, Egolf L. *Chemometric Methods in Molecular Design*, Waterbeemd. VCH, Weinheim; 1995.
104. Ramos M. Estado actual del tratamiento farmacológico de la leishmaniasis. *Revista Española de Quimioterapia*. 1997
105. Barçante TA, Vilela L, Tafuri WL, Afonso LCC, Vieira LQ. Vaccine-induced protection against *Leishmania amazonensis* is obtained in the absence of IL-12/23p40. *Immunology letters*. 2006;105(1):38-47.

106. Machado TY. Tamizaje farmacológico en la búsqueda de potenciales fármacos antimaláricos integrando nuevos modelos *in silico* y corroboración experimental. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2013.

ANEXOS

Anexo 1. Taxonomía de *Leishmania* spp.



ANEXO 2

Medicamentos utilizados en el tratamiento sistémico de las leishmaniasis en las Américas: Características y principales eventos adversos.

Los tratamientos sistémicos son los más utilizados para tratar las diferentes formas clínicas de leishmaniasis en la Región, sin embargo, presentan toxicidad causando eventos adversos leves, moderados y severos.

Los medicamentos actualmente disponibles son los antimonales pentavalentes, el isetionato de pentamidina, las diferentes formulaciones de la Anfotericina B, la pentoxifilina, la miltefosina y ketoconazol. A continuación describimos estos medicamentos mencionados y sus principales efectos adversos (5, 8, 9).

Antimonales pentavalentes (Sb+5)

Los antimonales pentavalentes disponibles en el mercado son el estibogluconato de sodio (Pentostam® o genérico) y el antimoniato de meglumina (Glucantime® o genérico). Los mismos son químicamente similares, y su toxicidad y eficacia están relacionados con el contenido de antimonio pentavalente (Sb+5): la solución de antimoniato de meglumina contiene 81 mg/ml de Sb+5 mientras que la solución de estibogluconato de sodio contiene 100 mg/ml de Sb+5. La inyección se puede administrar vía intramuscular o intravenosa o por infusión (más de 5-10 minutos) o por inyección lenta a través de una aguja fina (23-25 medidor, 0,6-0,5 mm) para evitar cualquier riesgo de trombosis posterior.

Los antimonales se distribuyen a altas concentraciones en plasma, hígado y bazo; la vida media es de 8 horas en adultos y 5 horas en niños, con una tasa rápida de absorción. La excreción se realiza a través de la orina (80% en 6 horas) y se completa entre 24 y 76 horas después de administrados, siendo la eliminación más rápida en los niños.

La respuesta al tratamiento con antimonales varía considerablemente dependiendo de la especie y cepa del parásito, del estado inmunológico del paciente y de la forma clínica de la enfermedad.

Los efectos adversos más comunes y responsables de la interrupción del tratamiento, son los relacionados con el sistema músculo esquelético, como mialgias y artralgias, las cuales pueden ser graves, principalmente en pacientes

mayores, pero que generalmente responden a antiinflamatorios no esteroides; también son frecuentes el dolor de cabeza, la anorexia, náuseas y fiebre.

La alanino aminotransferasa, la alcalino aminotransferasa, la aspartato aminotransferasa y la lipasa séricas con frecuencia se incrementan, aunque el nivel es leve. Además, frecuentemente se presenta hiperamilasemia con aparición o no de pancreatitis aguda, lo que puede ser la causa de la aparición de náuseas y dolor abdominal; ocasionalmente se han reportado disminución de la hemoglobina y leucocitos o aumento de concentraciones séricas de nitrógeno ureico y creatinina. En el electrocardiograma (ECG) se pueden ver efectos dosis-dependiente y tiempo dependiente, como cambios reversibles del ECG como un incremento en la amplitud de la onda P, inversión de la onda T (o disminución en su altura), elevación del segmento S-T, o prolongación del intervalo QT, que es el efecto adverso más serio y el usualmente asociado a muerte.

Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento

Los antimoniales pentavalentes están contraindicados durante el embarazo. No se han realizado estudios en humanos, ni en animales, por lo que no está recomendado su uso durante la lactancia materna. Se debe tener especial cuidado con su administración en pacientes con enfermedades cardíacas, en especial en los defectos de la conducción, ya que puede causar arritmias. Asimismo, puede producir una alteración de la función hepática, pancreatitis o disfunción tubular renal. Se ha informado la muerte de pacientes asociada al uso de este medicamento.

La resistencia a los antimoniales es un problema creciente principalmente con las especies de *Leishmania* que son antroponóticas, y está asociada al uso de tratamientos incompletos.

Anfotericina B

Actualmente existen cuatro diferentes formulaciones:

Anfotericina B deoxicolato: actúa alterando la permeabilidad de la membrana celular. Se administra por vía intravenosa en dextrosa al 5% en 2 horas, a una dosis de 0,7-1,0 mg/kg/d diarios, hasta alcanzar una dosis acumulativa total de 25 mg/kg (aproximadamente 42 dosis). Es un medicamento muy efectivo, con tasas de curación hasta del 98%, pero de uso limitado por los efectos adversos

frecuentes (infusiones intravenosas). Se recomienda administrar este tratamiento el hospital para permitir el monitoreo continuo de los pacientes. Las reacciones más comunes son fiebre alta, escalofríos y tromboflebitis de la vena inyectada. La nefrotoxicidad, tanto tubular como glomerular, es común, dando lugar a frecuentes interrupciones del tratamiento en algunos pacientes, ya sea por incremento de la urea y creatinina o desarrollo de hipocalcemia severa. Otros efectos tóxicos, como miocarditis, hepatitis severa son poco frecuentes pero graves. La correcta hidratación y otras estrategias de prevención, son muy importantes para evitar o reducir la toxicidad renal, hepática y cardíaca.

Formulaciones lipídicas de anfotericina B: Varias formulaciones, incluyendo la anfotericina B liposomal, complejo lipídico de anfotericina B y anfotericina B de dispersión coloidal, se han utilizado en el tratamiento. Son similares en su eficacia a la anfotericina B deoxicolato pero mucho menos tóxicos. La mayoría de los ensayos clínicos en leishmaniasis se han realizado con la formulación liposomal de anfotericina B, por esto es importante hacer estudios con otras formulaciones lipídicas.

a) *Anfotericina B liposomal* es una formulación lipídica de anfotericina B y fosfatidilcolina deshidrogenada de soya, distearoilfosfatidilglicerol y colesterol y que se utiliza por vía intravenosa a una dosis de 3-5 mg/kg de peso/d por 3-5 d para el tratamiento de la LV, con una eficacia superior al 98%. Las pequeñas vesículas de lípidos que contienen el medicamento son fagocitadas por los macrófagos, fusionándose a la membrana del fagosoma para liberar el medicamento directamente sobre el parásito.

b) *Dispersión coloidal de Anfotericina B* que es una formulación lipídica de anfotericina B y sulfato de colesterol.

c) *Complejo lipídico Anfotericina B* que es una formulación lipídica de Anfotericina B y dimiristoil fosfatidilcolina y dimiristoil fosfatidilglicerol.

De la misma forma, las respuestas terapéuticas son diferentes teniendo en cuenta las diferentes formas clínicas y especies de *Leishmania*.

Isetionato de pentamidina

Es un derivado aromático de la diamidina que interactúa con el ADN del kinetoplasto e inhibe la topoisomerasa II e interfiere con la glicólisis. Se

administra por vía intramuscular a una dosis de 3-4 mg/kg interdiario durante 3 a 4 dosis. El porcentaje de curación varía entre el 84% al 96%.

Se utiliza para el tratamiento de los casos que no responden a otros medicamentos y en situaciones en que se conoce la respuesta terapéutica local, de acuerdo con la especie de *Leishmania* circulante. Hay contraindicaciones de su uso en pacientes con alteraciones hepáticas, pancreáticas o renales.

Los eventos adversos secundarios más frecuentes con el uso del isotianato de pentamidina pueden ser leves o moderados como dolor y edema en el sitio de aplicación, abscesos, mareo, fiebre, cefalea, adinamia, náuseas y dolor articular. Se han reportado algunos casos de rabdomiolisis especialmente cuando se usa en dosis altas.

Los eventos adversos graves como hipotensión aguda o hipoglicemia son frecuentes, especialmente cuando se aplican muy rápido o cuando el paciente se levanta muy pronto después de la inyección, por eso, si recomienda permanecer recostado unos 15 minutos. Se presentan eventos adversos cardiovasculares similares a los de los antimoniales pentavalentes, pero la prolongación del QT es el más frecuente.

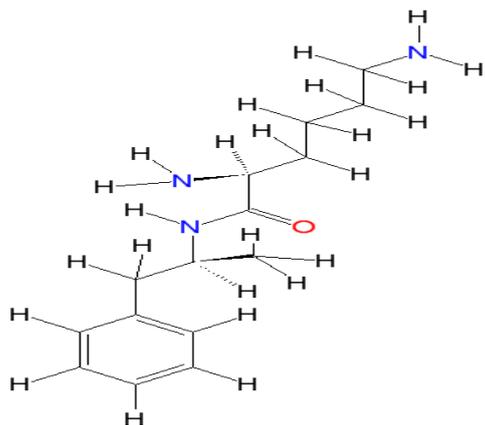
Miltefosina

Es un derivado de hexadecilfosfocolina. Se desarrolló originalmente como un medicamento oral contra el cáncer, pero ha demostrado tener actividad antileishmaniásica. Es la primera droga de uso oral para el tratamiento de la leishmaniasis. La dosis se administra teniendo en cuenta el peso del paciente.

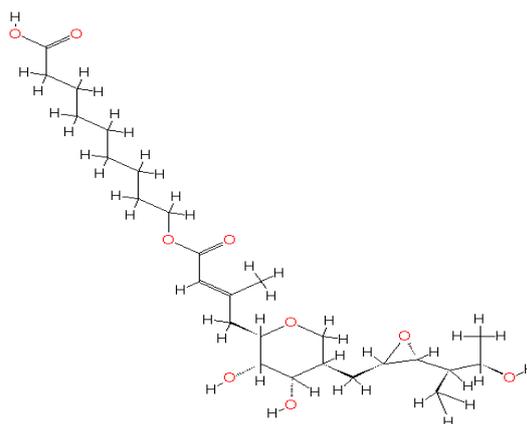
Es un medicamento antiparasitario, utilizado en Asia para el tratamiento de LV, pero las respuestas no fueran satisfactorias para *L. infantum*, especie circulante en las Américas. Para la leishmaniasis cutánea se ha demostrado eficacia variable, de acuerdo con las especies y zona geográfica.

La miltefosina produce efectos adversos gastrointestinales como náuseas, acompañadas algunas veces de vómito, diarrea y pérdida de apetito, lo que disminuye la adherencia al tratamiento. En situaciones raras, los efectos secundarios pueden ser graves y requieren la interrupción del tratamiento. Estos incluyen alergias en la piel, elevación de las concentraciones de las transaminasas hepáticas, pero sin llegar a valores críticos. Se han encontrado reportes de reacciones alérgicas tipo Steven- Johnson.

La miltefosina es potencialmente teratogénica y tiene una vida media prolongada en el organismo. En mujeres en edad fértil debe garantizarse una adecuada contracepción durante el tratamiento y hasta 3 meses después de terminado el mismo.



DRUGBANK_ID DB01255



DRUGBANK_ID DB00410