



Estudio de la relación mutagénesis-estructura de derivados de *N*-óxido de heterociclos aromáticos como potenciales fármacos

Martín Gabay

Tutor: Dra. María Laura Lavaggi
Co-tutor: Dra. Mercedes González

Tesina de grado Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias – Universidad de la República
Montevideo, Mayo 2013

A mis padres

Quisiera agradecer a todos aquellos que me acompañaron en este proceso, y a todos los que de alguna manera u otra me ayudaron a lograrlo:

A Hugo y Mercedes por abrirme las puertas del laboratorio, por su experiencia y su confianza en mí.

A María Laura por enseñarme desde el primer ensayo hasta la última interpretación, por ayudarme y alentarme.

A mis padres por su apoyo incondicional, por guiarme en la vida y dejarme ser, pero básicamente por todo.

A mis hermanos Dana, Sebastián y Andrés por estar siempre y dar una sonrisa.

A Karen por su comprensión y amor.

A mi primo Alex por compartir conmigo mi estancia en Madrid. A mi abuelo Samy por estar orgulloso de mí.

A todos mis compañeros del laboratorio, por el día a día, el trabajo y la buena onda.

A mis amigas de la carrera con quienes compartimos mucho estudio y diversión. En especial a Agus, quien me ayudó a que cada parcial, clase, examen o mismo trabajar fuera un nuevo desafío siempre con alegría.

A mis amigos de toda la vida por todos los momentos vividos juntos y por su aguante.

A la gente de síntesis y de micro del CIN por su colaboración.

A la gente del Instituto de Química Médica de CSIC Madrid, en especial a Nuria y Juan Antonio por sus enseñanzas en Redes Neuronales.

A ANII y CSIC por el apoyo económico.

Índice

Resumen	IX
1. Introducción y antecedentes	
1.1. Desarrollo de nuevos fármacos	2
1.2. Estudios de mutagenicidad: Test de Ames	6
1.3. Métodos teóricos para el estudio de la relación entre la actividad y la estructura de fármacos	11
1.4. Redes neuronales artificiales	12
1.5. Antecedentes	17
1.5.1. Benzofuroxanos y benzofurazanos	18
1.5.2. N^1, N^3 -dióxidos de benzimidazol	22
1.5.3. N^1, N^4 -dióxidos de quinoxalina	23
1.5.4. Furoxanos	25
1.6. Referencias bibliográficas	29
2. Objetivos	
2.1. Objetivos generales	38
2.2. Objetivos específicos	38
3. Materiales y métodos	
3.1. Compuestos a ensayar	40
3.2. Ensayo de toxicidad	40
3.3. Test de Ames de mutagenicidad	40
3.4. Estudio teórico por redes neuronales	41
3.5. Referencias bibliográficas	42
4. Resultados y discusión	
4.1. Ensayo de toxicidad frente a <i>Salmonella typhimurium</i>	46
4.2. Test de mutagenicidad de Ames	50
4.2.1. Fenazinas	52

4.2.2. Indazoles	53
4.2.3. Benzimidazoles	54
4.2.4. Imidazoles	55
4.2.5. Triazinas	56
4.2.6. Piridinas	57
4.3. Obtención de parámetros estructurales para estudios teóricos	59
4.4. Clasificación estructural en clusters	64
4.4.1. Cluster 1	67
4.4.2. Cluster 2	70
4.4.3. Cluster 3	71
4.4.4. Cluster 4	72
4.4.5. Cluster 5	73
4.4.6. Cluster 6	74
4.5. Generación de modelos predictivos de actividad mutagénica por Redes Neuronales Artificiales	76
4.5.1. Modelo predictivo de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica	76
4.5.2. Modelo predictivo de actividad mutagénica en presencia de activación metabólica	82
4.6. Predicción de de la actividad mutagénica de nuevos compuestos	89
4.6.1. Predicción de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica	89
4.6.2. Predicción de actividad mutagénica en presencia de activación metabólica	90
4.7. Referencias bibliográficas	91
5. Conclusiones y perspectivas	95
Anexo	98

Abreviaturas y términos

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AMG- Agar mínimo glucosa

DMSO – Dimetil sulfóxido

EMA – European Medicines Agency

FDA – Food and Drug Administration

His⁻ - Dependiente de histidina

HOMO- por sus siglas del inglés Orbital molecular ocupado de mayor energía

IAC – acrónimo del inglés Modelo de Activación y Competición Interactivos

ICH - International Conference on Harmonisation

I+D F – Investigación y desarrollo de fármacos

LUMO- por sus siglas del inglés Orbital molecular desocupado de menor energía

NIHS – National Institute of Health Sciences (Japón)

OECD - The Organisation for Economic Co-operation and Development

PLS – acrónimo del inglés Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados

QSAR – acrónimo del inglés Relaciones Estructura-Actividad Cuantitativas

ReNDER- acrónimo del inglés Reversible Nonlinear Dimension Reduction

SMILES - acrónimo del inglés Simplified Molecular Input Line Entry Specification

UFC – Unidades formadoras de colonias

UV – Ultra Violeta

Resumen

En el desarrollo de nuevos fármacos capaces de combatir enfermedades, es muy importante conocer los efectos que éstos pueden provocar a quienes los consuman. La toxicidad que los fármacos presentan en contra de la enfermedad no debe provocar efectos secundarios tóxicos sobre los órganos sanos del organismo. La capacidad mutagénica de los compuestos oficia de tamiz en la selección de los mismos, durante los ensayos preclínicos, para poder avanzar a estudios clínicos.

El Test de Ames es un ensayo *in vitro* realizado en cinco cepas de *Salmonella typhimurium* que determina la capacidad mutagénica de potenciales fármacos. Un resultado positivo en este ensayo hace que el compuesto en cuestión abandone el proceso de desarrollo hacia medicamento.

La investigación en el tratamiento de las enfermedades requiere poseer mecanismos predictivos de algunas actividades, para ser más eficientes en el desarrollo de nuevos fármacos. Las redes neuronales artificiales son un ejemplo de modelos teóricos de predicción.

Hace años que nuestro grupo de investigación trabaja en la síntesis y evaluación de potenciales fármacos derivados de *N*-óxido de heterociclos aromáticos. El desarrollo de modelos teóricos con los que se pueda predecir, durante el desarrollo de moléculas, efectos mutagénicos que éstas puedan causar, previo a su síntesis es de importancia en este sentido.

Se realizó en esta tesina de graduación estudios de mutagénesis por Test de Ames de una serie de derivados de *N*-óxido de heterociclos aromáticos así como de algunos análogos deoxigenados. De los veintiséis compuestos derivados de seis familias estructurales diferentes benzimidazol, fenazina, indazol, imidazol, triazina y piridina se observa que la mutagenicidad no está directamente relacionada con la funcionalidad *N*-óxido.

De manera de estudiar la relación estructura-mutagénesis de los mismos se desarrollaron estudios teóricos por medio de redes neuronales artificiales. Se obtuvieron dos redes neuronales artificiales de muy buena predicción de biorespuesta tanto en el caso sin activación metabólica y con activación metabólica. La validación de los modelos utilizando fenazinas fue excelente.

1. Introducción y antecedentes.

1.1 Desarrollo de nuevos fármacos.

El desarrollo de nuevos fármacos es un proceso extenso integrado por una serie de etapas que involucran el trabajo de equipos multidisciplinarios. Las distintas etapas cumplen con diferentes objetivos para lograr la seguridad, eficacia y producción del medicamento ^[1]



Figura 1.1. Etapas del desarrollo de nuevos medicamentos. Extraído de referencia 2

El primer paso en el desarrollo de nuevos fármacos es el descubrimiento (Figura 1.1.). Para ello, se estudian los antecedentes que existen en el área o enfermedad de interés. Se determinan las posibles dianas objetivo y se comienza a evaluar que tipo de estructura puede actuar con ese fin. Luego de la recopilación bibliográfica, y una vez que se tiene claro a donde se quiere acometer, se procede a la síntesis de los posibles fármacos. La síntesis implica procesos que pueden llevar más o menos tiempo dependiendo del tipo de estructura. También se incluye en este proceso la identificación, el aislamiento y la purificación del producto.

Al pasar la fase de descubrimiento, de la cual se obtienen varios productos potenciales fármacos, se ingresa en la fase de estudios pre-clínicos. Los estudios pre-clínicos engloban una extensa lista de ensayos tanto *in vitro* en diferentes modelos como los cultivos celulares, así como *in vivo*. El uso de animales de experimentación permite acercarse más al sistema en el cual los medicamentos actuarán. Cabe destacar que a pesar de las ventajas que presenta el uso de animales de experimentación, siempre se tiende a la reducción de la cantidad de animales, y al uso de los mismos luego de haber agotado otras opciones de ensayos previos. Esto último se debe a una cuestión ética y de costo que conllevan los ensayos *in vivo*. ^[3-5]

Algunos de los objetivos de la fase pre-clínica son el estudio de como actúa el organismo sobre el potencial fármaco es decir la farmacocinética y el estudio de como actúa el potencial

fármaco sobre el organismo, farmacodinamia. Dentro de los análisis farmacocinéticos, se evalúa la absorción y el transporte del compuesto, que células y órganos son afectados, metabolización y eliminación de los subproductos. En la farmacodinamia se analizan aspectos bioquímicos y enzimáticos así como el efecto dosis-respuesta que se pueda producir.^[6]

Si bien la farmacocinética y la farmacodinamia son áreas fundamentales en dicha fase, quizás lo más decisivo es el estudio de la toxicidad de los potenciales medicamentos con el objetivo de entender si realmente son seguros para el consumo humano.

En los estudios pre-clínicos, es muy importante conocer los efectos que los potenciales fármacos pueden provocar a quienes los consuman. La toxicidad que los fármacos presentan en contra de la enfermedad no debe provocar efectos secundarios tóxicos sobre los órganos sanos del organismo. Estos efectos secundarios tóxicos pueden ser muy variados (mutagenicidad, genotoxicidad, clastogenicidad, teratogenicidad, etc.) pero sin dudas la capacidad mutagénica de los compuestos oficia de tamiz en la selección de los mismos, durante los ensayos pre-clínicos, para poder avanzar en los estudios clínicos de nuevos fármacos. Compuestos mutagénicos son apartados y no pueden continuar su desarrollo. Existe una batería de ensayos pre-clínicos para estudios de mutagenicidad y genotoxicidad, que van desde estudios *in vitro* a estudios *in vivo*.^[1]

La ICH (*International Conference on Harmonisation*) es una institución que recomienda distintos ensayos en la fase pre-clínica del desarrollo de fármacos. La realización de los mismos bajo las condiciones recomendadas permite luego, de obtenerse buenos resultados, registrar dichos medicamentos en las diferentes agencias internacionales de regulación de medicamentos, FDA (Food and Drug Administration), EMEA (European Medicines Agency), NIHS (National Institute of Health Sciences Japón). La ICH sugiere en su guía^[7] diferentes ensayos para estudio de mutagenicidad. Se aceptan válidas dos alternativas de ensayos a seguir para el estudio de genotoxicidad, pero en ambas se encuentra el Test de Ames como uno de los primeros a realizarse *in vitro*.

En la tabla 1.1. se detallan opciones de ensayos a seguir para el estudio de mutagenicidad de potenciales fármacos según la ICH.

Ensayos	
Opción 1	<ul style="list-style-type: none"> i. Ensayo de mutagénesis en bacterias. ii. Ensayo citogenético de aberraciones cromosómicas (ensayo de aberraciones cromosómicas en metafase <i>in vitro</i> o test de micronúcleo <i>in vitro</i>) o ensayo de mutación de gen Tk en linfoma de ratón <i>in vitro</i>. iii. Ensayo de genotoxicidad <i>in vivo</i>. Test de daño cromosómico utilizando células hematopoyéticas de roedor ya sea micronúcleo o aberraciones cromosómicas en células metafásicas.
Opción 2	<ul style="list-style-type: none"> i. Ensayo de mutagénesis en bacterias. ii. Ensayo de genotoxicidad <i>in vivo</i> en dos tejidos diferentes, generalmente test de micronúcleo utilizando células hematopoyéticas de roedor y luego un ensayo <i>in vivo</i>.

Tabla 1.1. Opciones de ensayos a realizar para el estudio de genotoxicidad de potenciales fármacos propuesto por ICH ^[7]

Luego de los ensayos pre-clínicos, aquellos productos que colman las exigencias requeridas por las agencias internacionales de regulación, pasan a la etapa de estudios clínicos en seres humanos. Esta tercera etapa en el desarrollo de nuevos medicamentos se subdivide en tres fases sucesivas I, II y III. En la fase I se realiza evaluación farmacológica, se lleva a cabo con un grupo pequeño de voluntarios sanos. La fase II evalúa la eficacia y seguridad del producto, y se realiza en un grupo más amplio de pacientes voluntarios que padecen la enfermedad para la cual se efectuará un tratamiento con el fármaco en cuestión. La fase III se realiza para la confirmación de la eficacia terapéutica, se lo compara con placebo y medicamentos ya existentes en el mercado. Esta última fase se realiza en grupos más grandes de pacientes enfermos voluntarios. ^[1-6]

La etapa de registro del medicamento ocurre una vez que se superan con éxito los estudios clínicos. La empresa que lo va a comercializar presenta una solicitud de aprobación del nuevo

medicamento. Las agencias reguladoras son las encargadas de aprobar el uso del medicamento y permitir su fabricación final o producción a gran escala en un laboratorio que cumpla con las normas exigidas como por ejemplo las Buenas Prácticas de Fabricación de la FDA.^[8]

Una vez que el medicamento sale al mercado continúa siendo estudiado con el fin de analizar la seguridad y efectividad del mismo a largo plazo en una población mayor.

En la actualidad se está tendiendo a la optimización de recursos (humanos, materiales y económicos) y tiempo en el desarrollo de nuevos medicamentos. Para ello se enfoca la investigación en la capacidad de predecir la actividad de los compuestos como algunos de los efectos secundarios que éstos pueden conllevar. La generación de modelos predictivos en el campo de la farmacología (ya sea predicción de actividad biológica como de pasaje de la barrera hemato-encefálica) y toxicología (predicción de toxicidad) es un área novedosa y de suma importancia para el mundo de hoy.

1.2. Estudios de mutagenicidad: Test de Ames.

El Test de Ames es un ensayo *in vitro* especialmente diseñado para la detección de un gran número de compuestos que producen daño genético ligado a la mutación de genes. La posibilidad de identificar compuestos que producen este tipo de daños ha sido un gran avance en la seguridad de los nuevos medicamentos. Compuestos que producen mutaciones son capaces de desarrollar o inducir el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Las mutaciones generadas pueden ser de tipo puntual involucrando una o unos pocos pares de bases, o bien generar inserciones o deleciones de fragmentos de mayor tamaño pudiendo generar rearrreglos que terminen en la ganancia o pérdida de cromosomas enteros. ^[9,10]

El Test de Ames ^[9-11] es realizado en un conjunto de 5 cepas de *Salmonella typhimurium* de entre TA97, TA97a, TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538, TA102, TA104, aunque siempre se deben utilizar una combinación de TA98, TA100, TA1535, TA102 y alguna de TA97, TA97a o TA1537. ^[1,7] Cada una de estas cepas presenta una mutación diferente en el operón de histidina, siendo todas His⁻. Es decir, carecen de la capacidad de síntesis de una enzima de la vía metabólica de la histidina, convirtiéndose en dependientes de dicho aminoácido en el medio de cultivo para su crecimiento. Estas mutaciones actúan como *hot spots* o puntos calientes para agentes mutagénicos que producen daño genético por diferentes vías. ^[9, 10,12]

Además de las mutaciones para histidina, las cepas presentan otras mutaciones que aumentan su capacidad de reconocer mutágenos. Una mutación (*rfa*), implica la pérdida parcial del lipopolisacárido de la pared, lo que aumenta la permeabilidad de la misma a ciertas moléculas. Otra mutación presente en alguna de las cepas (*uvrB*) provoca una deleción en el sistema de reparación del ADN.

Otra diferencia entre las diferentes cepas, es la presencia en algunas de ellas de plásmidos de resistencia a ciertos antibióticos. Otro plásmido que contienen varias de las cepas (TA97, TA98, TA100 y TA102) es pKM101. Dicho plásmido aumenta la mutagénesis química y espontánea promoviendo un sistema de reparación del ADN propenso a error que presentan las bacterias. Otra característica del plásmido pKM101 es aportar resistencia a ampicilina, el plásmido pAQ1, presente en las cepas TA 102 y TA 104, les confiere resistencia a tetraciclina. ^[10, 12,13]

En la tabla 1.2. se detallan algunas de las mutaciones presentes en las diferentes cepas, así como también la secuencia blanco y el evento de reversión que ocurre frente a agentes mutagénicos.

Cepa	Mutación	uvrB	Defecto en LPS	Plásmido	Secuencia blanco	Evento de reversión
TA1535	hisG46	Mutado	rfa	No presenta	-G-G-G-	Sustitución de un par de bases
TA100	hisG46	Mutado	rfa	pKM101	-G-G-G-	Sustitución de un par de bases
TA1538	hisD3052	Mutado	rfa	No presenta	-C-G-C-G- C-G-C-G-	Cambio marco de lectura
TA98	hisD3052	Mutado	rfa	pKM101	-C-G-C-G- C-G-C-G-	Cambio marco de lectura
TA1537	hisC3076	Mutado	rfa	No presenta	-C-C-C-	Cambio marco de lectura
TA97	hisO1242	No mutado	No presenta	No presenta	-C-C-C-C- C-C-	Cambio marco de lectura
TA104	hisG428	Mutado	rfa	No presenta	No específica	Transición/transversión
TA102	hisG428	Mutado	rfa	pKM101, pAQ1	No específica	Transición/transversión

Tabla 1.2. Características de la arquitectura de algunas cepas utilizadas en el Test de Ames. ^[12-16]

El ensayo de mutagenicidad por Test de Ames, consiste en hacer crecer cada una de las cepas en presencia del compuesto a estudiar a diferentes concentraciones del mismo, en un medio con trazas de histidina. Si el compuesto produce nuevas mutaciones sobre las preexistentes, o

cercano a estas en el gen, las bacterias reactivarán la función del gen revertiendo el fenotipo y crecerán formando colonias.

En el ensayo se realizan controles positivos (compuestos altamente mutagénicos para dicha cepa) y negativos (bacteria sin contacto con el compuesto), que garantizan por un lado contar con una gran reversión de la mutación, es decir la formación de muchas colonias, y por otro evidenciar las revertientes espontáneas. Esto último es fundamental, ya que la propia tasa de mutación del ADN genera mutaciones espontáneas todo el tiempo. El control realizado sirve para separar el efecto natural del efecto producido por la exposición a un compuesto en particular. A partir del control negativo se determina cuando un compuesto es mutagénico en dicha cepa, ya que según Chu y colaboradores ^[17] un compuesto es mutagénico cuando es capaz de al menos duplicar en número de colonias a las colonias revertientes espontáneas.

A modo de ejemplo se muestra en la figura 1.2. como se visualizan las placas de cultivo en un ensayo con un compuestos mutagénico.

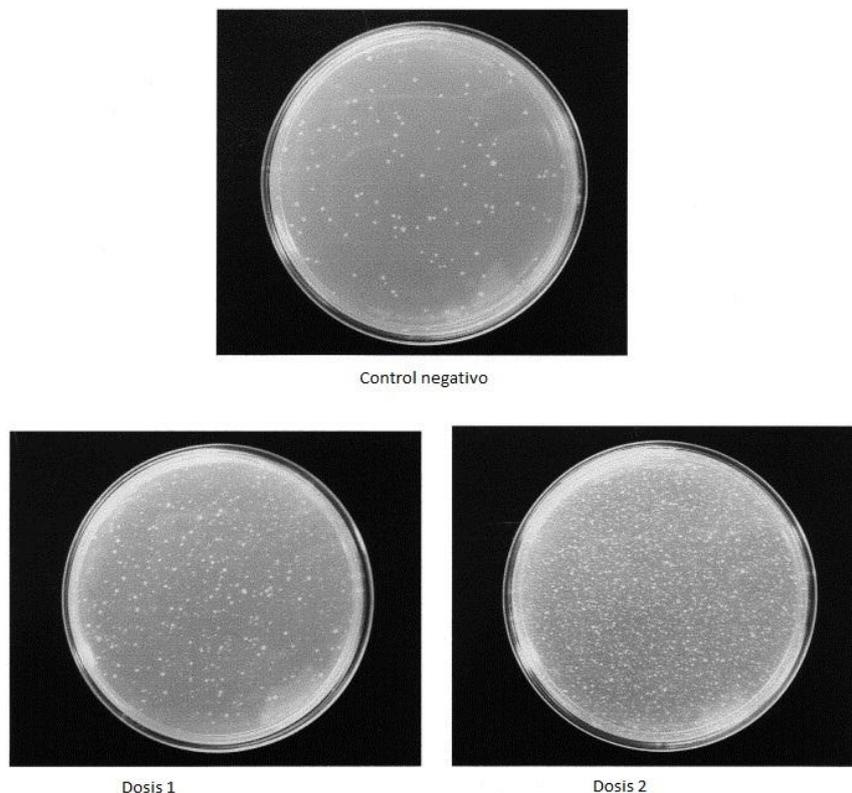


Figura 1.2. Comportamiento de un compuesto mutagénico frente a un control negativo. Dosis 2 es el doble de Dosis 1.

Es recomendable por otro lado confirmar el resultado del ensayo mediante la demostración de un efecto dosis-respuesta que se presenta en un rango de concentraciones previo a una saturación por efectos de toxicidad. No obstante, no todos los compuestos presentan efecto dosis-respuesta aun así siendo mutagénicos. La gran mayoría de los mutágenos son tóxicos para la bacteria en alguna concentración y en ese caso la cantidad de revertientes disminuye. Por otro lado, es importante además de contar las colonias de revertientes, observar el crecimiento confluyente de bacteria en toda la placa. En el caso que no se vea crecimiento en toda la placa puede ser un indicio de toxicidad y es esencial para la determinación e interpretación de los resultados. ^[9, 10,17]

Existen algunos compuestos carcinogénicos como algunas aminas o heterociclos aromáticos que no son activos de por sí, sino que lo son una vez que son metabolizados a formas biológicamente activas. Es por esto que el Test de Ames se realiza sin y con activación metabólica, en presencia o ausencia de fracción S9, lo cual permite también conocer si los efectos mutagénicos son dados por el compuesto en sí mismo o por productos de su metabolización (hecho muy importante en el desarrollo de fármacos que serán tratados por el organismo como xenobióticos). ^[10]

La fracción S9 es un homogeneizado de hepatocitos de hígado de rata, ratón, mono o ser humano. Para incrementar la actividad de las enzimas de metabolización, en el caso de trabajar con fracciones provenientes de animales, se trata previamente a los mismos con Aroclor 1254. ^[10]

El Test de Ames es ampliamente utilizado en todo el mundo como un escaneo inicial para determinar la capacidad mutagénica de los candidatos a fármacos. ^[18, 20-22] Es determinante en los estudios pre-clínicos ya que es exigido por las agencias internacionales de regulación de medicamentos. En primer lugar un compuesto que es mutagénico, para al menos una de las cepas, se lo considera mutagénico. Por otro lado, un resultado positivo en este ensayo es suficiente para no continuar con otros ensayos posteriores relacionados con toxicidad. ^[9, 10,23] Un resultado negativo en una cepa debe ser confirmado utilizando cuatro de las cepas restantes.

El ensayo utilizando las cepas TA98 o TA100 identifica hasta un 90% de los mutágenos de una población con un 35% de compuestos mutagénicos. ^[10,24] En caso que el resultado del ensayo fuese negativo en esas dos cepas, se procede a realizarlo en otras para la confirmación.

1.3. Métodos teóricos para el estudio de la relación entre la actividad y la estructura de fármacos.

La estructura molecular de los fármacos es muy importante para la actividad biológica que estos producen. Ya sea el arreglo de átomos que forman la molécula o distintas propiedades químicas o fisicoquímicas como reactividad, electrofilia, nucleofilia, distancias y ángulos de enlace, energías, o hidrofobicidad determinan la actividad que un producto pueda presentar. Es fundamental estudiar y entender la relación entre la estructura y la actividad biológica de los potenciales fármacos para realizar un desarrollo eficaz. ^[25, 26]

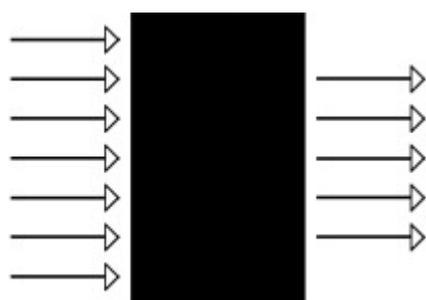
Se realizan en la actualidad estudios de tipo QSAR, acrónimo del inglés *quantitative study of structure-activity relationship*, los cuales vinculan la estructura de los compuestos con la actividad biológica que éstos conllevan. Este tipo de estudio consiste en correlacionar por medio de descriptores moleculares distintas propiedades químicas o fisicoquímicas con valores de actividad biológica. Existe una gran variedad de tratamientos QSAR para actividades biológicas dirigidas a diversas dianas biológicas. El objetivo es que el modelo teórico descriptivo aprenda de los datos que se tienen de los descriptores y actividad biológica. Hay dos grandes métodos de aprendizaje por el cual se generan los modelos; uno estadístico convencional y otro por redes neuronales artificiales. ^[25-30]

Los modelos estadísticos o también llamados QSAR clásicos utilizan principalmente descriptores topológicos, geométricos, fisicoquímicos y electrónicos. Los métodos más utilizados son el análisis PLS (acrónimo del inglés *projection to latent structures*) y la regresión lineal múltiple. La validación estadística de estos últimos depende del número de compuestos, el desvío estándar, los coeficientes de correlación y la varianza. Dentro de las propiedades más típicas para los estudios se destacan hidrofobicidad (por medio del logP o coeficiente de reparto octanol-agua), carga parcial, parámetros estéricos, variación de entalpía de algunos procesos, momento dipolar o energías de orbitales moleculares frontera, HOMO y LUMO. ^[31-33]

1.4. Redes neuronales artificiales.

Los modelos basados en redes neuronales artificiales son ampliamente utilizados en muchas áreas de la ciencia como en medicina, química, bioquímica así como también en el desarrollo de medicamentos. En esta última son muy útiles para la predicción de propiedades de los potenciales fármacos. ^[34-39]

Desde hace ya muchos años se admira la capacidad del cerebro humano de captar y analizar la información. Este tipo de procesamiento difiere de los métodos clásicos basados en estadística y reconocimiento de patrones. Las redes neuronales imitan el funcionamiento del sistema nervioso aprendiendo con ejemplos. ^[40]



Las redes neuronales artificiales son consideradas una caja negra que recibe una serie de datos de entrada (denominados *inputs*) y los procesa dando uno o más datos de salida (denominados *outputs*). ^[26]

Figura 1.3. Esquema del modelo de la caja negra.

Como datos de entrada y de salida se puede utilizar desde información médica de un paciente para saber que medicamento tiene que tomar, datos para predecir una estructura hasta parámetros estructurales para predecir una actividad biológica. Para muchos investigadores, no es importante que sucede en esa caja negra, y utilizan las redes neuronales con el fin de obtener un resultado a partir de aquello que se ingresó como *input* (Figura 1.3.). ^[26]

Considerada entonces la red como una caja negra, se puede utilizar como dato de entrada m variables y esperar n variables como datos de salida. ^[26] Esas variables pueden ser números reales (generalmente entre 0 y 1 o entre -1 y +1), números binarios (0 y 1) o números bipolares (-1 y +1). La cantidad de *output* generalmente es menor a la cantidad de datos de *input*.

Una neurona es la unidad anatómica funcional del sistema nervioso. Las neuronas forman largas redes y su actividad conjunta es la encargada del desarrollo de funciones vitales en los seres vivos. Una neurona está formada, estructuralmente, por una serie de dendritas que son

prolongaciones por las cuales llegan señales de otras neuronas. Las señales van hacia un cuerpo o soma central donde se procesa la información que luego va al axón, otra prolongación terminal que da en el sitio de una nueva sinapsis. La sinapsis es un tipo de unión intercelular especializada que se suele dar entre neuronas. [25, 26, 40]

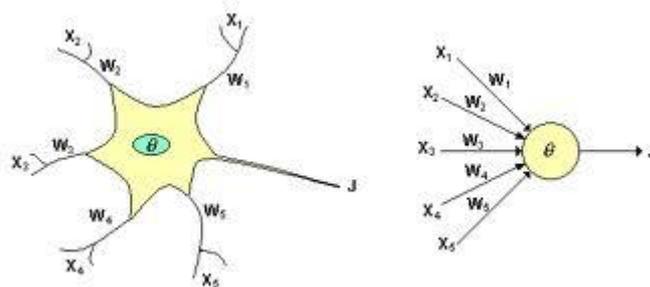


Figura 1.4. Paralelismo entre una neurona biológica (izquierda) y una neurona artificial (derecha).

En la figura 1.4. se muestra el paralelismo entre ambos tipos de neuronas, biológica y artificial. Donde X_i representan las señales de entrada a la neurona, W_i son los pesos sinápticos y θ es la función umbral que la neurona debe sobrepasar para activarse. [25]

La entrada global de una neurona es una función que depende de cada una de las señales de entrada que provienen de otras neuronas y su peso correspondiente es decir la intensidad de la sinapsis que conecta dos neuronas. [41]

$$global_i = \sum_{i=1}^n X_i W_i = \vec{X} \vec{W}$$

Mientras que la salida (Y_i) es una función que depende de la entrada y de la función umbral.

$$Y_i = \theta_i (global_i)$$

Los modelos basados en redes neuronales artificiales procesan la información por medio de neuronas interconectadas entre sí. Estas interconexiones formadas por las neuronas artificiales tienen cualidades típicas del sistema nervioso que le aportan mayor similitud al mismo. *Procesamiento en paralelo*, se da ya que es el comportamiento de la red como tal (conexión de la actividad de todas las neuronas que la forman) la que permite cumplir la función. Se dice que también el *procesamiento es distribuido* ya que no existe un centro que contenga toda la

información sino que ésta se encuentra en todas las neuronas que forman la red. Por último, la *adaptabilidad* es la capacidad de la red de auto-gestionarse o regularse. Estas características hacen a las redes neuronales preferibles frente a otros modelos para la predicción de ciertas actividades biológicas.

Junto con el método de aprendizaje, la topología de la red define a la misma. Esta última se refiere a la arquitectura es decir como se encuentra organizada en sus capas así como al tipo y cantidad de conexiones entre las neuronas. Pueden identificarse distintos tipos de neurona según su ubicación en la red. Las neuronas de entrada son aquellas que reciben un estímulo externo, luego de éstas se ubican las neuronas ocultas que se encargan del procesamiento de la información, finalmente las neuronas de salida dan respuesta.^[40]

Tanto la agrupación de las diferentes neuronas en capas, cantidad y ubicación, como la cantidad de capas que presente la red son fundamentales para el funcionamiento de la misma.

La arquitectura de la red va a determinar como se procese la información en la misma. En la Figura 1.5. se muestra el diagrama de una red neuronal artificial utilizada.

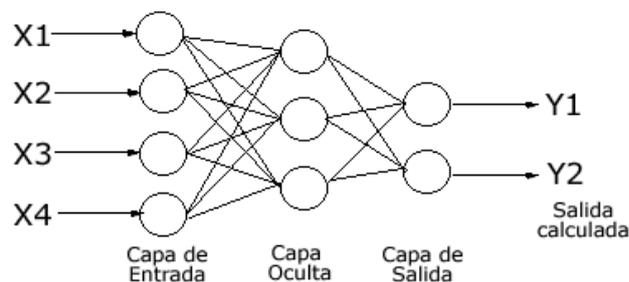


Figura 1.5. Diagrama ejemplo de la arquitectura de una red neuronal artificial.

Diagramar una red con la arquitectura justa implica llegar a un equilibrio entre el grado de complejidad de la misma y la capacidad de correlacionar de la mejor manera los parámetros de entrada y los de salida. Una red con arquitectura demasiado simple puede no ser capaz de aprender correctamente a correlacionar entradas con salidas obteniéndose un modelo no óptimo. Por otro lado, si la arquitectura de la red es muy compleja, el modelo podrá correlacionar bien los datos de entrada con los de salida pero no será capaz de predecir sobre nuevos datos luego de la generación del mismo.^[26]

El aprendizaje consiste en modificaciones de los pesos sinápticos de las distintas conexiones de la red en respuesta a los valores de entrada. Al considerarse que es en los pesos sinápticos

donde se almacena la información del modelo, los cambios que suceden en los mismos, ya sea por eliminación de conexiones o generación de nuevas, van a determinar el método de aprendizaje. El aprendizaje se considera terminado cuando los valores de los pesos dejan de variar en función del tiempo. ^[26]

Se pueden distinguir dos clases de aprendizaje:

- 1- Aprendizaje supervisado: en este tipo de aprendizaje hay un supervisor externo que marca la respuesta indicada según las entradas. La red aprende, modificando los pesos hasta determinar un valor de salida. Luego del aprendizaje, el supervisor compara el valor de salida calculado por la red con el marcado por él previamente, y el modelo vuelve a aprender para que el valor de salida sea lo más próximo al marcado por el supervisor.
- 2- Aprendizaje no supervisado: en este tipo de aprendizaje puede auto-regular los pesos de las conexiones sin la necesidad de un factor externo.

Existe también el llamado aprendizaje híbrido el cual combina ambos tipos de aprendizaje en distintas regiones del modelo.

Las conexiones que se establecen entre las neuronas, así como las que se deshacen y vuelven a formar durante el aprendizaje pueden variar su sentido. Las redes pueden tener un único sentido, desde la entrada de la primera neurona hasta la salida de la última neurona. Por otra parte están los modelos en los que las neuronas pueden conectarse de la forma antes mencionada, y en sentido opuesto durante el proceso, así como también entre neuronas de la misma capa. Las conexiones que existan en una red neuronal caracterizan a la misma y le otorgan diferentes propiedades por lo que serán útiles para diferentes usos. ^[25,26]

Existe una gran variedad de redes neuronales que difieren entre sí por la arquitectura, las conexiones entre sus neuronas y los procesos para los que sirve su uso. Algunos ejemplos son los *modelos de activación y competición interactivos* como es el *Modelo IAC*, y las redes de retropropagación.

El *Modelo IAC* ^[42], utilizado por el programa CODES[®] ^[43], es una red de aprendizaje competitivo y cooperativo no supervisado que consiste en el agrupamiento de las neuronas para competir y cooperar unas con otras con el fin de realizar una tarea dada.

Las redes de retropropagación del error son ampliamente usadas y emplean un tipo de aprendizaje supervisado cuya función consiste en minimizar mediante un gradiente descendiente el error entre los valores reales de salida y los calculados por la red. Un ejemplo es la red del tipo ReNDeR (acrónimo del inglés *Reversible Nonlinear Dimension Reduction*) la cual es un ejemplo específico de red de retropropagación del error de aprendizaje supervisado en el cual la arquitectura se halla estructurada en 5 capas e implica una reducción de la dimensionalidad. ^[44]

1.5. Antecedentes

Desde hace años el grupo de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias-Facultad de Química-UdelaR trabaja en la investigación y desarrollo de familias de diferentes heterociclos conteniendo agrupamientos *N*-óxidos. Estos compuestos han sido desarrollados para el tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas, como enfermedad de Chagas^[45-47], o de carácter inflamatorio^[48], enfermedades cardiovasculares^[49], así como también distintos tipos de cáncer.^[50]

En la figura 1.6. se muestran las estructuras generales de los derivados de benzofuroxano^[51-53], *N*¹,*N*³-dióxido de benzimidazol^[54,55], *N*¹,*N*⁴-dióxido de quinoxalina^[56], *N*⁵,*N*¹⁰-dióxido de fenazina^[50], *N*¹-óxido de indazol^[57], furoxano, *N*¹,*N*⁴-dióxido de 1,2,4 triazina y *N*⁴-óxido de 1,2,4-triazina^[58]. Dentro de éstos en algunos casos se han estudiado su actividad mutagénica y genotóxica.^[48, 49,59]

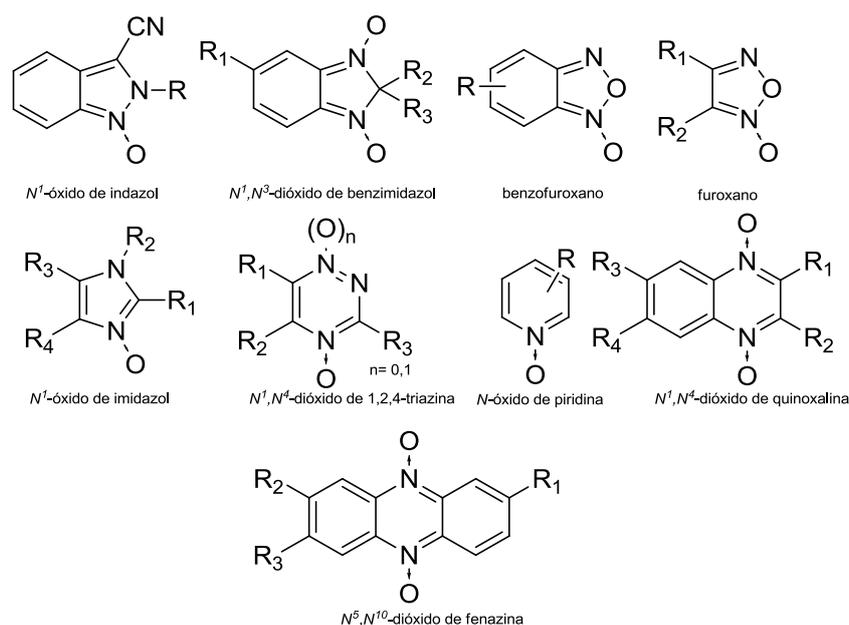
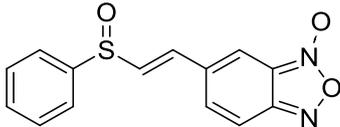
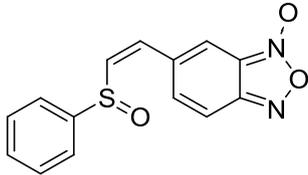
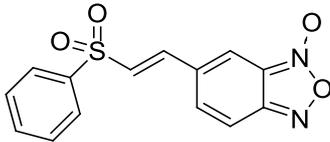
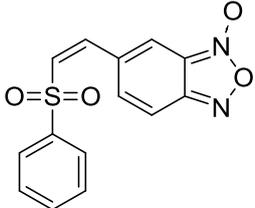
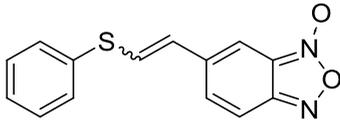
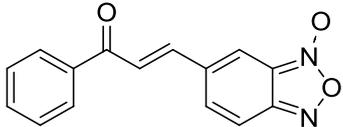
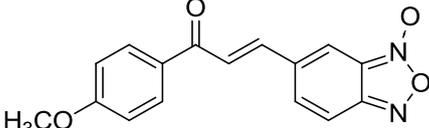
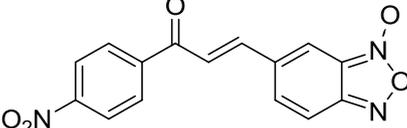
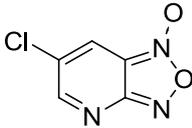
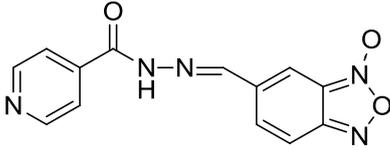
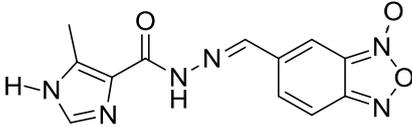
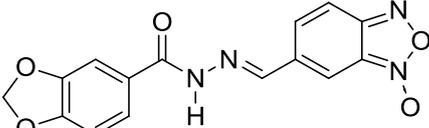


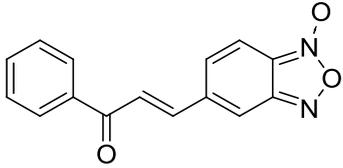
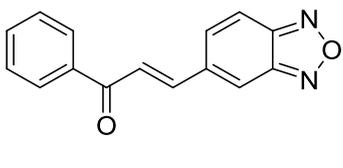
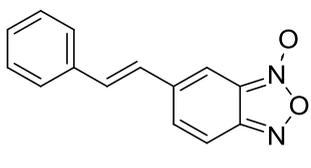
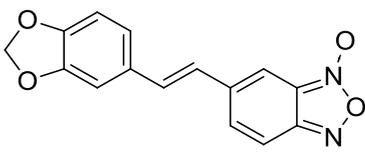
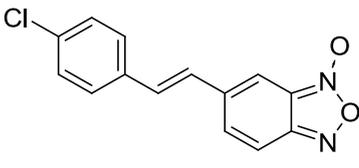
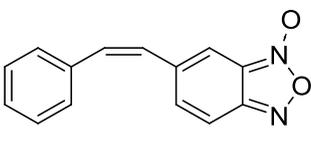
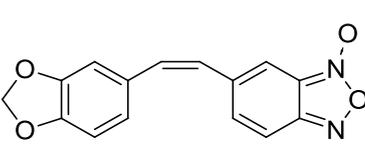
Figura 1.6. Estructura de distintas familias de heterociclos derivados de *N*-óxido sintetizados por el grupo de Química Medicinal.

A continuación se discutirá los resultados de mutagenicidad obtenidos para los *N*-óxidos y sus congéneres de-oxygenados.

1.5.1. Benzofuroxanos y benzofurazanos

Compuesto	Estructura	Resultado sin activación metabólica	Resultado con activación metabólica
1		Mutagénico	Mutagénico
2		Mutagénico	No Mutagénico
3		Mutagénico	Mutagénico
4		Mutagénico	Mutagénico
5		No Mutagénico	Mutagénico

6		Mutagénico	No Mutagénico
7		Mutagénico	Mutagénico
8		Mutagénico	Mutagénico
9		No Mutagénico	Mutagénico
10		Mutagénico	Mutagénico
11		Mutagénico	Mutagénico
12		No Mutagénico	No Mutagénico

13		Mutagénico	No Mutagénico
14		No Mutagénico	No Mutagénico
15		No Mutagénico	Mutagénico
16		No Mutagénico	Mutagénico
17		No Mutagénico	Mutagénico
18		No Mutagénico	No Mutagénico
19		Mutagénico	Mutagénico

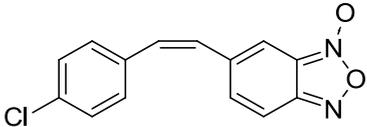
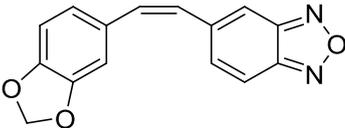
<p>20</p>		<p>Mutagénico</p>	<p>Mutagénico</p>
<p>21</p>		<p>No Mutagénico</p>	<p>Mutagénico</p>

Tabla 1.3. Resultado del test de Ames para los compuestos derivados de la familia benzofuroxanos y benzofurazanos.

En la familia de benzofuroxanos la gran mayoría (compuestos **1-4**, **6-8**, **10**, **11**, **13**, **19** y **20**) resultaron ser mutagénicos sin activación metabólica, y prácticamente todos con activación metabólica. A excepción de tres compuestos, todos presentan efectos mutagénicos al menos en una de las dos condiciones. También se puede inferir que la presencia del agrupamiento *N*-óxido podría relacionarse con un perfil de actividad mutagénica sin activación metabólica. La ausencia de la función *N*-óxido (benzofurazano) en el compuesto **14** le confirió pérdida de la capacidad mutagénica (comparar con el derivado *N*-oxidado **13**), algo similar ocurre con el compuesto **19** y su congénere de-oxygenado **21**.

1.5.2. N¹,N³-dióxidos de benzimidazol

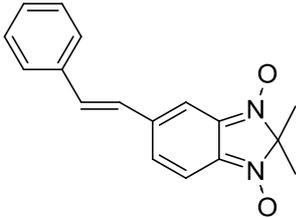
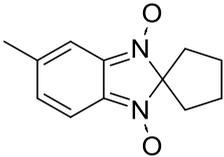
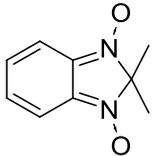
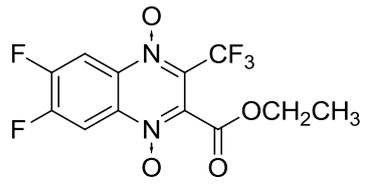
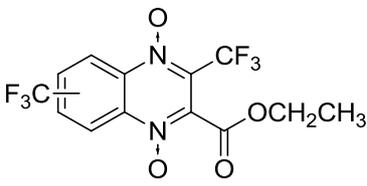
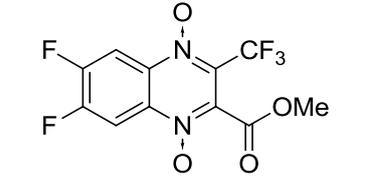
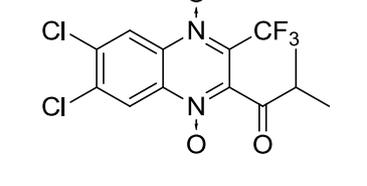
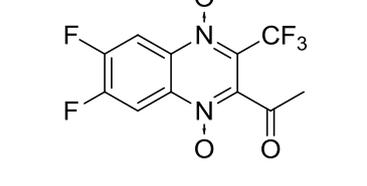
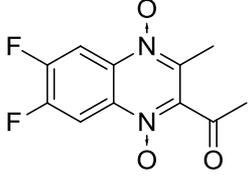
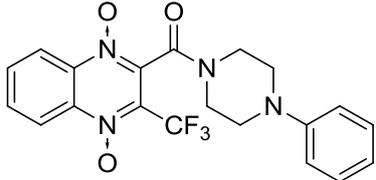
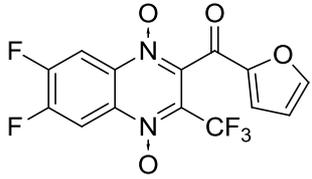
Compuesto	Estructura	Resultado sin activación metabólica	Resultado con activación metabólica
22		Mutagénico	Mutagénico
23		Mutagénico	Mutagénico
24		Mutagénico	Mutagénico

Tabla 1.4. Resultado del test de Ames para los dióxidos de benzimidazol.

En cuanto a los dióxidos de benzimidazoles ensayados resultaron ser todos mutagénicos en ambas condiciones. Esto podría interpretarse como que tanto los compuestos en sí mismos, como los productos de metabolización de los mismos poseen dicha actividad.

1.5.3. N¹,N⁴-dióxidos de quinoxalina

Compuesto	Estructura	Resultado sin activación metabólica	Resultado con activación metabólica
27		No Mutagénico	Mutagénico
28		No Mutagénico	No Mutagénico
29		No Mutagénico	Mutagénico
30		Mutagénico	Mutagénico
31		No Mutagénico	Mutagénico

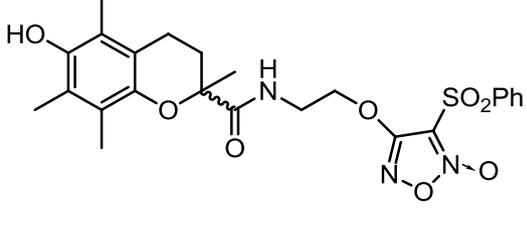
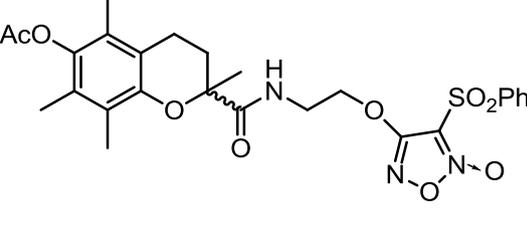
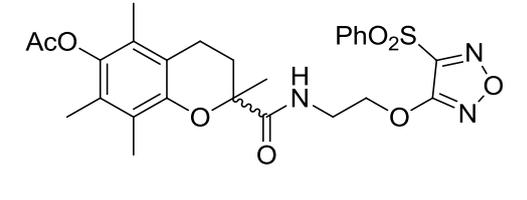
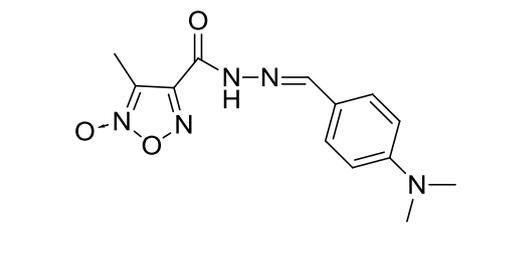
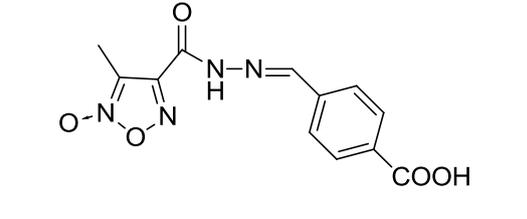
32		Mutagénico	Mutagénico
33		Mutagénico	ND*
34		No Mutagénico	Mutagénico

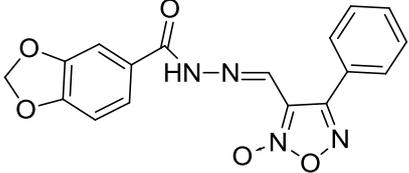
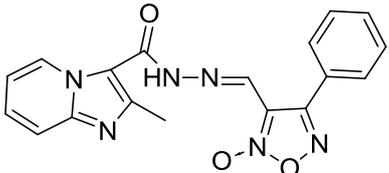
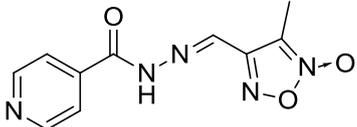
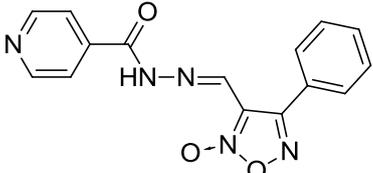
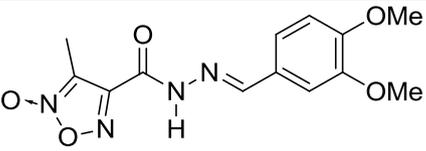
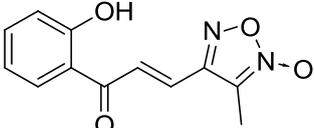
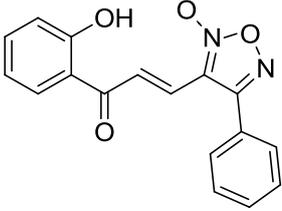
*No determinado

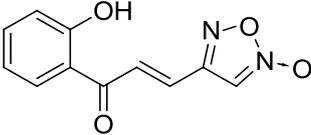
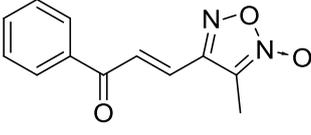
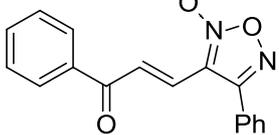
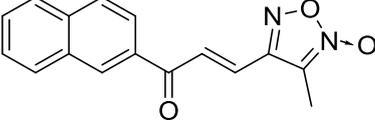
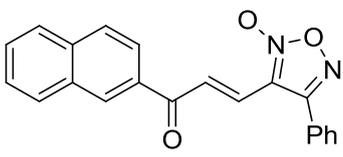
Tabla 1.5. Resultado del test de Ames para los compuestos derivados de *N,N'*-dióxido de quinoxalina.

Por otro lado, los derivados de *N,N'*-dióxido de quinoxalina si bien no presentan una clara tendencia de potencial mutagénico en ausencia de activación metabólica. Interesantemente los ésteres resultaron no mutagénicos mientras que los derivados de cetonas fueron en su mayoría a excepción de **31** y **34**. Todos resultaron ser mutagénicos con activación metabólica, excepto el compuesto **28** que no resulta mutagénico en ninguna de las dos condiciones. Este hecho estaría demostrando que los metabolitos serían los responsables de esta bioactividad observada.

1.5.4. Furoxanos y furazano.

Compuesto	Estructura	Resultado sin activación metabólica	Resultado con activación metabólica
41		No Mutagénico	ND*
42		No Mutagénico	No Mutagénico
43		Mutagénico	No Mutagénico
44		No Mutagénico	No Mutagénico
45		No Mutagénico	No Mutagénico

46		No Mutagénico	No Mutagénico
47		No Mutagénico	No Mutagénico
48		No Mutagénico	No Mutagénico
49		No Mutagénico	No Mutagénico
50		No Mutagénico	Mutagénico
51		No Mutagénico	No Mutagénico
52		No Mutagénico	No Mutagénico

53		No Mutagénico	No Mutagénico
54		No Mutagénico	No Mutagénico
55		No Mutagénico	No Mutagénico
56		No Mutagénico	No Mutagénico
57		No Mutagénico	No Mutagénico

No determinado

Tabla 1.6. Resultado del test de Ames para los compuestos derivados de furoxano.

Resultados opuestos se observan en la familia de los derivados de furoxano, ya que sólo el derivado de-oxigenado, compuesto **43**, es mutagénico y únicamente sin activación metabólica, todos los restantes no producen un efecto de mutagénesis. En esta familia se debilita la teoría de que el agrupamiento *N*-óxido esté vinculado con la mutagénesis ya que el único compuesto mutagénico no lo presenta.

De estos últimos estudios, en algunos casos se ha encontrado cierta relación entre la presencia del agrupamiento *N*-óxido y la mutagenicidad. Específicamente, el sistema benzofuroxano (*N*-óxido de benzo[1,2-*c*][1,2,5]oxadiazol) parece ser responsable de la mutagenicidad de ciertos

agentes contra el mal de Chagas y ciertos agentes antiinflamatorios desarrollados por el grupo.^[23,48] Sin embargo, otros *N*-óxidos, como es en el caso de los derivados de furoxano con actividad antiinflamatoria y anti-aterosclerosis,^[48,49] parecen carecer de mutagenicidad. En otros casos, como *N,N'*-dióxidos de quinoxalina con actividad anti-parasitaria muestran una mutagenicidad dependiente del resto de sustituyentes del heterociclo.^[59]

Por otro lado, la investigación y desarrollo de fármacos (I+D F) ha exigido poseer herramientas predictivas de las actividades biológicas^[27] de los compuestos en estudio, para de esta forma ser más eficientes en el desarrollo de nuevos medicamentos. En este sentido el grupo de Química Medicinal ha desarrollado una serie de estudios tipo QSAR ya sea 2D como 3D con el fin de relacionar la estructura y la actividad biológica.^[60-62]

Pero también, ha surgido por parte de los actores dedicados a la I+D F la necesidad de herramientas predictivas para otros aspectos (absorción oral, penetración de barrera hematoencefálica, biodisponibilidad, metabolización)^[28], entre ellos la mutagenicidad y otros efectos adversos.

Existen en la actualidad una amplia descripción bibliográfica relativa a estudios de relación estructura-actividad mutagénica de distintos grupos de compuestos. Diversos grupos de investigación han basado sus estudios en el área en diferentes modelos teóricos. Estos van desde métodos clásicos^[60-63] que utilizan hidrofobicidad^[67], energías^[68] o propiedades electrónicas^[69,70], hasta empleo otros métodos como redes neuronales y máquinas de soporte vectorial.^[71-80]

Para nuestro grupo de I+D F es de importancia obtener modelos teóricos que relacionen la estructura de distintos compuestos que contengan la funcionalidad *N*-óxido y su potencial actividad mutagénica. Esto permitiría conocer de antemano, durante el desarrollo de moléculas, efectos mutagénicos que éstas pueden causar, previo a su síntesis. De este modo se trabajaría con la intención de reducir los recursos prediciendo efectos secundarios no deseados.

1.6. Referencias bibliográficas.

- [1] <http://www.oecd.org/sti/biotech/41603452.pdf> (acceso 04/04/2013).
- [2] http://revistacontable.dev.nuatt.es/noticias_base/la-valoraci%C3%B3n-de-los-activos-intangibles-en-la-empresa-biofarmac%C3%A9utica-una-reflexi%C3%B3n-cr%C3%ADtica-sobre-la-aplicaci%C3%B3n-de-las-niif (acceso 18/04/2013).
- [3] Kerns, E.H.; Di, L. *Drug-like properties: concepts, structure design and methods*. Academic Press, Elsevier Inc., San Diego, California, USA, cap. 1, 2, 4, 2008.
- [4] Barreiro, E.J.; Manssour Fraga, C.A. *Química Medicinal as bases moleculares da ação dos fármacos*. Artmed, Rio de Janeiro, Brasil, cap. 1-3, 2008.
- [5] Silverman, R.B. *The organic chemistry of drug design and drug action*. Academic Press, Inc., San Diego, California, USA, cap. 1-4, 1992.
- [6] Magos Guerrero, G.A; Lorenzena-Jiménes, M. *Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos*. Rev. Fac. Med. UNAM, México. 52(6), 260-264, 2009.
- [7] http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf (acceso 10/04/2013).
- [8] <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm064971.htm> (acceso 13/04/2013).
- [9] Maron, D.M.; Ames, B.N. *Revised methods for Salmonella mutagenicity test*. Mut. Res. 113, 173- 215, 1983.
- [10] Mortelmans, K.; Zeiger, E. *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. Mut. Res. 455, 29-60, 2000.
- [11] Guía OECD, <http://www.oecd.org/dataoecd/18/31/1948418.pdf> (acceso 15/02/2013).
- [12] Isono, K.; Yourno, J. *Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1612-1617, 1974.
- [13] Ames, B.N.; Lee, F.D ; Durston, W.E. *An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 782-786, 1976.
- [14] Barnes, W.; Tuley, E.; Eisenstadt, E. *Base-sequence analysis of His⁺ revertants of the hiG46 missense mutation in Salmonella typhimurium*. Environ. Mutagen. 4, 297, 1982.
- [15] Levin, D.E.; Yamasaki, E.; Ames, B.N. *A new Salmonella tester strain for the detection of frameshift mutagens: a run of cytosines as a mutational hot-spot*. Mut. Res. 94, 315-330, 1982.

- [16] Levin, D.E.; Hollstein, M.C.; Christman, M.F.; Schwiers, E.A.; Ames, B.N. *A new Salmonella tester strain (TA102) with A:T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 7445-7449, 1982.
- [17] Chu, K.C.; Patel, K.M.; Lin, A.H.; Tarone, R.E.; Linhart, M.S.; Dunkel, V.C. *Evaluating statistical analysis and reproducibility of microbial mutagenicity assays*. Mut. Res. 85, 119-132, 1981.
- [18] McCann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E.; Ames, B.N. *Detection of carcinogens in the Salmonella/microsome test. Assay of 300 chemicals*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 5135-5139, 1975.
- [19] Zeiger, E. *The Salmonella mutagenicity assay for identification of presumptive carcinogens*. H.A. Milman, E.K. Weisburger (Eds.), Handbook of Carcinogen Testing, Noyes Publishers, Park Ridge, NJ, pp 83-99, 1985.
- [20] Zeiger, E.; Haserman, J.K.; Shelby, M.D.; Mergolin, B.H.; Tennant, R.W. *Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals*. Environ. Mol. Mutagen. 16, 18, 1-14, 1990.
- [21] Kier, L.E.; Brusick, D.J.; Auletta, A.E.; Von Halle, E.S.; Brown, M.M.; Simmon, V.F.; Dunkel, V.; McCann, J.; Mortelmans, K.; Prival, M.; Rao, T.K.; Ray, V. *The Salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program*. Mut. Res. 168, 69-240, 1986.
- [22] Nielsen, P.; Lagersted, A.; Danielsen, S.; Jensen, A.; Hart, J.; Larsen, J.C. *Mutagenic activity of nine N,N-disubstituted hydrazines in the Salmonella/mammalian microsome assay*. Mut. Res. 278, 215-226, 1992.
- [23] Cabrera, M.; Lavaggi, M.L.; Hernández, P.; Merlino, A.; Gerpe, A.; Porcal, W.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Monge, A.; López de Cerain, A.; González, M.; Cerecetto, H. *Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-T. cruzi 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction*. Toxicol. Lett. 190, 140-149, 2009.
- [24] Zeiger, E.; Risko, K.J.; Margolin, B.H. *Strategies to reduce the host of mutagenicity screening using the Salmonella/microsomal assay*. Environ. Mutagen. 7, 901-921, 1985.
- [25] Devillers, J. *Neural networks in QSAR and drug design (principles of QSAR and drug design)*. 1st ed. Academic Press: Lyon, France, 1996.
- [26] Zupan, J.; Gasteiger, J. *Neural networks in chemistry and drug desing*. 2nd ed. WILEY VCH: Weinheim, Germany, 1999.

- [27] Boiani, M.; Cerecetto, H., González, M.; Gasteiger, J. *Modeling anti-Trypanosoma cruzi activity of N-oxide containing heterocycles*. J. Chem. Inf. Model.48, 213-219, 2008.
- [28] Guerra, A.; Gonzalez-Naranjo, P.; Campillo, N.E., Cerecetto, H.; González, M.; Páez, J.A. *Artificial neural networks based on CODES descriptors in pharmacology: Identification of novel Trypanocidal drugs against Chagas disease*. Curr. Comp. Aided Drug Design, 9, 1, 2013.
- [29] Hansch, C.; Leo, A. *Exploring QSAR fundamentals and applications in chemistry and biology*. ACS Professional Reference Book. Washington, DC, USA, pp 349-386, 1995.
- [30] Wang, X.; Greene, N. *Comparing measures of promiscuity and exploring their relationship to toxicity*. Mol. Inf. 31, 145-159, 2012.
- [31] Tuppurainen, K. *Frontier orbital energies, hydrophobicity and steric factors as physical QSAR descriptors of molecular mutagenicity. A review with a case study: MX compounds*. Chemosphere, 38, 13, 3015-3030, 1999.
- [32] Hansch, C.; Leo, A. *Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*. ACS, Washington, DC, USA, 1995.
- [33] Hansch, C.; Leo, A.; Hockman, D. *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. ACS, Washington, DC, USA, 1995.
- [34] Boiani, M. *Generación de modelos de clasificación de actividad antichagásica y estudio de mecanismos de acción: Aplicación en la búsqueda de nuevos fármacos anti-Trypanosoma cruzi*. Tesis de Doctorado, Universidad de la República Facultad de Química-PEDECIBA Química, 2007.
- [35] Taskinen, J.; Yliruusi, J. *Prediction of physicochemical properties based on neural network modeling*. Adv. Drug Deliv. Rev., 55, 1163-1183, 2003.
- [36] Polanski, J. *Self-organizing neural networks for pharmacophore mapping*. Adv. Drug Deliv. Rev., 55, 1149-1162, 2003.
- [37] Schneider, G.; Wrede, P. *Artificial neural networks for computer-based molecular design*. Prog. Biophys. Mol. Biol., 70, 175-222, 1998.
- [38] Yamashita, F.; Hashida, M. *Mechanistic and empirical modeling of skin permeation of drugs*. Adv. Drug Deliv. Rev. 55, 1185-1199, 2003.
- [39] Takayama, K.; Fujikawa, M.; Obata, Y.; Morishita, M. *Neural network based optimization of drug formulations*. Adv. Drug Deliv. Rev., 55, 1217-1231, 2003.
- [40] Ichikawa, H.; *Hierarchy neural networks as applied to pharmaceutical problems*. Adv. Drug Deliv. Rev., 55, 1119-1147, 2003.

- [41] Guerra, A. *Aplicación de la inteligencia artificial en química médica*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, 2009.
- [42] McClelland, J.; Rumelhart, D. *Parallel distributed processing: Explorations in the microstructure of cognition*. Foundations. Cambridge, Mass: Bradford Books & MIT Press, vol. 2, 1989.
- [43] Stud M. CODES©; v1.0 (revision 3) ed. Instituto de Química Médica. CSIC. España.
- [44] Niculescu, S. *Artificial neural networks and genetic algorithms in QSAR*. J. Mol. Struct: *THEOCHEM*, 622, 71-83, 2003.
- [45] Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Risso, M.; Saenz, P.; Seoane, G.; Denicola, A.; Peluffo, G.; Quijano, C.; Olea-Azar, C. *1,2,5-Oxadiazole N-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs. Structure-activity relationships*. J. Med. Chem. 42, 1941-1950, 1999.
- [46] Aguirre, G.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Seoane, G.; Denicola, A.; Ortega, M. A.; Aldana, I.; Moge-Vega, A. *Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Structure-activity relationships*. Part II. Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.) 335, 15-21, 2002.
- [47] Olea-Azar, C.; Rigol, C.; Mendizábal, F.; Brinones, R.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Risso, M. *Electrochemical and microsomal production of free radicals from 1,2,5-oxadiazole N-oxide as potential antiprotozoal drugs*. Spectrochim. Acta, Part A, 59, 69-74, 2003.
- [48] Hernandez, P.; Cabrera, M.; Lavaggi, M L.; Celano, L.; Tiscornia, I.; Rodríguez Da Costa, T.; Thomson, L.; Bollati-Fogolín, M.; Miranda, A.L.; Lima, L.M.; Barreiro, E.J.; González, M.; Cerecetto, H. *Discovery of new orally effective analgesic and anti-inflammatory hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives*. Bioorg. Chem. Med. 20, 2158-2171. 2012.
- [49] Cabrera, M.; López, G.V.; Gómez, L.E.; Breijo, M.; Pintos, C.; Botti, H.; Raymondo, S.; Vettorazzi, A.; López de Ceráin, A.; Monge, A.; Rubbo, H.; González, M.; Cerecetto, H. *Genetic toxicology and preliminary in vivo studies of nitric oxide donor tocopherol analogs as potential new class of antiatherogenesis agents*. Drug Chem. Toxicol. 34 (3), 285-293, 2011.
- [50] Lavaggi, M.L.; Cabrera, M.; Cristina Pintos; Arredondo, C.; Pachón, G.; Rodríguez, J.; Stella Raymondo; Pacheco, J.P; Cascante, M.; Olea-Azar, C.; López de Ceráin, A.; Monge, A.; Cerecetto, H.; González, M. *Novel phenazine 5,10-dioxides release OH in simulated hypoxia and induce reduction of tumour volume in vivo*. ISRN Pharmacology. 314209, 2011.

- [51] Aguirre, G.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Thomson, L.; Tórtora, V.; Denicola, A.; Moller, M. *Benzo-[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs*. Part III. Substituents-clustering methodology in the search of new active compounds. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 6324-6335, 2005.
- [52] Olea-Azar, C.; Rigol, C.; Mendizábal, F.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Morello, A.; Repetto, Y.; Maya, J. D. *Novel benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as antichagasic agents: chemical and biological studies*. *Lett. Drugs Des. Discov.* 2, 294-301, 2005.
- [53] Porcal, W.; Hernandez, P.; Aguirre, G.; Boiani, L.; Boiani, M.; Merlino, A.; Ferreira, A.; Di Maio, R.; Castro, A.; González, M.; Cerecetto, H. *Second generation of 5-ethenylbenzofuroxan derivatives as Inhibitors of Trypanosoma cruzi growth: Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships*. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 2768-2781, 2007.
- [54] Aguirre, G.; Boiani, M.; Cerecetto, H.; Gerpe, A.; González, M.; Fernández Sainz, Y.; Denicola, A.; Ochoa de Ocariz, C.; Nogal, J.; Montero, D.; Escápio, J. *Novel antiprotozoal products: Imidazole and benzimidazole N-oxide derivatives and related compounds*. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* 337, 259-270, 2004.
- [55] Boiani, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Torres, S.; Serna, E.; Vera de Bilbao, N.; Sanabria, L.; Yaluff, G.; Nakayama, H.; Rojas de Arias, A.; Vega, C.; Rolan, M.; Gomez-Barrios, A.; Cerecetto, H.; González, M. *2H-Benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: A new family of watersoluble anti-trypanosomatid agents*. *J. Med. Chem.* 49, 3215-3220, 2006.
- [56] Aguirre, G.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Montoya Alfaro, M. E.; Jaso, A.; Zarranz, B.; Ortega, M. A.; Aldana, I.; Moge-Vega, A. *Quinoxaline N,N'-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of Trypanosoma cruzi. Structure-activity relationships*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 3835-3839, 2004.
- [57] Gerpe, A.; Aguirre, G.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; González, M.; Olea-Azar, C.; Rigol, C.; Maya, J. D.; Morello, A.; Piro, O.; Arán, V. J.; Azqueta, A.; Lopez de Cerain, A.; Moge-Vega, A.; Rojas de Arias, A.; Yaluff, G. *Indazole N-oxide derivatives as antiprotozoal agents: Synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies*. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 3467-3480, 2006.
- [58] Cerecetto, H.; González, M.; Risso, M.; Saenz, P.; Olea-Azar, C.; Bruno, A. M.; Azqueta, A.; López de Cerain, A.; Monge, A. *1,2,4-Triazine N-oxide derivatives: studies as potential hypoxic cytotoxins*. Part III. *Archiv der Pharmazie*, 337, 271 - 280, 2004.

- [59] Benitez, D.; Cabrera, M.; Hernández, P.; Boiani, L.; Lavaggi, M.L.; Di Maio, R.; Yaluff, G.; Serna, E.; Torres, S.; Ferreira, M.E.; Vera de Bilbao, N.; Torres, E.; Pérez-Silanes, S.; Solano, B.; Moreno, E.; Aldana, I.; López de Ceráin, A.; Cerecetto, H.; González, M.; Monge, A. *3-trifluoromethylquinoxaline N,N'-dioxides as anti-trypanosomatid agents. Identification of optimal anti-T. cruzi agents and mechanism of action studies*. J. Med. Chem. 54, 3624-3636, 2011.
- [60] Aguirre, G.; Boiani, L.; Boiani, M.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Denicola, A.; Piro, O.; Castellano, E.; Sant'Anna, C. M. R.; Barreiro, E. J. *New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of Trypanosoma cruzi growth. Quantitative structure-activity relationship studies*. Bioorg. Med. Chem. 13, 6336-6346, 2005.
- [61] Da Cunha, J.; Lavaggi, M.L.; Abasolo, M.I.; Cerecetto, H.; González, M. *2D- and 3D-quantitative structure-activity relationship studies for a series of phenazine N,N'-dioxide as antitumour agents*. Chem. Biol. Drug Design. 78, 6, 960 - 968, 2011.
- [62] Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.L.; Aravena, M.A.; Rigol, C.; Olea-Azar, C.; Azqueta, A.; López de Ceráin, A.; Monge, A.; Bruno, A. M. *phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins. Part II. Structure-activity relationship studies*. Med. Chem. 2, 511 - 521, 2006.
- [63] Pérez-Garrido, A.; Morales Helguera, A.; Girón Rodríguez, F.; D.S. Cordeiro, M.N. *QSAR models to predict mutagenicity of acrylates, methacrylates and α,β -unsaturated carbonyl compounds*. Dental Materials, 26, 397-415, 2010.
- [64] Hirayama, T.; Watanabe, T.; Akita, M.; Shimomura, S.; Fujioka, Y.; Ozasa, S.; Fukui, S. *Relationships between structure of nitrated arenes and their mutagenicity in Salmonella typhimurium; 2- and 2,7-nitro substituted fluorine, phenanthrene and pyrene*. Mut. Res. 209, 67-74, 1988.
- [65] Hooberman, B.H.; Chakraborty, P.K.; Sinsheimer, J.E. *Quantitative structure-activity relationships for the mutagenicity of propylene oxides with Salmonella*. Mut. Res. 299, 85-93, 1993.
- [66] Sturdik, E.; Rosenber, M.; Stibrany, L.; Balá, S.; Chreño, O.; Ebringer, L.; Ilavsky, D.; Vegh, D. *Structure-mutagenicity relationships of 5-nitro-2-furylethylenes in Salmonella typhimurium TA98*. Chem. Biol. Interactions, 53, 145-153, 1985.

- [67] Debnath, A.; Lopez de Compadre, R.L.; Hansch, C. *Mutagenicity of quinolines in Salmonella typhimurium TA100. A QSAR study based on hydrophobicity and molecular orbital determinants*. Mut. Res. 280, 55-65, 1992.
- [68] Hatch, F.T.; Colvin, M.E. *Quantitative structure-activity (QSAR) relationships of mutagenic aromatic and heterocyclic amines*. Mut. Res. 376, 1-2, 87-96, 1997.
- [69] Pérez-Garrido, A.; Pérez, M.; Garrido, A. *Halogenates derivatives QSAR model using spectral moments to predict haloacetic acids (HAA) mutagenicity*. Bioorg. Med. Chem. 16, 5720-5732, 2008.
- [70] Contrera, J.F.; Matthews, E.J.; Kruhlak, N.L.; Benz, D. *In silico screening of chemicals for bacterial mutagenicity using electrotopological E-state indices and MDL QSAR software*. Reg. Tox. Pharm. 43, 313-323, 2005.
- [71] Shoji, R.; Kawakami, M. *Prediction of genotoxicity of various environmental pollutants by artificial neural network simulation*. Molecular Diversity. 10, 101-108, 2006.
- [72] Votano, J.R.; Parham, M.; Hall, L.H.; Kier, L.B.; Oloff, S.; Tropsha, A.; Xie, Q.; Tong, W. *Three new consensus QSAR models for the prediction of Ames genotoxicity*. Mutagenesis. 19, 5, 365-377, 2004.
- [73] Leong, M.K.; Lin, S.; Chen, H.; Tsai, F. *Predicting mutagenicity of aromatic amines by various machine learning approaches*. Toxicol. Scien. 116, 2, 498-513, 2010.
- [74] Sharma, A.; Kumar, R.; Varadwaj, R.K.; Ahmad, A.; Ashraf, G.M. *A comparative study of support vector machine, artificial neural network and bayesian classifier of utagenicity Prediction*. Interdiscip Sci Comput Life Sci, 3, 232-239, 2011.
- [75] Song, X.; Xiao, M.; Yu, R. *Artificial neural networks applied to classification of mutagenic activity of nitro-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons*. Computers Chem. 18, 4, 391-396, 1994.
- [76] Xu, C.; Cheng, F.; Chen, L.; Du, Z.; Li, W.; Liu, G; Lee, P.; Tang, Y. *In silico Prediction of Chemical Ames Mutagenicity*. J. Chem. Inf. Model. 2012.
- [77] Carlsson, L. *Interpretation of Nonlinear QSAR Models Applied to Ames Mutagenicity Data*. J. Chem. Inf. Model. 49, 2551-2558, 2009.
- [78] Chung, K.; Kirkovsky, L.; Kirkovsky, A.; Purcell, W.P. *Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines: quantitative structure-activity relationships*. Mut. Res. 387, 1-16, 1997.

[79] Valerio, L.G. Jr.; Cross, K.P. *Characterization and validation of an in silico toxicology model to predict the mutagenic potential of drugs impurities*. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 260, 209-221, 2012.

[80] Vracko, M.; Mills, D.; Basak, S.C. *Structure-mutagenicity modeling using counter propagation neural networks*. *Env. Tox. Pharmacol.* 16, 25-36, 2004.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general.

Es en base a los antecedentes expuestos y a la relevancia del tema es que se plantea realizar en el marco de esta tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica una investigación en el área.

Se propone como objetivo general el estudio de la capacidad mutagénica de *N*-óxidos de aminas heterocíclicas aromáticas de la quimioteca del Grupo de Química Medicinal y de la relación estructura-mutagenicidad utilizando métodos no paramétricos, redes neuronales.

Este objetivo general se cumplirá a través de los siguientes objetivos específicos.

2.2. Objetivos específicos.

- 1- Selección de moléculas de diferentes familias derivados de *N*-óxidos sintetizadas previamente en el Laboratorio de Química Orgánica de Facultad de Ciencias.
- 2- Ensayo de toxicidad de los compuestos frente a *Salmonella typhimurium* cepa TA98.
- 3- Test de Ames de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* cepa TA98.
- 4- Estudio cualitativo de la relación estructura-actividad mutagénica por familia de compuestos.
- 5- Análisis de cluster de clasificación estructural de los compuestos.
- 6- Generación de modelos predictivos de actividad mutagénica basados en redes neuronales artificiales.

3. Materiales y métodos

3.1. Compuestos a ensayar.

Los derivados de *N*-óxido de heterociclos de aminas aromáticas y sus análogos de-oxygenados se obtienen de la quimioteca del Laboratorio de Química Orgánica Facultad de Ciencias-UdelaR. Se pesan los sólidos en tubos eppendorf de acuerdo a concentración inicial del ensayo.

3.2. Ensayo de toxicidad.

La toxicidad de los compuestos a evaluar frente a *Salmonella typhimurium* cepa TA98 (*hisD3052*, dependiente de histidina) se evalúa a partir de un cultivo de 1×10^8 UFC/mL en medio Oxoid N°2 en fase exponencial [1-3]. Los compuestos se evalúan a una concentración máxima de 1000 µg/placa y se realizan cuatro diluciones seriadas al décimo a partir de ésta en DMSO. Se realiza un control de crecimiento de bacterias y un control del fenotipo (Ampicilina resistente, Tetraciclina, Cristal violeta y luz UV sensible) sin agregado de compuesto. Se incuba por 1 h a 37 °C. Se agrega solución de Histidina (100 mM) / Biotina (0,5 mM). Se cultiva luego en Agar Mínimo Glucosa (AMG) en estufa durante 24 h a 37 °C. Se observa el crecimiento bacteriano en cada caso para determinar la máxima dosis no tóxica a evaluar en el Test de Ames de mutagenicidad.

3.2. Test de Ames de mutagenicidad

La capacidad mutagénica de los compuestos a evaluar fue determinada a partir de un cultivo 2×10^9 UFC/mL en medio Oxoid N°2 en fase exponencial de *S. typhimurium* cepa TA98 (*hisD3052*, dependiente de histidina) [1-4]. Se evaluaron cinco diluciones seriadas al tercio en DMSO partiendo de la máxima dosis no tóxica estimada a partir de los resultados del ensayo de toxicidad.

El efecto mutagénico causado por la metabolización de los compuestos se evaluó con el agregado de solución de la fracción S9 (5%) de hepatocitos de hígado de ratón tratado con Aroclor-1254 obtenida de Moltox Inc. (Annapolis, MD, USA).

Se realizaron controles positivos 4-nitro-*o*-fenilendiamina (20,0 µg/placa) sin activación metabólica y 2-aminofluoreno (10,0 µg/placa) con activación metabólica. Como control negativo se utilizó DMSO (50 µL/placa) y control del fenotipo (Ampicilina resistente,

Tetraciclina, Cristal violeta y luz UV sensible). Se incubó por 1 h a 37 °C. Se adicionó 2 mL de una solución de agar que contiene 10 mL de solución de histidina [(0,5 mM) / biotina (0,5 mM)] por cada 100 mL. Se cultivó luego en AMG durante 48 h a 37 °C.

El número de revertientes fue contado manualmente y se expresó como el promedio de duplicados \pm desviación estándar. La muestra se considera mutagénica cuando el número de colonias revertientes duplica el control negativo.

La preparación de la suspensión bacteriana, de solución de la fracción S9, de los productos y la primera parte del ensayo (hasta que los tubos con todas las soluciones pasan a la estufa para su incubación) se realizó en condiciones de esterilidad: cabina de flujo laminar y con material estéril autoclavado a 121 °C por 20 min o manteniendo la esterilidad del fabricante.

El agregado de la solución de histidina/biotina (concentración dependiente del ensayo que se trate), y la siembra de las placas se realizó al lado de una corriente de aire ascendente generada por un mechero.

3.3. Estudio teórico por Redes Neuronales Artificiales.

Para la generación de los modelos predictivos de actividad mutagénica se obtuvieron los códigos SMILE de los 83 compuestos utilizando el paquete de programas ChemBioDraw Ultra 12.0 ^[5]. Se generó una matriz dinámica para cada molécula en el programa CODES® ^[6] que se guardó en una planilla de cálculos Excel.

A partir de las matrices dinámicas se realizó la reducción de dimensiones con el programa de cálculo Tsar® ^[7], ingresando como requerimiento cuatro nodos para la configuración de las redes.

Las Redes Neuronales Artificiales fueron generadas entrenadas con los cuatro parámetros de la reducción de dimensiones como datos de la capa de entrada. El dato de salida fue la actividad mutagénica codificada como 0 para no mutagénico y 1 para mutagénico. La validación estadística realizada por los programas fue por el método de *leave one out*.

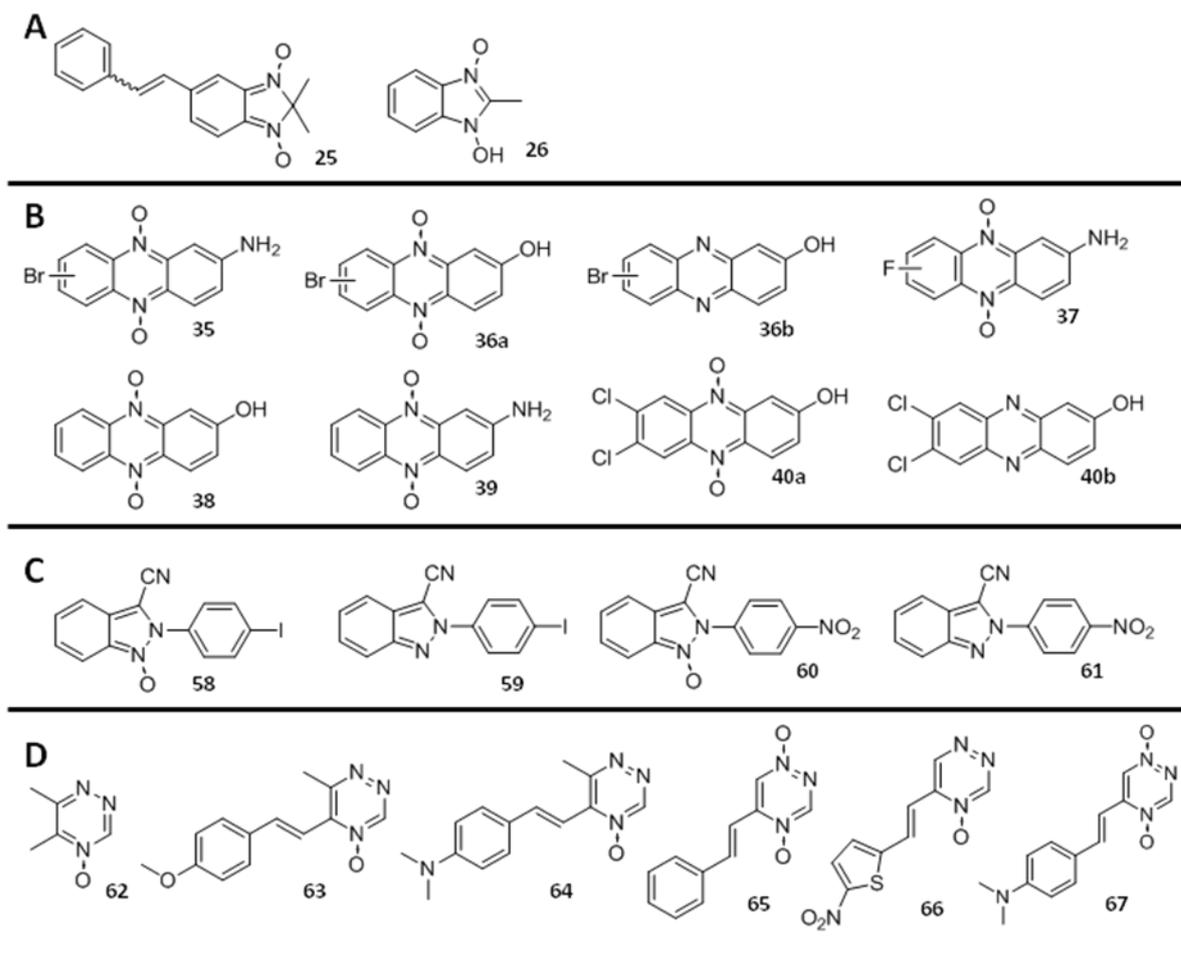
El análisis de cluster se realiza con los mismos parámetros obtenidos de la reducción de dimensiones.

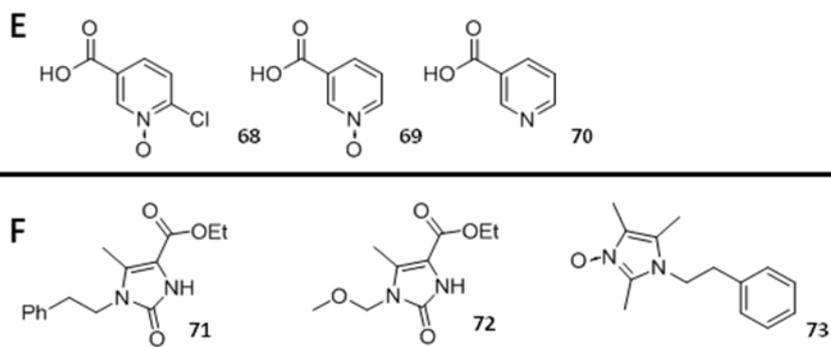
3.4. Referencias bibliográficas.

- [1] Maron, D.M.; Ames, B.N. *Revised methods for Salmonella mutagenicity test*. Mut. Res. 113, 173- 215, 1983.
- [2] Mortelmans, K.; Zeiger, E. *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. Mut. Res. 455, 29-60, 2000.
- [3] Guía OECD, <http://www.oecd.org/dataoecd/18/31/1948418.pdf> (acceso 15/02/2013).
- [4] Ames, B.N.; Lee, F.D ; Durston, W.E. *An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 782-786, 1976.
- [5] ChemBioDraw Ultra 12.0©, ChambridgeSoft 1986-2009.
- [6] Stud M. CODES©; v1.0 (revision 3) ed. Instituto de Química Médica. CSIC. España.
- [7] TSAR®, version 3.3. Oxford Molecular, Ltd.; Oxford, UK: 2000.

4. Resultados y discusión.

Los compuestos derivados de las familias mostradas en la Figura 4.1. fueron seleccionados de la quimioteca del Laboratorio de Química Orgánica. Se realizó una selección que incluyera diversidad estructural comprendiendo diferentes heterociclos aromáticos. Para completar los resultados que se tenían como antecedentes. Además se buscó diversidad dentro de cada familia a nivel de los sustituyentes de cada heterociclo. Se seleccionaron compuestos *N*-de-oxigenados así como mono y di-*N*-óxidos con el fin de estudiar como afecta la funcionalidad *N*-óxido en la mutagenicidad. Una vez seleccionados los compuestos a ensayar, se realizó el estudio de la capacidad mutagénica *in vitro* según se indican en los protocolos de la OECD.^[1,2]





A- derivados de *N*-óxido de benzimidazol, **B-** derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina y fenazina, **C-** derivados de *N*-óxido de indazol e indazol, **D-** derivados de 1,2,4 triazina mono y di-*N*-óxido, **E-** derivados de piridina *N*-óxido y piridina, **F-** derivados de imidazol.

Figura 4.1. Estructuras de los compuestos ensayados agrupados por familias.

4.1. Ensayo de toxicidad frente a *Salmonella typhimurium*.

El objetivo del ensayo es evaluar cual es la dosis máxima en la que el compuesto no es tóxico para las bacterias. Para evaluar la toxicidad de los compuestos se hace crecer a las bacterias, en este caso de la cepa TA98, en presencia de cinco concentraciones del compuesto en cuestión partiendo de una concentración de 1000 $\mu\text{g/placa}$, si la solubilidad del mismo lo permite, de lo contrario se parte de una dosis menor. Se evalúan cinco concentraciones al décimo. Es importante destacar que en este ensayo no se está visualizando la capacidad mutagénica del compuesto ya que se le agrega al cultivo bacteriano una solución de Histidina (100 mM)/Biotina (0,5 mM) la cual permite el crecimiento de las bacterias por disponibilidad de dichas biomoléculas.^[1]

Los resultados del ensayo pueden evaluarse mediante la observación del crecimiento confluyente llamado “césped bacteriano” sobre el cual se puede decir que a esa dosis el compuesto no fue tóxico. Puede darse también un crecimiento bacteriano en menor proporción que se observa como un césped con zonas sin crecimiento, eso ocurre cuando un compuesto es levemente tóxico y no permita el crecimiento confluyente (conocido como césped parcial). Cuando un compuesto es muy tóxico se espera ver una placa sin crecimiento bacteriano igual que en una placa en la que no se sembró bacterias. Existen casos de toxicidad no tan extrema en los que el compuesto mata a prácticamente todas las bacterias pero quedan unas pocas que son capaces de crecer aisladas, no en forma confluentes sino formando colonias pequeñas (llamadas microcolonias).^[3,4] En la Figura 4.2. se presentan los distintos resultados ya mencionados que se pueden obtener en el ensayo de toxicidad.

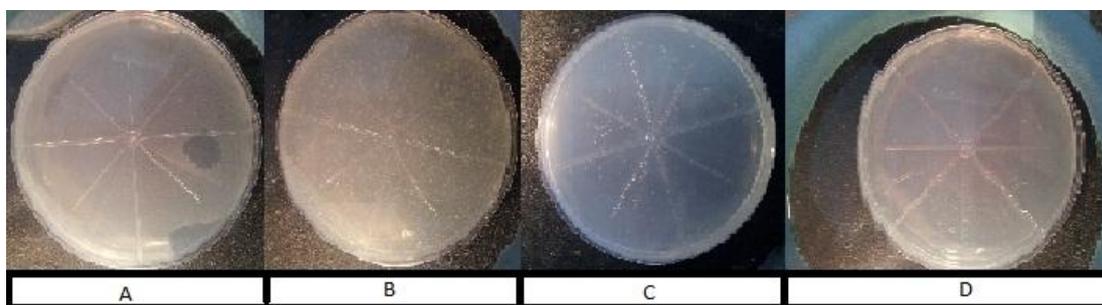


Figura 4.2. Resultados posibles del ensayo de toxicidad. A) césped, crecimiento confluyente de las bacterias. B) césped parcial. C) microcolonias. D) tóxico, ausencia de crecimiento bacteriano.

En el Laboratorio de ensayos biológicos del Grupo de Química Medicinal existe un criterio utilizado para, con el resultado del ensayo de toxicidad, calcular la máxima dosis a ensayar en el test de Ames.

El criterio utilizado está basado en antecedentes del grupo ^[5-8] y se presenta en la Tabla 4.1. Se intenta evaluar en el ensayo de Ames la máxima concentración posible no tóxica para la cepa bacteriana.

Ensayo de toxicidad	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
Dosis 1	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico
Dosis 2	Césped	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Microcolonias
Dosis 3	Césped	Césped	Tóxico	Tóxico	Césped
Dosis 4	Césped	Césped	Césped	Tóxico	Césped
Dosis 5	Césped	Césped	Césped	Césped	Césped
Dosis máxima test de Ames	Dosis 2 x 3	Dosis 3x3	Dosis 4 x 3	Dosis 5 x 3	Dosis 3 x 4

Ensayo de toxicidad	Caso 6	Caso 7	Caso 8	Caso 9
Dosis 1	Microcolonias	Césped parcial	Césped con mucha precipitación de compuesto	Césped con poca precipitación de compuesto
Dosis 2	Césped	Césped	Césped	Césped
Dosis 3	Césped	Césped	Césped	Césped

Dosis 4	Césped	Césped	Césped	Césped
Dosis 5	Césped	Césped	Césped	Césped
Dosis máxima test de Ames	Dosis 2 x 4	Dosis 1 x 0,8	Dosis 1 x 0,5	Dosis 1 x 0,8

Tabla 4.1. Criterio utilizado para el cálculo de la máxima dosis a ensayar en el Test de Ames a partir del resultado del ensayo de toxicidad donde dosis 1 es la máxima dosis utilizada en el ensayo de toxicidad y dosis 4 es la mínima.

A modo de ejemplo se detalla el cálculo de la máxima dosis a ensayar para el compuesto **59** que pertenece a la familia de los indazoles. En la Tabla 4.2. se muestran los resultados del ensayo de toxicidad del mismo. Se partió de una dosis inicial de 1000 µg/placa.

Dosis (µg/placa)	Resultado
1000	Césped parcial
100	Césped parcial
10	Césped
1	Césped
0,1	Césped

Tabla 4.2. Resultados del ensayo de toxicidad para el compuesto **59**.

Utilizando el criterio expuesto en la Tabla 4.1. se observa que el compuesto **59** está comprendido en el caso 7. De esa forma se puede calcular la máxima dosis a ensayar en el Test de Ames. Tomando dosis 1 a 100 µg/placa se obtiene una dosis para el Test de Ames de 80 µg/placa.

De la misma forma se calculó para los restantes compuestos. Los resultados de dichos cálculos se presentan en la Tabla 4.3.

Compuesto	Dosis^a (µg/placa)	Compuesto	Dosis^a (µg/placa)	Compuesto	Dosis^a (µg/placa)
25	40	58	250	66	800
26	125	59	80	67	1000
36b	80	60	8	68	200
37	0,04	61	400	69	1000
38	0,8	62	125	70	1000
39	3	63	250	71	400
40a	0,5	64	8	72	125
40b	40	65	8	73	400

^a máxima dosis a ensayar en el Test de Ames calculada a partir de los resultados del ensayo de toxicidad.

Tabla 4.3. Máxima dosis de los compuestos que se utilizará en el Test de Ames.

4.2. Test de mutagenicidad de Ames.

Este ensayo se basa en la capacidad de un compuesto mutagénico de causar cambios genotípicos que como consecuencia generen modificaciones en el ADN de las bacterias cambiando el fenotipo de las mismas.^[3,9] Las bacterias utilizadas en el ensayo cambian su fenotipo y son capaces de sintetizar Histidina para crecer cuando se las enfrenta a un compuesto mutagénico. En los ensayos pre-clínicos de medicamentos se utilizan cinco cepas diferentes según la recomendación de la OECD.^[1,2] Cada cepa tiene diferencias en las mutaciones que le confieren características para reconocer distintos tipos de agentes mutagénicos. En este trabajo se utilizó la cepa TA98, la cual se utiliza generalmente para un tamizado primario en el desarrollo de nuevos fármacos.^[3,10-13]

En el ensayo se hacen crecer las bacterias en presencia de cinco concentraciones de los compuestos a ensayar. La máxima dosis se calcula a partir del ensayo de toxicidad como se describió anteriormente, y a partir de ésta se realizan diluciones seriadas al tercio en un disolvente que no confiera efectos mutagénicos, en este caso se utilizó DMSO. Se realiza el test en dos condiciones: en ausencia de activación metabólica para evaluar la capacidad del compuesto por sí mismo de producir mutaciones, y en presencia de activación metabólica utilizando la fracción S9 de hepatocito de rata de laboratorios Moltox®. Es importante esta segunda condición ya que se evalúa no sólo la capacidad mutagénica del compuesto, sino también la capacidad mutagénica de sus productos de metabolización.^[3]

En el caso que el compuesto en cuestión sea mutagénico, habrá crecimiento de colonias de bacterias, producto del cambio de fenotipo. No obstante, constantemente se producen mutaciones por la propia tasa de mutaciones del ADN, lo cual puede desencadenar crecimiento de colonias llamadas revertientes espontáneas, que no se deban a la exposición a un agente mutagénico. Es por dicho motivo que se realiza en el ensayo un control negativo el cual en lugar de un compuesto se incuba con DMSO para conocer la tasa de mutaciones espontánea. Se considera entonces como mutagénico un compuesto que su incubación con las bacterias es capaz de duplicar la cantidad de colonias que crecen en un control negativo y que presente un efecto dosis respuesta.^[14] Además se realiza un control positivo con compuestos mutagénicos (como es 4-nitro-*o*-fenilendiamina utilizado en ausencia de condiciones de metabolización o compuestos que sus productos de metabolización son mutagénicos (como 2

amino fluoreno utilizado en la fracción S9), en los cuales se verá crecimiento de un número elevado de colonias.

En la Figura 4.3. se muestra el efecto dosis respuesta que presenta un compuesto mutagénico en ausencia de activación metabólica, el compuesto **37**, un di-*N*-óxido de fenazina. El concepto dosis respuesta asume que hay una relación entre la concentración o dosis de un mutágeno y la magnitud del efecto que este produce. En condiciones ideales a medida que su concentración aumenta, aumenta también la cantidad de colonias que crecieron, hasta llegar a un nivel de saturación en las dosis más altas. Además se muestra el efecto que produce un compuesto no mutagénico en ausencia de activación metabólica, el compuesto **72**, un derivado de imidazol. En este caso la cantidad de colonias revertientes no varía con la dosis del compuesto.

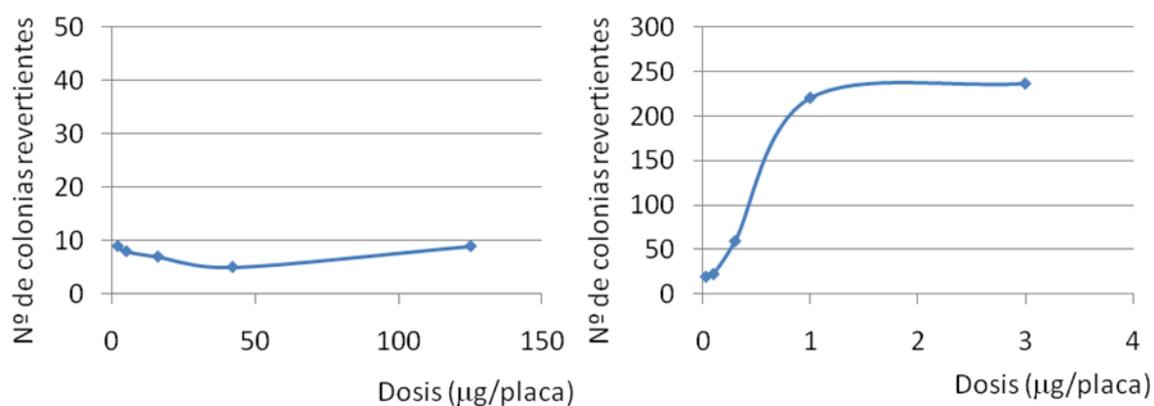


Figura 4.3. Efecto dosis respuesta presentado por el compuesto **72**, no mutagénico en ausencia de activación metabólica (derecha) y efecto producido por el compuesto **37**, mutagénico (izquierda), en la misma condición.

En la Tabla I del Anexo se muestran los resultados de los diferentes compuestos evaluados en este trabajo.

4.2.1. Fenazinas.

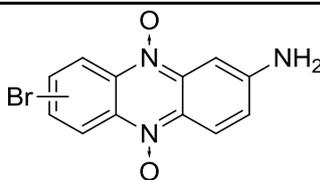
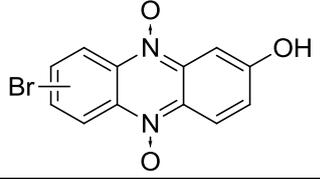
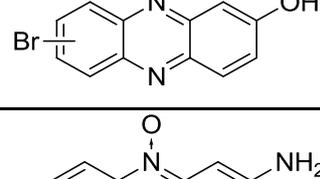
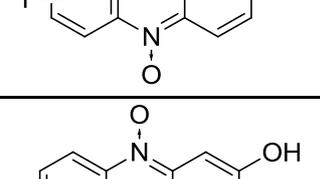
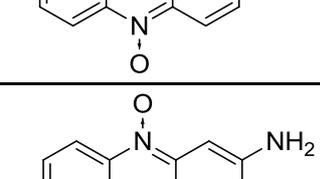
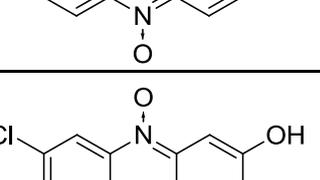
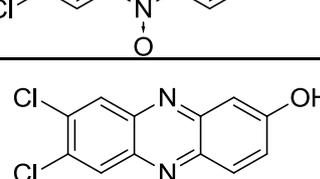
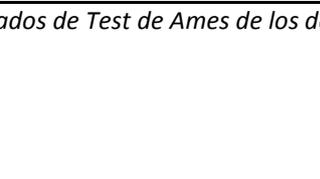
Compuesto	Estructura	Resultado sin activación metabólica	Resultado con activación metabólica
35		Mutagénico	No Mutagénico
36a		Mutagénico	No Mutagénico
36b		Mutagénico	No Mutagénico
37		No Mutagénico	No Mutagénico
38		Mutagénico	No Mutagénico
39		Mutagénico	Mutagénico
40a		Mutagénico	No Mutagénico
40b		No Mutagénico	No Mutagénico

Tabla 4.4. Resultados de Test de Ames de los derivados de N,N'-dióxido de fenazina y fenazinas.

Los *N,N'*-dióxidos de fenazina evaluados (Tabla 4.4.) resultaron ser mutagénicos sin activación metabólica, a excepción del derivado fluorado **37**. Las características electrónicas del F parecen gobernar el efecto observado para **37**. Los sustituyentes en posiciones 2 y/o 7 u 8 de la fenazina no parecen afectar en la actividad observada. En cambio con activación metabólica la mayoría resulta no mutagénico a excepción del **39**, el cual no posee sustituyentes en posición 7 u 8. Analizando los resultados de los derivados de-oxigenados de fenazina (compuestos **36b** y **40b**) se pueden notar dos efectos diferentes. El compuesto **36b** derivado completamente reducido de **36a**, posee un comportamiento idéntico al **36a**, tanto con como sin activación metabólica, mutagénico en la primera condición y no mutagénico en la otra. Este efecto podría estar indicando que los productos de metabolización en condiciones aeróbicas de **36a** no rinden la fenazina **36b**. En el caso de **40a** y **40b** ocurre algo diferente. Si bien ninguno es mutagénico con activación metabólica, el **40a** resulta serlo sin activación metabólica, no así el de-oxigenado. Lo que estaría demostrando que en este caso la metabolización de **40a** en las condiciones del ensayo conduce a la fenazina **40b**. Podría decirse por tanto que la funcionalidad *N*-óxido en esta familia es importante en la mutagenicidad y que se pierde actividad al metabolizarse. **37** puede ser considerado para estudios con el resto de las cepas de *S. typhimurium*.

4.2.2. Indazoles

En la familia de indazoles evaluados (Tabla 4.5.) la presencia del agrupamiento *N*-óxido parece no estar asociado con actividad mutagénica directamente. En el caso del derivado 4-iodofenil **58** y su análogo de-oxigenado **59**, no se observa actividad mutagénica en ninguna de las condiciones ensayadas. Sin embargo, en el caso de los 4-nitrofenil derivados **60** y **61** ambos son mutagénicos con activación metabólica. Sin embargo el compuesto **61**, que no presenta *N*-óxido es también mutagénico en ausencia de activación metabólica mientras que el oxidado no. Lo que puede estar indicando que el agrupamiento nitro sería el responsable de la mutagenicidad observada. Esto está en concordancia con descripciones previas de compuestos nitroaromáticos.^[15]

Compuesto	Estructura	Resultado sin activación metabólica	Resultado con activación metabólica
58		No mutagénico	No Mutagénico
59		No mutagénico	No Mutagénico
60		No mutagénico	Mutagénico
61		Mutagénico	Mutagénico

Tabla 4.5. Resultados de Test de Ames de los derivados de indazol.

4.2.3. Benzimidazoles

Compuesto	Estructura	Resultado sin activación metabólica	Resultado con activación metabólica
25		Mutagénico	No Mutagénico
26		No Mutagénico	No Mutagénico

Tabla 4.6. Resultados del Test de Ames para los compuestos derivados de benzimidazol.

De los dos derivados evaluados (Tabla 4.6.) cabe mencionar que **25** conteniendo N^1, N^3 -dióxidos resulta mutagénico en condiciones normales sin metabolización, no así después de la

metabolización. Mientras que **26**, conteniendo únicamente un agrupamiento *N*-óxido en su estructura, es no mutagénico en ninguna de las dos condiciones, lo cual podría marcar la importancia de la funcionalidad *N*-óxido en la molécula. Por otro lado, el compuesto **25**, mezcla de isómeros *Z* y *E* del derivado **22** (ver antecedentes Tabla 1.4.) presenta la misma actividad sin activación metabólica pero no con activación metabólica lo que demuestra que esta última rendiría metabolitos diferentes.

4.2.4. Imidazoles

Compuesto	Estructura	Resultado sin activación metabólica	Resultado con activación metabólica
71		No Mutagénico	No Mutagénico
72		No Mutagénico	No Mutagénico
73		No Mutagénico	No Mutagénico

Tabla 4.7. Resultados de Test de Ames de los derivados de imidazol.

Los derivados de imidazol evaluados (Tabla 4.7.) no presentan actividad mutagénica aún así modificando los distintos sustituyentes a la estructura central, o bien presentando un *N*-óxido en la estructura.

4.2.5. Triazinas

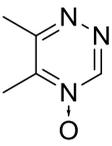
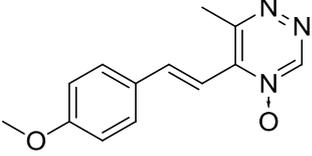
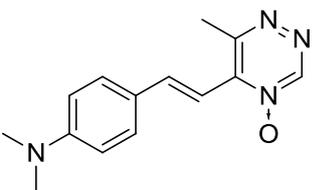
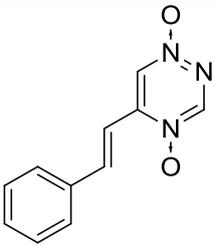
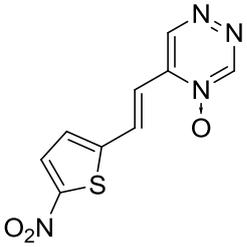
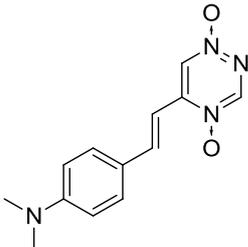
Compuesto	Estructura	Resultado sin activación metabólica	Resultado con activación metabólica
62		No Mutagénico	No Mutagénico
63		Mutagénico	Mutagénico
64		Mutagénico	Mutagénico
65		Mutagénico	Mutagénico
66		Mutagénico	Mutagénico
67		Mutagénico	Mutagénico

Tabla 4.8. Resultados de test de Ames de los derivados de 1,2,4 triazina.

En el caso de los derivados del heterociclo 1,2,4-triazina (Tabla 4.8.) aparentemente la presencia de la función *N*-óxido no estaría implicada en la mutagénesis. Puede observarse que el compuesto **62**, *N*-óxido de 1,2,4 triazina metilado en posiciones 5 y 6 no presenta actividad mutagénica. La sustitución en posición 5 con otros grupos diferentes, como es el caso de los restantes compuestos de la familia evaluados, modifica el potencial mutagénico de los mismos. Aparentemente un doble enlace en posición α al carbono 5 de la triazina podría estar involucrado en la mutagénesis. Esto podría deberse a que el doble enlace conjugado podría estar actuando como aceptor de Michael reaccionando con biomoléculas como ADN.^[16]

4.2.6. Piridinas

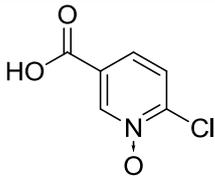
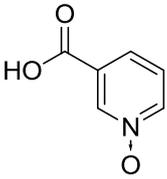
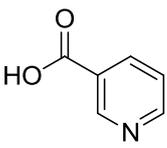
Compuesto	Estructura	Resultado sin activación metabólica	Resultado con activación metabólica
68		No Mutagénico	No Mutagénico
69		No Mutagénico	No Mutagénico
70		No Mutagénico	Mutagénico

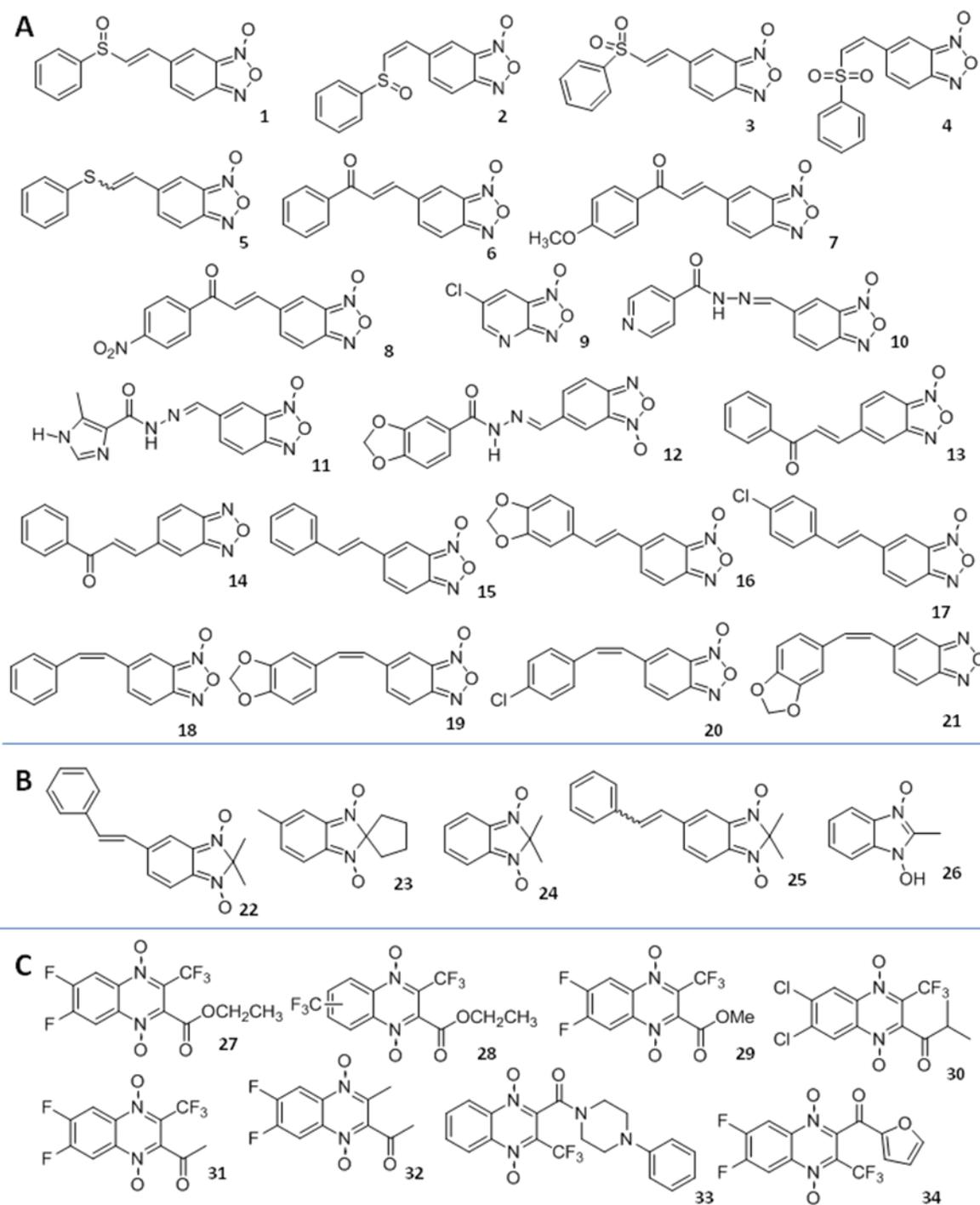
Tabla 4.9. Resultados de Test de Ames de los derivados de piridina.

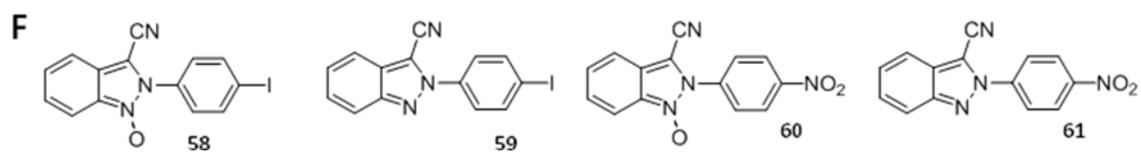
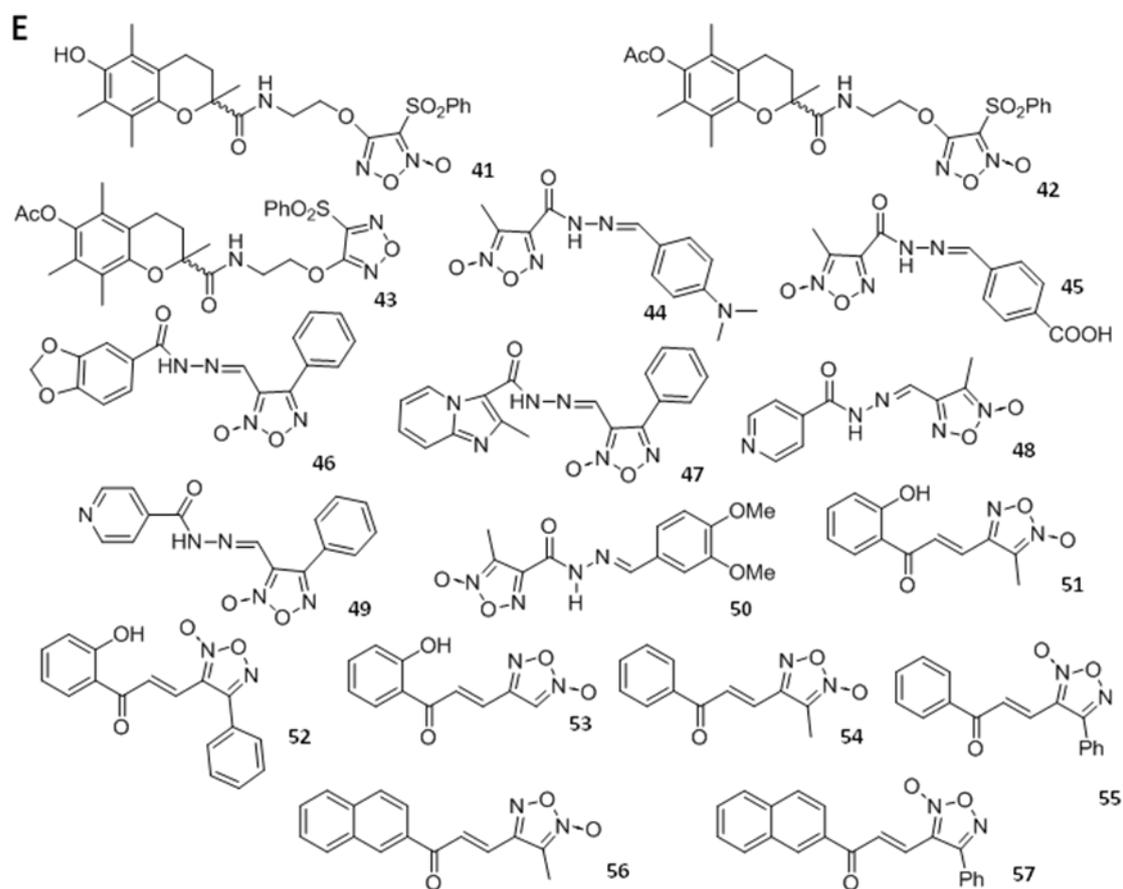
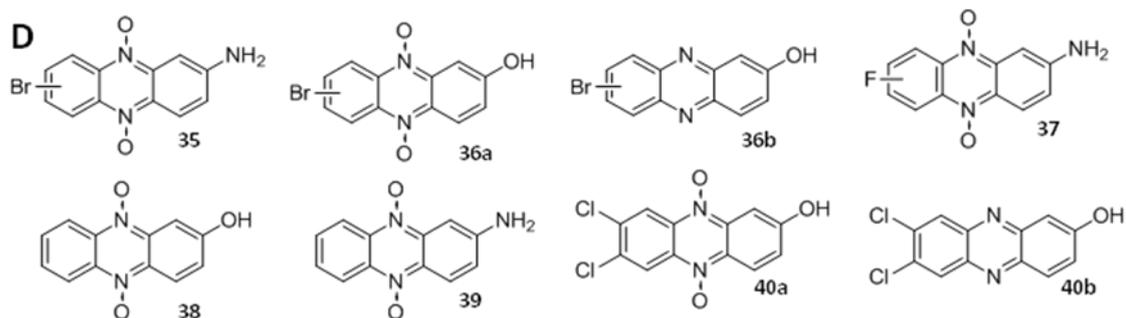
En esta familia de derivados de piridina evaluados (Tabla 4.9.) ninguno de los compuestos es mutagénico en ausencia de activación metabólica. Al ensayarlos con activación metabólica, el ácido nicotínico (**70**) resulta ser mutagénico no así su derivado *N*-oxidado, **69**. Lo que podría ser indicativo de que la metabolización de éste no transcurre por *N*-oxidación en las condiciones del ensayo.

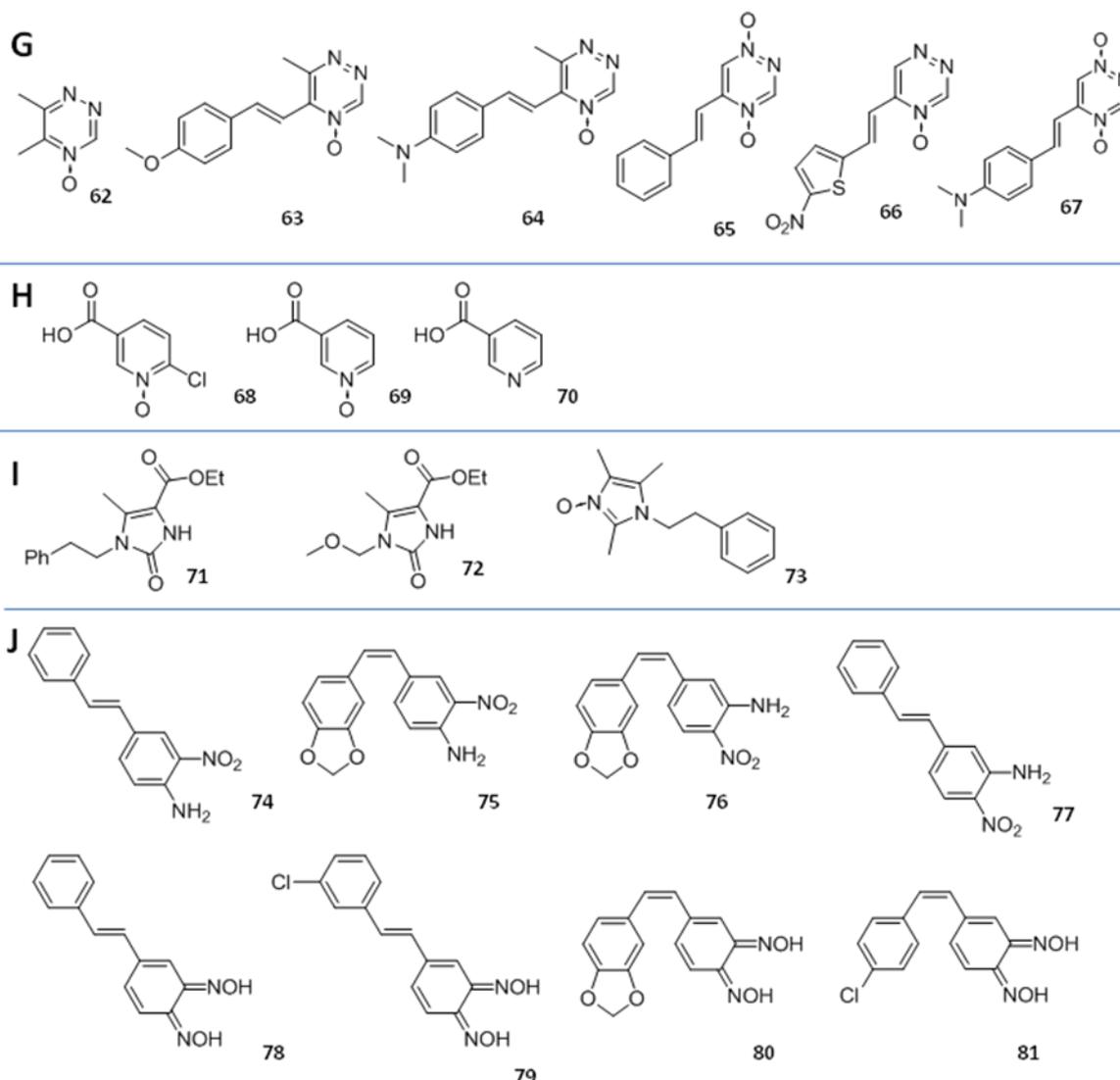
Se puede afirmar que la actividad mutagénica de los diferentes *N*-óxidos de aminas heterocíclicas aromáticas evaluados varía de acuerdo al sistema heterocíclico que lo constituye así como al perfil de sustitución de los mismos. Observándose una interesante relación de la actividad con la activación metabólica.

4.3. Obtención de parámetros estructurales para estudios teóricos.

Para los estudios teóricos de relación estructura-actividad mutagénica se utilizaron los compuestos ensayados experimentalmente en trabajos de investigación del grupo de Química Medicinal. Los compuestos ensayados experimentalmente en el marco de esta tesina de grado y los restantes compuestos ensayados previamente por el grupo se muestran en la figura 4.4.







A- Benzofuroxanos, B- Benzimidazoles, C- Quinoxalinas, D- Fenazinas, E- Furoxanos, F- Indazoles, G- Triazinas, H- Piridinas, I- Imidazoles, J- Di-oximas.

Figura 4.4. Estructuras de los compuestos utilizados para el estudio teórico.

Para la determinación de los parámetros estructurales se obtuvieron los códigos SMILE de los 83 compuestos seleccionados para el estudio (ver Tabla II anexo) a partir de sus estructuras 2D en el programa ChemBioDraw Ultra 12.0^[17].

Dichos códigos SMILE fueron utilizados para calcular las matrices dinámicas de cada compuesto en el programa CODES[®]^[18]. Este programa codifica las estructuras desde un punto de vista topológico teniendo en cuenta tanto la naturaleza de los átomos como el tipo de enlace, la conectividad con el resto de la molécula así como la carga atómica y los centros quirales, dando lugar a una representación numérica única de cada molécula. El programa

utiliza redes neuronales basadas en modelos de activación y competición interactivos (IAC). Una red de este tipo consiste en agrupamiento entre neuronas para competir y cooperar entre ellas para así lograr un fin concreto. Existen básicamente dos tipos de conexiones en un modelo IAC, auto-excitatorias, que darán un aprendizaje cooperativo, e inhibitorias, que darán un aprendizaje competitivo.^[19,20]

Una vez obtenidas las matrices dinámicas, se utilizaron las mismas para la reducción de dimensiones con el programa estadístico Tsar[®]^[21]. El proceso de reducción de dimensiones consiste en simplificar el sistema sin desvirtuar sus características intrínsecas. Es decir, comprimir la matriz dinámica de cada estructura a un número determinado de variables sin perder la información esencial de la misma. El software utilizado realiza el proceso por medio de redes neuronales de retro-propagación.

La arquitectura del tipo de red utilizada para la reducción de dimensiones consta de cinco capas, la de entrada igual a la de salida, dos capas de procesamiento intermedio (llamadas codificantes) siendo el número de neuronas que las forman un tercio de la cantidad de átomos de la molécula y una capa oculta central. La cantidad de neuronas de la capa oculta será igual al número de variables previamente seleccionado para definir a la molécula. En la figura 4.5 se muestra un esquema de una red del tipo ReNDeR, un ejemplo de red utilizada para reducción de dimensiones.^[22]

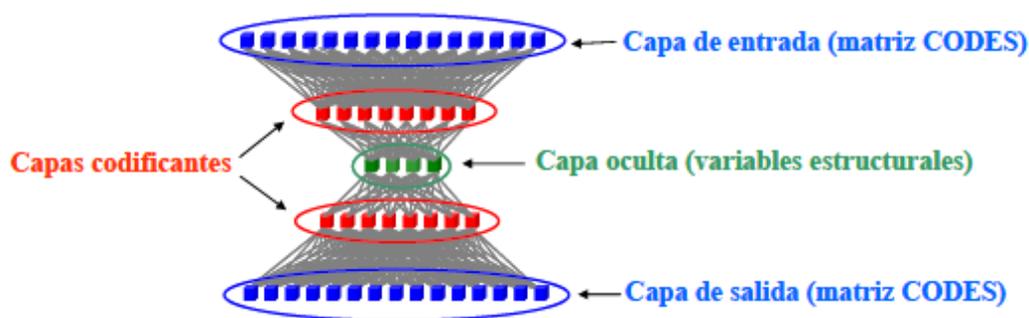


Figura 4.5. Esquema de una red neuronal de retro-propagación del tipo ReNDeR.^[23]

Para la reducción de dimensiones se utilizaron los siguientes parámetros.

- Iteraciones por ciclo: 6000
- Mejores ciclos pasados: 500

- Convergencia RMS: 0,01
- Parámetros de nodo: 4
- No excluir datos para validar.

A partir de la reducción de dimensiones se obtuvieron 4 parámetros estructurales para cada molécula (Tabla III anexo) los cuales fueron utilizados para la clasificación en clusters, generación de modelos predictivos y predicción de actividad mutagénica.

4.4. Clasificación estructural en clusters.

Para un estudio teórico cualitativo de la relación estructura-actividad mutagénica de los compuestos ensayados, se clasificaron 74 compuestos en clusters (compuestos **1-27**, **29-32**, **37**, **38**, **40a**, **42-81** ver estructuras en Figura 4.4.). Los compuestos seleccionados pertenecen a todas las familias estudiadas. La clasificación en clusters involucra únicamente parámetros estructurales obtenidos de la reducción de dimensiones realizada en el programa Tsar®^[21] a partir de las matrices numéricas obtenidas en CODES®.^[18]

De los 74 compuestos analizados, 40% de ellos no son mutagénicos en ausencia de activación metabólica, mientras que 60% si lo son. Cuando analizamos la condición de activación metabólica las proporciones son 49% y 51% mutagénicos y no mutagénicos respectivamente.

En la Figura 4.6. se muestra el gráfico que da cuenta de los clusters obtenidos en el programa Tsar.

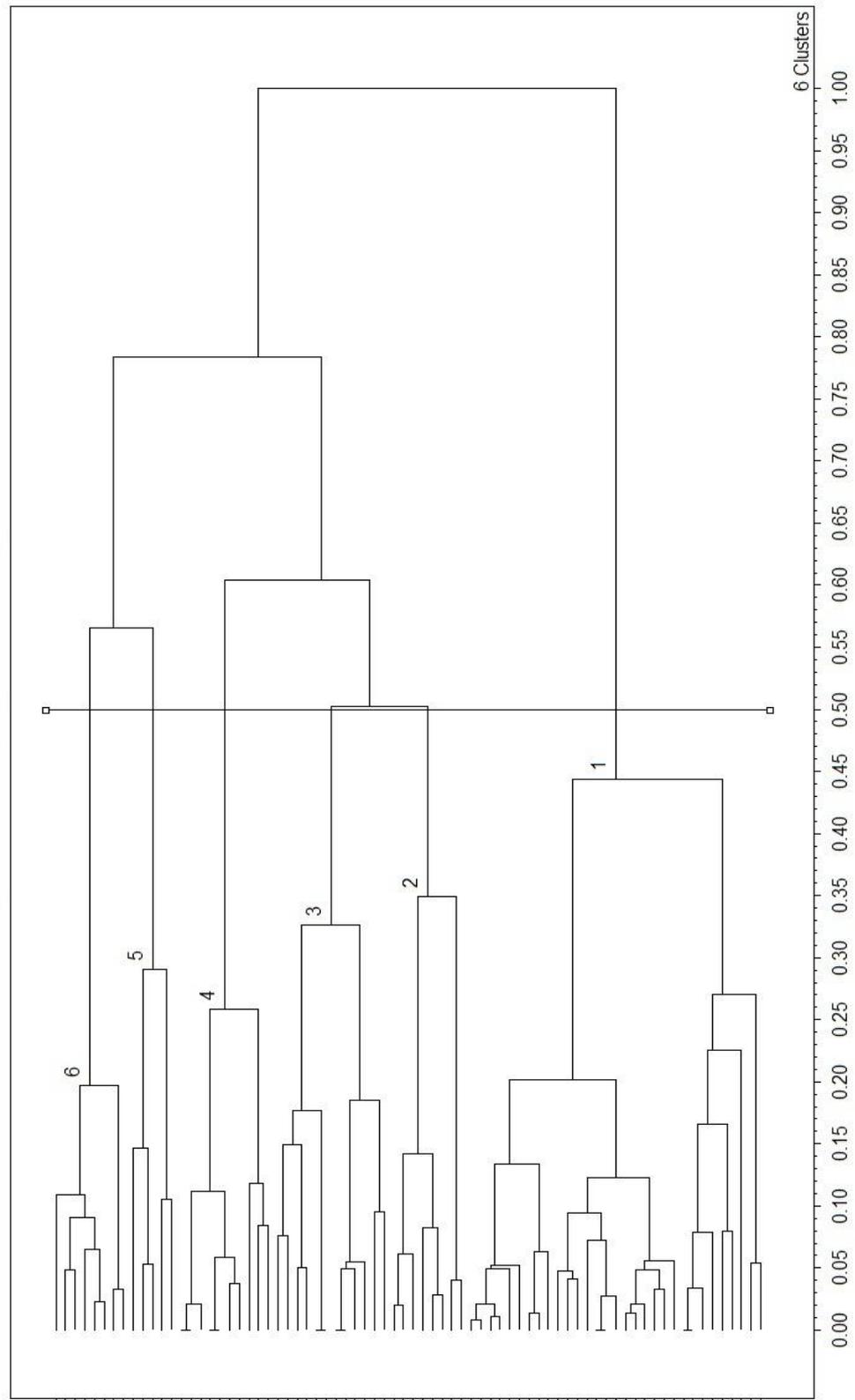


Figura 4.6. Análisis en cluster de 74 compuestos clasificados según parámetros estructurales.

Como puede observarse, los compuestos se dividen en dos grandes conjuntos, uno formado por el cluster 1, y el otro conteniendo a los compuestos clasificados en los clusters 2 a 6. En la Tabla 4.10. se muestran los porcentajes de compuestos mutagénicos y no mutagénicos en cada cluster.

	Mutagénicos sin activación metabólica (%)	No Mutagénicos sin activación metabólica (%)	Mutagénicos con activación metabólica (%)	No Mutagénicos con activación metabólica (%)
Cluster 1	42	58	65	35
Cluster 2	12	88	20	80
Cluster 3	58	42	54	46
Cluster 4	50	50	40	60
Cluster 5	40	60	20	80
Cluster 6	50	50	22	78
Clusters 2 a 6	40	60	37	63

Tabla 4.10. Porcentajes de compuestos mutagénicos y no mutagénicos en presencia y en ausencia de activación metabólica según la clasificación en clusters.

Analizando estos dos grandes conjuntos se destaca que en el cluster 1 hay un 42% de compuestos mutagénicos sin activación metabólica y un 58% de compuestos no mutagénicos en dicha condición. Mientras que en condiciones de activación metabólica, hay un 65% de mutagénicos y un 35% que no lo son. Es decir que en este cluster, hay una clara predominancia de compuestos mutagénicos al realizar el ensayo en presencia de fracción S9, no así en condiciones normales en el cual se invierte la situación aunque de forma menos drástica.

Por otro lado, considerando el segundo conjunto, o sea todos los compuestos presentes en los clusters 2 a 6, se observa que en condiciones normales el comportamiento de los compuestos es similar al que presentan los compuestos en el cluster 1. Se observa que 40% de los compuestos son mutagénicos y 60% no lo son en condiciones normales. Sin embargo, en presencia de fracción metabolizadora S9 hay 37% mutagénicos y 63% no mutagénicos.

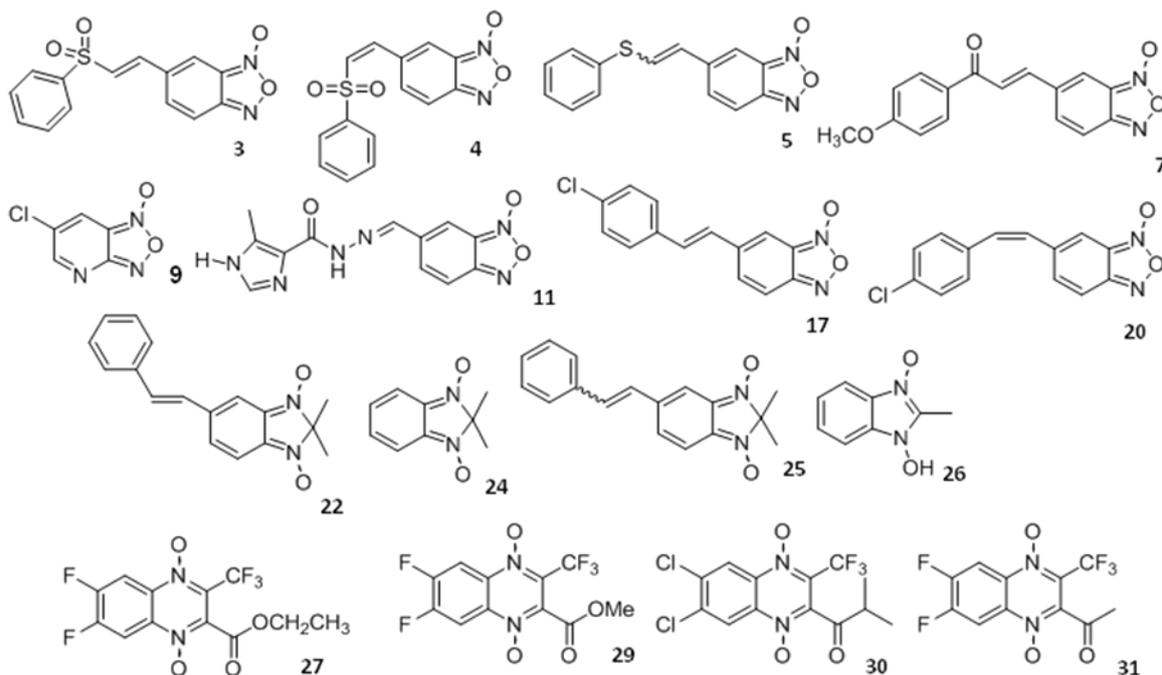
Se puede decir entonces que las proporciones de mutagénicos/no mutagénicos en condiciones sin metabolización del total de los 74 compuestos clasificados con los clusters se mantiene en los dos conjuntos en los cuales se divide en una primera instancia a los compuestos.

No obstante, la mitad de los compuestos analizados son mutagénicos en presencia de fracción metabolizadora S9 y la mitad no, pero la división del cluster deja dos tercios de los mutagénicos en el cluster 1 y dos tercios de los no mutagénicos en el conjunto de los restantes clusters. Se puede observar entonces una tendencia de mutagenicidad en el cluster 1, y lo contrario en el general de los clusters 2 a 6 en esta última condición.

El hecho de que no exista una tendencia similar para las dos condiciones en las que se realiza el ensayo puede deberse a que 28% de los compuestos no presentan la misma respuesta en ambas condiciones. Comportamiento debido a como ya se mencionó anteriormente dado el efecto de la metabolización. De los compuestos que si se comportan igual en ambas condiciones, 58% son no mutagénicos mientras que 42% si lo son. Los no mutagénicos se encuentran dos tercios en los clusters 2 a 6 y un tercio en el cluster 1. Esta característica es igual a la que se observa teniendo en cuenta sólo la actividad con activación metabólica. Sin embargo, los compuestos mutagénicos en ambas condiciones, se ubican exactamente la mitad en el cluster 1 y la otra mitad en los restantes clusters.

4.4.1. Cluster 1

En la Figura 4.7. se muestran las estructuras de los compuestos clasificados en el cluster 1.



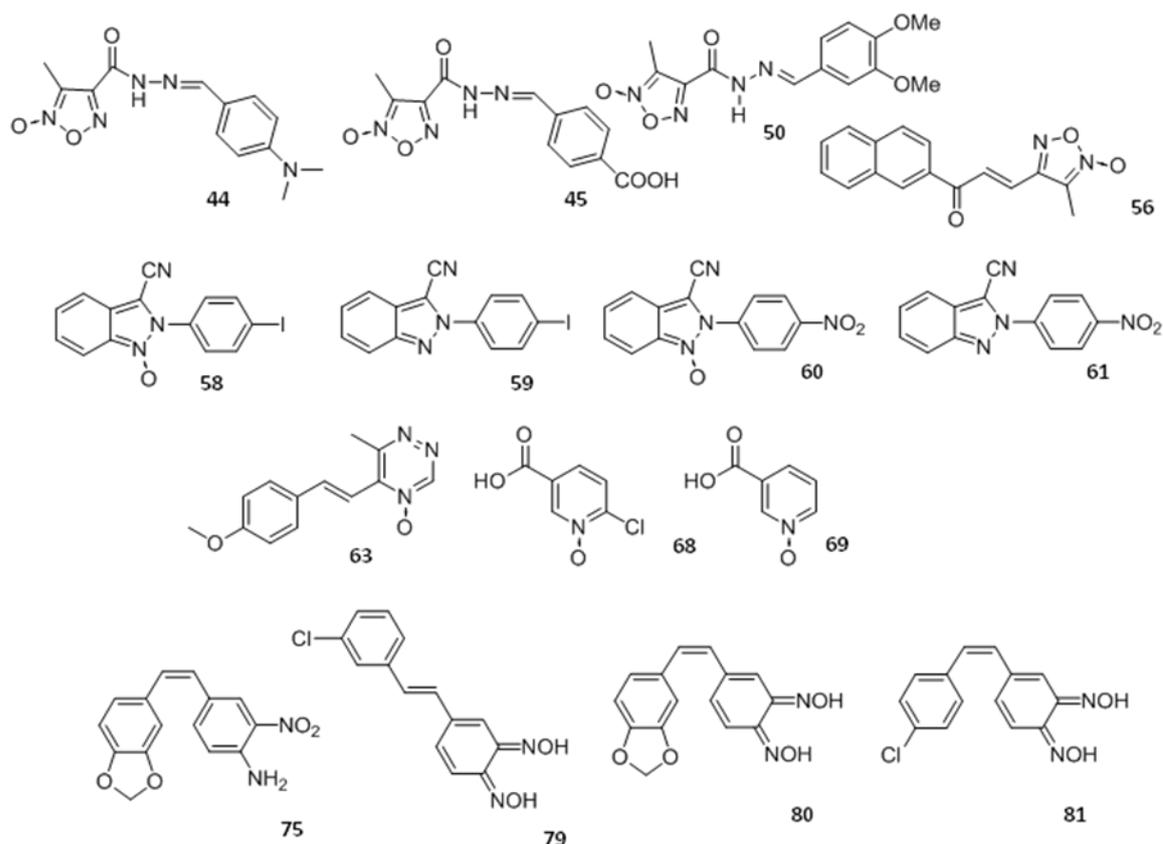


Figura 4.7. Estructuras de los compuestos clasificados en el cluster 1.

En este cluster se agrupan mayormente los compuestos mutagénicos en condiciones de metabolización.

Analizando particularmente los compuestos pertenecientes a dicho cluster, se puede observar que el 35% de los compuestos se aparta de la tendencia de mutagenicidad en presencia de la fracción metabolizadora S9. Todos éstos a excepción de uno tampoco son mutagénicos sin activación metabólica, es decir tienen la misma actividad en ambas condiciones. El compuesto que se aparta es **25**, un derivado de di-*N*-óxido de benzimidazol. Comparando los benzimidazoles **25** y **22** se esperaría que ambos tuviesen la misma biorespuesta ya que el primera es la mezcla de isómeros *Z* y *E* mientras que **22** es el isómero *E*, pero curiosamente esto no es así. Las diferencias de biorespuesta podrían deberse a que la mezcla de isómeros podría generar productos de metabolización diferentes y de ahí diferir en la actividad mutagénica. **25** podría considerarse como *outlier* en esta clasificación ya que su estructura 2D para los estudios teóricos fue considerada como el isómero *E* por tanto coincide con **22**. Y

como ya se mencionó en el estudio de clusters se utiliza la parametrización a partir de la estructura 2D.

Entre los compuestos que se apartan de la tendencia se encuentra el compuesto **26**, un benzimidazol que en el ensayo presentó grandes problemas de solubilidad por lo cual hubo que estimar la dosis máxima a utilizar. Es probable que por los problemas de solubilidad, no se haya ensayado realmente la concentración indicada sino una menor.

Los compuestos **58-61**, derivados de indazol, se encuentran todos en el cluster 1. No obstante, dos de ellos (**58** y **59**) se apartan de la tendencia del grupo ya que no son mutagénicos en ninguna de las dos condiciones. Ambos compuestos contienen un agrupamiento iodofenil. Difieren entre sí por la *N*-oxidación presente en **58**.

Otra familia cuyos compuestos se apartan de la tendencia son los derivados de piridina. Los compuestos **68** y **69** no son mutagénicos en ninguna condición y se encuentran en el cluster 1. Por otro lado, el compuesto **70**, es el único de la familia mutagénico en presencia de la fracción metabolizadora S9 y no se encuentra en el cluster en cuestión.

A nivel general, los compuestos presentes en el cluster 1 que se apartan de la tendencia de ser mutagénicos en presencia de fracción metabolizadora S9 no tienen similitudes estructurales en común.

4.4.2. Cluster 2

Los compuestos incluidos en este cluster se muestran en la Figura 4.8.

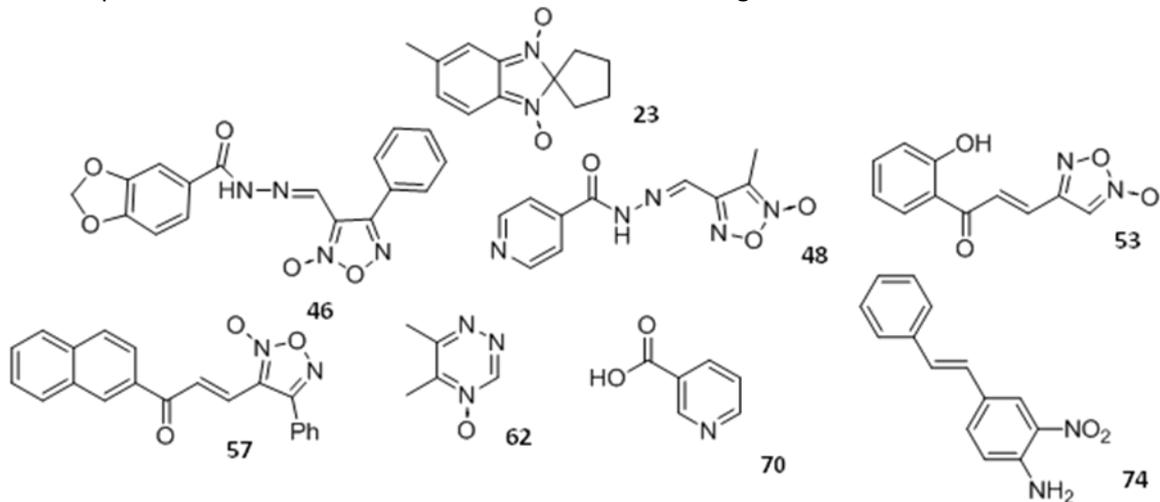


Figura 4.8. Estructuras de los compuestos pertenecientes al cluster 2.

En el cluster 2, sólo 20% de los compuestos son mutagénicos en presencia de la fracción metabolizadora S9, es decir se apartan de la tendencia del grupo. Uno de éstos es **70**, un derivado de piridina, que es mutagénico sólo en condiciones de metabolización y ya fue mencionado en el *cluster* 1 debido a que los otros compuestos de esa familia se apartan de la tendencia de dicho cluster. Podría decirse entonces que la clasificación estructural realizada por el cluster no muestra una relación con la actividad mutagénica para la familia de las piridinas. El otro compuesto mutagénico en presencia de la fracción S9 es **23**, un benzimidazol que es mutagénico en ambas condiciones. Es el único de esta familia en el cluster 2, pero como se discutió previamente, otros compuestos de la misma familia se apartaron de la tendencia del cluster. Estos dos compuestos mutagénicos en la condición de activación metabólica no presentan estructura similar, es más, el derivado **23** un di-*N*-óxido, mientras que **70** no presenta el agrupamiento *N*-óxido en su estructura.

El 90% de los compuestos del cluster 2 (7 compuestos) tienen la misma actividad en ambas condiciones. De estos, 6 son no mutagénicos y sólo uno es mutagénico.

4.4.3. Cluster 3

Los compuestos del *cluster 3* se muestran en la Figura 4.9.

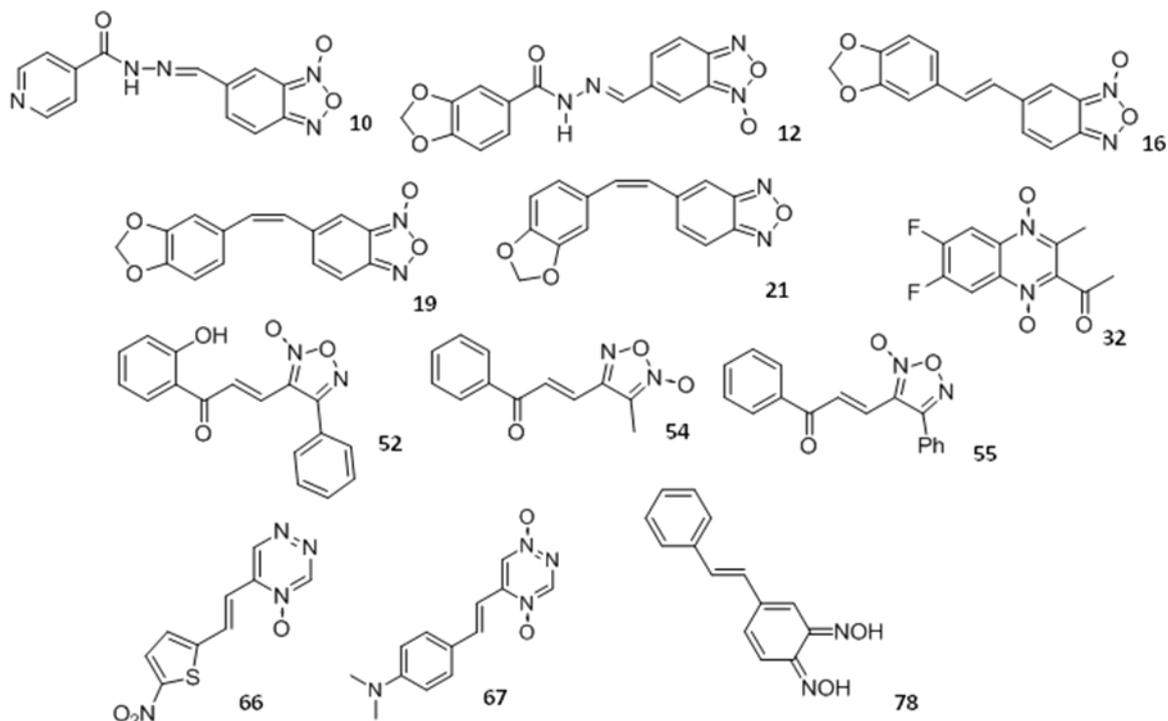


Figura 4.9. Estructuras de los compuestos comprendidos en el cluster 3.

En el cluster 3 no se mantiene la tendencia de no mutagénesis en presencia de fracción metabolizadora S9. La gran mayoría de los compuestos tienen la misma actividad en ambas condiciones. Pero de ellos, la mitad son mutagénicos y la mitad no lo son. Por otro lado, los compuestos que no tienen la misma actividad en ambas condiciones resultan mutagénicos en condiciones de metabolización. En total el 54% de los compuestos son mutagénicos en presencia de fracción metabolizadora S9 y apartándose de la tendencia general de los clusters 2 a 6 de no mutagénesis en dicha condición.

Se destacan entre los compuestos que resultan mutagénicos en presencia de fracción S9 y por lo tanto apartan a este cluster de la tendencia de no mutagénesis algunos benzofuroxanos y triazinas. Los compuestos **16**, **19** y **21** son benzofuroxanos que tienen similitudes en su estructura, los dos primeros son isómeros geométricos a nivel del doble enlace etenilo, mientras que el último es el análogo de-oxygenado, benzofurazano. Si bien esos compuestos tienen agrupamientos funcionales en común, también hay otro benzofuroxano, el compuesto

10, mutagénico que no comparte esas características. Dos triazinas, los compuestos **66** y **67** que son mutagénicos en presencia de la fracción S9 también se encuentran en este cluster.

4.4.4. Cluster 4

Los compuestos clasificados en el cluster 4 se muestran en la Figura 4.10.

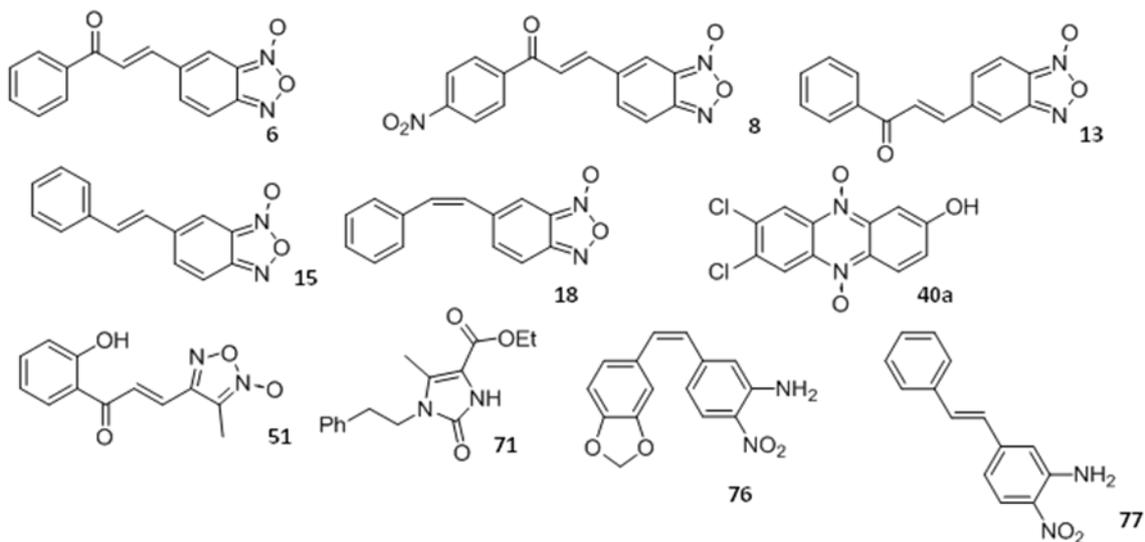


Figura 4.10. Compuestos clasificados en el cluster 4.

Analizando el *cluster* 4 se puede observar que se mantiene la tendencia ya que un 60% de los compuestos resultaron no mutagénicos en presencia de fracción S9. De los compuestos mutagénicos un 50% son benzofuroxanos y 50% dioximas, metabolitos de benzofuroxanos. Algo a destacar de los benzofuroxanos es que el compuesto **15**, isómero *E* del compuesto **18**, que también está en este cluster, pero no es mutagénico. Es decir, la clasificación estructural realizada por el cluster sí agrupó a dos isómeros en el mismo cluster, pero aparentemente los parámetros estructurales no son los determinantes de la capacidad mutagénica en este caso.

Por otro lado en este cluster 50% de los compuestos tienen la misma actividad en condiciones normales y en condiciones de metabolización. Lo que es relevante es que en estos, 60% son no mutagénicos. Mientras que el mismo porcentaje, entre aquellos que se comportan diferente en las dos condiciones, resultan no mutagénicos en presencia de S9.

4.4.5. Cluster 5

A continuación, en la Figura 4.11. se muestran las estructuras de los compuestos incluidos en este cluster.

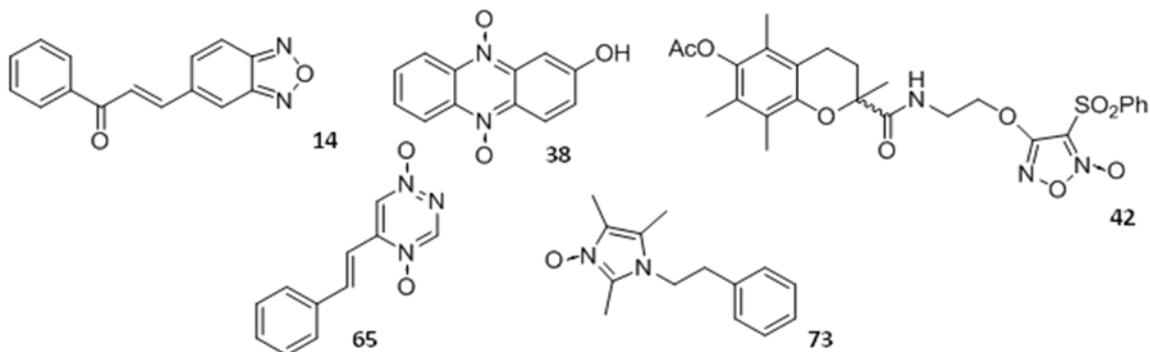


Figura 4.11. Estructuras de los compuestos pertenecientes al cluster 5.

El cluster 5 contiene cinco compuestos, de los cuales el único mutagénico (20%), y en ambas condiciones es el **65**, de la familia de las triazinas. Otros integrantes de la misma familia también se alejaban de la tendencia en el cluster 3. En cuanto a los compuestos que se comportan de la misma forma en las dos condiciones del ensayo, son la mayoría en este cluster, el 80%. Entre éstos todos son no mutagénicos excepto **65**. El único compuesto que resulta mutagénico en una condición sola, sin metabolización, es un dióxido de fenazina, el compuesto **38**.

4.4.6. Cluster 6

A continuación, en la Figura 4.12 se muestran las estructuras de los compuestos incluidos en este cluster.

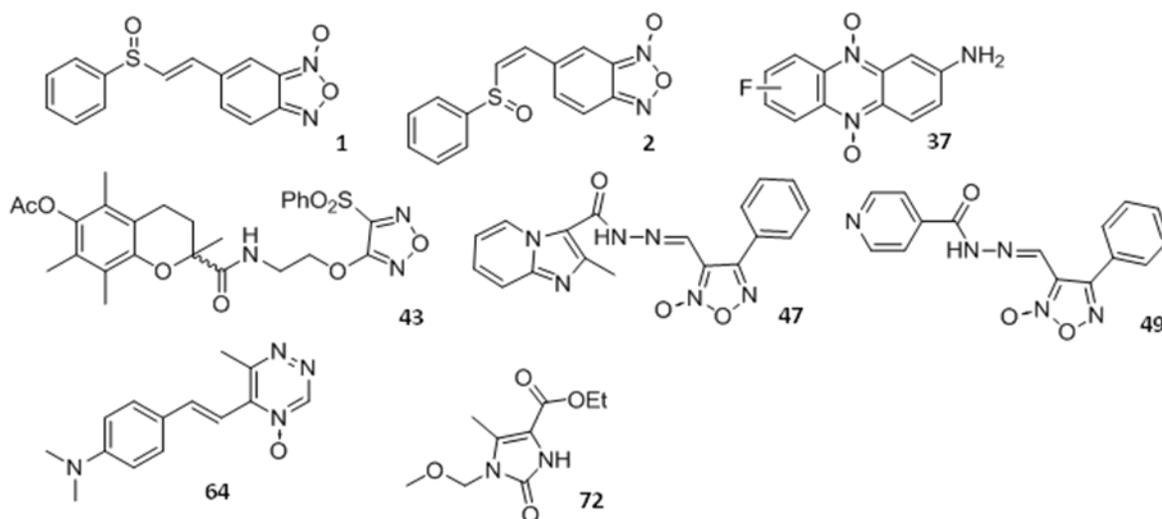


Figura 4.12. Estructuras de los compuestos comprendidos en el cluster 6.

El último cluster en el cual se clasifican los compuestos estudiados tiene un 22% de error en la tendencia de no mutagénesis. Los compuestos que se apartan son **1** y **64**, ambos mutagénicos en ambas condiciones ensayadas. El compuesto **1** es un benzofuroxano, isómero *E* del compuesto **2**. En el cluster 6, ocurre algo similar a lo observado en el cluster 4, dos isómeros tienen actividad diferente en presencia de la fracción metabolizadora S9. Estructuralmente ambos son clasificados en el mismo cluster, pero es de suponer que la mutagénesis estaría relacionada con la distribución espacial en el ambiente de ADN nuclear. El compuesto **64** es una triazina, al igual que aquellas que se apartan en los clusters 5 y 3.

Se puede mencionar que la clasificación estructural realizada en el análisis en cluster divide a los compuestos estudiados en dos grandes grupos. En uno de ellos, constituido por el cluster 1, se encuentran predominantemente compuestos mutagénicos en presencia de fracción S9. Por otro lado, en el otro grupo, formado por los clusters 2 a 6 se encuentra la misma proporción que en el 1 pero de compuestos no mutagénicos en presencia de fracción S9. Si bien la suma de estos cinco clusters llega a un 66% de compuestos no mutagénicos en dicha condición, se observa también que cuatro de esos clusters contienen más del 50% de compuestos con la tendencia mencionada. Únicamente el cluster 3 se aparta en particular de la tendencia.

Es destacable también que en los clusters 2 a 6 tomados como conjunto no sólo contienen dos tercios de los compuestos no mutagénicos en S9, sino que también contienen dos tercios de los compuestos que no resultan mutagénicos en ninguna condición. A diferencia de estos últimos, los compuestos que sí son mutagénicos en ambas condiciones se ubican en igual proporción en el cluster 1 que en el conjunto de los restantes clusters.

Si bien la clasificación en cluster agrupa de forma a los compuestos teniendo en cuenta el potencial mutagénico de los mismos, no existe una relación precisa entre la estructura y dicha actividad.

4.5. Generación de modelos predictivos de actividad mutagénica por Redes Neuronales Artificiales.

Los modelos predictivos utilizando Redes Neuronales Artificiales son entrenados con una serie de compuestos con los cuales la red “aprende” para unos determinados parámetros estructurales una determinada función.

Se plantea el desarrollo de dos redes predictivas, una para cada una de las condiciones para las que se cuenta con datos de mutagénesis, sin activación metabólica y con activación metabólica utilizando la fracción S9. La razón por la cual no se puede generar un modelo de predicción único para las dos condiciones es que son dos actividades diferentes evaluadas en condiciones distintas.

Para la generación de un buen modelo predictivo hay que nutrir a la red con la mayor cantidad de datos, en este caso muchas moléculas, pero dejando un número importante de moléculas para luego predecir. La predicción posterior es la forma de validar el modelo. No es útil generar un modelo que aprenda de 78 compuestos con un 100% de eficiencia, y luego prediga sólo 2 compuestos y lo haga de forma errónea. Esto genera un “sobreaprendimiento” de la red, que luego, cuando se la enfrenta a una estructura desconocida no es capaz de predecirla. El caso opuesto sería que el modelo aprenda de muy pocos compuestos, esto también traería problemas a la hora de la predicción. Es importante lograr un equilibrio en el que se aprenda de un buen número para nutrir de la mejor forma a la red, pero siempre validando luego con una cantidad considerable de moléculas.

4.5.1. Modelo predictivo de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica.

En primer lugar se procedió al desarrollo de un modelo para predecir la actividad en condiciones normales sin activación metabólica. Para este proceso se incluyeron 80 compuestos (ver Figura 4.4), los compuestos **36b**, **40a** y **40b** no se utilizaron ya que no se contaba con los datos experimentales al momento de generar los modelos. Estos compuestos se utilizaron luego para la validación del modelo (apartado 4.6. Predicción de de la actividad mutagénica de nuevos compuestos). Se les asignó a cada compuesto valores de 1 ó 0 a la actividad mutagénica dependiendo si eran mutagénicos o no mutagénicos respectivamente.

En la Figura 4.13. se muestra un esquema del procedimiento realizado para la generación de modelos teóricos de predicción de actividad mutagénica.

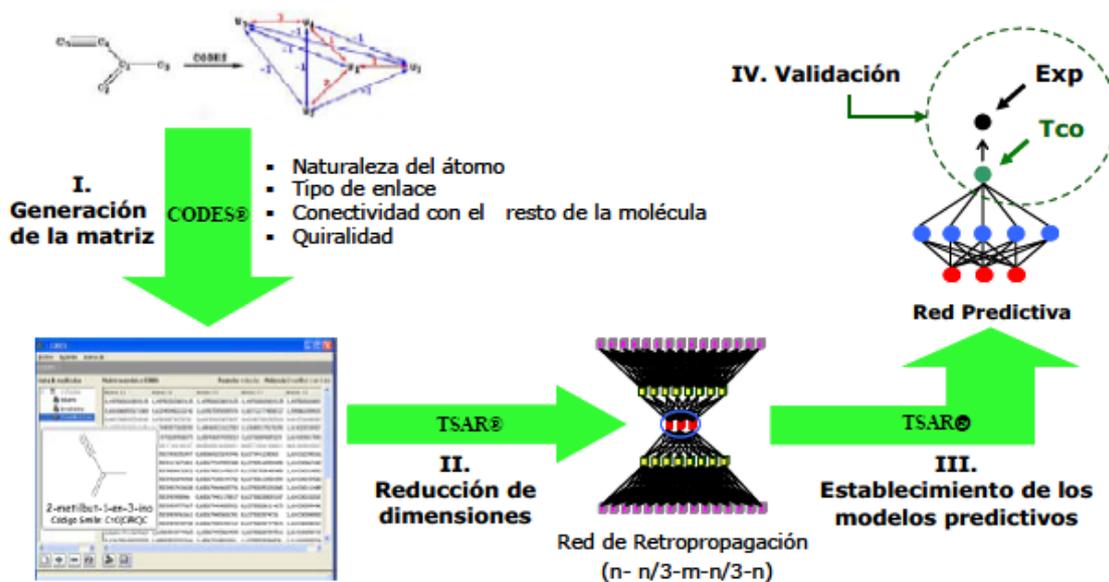


Figura 4.13. Esquema del proceso seguido para la generación de modelos. ^[23]

Para la generación de modelos se ensayaron distintas combinaciones de parámetros como configuración de la red, cantidad de compuestos en el entrenamiento, iteraciones por ciclo, convergencia RMS y cantidad de compuestos excluidos para validar. El valor de los pesos sinápticos para el entrenamiento se dejó constante 0,0001 (mínimo) y 0,025 (máximo).

Se probaron distintas configuraciones de redes. Es decir, se variaba la cantidad de neuronas de la capa oculta, dejando constante 4 en la capa de entrada (los cuatro parámetros estructurales) y 1 en la de salida (la actividad que será 0 ó 1). Para la capa oculta se probó valores de 4, 5 y 6.

El número de compuestos utilizados para el entrenamiento varió desde 45 hasta 70, dejando los restantes para predicción. También se modificó el porcentaje de compuestos para la validación externa (compuestos de los utilizados para el entrenamiento que el programa aparta al azar para predecir y validar el modelo). Se ordenaron los compuestos a incluir en el entrenamiento, siempre se tomaron los primeros de la lista, pero esta fue distribuida al azar en

orden ascendente o descendente según los parámetros a, b, c, ó d de la reducción de dimensiones.

Los valores de iteraciones por ciclo fueron 3000, 3500 ó 4000 y la convergencia RMS fue 0,01 o 0,001.

Para la condición de ausencia de activación mutagénica se generaron 41 modelos diferentes. Se calculó en cada uno el porcentaje de compuestos que son incluidos para el entrenamiento y el modelo los predice bien y también el porcentaje de compuestos predichos bien del grupo utilizado para la predicción. En las tablas IV y V del anexo se muestran los datos de los modelos generados para la predicción de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica. Se seleccionaron los modelos con mejores porcentajes de predicción y se trabajó con ellos para mejorar esos valores. La forma de optimizar la predicción fue quitar compuestos del entrenamiento que hayan sido bien predichos, y dejarlos para predecirlos. Además, se incluyeron en el entrenamiento compuestos que antes estaban en el grupo de predicción y eran predichos erróneamente. Esto se realiza de a dos o tres compuestos a la vez para ver si hay mejoras. El objetivo de este procedimiento es lograr aprender de aquellos compuestos que eran predichos erróneamente incluyéndolos en el entrenamiento.

El mejor modelo fue con los compuestos ordenados de forma ascendente según el parámetro c, incluyendo 60 compuestos en el entrenamiento (ver Tabla VI anexo). Para el entrenamiento se utilizaron los siguientes valores:

- Configuración de la red: 4:6:1 (esto es, 4 en la capa de entrada, 6 en la oculta y 1 en la capa de salida)
- Iteraciones por ciclo: 4000
- Mejores ciclos pasados: 500
- Convergencia RMS: 0,01
- 5% de datos excluidos para testear. (corresponde a tres compuestos que utiliza el programa para predecir)

Se obtuvo entonces un modelo entrenado por 57 compuestos (ver tabla V de anexo), el cual se utilizó luego para predecir los restantes 23 compuestos que eran desconocidos para el mismo.

En la Figura 4.14. Se muestra un gráfico con los resultados experimentales y de predicción para los compuestos utilizados con este modelo. También se muestran los errores (diferencia entre valor experimental y predicción).

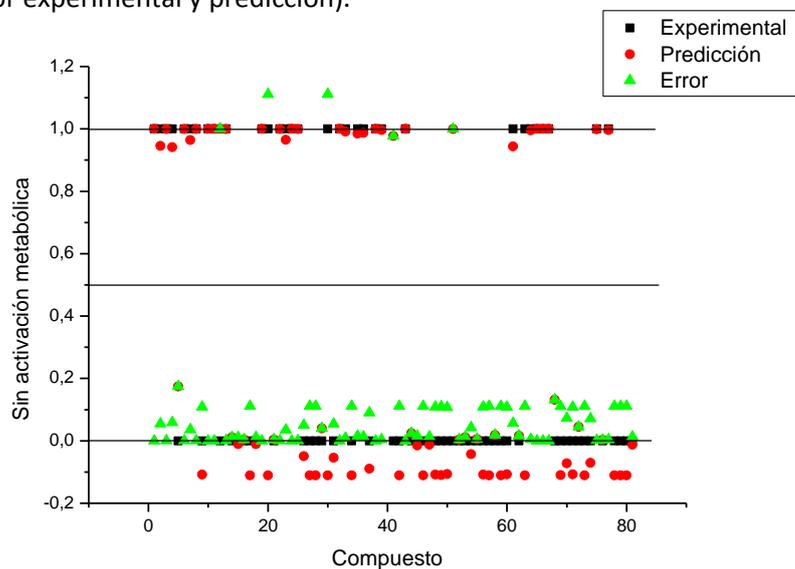


Figura 4.14. Gráfico con los valores de mutagénesis experimental, predicción del modelo y error entre ellos.

Los compuestos con los valores de error mayores a 0,5 son considerados compuestos mal predichos. Como puede verse en el gráfico, la gran mayoría de los valores de error (valor absoluto) se encuentran cercanos a la línea de cero y uno respectivamente.

En la Tabla 4.11. se muestra el comportamiento de los compuestos en el modelo agrupados por familias.

Familia	Bien predichos ^a	Mal predichos ^b	Entrenamiento ^c
Benzofuroxanos	4	2	15
Benzimidazoles	4	0	1
Quinoxalinas	2	1	5
Imidazoles	0	0	3
Indazoles	0	0	4
Fenazinas	1	0	4
Triazinas	2	1	3
Piridinas	1	0	2
Furoxanos	2	1	14
Dioximas	2	0	6

^a cantidad de compuestos predichos de forma acertada, ^b cantidad de compuestos predichos de forma errónea, ^c cantidad de compuestos utilizados en el entrenamiento.

Tabla 4.11. Comportamiento de los compuestos incluidos en el modelo en ausencia de activación metabólica utilizados para la predicción de actividad agrupados por familias.

Como puede observarse la generación de un modelo incluyó en el mismo, compuestos de todas las familias estudiadas. De los 57 compuestos de los cuales la red aprendió, solamente uno fue predicho luego de forma errónea. Es decir que el modelo tiene un 98,25% de acierto en la predicción de los compuestos con los cuales fue entrenado. Sólo el compuesto **51** fue utilizado para el entrenamiento y aprendizaje de manera errónea (Figura 4.15.).

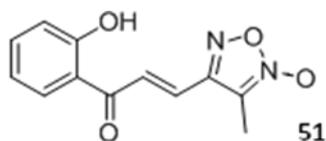


Figura 4.15. Estructura del compuesto aprendido de manera errónea por el modelo.

Por otro lado de los 23 compuestos predichos, el modelo acierta en 18, un 78,26%. El resultado experimental del test de Ames de los compuestos **12**, **20**, **30**, **41** y **63** que fueron predichos de forma errónea no deja dudas. Esto significa que la cantidad de colonias

revertientes fue notoriamente superior (más del doble) a la del control negativo, por lo que no se cree que la mala predicción esté relacionada con un resultado experimental dudoso. En la Figura 4.16. se muestran las estructuras de los compuestos antes mencionados.

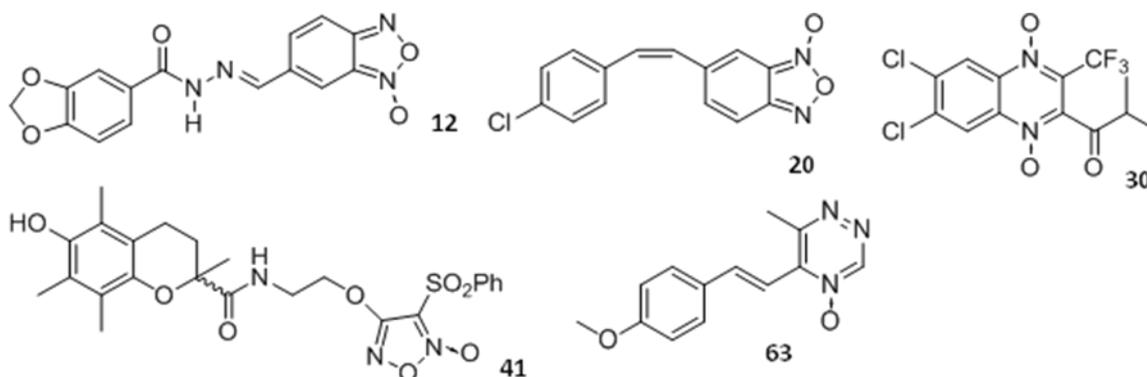


Figura 4.16. Estructuras de los compuestos predichos de forma errónea en el modelo predictivo.

Observando la estructura de estos compuestos se puede mencionar que todos contienen el agrupamiento *N*-óxido. Esta última característica no puede determinar ninguna conclusión general ya que una gran cantidad de compuestos también presentan ese agrupamiento y fueron predichos de forma acertada. Es claro que los seis compuestos presentan agrupamientos que pueden ser susceptibles de ataque nucleofílico por parte de ADN.

Es importante destacar que el 60% de los compuestos utilizados para el entrenamiento del modelo no eran mutagénicos. En cuanto a los compuestos a predecir, las proporciones eran similares. El porcentaje de error en la predicción de los compuestos no mutagénicos es 14% en tanto que los mutagénicos son predichos con un 33% de error.

Analizando cada familia en particular, se puede observar que ninguno de los derivados de indazol ni de imidazol fue utilizado en la predicción. Si bien el modelo aprende bien de ellos no se contó con derivados para la predicción de este tipo de estructuras.

Las familias restantes, tomadas cada una por separado, tienen un nivel de acierto en la predicción de al menos un 60%.

4.5.2. Modelo predictivo de actividad mutagénica en presencia de activación metabólica.

Una vez generado un buen modelo predictivo de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica, se procedió de la misma manera para la condición donde se emplea la fracción de metabolización S9. Para este modelo se utilizaron 76 compuestos. Las estructuras se muestran en la Figura 4.4., los compuestos **35**, **36a**, **36b**, **39** y **40b** no se utilizaron ya que no se contaba con los datos experimentales, no obstante los ensayos fueron realizados posteriormente y se incluyeron dichos compuestos en el proceso de predicción detallado en el apartado 4.6 de este capítulo.

Los parámetros que se modificaron en el proceso de generación de los modelos fueron la configuración de la red (variando la capa oculta por 5 ó 6), la cantidad de compuestos en el entrenamiento (76, 60 ó 55) y el porcentaje de validación interna, es decir los datos excluidos para predecir (5% ó 6%). Se organizaron las moléculas al azar ascendente según parámetro a. El valor de los pesos sinápticos para el entrenamiento se dejó constante 0,0001 (mínimo) y 0,025 (máximo). Se generaron 30 modelos predictivos (ver tablas VII y VIII anexo).

El modelo con mejores resultados se muestra en la tabla VIII del anexo. Para él se utilizaron 60 compuestos en el entrenamiento con siguientes valores:

- Configuración de la red: 4:6:1
- Iteraciones por ciclo: 4000
- Mejores ciclos pasados: 500
- Convergencia RMS: 0,01
- 5% de datos excluidos para testear.

Luego se utilizaron 16 compuestos para predecir y validar la red generada (ver tabla IX en anexo). En la Figura 4.17. se puede ver la distribución de los valores experimentales de mutagénesis, las predicciones del modelo y el error entre ellos.

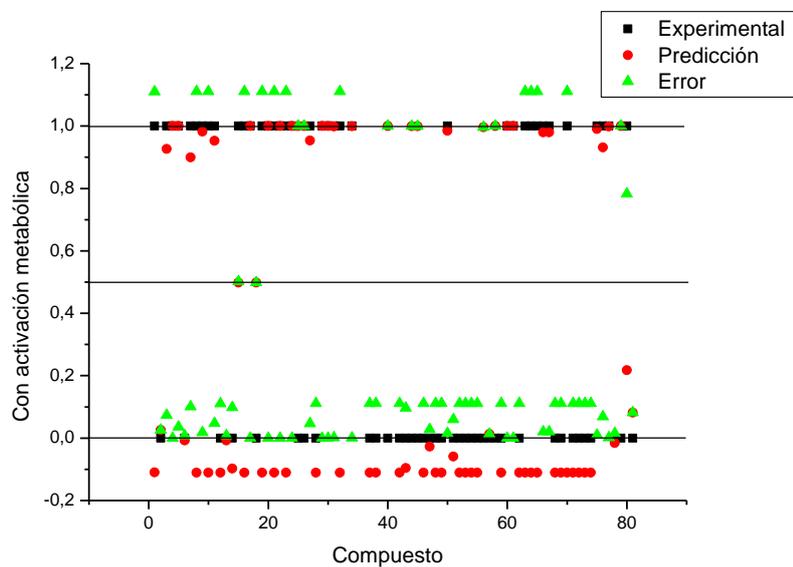


Figura. 4.17. Gráfico con los valores de mutagénesis experimental, predicción del modelo y error entre ellos.

La línea en 0,5 marca el límite que divide los compuestos predichos o aprendidos correctamente (error menor a ese valor) y los que resulta erróneos (error igual o mayor a 0,5). En las líneas de 0 y 1 se alinean los valores experimentales, así como las predicciones que coinciden con dicho valor.

En la Tabla 4.12. se detallan las proporciones de compuestos utilizados ya sea en el entrenamiento como en la validación agrupados por familia.

	Bien entrenamiento ^a	Mal entrenamiento ^b	Bien predichos ^c	Mal predichos ^d
Benzofuroxanos	10	7	4	0
Benzimidazoles	1	2	1	1
Quinoxalinas	5	1	1	0
Fenazinas	2	1	0	0
Furoxanos	12	0	1	3
Indazoles	1	0	2	1
Triazinas	3	3	0	0
Piridinas	2	1	0	0
Imidazoles	2	0	1	0
Dioximas	5	2	1	0

^a cantidad de compuestos utilizados en el entrenamiento y aprendidos acertadamente, ^b cantidad de compuestos utilizados en el entrenamiento y aprendidos de forma errónea, ^c cantidad de compuestos predichos de forma acertada, ^d cantidad de compuestos predichos de forma errónea.

Tabla 4.12. Resultados del análisis de los compuestos presentes en el modelo predictivo de actividad mutagénica con activación metabólica y predichos por el mismo.

El modelo predictivo se nutrió de moléculas integrantes de todas las familias estudiadas, aunque a diferencia del generado para ausencia de activación metabólica, éste tiene un porcentaje de acierto en los compuestos de los que aprende de 72%. Si se tiene en cuenta únicamente los compuestos predichos, la red acierta en un 69%.

En el caso de las quinoxalinas, las dioximas y los imidazoles las proporciones de compuestos ya sea utilizados para el entrenamiento como predichos de manera acertada son adecuados. En las otras familias como los benzofuroxanos se observa que si bien la proporción de compuestos que el modelo aprende de forma errada es alta, luego predice bien el 100% de los mismos. Algo opuesto sucede con los furoxanos, el 100% de los compuestos presentes en el modelo son aprendidos acertadamente, pero el modelo predice con un error del 75% de la misma. Las triazinas son aprendidas con un 50% de error y las piridinas con un 30%, pero

ninguna de las dos familias fueron predichas luego, por lo que no hay datos sobre la capacidad del modelo para predecir estructuras de ese tipo.

En la Figura 4.18. se muestran las estructuras de los compuestos que el modelo predice de manera errada.

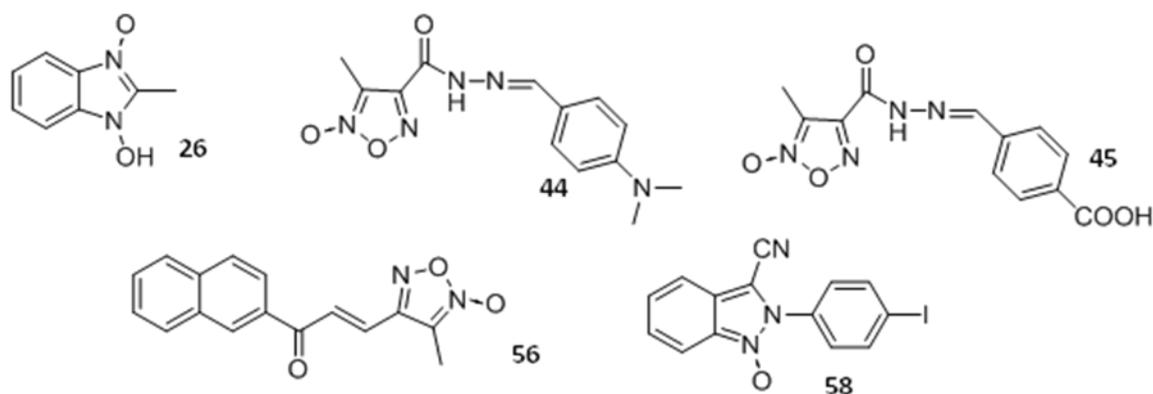


Figura 4.18. Estructuras de los compuestos predichos erróneamente por el modelo.

Todos los compuestos que la red predice inadecuadamente resultaron no mutagénicos. Tres son furoxanos (**44**, **45**, **65**) y uno es un benzimidazol (**26**), el resultado del ensayo *in vitro* no es dudoso para todos ellos. El quinto compuesto es el **58**, un *N*-óxido de indazol que se considera no mutagénico a pesar que el promedio de los duplicados de la dosis máxima ensayada sea superior al control negativo. Es posible que dicho compuesto haya tenido que considerarse mutagénico en este caso el resultado es dudoso. En esa dosis máxima, una de las placas tiene un crecimiento muy elevado de colonias mientras que la segunda no. Al promediarlas se tiene un número mayor al control negativo, pero con un desvío del 80%. Por otro lado no presenta efecto dosis respuesta, las cuatro dosis restantes tienen un número de revertientes similar entre sí y con respecto al control negativo.

Realizando un análisis de los compuestos que se utilizan para entrenar la red pero no son predichos de forma adecuada, se puede ver como un 82% de éstos son mutagénicos. Esto es llamativo si se recuerda que aquellos cinco compuestos desconocidos para la red que son predichos mal, eran no mutagénicos.

En el entrenamiento del modelo, 17 compuestos fueron aprendidos de manera errónea, sus estructuras se muestran en la Figura 4.19.

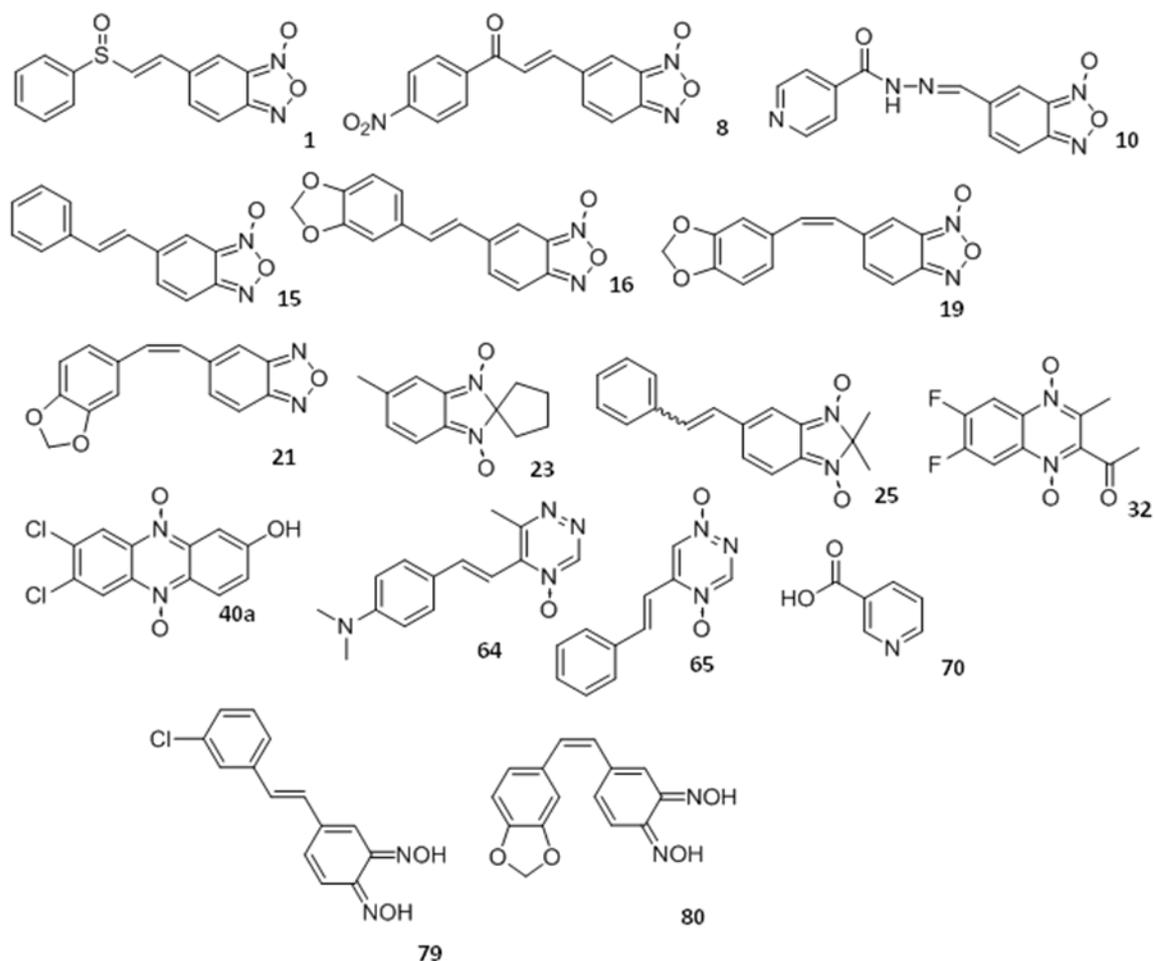


Figura 4.19. Estructuras de los compuestos aprendidos de manera errónea por el modelo durante su entrenamiento

Es interesante que 14 de los 17 compuestos que entrenan mal el modelo, también se apartan de la tendencia de los clusters a los que pertenecen en el análisis de clusters. Lo más relevante sucede en el cluster 3, que si bien debería tener mayoría de compuestos mutagénicos en condiciones metabólicas, tenía la mitad que no lo eran. Son cinco los compuestos que entrenan mal el modelo y también se apartan de la tendencia de ese cluster. Estos son tres benzofuroxanos, **10**, **16**, **19**, un benzofurazano, **21**, y una quinoxalina, **32** (Figura 4.20.).

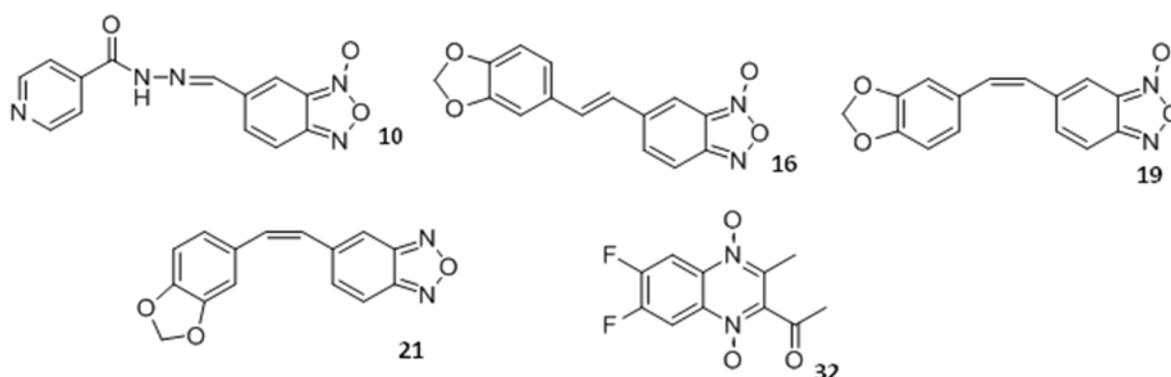


Figura 4.20. Estructuras de los compuestos mal entrenados en el modelo con activación metabólica y apartados de la tendencia del cluster 3.

El compuesto **25** es un benzimidazol que es la mezcla de isómeros *E* (compuesto **22**) y *Z*. La actividad mutagénica es diferente a la del compuesto **22** por separado, pero los parámetros estructurales ingresados para el modelo fueron del isómero *E* (los mismos que el compuesto **22**). Esa puede ser la razón por la cual si bien ambos compuestos se encuentran en el cluster 1 el compuesto **25** se aparta de la tendencia de mutagénesis en presencia de fracción metabolizadora S9 presentada por ese grupo.

Una familia de compuestos de la que la red neuronal aprende mal son las triazinas. Estos compuestos también se apartaban bastante de la tendencia de los clusters en los que estaban clasificados. Los compuestos **63**, **64** y **65** son aquellos en los que el modelo se equivoca (ver Figura 4.21.).

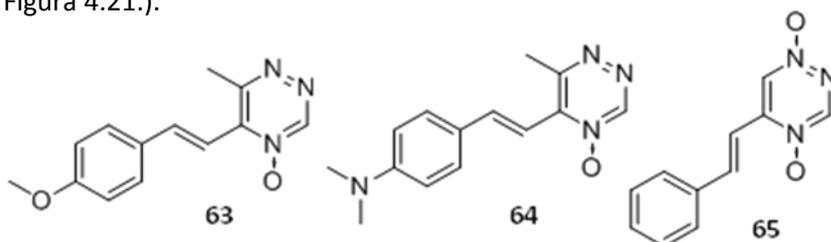


Figura 4.21. Estructuras de las triazinas que el modelo aprende de forma incorrecta.

Como se puede observar, los tres compuestos tienen similitudes estructurales. Tienen un doble enlace en posición α del C^5 del heterociclo y a un anillo aromático. Todos presentan el agrupamiento *N*-óxido, si bien el compuesto **65** presenta dos.

Por otro lado, **64** y el **65** también se apartan de la tendencia de los clusters 6 y 5 respectivamente.

En cuanto al modelo de red neuronal generado en el caso de actividad mutagénica en presencia de activación metabólica es interesante que los compuestos en los que la red falla también se aparten en el análisis de clusters. Esto último podría estar indicando que la actividad mutagénica no sólo está determinada por parámetros estructurales, y que en algunas familias en especial el causante es otro tipo de propiedad, parámetro o condición como ser grado de metabolización, metabolitos, etc.

4.6. Predicción de de la actividad mutagénica de nuevos compuestos.

Con el fin de estudiar la capacidad predictiva de los modelos generados, se utilizaron los mismos para predecir compuestos cuyos resultados experimentales de Test de Ames fueron obtenidos luego de la generación de los modelos. Los compuestos pertenecen a la familia de fenazinas. Se trata de *N,N'*-dióxidos utilizados para ampliar la quimiodiversidad y derivados deoxigenados para evaluar la relevancia de la funcionalidad *N*-óxido en la mutagenicidad.

4.6.1. Predicción de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica.

El modelo de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica se utilizó para predecir los compuestos **36b**, **40a** y **40b**. Los datos de la reducción de dimensiones y de la predicción correspondientes a estos compuestos se encuentran en la Tabla X del anexo. En la Figura 4.22. se muestran las estructuras de dichos compuestos.

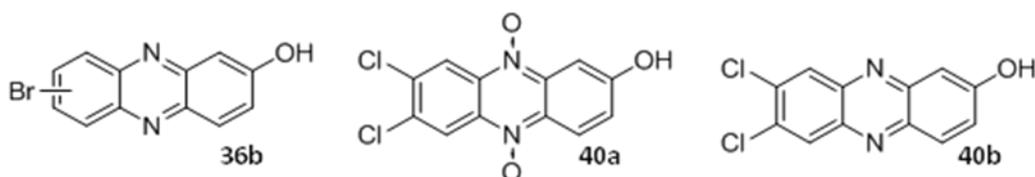


Figura 4.22. Estructuras de las fenazinas utilizadas para la predicción de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica.

Como resultado de la predicción de actividad mutagénica, se obtuvo un acierto de 67%. El compuesto di-oxidado (**40a**) resulta mutagénico y es predicho de igual manera, su derivado deoxigenado (**40b**) también es predicho de manera acertada siendo no mutagénico. Sin embargo la fenazina **36b** que es mutagénico en esta condición es predicho como si no lo fuera. Es interesante este resultado, ya que su congénere di-oxigenado **36a** que también es mutagénico fue predicho de manera acertada por el modelo.

Si se incorporan estos resultados a los anteriores de predicción de este modelo (incluyendo estos tres compuestos dentro del grupo de predicción), el porcentaje de acierto es de 76,9%, prácticamente igual al obtenido sin estos compuestos. Estas últimas predicciones aportan datos sobre el nivel de predicción del modelo, validándolo.

4.6.2. Predicción de actividad mutagénica en presencia de activación metabólica.

Con el modelo de actividad con fracción metabolizadora S9 se predijeron los compuestos **35**, **36a**, **36b**, **39** y **40b**, cuyas estructuras se muestran en la Figura 4.23. Los datos de la reducción de dimensiones y los datos de la predicción correspondientes a estos compuestos se encuentran en la tabla XI del anexo.

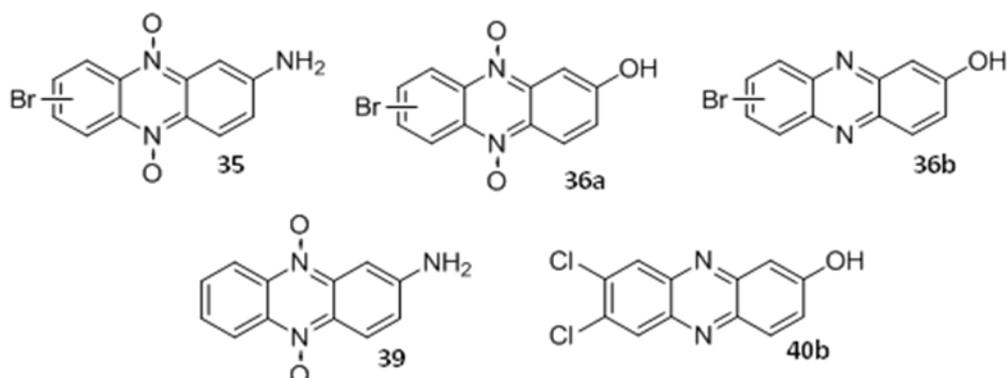


Figura 4.23. Estructuras utilizadas para la predicción de actividad mutagénica con activación metabólica.

Los compuestos **36a**, **36b** y **40b** son predichos de forma correcta por el modelo, mientras que los restantes no.

Algo a destacar en estos resultados es que el modelo continúa con un nivel de predicción en el entorno del evaluado cuando se generó. Es algo positivo ya que se puede confirmar que testeando el modelo con estructuras que no estuvieron involucradas en el entrenamiento igualmente son predichas de manera adecuada. Esto se prueba con la buena predicción de las fenazinas de-oxigenadas (compuestos **36b** y **40b**) ya que en el entrenamiento sólo se habían utilizado dióxidos de fenazina. Por otro lado anteriormente no se había predicho ninguna fenazina y con estos datos se obtiene un 60% de acierto en la predicción.

Se puede demostrar que al incluir estos compuestos en el grupo de predicción, el nivel es sólo un 1% inferior al obtenido anteriormente. Por eso, al igual que el otro modelo, este puede ser validado.

4.7. Referencias bibliográficas.

- [1] <http://www.oecd.org/sti/biotech/41603452.pdf> (acceso 04/04/2013).
- [2] http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf (acceso 10/04/2013).
- [3] Mortelmans, K.; Zeiger, E. *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. Mut. Res. 455, 29-60, 2000.
- [4] Waleh, N.S.; Rapport, S.J.; Mortelmans, K.E. *Development of a toxicity test to be coupled to the Ames Salmonella assay and the method of construction of the required strains*. Mutat. Res, 97, 247-256, 1982.
- [5] Cabrera, M.; Lavaggi, M.L.; Hernández, P.; Merlino, A.; Gerpe, A.; Porcal, W.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Monge, A.; López de Cerain, A.; González, M.; Cerecetto, H. *Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-T. cruzi 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction*. Toxicol. Lett. 190, 140-149, 2009.
- [6] Hernandez, P.; Cabrera, M.; Lavaggi, M L.; Celano, L.; Tiscornia, I.; Rodríguez Da Costa, T.; Thomson, L.; Bollati-Fogolín, M.; Miranda, A.L.; Lima, L.M.; Barreiro, E.J.; González, M.; Cerecetto, H. *Discovery of new orally effective analgesic and anti-inflammatory hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives*. Bioorg. Chem. Med. 20, 2158-2171. 2012.
- [7] Cabrera, M.; López, G.V.; Gómez, L.E.; Breijjo, M.; Pintos, C.; Botti, H.; Raymondo, S.; Vettorazzi, A.; López de Ceráin, A.; Monge, A.; Rubbo, H.; González, M.; Cerecetto, H. *Genetic toxicology and preliminary in vivo studies of nitric oxide donor tocopherol analogs as potential new class of antiatherogenesis agents*. Drug and Chemical Toxicology, 34 (3), 285-293, 2011.
- [8] Benitez, D.; Cabrera, M.; Hernández, P.; Boiani, L.; Lavaggi, M.L.; Di Maio, R.; Yaluff, G.; Serna, E.; Torres, S.; Ferreira, M.E.; Vera de Bilbao, N.; Torres, E.; Rérez-Silanes, S.; Solano, B.; Moreno, E.; Aldana, I.; López de Ceráin, A.; Cerecetto, H.; González, M.; Monge, A. *3-trifluoromethylquinoxaline N,N'-dioxides as anti-trypanosomatid agents. Identification of optimal anti-T. cruzi agents and mechanism of action studies*. J. Med. Chem. 54, 3624-3636, 2011.

- [9] Maron, D.M.; Ames, B.N. *Revised methods for Salmonella mutagenicity test*. Mut. Res. 113, 173- 215, 1983.
- [10] McCann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E.; Ames, B.N. *Detection of carcinogens in the Salmonella/microsome test. Assay of 300 chemicals*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 5135-5139, 1975.
- [11] Zeiger, E.; Haserman, J.K.; Shelby, M.D.; Mergolin, B.H.; Tennant, R.W. *Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: confirmation of earlier results with 41 additional chemicals*. Environ. Mol. Mutagen. 16, 18, 1-14, 1990.
- [12] Nielsen, P.; Lagersted, A.; Danielsen, S.; Jensen, A.; Hart, J.; Larsen, J.C. *Mutagenic activity of nine N,N-disubstituted hydrazines in the Salmonella/mammalian microsome assay*. Mut. Res. 278, 215-226, 1992.
- [13] Zeiger, E.; Risko, K.J.; Margolin, B.H. *Strategies to reduce the host of mutagenicity screening using the Salmonella/microsomal assay*. Environ. Mutagen. 7, 901-921, 1985.
- [14] Chu, K.C.; Patel, K.M.; Lin, A.H.; Tarone, R.E.; Linhart, M.S.; Dunkel, V.C. *Evaluating statistical analysis and reproducibility of microbial mutagenicity assays*. Mut. Res. 85, 119-132, 1981.
- [15] Debnath, A. K.; Lopez de Compadre, R. L.; Debnath, G.; Shusterman, A. J.; Hansch, C. *Structure-activity relationship of mutagenic aromatic and heteroaromatic nitro compounds. Correlation with molecular orbital energies and hydrophobicity*. J. Med. Chem. 34, 2, 786-797, 1991.
- [16] Campodónico, P. R.; Contreras, R. *Structure–reactivity relationships for electrophilic sugars in interaction with nucleophilic biological targets*. Bioorg. Med. Chem. 16, 6, 3184-3190, 2008.
- [17] ChemBioDraw Ultra 12.0©, ChambridgeSoft 1986-2009.
- [18] Stud M. CODES©; v1.0 (revisión 3) ed. Instituto de Química Médica. CSIC. España.
- [19] Dorronsoro, I.; Chana, A.; Abasolo, I.; Castro, A.; Gil, C.; Stud, M.; Martinez, A. *CODES/Neural network model: a useful tool for in silico prediction of oral absorption and blood-brain barrier permeability of structurally diverse drugs*. Qsar Comb. Sci. 23, 89-98, 2004.

[20] McClelland, J.; Rumelhart, D. *Parallel distributed processing: Explorations in the microstructure of cognition*. Foundations. Cambridge, Mass: Bradford Books & MIT Press, 2, 1989.

[21] TSAR[®], version 3.3. Oxford Molecular, Ltd.; Oxford, UK: 2000.

[22] Niculescu, S. *Artificial neural networks and genetic algorithms in QSAR*. J. Mol. Struct.: THEOCHEM, 622, 71-83, 2003.

[23] Guerra, A. *Aplicación de la inteligencia artificial en química médica*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, 2009.

5. Conclusiones y perspectivas.

En el marco de esta tesina de grado se ensayó experimentalmente la actividad mutagénica de 26 compuestos derivados de seis familias estructurales diferentes (benzimidazol, fenazina, indazol, imidazol, triazina y piridina).

Se comprobó que existen tendencias de mutagénesis con ciertas características estructurales presentes en algunas familias estudiadas como es en el caso de las fenazinas. También se observó el caso opuesto en el caso de los imidazoles. Por otro lado, en otras familias, la mutagénesis estaría ligada, entre otras cosas, a algunos grupos funcionales presentes y no precisamente el heterociclo común (triazinas, imidazoles, piridinas). Se pudo observar también que el agrupamiento *N*-óxido no es el causante de la actividad mutagénica de los compuestos.

Se calcularon por medio de redes neuronales parámetros estructurales de 83 derivados de heterociclos aromáticos con potencial uso como fármacos para estudios teóricos de relación estructura-actividad mutagénica.

En primer lugar se clasificó 74 compuestos según parámetros estructurales en clusters. Se encontró en dicha clasificación una tendencia del 65% de compuestos mutagénicos en presencia de activación metabólica en una de las primeras dos ramas en las cuales se divide el cluster (cluster 1). Se encontró también una tendencia de 63% de compuestos no mutagénicos en la misma condición en la otra rama inicial (clusters 2 a 6).

Se generaron dos modelos predictivos de actividad mutagénica utilizando redes neuronales artificiales. El modelo para la condición en ausencia de activación metabólica se generó con 57 compuestos y predice otros 23 con un acierto del 78,26%. Cabe destacar también que predice los compuestos del entrenamiento con un acierto cercano al 100%. También se generó otro modelo para la condición de presencia de activación metabólica el cual tuvo un nivel de predicción del 69%.

Este último modelo tuvo resultados inferiores al anterior ya que no fueron los productos de metabolización los utilizados para entrenar la red, sino los compuestos de partida.

Se entiende también que para generar un modelo que prediga la actividad en condiciones de metabolización y que sea mejor al existente, se debería por un lado conocer los productos de metabolización de los compuestos estudiados, y por otro lado conocer la actividad

independiente de cada uno de ellos. La red entonces, debería nutrirse con parámetros estructurales de los metabolitos y la actividad de cada uno de ellos.

Por último se validaron ambos modelos utilizándolos para predecir nuevos compuestos desconocidos para ellos. Para ambos se probó que al predecir nuevas estructuras, éstos mantienen el nivel de predicción logrado en su generación.

Anexo

En la tabla I se muestran los resultados de Test de Ames de los compuestos ensayados en el marco de esta tesina.

Compuesto	Dosis ($\mu\text{g/placa}$)	Nº de colonias revertientes en ausencia de activación metabólica \pm DS	Nº de colonias revertientes en presencia de activación metabólica \pm DS
25	40	40 \pm 4	17 \pm 0
	13	17 \pm 2	15 \pm 3
	4	17 \pm 4	14 \pm 7
	1,5	11 \pm 2	20 \pm 7
	0,5	15 \pm 4	25 \pm 1
	C -	7 \pm 2	13 \pm 3
C +	880	932	
26	125	11 \pm 2	15 \pm 4
	42	8 \pm 2	11 \pm 1
	14	11 \pm 7	17 \pm 6
	5	11 \pm 5	12 \pm 3
	2	10 \pm 9	12 \pm 5
	C -	10 \pm 1	15 \pm 2
C +	880	932	
35	0,3	31 \pm 1	20 \pm 1
	0,1	21 \pm 5	15 \pm 1
	0,03	11 \pm 2	18 \pm 1
	0,01	13 \pm 5	20 \pm 1
	0,003	8 \pm 3	13 \pm 1
	C -	11 \pm 3	15 \pm 3
C +	792	600	
36a	15	173 \pm 6	17 \pm 2
	5	53 \pm 4	19 \pm 4
	2	20 \pm 1	14 \pm 1
	1	15 \pm 1	12 \pm 3
	0,3	16 \pm 1	10 \pm 1
	C -	11 \pm 3	15 \pm 3
C +	792	600	
36b	80	29 \pm 0	30 \pm 1
	27	18 \pm 6	20 \pm 4
	9	15 \pm 3	17 \pm 0
	3	10 \pm 3	17 \pm 4
	1	10 \pm 4	16 \pm 4
	C -	9 \pm 2	16 \pm 4

	C +	796	670
37	0,04	14±1	21±4
	0,01	17±4	15±8
	4,00E-03	15±8	13±1
	1,00E-03	6±3	11±1
	5,00E-04	12±2	32±25
	C -	11±2	12±1
	C +	566	700
38	0,8	128±60	18±8
	0,3	16±1	20±7
	9,00E-02	15±1	25±1
	3,00E-02	11±5	9±3
	5,00E-03	16±8	13±1
	C -	10±3	14±1
	C +	842	740
39	3	237±34	39±10
	1	221±58	26±6
	0,3	60±11	13±1
	0,1	23±1	15±5
	0,03	20±6	14±0
	C -	12±3	14±2
	C +	696	740
40a	0,5	9±0	18±1
	0,2	12±4	10±5
	0,05	10±3	11±1
	0,02	7±0	16±4
	0,006	8±5	19±2
	C -	5±1	16±1
	C +	580	438
40b	40	4±1	11±3
	13	9±1	13±2
	4	11±1	16±3
	1,5	10±1	13±5
	0,5	15±0	10±1
	C -	11±3	15±3
	C +	792	600
58	250	25±3	30±24
	83	12±1	14±1
	28	6±0	13±7

	9	11±1	14±1
	3	11±0	12±4
	C -	15±10	10±2
	C +	1294	760
59	80	14±0	8±1
	27	7±0	11±6
	9	6±2	15±1
	3	8±5	16±9
	1	9±2	12±3
	C -	10±1	15±2
	C +	880	932
60	8	29±0	89±10
	3	14±7	30±10
	1	13±8	24±1
	0,3	18±4	29±4
	0,1	12±2	19±4
	C -	15±10	10±2
	C +	1294	760
61	400	363±88	405±50
	133	214±59	302±26
	44	164±28	322±6
	15	53±16	306±125
	5	55±5	162±13
	C -	15±10	10±2
	C +	1294	760
62	125	11±1	9±3
	42	10±2	14±10
	14	10±6	14±7
	5	9±4	22±0
	2	12±1	13±4
	C -	10±1	15±2
	C +	880	932
63	250	133±68	85±8
	83	35±1	41±10
	28	15±10	35±4
	9	10±0	19±1
	3	10±1	16±2
	C -	13±9	12±3
	C +	880	932

64	8	21±8	80±4
	3	18±6	37±15
	1	10±6	18±6
	0,3	11±6	16±0
	0,1	11±4	10±1
	C -	7±2	13±3
C +	880	932	
65	8	30±6	19±1
	3	20±5	34±5
	1	15±1	29±3
	0,3	11±2	22±1
	0,1	11±1	13±4
	C -	10±3	14±1
C +	842	740	
66	800	119±6	196±51
	267	96±4	63±9
	89	50±9	28±13
	30	23±7	18±1
	10	13±4	15±5
	C -	10±3	14±1
C +	842	740	
67	1000	80±11	110±8
	333	100±11	97±1
	111	180±139	91±7
	37	71±14	77±7
	12	50±23	38±11
	C -	10±3	14±1
C +	842	740	
68	200	13±3	7±1
	67	9±2	15±4
	22	7±1	14±4
	7	9±1	8±3
	3	10±4	12±0
	C -	11±2	12±1
C +	566	700	
69	1000	12±6	21±0
	333	7±3	22±1
	111	15±1	19±1
	37	9±4	20±7

	12	20±11	8±1
	C -	10±2	12±1
	C +	714	972
70	1000	8±0	53±26
	333	10±1	14±3
	111	11±2	29±4
	37	10±0	23±9
	12	13±0	13±3
	C -	10±2	12±1
	C +	714	972
71	400	11±2	17±13
	133	10±1	15±1
	44	10±6	12±2
	15	10±7	8±0
	5	7±1	12±4
	C -	7±2	13±3
	C +	566	700
72	125	9±1	11±0
	42	5±0	8±2
	16	7±0	19±11
	5	8±1	9±3
	2	9±6	9±3
	C -	11±2	12±1
	C +	566	700
73	400	12±4	19±1
	133	9±2	13±1
	44	13±2	12±1
	15	7±1	11±1
	5	10±0	14±2
	C -	10±1	15±2
	C +	880	932

Tabla I. Resultados de Test de Ames.

Los códigos SMILE de los compuestos, obtenidos de ChemBioDraw Ultra 12.0 se muestran en la tabla II.

Compuesto	Código SMILE
1	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C/S(c3ccccc3)=O)ccc2=NO1</chem>
2	<chem>O=S(c1ccccc1)/C=C\c2ccc3=NO[N+](O)=c3c2</chem>
3	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C/S(c3ccccc3)(=O)=O)ccc2=NO1</chem>
4	<chem>O=S(/C=C\c1ccc2=NO[N+](O)=c2c1)(c3ccccc3)=O</chem>
5	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C/Sc3ccccc3)ccc2=NO1</chem>
6	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C/C(c3ccccc3)=O)ccc2=NO1</chem>
7	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C/C(c3ccc(OC)cc3)=O)ccc2=NO1</chem>
8	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C/C(c3ccc([N+](O)=O)cc3)=O)ccc2=NO1</chem>
9	<chem>Clc1cc2=[N+](O)ON=c2nc1</chem>
10	<chem>O=C(c1ccncc1)NN=Cc2cc3=[N+](O)ON=c3cc2</chem>
11	<chem>O=C(C1=C(C)NC=N1)NN=Cc2cc3=[N+](O)ON=c3cc2</chem>
12	<chem>O=C(c1ccc2c(OCO2)c1)NN=Cc3cc4=[N+](O)ON=c4cc3</chem>
13	<chem>[O-][N+]1=c(cc(/C=C/C(c2ccccc2)=O)cc3)c3=NO1</chem>
14	<chem>O=C(c1ccccc1)/C=C/c2cc3=NON=c3cc2</chem>
15	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C/c3ccccc3)ccc2=NO1</chem>
16	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C/c3cc4c(OCO4)cc3)ccc2=NO1</chem>
17	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C/c3ccc(Cl)cc3)ccc2=NO1</chem>
18	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C\c3ccccc3)ccc2=NO1</chem>
19	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C\c3ccc4c(OCO4)c3)ccc2=NO1</chem>
20	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C\c3ccc(Cl)cc3)ccc2=NO1</chem>
21	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C\c3cc4c(OCO4)cc3)ccc2=NO1</chem>
22	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C/c3ccccc3)ccc2=[N+](O)C1(C)C</chem>
23	<chem>[O-][N+]1=c2cc(C)ccc2=[N+](O)C13CCCC3</chem>
24	<chem>[O-][N+]1=c2ccccc2=[N+](O)C1(C)C</chem>
25	<chem>[O-][N+]1=c2cc(/C=C/c3ccccc3)ccc2=[N+](O)C1(C)C</chem>
26	<chem>[O-][N+]1=c2ccccc2=[N+](O)C1C</chem>
27	<chem>Fc1cc2[n+](O)c(C(F)(F)F)c(C(OCC)=O)[n+](O)c2cc1F</chem>
28	<chem>[O-][n+]1c2cc(C(F)(F)F)ccc2[n+](O)c(C(OCC)=O)c1C(F)(F)F</chem>
29	<chem>[O-][n+]1c2cc(F)c(F)cc2[n+](O)c(C(OC)=O)c1C(F)(F)F</chem>
30	<chem>[O-][n+]1c2cc(Cl)c(Cl)cc2[n+](O)c(C(C)C)=O)c1C(F)(F)F</chem>
31	<chem>[O-][n+]1c2cc(F)c(F)cc2[n+](O)c(C(C)=O)c1C(F)(F)F</chem>
32	<chem>[O-][n+]1c2cc(F)c(F)cc2[n+](O)c(C(C)=O)c1C</chem>
33	<chem>[O-][n+]1c2[c-]cccc2[n+](O)c(C(F)(F)F)c1C(N3CCN(c4ccccc4)CC3)=O</chem>
34	<chem>[O-][n+]1[c+]2cc(F)c(F)cc2[n+](O)c(C(F)(F)F)c1C(C3=CC=CO3)=O</chem>
35	<chem>[O-][n+]1c2cc(Br)ccc2[n+](O)c3ccc(N)cc31</chem>
36a	<chem>[O-][n+]1c2cc(Br)ccc2[n+](O)c3ccc(O)cc31</chem>
36b	<chem>Oc1cc2nc3ccccc3nc2cc1.CBr</chem>

37	[O-][n+]1c2cc(F)ccc2[n+](O)c3ccc(N)cc31
38	[O-][n+]1c2cccc2[n+](O)c3ccc(O)cc31
39	[O-][n+]1c2cccc2[n+](O)c3ccc(N)cc31
40a	[O-][n+]1c2cc(Cl)c(Cl)cc2[n+](O)c3ccc(O)cc31
40b	Clc1cc2nc3cc(O)ccc3nc2cc1Cl
41	[O-][N+]1=C(S(=O)(c2cccc2)=O)C(OCCNC(C3(C)CCc4c(C)c(O)c(C)c(C)c4O3)=O)=NO1
42	[O-][N+]1=C(S(=O)(c2cccc2)=O)C(OCCNC(C3(C)CCc4c(C)c(OC(C)=O)c(C)c(C)c4O3)=O)=NO1
43	O=C(C1(C)CCc2c(C)c(OC(C)=O)c(C)c(C)c2O1)NCCOC3=NON=C3S(=O)(c4cccc4)=O
44	[O-][N+]1=C(C)C(C(NN=Cc2ccc(N(C)C)cc2)=O)=NO1
45	[O-][N+]1=C(C)C(C(NN=Cc2ccc(C(O)=O)cc2)=O)=NO1
46	O=C(NN=CC1=[N+](O)ON=C1c2cccc2)c3cc(OCO4)c4cc3
47	O=C(NN=CC1=[N+](O)ON=C1c2cccc2)C3=C(C)C=C4ccccn34
48	O=C(NN=CC1=NO[N+](O)=C1C)c2ccncc2
49	O=C(NN=CC1=[N+](O)ON=C1c2cccc2)c3ccncc3
50	[O-][N+]1=C(C)C(C(N/N=C/c2ccc(OC)c(OC)c2)=O)=NO1
51	[O-][N+]1=C(C)C(/C=C/C/c2cccc2O)=O)=NO1
52	O=C(c1cccc1O)/C=C/C2=[N+](O)ON=C2c3cccc3
53	O=C(c1cccc1O)/C=C/C2=[N+](O)ON=C2
54	O=C(c1cccc1O)/C=C/C2=NO[N+](O)=C2C
55	O=C(c1cccc1O)/C=C/C2=[N+](O)ON=C2c3cccc3
56	O=C(c1cc2cccc2cc1)/C=C/C3=NO[N+](O)=C3C
57	O=C(c1cc2cccc2cc1)/C=C/C3=[N+](O)ON=C3c4cccc4
58	[O-][N+]1=c2c(cccc2)=C(C#N)N1c3ccc(l)cc3
59	lc1ccc(N2N=c3c(cccc3)=C2C#N)cc1
60	[O-][N+]1=c2c(cccc2)=C(C#N)N1c3ccc([N+](O)=O)cc3
61	N#CC1=c2cccc2=NN1c3ccc([N+](O)=O)cc3
62	Cc1nnc[n+](O)c1C
63	Cc1nnc[n+](O)c1/C=C/c2ccc(OC)cc2
64	Cc1nnc[n+](O)c1/C=C/c2ccc(N(C)C)cc2
65	[O-][n+]1cnnc1/C=C/c2cccc2
66	[O-][n+]1cnnc1/C=C/C2=CC=C([N+](O)=O)S2
67	[O-][n+]1cnnc1/C=C/c2ccc(N(C)C)cc2
68	O=C(O)c1ccc(Cl)[n+](O)c1
69	O=C(O)c1ccc[n+](O)c1
70	O=C(O)c1ccnc1
71	O=C(OCC)C1=C(C)N(CCc2cccc2)C(N1)=O
72	O=C(OCC)C1=C(C)N(COC)C(N1)=O
73	CC1=C(C)N(CCc2cccc2)C(C)=[N+]1[O-]
74	Nc1c([N+](O)=O)cc(/C=C/c2cccc2)cc1
75	Nc1ccc(/C=C/c2ccc(OCO3)c3c2)cc1[N+](O)=O
76	Nc1c([N+](O)=O)ccc(/C=C/c2ccc(OCO3)c3c2)c1

77	<chem>Nc1cc(/C=C/c2ccccc2)ccc1[N+](O-)=O</chem>
78	<chem>ON=c1cc(/C=C/c2ccccc2)ccc1=NO</chem>
79	<chem>Clc1cccc(/C=C/c(ccc2=NO)cc2=NO)c1</chem>
80	<chem>ON=c1cc(/C=C\c2cc3c(OCO3)cc2)ccc1=NO</chem>
81	<chem>Clc1ccc(/C=C\c(ccc2=NO)cc2=NO)cc1</chem>

Tabla II. Códigos SMILE de los compuestos utilizados para estudios teóricos.

En la tabla III se detallan los parámetros estructurales para los 83 compuestos estudiados, obtenidos de la reducción de dimensiones en Tsar®. También en dicha tabla se muestra la categorización de la bioactividad de 1 ó 0 para los compuestos si son mutagénicos o no mutagénicos respectivamente para las dos condiciones de ensayo.

Molécula	a*	b*	c*	d*	Categorización de mutagénesis sin activación metabólica	Categorización de mutagénesis con activación metabólica
1	0,116026	0,303136	0,832494	0,374784	1	1
2	0,354078	0,179303	0,888789	0,124916	1	0
3	0,994108	0,988795	0,911342	0,747517	1	1
4	0,990322	0,843561	0,749209	0,982142	1	1
5	0,713722	0,68741	0,990199	0,98235	0	1
6	0,220024	0,939968	0,214551	0,959146	1	0
7	0,987939	0,986278	0,930329	0,721473	1	1
8	0,269299	0,976479	0,258877	0,967698	1	1
9	0,865216	0,939091	0,934865	0,962337	0	1
10	0,562696	0,277329	0,56135	0,781745	1	1
11	0,992678	0,993286	0,707138	0,744486	1	1
12	0,883159	0,073965	0,979955	0,817686	0	0
13	0,220024	0,939968	0,214551	0,959146	1	0
14	0,39422	0,863382	0,161152	0,209032	0	0
15	0,19611	0,754658	0,263957	0,716012	0	1
16	0,110179	0,433561	0,846587	0,983365	0	1
17	0,656415	0,997703	0,994477	0,72381	0	1
18	0,19611	0,754658	0,263957	0,716012	0	0
19	0,880938	0,28097	0,957929	0,779132	1	1
20	0,656415	0,997703	0,994477	0,72381	1	1
21	0,110179	0,433561	0,846587	0,983365	0	1
22	0,932753	0,779165	0,991225	0,992934	1	1
23	0,817851	0,158473	0,194561	0,8883	1	1
24	0,986198	0,724857	0,964382	0,936011	1	1
25	0,932753	0,779165	0,991225	0,992934	1	0
26	0,956634	0,881563	0,975608	0,965967	0	0
27	0,858668	0,955991	0,989097	0,951531	0	1
28	4,00E-06	0,000254	3,7e-005	4,00E-05	0	0
29	0,889293	0,735181	0,826707	0,865074	0	1
30	0,604024	0,993332	0,999811	0,456375	1	1

31	0,86476	0,848393	0,950402	0,762992	0	1
32	0,564	0,030813	0,764557	0,757855	1	1
33	0,024027	0,826154	0,027813	0,042415	1	ND
34	1,4e-005	2,00E-05	2,2e-005	0,000223	0	1
35	0,176497	0,938498	0,347131	0,749029	1	0
36a	0,144509	0,641133	0,274725	0,986024	1	0
36b	0,534267	0,79998	0,939824	0,139531	1	0
37	0,481969	0,318325	0,965132	0,130745	0	0
38	0,904079	0,98261	0,038181	0,044215	1	0
39	0,809402	0,910426	0,044677	0,852853	1	1
40a	0,508453	0,993988	0,782866	0,981403	1	0
40b	0,744176	0,977663	0,800114	0,995187	0	0
41	0,051207	0,819396	0,029092	0,034399	0	
42	0,905613	0,202452	0,003928	0,004746	0	0
43	0,044809	0,013817	0,86918	0,007211	1	0
44	0,996178	0,883272	0,831591	0,626052	0	0
45	0,99321	0,931491	0,919753	0,739709	0	0
46	0,001832	0,075887	0,00043	0,945726	0	0
47	0,080739	0,057457	0,743943	0,020351	0	0
48	0,745291	0,468837	0,053802	0,979113	0	0
49	0,367389	0,579758	0,994016	0,105774	0	0
50	0,809131	0,921936	0,9966	0,995056	0	1
51	0,0864	0,787768	0,142698	0,84688	0	0
52	0,08059	0,578094	0,940098	0,919926	0	0
53	0,967531	0,072251	0,067426	0,943419	0	0
54	0,181628	0,316575	0,358018	0,984465	0	0
55	0,231856	0,385621	0,942009	0,901342	0	0
56	0,969178	0,927874	0,957	0,725303	0	0
57	0,001845	0,001505	0,099091	0,828254	0	0
58	0,968719	0,962876	0,865192	0,991697	0	0
59	0,319623	0,924699	0,862951	0,208967	0	0
60	0,99438	0,995199	0,606605	0,978413	0	1
61	0,985653	0,661412	0,77034	0,977282	1	1
62	0,743779	0,41266	0,382802	0,968534	0	0
63	0,131612	0,939991	0,958204	0,127932	1	1
64	0,317887	0,455316	0,89702	0,241162	1	1
65	0,915477	0,919721	0,230082	0,143794	1	1
66	0,380896	0,018328	0,997051	0,97814	1	1
67	0,380896	0,018328	0,997051	0,97814	1	1
68	0,731701	0,59438	0,958522	0,541075	0	0
69	0,706359	0,62738	0,666306	0,701035	0	0

70	0,681692	0,357041	0,301056	0,997293	0	1
71	0,547824	0,865699	0,432421	0,788543	0	0
72	0,361877	0,395599	0,837403	0,223938	0	0
73	0,986838	0,133678	0,42837	0,085377	0	0
74	0,848235	0,12684	0,255952	0,922159	0	0
75	0,992866	0,976381	0,700845	0,798918	1	1
76	0,80239	0,985032	0,369575	0,992547	0	1
77	0,179347	0,858602	0,246406	0,846577	1	1
78	0,271584	0,428236	0,544346	0,661727	0	0
79	0,773934	0,991115	0,976945	0,688703	0	0
80	0,952932	0,506411	0,973691	0,069306	0	1
81	0,787682	0,974497	0,809618	0,9882	0	0

* Parámetros estructurales.

Tabla III. *Parámetros estructurales obtenidos de la reducción de dimensiones, y categorización de actividad mutagénica.*

En la tabla IV se observan las características de los modelos predictivos de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica generados.

Red	Configuración	Aleatoriedad	Iteraciones por ciclo	Ciclos mejores pasados	RMS	Nº moléculas del entrenamiento	Porcentaje de validación interna	Nº moléculas a predecir
1	4:7:1	no	3000	500	0,001	80	no	0
2	4:4:1	de b asc	3000	500	0,001	45	2	35
3	4:4:1	de b asc	3000	500	0,01	45	2	35
4	4:5:1	de b asc	3000	500	0,001	60	5	20
5	4:5:1	de b asc	3000	500	0,01	60	5	20
6	4:6:1	de b asc	3000	500	0,001	70	10	10
7	4:6:1	de b asc	3000	500	0,01	70	10	10
8	4:3:1	de b asc	3000	500	0,001	45	2	35
9	4:3:1	de b asc	3000	500	0,01	45	2	35
10	4:5:1	de b asc	3000	500	0,001	45	5	35
11	4:5:1	de b asc	3000	500	0,01	45	2	35
12	4:4:1	de b asc	3000	500	0,001	60	5	20
13	4:4:1	de b asc	3000	500	0,01	60	5	20
14	4:6:1	de b asc	3000	500	0,001	60	5	20
15	4:6:1	de b asc	3000	500	0,01	60	5	20
16	4:5:1	de b asc	3000	500	0,001	70	10	10
17	4:5:1	de b asc	3000	500	0,01	70	10	10
18	4:7:1	de b asc	3000	500	0,001	70	10	10
19	4:7:1	de b asc	3000	500	0,01	70	10	10
20	4:5:1	de b asc	4000	500	0,01	57	5	17

21	4:4:1	de c asc	4000	500	0,01	55	5	25
22	4:4:1	de b asc	4000	500	0,01	55	5	25
23	4:4:1	de d asc	4000	500	0,01	55	5	25
24	4:4:1	de a asc	4000	500	0,01	50	5	30
25	4:3:1	de a asc	4000	500	0,01	50	5	30
26	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	50	5	30
27	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	20
28	4:4:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	20
29	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	20
30	4:4:1	de c asc	4000	500	0,01	50	5	30
31	4:3:1	de c asc	4000	500	0,01	50	5	30
32	4:5:1	de c asc	4000	500	0,01	50	5	30
33	4:5:1	de c asc	4000	500	0,01	60	5	20
34	4:4:1	de c asc	4000	500	0,01	60	5	20
35	4:6:1	de c asc	4000	500	0,01	60	5	20
36	4:4:1	de d asc	4000	500	0,01	50	5	30
37	4:3:1	de d asc	4000	500	0,01	50	5	30
38	4:5:1	de d asc	4000	500	0,01	50	5	30
39	4:5:1	de d asc	4000	500	0,01	60	5	20
40	4:4:1	de d asc	4000	500	0,01	60	5	20
41	4:6:1	de d asc	4000	500	0,01	60	5	20
42	4:6:1	de c asc	3000	500	0,01	60	5	20
43	4:6:1	no	3000	500	0,001	77	no	0

Tabla IV. Modelos predictivos de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica, detallando los parámetros utilizados.

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes de predicción de los modelos generados para la condición de ausencia de activación metabólica.

Red	Incorrectos total	Correctos total	Incorrectos predicción	Correctos predicción	Porcentaje de Incorrectos predicción	Porcentaje de Incorrectos total
1*	3	77	-	-	-	3,75
2	20	60	18	17	51,43	25,00
3	18	62	17	18	48,57	22,50
4	9	71	6	14	30,00	11,25
5	6	74	6	14	30,00	7,50
6	8	72	5	5	50,00	10,00
7	8	72	7	3	70,00	10,00
8	22	58	20	15	57,14	27,50
9	22	58	22	13	62,86	27,50
10	22	58	22	13	62,86	27,50
11	6	74	5	15	25	7,5
12	13	67	6	14	30,00	16,25
13	16	64	8	12	40,00	20,00
14	32	48	8	12	40,00	40,00
15	10	70	9	11	45,00	12,50
16	21	59	6	4	60,00	26,25
17	11	69	7	3	70,00	13,75
18	9	71	6	4	60,00	11,25
19	7	71	6	4	60,00	8,75
20	39	35	8	9	47,06	52,70
21	14	66	9	16	36,00	17,50
22	14	66	11	14	44,00	17,50
23	12	68	9	16	36,00	15,00
24	17	63	13	17	43,33	21,25
25	23	57	18	12	60,00	28,75
26	19	61	15	15	50,00	23,75
27	17	63	12	8	60,00	21,25
28	14	66	11	9	55,00	17,50
29	12	68	10	10	50,00	15,00
30	14	66	12	18	40,00	17,50
31	15	65	10	20	33,33	18,75
32	14	66	14	16	46,67	17,50
33	13	67	11	9	55,00	16,25

34	16	64	11	9	55,00	20,00
35	6	74	5	15	25,00	7,50
36	19	61	16	14	53,33	23,75
37	20	60	14	16	46,67	25,00
38	16	64	14	16	46,67	20,00
39	9	71	8	12	40,00	11,25
40	18	62	9	11	45,00	22,50
41	11	71	8	12	40,00	13,75

*En este modelo no se predijo compuestos, simplemente se analizó con que acierto es el entrenamiento

Tabla V. Porcentajes de predicción de los modelos generados para la condición de ausencia de activación metabólica.

En la tabla VI se detalla el mejor modelo de predicción de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica. En negrita se encuentran los números de los compuestos utilizados para la generación del modelo.

Compuesto	Actividad experimental	Entrenamiento ^a	Predicción ^b	Error ^c
28	0	0,00510256	-0,111111	0,111111
46	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
42	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
33	1	0,990857	0,990857	0,00914317
38	1	0,999994	0,999994	6,00E-06
39	1	0,996542	0,996542	0,00345773
48	0	-0,10852	-0,10852	0,10852
53	0	0,011338	0,011338	-0,011338
57	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
51	0	0,999285	0,999285	-0,999285
14	0	0,011044	0,011044	-0,011044
23	1	0,965048	0,965048	0,0349522
6	1	0,999807	0,999807	0,00019288
13	1	0,999807	0,999807	0,00019288
65	1	0,999829	0,999829	0,00017107
77	1	0,996412	0,996412	0,0035879
74	0	-0,070737	-0,070737	0,070737
8	1	0,999765	0,999765	0,00023532

15	0	-0,0109689	-0,0109689	0,0109689
36	1	0,986886	0,986886	0,0131144
70	0	-0,072494	-0,072494	0,072494
35	1	0,98487	0,98487	0,0151303
54	0	-0,0426816	-0,0426816	0,0426816
76	0	0,0029561	0,0029561	-0,0029561
62	0	0,0158245	0,0158245	-0,0158245
73	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
71	0	-0,107634	-0,107634	0,107634
78	0	-0,111109	-0,111109	0,111109
10	1	0,999909	0,999909	9,10E-05
60	0	-0,107778	-0,107778	0,107778
69	0	-0,109944	-0,109944	0,109944
75	1	0,998559	0,998559	0,001441
11	1	0,999882	0,999882	0,00011832
47	0	-0,0126066	-0,0126066	0,0126066
4	1	0,941671	0,941671	0,0583288
32	1	1	1	0
61	1	0,943464	0,943464	0,0565355
81	0	-0,0128565	-0,0128565	0,0128565
29	0	0,0397535	0,0397535	-0,0397535
44	0	0,0247069	0,0247069	-0,0247069
1	1	0,999891	0,999891	0,0001089
72	0	0,0449129	0,0449129	-0,0449129
16	0	0,00417756	0,00417756	-0,00417756
21	0	0,00417756	0,00417756	-0,00417756
59	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
58	0	0,0183587	0,0183587	-0,0183587
43	1	0,999855	0,999855	0,00014478
2	1	0,945501	0,945501	0,0544987
64	1	0,995516	0,995516	0,00448447
3	1	0,999477	0,999477	0,00052273
45	0	-0,0149915	-0,0149915	0,0149915
7	1	0,964112	0,964112	0,0358876
9	0	-0,108703	-0,108703	0,108703

52	0	0,00403613	0,00403613	-0,00403613
55	0	0,00585834	0,00585834	-0,00585834
31	0	-0,0538835	-0,0538835	0,0538835
56	0	-0,108658	-0,108658	0,108658
34	0		-0,111111	0,111111
41	0		0,97729	-0,97729
18	0		-0,0109689	0,0109689
19	1		0,999997	3,00E-06
63	1		-0,111111	0,111111
68	0		0,131456	-0,131456
24	1		0,999979	0,00002
37	0		-0,0895562	0,0895562
80	0		-0,111096	0,111096
26	0		-0,0494026	0,0494026
79	0		-0,111111	0,111111
12	0		0,999998	-0,999998
27	0		-0,110988	0,110988
5	0		0,174331	-0,174331
22	1		0,999659	0,000341
25	1		0,999659	0,000341
49	0		-0,109628	0,109628
17	0		-0,111111	0,111111
20	1		-0,111111	1,111111
50	0		-0,106622	0,106622
66	1		0,999977	2,00E-05
67	1		0,999977	2,00E-05
30	1		-0,111111	1,111111

^a Valor con el que el programa aprende la actividad en el entrenamiento del modelo (lo presentan los compuestos utilizados para la generación del modelo), ^b Valor con el cual el modelo predice la actividad mutagénica, ^c Error de predicción, es la diferencia entre la actividad experimental y la predicción, en color rojo se muestran aquellos errores superiores a 0,5.

Tabla VI. Modelo de predicción de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica.

En la tabla VII se observan las características de los modelos predictivos de actividad mutagénica en presencia de activación metabólica generados.

Red	Configuración	Aleatoriedad	Iteraciones por ciclo	Ciclos mejores pasados	RMS	Nº moléculas entrenamiento	Porcentaje de validación interna	Nº moléculas predicción
1	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	16
2	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	16
3	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	16
4	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	76	0	0
5	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	16
6	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	16
7	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	16
8	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	16
9	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	16
10	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	16
11	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	16
12	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	16
13	4:6:1	de a asc	4000	500	0,01	60	5	16
14	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
15	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
16	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
17	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
18	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
19	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
20	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
21	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
22	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
23	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
24	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
25	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
26	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
27	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
28	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
29	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21
30	4:5:1	de a asc	4000	500	0,01	55	6	21

Tabla VII. Modelos predictivos de actividad mutagénica en presencia de activación metabólica, detallando los parámetros utilizados.

En la tabla VIII se muestran los porcentajes de predicción de los modelos generados.

Red	Incorrectos total	Correctos total	Incorrectos predicción	Correctos predicción	Porcentaje de Incorrectos predicción	Porcentaje de Incorrectos total
1	14	62	10	6	62,50	18,42
2	14	62	6	10	37,50	18,42
3	21	55	6	10	37,50	27,63
4	16	60		0		21,05
5	21	55	8	8	50,00	27,63
6	11	65	6	10	37,50	14,47
7	16	60	8	8	50,00	21,05
8	21	55	5	11	31,25	27,63
9	9	67	6	10	37,50	11,84
10	26	50	7	9	43,75	34,21
11	28	48	8	8	50,00	36,84
12	16	60	10	6	62,50	21,05
13	14	62	6	10	37,50	18,42
14	18	58	10	11	47,62	23,68
15	18	58	12	9	57,14	23,68
16	19	57	11	10	52,38	25,00
17	22	54	12	9	57,14	28,95
18	12	64	8	13	38,10	15,79
19	20	56	11	10	52,38	26,32
20	19	57	12	9	57,14	25,00
21	21	55	11	10	52,38	27,63
22	21	55	9	12	42,86	27,63
23	17	59	15	6	71,43	22,37
24	16	60	10	11	47,62	21,05
25	15	61	10	11	47,62	19,74
26	19	57	11	10	52,38	25,00
27	16	60	12	9	57,14	21,05
28	15	61	10	11	47,62	19,74
29	15	61	8	13	38,10	19,74
30	11	65	10	11	47,62	14,47

Tabla VIII. Porcentajes de predicción de los modelos generados para la condición de presencia de activación metabólica.

En la tabla IX se detalla el modelo generado para la condición de presencia de activación metabólica.

Compuesto	Actividad experimental	Entrenamiento ^a	Predicción ^b	Error ^c
34	1	0,999038	0,999038	0,0009619
46	0	-0,111107	-0,111107	0,111107
57	0	0,0127546	0,0127546	-0,0127546
43	0	-0,0960549	-0,0960549	0,0960549
52	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
47	0	-0,0275297	-0,0275297	0,0275297
51	0	-0,0595559	-0,0595559	0,0595559
16	1	-0,111054	-0,111054	1,111054
21	1	-0,111054	-0,111054	1,111054
1	1	-0,109895	-0,109895	1,109895
63	1	-0,111111	-0,111111	1,111111
77	1	0,998578	0,998578	0,00142181
54	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
15	1	0,498277	0,498277	0,501723
18	0	0,498277	0,498277	-0,498277
6	0	-0,0076599	-0,0076599	0,0076599
13	0	-0,0076599	-0,0076599	0,0076599
55	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
8	1	-0,111111	-0,111111	1,111111
78	0	-0,0155256	-0,0155256	0,0155256
64	1	-0,111111	-0,111111	1,111111
59	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
2	0	0,025962	0,025962	-0,025962
72	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
49	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
66	1	0,979606	0,979606	0,020394
67	1	0,979606	0,979606	0,020394
14	0	-0,0979652	-0,0979652	0,0979652
37	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
40a	0	0,999995	0,999995	-0,999995
71	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
10	1	-0,111111	-0,111111	1,111111
32	1	-0,111111	-0,111111	1,111111

30	1	1	1	0,000000
17	1	1	1	0
20	1	1	1	0
70	1	-0,111111	-0,111111	1,111110
69	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
5	1	1	1	3,58E-02
68	0	-0,111068	-0,111068	0,111068
62	0	-0,111019	-0,111019	0,111019
48	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
79	0	1	1	-1
81	0	0,0815454	0,0815454	-0,0815454
76	1	0,931099	0,931099	0,0689009
50	1	0,984538	0,984538	0,0154615
23	1	-0,111111	-0,111111	1,11111
74	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
27	1	0,953915	0,953915	0,0460852
31	1	0,998641	0,998641	0,00135922
9	1	0,982631	0,982631	0,0173694
19	1	-0,110357	-0,110357	1,11111
12	0	-0,110455	-0,110455	0,110455
29	1	1	1	0
38	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
42	0	-0,111111	-0,111111	0,111111
65	1	-0,111111	-0,111111	1,11111
22	1	1	1	0
25	0	1	1	-1
80	1	0,217522	0,217522	0,782478
26	0		1	-1
53	0		-0,111111	0,111111
58	0		0,999997	-0,999997
56	0		0,996086	-0,996086
61	1		1	0
24	1		1	0
73	0		-0,111111	0,111111
7	1		0,899221	0,100779
4	1		1	0
11	1		0,953021	0,0469788
75	1		0,990277	0,00972325

45	0		0,999021	-0,999021
3	1		0,926721	0,073279
60	1		0,999831	0,000169098
44	0		0,999108	-0,999108
28	0		-0,111111	0,111111

^a Valor con el que el programa aprende la actividad en el entrenamiento del modelo (lo presentan los compuestos utilizados para la generación del modelo), ^b Valor con el cual el modelo predice la actividad mutagénica, ^c Error de predicción, es la diferencia entre la actividad experimental y la predicción, en color rojo se muestran aquellos errores superiores a 0,5.

Tabla IX. Modelo de predicción de actividad mutagénica en presencia de activación metabólica.

En la tabla X se muestran los datos de reducción de dimensiones y predicción de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica de los compuestos utilizados para validar el modelo.

Compuesto	a	b	c	d	Actividad experimental	Predicción
36b	0,534267	0,79998	0,939824	0,139531	1	-0,11106
40a	0,508453	0,993988	0,782866	0,981403	1	0,997171
40b	0,744176	0,977663	0,800114	0,995187	0	0,129214

Tabla X. *Parámetros estructurales y predicción de actividad mutagénica en ausencia de activación metabólica.*

En la tabla XI se muestran los datos de reducción de dimensiones y predicción de actividad mutagénica en presencia de activación metabólica de los compuestos utilizados para validar el modelo.

Compuesto	a	b	c	d	Actividad experimental	Predicción
35	0,176497	0,938498	0,347131	0,749029	0	0,998437
36a	0,144509	0,641133	0,274725	0,986024	0	0,193917
36b	0,534267	0,79998	0,939824	0,139531	0	-0,111111
39	0,809402	0,910426	0,044677	0,852853	1	-0,108314
40b	0,744176	0,977663	0,800114	0,995187	0	0,0334322

Tabla XI. *Datos de reducción de dimensiones y predicción del modelo de actividad mutagénica en presencia de activación metabólica.*