



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

ESTUDIO COMPUTACIONAL EN EL DESARROLLO DE
UN LIGANDO INHIBIDOR DE *Giardia intestinalis* DE
TIPO N-[4-(4'-SUSTITUIDO)-5-SUSTITUIDO-2-
TIAZOLIL]AMIDA

TESIS

PRESENTADA POR

Q. CAROLINA STEPHANÍA CASTRO SEGURA

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

**ESTUDIO COMPUTACIONAL EN EL DESARROLLO DE
UN LIGANDO INHIBIDOR DE *Giardia intestinalis* DE
TIPO N-[4-(4'-SUSTITUIDO)-5-SUSTITUIDO-2-
TIAZOLIL]AMIDA**

TESIS

PRESENTADA POR

Q. CAROLINA STEPHANÍA CASTRO SEGURA

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019



Mérida, Yuc., 29 de agosto de 2019
Oficio Num.: PICQB/207/2019

Asunto: Autorización de digitalización

La tesis "Estudio computacional en el desarrollo de un ligando inhibidor de *Giardia intestinalis* de tipo N-[4-(4'-sustituido)-5-sustituido-2-tiazolil]amida" presentada por Carolina Stephanía Castro Segura, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestra en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la digitalización de los ejemplares correspondientes.

Directores de la tesis


Dr. Rolando D. Cáceres Castillo


Dr. Ramiro F. Quijano Quiñones

Sinodales

Dr. Sergio Rodríguez Morales

Dr. Gonzalo J. Mena Rejón

Dr. Gabriel Murrieta Hernández

Firmas



ATENTAMENTE
"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"


DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS



c.c. Archivo
MRSC

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS
Y BIOQUÍMICAS

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores Dr. Ramiro Felipe Quijano Quiñones y Dr. Rolando David Cáceres Castillo, les agradezco su guía así como las experiencias compartidas a lo largo de mis estudios de Maestría.

Al sínodo conformado por Dr. Gonzalo Joaquín Mena Rejón, Dr. Sergio Rodríguez Morales, al Dr. Gabriel Murrieta Hernández y al Dr. Rubén Marrero Carballo por sus recomendaciones, observaciones y consejos para la mejora del trabajo de tesis.

Al QFB. Jesús Aguilera González por compartir sus conocimientos sin los cuales no habría podido desarrollar algunas partes de ésta tesis. Agradezco su compañerismo y paciencia para conmigo.

Al Br. Jareth Guadarrama, la Br. Ángeles Gamboa y el Br. Mario López por su colaboración en la realización de éste proyecto, se que llegarán a ser excelentes Químicos en el futuro.

Al IBQ. Vicente López, la Q. Jessica Carrillo, al Q Mario Noh, al QFB Marco Palacios, al QFB Carlos Pech y al QFB Adrián López, gracias por su compañerismo, sus consejos y su buen humor que hicieron memorables las largas jornadas de trabajo en el laboratorio.

A la M. en C. Dianela Lara Nah, la Q. Wendy Manzanarez y la Q. Jessica Torres por su paciencia y consejos acertados que me han impulsado a dar lo mejor y nunca rendirme. Su amistad vale mucho para mí.

A mis padres y hermanos, sin cuyo apoyo no me habría animado a recorrer este camino. Gracias por confiar en mi, su amor me ha sostenido en todo momento.

A mi abuelita, quien me ha enseñado a luchar por lo que quieres y ser fuerte ante la adversidad, gracias por creer en mí más de lo que yo misma creo.

Gracias a Dios, porque todo viene de él y va a él, tal como diría Santa Teresa: *Quien a Dios tiene nada le falta, solo Dios basta.*

Este trabajo de Tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Química teórica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán bajo la dirección del Dr. Ramiro Felipe Quijano Quiñones como parte del proyecto “Estudio de la interacción de derivados tiazólicos con la β -tubulina de *Giardia intestinalis*”, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), clave 256657 y en las instalaciones del Laboratorio de Química Farmacéutica, de la misma Facultad, bajo la dirección del Dr. Rolando David Cáceres Castillo, formando parte del proyecto “Desarrollo de inhibidores selectivos de *Giardia intestinalis*. Ensayos preclínicos de derivados de *N*-(4-metilfenil-5-aril-2-tiazolil)-acetamidas” financiado por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social, clave CONACYT 290398. De igual manera se contó con el apoyo de una beca por parte del CONACYT con número 632868 para los estudios de posgrado.

RESUMEN

Recientemente la giardiasis se ha posicionado como una enfermedad reemergente en países como Inglaterra, Estados Unidos, Noruega, Nueva Zelanda entre otros y en México es una de las enfermedades con mayor morbilidad, es por ello que la búsqueda de nuevos agentes anti-giardíacos cada día es más importante. El grupo de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la UADY ha trabajado en la síntesis de moléculas con actividad anti-giardíaca y recientemente reportó 50 compuestos de tipo tiazólico, de los cuales, dos de tipo *N*-(4-aryl-5-bromo-2-tiazolil)-acetamida resultaron activos y altamente selectivos contra *Giardia intestinalis*, sobre este grupo de análogos se realizó un estudio QSAR-2D donde se encontró que las contribuciones a la actividad anti-giardíaca de dichos derivados tiazólicos están directamente relacionadas con la distribución tridimensional de los átomos, por lo cual en respuesta a dichas conclusiones en este trabajo se analizaron a través de un estudio computacional de QSAR-3D las características electrostáticas y estéricas de los derivados tiazólicos para desarrollar y obtener nuevos análogos con potencial anti-giardíaco y selectivos contra *Giardia intestinalis*.

Inicialmente se calcularon y validaron un total de 30 modelos QSAR-3D utilizando 10 grupos de alineado y tres grupos de validación externa, de estos modelos se escogió aquel con los mejores parámetros estadísticos: $R^2=0.83$, $R_{ext}^2=0.85$, $R^2-R_{ext}^2=-0.02$, $SDEP_{int}=0.36$, $F=23$, $Q_{loo}^2=0.60$ y $Q_{ai}^2=0.32$, los cuales señalan la significancia del modelo así como el poder predictivo del mismo; partiendo de este modelo se graficaron los mapas de contornos cuyas contribuciones estéricas indican que la posición dos del anillo tiazólico está fuertemente influenciada por grupos voluminosos con un volumen similar al de un grupo benzamida, por otro lado las contribuciones electrostáticas señalan que grupos ricos en electrones en posición cinco son necesarios para mejorar la actividad anti-giardíaca.

Partiendo de los resultados de los mapas de contornos se propusieron un total de 10 nuevos análogos, las predicciones de actividad anti-giardíaca teórica llevadas a cabo sobre éstos a partir del modelo QSAR-3D señalaron a los derivados *N*-[5-bromo-4-(4'-metilfenil)-tiazol-2-il]propanamida (**11a**), *N*-[5-bromo-4-(4'-clorofenil)-tiazol-2-il]propanamida (**11b**) y *N*-[5-bromo-4-(4'-metilfenil)-tiazol-2-il]trimetilacetamida (**13a**) como candidatos con potencial anti-giardíaco.

ABSTRACT

Giardiasis is considered a re-emerging infectious disease in countries like England, the United States, Norway and New Zealand. Cases of resistance have been reported and about it all giardiasis is in Mexico one of the principal morbidity causes; for that reasons the development of new anti-giardiasis drugs is very important. Research groups have been working in the synthesis of new anti-giardiasis molecules and recently they created 50 new compounds with thiazolyl ring, two of those presented anti-giardiasis activity and good selectivity indexes, as part of that investigation they developed a QSAR-2D analysis, the main conclusion from this study was that the tridimensional distribution of the atoms is the mayor contribution to the anti-giardiasis activity. As a result of the efforts for the development of thiazolyl anti-giardiasis drugs in this thesis we created a QSAR-3D model for the analysis of the electrostatic and steric contributions from the compounds, with the propose of synthesize new anti-giardiasis drugs with high selectivity againts *Giardia intestinalis*.

Firstly 30 QSAR-3D models were calculated and validated using 10 alignment groups and three external validation groups, the selection of the best model was decided using statistical parameters, for this purpose the best model have: $R^2=0.83$, $R_{ext}^2=0.85$, $R^2-R_{ext}^2=-0.02$, $SDEP_{int}=0.36$, $F=23$, $Q_{loo}^2=0.60$ y $Q_{al}^2=0.32$, this results shows that the model is statistically significant and have a good predictivity power; in the same matter it was posible to visualize the more important contributions using contour maps, this maps reveal that is necessary to add electronically-rich groups to the position number five of the thiazolyl ring and bulky groups with no more than fourth bonds in the position two.

Using the contour maps was posible to modify the chemical structures and propose new molecules, furthermore, the 3D-QSAR was used to calculate the activity of 10 hypothetical molecules and the results shows that the *N*-[5-bromo-4-(4'-methylphenyl)-thiazol-2-yl]propanamide, *N*-[5-bromo-4-(4'-chlorophenyl)-thiazol-2-yl]propanamide y *N*-[5-bromo-4-(4'-methylphenyl)-thiazol-2-yl]trimethylacetamide presents the higher theoretical anti-giardiasis activity.

ÍNDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Giardiasis	3
Tratamientos contra la giardiasis	4
Búsqueda de nuevos agentes anti giardiásicos	7
HIPÓTESIS	13
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVOS	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Códigos y equipo de cómputo empleado	19
Generación del Modelo QSAR-3D	19
<i>Preparación de los modelos moleculares iniciales</i>	20
<i>Análisis conformacional y alineado molecular</i>	21
<i>Selección de grupos de prueba y validación</i>	24
<i>Cálculo de los campos estéricos y electrostáticos</i>	24
<i>Tratamiento de variables y regresión lineal</i>	25
<i>Eliminación de moléculas con comportamiento atípico</i>	26
<i>Generación de los mapas de coeficientes</i>	26
Predicción del CI_{50} teórico para los nuevos análogos	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Calibración de los códigos	29

Búsqueda de conformeros bioactivos	30
Alineado molecular	30
<i>Alineado sobre la molécula más activa (Bioactividad)</i>	31
<i>Alineado basado en la diversidad de los farmacóforos</i>	32
<i>Alineado basado en múltiples conformeros</i>	37
Selección de grupos de validación	38
Modelos QSAR-3D obtenidos	40
Detección de moléculas atípicas	45
Análisis del mejor modelo QSAR-3D generado	49
Mapas de coeficientes del modelo QSAR-3D	53
Propuesta de nuevos análogos y predicción	57
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

INTRODUCCIÓN

La giardiasis es una enfermedad que afecta a personas de todo el mundo, especialmente a aquellas que viven en países en vías de desarrollo. Esta enfermedad es asintomática en la mayoría de los adultos, pero en niños presenta una gran variedad de síntomas como dolor abdominal, diarrea, anemia y pérdida de peso; de igual forma la giardiasis pertenece al grupo de enfermedades infecciosas intestinales, las cuales ocupan el segundo lugar a nivel nacional en cuanto a la proporción de personas enfermas y son la segunda causa de muerte en menores de 5 años dentro del estado de Yucatán, estos índices son alarmantes y a pesar de que en la actualidad se cuenta con fármacos para el tratamiento de esta parasitosis, como el metronidazol y la nitazoxanida, éstos presentan efectos secundarios y se han reportado casos de resistencia en varias cepas de *Giardia intestinalis*.

En años recientes algunos grupos de investigación se han centrado en la búsqueda de moléculas con potencial anti-giardiasis, a partir de diversas aproximaciones se han encontrado compuestos heterocíclicos como el auranofin y la fumagilina los cuales actualmente forman parte de ensayos clínicos y preclínicos para el tratamiento de la giardiasis. Los tiazoles son un grupo privilegiado de heterociclos que presentan actividad sobre varios tipos de parásitos, recientemente se reportó la síntesis de 50 compuestos de tipo tiazólico de los cuales dos compuestos de tipo *N*-(4-aril-5-bromo-2-tiazolil)-acetamida fueron activos y altamente selectivos contra *Giardia intestinalis*, por lo cual se les realizó un estudio QSAR-2D encontrándose que la estructura tridimensional de estas moléculas tiene un efecto significativo en la actividad anti-giardiasis.

Tomando en consideración lo anterior y con el objetivo de colaborar en el desarrollo de nuevos agentes anti-giardiasis, en esta investigación se propone estudiar los 50 compuestos de tipo 2-amino-4-aril-1,3-tiazólico previamente reportados mediante la técnica computacional de QSAR-3D y proponer un conjunto de análogos tiazólicos con probabilidades de ser activos contra *Giardia intestinalis*.

ANTECEDENTES

Giardiasis

La giardiasis es una enfermedad parasitaria de distribución geográfica cosmopolita causada por *Giardia intestinalis*, esta enfermedad se presenta de forma asintomática en adultos y sintomática en niños. *Giardia intestinalis* se considera el parásito más común del tracto digestivo en humanos, este parásito se puede encontrar de dos formas, como quiste o como trofozoito. La transmisión de *Giardia* en humanos ocurre a través de la ingesta de quistes presentes en agua contaminada con heces fecales, la contaminación del agua potable es debida sobre todo a la resistencia de los quistes a la cloración y a su habilidad para sobrevivir en agua helada por semanas. Otra forma de transmisión es a través de la comida o por contacto directo con heces fecales como en el caso de las guarderías.^{1,2}

El trofozoito es la forma activa de *Giardia intestinalis* y el causante de los síntomas de la enfermedad.³ La mayoría de los pacientes enfermos con giardiasis son asintomáticos, sin embargo los síntomas clínicos típicos se presentan de una a tres semanas después de haber ingerido los quistes e incluyen flatulencias, diarrea, dolor abdominal, pérdida de peso, anorexia entre otros. En la etapa aguda del padecimiento es común encontrar evacuaciones diarreicas explosivas con la característica de que son expelidas sin dolor cólico.⁴ Información reciente indica que la giardiasis puede generar post infecciones gastrointestinales crónicas, síndrome del colon irritable e incluso síndrome de fatiga crónica. Una investigación llevada a cabo en Noruega mostró que un grupo de pacientes presentó estos síntomas 10 años después de haber sufrido giardiasis aguda, lo cual indica el gran impacto de esta parasitosis incluso en zonas donde no es endémica.^{5,6}

En 2004 la giardiasis se incluyó como enfermedad desatendida, dentro de las iniciativas de la OMS, no solo por su sintomatología sino también por su prevalencia en los países en vías de desarrollo donde afecta a un 20-30% de la población. Actualmente la giardiasis ya no se encuentra en la lista de enfermedades tropicales desatendidas, sin embargo en años recientes se han reportado nuevos casos de ésta parasitosis en zonas donde se creía erradicada e incluso en países de primer mundo como Estados Unidos, Nueva Zelanda, Noruega, Alemania e Inglaterra catalogándola como una enfermedad re-emergente.⁷

Aproximadamente el 2% de los adultos y entre un 6-8% de los niños a nivel mundial se encuentran parasitados por *Giardia intestinalis*;² en México se calcula que un 10-50% de la población infectada con este parásito no presenta síntomas, por tanto aproximadamente nueve millones de mexicanos tienen giardiasis, encontrándose

principalmente en infantes preescolares y escolares.⁸⁻¹⁰ De acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en 2018 se reportó una media nacional de 375 nuevos casos de giardiasis en el país, registrándose en Yucatán 614 casos en el mismo año, 1.6 veces sobre la media, ocupando el sexto lugar entre los estados con mayor incidencia, el primer lugar lo ocupó Sinaloa con 2 016 casos nuevos de giardiasis.¹¹

Por otro lado, las enfermedades infecciosas intestinales, dentro de las cuales se encuentra la giardiasis, ocupan el segundo lugar en la proporción de personas enfermas en el país y también se ubican como la quinta causa de mortalidad infantil, falleciendo por este tipo de enfermedad seis de cada 100 niños menores a 5 años.^{12,13} De igual manera esta parasitosis intestinal se clasifica dentro de las enfermedades diarreicas agudas (EDA) y en los meses de febrero, julio, agosto y diciembre del 2016, así como a lo largo del 2017, el estado de Yucatán se ubicó en el primer lugar como el estado con mayor incidencia de EDA en menores de 5 años, en estos meses la aparición de nuevos casos de enfermedades diarreicas agudas en Yucatán ha fluctuado de dos hasta seis por cada 1000 niños menores de 5 años.^{14,15}

La giardiasis es por tanto una problemática prevalente en muchos países, la cual hoy en día se combate con una gran diversidad de fármacos, sin embargo estos fármacos llevan más de 10 años en el mercado y la gran mayoría generan efectos secundarios en el consumidor.² Por otro lado estudios recientes demuestran que las cepas de *Giardia intestinalis* están comenzando a generar resistencia contra los anti giardiáticos conocidos.⁴

Tratamientos contra la giardiasis

Los fármacos con los que se cuenta para el tratamiento de la giardiasis en la actualidad son: acridinas (quinacrina), aminoglicósidos (paromomicina), el complejo bacitracina-zinc, los 5-nitroimidazoles (metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol), 5-nitrofuranos (furazolidona), benzimidazoles (albendazol, mebendazol), y 5-nitrotiazoles (nitazoxanida) (**Figura 1**).¹⁶

Dentro de las acridinas el anti giardiático más conocido es la quinacrina, éste fármaco comenzó a utilizarse como agente antimalárico en 1930 durante la segunda guerra mundial, tiempo después se convirtió en un agente importante contra la giardiasis presentando una eficacia del 90%, sin embargo ocasiona vómitos, tiene mal sabor y en un 4-5% de quienes la consumen genera coloración amarilla/naranja en la piel, debido a estos efectos secundarios muchos médicos han dejado de utilizarla sobre todo en niños.² El modo de acción de la quinacrina no se conoce a fondo, sin embargo se sabe que se intercala con facilidad en el ADN de *Giardia Intestinalis*, y se cree que esta interacción ocasiona la inhibición en la síntesis de ácidos nucleicos.²

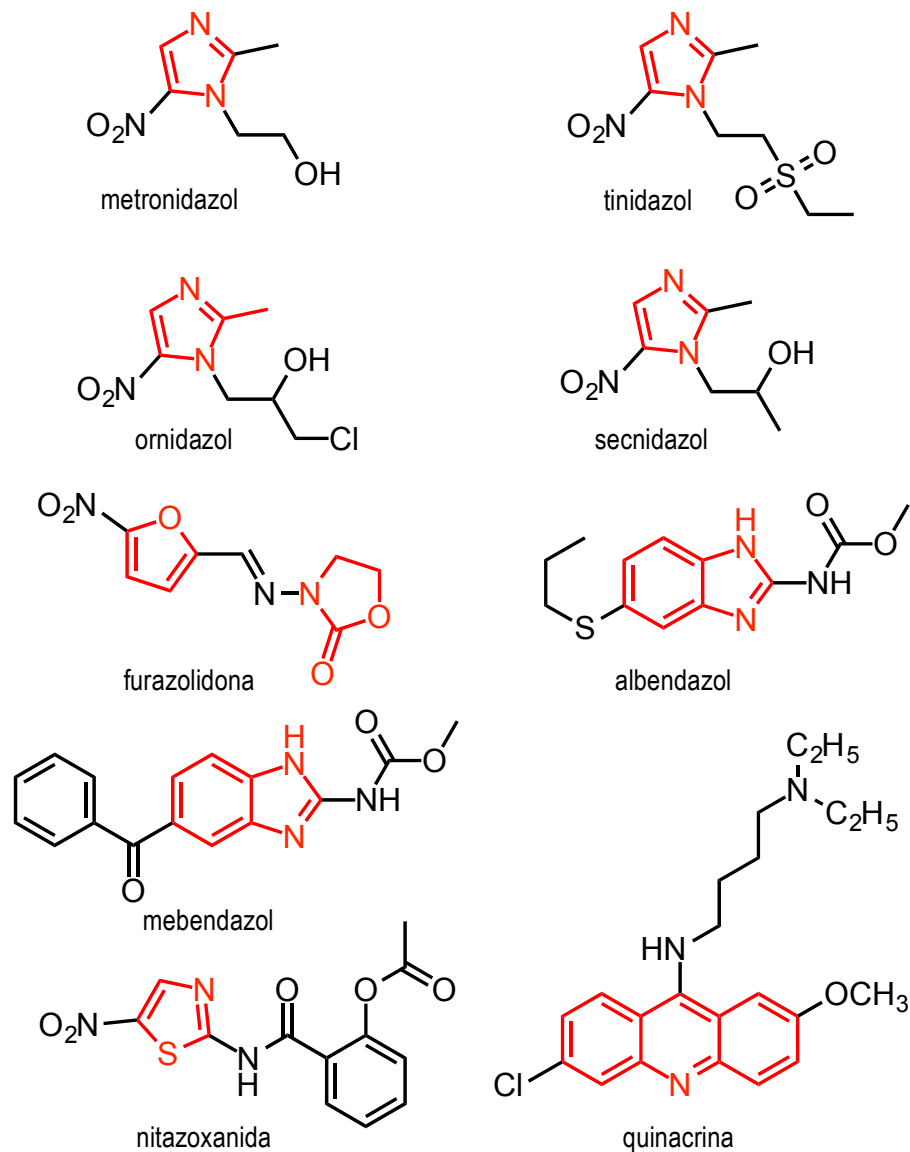


Figura 1. Algunos de los fármacos aprobados por la FDA (E.E.U.U.) para el tratamiento de la giardiasis.

Por otro lado la paramomicina es un aminoglicósido, fue aislado por primera vez en 1956 y ha demostrado ser poco eficaz (60%) contra *Giardia intestinalis*, sin embargo se receta a mujeres embarazadas ya que no se metaboliza completamente. Este fármaco inhibe la síntesis de proteínas de *Giardia Intestinalis* al interferir con las subunidades ribosomales 50S y 30S, causando una lectura inadecuada de los codones del ARNm. A diferencia de la paramomicina el complejo bacitracina-zinc, aislado en 1945 de una cepa de *Bacillus*, tiene una eficacia del 95% y se requiere un tratamiento de 10 días para observar sus efectos, se ha encontrado que genera toxicidad en los riñones y malestares gastrointestinales.²⁻⁴

Entre los fármacos anti-giardíacos más populares se encuentran los 5-nitroimidazoles, descubiertos en 1955, entre estos destaca el metronidazol, el fármaco más usado contra la giardiasis. El metronidazol funciona como profármaco ya que requiere la reducción del grupo nitro para generar un efecto tóxico en el trofozoito de *Giardia*, el tratamiento con este fármaco requiere ser administrado en una o dos dosis de 5 a 10 días. El tinidazol, el ornidazol y el secnidazol pertenecen también a la familia de los 5-nitroimidazoles y su ventaja es que se pueden aplicar en una sola dosis para tener un efecto semejante al del metronidazol en menos tiempo.^{2,3} La eficacia de estos fármacos va del 70-100%,² sin embargo se ha observado que pueden provocar dolor de cabeza, vértigo, náuseas, sabor metálico en la boca y en altas dosis ocasionan pancreatitis, incluso el metronidazol fue catalogado en 2015 como carcinogénico por el Centro para el Control de Enfermedades en E.E.U.U., ya que ocasiona tumores en ratones cuando se administra en dosis altas, sin embargo hasta ahora no se ha observado este efecto en humanos.⁴

Los 5-nitrofuranos, como la furazolidona, tienen un mecanismo similar al del metronidazol, sin embargo poseen un potencial redox más elevado por lo cual son eficazmente reducidos en parásitos microaerófilos, los intermediarios reducidos de la furazolidona dañan las células que constituyen el ADN y las proteínas del trofozoito de *Giardia intestinalis*.⁴ Una de las grandes ventajas de éste fármaco es que se encuentra en suspensión por lo cual es adecuado para administrar en niños, sin embargo, el tratamiento con furazolidona requiere de 7 a 10 días para lograr una eficacia del 80-100%, más del tiempo necesario con los 5-nitroimidazoles. Por otro lado un 10% de los pacientes bajo este tratamiento han presentado problemas gastrointestinales, náuseas, vómito, diarrea, coloración café de la orina y en pacientes con deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se ha reportado hemólisis.²

Otros fármacos conocidos para el tratamiento de la giardiasis son los benzimidazoles entre los que se encuentran el albendazol y el mebendazol.^{2,4} Éste grupo de moléculas fue aprobado en 1983, presentan una eficacia del 65-97% y menos efectos secundarios que los 5-nitroimidazoles.² Estudios recientes han revelado que el modo de acción de éstos fármacos está relacionado con la β -tubulina, un componente del citoesqueleto de la *Giardia intestinalis*, el albendazol y el mebendazol se unen efectivamente a la β -tubulina en microorganismos como *Giardia*, específicamente a los residuos 198 y 165 inhibiendo la polimerización del citoesqueleto, dejando severos daños estructurales. A pesar de la eficacia de los benzimidazoles el albendazol ha sido señalado como teratogénico y por tanto no se prescribe a embarazadas.²

En el año 2004 se aprobó el fármaco nitazoxanida, el cual ha sido introducido como opción alternativa para el tratamiento de la giardiasis y presenta una excelente actividad *in vitro* contra varios parásitos. En ensayos clínicos con niños ayudó a reducir los síntomas de la giardiasis y los efectos secundarios reportados son de tipo

gastrointestinal. Actualmente es el fármaco más recomendado para tratamiento en niños.^{3,4}

A pesar de la gran diversidad de fármacos para tratar la giardiasis en 2015 se reportaron casos de resistencia al metronidazol, albendazol, nitazoxanida, quinacrina y furazolidona en varias cepas de *Giardia intestinalis* inducida tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo cual, en la actualidad se recomienda la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento.⁴

Busqueda de nuevos agentes anti giardiásicos

La terapia combinada,⁴ es una metodología que surge como respuesta a la necesidad de generar nuevas opciones para el tratamiento de la giardiasis, consiste en recetar al mismo tiempo diferentes dosis de diferentes anti giardiásicos conocidos para tratar la enfermedad, sin embargo la terapia combinada aumenta la eficacia pero no disminuye los efectos secundarios y no siempre funciona. Por lo cual las investigaciones se han decantado a la búsqueda y desarrollo de nuevos anti giardiásicos, hoy en día se conocen algunos fármacos en etapas clínicas y preclínicas.

En ensayos clínicos se encuentra el auranofin, un antireumático aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, E.E.U.U) en 1985, se encuentra desde 2013 en pruebas clínicas en el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID, *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*).¹⁷ La actividad anti giardiásica del auranofin se encontró a través de un cribado molecular de alto impacto (HTS, *High Throughput Screening*) realizado a una biblioteca de compuestos previamente aprobados por la FDA. En ensayos *in vivo* en ratas demostró ser activo ante diversas cepas de *Giardia* a concentraciones de CI_{50} de 152 ± 12 nM (**Figura 2**).

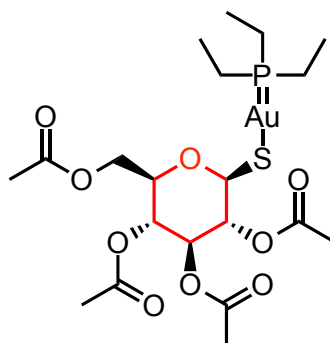


Figura 2. Estructura del auranofin, un derivado con actividad anti giardiásica tipo glucopirano.

En etapa preclínica podemos encontrar a la fumagilina, la cual en 2014 se encontró a través de un cribado¹⁸ y presentó un CI_{50} ($0.002 \mu M$) menor al del metronidazol ($1.6 \mu M$). En ese mismo año se propuso al omeprazol para tratar la

giardiasis debido al efecto que se ha observado tiene sobre los trofozoitos de *Giardia*, sin embargo estudios recientes^{19,20} han revelado que el uso prolongado de los inhibidores de la bomba de protones (IBP), entre los que se encuentra el omeprazol, podría generar cáncer estomacal (**Figura 3**).

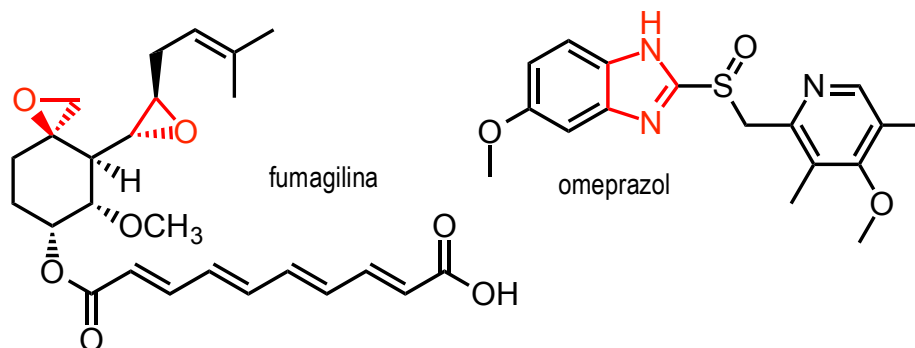


Figura 3. Fármacos con actividad anti-giardiasis en etapa preclínica.

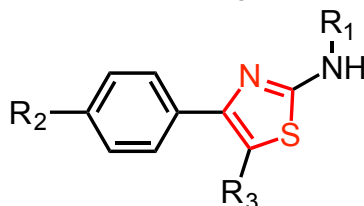
Como puede apreciarse en las **Figuras 1 a 3**, todos los fármacos anteriormente mencionados presentan estructuras heterocíclicas (resaltadas de color rojo), por lo cual los derivados heterocíclicos cuentan con un potencial justificado para la búsqueda de moléculas en contra de la giardiasis. Los núcleos de tipo imidazol y tiazol son los más utilizados debido a que estos grupos han demostrado un amplio espectro de actividades biológicas. Los tiazoles han sido probados como farmacóforos en muchos compuestos sintéticos y han demostrado actividades *in vitro* e *in vivo* contra *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Plasmodium* y *Toxoplasmosis*, entre otros protozoarios patógenos.²¹

Muy pocos grupos de investigación se han centrado a estudiar los núcleos tiazólicos como anti-giardiasis, en México el equipo de investigación de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma de Morelos se ha enfocado en los últimos años en el desarrollo de nuevos agentes anti-giardiasis derivados de nitazoxanida²²⁻²³ y recientemente obtuvieron un grupo de nitrotiazoles con una interesante actividad *in vitro* contra *Giardia intestinalis*, además llevaron a cabo un estudio computacional de acoplamiento molecular de los derivados con la enzima fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *Giardia*, los ligandos probados presentaron un efecto inhibitorio aceptable sobre la actividad de dicha enzima, proponiéndose que la inhibición de dicha proteína podría contribuir al mecanismo de acción multifactorial de la nitazoxanida y sus análogos contra *Giardia intestinalis*, los ensayos *in vivo* para estos derivados están en proceso.²²

De igual manera, investigadores pertenecientes al grupo de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán,²¹ sintetizaron y evaluaron la actividad de 50 compuestos de tipo 2-amino-4-aryl-1,3-tiazol contra *Giardia intestinalis* (**Tabla 1**) encontrando dos moléculas de tipo *N*-(4-aryl-5-

bromo-2-tiazolil)-acetamida cuya actividad resultó mejor a la del metronidazol; de igual manera, la citotoxicidad de dichas moléculas fue determinada usando células vero, encontrando que las moléculas más activas también son las más selectivas con índices de selectividad (IS) mayores a 10 (**Figura 4**).²¹

Tabla 1. Derivados tiazólicos con actividad anti-giardíasis.²¹



D.	R ₁	R ₂	R ₃	Cl ₅₀ (μM)	D.	R ₁	R ₂	R ₃	Cl ₅₀ (μM)
1a	H	H	H	108.26	5a	H	H	Br	59.97
1b	H	Cl	H	29.29	5b	H	Cl	Br	23.21
1c	H	Br	H	16.97	5c	H	Br	Br	11.05
1d	H	NO ₂	H	35.75	5d	H	NO ₂	Br	27.82
1e	H	Me	H	20.29	5e	H	Me	Br	40.42
1f	H	OMe	H	98.61	6a	Ac	H	Br	1.95
1g	H	OH	H	45.88	6b	Ac	Cl	Br	0.87
2a	Ac	H	H	50.76	6c	Ac	Br	Br	9.31
2b	Ac	Cl	H	142.13	6d	Ac	NO ₂	Br	9.03
2c	Ac	Br	H	96.21	6e	Ac	Me	Br	0.39
2d	Ac	NO ₂	H	9.72	6f	Ac	OMe	Br	2.51
2e	Ac	Me	H	39.39	7a	Bz	H	Br	36.80
2f	Ac	OMe	H	30.77	7b	Bz	Cl	Br	11.61
3a	Bz	H	H	44.12	7c	Bz	Br	Br	29.05
3b	Bz	Cl	H	119.79	7d	Bz	NO ₂	Br	16.70
3c	Bz	Br	H	78.42	7e	Bz	Me	Br	25.16
3d	Bz	NO ₂	H	22.13	7f	Bz	OMe	Br	9.97
3e	Bz	Me	H	56.77	8a	Furoil	H	Br	8.68
3f	Bz	OMe	H	8.70	8b	Furoil	Cl	Br	58.83
4a	Furoil	H	H	16.50	8c	Furoil	Br	Br	42.23
4b	Furoil	Cl	H	43.64	8d	Furoil	NO ₂	Br	7.20
4c	Furoil	Br	H	38.09	8e	Furoil	Me	Br	31.30
4d	Furoil	NO ₂	H	42.78	8f	Furoil	OMe	Br	1.66
4e	Furoil	Me	H	17.09	9	Ac	OAc	Br	56.28
4f	Furoil	OMe	H	19.41	10	Ac	OAc	Br	2.90
MTZ				1.40					

D- Compuesto, Cl₅₀-Concentración mínima inhibitoria.

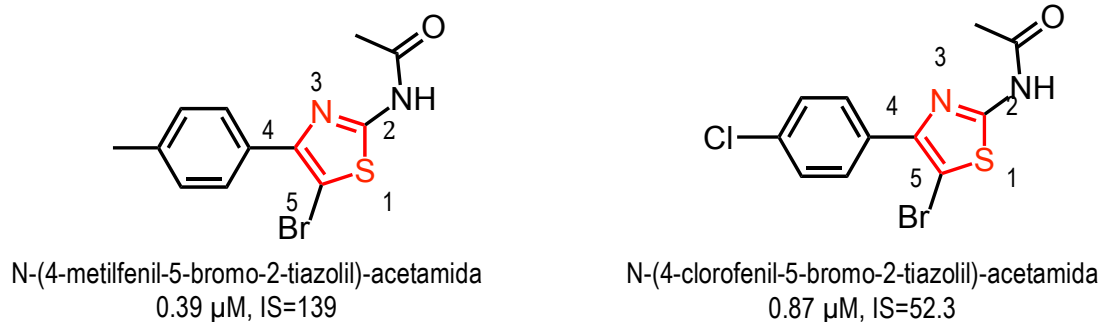


Figura 4. Estructura de dos tiazoles anti-giardíacos con Cl_{50} menor al metronidazol (1.4 μ M) y con IS ≥ 10

En este trabajo se observó que los derivados bromados en el carbono cinco y con una acetamida en el carbono dos presentaron actividades mejoradas en comparación con los otros análogos, sugiriéndose que la presencia de grupos electroattractores en dicha posición podrían potenciar la actividad; consecutivamente realizaron un estudio QSAR- 2D cuyos descriptores más significativos, E2M, Hypnotic-80, MATS6v, RDF115m y F10 revelaron la importancia de la distribución uniforme de las masas atómicas sobre el segundo eje principal de las mismas, la distribución en tres dimensiones de los átomos y el volumen molecular, sugiriéndose una dependencia lineal entre la actividad anti-giardíaca y la distribución en 3D de la masa molecular. Por estas razones proponen la modificación estructural de los tiazoles y la necesidad de realizar más estudios para probar las hipótesis planteadas. En 2017 este mismo grupo reportó pruebas *in vitro* con siete compuestos de tipo 2-amino-4-fenil-oxazol, obteniendo uno con mejor actividad que la del metronidazol pero menos activo en comparación con los tiazoles previamente reportados.²⁴

Una parte muy importante en la búsqueda de nuevos anti-giardíacos consiste en identificar los receptores del parásito sobre los cuales podrían actuar las moléculas activas, estos son los llamados blancos biológicos. En este sentido varios grupos de investigación han trabajado en la búsqueda de blancos biológicos en *Giardia intestinalis*, conociéndose principalmente tres, estos son: la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR) la cual interacciona con el metronidazol y reduce el grupo nitro,^{2,4} la enzima fructosa-1,6-bifosfato aldolasa la cual se ha encontrado recientemente que interacciona con un grupo de nitrotiazoles y sus derivados²² y la tubulina, componente del citoesqueleto de *Giardia*, en cuyo fragmento β se acoplan los ligandos de tipo benzimidazol.⁴ El objetivo de conocer estos sitios de acción es poder diseñar moléculas cuyas características fisicoquímicas sean las adecuadas para interactuar con dichos blancos, sin embargo no siempre es posible identificar el modo de acción de los fármacos, es por esta razón que las técnicas de química computacional han surgido en los últimos años fungiendo como auxiliares al momento de evaluar la acción de nuevas moléculas sobre blancos biológicos o en caso de no conocer el modo de acción

permiten desarrollar fármacos con características fisicoquímicas adecuadas para tratar alguna enfermedad a partir de bibliotecas de compuestos con actividades biológicas ya reportadas. En el primer caso la técnica de acoplamiento molecular permite observar las interacciones entre las estructuras tridimensionales de los fármacos y los sitios de acción de los blancos biológicos; en el segundo caso, cuando no se conoce el blanco biológico una de las técnicas más utilizadas es el análisis de relación estructura actividad, QSAR.

El QSAR, como se mencionó anteriormente, es una técnica computacional que no requiere conocer la proteína o el blanco molecular, más bien se basa en el análisis estructura-actividad de un conjunto de compuestos cuyas actividades biológicas se conocen, en este tipo de diseño se identifican patrones que sugieran la modificación de los compuestos con la intención de aumentar su actividad y se analizan las estructuras en 2D y 3D de los ligandos. Este método es considerado una aproximación indirecta al desarrollo de fármacos, ya que asume que moléculas similares actuarán sobre el mismo sitio activo en el blanco biológico. Dentro de las técnicas de este tipo las más avanzadas son aquellos que consideran la forma tridimensional de una molécula, uno de estas es el QSAR-3D, propuesta por Crammer en 1988,²⁵ con la intención de encontrar correlación estadística entre descriptores tridimensionales (estéricos, electrostáticos, geométricos etc.) cuyo arreglo espacial da lugar a campos de interacción molecular y las actividades biológicas de los compuestos; a la técnica de Crammer se le llamó análisis comparativo de campo molecular (*CoMFA*, *Comparative Molecular Field Analysis*). Un avance de esta técnica es que toma en cuenta las estructuras en 3D de los ligandos y además es aplicable a grupos de compuestos estructuralmente diversos. El rango de aplicación de esta herramienta computacional va desde racionalizar el desarrollo de nuevos fármacos hasta priorizar la síntesis de ciertas moléculas para ser probadas contra un blanco en particular.^{26,27}

En los últimos 10 años el QSAR-3D se ha utilizado en muchos casos para la evaluación de derivados tiazólicos con actividades prometedoras como anticancerígenas, antiproliferativas,²⁸ inhibidores enzimáticos,^{29,30} antiplaquetarios³¹ etc. De igual manera hay reportes de estudios de CoMFA aplicados a organismos amitocondriados como *Tricomona vaginalis*,³² *Entamoeba hystolica*,³³ *Plasmodium*³⁴ entre otros protozoarios patógenos, obteniendo muy buenos resultados (**Figura 5**), sin embargo hasta ahora son muy pocos o nulos los reportes de estudios de este tipo para antiangiardiásicos, sobre todo para derivados tiazólicos con actividad antiangiardiásica.

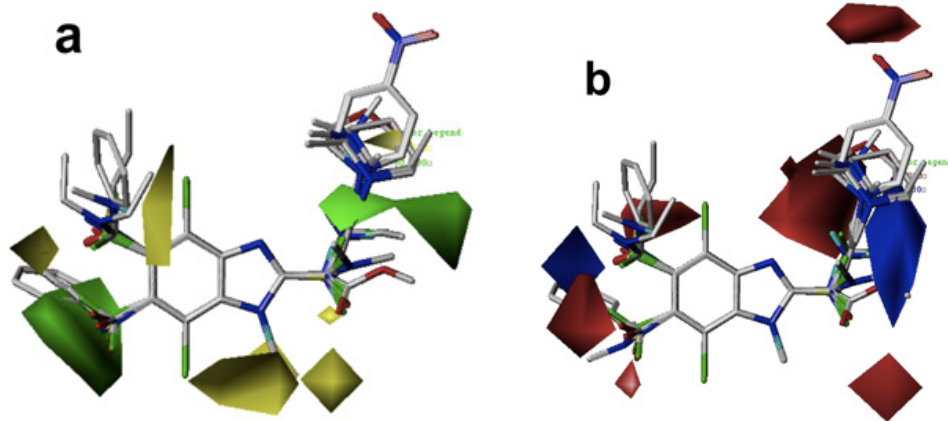


Figura 5. El mejor modelo QSAR-3D de derivados benzimidazólicos contra *Trichomona vaginalis* ($r^2=0.936$, $q^2=0.634$).³²

HIPÓTESIS

Es posible generar un ligando de tipo *N*-[4-(4'-sustituido)-5-sustituido-2-tiazolil]-amida selectivo contra *Giardia intestinalis* a partir de la técnica computacional de QSAR-3D.

JUSTIFICACIÓN

En años recientes se han reportado nuevos casos de giardiasis en zonas donde se creía erradicada como Estados Unidos, Nueva Zelanda, Noruega, Alemania e Inglaterra catalogándola como una enfermedad re-emergente. Se calcula que en México aproximadamente nueve millones de personas están parasitadas con *Giardia intestinalis*, encontrándose sobre todo en infantes, preescolares y escolares. De acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en 2018 se reportó una media nacional de 375 nuevos casos de giardiasis en el país, registrándose en Yucatán 614 casos en el mismo año, 1.6 veces sobre la media, ocupando el sexto lugar entre los estados con mayor incidencia, el primer lugar lo ocupó Sinaloa con 2 016 casos nuevos de giardiasis. Estos índices son alarmantes y a pesar de que en la actualidad se cuenta con una gran cantidad de fármacos para el tratamiento de la giardiasis, la mayoría de éstos tienen más de 30 años en el mercado y han comenzado a perder su eficacia ya que se tiene reportes de resistencia de cepas de *Giardia intestinalis* a éstos compuestos, de igual forma muchos de los anti-giardiasis conocidos presentan efectos secundarios en el consumidor, por tanto la búsqueda de nuevos fármacos con potencial anti-giardiasis es un problema que requiere de atención inmediata.

Las técnicas de química computacional son una herramienta de gran ayuda al momento de tomar decisiones que impliquen la modificación estructural y síntesis de un grupo nuevo de compuestos ya que a través de éstas es posible disminuir los recursos económicos y ambientales implicados en el desarrollo de nuevos fármacos y en muchos casos el tiempo para el diseño de moléculas líder.

Con todo esto, en el presente trabajo se plantea un estudio de tipo computacional con el objetivo de proponer un grupo de nuevos compuestos de tipo *N*-[4-(4'-sustituido)-5-sustituido-2-tiazolil]-amida que presenten actividad anti-giardiasis potencial y cuyos CI_{50} puedan predecirse teóricamente a través de un modelo QSAR-3D.

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener mediante un estudio QSAR-3D un ligando de tipo *N*-[4-(4'-sustituido)-5-sustituido-2-tiazolil]-amida selectivo contra *Giardia intestinalis*.

Objetivos Específicos

Generar un modelo QSAR-3D validado para los derivados tiazólicos de tipo 2-amino-4-aril-1,3-tiazol.

Predecir la actividad biológica de un grupo de *N*-[4-(4'-sustituido)-5-sustituido-2-tiazolil]amidas usando el modelo QSAR-3D generado previamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Códigos y equipo de computo empleado.

Para la modelación de la estructura tridimensional de los tiazoles estudiados se utilizó el programa GaussView 5.0.8 en su versión para Windows. La geometría de las moléculas fue optimizada con ayuda de los códigos Spartan'14³⁵ en su versión Windows y Gaussian 09³⁶ en su versión Linux. El QSAR-3D se llevó a cabo con los programas de código libre Open3DALIGN³⁷ y Open3DQSAR,³⁸ la visualización de los mapas de contorno se realizó con PyMOL 1.7.x.³⁹

Las características del equipo de cómputo donde se realizaron las simulaciones son:

- Un servidor con sistema operativo Linux Open Suse con un procesador Intel® Core™ i5-2400 con 4 núcleos de 3.1 Hz y 6GB de memoria RAM.
- Un cluster con sistema operativo Linux Open Suse con un procesador Intel® Xeon® con 72 núcleos de 2.1 GHz y 132 GB de memoria RAM.
- Un servidor con sistema operativo Windows 10 version 2015, con procesador Intel® Core™ i5-7500, 3.40 GHZ y 8 GB de RAM

Generación del modelo QSAR 3D

Para la generación del modelo QSAR-3D se utilizaron los 50 derivados 2-amino-4-aril-1,3-tiazólicos con actividad anti-giardíasis sintetizados en el Laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán²¹ y evaluados en la Unidad Interinstitucional IMSS-UADY de la Facultad de Medicina de la misma Universidad. El procedimiento que se utilizó para la generación del modelo QSAR-3D se representa en la **Figura 6**.

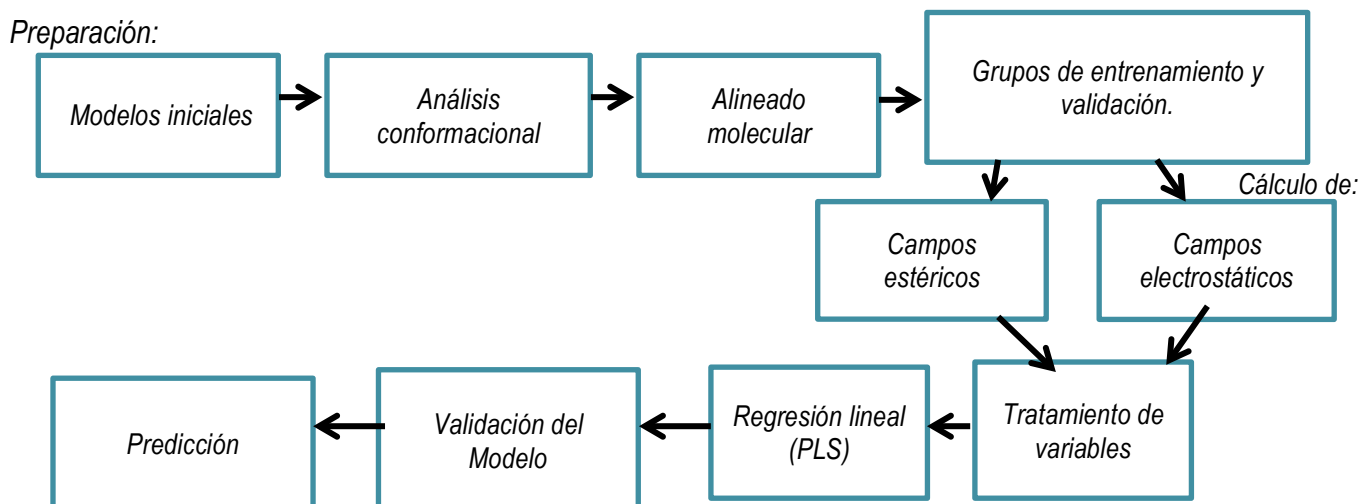
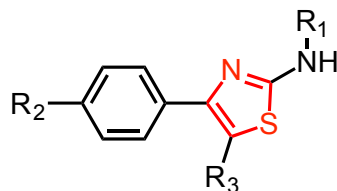


Figura 6. Procedimiento general para el desarrollo de un modelo QSAR-3D.

Preparación de los modelos moleculares iniciales

La optimización geométrica de los derivados 2-amino-4-aril-1,3-tiazólicos (**Figura 7**) se realizó a través del programa Gaussian 09³⁶ utilizando la teoría del funcional de la densidad (DFT) con el funcional B3LYP y la base 6-31g(d,p). Los criterios de convergencia para la optimización geométrica³⁶ fueron: a) el máximo componente de las sumas de fuerzas debe ser menor a 0.00045 u.a., b) la raíz de la media cuadrática de las fuerzas debe ser menor a 0.0003 u.a., c) el desplazamiento calculado para el siguiente paso debe ser menor a 0.0018 u.a. y d) la raíz de la media cuadrática del desplazamiento al siguiente paso debe ser menor a 0.0012 u.a.; una vez que los criterios mencionados previamente se cumplen el análisis de optimización geométrica converge. Para concluir la optimización de las estructuras químicas se calcularon los modos normales de vibración de cada molécula.

Tabla 2. Derivados tiazólicos incluidos en el QSAR-3D.²¹



D.	R ₁	R ₂	R ₃	D.	R ₁	R ₂	R ₃
1a	H	H	H	5a	H	H	Br
1b	H	Cl	H	5b	H	Cl	Br
1c	H	Br	H	5c	H	Br	Br
1d	H	NO ₂	H	5d	H	NO ₂	Br
1e	H	Me	H	5e	H	Me	Br
1f	H	OMe	H	6a	Ac	H	Br
1g	H	OH	H	6b	Ac	Cl	Br
2a	Ac	H	H	6c	Ac	Br	Br
2b	Ac	Cl	H	6d	Ac	NO ₂	Br
2c	Ac	Br	H	6e	Ac	Me	Br
2d	Ac	NO ₂	H	6f	Ac	OMe	Br
2e	Ac	Me	H	7a	Bz	H	Br
2f	Ac	OMe	H	7b	Bz	Cl	Br
3a	Bz	H	H	7c	Bz	Br	Br
3b	Bz	Cl	H	7d	Bz	NO ₂	Br
3c	Bz	Br	H	7e	Bz	Me	Br
3d	Bz	NO ₂	H	7f	Bz	OMe	Br
3e	Bz	Me	H	8a	Furoil	H	Br
3f	Bz	OMe	H	8b	Furoil	Cl	Br
4a	Furoil	H	H	8c	Furoil	Br	Br
4b	Furoil	Cl	H	8d	Furoil	NO ₂	Br
4c	Furoil	Br	H	8e	Furoil	Me	Br
4d	Furoil	NO ₂	H	8f	Furoil	OMe	Br
4e	Furoil	Me	H	9	Ac	OAc	Br
4f	Furoil	OMe	H	10	Ac	OAc	Br

Análisis conformacional y alineado molecular

Para la búsqueda de confórmeros de cada derivado tiazólico se utilizó una aproximación de dinámica molecular denominada *QMD (Quenched Molecular Dynamics)* por sus siglas en inglés). El procedimiento consistió en 200 ciclos de dinámica molecular para cada derivado tiazólico donde el paso inicial fue la minimización de la estructura geométrica inicial utilizando el método de Merck para mecánica molecular (MMFF94s), seguidamente y con el objetivo de explorar el espacio conformacional se impartió una energía equivalente a 1000 K a cada molécula a lo

largo de una simulación de dinámica molecular con una duración de 10 ps, incrementando la temperatura 10 K cada 0.1 ps; en cada ciclo los conformeros obtenidos se minimizaron con mecánica molecular (MMFF94s) y se descartaron aquellos cuya energía con respecto al mínimo fue mayor a 3 kcal/mol. Por último los conformeros obtenidos después de todos los ciclos de dinámica molecular fueron comparados a través de sus medias cuadráticas, aquellos con una diferencia menor a 0.2 Å se consideraron duplicados y se descartaron.⁴⁰⁻⁴²

Es importante aclarar que los conformeros pertenecientes a las estructuras iniciales calculadas con DFT y reoptimizadas con mecánica molecular también se utilizaron en el alineado molecular, tal como lo recomienda la literatura, por lo cual se retuvieron en la base de datos de conformeros final aún cuando no se encontrasen dentro del rango energético establecido (0-3 kcal/mol). En la **Figura 7** se resume la metodología seguida para el análisis conformacional.

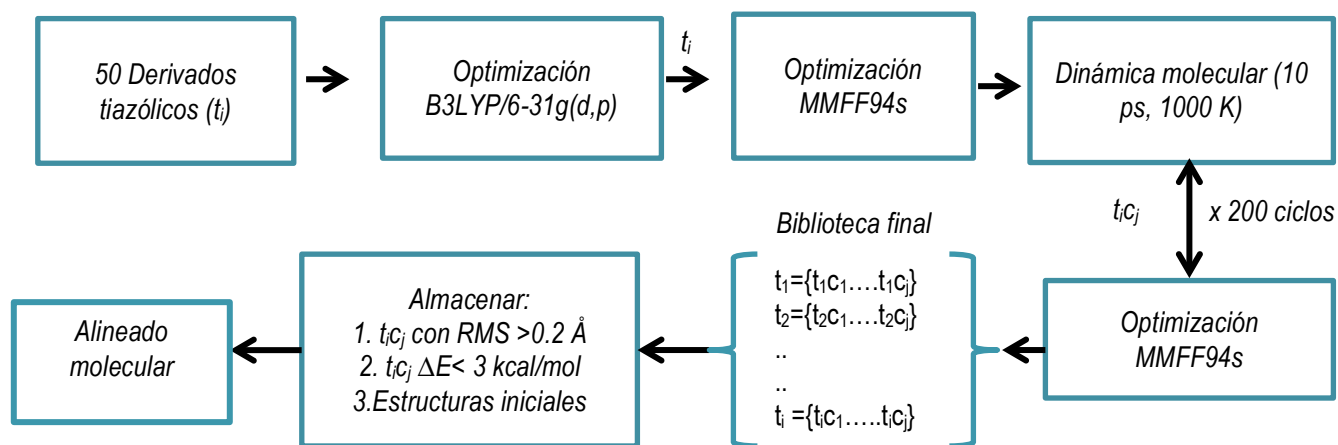


Figura 7. Metodología para la generación de la base de datos de conformeros, donde t_i representa cada derivado tiazólico ($i=1...50$) y $t_i c_j$ se refiere a los conformeros generados después del cálculo de dinámica molecular para cada derivado.

Una vez realizado el análisis conformacional con la metodología planteada anteriormente, el siguiente paso consistió en alinear los conformeros, para lo cual se procedió a seleccionar algún derivado tiazólico como plantilla de alineado. Se utilizaron tres estrategias diferentes para localizar la plantilla de alineado adecuada. La primera estrategia consistió en alinear las moléculas sobre los conformeros del derivado tiazólico con la mejor actividad biológica reportada (Bioactividad),⁴³⁻⁴⁷ en la segunda estrategia se alineó utilizando como plantilla aquellos conformeros que posean la mayor cantidad de características farmacofóricas (Farmacóforo) y para la tercera aproximación el alineado se realizó sobre todos los conformeros eligiendo aquel que presentó la mejor puntuación de ajuste (Conformacional).^{48,49} En todos los casos el alineado se llevó a cabo utilizando un algoritmo mixto de alineado rígido y

sobreponiendo todos los confórmers encontrados para cada derivado sobre la plantilla escogida, para cada derivado solo se retuvo el confórmero que mejor se ajustó a la plantilla; para determinar la calidad de la superposición se utilizó un parámetro de ajuste el cual se calculó a través una función gaussiana simple (Ec 1) que genera un parámetro de puntuación P adimensional, el cual mientras mayor sea indica un mejor ajuste.^{37,48}

$$P = \sum_{i=1}^n \left(\frac{1.0 + \alpha_{O3A} + q_{O3A} * Q_i^{sum}}{(1.0 + Q_i^{dif})} * e^{(-\beta_{O3A} * dist_i)} \right) \quad \text{Ec.1}$$

Donde α_{O3A} , q_{O3A} , β_{O3A} son constantes, Q_i^{sum} y Q_i^{dif} es la suma y el valor absoluto de la diferencia de cargas de los átomos en la plantilla y el confórmero que se alinea, $dist_i$ es la distancia entre los átomos en la plantilla y el confórmero alineado.

El algoritmo de alineado empleado combina un método basado en los átomos (LAMDA, *Ligand Alignment based on linear Assignment* en inglés)^{48,50} y un método basado en el farmacóforo (PHARAO, *Pharmacophore Alignment and Optimization* en inglés).⁴⁹ En la **Figura 8** se presenta un resumen de la metodología que se seguirá para el alineado de confórmers.

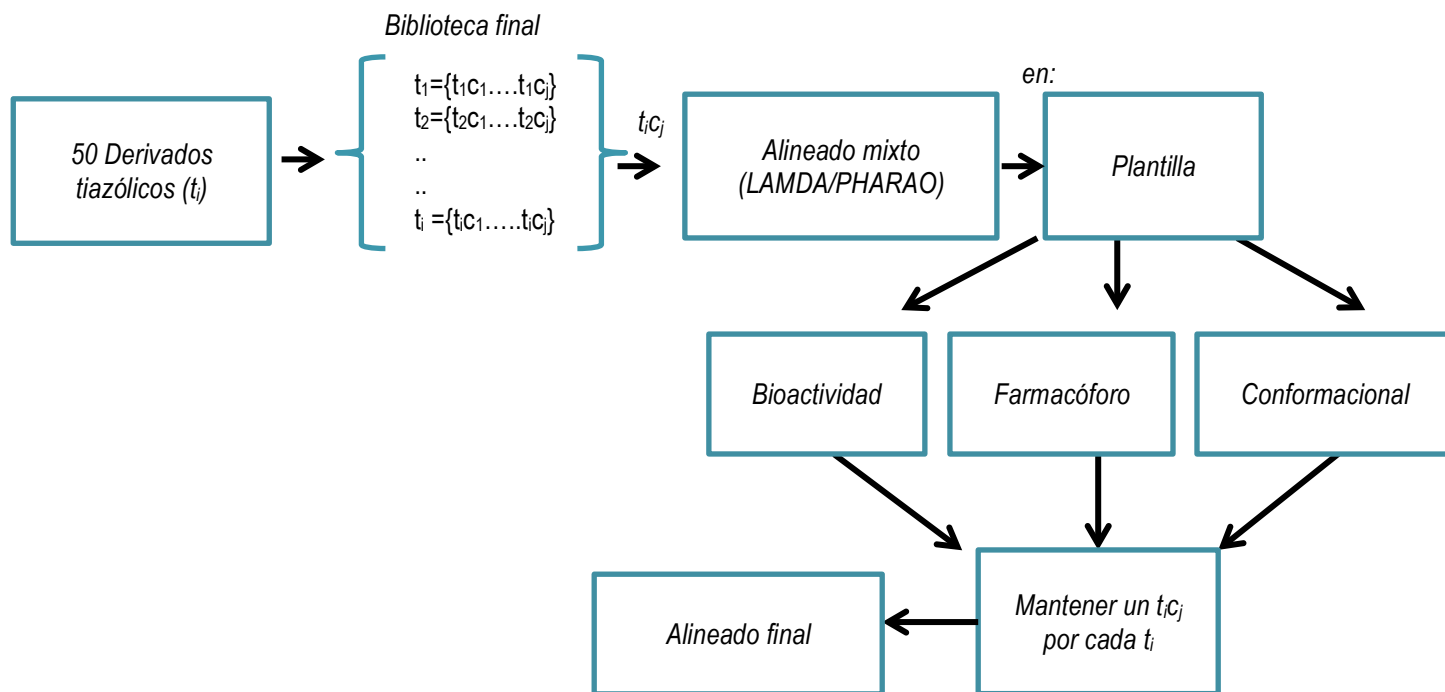


Figura 8. Procedimiento seguido para el alineado molecular.

Dado que este proceso se llevó a cabo con todos los confórmers y utilizando diferentes estrategias para la selección de la plantilla, se generaron varios grupos de alineado. Para cada uno de estos grupos se desarrolló un modelo QSAR-3D y aquel

que generó el mejor conjunto de parámetros estadísticos se escogió como el alineado óptimo

Selección de los grupos de entrenamiento y validación

Previo a la generación de los modelos QSAR-3D los derivados 2-amino-4-aryl-1,3-tiazólicos se dividieron en dos grupos, de entrenamiento y de validación, el primer grupo sirvió para generar el modelo QSAR-3D y el segundo se utilizó para validar externamente el modelo. Se eligieron tres grupos de validación externa, cada uno escogido de manera aleatoria y manteniendo una relación 75:25 (entrenamiento:validación) de moléculas. El primer grupo de validación (G1) se seleccionó manteniendo fuera de éste las dos moléculas más activas y las dos menos activas;⁵² el segundo grupo (G2) se tomó de un estudio previo de QSAR-2D²¹ en el cual el mejor modelo fue generado con ésta combinación de derivados, el tercer grupo (G3) fue una combinación de los dos anteriores.

Cálculo de los campos estéricos y electrostáticos

Los grupos de alineado obtenidos previamente a través de las diversas estrategias mencionadas se insertaron de manera individual dentro de una caja, cuyo tamaño fue 5 Å mayor al volumen de todas las moléculas en cada dirección, sobre ésta caja se generó una malla en cuyos puntos se calcularon los campos de interacción molecular (MIF's). Los MIF's se calcularon utilizando un campo de fuerza estérico basado en los parámetros de Van der Waals implementados en Merck (MMFF94) y un campo de fuerza electrostático basado en un modelo de carga puntual. Específicamente el campo estérico se calculó de acuerdo al potencial especial amortiguado 14-7 implementado en el campo de fuerza MMFF94 (**Ec. 2**) entre n moléculas y un átomo de carbono sp^3 (CH_3^+) de prueba, mientras que el campo electrostático se calculó a través de la sumatoria de las fuerzas coulombicas (**Ec. 3**) entre una carga positiva de prueba (CH_3^+) y los n átomos de una molécula.^{53,54}

$$E_{vdw} = \sum_{i=1}^n \left\{ \epsilon_{ij} \left[\left(\left(\frac{1.07R_{ij}}{r_{ij}+0.07R_{ij}} \right)^7 \cdot \left(\frac{1.12R_{ij}^7}{r_{ij}^7+0.12R_{ij}} \right) \right) - 2 \left(\frac{1.07R_{ij}}{r_{ij}+0.07R_{ij}} \right)^7 \right] \right\} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

ϵ_{ij} =profundidad del pozo (kcal/mol)

N_i y N_j =Números de electrones de valencia

G_i y G_j =Factores de escalamiento

α_i , α_j =polarizabilidad atómica de i o j

$$\epsilon_{ij} = \frac{181.16 G_i G_j \alpha_i \alpha_j}{\left(\frac{\alpha_i}{N_i} \right)^{0.5} + \left(\frac{\alpha_j}{N_j} \right)^{0.5}} \cdot \frac{1}{R_{ij}^6}$$

r_{ij} =distancia interatómica entre el átomo i y el punto j de la malla (CH_3^+)
 R_{ij} =energía mínima de separación (Å) entre el átomo i y el punto j (CH_3^+)

$$R_{ij}=0.5(R_i+R_j[1+0.2(1-e^{-12Y_{ij}^2})])$$

$$R_i=A_i\alpha_i^{0.25} \quad \text{y} \quad R_j=A_j\alpha_j^{0.25}$$

α_i, α_j =polarizabilidad atómica de i o j.

A_i, A_j =factor de escalamiento para i o j.

$$Y_{ij}=\frac{R_i-R_j}{R_i+R_j}$$

Y_{ij} =media de la distancia entre el átomo i y el punto j

$$E_{ele}=\sum_{i=1}^n \left[\frac{q_i q_j}{r_i^m} \right]$$

Ec. 3

Donde:

r_{ij} =distancia entre el átomo i y el punto j de la malla.

q_i =carga del átomo i

q_j =carga del átomo de prueba

Tratamiento de variables y regresión lineal

Los pasos para el tratamiento de variables fueron: a) hacer cero los valores de la malla cercanos a cero, lo cual se logró estableciendo un valor límite de 0.05 para los datos en la malla, b) eliminar aquellos valores que exceden el mínimo y el máximo de energía establecido (-30 a 30 kcal/mol),⁴¹ c) remover las variables cuya desviación estándar es menor a un valor establecido de 0.1 d) remover aquellas variables que asumen únicamente n ($n= 1,2,3,4$) valores diferentes a través del grupo de datos y cuya distribución no es uniforme. Adicionalmente se realizó un escalamiento de las variables y se realizó la separación de las moléculas y sus variables en el grupo de entrenamiento y validación.

Una vez llevado a cabo el tratamiento de las variables, se realizó un ajuste lineal entre la actividad biológica (Y) y los valores de MIF's en la matriz X del grupo de entrenamiento, utilizando la metodología de mínimos cuadrados parciales (*PLS, partial least square*). Este cálculo permitió evaluar la capacidad del modelo para explicar la varianza experimental del grupo de entrenamiento a través del coeficiente de determinación (R^2). Para considerar un modelo adecuado se requiere obtener valores de R^2 mayores a 0.7, de igual forma se calculó el parámetro de Fisher utilizando un valor crítico de distribución de Fisher de 5.06 con un índice de confianza de $\alpha=0.01$.⁵⁵⁻⁵⁹

El siguiente paso consistió en validar de manera interna el modelo QSAR-3D, para lo cual se calculó de nuevo el PLS, extrayendo un número determinado de componentes principales (CP), el número óptimo de CP se escogió a través de la validación cruzada, la cual consiste en calcular modelos QSAR-3D para el grupo de entrenamiento dejando una molécula fuera (*LOO*, *leave-one-out* por sus siglas en inglés), dejando dos moléculas fuera (*LTO*, *leave-two-out* por sus siglas en inglés) y con varias moléculas fuera (*LMO*, *leave-many-out* por sus siglas en inglés), para ésta última estrategia de validación se evaluaron 3, 5, y 10 grupos de moléculas con 20, 10 y 5 corridas de cálculo respectivamente (L33%O, L20%O, L10%O), utilizando como parámetros de determinación el coeficiente de validación cruzada (Q^2_{int}) y la desviación estándar de las predicciones internas del modelo ($SDEP_{int}$). El número de CP con el valor más grande de Q^2_{int} y más pequeño de $SDEP_{int}$ dentro de la validación cruzada se utilizó en la validación externa.⁵⁵⁻⁵⁹

Para el refinado de los modelos se utilizó la técnica de eliminación de variables uninformativas a través de mínimos cuadrados parciales (*UVE-PLS en inglés*)⁶⁰ y su variante, eliminación iterativa de variables a través de mínimos cuadrados parciales (*IVE-PLS en inglés*).⁶¹

Para la validación externa se aplicó el modelo PLS con el número de componentes óptimo y seguidamente se realizó un análisis predictivo para las moléculas pertenecientes al grupo de validación, el carácter predictivo del modelo se evaluó través de los coeficientes de determinación externo (R^2_{ext}) y la desviación estándar externa ($SDEP_{ext}$), un modelo predictivo es aquel que presenta una R^2_{ext} mayor a 0.6 y el $SDEP_{ext}$ más próximo a cero.

Por otro lado, para calcular la robustez de los modelos se utilizó la prueba de aleatorización. La idea general es dividir la matriz de variables X (coeficientes calculados) y Y (actividades biológicas) en grupos de tres moléculas y después intercambiar las variables Y dentro de cada grupo para generar un nuevo modelo QSAR-3D en cada permutación; de éste análisis se generan una R_{al}^2 y una Q_{al}^2 .⁶²

Eliminación de moléculas con comportamiento atípico.

Se eliminaron las moléculas cuya diferencia entre la actividad predicha y la actividad observada es dos veces más grande a la desviación estándar del modelo generado.⁶³⁻⁶⁵

Generación de los mapas de coeficientes

Una vez obtenidos los modelos se analizaron los coeficientes con contribuciones más importantes de campo estérico y electrostático a la actividad

biológica, para ello se graficaron contornos cuyo tamaño está determinado por el valor de iso-superficie (isovalor). Las conclusiones obtenidas del análisis de iso-contornos se utilizaron para la propuesta de nuevos análogos.

Predicción del CI_{50} teórico para los nuevos análogos

Para los análogos propuestos se siguió la metodología planteada con anterioridad para la predicción de actividad teórica: se optimizaron con el funcional B3LYP y la base 6-31G(d,p), seguidamente se llevó a cabo un análisis conformacional con dinámica molecular para cada análogo y se alinearon de manera individual sobre la plantilla perteneciente al mejor modelo QSAR-3D, reteniéndose únicamente el conformero de cada análogo con la mejor puntuación de ajuste. Por último se predijeron utilizando el mejor modelo QSAR-3D generado con anterioridad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mejor modelo QSAR-3D se generó a partir de una exhaustiva búsqueda conformacional, seguida del alineado de todos los derivados tiazólicos utilizando tres diferentes estrategias, por último se calcularon los potenciales estéricos y electrostáticos para estos grupos de alineado, seleccionando el modelo que obtuvo el mejor conjunto de parámetros estadísticos. Un paso previo de mucho valor para la construcción y consecuente validación de los modelos QSAR-3D es la calibración de los códigos a emplear, de esta forma se garantiza el correcto funcionamiento de dichos códigos y la veracidad de los resultados.

Calibración de los códigos

Para calibrar los programas se reprodujo el trabajo de Paolo y colaboradores⁶⁶ sobre un grupo de ligandos $\alpha_4\beta_2$ nicotínicos, siguiéndose paso a paso la metodología reportada y empleando los códigos Open3DALIGN^{37,41} y Open3DQSAR.³⁸ En la **Tabla 3** se presenta la comparación entre los resultados obtenidos en esta tesis y los reportados en el artículo de referencia.

Tabla 3. Calibración de los códigos Open3DALIGN y Open3DQSAR.

Parámetros estadísticos	Referencia ⁶⁶	Valores obtenidos
R^2	0.96	0.93
Q_{LOO}^2	0.76	0.74
R_{ext}^2	0.89	0.87
$SDEP_{ext}$	0.33	0.37

De la tabla se observa que los resultados obtenidos en esta tesis son ligeramente inferiores a los reportados en la literatura, una explicación para estas variaciones recae en el hecho de que en el estudio de referencia se utilizó para el análisis una versión anterior del código (v. 2.24), la versión actualizada, utilizada en esta tesis (v. 2.281), tiene modificaciones en el algoritmo para la selección y eliminación de variables, lo que mejora la calidad de los QSAR-3D pero produce un cambio leve en los resultados de apenas 0.03 unidades. Es importante hacer notar que no existe en la literatura un parámetro para determinar la significancia de dicha diferencia, sin embargo es notable que todos los datos se mantuvieron sobre el mismo rango óptimo de parámetros estadísticos, ejemplo: R^2 por arriba de 0.9 y R_{ext}^2 por arriba de 0.80.

Búsqueda de conformeros bioactivos

Para cada molécula existe una cantidad de conformeros estables dependiendo de los grados de libertad de la misma (enlaces, ángulos etc), los cuales podrían ser o no formas biológicamente activas de la misma molécula, sin embargo, debido a que no se conoce la conformación bioactiva de los derivados tiazólicos estudiados, es necesario incluir la mayor cantidad de éstos en el análisis previo a la generación de los modelos QSAR-3D.⁵¹

El primer paso en la búsqueda de los conformeros bioactivos es la optimización de los compuestos, para la cual existen varios métodos reportados, los más empleados son los de mecánica molecular y los de primeros principios, incluida la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT); en este análisis se empleó DFT con el funcional B3LYP y la base 6-31g(d,p), ya que existen evidencias en la literatura^{67,68} de que dicha metodología permite generar mejores modelos QSAR-3D. Sin embargo para corroborar este hecho, se optimizó adicionalmente la configuración inicial de cada molécula usando métodos de mecánica molecular, específicamente el campo de fuerza universal (UFF) implementado en Gaussian 09. Consecutivamente se llevó a cabo el análisis conformacional de las moléculas ya optimizadas utilizando la metodología anteriormente expuesta.

Los resultados muestran que cuando la estructura inicial de las moléculas es optimizada con B3LYP se obtiene una mayor población de conformeros a diferencia de la optimización llevada a cabo con mecánica molecular, lo cual corrobora que una optimización con métodos de primeros principios promueve un análisis conformacional más fino. De igual manera, a través de la ecuación de Boltzman se calculó la población de conformeros localizada entre 0-3 kcal/mol para cada derivado tiazólico encontrándose que en dicho rango está ubicada la mayor cantidad de conformeros para cada derivado (> 97%). En total se encontraron 193 conformeros para todos los derivados tiazólicos, que representan más del 97% de la población conformacional de cada tiazol y dentro de los cuales es altamente probable que se encuentren las conformaciones bioactivas.

Alineado molecular

Los modelos QSAR en tres dimensiones son muy sensibles a la manera en que los conformeros son alineados. En cada punto de la malla establecida sobre las moléculas previamente alineadas se calcula la energía estérica y electrostática correspondiente a un átomo o conjunto de átomos específicos de cada molécula, por tanto, para cada punto hay una energía correspondiente a cada una de las moléculas alineadas, dichas energías son matemáticamente equivalentes, sin embargo un buen alineado garantiza que dichas energías representen las características en común entre

los átomos de las moléculas, es decir, equivalencia química.⁶⁹ Para alinear eficazmente es necesario contar con una molécula de plantilla que posea la conformación bioactiva para interactuar eficazmente en el sitio activo del blanco biológico de interés, tal como se mencionó con anterioridad no se conoce la conformación bioactiva, por lo cual se utilizaron tres estrategias, para escoger la mejor plantilla de alineado, cada estrategia recurrió a un criterio específico para la selección de las plantillas, estos fueron: a) Bioactividad, b) Farmacológico, c) Conformacional.

Alineado sobre la molécula más activa (Bioactividad).

Esta estrategia consistió en alinear todos los conforméromos sobre la molécula con mejor actividad anti-giardíasis reportada (6e, $Cl_{50}=0.39 \mu M$).²¹ En este caso se utilizaron los conforméromos del derivado tiazólico *N*-[5-bromo-4-(*p*-tolil)-tiazol-2-il]acetamida (6e) más activo (**Figura 9**) numerados como 6e-1 y 6e-2, donde el número uno después del código 6e hace referencia al conforméromo de mínima energía y el número dos al segundo conforméromo, con una diferencia relativa entre ambos de 9.56 kcal/mol, esta diferencia se debe a que el conforméromo 6e-1 corresponde al único conforméromo encontrado para la molécula 6e en el rango de 0-3 kcal/mol, mientras que el conforméromo 6e-2 se encuentra fuera de este rango energético y es el correspondiente a la estructura inicial previamente optimizada con DFT y reoptimizada con mecánica molecular, la cual se mantuvo dentro de la base de datos de conforméromos como parte de la metodología sugerida en la literatura.⁵¹ La diferencia más notoria entre ambos conforméromos es debida a la rotación del ángulo diedro entre los átomos 3, 4, 1' y 2', el cual tiene un valor de 0° para el conforméromo 6e-1 y 30° para el conforméromo 6e-2.

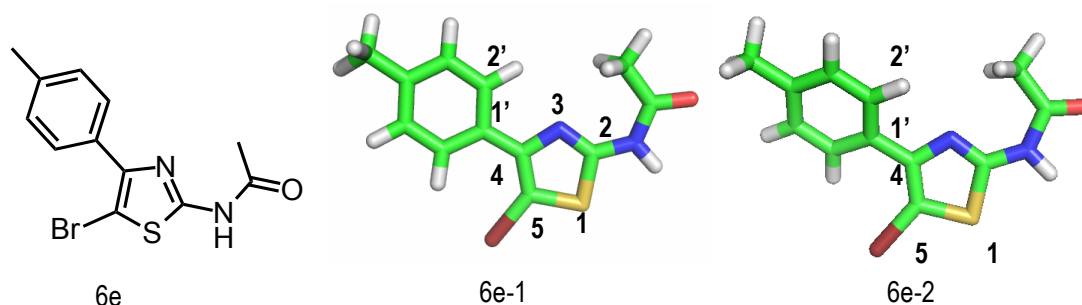


Figura 9. Conforméromos de la molécula más activa (6e).

En la **Figura 10** se presentan los grupos de alineado (A) obtenidos con ambos conforméromos como plantillas. Para determinar el grado de ajuste de los conforméromos alineados sobre las plantillas 6e-1 y 6e-2 se calculó el parámetro de puntuación P obteniéndose: 6266 para A6e-1 y 6263.4 para A6e-2, lo cual indica un mejor ajuste de los conforméromos alineados sobre 6e-1; tomando en consideración la importancia del alineado en la generación de los modelos QSAR-3D, es probable que el mejor modelo

se genere con el grupo A6e-1, sin embargo, al observar la **Figura 10** se puede notar que los grupos funcionales en la posición dos del anillo tiazólico se encuentran mejor alineados en A6e-2 que en A6e-1, esto se puede explicar debido a que la ecuación utilizada para calcular la puntuación de ajuste (P) únicamente considera las cargas y distancias entre los átomos etiquetados del mismo modo, esto quiere decir que solo mide el ajuste del esqueleto principal de los tiazoles, por tanto, las partes de la molécula con variaciones en cuanto a grupos funcionales pueden no estar correctamente alineadas a pesar de que la puntuación P indique lo contrario.

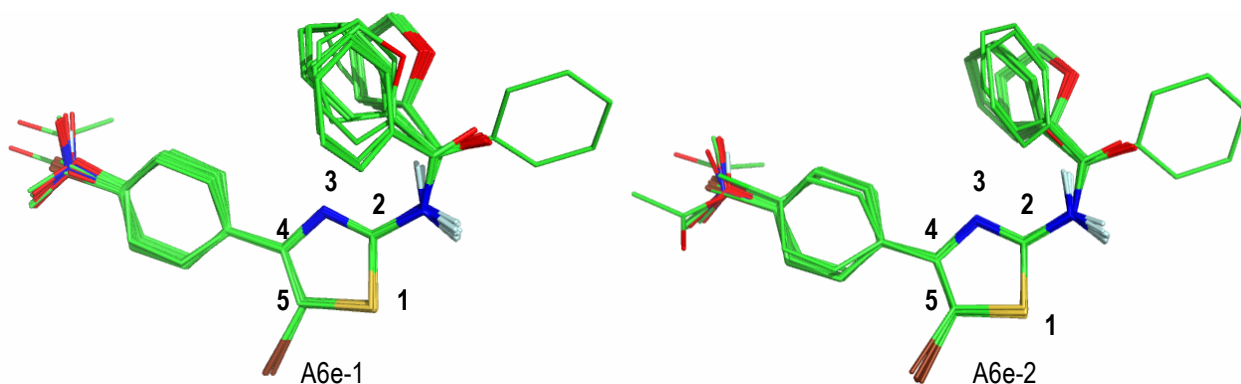


Figura 10. Alineado de los conformeros de los 50 derivados tiazólicos sobre los conformeros de 6e.

Alineado basado en los diversidad de los farmacóforos.

En esta metodología se utilizaron como plantillas para alinear aquellas moléculas que poseen la mayor variedad de características farmacofóricas. Una forma para encontrar los derivados que cumplen con dicha condición y reducir el número de 193 conformeros presentes en la base de datos de conformeros, es filtrando dichos conformeros de manera intra e intermolecular.

Se consideran como características farmacofóricas o grupos funcionales farmacofóricos los anillos aromáticos, átomos donadores y aceptores de hidrógeno (como el oxígeno y el nitrógeno), las regiones lipofílicas y las regiones con carga positiva o negativa presentes en una molécula, dichas características son señaladas sobre cada conformero ($t_i c_j$) en forma de esferas farmacofóricas.⁴⁹ El primer paso para la búsqueda de los conformeros con mayor variedad de características farmacofóricas consiste de un filtrado intragrupo donde todos los conformeros ($t_i c_j$) se dividen en sus respectivos grupos de tiazoles (t_i) y son comparados a pares, reteniéndose aquellos que se encuentren por arriba del parámetro de Tanimoto (nivel=0.7), lo que indica que son duplicados de la misma molécula. El parámetro de Tanimoto compara los volúmenes de traslape, de las esferas farmacofóricas, entre pares de conformeros para

el mismo tiazol y como regla general cuando dos moléculas tienen volúmenes de traslape similares son consideradas duplicados. De este análisis se retuvo un total de 87 conformeros para los 50 derivados tiazólicos estudiados a partir de los 193 iniciales.

En el segundo paso se combinaron los 87 conformeros ($t_i c_j$) obtenidos en el filtrado intragrupo a través de un filtrado intergrupos donde los conformeros de todos los tiazoles se acomodan de acuerdo al número decreciente de grupos funcionales farmacofóricos y se generan grupos de moléculas con características parecidas, seguidamente todos los conformeros son comparados a pares y aquellos con un valor mayor a 0.7 para el parámetro de Tanimoto son consideradas duplicados y los que tengan un valor mayor a 0.7 del parámetro de Tversky son considerados como parte de ese grupo o en su caso líderes de grupo. El parámetro de Tversky mide la diversidad de las moléculas al calcular la razón entre el volumen de traslape de un par de conformeros y el volumen de las esferas farmacofóricas de la molécula de referencia, siendo aquella con mayor diversidad de características farmacofóricas. Los conformeros con esferas farmacofóricas similares a las de la molécula de referencia y donde el volumen de traslape es similar al volumen de la molécula con mayor diversidad de grupos farmacofóricos obtendrán parámetros de Tversky mayores a 0.7 y cercanos a uno, mientras que los conformeros con esferas farmacofóricas diferentes a la de referencia o con menor volumen de traslape tendrán puntuaciones menores a 0.7 y se considerarán parte de otro grupo. Al final las moléculas que tengan la mayor diversidad de características farmacofóricas para todos los conformeros serán retenidas y las demás descartadas. Esta metodología se encuentra implementada en el código Open3DALIGN.³⁷

En este análisis se obtuvieron un total de siete conformeros dibujados en la **Figura 11**, donde el número resaltado en negritas que acompaña la etiqueta del derivado tiazólico indica el conformero que se retuvo a partir de las conformaciones iniciales.

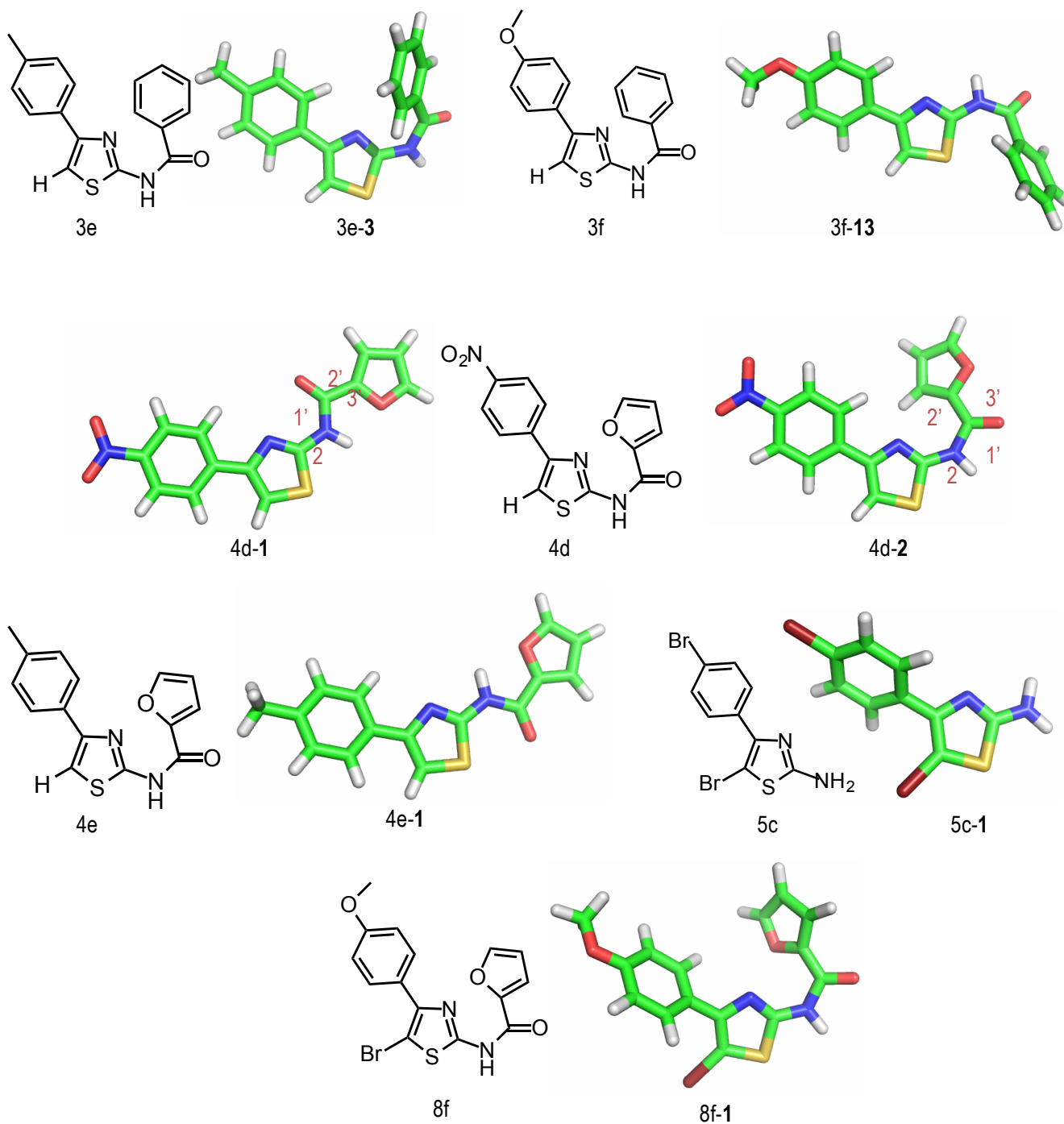


Figura 11. Confórmeros con la mayor diversidad de grupos funcionales.

Es evidente la diversidad de estos confórmeros, por ejemplo: 3e-3 tiene un grupo fenilo unido al carbonilo de la amida mientras que 4d-1 posee un furilo, 5c-1 es el

único que contiene dos átomos de bromo, uno en posición cinco y otro en *para* del fenilo en posición cuatro, 4d-1 y 4d-2 poseen un grupo nitro en la posición *para* del fenilo en posición cuatro, mientras 3f-13 y 8f-1 poseen sendos grupos metoxilo.

Las estructuras 4d-1 y 4d-2 son conformeros de la misma molécula, el conformero 4d-1 posee el furilo unido al carbonilo de la amida en *trans*, ángulo diedro entre los átomos 2, 1', 2', 3' de 180°, mientras que el conformero 4d-2 tiene el mismo grupo en *cis* y un ángulo diedro entre los átomos 2, 1', 2', y 3' de 30°; podemos suponer que este cambio conformacional es relevante debido a que no se traslapan correctamente las esferas farmacofóricas correspondientes al grupo en posición dos del anillo tiazólico, por consiguiente aún con las evaluaciones a pares los puntajes de Tanimoto y Tversky mantienen a ambos conformeros dentro del grupo de los más variados.

Por otro lado los derivados tiazólicos más activos (6b y 6e), cuyo farmacóforo conocido esta formado por una acetamida en posición dos y un bromo en posición cinco no se encuentran entre las más diversas, esto es debido a que dichas características farmacofóricas se consideran como parte de los subgrupos generados, es decir, están consideradas a lo largo de los siete conformeros obtenidos. Dado que éste conjunto de conformeros representa la mayor diversidad de grupos funcionales farmacofóricos se utilizaron como plantilla para el alineado molecular basado en la diversidad de farmacóforos, en la **Figura 12** se presentan los conformeros de los derivados tiazólicos alineados sobre las plantillas encontradas con ésta estrategia.

Las puntuaciones de ajuste obtenidas para cada grupo de alineado fueron: A3e-3 (6419.73), A3f-13 (5771.45), A4d-1(6778.89), A4d-2 (6995.20), A4e-1(6092.26), A5c-1(5053.27), A8f-1(6433.82). Se puede observar que el grado de ajuste varía mucho entre los siete grupos de alineado, los grupos de alineado donde el ajuste no es bueno y los grupos funcionales se encuentran más dispersos presentan menores puntuaciones como es el caso de A3f-13, A4e-1 y A5c-1.

Aunque esta estrategia ha sido utilizada con anterioridad por algunos grupos de investigación, se tienen reportes de que el alineado basado en la diversidad de los farmacóforos no siempre es eficiente, ya que se obliga a los conformeros a adoptar la estructura de la plantilla, ocasionando que los grupos funcionales pertenecientes a las diferentes esferas farmacofóricas, no logren ajustarse a ésta, la consecuencia directa es la generación de modelos QSAR-3D poco predictivos.^{41,49}

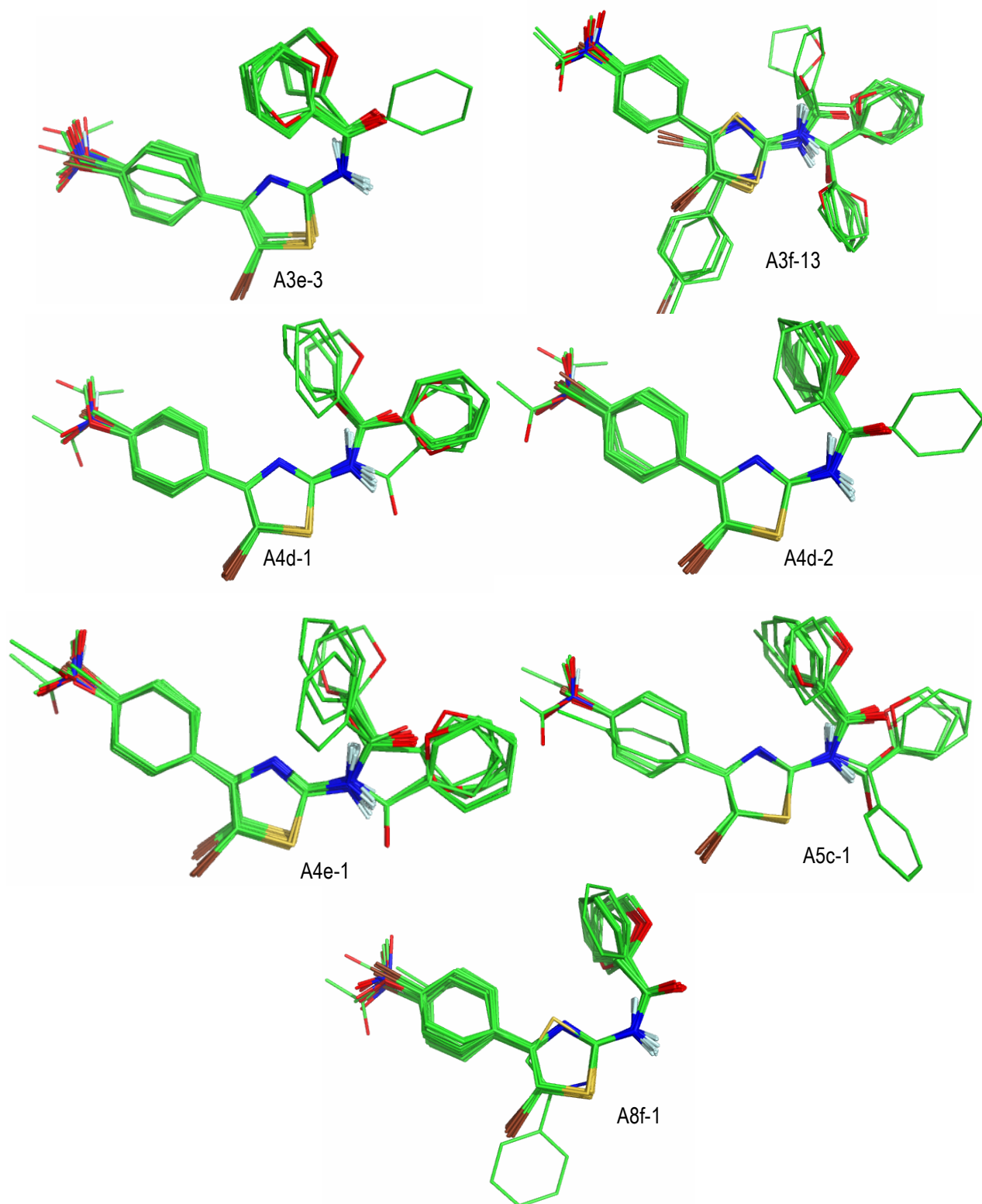


Figura 12. Alineado de los conformeros de los 50 derivados tiazólicos sobre las plantillas con mayor diversidad farmacofórica.

Alineado basado en múltiples conforméros.

Una estrategia recientemente implementada debido al avance en los códigos de alineado, es el caso del Open3DALIGN, consiste en utilizar todos los conforméros de la base de datos como plantillas y escoger el o los grupos de alineado que presenten el mejor grado de ajuste. A partir de esta aproximación se obtuvieron un total de 193 grupos de alineado, una manera de disminuir esta cantidad de grupos es a través de las funciones de puntuación previamente mencionadas. Tomando esto en consideración se seleccionó el grupo de alineado A8d-5 (**Figura 13**), el cual generó la mejor puntuación (P=7123.94) de un total de 193 grupos de alineado.

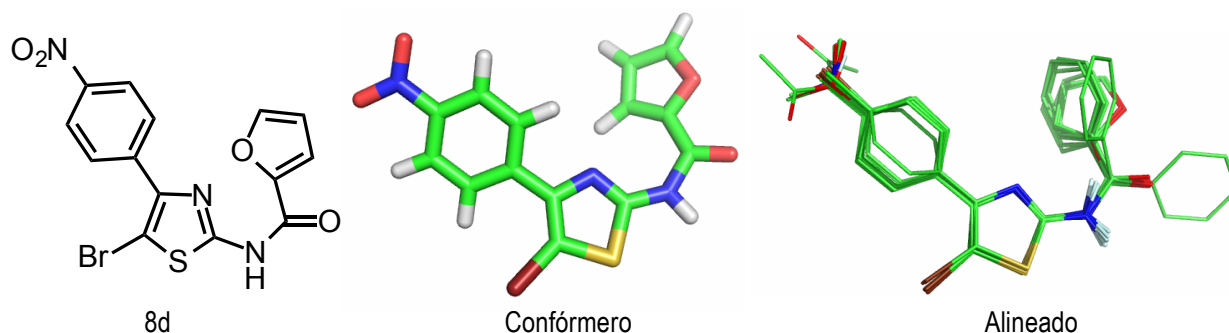


Figura 13. Estructura del conformero 8d-5 y el alineado A8d-5.

En la **Tabla 4** se presenta la comparación de las puntuaciones de ajuste obtenidas para cada uno de los grupos de alineado generados con las tres estrategias y criterios mencionados con anterioridad.

Tabla 4. Puntuaciones de alineado ordenadas de acuerdo a la estrategia utilizada y en orden creciente.

Criterio	Grupo	Puntuación
1.Bioactividad	A6e-2	6263.4
	A6e-1	6266
2.Farmacofórico	A5c-1	5053.27
	A3f-13	5771.45
	A4e-1	6092.26
	A3e-3	6419.73
	A8f-1	6433.82
	A4d-1	6778.89
	A4d-2	6995.20
3.Conformacional	A8d-5	7123.94

De acuerdo con los resultados de la **Tabla 4** el mejor alineado es el correspondiente al grupo A8d-5, obtenido de la estrategia de alineado con multi-conforméros y seguido por el grupo A4d-2, perteneciente al alineado farmacofórico, por

lo cual hay una buena posibilidad de que uno de los mejores modelos QSAR-3D se genere a partir de estas plantillas. La diferencia estructural entre los conformeros 8d-5 y 4d-2 consiste en la presencia del átomo de bromo en la posición cinco del anillo tiazólico en el primero y su ausencia en el segundo, de igual manera, el conformero cinco y el conformero dos son los conformeros más energéticos obtenidos para 8d y 4d respectivamente, las energías de ambos conformeros se encuentran fuera del rango de 0-3 kcal/mol asignado en la metodología para los conformeros analizados; esta situación observada en ambos conformeros se debe a que pertenecen a las estructuras que fueron inicialmente optimizadas con DFT y reoptimizadas con mecánica molecular⁵¹ y que se mantuvieron dentro de la biblioteca de compuestos, a pesar de no cumplir el criterio energético, como parte de la metodología recomendada por la literatura. Por el contrario los conformeros 4d-1, 8f-1, 6e-1, 3f-13 y 5c-1, sí se encuentran dentro del rango energético de 0-3 kcal/mol. Partiendo de los grupos alineados presentados en la **Tabla 4** se llevó a cabo la generación de los modelos QSAR-3D.

Selección de grupos de validación

Para la validación externa de los modelos QSAR-3D se requiere remover una parte de las moléculas de entrenamiento y generar un grupo de validación, por lo cual antes de comenzar a generar los modelos es necesario definir el grupo de validación.

En la **Tabla 5** se encuentran señalados los tres grupos de validación, el grupo uno (G1) se generó manteniendo las moléculas más y menos activas dentro del grupo de entrenamiento, las moléculas del grupo dos (G2) son las mismas utilizadas para el QSAR-2D y el grupo 3 (G3) se escogió al azar; en la **Figura 14** se presenta un gráfico con las distribuciones de los pCl_{50} en los grupo de validación uno, dos y tres con respecto al total.

Tabla 5. Grupos de validación seleccionados para los modelos QSAR-3D.

D.	Cl ₅₀ (μM)	G1	G2	G3	D.	Cl ₅₀ (μM)	G1	G2	G3
1a	108.26		X		5a	59.97			X
1b	29.29	X	X		5b	23.21		X	
1c	16.97	X			5c	11.05			X
1d	35.75				5d	27.82		X	
1e	20.29			X	5e	40.42			
1f	98.61	X		X	6a	1.95	X		
1g	45.88				6b	0.87			
2a	50.76	X		X	6c	9.31	X		
2b	142.13				6d	9.03			
2c	96.21		X		6e	0.39		X	
2d	9.72				6f	2.51			
2e	39.39				7a	36.80	X		
2f	30.77				7b	11.61	X		
3a	44.12				7c	29.05		X	X
3b	119.79				7d	25.16			
3c	78.42	X			7e	16.70			X
3d	22.13	X			7f	9.97			
3e	56.77	X			8a	8.68			
3f	8.70				8b	58.83			
4a	16.50				8c	42.23			X
4b	43.64	X	X		8d	7.20		X	X
4c	38.09			X	8e	31.30			
4d	42.78		X		8f	1.66		X	X
4e	17.09				9	56.28		X	
4f	19.41				10	2.90	X	X	

D- Compuesto, Cl₅₀-Concentración mínima inhibitoria, G1-grupo de validación uno, G2-grupo de validación dos, G3-grupo de validación tres.

En la **Figura 14** se puede observar la distribución de las actividades biológicas en pCl₅₀ (log 1/Cl₅₀) de todos los tiazoles comparada con la distribución en los grupos de validación, en general se observa que los tiazoles poseen actividades con una distribución normal y que la mayoría de las moléculas se encuentran dentro del rango de 4.0 a 6.0. En el caso del grupo de validación 1 y 3 se omitieron las actividades dentro del rango 3.0-4.0 y 6.0-7.0 ya que la estrategia de selección consistió en mantener fuera de éste las dos moléculas más activas y las dos menos activas. Por otro lado el G2 presenta una distribución normal, con moléculas de todos los rangos de pCl₅₀.

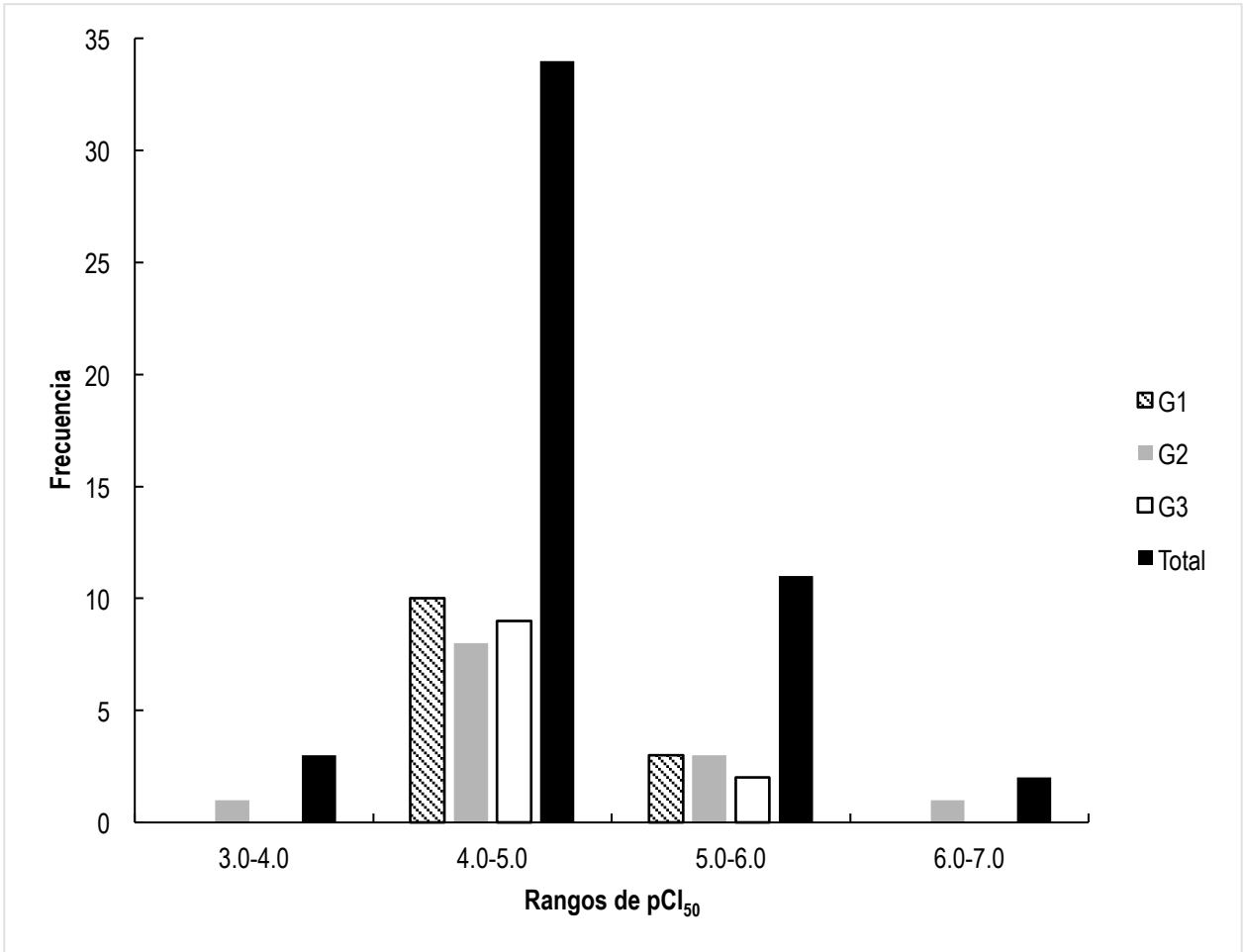


Figura 14. Distribución de los pCl₅₀ en los grupos de validación.

Modelos QSAR-3D obtenidos.

La generación de los modelos QSAR-3D se llevó a cabo utilizando los 10 grupos de alineado y los tres grupos de validación externa generados al azar, por tanto se obtuvieron 30 modelos QSAR-3D. Para la generación de los 30 modelos se calcularon las variables respectivas de energía estérica y electrostática, en la **Figura 15** se puede observar que dichas variables, calculadas para cada punto de la malla y para cada molécula, se acomodan formando una matriz X, donde Y hace referencia al logaritmo de la actividad biológica conocida (pCl₅₀).

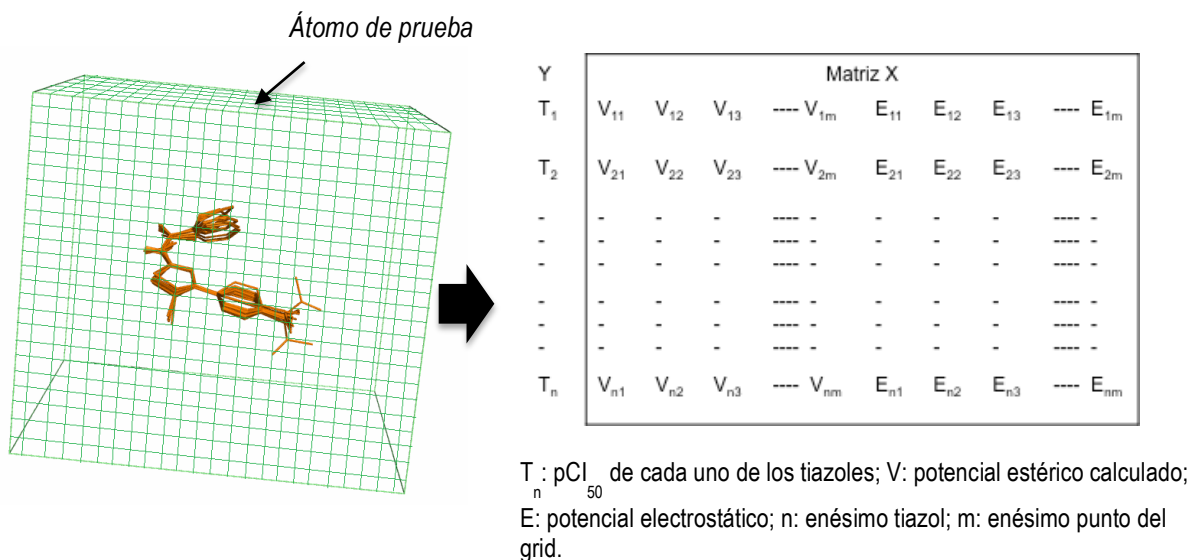


Figura 15. Esquema representativo del cálculo de potenciales en un QSAR-3D.

En la **Tabla 6** se presentan los modelos QSAR-3D obtenidos para todos los grupos de alineación calculados con cada uno de los grupos de validación. Para elegir el mejor modelo QSAR-3D generado se analizaron los parámetros estadísticos obtenidos.

En el apartado de parámetros estadísticos están el coeficiente de determinación (R^2) que para un buen modelo debe ser mayor a 0.7, la F de Fisher, estadístico muy utilizado para evaluar la significancia del modelo y que debe ser mayor o igual a 5.06 con un índice de confianza de $\alpha=0.01$; valores grandes de F aumentan la confianza en el carácter predictivo del mismo, ya que es un indicativo del ajuste de una ecuación lineal con el grupo de entrenamiento y los parámetros de validación interna, que deben ser mayores a 0.5 unidades e indican la capacidad del modelo para predecir las moléculas que forman parte del grupo de entrenamiento así como la robustez del mismo. Seguidamente se encuentra el coeficiente de predicción externa (R_{ext}^2) el cual para considerar un modelo predictivo debe ser mayor a 0.6 y la desviación estándar externa ($SDEP_{ext}$) lo más cercana a cero.⁵⁵⁻⁶²

La diferencia entre R^2 y R_{ext}^2 se utiliza para evaluar si el modelo está o no sobreestimado (*overfitting* en inglés), lo cual quiere decir que solo tiene la capacidad de predecir las moléculas pertenecientes al grupo de entrenamiento y no puede predecir adecuadamente las externas, esta diferencia debe ser cercana a cero. Por último se evalúa la robustez con Q_{al}^2 , este parámetro debe ser menor a la Q_{LOO}^2 , es decir menor a 0.5 y mientras más pequeño mejor, ya que esto indica que el modelo no fue generado por casualidad y que se trata de un modelo robusto.⁵⁵⁻⁶²

Los modelos 1, 7, 17, 25 y 28 presentaron valores de R_{ext}^2 mayores a 0.6, sin embargo, los coeficientes de validación cruzada de los primeros cuatro ($Q_{L33\%O}^2$, $Q_{L20\%O}^2$) están por debajo de 0.5, por lo cual el único modelo que cumple con los límites señalados para los parámetros estadísticos es el modelo 28. En el caso del modelo 1, éste se creó a partir del grupo de alineado A6e-2, el cual tienen una puntuación de ajuste tres puntos menor a la del A6e-1, esto nos indica que la puntuación de ajuste no siempre generará el mejor modelo QSAR-3D, sin embargo los modelos 25 y 28 presentaron el mayor poder predictivo de entre los 30 modelos QSAR-3D calculados con R_{ext}^2 de 0.84 y 0.78 respectivamente, dichos modelos se obtuvieron a partir de los grupos de alineado A4d-2 y A8d-5 los cuales presentaron la segunda y primera mejor puntuación de ajuste (P); por lo cual se puede concluir que para los tiazoles estudiados se cumple que a mejor puntuación de ajuste mayor predictividad del modelo QSAR-3D.⁴¹

Tabla 6. Modelos QSAR 3D generados para todos los grupos de alineado.

#	Grupo Alineación	#CP	# M.A.	G	Parámetros estadísticos												
					R ²	F	Q _{L00} ²	SDEP _{int}	Q _{LTO} ²	Q _{L33%O} ²	Q _{L20%O} ²	Q _{L10%O} ²	R _{ext} ²	SDEP _{ext}	R ² -R _{ext} ²	Q _{al} ²	SE _{al}
Bioactividad																	
1	A6e-2	6	6	1	0.76	14	0.55	0.38	0.54	0.45	0.48	0.52	0.71	0.30	0.05	0.28	0.49
2	A6e-2	7	4	2	0.77	12	0.53	0.34	0.51	0.17	0.40	0.49	0.53	0.49	0.24	0.17	0.45
3	A6e-2	6	5	3	0.82	21	0.63	0.36	0.62	0.55	0.61	0.60	0.41	0.37	0.41	0.45	0.44
4	A6e-1	4	5	1	0.76	22	0.56	0.38	0.56	0.52	0.57	0.56	0.58	0.34	0.18	0.43	0.44
5	A6e-1	3	4	2	0.71	24	0.49	0.35	0.48	0.41	0.43	0.47	0.37	0.55	0.34	0.36	0.39
6	A6e-1	4	5	3	0.73	20	0.52	0.39	0.53	0.48	0.52	0.51	0.03	0.35	0.69	0.33	0.47
Farmacóforos																	
7	A5c-1	4	5	1	0.81	32	0.53	0.38	0.52	0.45	0.49	0.50	0.65	0.28	0.16	0.26	0.47
8	A5c-1	8	4	2	0.83	15	0.54	0.33	0.53	0.34	0.44	0.49	0.59	0.44	0.24	0.13	0.44
9	A5c-1	3	3	3	0.76	35	0.61	0.36	0.60	0.55	0.59	0.60	0.52	0.34	0.24	0.48	0.41
10	A3f-13	7	3	1	0.91	38	0.63	0.33	0.62	0.46	0.55	0.62	-0.33	0.58	1.24	0.23	0.48
11	A3f-13	8	0	2	0.85	20	0.63	0.29	0.62	0.42	0.52	0.57	0.45	0.53	0.40	0.43	0.36
12	A3f-13	6	1	3	0.82	24	0.53	0.39	0.53	0.45	0.49	0.53	-0.36	0.56	1.18	0.35	0.46
13	A4e-1	7	3	1	0.77	14	0.52	0.39	0.51	0.36	0.44	0.53	0.55	0.34	0.22	0.26	0.48
14	A4e-1	6	3	2	0.79	19	0.56	0.31	0.55	0.37	0.52	0.56	0.53	0.44	0.26	0.45	0.35
15	A4e-1	2	1	3	0.47	16	0.28	0.48	0.28	0.21	0.25	0.27	-0.15	0.39	0.62	0.20	0.50
16	A3e-3	5	6	1	0.84	27	0.65	0.32	0.65	0.57	0.62	0.65	0.45	0.39	0.39	0.51	0.39
17	A3e-3	2	5	2	0.66	29	0.53	0.33	0.53	0.47	0.52	0.52	0.62	0.41	0.04	0.42	0.34
18	A3e-3	7	5	3	0.81	17	0.61	0.36	0.61	0.42	0.59	0.60	0.79	0.22	0.01	0.41	0.44
19	A8f-1	7	5	1	0.79	14	0.45	0.43	0.42	0.14	0.27	0.35	0.48	0.37	0.31	0.19	0.52
20	A8f-1	3	3	2	0.56	13	0.29	0.41	0.29	0.22	0.25	0.29	0.36	0.57	0.20	0.14	0.45
21	A8f-1	4	5	3	0.72	20	0.56	0.38	0.56	0.49	0.54	0.55	0.30	0.42	0.42	0.47	0.42
22	A4d-1	7	1	1	0.61	6	0.15	0.51	0.11	-0.57	-0.32	-0.072	0.61	0.33	0	-0.30	0.64
23	A4d-1	3	3	2	0.68	22	0.37	0.40	0.36	0.26	0.35	0.36	0.37	0.53	0.31	0.33	0.42
24	A4d-1	4	5	3	0.75	25	0.43	0.43	0.42	0.23	0.36	0.39	0.05	0.36	0.70	0.28	0.48
25	A4d-2	8	6	1	0.85	18	0.60	0.36	0.59	0.41	0.53	0.56	0.78	0.27	0.07	0.11	0.54

#	Grupo alineación	#CP	# M.A.	G	Parámetros estadísticos												
					R ²	F	Q _{LOO} ²	SDEP _{int}	Q _{LTO} ²	Q _{L33%O} ²	Q _{L20%O} ²	Q _{L10%O} ²	R _{ext} ²	SDEP _{ext}	R ² -R _{ext} ²	Q _{al} ²	SE _{al}
26	A4d-2	6	8	2	0.86	25	0.72	0.26	0.71	0.43	0.68	0.68	0.13	0.6	0.73	0.41	0.38
27	A4d-2	6	5	3	0.85	26	0.68	0.32	0.67	0.52	0.64	0.66	-1.59	0.58	2.44	0.41	0.44
Conformacional																	
28	A8d-5	6	5	1	0.83	23	0.60	0.36	0.59	0.53	0.56	0.59	0.84	0.22	-0.01	0.34	0.46
29	A8d-5	6	4	2	0.81	19	0.52	0.32	0.51	0.34	0.42	0.46	0.40	0.56	0.41	0.27	0.40
30	A8d-5	7	5	3	0.82	17	0.64	0.34	0.64	0.56	0.61	0.62	0.09	0.46	0.73	0.34	0.46

R²: coeficiente de determinación, F: estadístico de Fisher, Q_{LOO}², Q_{LTO}²: Coeficientes de validación cruzada con una y dos moléculas fuera, SDEP_{int}: desviación estándar para la validación interna, Q_{L33%O}², Q_{L20%O}², Q_{L10%O}²: Coeficientes de validación cruzada con 33, 30 y 10% de moléculas fuera, R_{ext}²: coeficiente de validación externa, SDEP_{ext}: Desviación estándar para la validación externa, Q_{al}²: Coeficiente de aleatorización, SE_{al}: Desviación estándar de aleatorización.

DetECCIÓN DE MOLÉCULAS ATÍPICAS

Uno de los factores que afecta la estabilidad de los modelos QSAR-3D es la presencia de moléculas atípicas, las cuales deben ser detectadas y analizadas con mucho cuidado para determinar su relevancia dentro del modelo. En general las moléculas atípicas hacen referencia a valores extremos de actividad biológica (*cliffs* en inglés) ya sea valores muy grandes o muy pequeños dentro de un grupo de compuestos similares, por lo cual son puntos donde la hipótesis inicial del QSAR que dice “*Compuestos similares tienen propiedades similares*” no se cumple.⁶³⁻⁶⁵

Como se mencionó anteriormente, el modelo 28 presentó la mayor consistencia en todo su conjunto de parámetros estadísticos y además es el que se formó a partir del grupo de alineado con la mayor puntuación de ajuste y el grupo de validación uno (G1), obteniendo una $Q_{ai}^2 < Q_{LOO}^2$ por lo cual se trata de un modelo robusto y estable; de este modelo se extrajeron cinco moléculas que cumplen con el criterio de comportamiento atípico: 2d, 3a, 3d, 6c y 7b, sin embargo, se observó que 3a, 3d y 7b no se alinean a la plantilla 8d-5 (**Figura 16**). Tomando esto en consideración se procedió a realizar un análisis conformacional más riguroso utilizando un mayor número de procesadores para el cálculo de QMD y se encontraron conformeros de las moléculas 3a, 3d y 7b que si se alinean a la plantilla correspondiente; como resultado de este análisis se generó un grupo de alineado A8d-5* y a partir de éste se calculó un segundo modelo al cual se le etiquetó como modelo 31, este modelo es 0.01 unidades más predictivo que el modelo 28, por lo tanto es el mejor modelo QSAR-3D generado para los derivados tiazólicos estudiados. Los modelos 28 y 31 se presentan en la **Tabla 7**.

En el modelo 31 se encontraron cuatro moléculas con comportamiento atípico, es decir una menos que en el modelo 28, las moléculas con comportamiento atípico encontradas son 1f, 2d, 3d, 6c, es decir que en el nuevo modelo los derivados 3a y 7b ya no presentan comportamiento atípico, sin embargo la molécula 3d sigue contándose entre las moléculas con comportamiento atípico a pesar de haberse alineado mejor a la plantilla 8d-5.

En la **Tabla 8** se encuentran todos los derivados de tiazol del grupo inicial con sus respectivos valores de actividad anti-giardíasis (CI_{50}); en esta tabla se observa que los derivados tiazólicos se encuentran clasificados originalmente en familias, las cuales se diferencian en la presencia de un grupo funcional en *para* del fenilo en posición cuatro del anillo tiazólico.

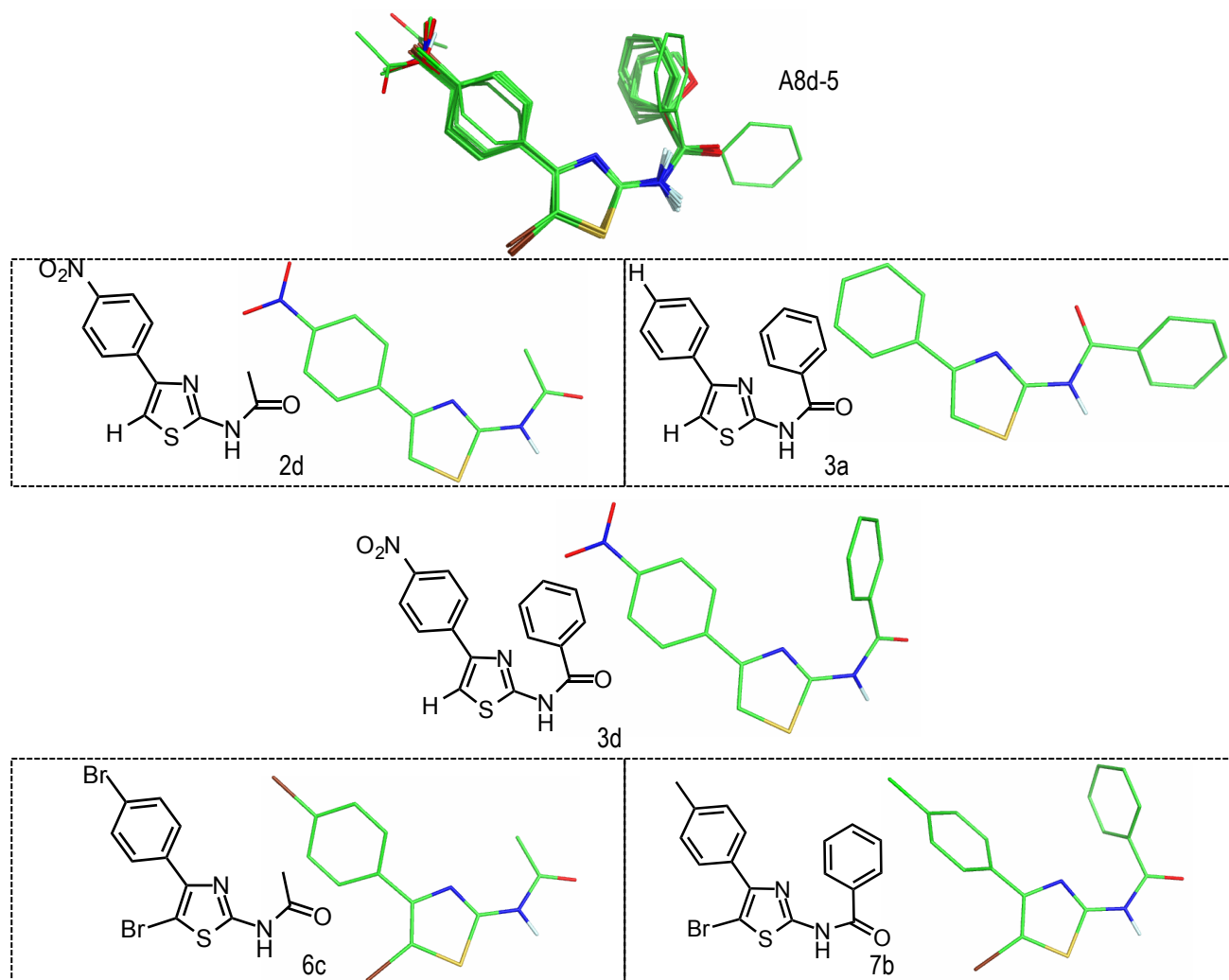


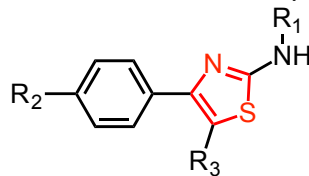
Figura 16. Moléculas con comportamiento atípico del modelo 28.

Tabla 7. Modelo original y refinado para los 2-amino-4-aryl-1,3-tiazólicos.

#	Grupo Alineación	#CP	# M.A.	G	Parámetros estadísticos												
					R ²	F	Q _{L00} ²	SDEP _{int}	Q _{LTO} ²	Q _{L33%O} ²	Q _{L20%O} ²	Q _{L10%O} ²	R _{ext} ²	SDEP _{ext}	R ² -R _{ext} ²	Q _{al} ²	SE _{al}
28	A8d-5	6	5	1	0.83	23	0.60	0.36	0.59	0.53	0.56	0.59	0.84	0.22	-0.01	0.34	0.46
31	A8d-5*	6	4	1	0.83	23	0.60	0.36	0.59	0.50	0.57	0.60	0.85	0.20	-0.02	0.32	0.46

*Grupo de alineado obtenido con nuevos conformeros de 3a y 7b.

Tabla 8. Derivados tiazólicos estudiados clasificados por familias.



D.	R ₁	R ₂	R ₃	Cl ₅₀ (μM)	D.	R ₁	R ₂	R ₃	Cl ₅₀ (μM)
Familia 1					Familia 5				
1a	H	H	H	108.26	5a	H	H	Br	59.97
1b	H	Cl	H	29.29	5b	H	Cl	Br	23.21
1c	H	Br	H	16.97	5c	H	Br	Br	11.05
1d	H	NO ₂	H	35.75	5d	H	NO ₂	Br	27.82
1e	H	Me	H	20.29	5e	H	Me	Br	40.42
1f* ²	H	OMe	H	98.61	Familia 6				
1g	H	OH	H	45.88	6a	Ac	H	Br	1.95
Familia 2					6b	Ac	Cl	Br	0.87
2a	Ac	H	H	50.76	6c* ^{1,2}	Ac	Br	Br	9.31
2b	Ac	Cl	H	142.13	6d	Ac	NO ₂	Br	9.03
2c	Ac	Br	H	96.21	6e	Ac	Me	Br	0.39
2d* ^{1,2}	Ac	NO ₂	H	9.72	6f	Ac	OMe	Br	2.51
2e	Ac	Me	H	39.39	Familia 7				
2f	Ac	OMe	H	30.77	7a	Bz	H	Br	36.80
Familia 3					7b* ¹	Bz	Cl	Br	11.61
3a* ¹	Bz	H	H	44.12	7c	Bz	Br	Br	29.05
3b	Bz	Cl	H	119.79	7d	Bz	NO ₂	Br	16.70
3c	Bz	Br	H	78.42	7e	Bz	Me	Br	25.16
3d* ^{1,2}	Bz	NO ₂	H	22.13	7f	Bz	OMe	Br	9.97
3e	Bz	Me	H	56.77	Familia 8				
3f	Bz	OMe	H	8.70	8a	Furoil	H	Br	8.68
Familia 4					8b	Furoil	Cl	Br	58.83
4a	Furoil	H	H	16.50	8c	Furoil	Br	Br	42.23
4b	Furoil	Cl	H	43.64	8d	Furoil	NO ₂	Br	7.20
4c	Furoil	Br	H	38.09	8e	Furoil	Me	Br	31.30
4d	Furoil	NO ₂	H	42.78	8f	Furoil	OMe	Br	1.66
4e	Furoil	Me	H	17.09	Derivados 9 y 10				
4f	Furoil	OMe	H	19.41	9	Ac	OAc	Br	56.28
					10	Ac	OAc	Br	2.90

D-Derivados, *Moléculas con comportamiento atípico en el modelo 28 (1) y en el modelo 31(2).

Los derivados 2d, 3d y 6c presentaron valores atípicos tanto en el modelo 28 como en el 31, en el caso del derivado 2d su actividad (9.72 μM) es atípica ya que se

encuentra por debajo del rango de la familia 2 (30.77-142.12 μM) por lo cual se considera un valor extremo (*cliff*, en inglés); algo similar ocurre en el caso de 6c (9.31 μM) donde el rango es de 0.39 a 9.03 μM ; por otro lado el comportamiento atípico de la molécula 3d no es tan evidente pues presenta un Cl_{50} de 22.13 μM que esta en el rango de la familia 3 (119.79-8.70 μM), lo que nos dice que probablemente no sigue el mismo mecanismo de acción que los demás derivados.^{64,65}

Análisis del mejor modelo de QSAR-3D generado.

De acuerdo con los resultados estadísticos ($R^2=0.83$) se puede esperar que la distribución de los datos sea cercana a la forma $y=x$, lo cual se observa en la **Figura 17** donde se graficó la actividad experimental contra la teórica obtenidas del modelo 31, este gráfico indica que hay un buen balance en términos de la capacidad predictiva del modelo. También se observa que la distribución del grupo de validación con respecto al de entrenamiento es homogénea y las moléculas con comportamiento atípico encontradas, señaladas con círculos blancos, se encuentran fuera de la tendencia lineal del modelo.

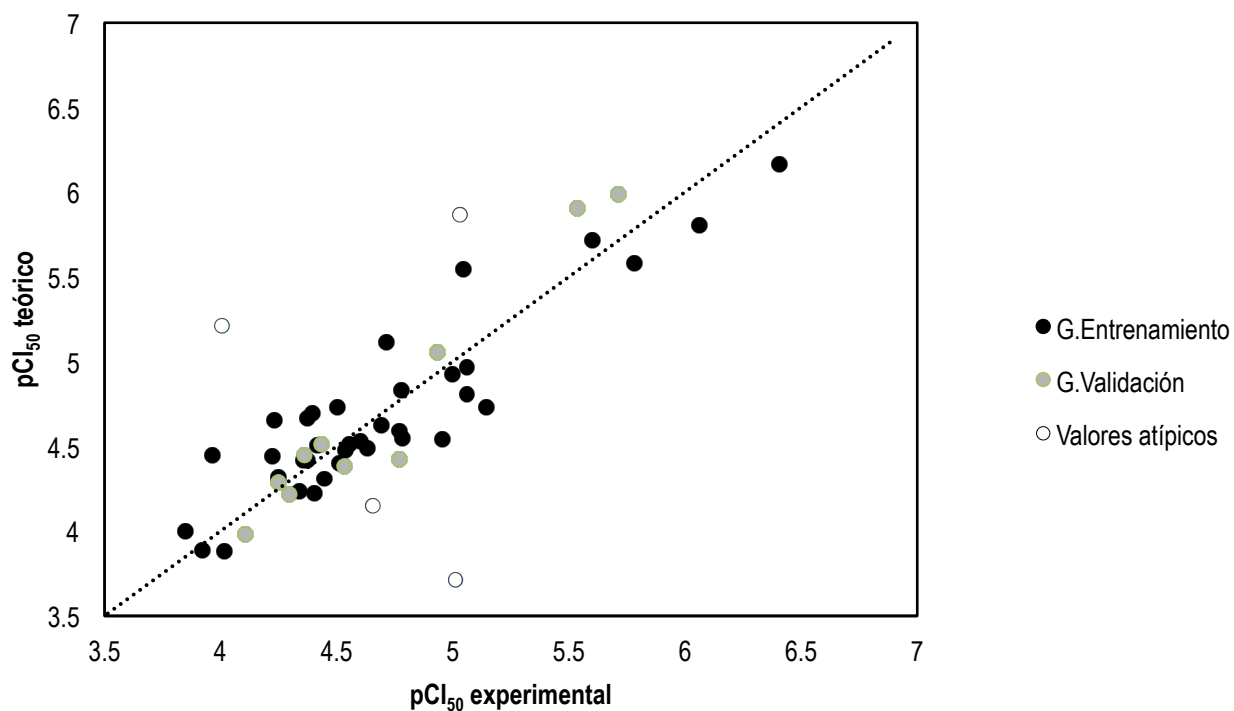


Figura 17. Gráfico de la correlación entre actividades predichas y experimentales.

En la **Figura 18** se presenta el gráfico de residuales (pCl_{50} experimental menos teórico) para cada uno de los 46 derivados tiazólicos analizados, sin contar las moléculas atípicas; los residuales se interpretan como la varianza no explicada por el

modelo lineal y se consideran el error de predicción, los residuales están formados por dos componentes: error al azar y el error sistemático. Los errores al azar puede medirse fácilmente con parámetros estadísticos a través de la validación del modelo, sin embargo los errores sistemáticos no son fáciles de determinar. Cuando un modelo presenta errores sistemáticos la distribución de residuales alrededor del cero presenta un patrón determinado, por el contrario cuando los errores se distribuyen al azar y la media de los errores de predicción (residuales) es cercana a cero se puede decir que no hay presencia de error sistemático.^{63,70}

En el caso de los datos analizados es posible observar que los residuales se encuentran distribuidos de manera aleatoria (**Figura 18**) y que las moléculas pertenecientes al grupo de validación presentan un comportamiento similar al del grupo de entrenamiento. En la zona de pCl_{50} entre 5.7 y 6.5 perteneciente a las moléculas más activas cuyos residuales van de 0.25 a 0.3 aproximadamente, se observa un patrón casi lineal, es decir que en esta región el modelo predice errores similares para las moléculas más activas, esto podría ser indicativo de un error sistemático en la medición de las actividades biológicas *in vitro* de los derivados tiazólicos. Al medir la media de error se observa que es de -0.006, muy cercana a cero, por lo cual a pesar de observar la presencia de un patrón entre 5.7 y 6.5 es probable que se trate de una casualidad.

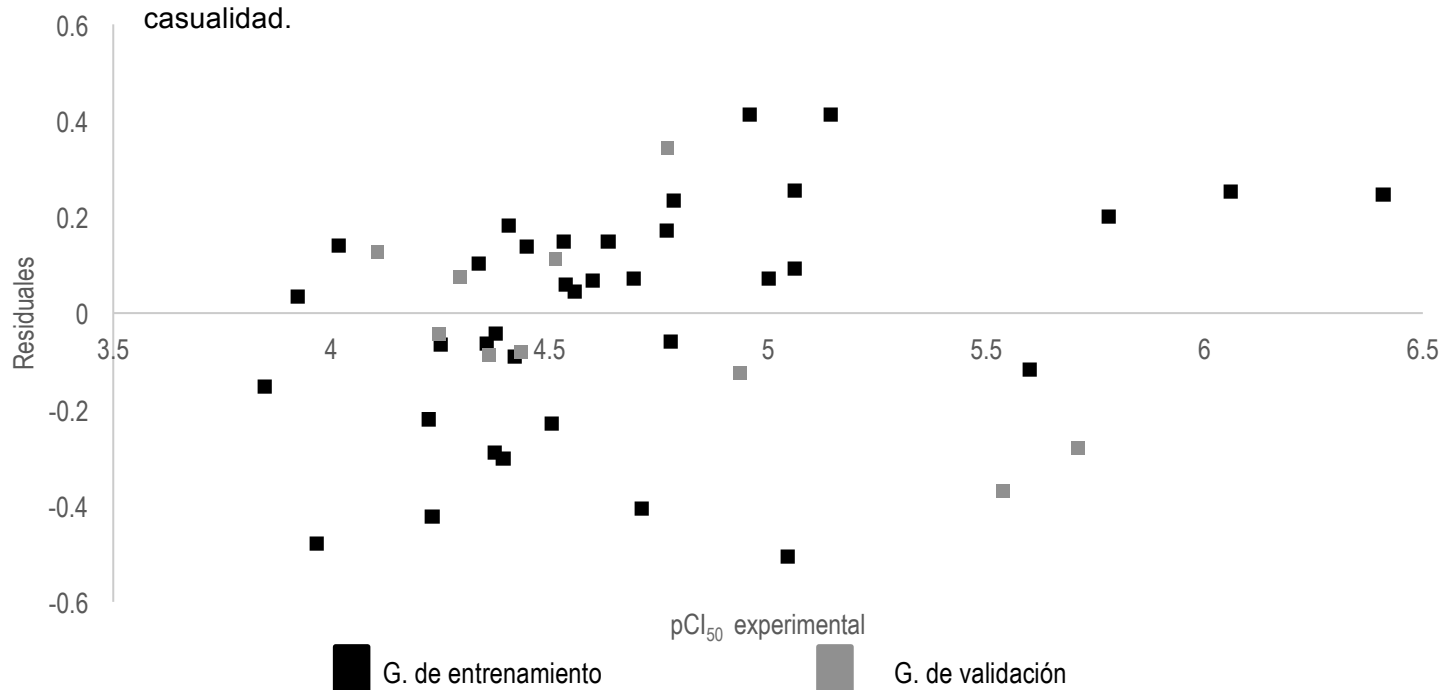


Figura 18. Gráfico de los residuales para el mejor modelo QSAR-3D generado.

En la **Tabla 9** se presentan todos los derivados tiazólicos incluidas las moléculas con comportamiento atípico y sus residuales. Los rangos de residuales van de -0.50 a 0.41, tomando en consideración únicamente las moléculas con las que se generó el

modelo en total 21 derivados presentan residuales negativos y 25 derivados presentan residuales positivos, de los cuales seis compuestos tienen residuales mayores a 0.4 y menores de -0.4. La media de los residuales fue de -0.006, como se mencionó anteriormente, y la media de errores para la predicción del grupo de validación fue de -0.029, ambos cercanos a cero. Tomando en consideración trabajos previos de QSAR-3D⁷¹⁻⁷³ los valores de residuales obtenidos se encuentran en el rango de un modelo predictivo.

Tabla 9. Residuales obtenidas de las predicciones con el mejor modelo QSAR-3D

D.	pCl ₅₀ Exp.	pCl ₅₀ teórico	residuales	D.	pCl ₅₀ Exp.	pCl ₅₀ teórico	residuales
1a	3.97	4.45	-0.48	5a	4.22	4.44	-0.22
1b ^v	4.53	4.38	0.15	5b	4.63	4.49	0.15
1c ^v	4.77	4.43	0.34	5c	4.96	4.54	0.41
1d	4.45	4.31	0.14	5d	4.56	4.51	0.04
1e	4.69	4.62	0.07	5e	4.39	4.70	-0.30
1f ^{*v}	4.01	5.21	-1.21	6a ^v	5.71	5.99	-0.28
1g	4.34	4.24	0.10	6b	6.06	5.81	0.25
2a ^v	4.29	4.22	0.07	6c ^{*v}	5.03	5.87	-0.84
2b	3.85	4.00	-0.15	6d	5.04	5.55	-0.51
2c	4.02	3.88	0.14	6e	6.41	6.16	0.25
2d [*]	5.01	3.71	1.30	6f	5.60	5.72	-0.12
2e	4.41	4.22	0.18	7a ^v	4.43	4.51	-0.08
2f	4.51	4.40	0.11	7b ^v	4.94	5.06	-0.12
3a	4.36	4.42	-0.06	7c	4.54	4.48	0.06
3b	3.92	3.89	0.03	7d	4.78	4.84	-0.06
3c ^v	4.11	3.98	0.13	7e	4.60	4.53	0.07
3d ^{*v}	4.66	4.15	0.50	7f	5.00	4.93	0.07
3e ^v	4.25	4.29	-0.04	8a	5.06	4.81	0.25
3f	5.06	4.97	0.09	8b	4.23	4.65	-0.42
4a	4.78	4.55	0.23	8c	4.37	4.66	-0.29
4b ^v	4.36	4.45	-0.09	8d	5.14	4.73	0.41
4c	4.42	4.51	-0.09	8e	4.50	4.73	-0.23
4d	4.38	4.42	-0.04	8f	5.78	5.58	0.20
4e	4.77	4.59	0.17	9	4.25	4.32	-0.07
4f	4.71	5.12	-0.41	10 ^v	5.54	5.91	-0.37

pCl₅₀= log (1/Cl₅₀), *moléculas atípicas, ^vgrupo de validación

De igual forma se analizó la similitud entre los pCl₅₀ *in vitro* y teóricos utilizando la **Figura 19** desde esta perspectiva es posible observar la capacidad predictiva del modelo por familia, por ejemplo: se puede observar que en la región de la familia 4, la cual posee furamida en posición dos e hidrógeno en posición cinco del anillo tiazólico y

la familia 8, la cual a diferencia de la familia 4 posee un átomo de bromo en posición cinco, los residuales para algunas moléculas están por arriba de 0.4 esto pasa específicamente en el caso de los derivados 4f, 8b y 8d, mientras que el resto de los derivados pertenecientes a estas familias presentan errores entre 0.09 y 0.29, esto sugiere la presencia de error sistemático debido a las mediciones de las actividades *in vitro*.

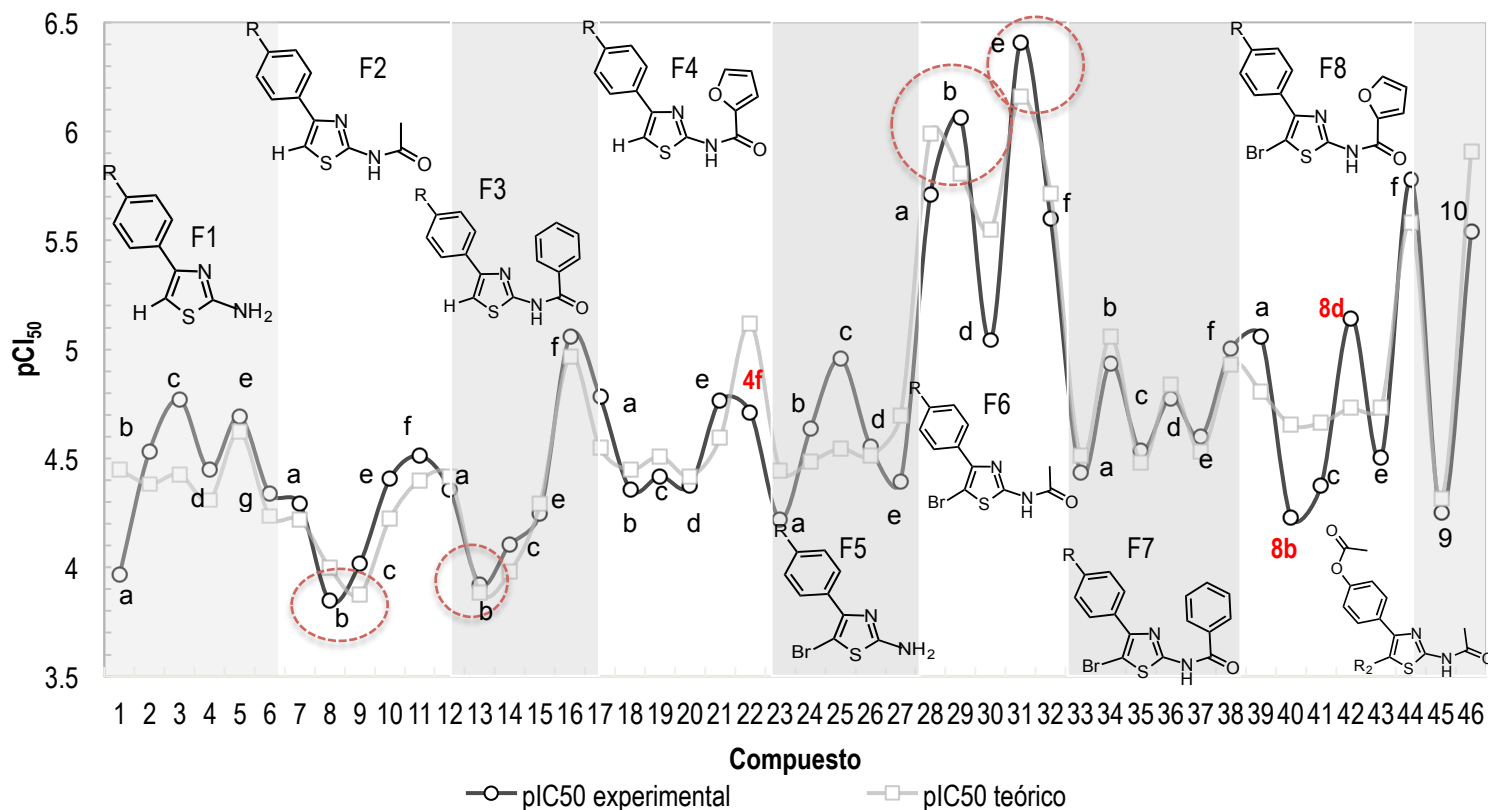


Figura 19. Gráfico de la relación entre la actividad predicha y la actividad experimental de los derivados tiazólicos clasificados por familias(F). Donde R puede ser a-H, b-Cl, c-Br, d-NO₂, e-CH₃, f-OCH₃ o g-OH y R₂ puede ser 9-H o 10-Br.

En la familia 6 se encuentran las moléculas con mayor actividad antiangiogénica éstas presentan en su estructura un grupo acetamida en posición dos, un átomo de bromo en posición cinco y en *para* del fenilo en posición cuatro presentan diferentes grupos funcionales, en el caso del análogo 6d, el cual posee en *para* del fenilo en posición cuatro un grupo nitro, se observó un error de -0.51 con respecto al valor experimental de actividad antiangiogénica, esto es interesante ya que la mayoría de los derivados pertenecientes a la familia 6 presentaron errores menores a 0.3.

Las variaciones encontradas tienen sentido al analizar los valores de Cl₅₀ experimental en los análogos de la familia 6; para los derivados 6a, 6b, 6c, 6d, 6e y 6f se reportan²¹ Cl₅₀ de 1.95, 0.87, 9.31, 9.03, 0.39 y 2.51 μM, el análogo 6c tiene el

mayor Cl_{50} experimental y presentó comportamiento atípico en la construcción del modelo QSAR-3D por lo cual se retiró del grupo de entrenamiento, el siguiente análogo con mayor Cl_{50} experimental es el derivado 6d con actividad *in vitro* de 9.03 μ M sin embargo el rango de actividad reportada para los análogos 6a, 6b, 6e y 6f es de 0.39 a 2.51 μ M, es decir que el derivado 6d se sale del rango de actividad presentada por la familia a la que pertenece, de manera similar a lo ocurrido con el análogo 6c; tomando en consideración que los derivados 6c y 6d poseen en posición *para* del grupo fenilo grupos electrosustractores fuertes (Br, NO_2) y los demás derivados de la familia presentan grupos electrosustractores débiles o electrodonadores (H, Cl, CH_3 , OCH_3 , OH), el valor de residual de 6d (-0.51) y el comportamiento atípico de 6c puede deberse a que la información comprendida dentro del modelo es insuficiente para predecir dichas variaciones debido al error sistemático presente en las mediciones de las actividades *in vitro* o a la falta de diversidad estructural en los derivados utilizados en el QSAR-3D.

En la **Figura 19** los compuestos más y menos activos, señalados con círculos rojos, tienen residuales dentro del rango de ± 0.25 , lo que nos dice que el modelo tiene una capacidad predictiva satisfactoria tanto para las moléculas más activas como para las menos activas y que está bien balanceado.

Mapas de coeficientes del modelo QSAR-3D.

De acuerdo con los mapas de contornos graficados en la **Figura 20** se puede observar que la mayor contribución a la actividad anti-giardíasis es debida al potencial estérico, ya que éste representa un 86 % de la contribución a la actividad anti-giardíasis, mientras que el potencial electrostático solo representa el 14%, estos resultados coinciden con lo obtenido previamente en el QSAR 2D realizado por Mocello y colaboradores²¹ sobre los derivados 2-amino-4-aril-1,3-tiazólicos donde la distribución tridimensional de los átomos fue el descriptor con mayor contribución a la actividad anti-giardíasis.

En los mapas de contorno para el potencial estérico se observa que la posición dos está fuertemente influenciada por grupos voluminosos, el contorno color verde en la **Figura 20-b** se encuentra sobre todos los grupos presentes en la posición dos de las moléculas utilizadas para generar el QSAR-3D, cabe recalcar que en dicha posición se encuentran cuatro sustituyentes diferentes: amino, acetamida, benzamida y furamida, dado que el QSAR-3D se generó con esta información lo que los mapas de contorno color verde sugieren es que grupos "voluminosos" aproximadamente del tamaño y largo de un grupo benzamida, el cual es el grupo más voluminoso de los cuatro mencionados, podrían potenciar la actividad anti-giardíasis.

De igual forma se observa un contorno color verde sobre los grupos en *para* del fenilo de la posición cuatro, de manera análoga a lo analizado para la posición dos, en la posición cuatro de los derivados tiazólicos pertenecientes al grupo de entrenamiento hay ocho sustituyentes diferentes: hidrógeno, cloro, bromo, nitro, metilo, metóxilo, hidroxilo y acetato, dado que el grupo acetato es el grupo funcional con mayor volumen, la presencia de un contorno verde indica que se prefieren grupos voluminosos en dicha posición teniendo como límite el tamaño de un grupo acetato.

En cuanto a los mapas de potencial electrostático, a pesar de contribuir menos que el potencial estérico, lo primero que se observa en el diagrama de la **Figura 20-a** es que los contornos rojos y azules en la posición dos del anillo tiazólico indican que la presencia de un grupo cargado eléctricamente que también sea aceptor de protones y un grupo cargado electropositivamente y dador de protones, como en el caso del grupo carbonilo y el grupo amino, son necesarios para una buena actividad antiangiogénica, en otras palabras, la presencia de grupos amida en posición dos potenciará la actividad antiangiogénica de los derivados tiazólicos.

Por otro lado los contornos rojos sobre el fenilo en posición cuatro indican que el carácter electronegativo sobre dicho sustituyente modificará positivamente la actividad biológica y que para ello es necesario grupos electrodonadores en *para*, señalados por contornos azules, los cuales activen el grupo aromático (fenilo). Por último grupos eléctricamente cargados o aceptores de protones en posición cinco contribuyen positivamente en la actividad biológica de los derivados tiazólicos.

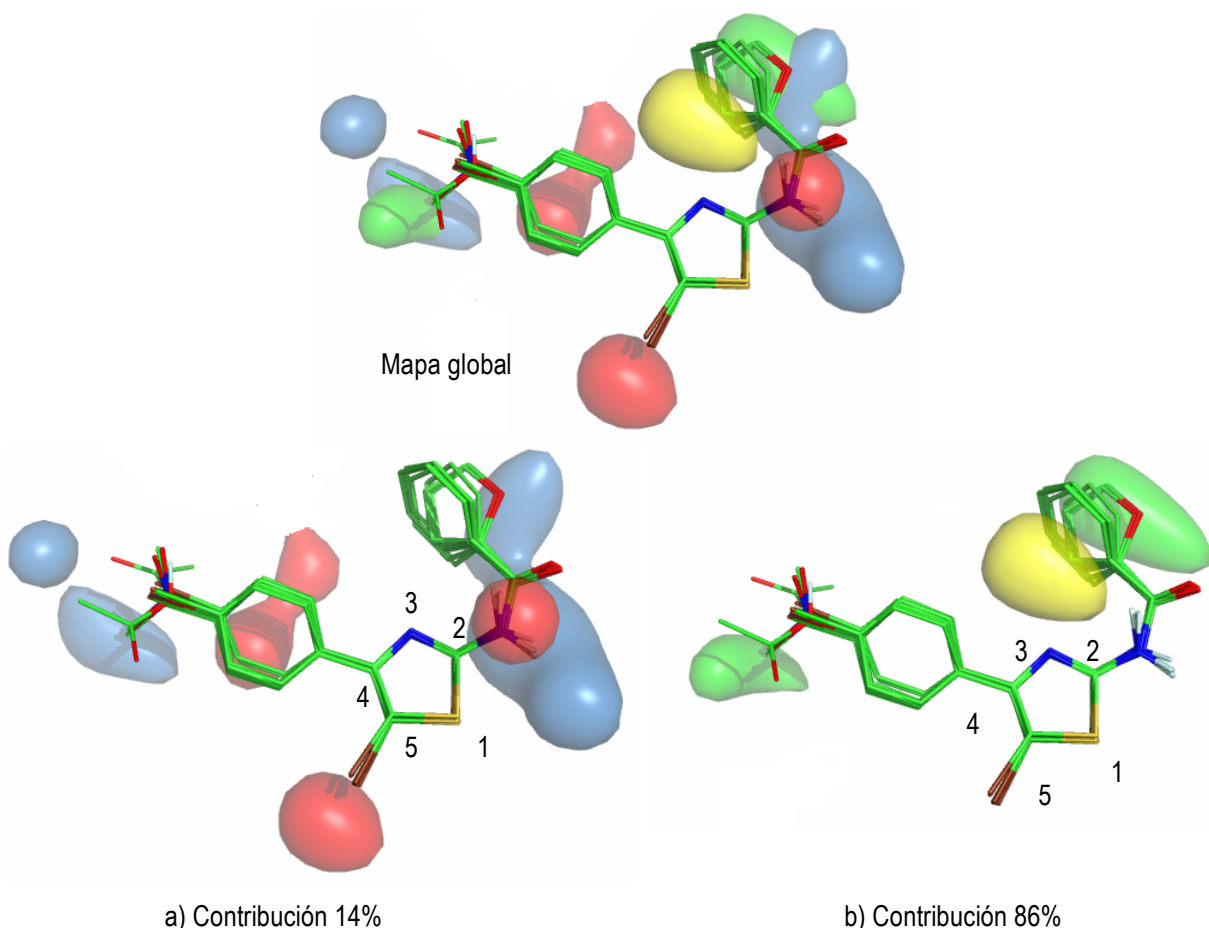


Figura 20. Mapas de coeficientes para el modelo 31 con valores de isosuperficie de a) potencial electrostático ($\pm 0.002 \text{ e/au}^3$), b) potencial estérico ($\pm 0.01 \text{ e/au}^3$).

Los resultados obtenidos en los mapas de contornos permiten entender mejor lo observado en las moléculas del conjunto de derivados 2-amino-4-*aryl*-1,3-tiazólicos, utilizados en la generación del modelo QSAR-3D, al analizar específicamente las estructuras con menor y mayor actividad anti-giardíaca en dicho grupo (**Figura 21**). En el caso de las moléculas menos activas (2b, 3b) se observa que ambas poseen cloro en la posición *para* del fenilo en cuatro, el cloro es un grupo electroextractor débil de acuerdo con Hammett^{74,75} el cual retira densidad electrónica por inducción ($\sigma=0.23$), por lo cual el grupo fenilo se vuelve electrodeficiente, por otro lado en posición cinco se tiene un átomo de hidrógeno, sin embargo el QSAR-3D predice que en esa posición deberían ubicarse grupos con mayor densidad electrónica con el fin de mejorar la actividad anti-giardíaca; es notable que la baja actividad de los compuestos 2b y 3b esta relacionada con las contribuciones negativas de los grupos funcionales presentes en sus estructuras; por lo tanto, el modelo generado explica satisfactoriamente la baja actividad biológica en esas dos moléculas.

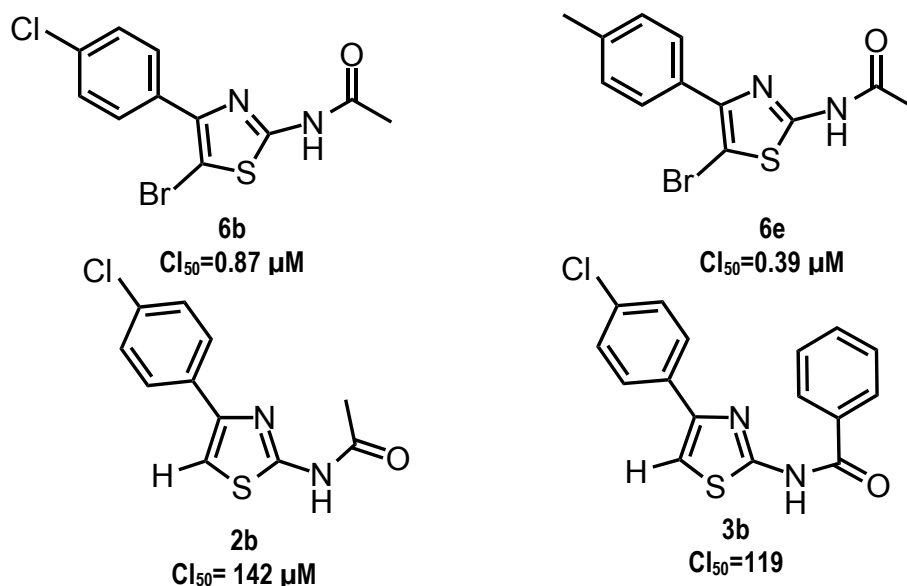


Figura 21. Estructura de las moléculas con mayor y menor actividad en pruebas de susceptibilidad *in vitro* en contra de *Giardia intestinalis*.

En el caso de las moléculas más activas (6b y 6e) ambas mantienen el grupo amida en posición dos y poseen un átomo de bromo en posición cinco, el cual funge como electroextractor, de igual manera se puede notar que el derivado 6b posee un átomo de cloro en *para* del grupo fenilo en posición cuatro, el cual funge como electroextractor débil ($\sigma=0.23$), dicha contribución es contraria a lo sugerido por los mapas de contornos del QSAR-3D, ya que se espera que grupos electrodonadores en dicha posición aumenten la actividad biológica sin embargo la diferencia entre el efecto de este grupo y el efecto del grupo metilo, el cual es un electrodonador débil de acuerdo con Hammet ($\sigma=-0.17$), no es muy pronunciada, lo cual se puede corroborar con los datos de actividad *in vitro*, esto sugiere que el cloro y el metilo están en el límite de lo que se considera un electrodonador y electroextractor; por otro lado ambos grupos poseen volúmenes similares, siendo el metilo ligeramente más voluminosos con un radio de Van de Waals⁷⁶ de 2 Å aproximadamente y el cloro de 1.73 Å estas diferencias podrían explicar porque el derivado 6e es más activo que el 6b.

En la **Figura 22** se presentan las conclusiones para la modificación de los derivados tiazólicos de acuerdo a los resultados del modelo 31 de QSAR-3D.

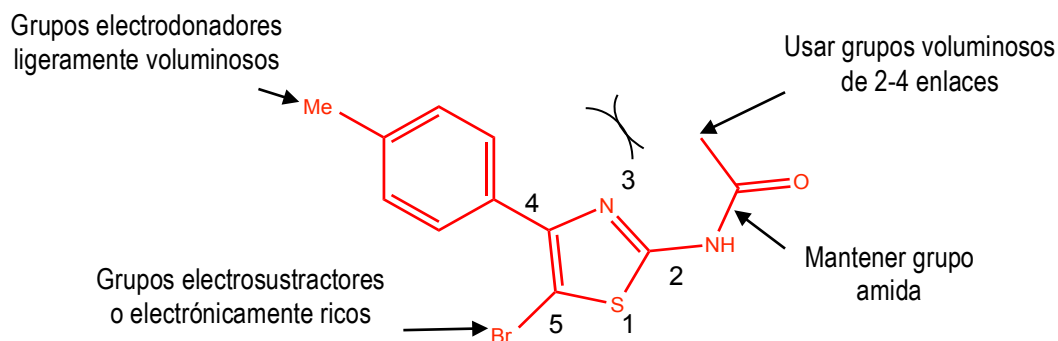


Figura 22. Modificaciones sugeridas sobre los derivados tiazólicos.

Propuesta de nuevos análogos y predicción

En 2015 Mocelo y colaboradores²¹ realizaron un QSAR-2D con los tiazoles estudiados en ese trabajo de tesis, dicho QSAR-2D reveló que la distribución uniforme de la masa atómica, el volumen molecular y la polarizabilidad correlaciona con la actividad anti-giardíasis, sin embargo al momento de proponer nuevos análogos el QSAR-2D no provee información cualitativa de donde y como modificar los derivados tiazólicos para cumplir con dichas restricciones, por el contrario el QSAR-3D genera información más precisa al respecto, ya que señala las zonas donde se debe modificar y que tipo de grupos funcionales son preferidos en dichas regiones.

Ambos trabajos QSAR se complementan, el QSAR-2D indica la necesidad de un QSAR-3D y el QSAR-3D señala el tipo de modificaciones a realizar partiendo de información de potencial estérico y electrostático extraída de los derivados, sustentando la importancia de la distribución y la polarizabilidad en éstas moléculas, por lo cual partiendo de la información obtenida de ambos estudios QSAR se planteó la modificación estructural de los tiazoles en la posición dos del anillo tiazólico con el objetivo de observar el efecto del tamaño de los sustituyentes en dicha posición.

Para las modificaciones realizadas en posición dos del anillo tiazólico (**Figura 23**) se mantuvo el grupo amida y se utilizaron cadenas de propilo, butilo, isobutilo, trimetilacilo y ciclopentilo, manteniendo en la posición cinco el bromo. En la posición cuatro en *para* del fenilo se utilizaron los grupos cloro y metilo ya que ambos grupos se encuentran presentes en los tiazoles más activos y aunque solo el metilo cumple con las condiciones encontradas en el QSAR-3D se espera observar el efecto que tiene la capacidad activante o desactivante ($\pm\sigma$) de estos grupos en la actividad anti-giardíasis de acuerdo con el QSAR-3D.

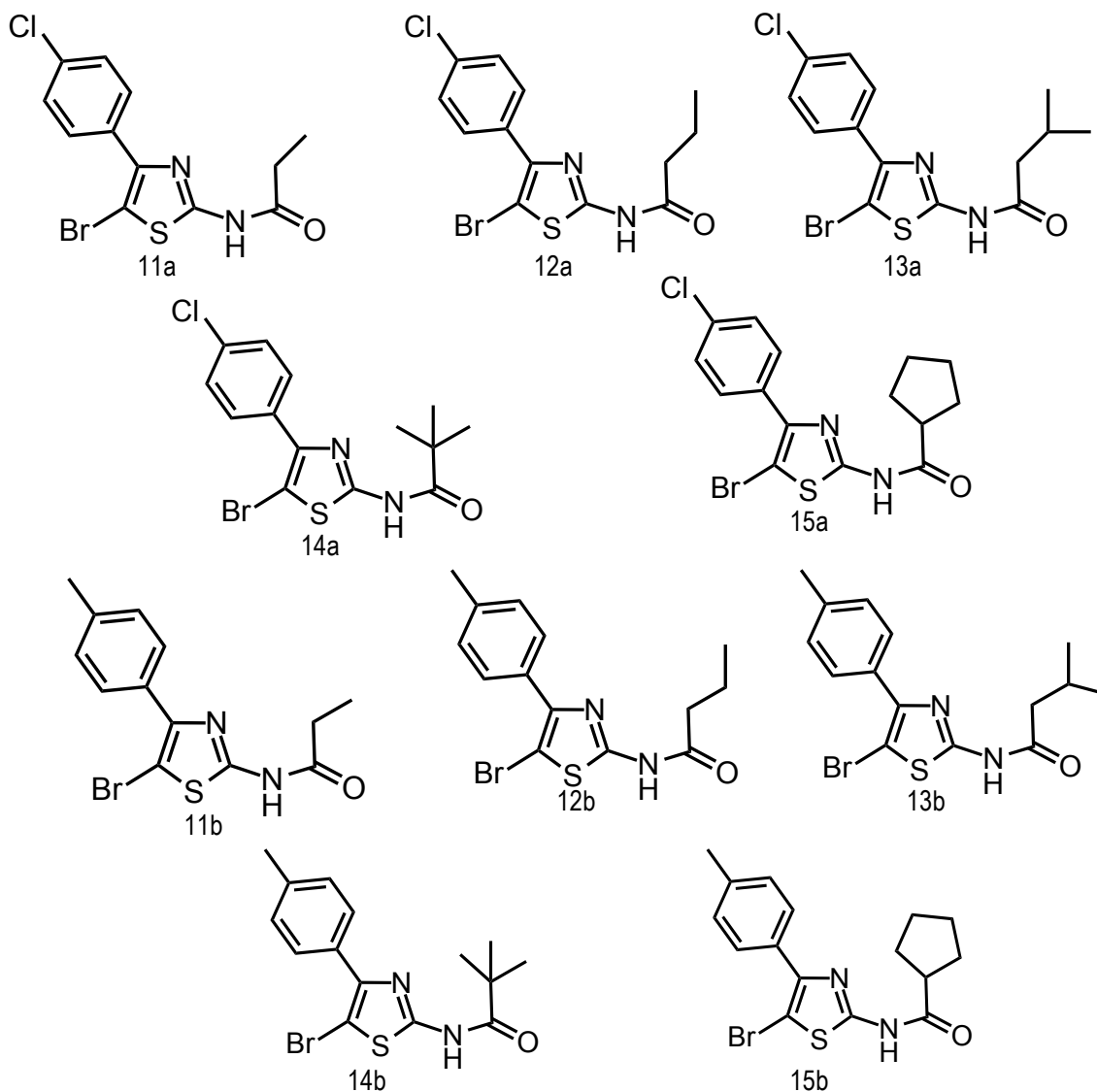


Figura 23. Modificaciones en posición dos del anillo tiazólico con grupos más voluminosos.

Una vez realizadas las modificaciones se procedió a predecir la actividad teórica anti-giardíaca de los 10 nuevos derivados utilizando el modelo QSAR-3D. En la **Tabla 10** se presentan los resultados.

Tabla 10. Actividades predichas con el modelo QSAR-3D para los nuevos derivados tiazólicos.

Clave	11a	12a	13a	14a	15a	11b	12b	13b	14b	15b
pCl ₅₀	5.45	4.43	4.47	4.77	4.37	5.82	4.43	4.65	4.94	4.46
Cl ₅₀ (μM)	3.55	37.52	33.88	16.93	42.54	1.53	36.85	22.39	11.46	35.06

Los valores de actividad antiangiogénica teórica predicha se sitúan entre 1.5 y 43 μM , observándose que para las moléculas con grupos butilo, isobutilo y ciclopentilo (12a, 12b, 13a, 13b, 15a, 15b) se generaron los valores más grandes de CI_{50} teórico (22 - 42 μM) y para el caso de los derivados con grupos propilo y trimetilacetilo (11a, 11b, 13a, 13b) se obtuvieron concentraciones inhibitorias teóricas menores (1.5 - 17 μM), de acuerdo con los resultados de los mapas de contornos se espera que grupos voluminosos con un tamaño máximo similar al del grupo benzamida mejoren la actividad antiangiogénica, sin embargo estos resultados reflejan que para grupos con un volumen muy cercano al de una benzamida (butilamida, isobutilamida, ciclopentanamida) el modelo QSAR-3D predice que tendrán baja o nula actividad antiangiogénica, y al contrario, grupos con un volumen intermedio (propanamida y trimetilacetamida) tienen altas probabilidades de ser activos; por lo cual para el conjunto de derivados tiazólicos estudiados, tomando como base para el cálculo del modelo QSAR-3D los análogos 2-amino-4-aryl-1,3-tiazólicos, se prefieren en la posición dos del anillo tiazólico. grupos funcionales con un volumen intermedio, teniendo como límite el tamaño de un grupo benzamida. Esta hipótesis está basada en resultados teóricos y solo será comprobada con los resultados de actividad *in vitro* de dichos análogos.

De igual forma se observó que las moléculas con cloro en *para* del fenilo en posición cuatro del anillo tiazólico (11a, 12a, 13a, 14a y 15a) presentaron valores de actividad antiangiogénica teórica mayores (3.55 - 42.54 μM) a las de sus análogos con metilo en la misma posición (1.53 - 35.06 μM), por ejemplo, sea el caso de 11a y 11b, donde hay una diferencia de 2 μM , o tal sea el caso de 13a y 13b con una diferencia de 11 μM , siendo menor la actividad predicha para 13b. Sin embargo la diferencia no es muy elevada si se toma en consideración que grupos electroextractores fuertes como el grupo nitro presente en algunos derivados del grupo de entrenamiento del modelo QSAR-3D aumentaron la actividad antiangiogénica *in vitro* de dichos derivados en un rango de 10 a 35 μM en comparación con sus análogos metilados. Tal como se mencionó con anterioridad, el átomo de cloro es un electroextractor débil ($\sigma=0.23$) y el grupo metilo es un electrodonador débil ($\sigma=-0.17$), la diferencia entre las capacidades eléctricas de ambos grupos no es muy pronunciada, por tal razón el efecto es pequeño, pero debido a que el metilo aumenta la carga del fenilo en posición cuatro, tal como sugiere el QSAR-3D, los análogos con dicho grupo presentan menor CI_{50} teórico.

La molécula **11b**, la cual posee un grupo propanamida en posición dos y metilo en *para* del fenilo en posición cuatro, presentó el menor CI_{50} calculado (1.53 μM), seguido por la molécula **11a** la cual posee también un grupo propanamida en posición dos del anillo tiazólico y un átomo de cloro en *para* del fenilo en posición cuatro (3.55 μM) y la molécula **14b** la cual está conformada por un grupo trimetilacetilo en posición dos y metilo en *para* del fenilo en posición cuatro (11.46 μM); al analizar los datos de

actividad teórica y utilizarlos como una aproximación para comparar la actividad probable de estas moléculas con los datos de actividad *in vitro* del compuesto 6e (CI₅₀= 0.39 μM) se observa que las actividades teóricas encontradas para estos derivados son mayores, sin embargo, hay que tomar en consideración que así como los derivados tiazólicos utilizados en la generación del modelo QSAR-3D presentaron residuales entre -0.5 y 0.4, estos nuevos análogos también presentarán residuales aproximadamente en el mismo rango, por lo cual es muy probable que los valores numéricos estén sobreestimados o subestimados, es decir, existe la posibilidad de que alguno de estos compuestos (**11b**, **11a**, **14b**) presente actividad anti-giardíasis *in vitro*, por lo cual se sugiere su síntesis química.

CONCLUSIONES

Para obtener la mayor población de confórmeros en un análisis conformacional, la optimización geométrica previa utilizando el funcional B3LYP es mejor en comparación con la optimización llevada a cabo con mecánica molecular.

Para el conjunto de derivados tiazólicos estudiados, la mejor estrategia para seleccionar la plantilla de alineado es aquella donde se escoje el grupo de alineado con el mayor parámetro de puntuación de ajuste (P) después de un alineado de multiconfórmeros.

La presencia de un grupo amida en posición dos del anillo tiazólico es necesaria para una buena actividad anti-giardíasis y grupos con un volumen intermedio teniendo como límite el tamaño de un grupo benzamida en dicha posición también potenciarán la actividad biológica.

Grupos electrodonadores en *para* del fenilo en posición cuatro, los cuales aumentan el carácter electronegativo del anillo aromático y grupos electroextractores o ricos en electrones en posición cinco tendrán un efecto positivo en la actividad anti-giardíasis.

A partir del modelo QSAR-3D validado fue posible predecir la actividad biológica de 10 nuevos análogos, de los cuales tres presentaron actividades teóricas interesantes, por lo cual se sugiere la síntesis de éstos análogos y su evaluación *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vázquez, O.; Campos, T. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Rev. Del Centro de Inv. (Mex.)* **2009**, *8*, 75-85.
2. Gardner, T.; Hill, D. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14*, 114-128.
3. Rossignol, J. Cryptosporidium and Giardia: Treatment options and prospects for new drugs. *Exp. Parasitol.* **2010**, *124*, 15-53.
4. Leitsch, D. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Curr Trop Med Rep*, **2015**, *2*, 128-135.
5. Littlekare, S.; Rortveit, G.; Egil Eide, G.; Hanevik, K.; Langeland, N.; Wensaas, K. Prevalence of Irritable Bowel Syndrome and Chronic Fatigue 10 Years After *Giardia Infectio*. *Clin. Gastroent. Hepatol*, **2018**, *16*, 1064-1072.
6. Halliez, M.; Buret, A. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J. Gastroenterol*, **2013**, *47*, 8974-8985.
7. Escobedo, A. A.; Almirall, P.; Hanevik, K.; Cimerman, S.; Rodríguez-Morales, A. J.; Almanza, C.; Auza-Santivañez, J. Giardiasis: a diagnosis that should be considered regardless of the setting. *Epidemiol. Infect.*, **2018**, *146*, 1216-1218.
8. Unbarren Berruela, Teresa. Giardiasis o Giardiosis. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/giardiasis.html> (consultado en noviembre del 2017). Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.
9. Quesadas Rojas, M. *Determinación de la relación cuantitativa estructura actividad (QSAR) de derivados tiazólicos con actividad anti-giardiasis*. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, 2011.
10. Ibáñez-Cervantes, G.; León-Ávila, G.; Bello-López, J. M.; Pérez-Rangel, A.; León-García, G.; Noguera-Torres, B.; Hernández, J. M. Changes in the incidence of intestinal giardiosis in Mexican population during five years (2011-2015). *Acta Parasitol.*, **2018**, *63*, 40-47.
11. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Boletín Epidemiológico, Semana 52, 2018, Vol. 35, pag 20.
12. Dirección General de Epidemiología, Anuario de Morbilidad 1984-2017. http://187.191.75.115/anuario/2017/morbilidad/nacional/veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.pdf (consultado en abril del 2018). Estados Unidos Mexicanos 2017.
13. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp> (consultado en noviembre del 2017). Año de registro 2016, Estados Unidos Mexicanos.

14. a) Enfermedades Diarreicas Agudas, Dirección General de Epidemiología, Informes Semanales para la Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Diarreicas Agudas 2017. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-informes-semanales-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-eda> (consultado en Enero del 2018)
- b) Enfermedades Diarreicas Agudas. Dirección General de Epidemiología. Informes Semanales para la Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Diarreicas Agudas 2017. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-informes-semanales-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-eda-2017> (consultado en Enero del 2018).
15. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/196355/EDA_2017_SE07.pdf (consultado en noviembre del 2017)
16. Ordóñez-Mena, J. M.; Mcarthy, N. D.; Fanshawe, T. R. Comparative efficacy of drugs for treating giardiasis: a systematic update of the literatura and network meta-analysis of randomized clinical trials. *J. Antimicrob. Chemother*, **2018**, *73*, 596-606.
17. Tejman, N.; Miyamoto, Y.; Leitsch, D.; Santini, J.; Debnath, A.; Gut, J.; McKerrow, J.; Reed, S.; Eckmann, L. A Reprofiled Drug, Auranofin, Is Effective against Metronidazole-Resistant *Giardia lamblia*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2013**, *57*, 2029-2035.
18. Kulokova, L.; Galkin, A.; Chen, C.; Southall, N.; Marugan, J.; Zheng, W.; Herzberg, O. Discovery of Novel Antigiardiasis Drug Candidates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 7303-7311.
19. Reyes-Vivas, H.; Mora-de la Mora, I.; Castillo-Villanueva, A.; Yépez-Mulia, L.; Hernández-Alcántara, G.; Figueroa-Salazar, R.; García-Torres, I.; Gómez-Manzo, S.; Méndez, S.; Vanoye-Carlo, A.; Marcial-Quino, J.; Torres-Arroyo, A.; Orla-Hernández, J.; Guitérrez-Castrellón, P.; Enríquez-Flores, S.; López-Velázquez, G. Giardial Triosephosphate Isomerase as Possible Target of the Cytotoxic Effect of Omeprazole in *Giardia lamblia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 7072-7082.
20. Shing, K.; Leung, W.K. Long term use of proton-pumps inhibitors and risk of gastric cancer a review of the current evidence. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2019**, *12*, 1-11.
21. Mocelo-Castell, R.; Villanueva-Novelo, C.; Cáceres-Castillo, D.; M. Carballo, R.; Quijano-Quiñones, R.; Quesadas-Rojas, M.; Cantillo-Ciau, Z.; Cedillo-Rivera, R.; Moo-Puc, R.; Moujir, L.; Mena-Rejón, G. 2-Amino-4-arylthiazole Derivatives as Anti-giardial agents: Synthesis, Biological Evaluation and QSAR Studies. *Open. Chem.*, **2015**, *13*, 1127-1136.
22. Navarrete-Vázquez, G.; Chávez-Silva, F.; Colín-Lozano, B.; Estrada-Soto, S.; Hidalgo-Figueroa, S.; Guerrero-Álvarez, J.; Méndez, S.; Reyes-Vivas, H.; Oria-Hernández, J.; Canul-Canché, J.; Ortiz-Andrade, R.; Moo-Puc, R. Synthesis of nitro(venzo)thiazole acetamides and in vitro antiportozoal effect against

- amitochondriate parasites *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, *23*, 2204-2210.
23. Scior, T.; Lozano-Aponte, J.; Ajmani, S.; Hernández-Montero, E.; Chávez-Silva, F.; Hernández-Núñez, E.; Moo-Puc, R.; Fraquela-Collar, A.; Navarrete-Vázquez, G. Antiprotozoal Nitazoxanida Derivatives: Synthesis, Bioassays and QSAR Study Combined with Docking for Mechanistic Insight. *Currente Computer-Aided Drug Design*, **2015**, *11*, 21-31.
 24. M. Carballo, R.; Patrón-Vázquez, J.; Cáceres-Castillo, D.; Quijano-Quiñones, R.; Herrera-España, A.; Moo-Puc, R.; Chalé-Dzul, J.; Mena-Rejón, G. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of some 2-amino-4-phenyloxazole derivatives. *Trop J. Pharm. Res.*, **2017**, *8*, 1951-1956.
 25. Svensson, F. Computational Methods in Medicinal Chemistry. Mechanistic Investigations and Virtual Screening Development. Tesis de Doctorado. Uppsala University, Uppsala, Suecia, Septiembre 2015.
 26. Sliwoski, G; Kothiwale, S; Meiler, J; Lowe, E. Computational Methods in Drug Discover. *Pharmacological. Reviews.* **2014**, *66*, 334-395
 27. Merz, K; Ringe, D.; Reynolds, C. *Drug Design: Structure and ligand-based approaches*, First Edition. Cambridge. **2010**. pp. 1, 120.
 28. Sun, M.; Xu, Q.; Xu, J.; Wu, Y.; Wang, Y.; Zuo, D.; Guan, Q.; Bao, K.; Wang, J.; Wu, Y.; Zhang, W. Synthesis and bioevaluation of N,4-diaryl-1,3-thiazole-2-amines as tubulin inhibitors with potent antiproliferative activity. *PLoS ONE*, **2017**, *3*, 1-15.
 29. Kumar Nagarajan, S.; Madhavan, T. 3D-QSAR Studies on 2-(indol-5-yl)thiazole Derivatives as Xanthine Oxidase (XO) Inhibitors. *J. Chosun Natural Sci.* **2015**, *8*, 258-266.
 30. Zhao, M-Y; Yin, Yong; Yu, Xiao-Wei; B. Sangani, Chetan; Wang, Shu-Fu; Lu, Ai-Min; Yang, Li-Fang; Lv, Peng-Cheng; Jiang, Ming-Guo; Zhu, Hai-Liang. Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR study of novel 4,5-dihydro-1H-pyrazole thiazole derivatives as BRAF^{V600E} inhibitors. *Bioor. Med. Chem.* **2015**, *23*, 45-54.
 31. Kashid, G.; Sarvanan, J.; Jain, N. QSAR studies on thiazoles having antiplatelet activity. *Innovational Journal of Chemistry*, **2016**, *1*, 10-21
 32. a) Mandalapu, D.; Kushwaha, B.; Gupta, Sonal; S., Nidhi; Shukla, M.; Kumar, J.; Tanpula, D. K.; Sankhwar, S. N.; Maikhuri, J. P.; Siddiqi, M. I.; Lal, J.r; Gupta, G.; Sharma, V.L. 2-Methyl-4/5-nitroimidazole derivatives protentiated against sexually transmitted *Trichomonas*: Design, synthesis, biology and 3D-QSAR study. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 820-839. b) Pérez-Villanueva, J.; Medina-F., José L.; Caulfield, T. R.; Hernández-Campo, A.; Hernández-Luis, F.; Yépez-Mulia, L.; Castillo, R. Comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA) of some benzimidazole derivatives with trichomonocidal activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3499-3508.

33. López-Vallejo, F.; Medina-Franco, J. L.; Hernández-Campos, A.; Rodríguez-Morales, S.; Yépez, L.; Cedillo, R.; Castillo, R. Molecular modeling of some 1H-benzimidazole derivatives with biological activity againsts *Entamoeba histolytica*: A comparative molecular field analysis study. *Bioor. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1117-1126.
34. Jiménez Villalobos, T. P.; Gaitán Ibarra, R.; Montalvo Acosta, J. 2D, 3D-QSAR and molecular docking of 4(1H)-quinolones analogues with antimalarial activities. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, *46*, 105-124.
35. Spartan'14 v.1.1.4, Wavefunction Inc. Irvine, 2014.
36. Gaussian 09, Revision A. 1; D. J. Gaussian, Inc. , Wallingford CT, 2009.
37. Tosco, P.; Balle, T.; Shiri, F. Open3DALIGN: an open-source software aimed at unsupervised ligand alignment. *J. Comput-Aided Mol. Des.* **2011**, *25*, 777-783.
38. Tosco, P.; Balle, T. Open3DQSAR: a new open-source software aimed at highthroughput chemometric analysis of molecular interaction fields. *J. Mol. Model.* **2011**, *17*, 201-208.
39. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.x Schrödinger, LLC.
40. O'Connor, S.; Smith, P.; Al-Obeidi, F.; Pettitt, B. M. Quenched Molecular Dynamics Simulations of Tuftsin and Proposed Cyclic Analogues. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2870-2881.
41. Tosco, P.; Balle, T. A 3D-QSAR-Driven Approach to Bindign Mode and Affinity Prediction. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 302-307.
42. Byrd, R.; Lu, P.; Nocedal, J.; Zhu, C. *A limited memory algorithm for bound constrained optimization*. Northwestern university, Departmen of Electrical Engineering and computer Science. 1994,
43. Ghasemi, J. B.; Shiri, F. Molecular docking and 3D-QSAR studies of Falcipain inhibitors using CoMFA, CoMSIA and Open3DQSAR. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 2788-2806.
44. Tahir, A.; Alharthy, R. D.; Naseem, S.; Mahmood, N.; Ahmed, M.; Shahzad, K.; Akthar, M. N.; Hameed, A.; Sadiq, I.; Nawaz, H., Muddassar, M. Investigations of Structural Requirements for BRD4 Inhibitors throug Ligand- and Structure-Based 3D QSAR Approaches. *Molecules.* **2018**, *23*, 1527.
45. Lorca, M.; Morales-Verdejo, C.; Vásquez-Velásquez, D.; Andrades-Lagos, J.; Campanini-Salinas, J.; Soto-Delgado, J.; Recabarren-Gajardo, G.; Mella, J. Structure-Activity relationships Based on 3D-QSAR CoMFA/CoMSIA and Design of Aryloxypropanol-Amine Agonists with Selectivity for the Human β 3-Adrenergic recceptor and Anti-Obesity and Anti-Diabetic Profiles. *Molecules.* **2018**, *23*, 1191.
46. Kashem Liton, M . A.; Bhowmick, A. C.; Ashraf Ali, M. 3D-QSAR MIFs Studies on 3,5-substituted-1,4,2-dioxazoles Derivatives using Open3DQSAR Tools. *Universal Journal of Chemistry*, **2013**, *1*, 71-76.

47. Li, X.; Fu, J.; Shi, W.; Luo, Y.; Zhang, X.; Zhu, H.; Yu, H. 3D-QSAR and Molecular Docking Studies on Benzotriazoles as Antiproliferative Agents and Histone Deacetylase Inhibitors. *Bull. Korean. Chem. Soc.* **2013**, *34*, 2387.
48. Richmond, N. J.; Willett, P.; Clark, R. D. Alignment of three-dimensional molecules using an image recognition algorithm. *J. Mol. Graph. Model.* **2004**, *23*, 199-209.
49. Taminau, J.; Thijs, G.; De Winter, H. PHARAO: Pharmacophore alignment and optimization. *J. Mol. Graph. Model.* **2008**, *27*, 161-169.
50. Petitjean, M. Interactive Maximal Common 3D Substructure Search with the Combined SDM/RMS Algorithm. *Computers Chem.* **1998**, *22*, 463-465.
51. Dolezal, R.; Korabecny, J.; Malinak, D.; Honegr, J.; Musilek, K.; Kuca, K. Ligand-based 3D QSAR analysis of reactivation potency of mono- and bis-pyridinium aldoximes toward VX-inhibited rat acetylcholinesterase. *J. Mol. Graph. Model.* **2015**, *56*, 113-129.
52. Shameera Ahamed, T. K.; Muraleedharam, K. A ligand-based comparative molecular field analysis (CoMFA) and homology model based molecular docking studies on 3', 4'-dihydroxyflavones as rat 5-lipoxygenase inhibitors: Design of new inhibitors. *Comput. Biol. Chem.* **2017**, *71*, 188-200.
53. Halgren, T. Merck Molecular Force Field. II. MMFF94 van der Waals and Electrostatic Parameters for Intermolecular Interactions. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 520-552.
54. Cronin, M. T.D.; Shultz, T. W. Pitfalls in QSAR. *J. Mol. Struct.*, **2003**, *622*, 39-51.
55. Golbraikh, A.; Tropsha, A.; Beware of q^2 !. *J. Mol. Graph.* **2002**, *20*, 269-276.
56. Kiralj, R.; Ferreira, M. M. C. Basic validation procedures for regression models in QSAR and QSPR studies. Theory and Application. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 770-787.
57. Clark, D. R.; Fox, C. P. Statistical variation in progressive scrambling. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2005**, *18*, 563-576.
58. Dearden, J. C.; Cronin, M. T. D.; Kaiser, K. L. E. How not to develop a quantitative structure-activity or structure property relationship (QSAR/QSPR). *SAR QSAR Environ. Res.* **2009**, *20*, 241-266.
59. Roy, K.; Kar, S.; Das, R. N. A primer on QSAR/QSPR Modeling: Fundamental Principles. Statistical Methods in QSAR/QSPR. SpringerBriefs in Molecular Science. 2015, pp 37-59.
60. Centner, V.; Massart, D. Elimination of Uninformative Variables for Multivariate Calibration. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3851-3858.
61. Gieleciak, R.; Polanski, J. Modeling Robust QSAR 2. Iterative Variable Elimination Schemes for CoMSA: Application for Modeling Benzoic Acid pK_a Values. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 547-556.
62. Rücker, C.; Rücker, G.; Meringer, M. Y-Randomization and Its Variants in QSPR/QSAR. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 2345-2357.

63. Roy K.; Kar, S. Ambure; P. On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. *Chemon. Intell. Lab. Syst.* **2015**, *145*, 22-29.
64. Tropsha, A. Best Practices for QSAR Model Development Validation and Explotation. *Mol. Inf.* **2010**, *29*, 476-488.
65. M. Carballo, R.; G. León, L.; Quijano-Quiñones, R.; Mena-Rejón, G.; S. Martín, V.; M. Padrón, J: I. Padrón, J. Antiproliferative Evaluation of N-sulfonyl-2-alkyl-six Membered Azacycles: A QSAR Study *J. Med. Chem*, **2014**, *10*, 571-579.
66. Tosco, P.; Ahring, P. K.; Dyhring, T.; Peters, D.; Harspsoe, K.; Liljefors, T.; Balle, T. Complementary three-dimensional quantitative structure-activity relationship modeling of binding affinity and functional potency: A study on $\alpha_4\beta_2$ nicotinic ligands. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2311-2316.
67. Verma, J.; Vijay, M K.; Coutinho, E. C. 3D-QSAR in Drug design- A review. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 95-115.
68. Byrd, R.; Lu, P.; Nocedal, J.; Zhu, C. *A limited memory algorithm for bound constrained optimization*. Northwestern university, Departmen of Electrical Engineering and computer Science. 1994,
69. OECD, Guidance Documento on the Validation of (Quantitative) structure-Activity Relationships (Q)SARs Models, ENV/JM/MONO(2007)2,2007.
70. Roy, K.; Ambure, P.; Aher, R. B. How important is to detect systematic error in predictions and understand statistical applicability domain of QSAR models? *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2017**, *162*, 44–54.
71. Ahamed Shameera, T.K.; Muraleedharan, K. A ligand-based comparative molecular field analysis (CoMFA) adn homology model based molecular docking studies on 3',4'-dihydroxyflavones as rat 5-lipoxygenasa inhibitors: Design of new inhibitors, *Comp. Biol. Chem*, **2017**, *7*, 188-200
72. Shibi, I. G.; Aswathy, L.; Jisha, R. S.; Masand, V. H.; Divyachandran, A.; Gajbhiye, J. M. Molecular docking and QSAR analyses for understanding the antimalarial activity of some 7-substituted-4-aminoquinoline derivatives. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2015**, *77*, 9-23.
73. López-Vallejo, F.; Medina-Franco, J. L.; Hernández-Campos, A.; Rodríguez-Morales, S.; Yépez, L.; Cedillo, R.; Castillo, R. Molecular modeling of some 1H-benzimidazole derivatives with biological activity against *Entamoeba histolytica*: A comparative molecular field analysis study. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 117-1126.
74. a) Hammet L. P. Some Relations between Reaction Rates and Equilibrium Constants. *Chem. Rev.*, **1935**, *17*, 125-136. b) Hammett, L. P. The Effect of Structure upon the Reactions of Organic Compounds. Benzene Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **1937**, *59*, 96-103.
75. Craig, P. N. Interdependence between Physical Parameters and Selection of Substituent Groups for Correlation Studies. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 680-683
76. Bondi, A. Van der Waals Volumes and Radii. The journal of Physical chemistry, 1964, *68*, 441-451

