

BÚSQUEDA COMPUTACIONAL DE PEQUEÑOS FÁRMACOS CONTRA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

CRISTIAN AMARO CORBALÁN

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOINFORMÁTICA Y BIOESTADÍSTICA

BIOINFORMÁTICA FARMACÉUTICA

CONSULTOR: MELCHOR SÁNCHEZ MARTÍNEZ

PROFESORA RESPONSABLE DE LA ASIGNATURA: MARÍA JESÚS MARCO GALINDO





Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>Búsqueda computacional de pequeños fármacos contra la enfermedad de Huntington</i>
Nombre del autor:	<i>Cristian Amaro Corbalán</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Melchor Sánchez Martínez</i>
Nombre del PRA:	<i>María Jesús Marco Galindo</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	<i>05/2017</i>
Titulación:	<i>Máster en Bioinformática y Bioestadística</i>
Área del Trabajo Final:	<i>Bioinformática farmacéutica</i>
Idioma del trabajo:	<i>Español</i>
Palabras clave	<i>“Huntingtina”, “Virtual screening” y “farmacocinética”</i>
Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): <i>Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados i conclusiones del trabajo.</i>	
<p>La búsqueda y descubrimiento de nuevos fármacos se ha visto agilizada en los últimos años con el avance de la tecnología. La bioinformática se está abriendo paso en el mundo de la farmacéutica con técnicas como el <i>virtual screening</i> permitiendo realizar búsquedas de compuestos (ligandos) con afinidad a estructuras proteicas (diana) relacionado con alguna enfermedad. Este es el inicio del análisis realizado en este trabajo. Partiendo de la enfermedad de Huntington se ha seleccionado la Huntingtina como posible diana terapéutica. El hecho de que la estructura de esta proteína no se encuentre descrita ha provocado la realización de una búsqueda estructural por homología y el análisis de moldeos predictores. Con esta base, se ha realizado el <i>virtual screening</i> y seleccionado 720 compuestos con posibilidad de unión. Estos compuestos se han analizado para obtener sus características físico-químicas descartando aquellos que presentan mutagénesis, carcinogénesis, toxicidad o sensibilidad a la piel. A los que fueron seleccionados se les analizó sus propiedades farmacocinéticas con el fin de obtener compuestos como posibles fármacos que no provocaran anormalidad en el funcionamiento del organismo. En este punto se obtuvo un solo compuesto que no presentó toxicidad hepática ni inhibición a la enzima hERG II, pero tenía aspectos negativos como la inhibición de algunas isoformas del citocromo P450. Aunque no se ha obtenido un fármaco ideal para la enfermedad, este método realizado a gran escala</p>	

por una empresa farmacéutica o grupo de investigación puede llevar al descubrimiento de alguno de ellos.

Abstract (in English, 250 words or less):

The research and discovery of new drugs has been speed up in the last years because of technology advance. Bioinformatics is making its way in pharmaceutical's world with virtual screening techniques, allowing to research compounds (ligands) with affinity to protein structures (target), related to some disease. This is the beginning of the analysis performed in this work. Based on Huntington's disease, Hungtintin has been selected as a possible therapeutic target. The fact that the structure of this protein is not described has led to a structural homology search and predictive modeling analysis. With this starting point, the virtual screening was carried out and 720 compounds with the possibility of union were selected. These compounds have been tested to obtain their physicochemicals characteristics by discarding those exhibiting mutagenesis, carcinogenesis, toxicity or skin sensitivity. Those who were selected were analyzed for their pharmacokinetic properties in order to obtain compounds as possible drugs that did not cause an abnormality in the functioning of the organism. At this point, a single compound was obtained which showed no hepatic toxicity neither inhibition to the hERG II enzyme, but had negative aspects such as the inhibition of some cytochrome P450 isoforms. Although an ideal drug for the disease has not been obtained, this method carried out on a large scale by a pharmaceutical company or research group can lead to discovery of some of them.

INDICE

1.	Introducción	1
1.1.	Contexto y justificación del trabajo.....	1
1.2.	Objetivos del trabajo	7
1.3.	Enfoque y método seguido	7
1.4.	Planificación del trabajo.....	7
1.5.	Breve resumen de productos obtenidos.....	8
1.6.	Breve descripción de los capítulos de la memoria	9
2.	Materiales y métodos.....	10
2.1.	Obtención del gen HTT.....	10
2.2.	Predicción estructural de la Huntingtina.....	10
2.3.	Virtual Screening basado en estructura	11
2.4.	Conversión de datos.....	11
2.5.	Análisis de las propiedades físico-químicas.....	11
2.6.	Análisis fármaco-cinético de los resultados	13
3.	Resultados.....	20
3.1.	Búsqueda de la estructura de la HTT.....	20
3.2.	Obtención de ligandos que se unan a la predicción de la HTT	28
3.3.	Analizar las propiedades físico-químicas de los ligandos obtenidos	31
3.4.	Analizar las propiedades farmacocinéticas de los ligandos seleccionados ...	39
4.	Discusión	45
5.	Conclusiones	49
6.	Glosario	50
7.	Bibliografía.....	51
8.	Anexo	

1. Introducción

1.1. Contexto y justificación del trabajo

a. Las enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son trastornos que implican la muerte progresiva de neuronas en diferentes regiones del sistema nervioso. La pérdida progresiva de las células nerviosas es lo que origina los signos y síntomas neurológicos y psicológicos característicos de estas enfermedades.

Las neuronas son los componentes básicos del sistema nervioso que incluye el cerebro y la médula espinal. Las neuronas normalmente no se reproducen o se reemplazan, por lo que cuando se dañan o mueren no pueden ser reemplazadas por el cuerpo. Por lo tanto, estas enfermedades son condiciones incurables i debilitantes que resultan en degeneración progresiva y/o muerte de las células nerviosas. Esto causa problemas con el movimiento (llamado ataxias), o funcionamiento mental (llamado demencia). Están fuertemente relacionadas con la edad, y Europa tiene un rápido envejecimiento de la población. Actualmente el 16% de la población europea tiene más de 65 años, y se espera que esta cifra en 2030 alcance el 25%. Esto implica que la cifra de personas con enfermedad neurodegenerativa se duplicará cada 20 años a medida que la población envejece (Enlace Web: JPND).

Actualmente no hay cura para ninguna de las enfermedades neurodegenerativas, aunque no es por falta de intentos (Heemels, MT. 2016)

b. La enfermedad de Huntington y epidemiología

La enfermedad de Huntington (EH), también conocida como corea de Huntington, es una grave y rara enfermedad neurológica, hereditaria y degenerativa. La EH se llama así en honor de George Huntington, un médico americano que describió la enfermedad en 1872. Fue la primera persona que identificó el carácter hereditario de la EH.

La EH es una enfermedad que afecta aproximadamente a uno de cada 10.000 habitantes en la mayoría de los países europeos, aunque existe en las demás partes del mundo y en diferentes proporciones. En España, por ejemplo, unas 4.000 personas tienen la enfermedad y más de 15.000 afrontan el riesgo de haber heredado el gen de la EH porque tienen o tuvieron un familiar directo afecto de la misma. En la población japonesa, china y africana la enfermedad tiene una incidencia menor. La enfermedad pueden heredarla y desarrollarla por igual hombres y mujeres, sin diferencias en clase social ni grupos étnicos.

La mayoría de las personas desarrollan la enfermedad durante la vida adulta, entre los 35 y los 55 años, aunque aproximadamente un 10% de las personas desarrollan

síntomas antes de los 20 años de edad (EH juvenil) y otro 10% después de haber cumplido los 55 años. Es poco frecuente que aparezcan síntomas antes de los diez años de edad (EH infantil). Se considera una enfermedad mortal que va progresando de forma gradual y lenta. La duración media es de 15 a 20 años, pero varía de una persona a otra. En la EH juvenil el rendimiento escolar disminuye a medida que las habilidades de pensamiento y razonamiento se deterioran. Las convulsiones ocurren en 30 por ciento a 50 por ciento de niños con esta condición. La enfermedad de Huntington juvenil tiende a progresar más rápidamente que la forma de aparición del adulto, suelen vivir de 10 a 15 años después de que aparezcan los signos y síntomas.

Los primeros signos de la enfermedad son muy leves y pueden consistir en pequeños cambios en la personalidad o el carácter. La falta de memoria, la torpeza y los movimientos “erráticos” de los dedos de las manos o de los pies pueden ser un signo. A menudo, durante estos estadios tan iniciales de la enfermedad, los pacientes no visitan a ningún médico y pueden pasar varios años hasta que se realice un diagnóstico médico. Por lo tanto, el inicio de la EH se describe como “insidioso”, pues la enfermedad se manifiesta muy lentamente.

La EH se caracteriza por una combinación de alteraciones motoras (movimiento), psiquiátricas (de personalidad o carácter) y cognitivas (pensamiento). Los síntomas de la EH varían de una persona a otra en amplitud, severidad, edad de comienzo y velocidad de progresión, incluso entre los miembros de una misma familia. Por ejemplo, una persona afectada por EH puede tener una alteración muy llamativa del movimiento, pero solo algunos síntomas psiquiátricos leves y poco deterioro intelectual, mientras que otra puede tener depresión y ansiedad muchos años antes de que aparezcan movimientos anormales.

La mayoría de las personas con EH no mueren como consecuencia de esta enfermedad, sino debido a problemas de salud derivados de la debilidad corporal que produce la EH, sobre todo por atragantamiento, infecciones (como neumonía) y fallo cardíaco (Enlace Web: Asociación Corea de Huntington Española).

c. Herencia de la EH

La EH es una enfermedad genética que sigue un patrón autosómico dominante. Una enfermedad con este patrón se caracteriza por presentar dominancia en los alelos cuyo locus se encuentra ubicado en los autosomas (no se encuentra ligada al sexo). Por lo tanto, la herencia de este carácter presentará de forma segura el fenotipo de la EH en la siguiente generación.

Como se muestra en la imagen 1, siguiendo el código de colores rojo y blanco para determinar la presencia o no del gen respectivamente, si ninguno de los ancestros tiene el gen mutado ningún descendiente tendrá el alelo de la enfermedad y, por tanto, no padecerán la enfermedad de Huntington.

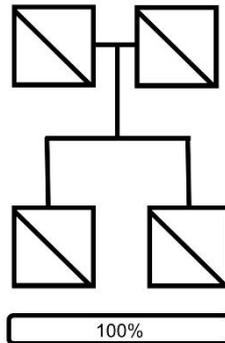


Imagen 1. Representación filogenética de la herencia de la EH con ancestros que no presentan el gen mutado. En color blanco se muestran los alelos que no presentan el gen mutado y, en rojo los que sí

En cambio, si uno de los ancestros padece la enfermedad podemos esperar diversas probabilidades en el fenotipo atendiendo a si el ancestro presenta uno o los dos alelos mutados. Un ancestro con los dos alelos de la EH tendrá descendencia portadora de un alelo con la mutación con una probabilidad del 100%, imagen 2. En cambio, si presenta la enfermedad, pero solo dispone de un alelo con el gen mutado, las probabilidades disminuyen a un 50%, imagen 3.

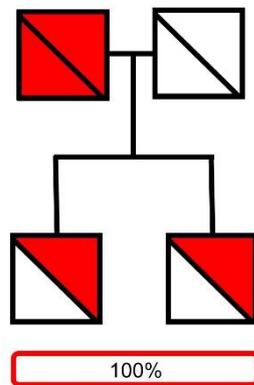


Imagen 2. Representación filogenética de la herencia de la EH con un ancestro portador de los dos alelos con el gen mutado y el otro ninguno. En color blanco se muestran los alelos que no presentan el gen mutado y, en rojo los que sí

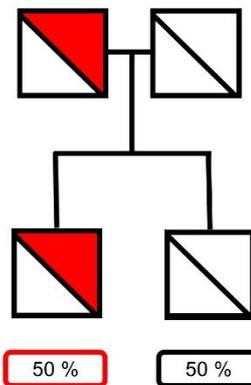


Imagen 3. Representación filogenética de la herencia de la EH con un ancestro portador de un alelo con el gen mutado y el otro ninguno. En color blanco se muestran los alelos que no presentan el gen mutado y, en rojo los que sí

Si los dos ancestros presentan la enfermedad, pero disponen de un alelo afectado y otro no mutado la probabilidad de que la descendencia presente la enfermedad es del 75%, tal y como se observa en la imagen 4.

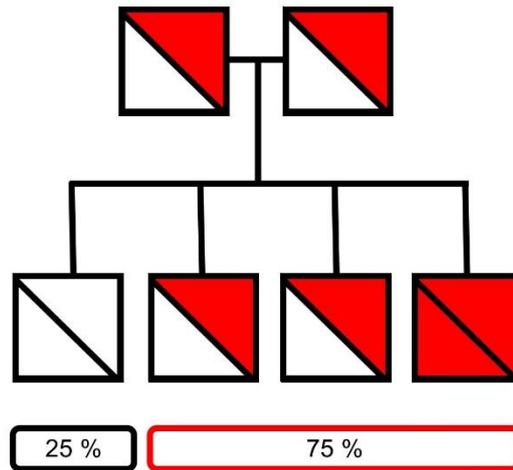


Imagen 4. Representación filogenética de la herencia de la EH con ancestros que presentan un alelo con el gen mutado. En color blanco se muestran los alelos que no presentan el gen mutado y, en rojo los que sí

Si los dos ancestros presentan la enfermedad, uno con los dos alelos afectados y el otro con uno afectado, el 100% descendencia presentará el fenotipo de la EH y, además, el 75% presentará los dos alelos también mutados (imagen 5). Por último, si los dos ancestros presentan la enfermedad, con los dos alelos afectados, el 100% de su descendencia presentará el fenotipo de la EH y, además, con los dos alelos también mutados (imagen 6).

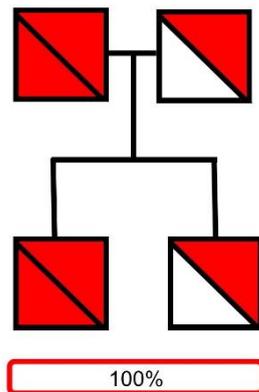


Imagen 5. Representación filogenética de la herencia de la EH con un ancestro portador de los dos alelos con el gen mutado y el otro con uno. En color blanco se muestran los alelos que no presentan el gen mutado y, en rojo los que sí

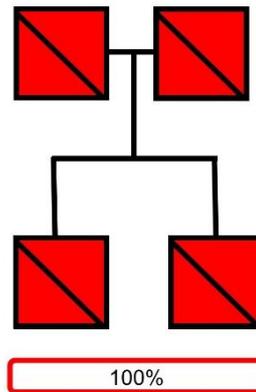


Imagen 6. Representación filogenética de la herencia de la EH con los dos ancestros portadores de los dos alelos con el gen mutado. En color blanco se muestran los alelos que no presentan el gen mutado y, en rojo los que sí

d. La enfermedad de Huntington a nivel molecular

La enfermedad de Huntington viene provocada por mutaciones en el gen HTT que codifica la Huntingtina (HTT).

El gen de la HTT se sitúa en el brazo corto del cromosoma 4, entre los 3.074.510 y 3.243.960 pares de bases (imagen 7).

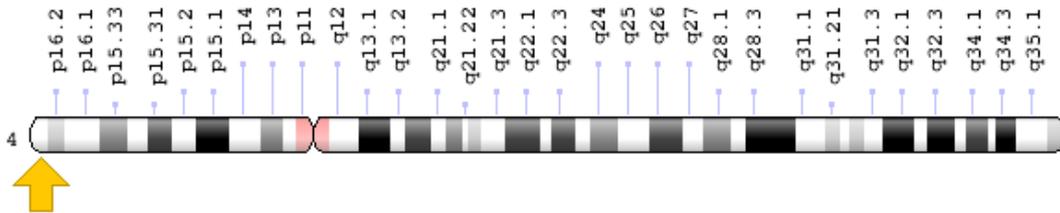


Imagen 7. Localización del gen de la HTT en el cromosoma 4.

La huntingtina es una proteína que se encuentra en diversos tejidos del cuerpo, con los niveles más altos de actividad en el cerebro. Dentro de las células, esta proteína puede estar implicada en la señalización química, el transporte de materiales, la unión a las proteínas y otras estructuras, y la protección de la célula de la auto-destrucción (apoptosis).

La mutación HTT, que causa la enfermedad de Huntington, implica un segmento de ADN conocido como una repetición trinucleotídica CAG. Este segmento se compone de una serie de tres bloques de nucleótidos: Citosina (C), Adenina (A) i Guanina (G) que aparecen repetidos varias veces. Normalmente, el segmento CAG se repite entre 10 y 35 veces dentro del gen.

En las personas con enfermedad de Huntington, el segmento CAG se repite de 36 a más de 120 veces. Las personas con 36 o 39 repeticiones CAG pueden o no desarrollar los signos y síntomas de la enfermedad de Huntington, mientras que las personas con 40 o más repeticiones casi siempre desarrollan el trastorno. Las personas que presentan la enfermedad en la edad adulta tienen de 40 a 50 repeticiones CAG en el gen de la HTT, mientras que las personas con la forma juvenil más común del trastorno tienden a tener más de 60 repeticiones CAG.

Un aumento en el tamaño del segmento CAG conduce a la producción de una versión anormalmente larga de la huntingtina. La proteína alargada se corta en pequeños fragmentos tóxicos que se unen y se acumulan en las neuronas, interrumpiendo las funciones normales de estas células (Enlace Web: *Genetics Home Reference*).

e. La bioinformática, una herramienta para la farmacéutica

La investigación y el desarrollo de nuevos fármacos es una de las tareas más complejas y caras que existen en la industria. A pesar de que, en función del producto a desarrollar, las cifras varían, se acepta comúnmente la media de entre 10 y 12 años, y el coste de mil millones de dólares en las cifras que se barajan para fabricar un nuevo fármaco.

La aparición de los primeros rasgos de la bioinformática en la década de los 60 y 70, juntamente con la evolución de la tecnología han posibilitado la utilización de herramientas computacionales en la farmacéutica, entre otras ramas como la genómica comparativa y la biología molecular y estructural.

Centrándonos en la industria farmacéutica, la bioinformática proporciona un avance en el tiempo de investigación y la forma de obtención de nuevos fármacos. Un ejemplo de ello es la realización de este trabajo de fin de máster, el cual, se realizará con herramientas vía online sin la necesidad de un supercomputador. Es decir, un usuario puede aprender a utilizar herramientas para el análisis de estructuras proteicas diana y realizar un cribado virtual o *virtual screening* desde su propio ordenador. El *virtual screening* permite la búsqueda de compuestos que se unan a una estructura proteica determinada. Esto permite obtener de forma “rápida” compuestos de interés, por ejemplo, la búsqueda y selección de una cavidad de la estructura diana y el *virtual screening* pueden realizarse en horas.

Esto no significa que ya se obtengan fármacos contra dicha estructura, ya que se deben realizar más pruebas, como, por ejemplo, el estudio de la farmacocinética para observar el comportamiento del compuesto, pero si se tiene un primer cribado de forma “rápida”.

El análisis computacional de las propiedades de un compuesto también es un hito de la bioinformática, permitiendo el análisis de la físico-química o la cinética de compuestos en el organismo.

1.2. Objetivos del trabajo

El trabajo de fin de máster presentado en esta memoria tiene como objetivos:

- i. Buscar la estructura de la Huntingtina (HTT)
 - a. Obtener su secuencia
 - b. Buscar su estructura por homología
 - c. Buscar su estructura por modelaje
- ii. Obtener los diferentes ligandos que se unan a la HTT
 - a. Buscar las cavidades de las estructuras diana.
 - b. Realizar el *virtual screening* basado en estructura
- iii. Analizar las propiedades físico-químicas de los ligandos obtenidos
 - a. Test de mutagénesis, carcinogénesis, toxicidad y sensibilidad de la piel.
- iv. Analizar las propiedades farmacocinéticas de los ligandos seleccionados

1.3. Enfoque y método seguido

Para la realización del trabajo se ha escogido la Huntingtina como diana contra la enfermedad de Huntington. Con la secuencia obtenida en el UCSC se ha realizado una búsqueda estructural por homología, obteniendo estructuras del PDB (*Protein Data Bank*) similares a ella y modelos creados por el programa *iTASSER*. Posteriormente, se realiza el análisis de cavidades mediante *fPocket*, posibles lugares de unión, y el *virtual screening* en busca de ligandos afines a estas estructuras mediante *MTiOpenScreen*. Por último, se analizan las propiedades físico-químicas con el programa *VEGA QSAR* y las propiedades farmacocinéticas de los compuestos obtenidos mediante el *Web pkCSM* de la *University of Cambridge*. Además, se han realizado cambios de formato con el programa *OpenBabel*.

Se ha realizado el trabajo seleccionando diversas estructuras con el fin de aumentar la diversidad de éstas. Otro método a seguir podría ser la selección del mejor PDB, en cuanto a homología, o el mejor modelo predicho y realizar el análisis de todas las cavidades y todos los ligandos posibles con el fin de seleccionarlo como válido o descartar por completo esa estructura o modelo.

1.4. Planificación del trabajo

Las tareas planteadas al inicio del trabajo y su temporalización fueron las siguientes:

Fecha	Trabajo
16/03/17 - 26/03/17	Realización del marco teórico Obtención de la estructura de la Huntingtina
27/03/17 - 9/04/17	Realizar el screening basado en estructura.

10/04/17 - 25/04/17	Obtener información sobre la interacción entre Huntingtina y el fármaco.
26/04/17 - 10/05/17	Obtener información sobre las propiedades físico-químicas y farmacocinéticas de los posibles fármacos.
11/05/17 - 24/05/17	Elaboración de la memoria
25/05/17 - 06/06/17	Preparación de la defensa

Debido a problemas con el uso de los programas y el elevado tiempo de análisis, sobre todo para el *virtual screening*, llegando a superar las 8h en una cavidad, se han realizado las tareas de *virtual screening*, selección de ligandos y análisis de propiedades de forma paralela.

1.5. Breve resumen de productos obtenidos

Mediante el análisis de las estructuras homólogas en PDB y los modelos predichos, se han obtenido 3 cavidades de cada uno y, de éstas, se han seleccionado 15 ligandos, obteniendo un total de 720 compuestos.

De los 720 compuestos se han seleccionado 64 que han superado las pruebas de análisis físico-químico y, de estos 64, se han seleccionado 12 que han obtenido negatividad en la toxicidad hepática y, por último, de estos 12 se han seleccionado 2 que no inhiben a la hERG II.



1.6. Breve descripción de los capítulos de la memoria

La memoria de este trabajo de fin de máster se divide en:

- Materiales y métodos. Recursos utilizados para la búsqueda y análisis de posibles fármacos.
- Resultados. Estructuras, cavidades y compuestos obtenidos a partir de la secuencia de la Huntingtina y los pasos realizados para la obtención de éstos. También su posterior análisis de propiedades físico-químicas y su farmacocinética.
- Discusión. Comentarios de los resultados obtenidos y valoración de los ligandos seleccionados.
- Conclusiones. Valoración final de los objetivos planteados al inicio del trabajo.
- Bibliografía. Recursos bibliográficos utilizados.
- Anexo. Materiales adjuntos a la memoria.

2. Materiales y métodos

Los recursos utilizados para la realización de la búsqueda computacional de posibles pequeños fármacos contra la enfermedad de Huntington son:

2.1 Obtención del gen HTT

Localización del gen de la Huntingtina y obtención de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas mediante el servidor genómico de la University of Santa Cruz (<https://genome.ucsc.edu/>).

2.2 Predicción estructural de la Huntingtina

Obtención de modelos y plantillas conocidas del PDB, mediante el programa Web I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) de la *University of Michigan*. El programa proporciona predicciones sobre estructura y función de proteínas. Los modelos se obtienen a partir de múltiples alineamientos mediante LOMETS (generando modelos 3D mediante la recopilación de alineaciones del objetivo a plantillas de alta calificación de 9 programas de enhebrado: FAS-3D, HHsearch, MUSTER, pGenTHREADER, PPAS, PRC, PROSPECT2, SP3 y SPARKS-X) y simulaciones iterativas TASSER (método para predecir estructuras 3D modelo de secuencias aminoacídicas objetivo detectando estructuras plantilla del PDB mediante reconocimiento de plegado o *threading*).

Mediante entradas de máximo 1500 aminoácidos se obtiene:

- a. Predicción de la estructura secundaria.
- b. Predicción sobre la accesibilidad del solvente.
- c. Predicción normalizada del B-factor.
- d. Top 5 de modelos de predicción.
- e. Proteínas estructuralmente parecidas en el PDB.
- f. Predicción de función.

Obtención de plantillas conocidas en PDB mediante la búsqueda en el repositorio de ZINC (<http://zinc.docking.org/>).

A partir de la información obtenida del análisis estructural se obtienen los datos de las plantillas seleccionadas en el *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) descargando los archivos de cada entrada en formato *.pdb*.

2.3 *Virtual Screening* basado en estructura

Realización del *Virtual Screening* basado en estructura que permite realizar la web del *Ressource Parisienne en Bioinformatique Structurale* (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/index.html>).

Para realizar el *screening* primero se analizan las cavidades de cada modelo o plantilla PDB mediante el programa *fPocket* (<http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=fpocket#forms::fpocket>) seleccionando los 3 mejores candidatos. Este programa está basado en el Diagrama de Voronoi, el cual permite realizar interpolaciones basados en distancia euclidiana de forma sencilla.

Posteriormente, se realiza el *Virtual screening* basado en estructura de cada entrada (modelo o PDB) en sus respectivas cavidades mediante *MTiOpenScreen* (<http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::MTiOpenScreen>). El programa permite obtener una selección de pequeños compuestos con probabilidad de unión al receptor dado, en este caso, a las diferentes cavidades de los modelos o PDBs obtenidos como plantilla.

2.4 Conversión de datos

El programa *OpenBabel* (http://openbabel.org/wiki/Main_Page) que permite la conversión de archivos.

Durante este trabajo se ha utilizado el programa para convertir los datos generados mediante el *virtual screening* en formato *.mol2* a formato *.sdf* para su lectura en *VEGA QSAR*. Además se han añadido los hidrógenos a los ligandos en formato *.mol2* para su *docking* con *Swissdock*.

2.5 Análisis de las propiedades físico-químicas

El programa *VEGA QSAR* (<https://www.vegahub.eu/>) permite realizar diferentes test para el análisis de las propiedades físico-químicas de diferentes compuestos:

- *Mutagenicity (Ames test) model (ScarPy/IRFMN) – v. 1.0.7.*

Este modelo realiza una predicción cualitativa de mutagénesis en *Salmonella typhimurium* (*Ames test*). El modelo ha sido construido como un conjunto de reglas, extraídas con el software del conjunto de entrenamiento del modelo de mutagénesis *CAESAR*. El modelo está basado en Ferrari, T., Cattaneo, D., Gini, G., Golbamaki, N.,

Bakhtyari, Manganaro, A., Benfenati, E., *Automatic knowledge extraction from chemical structures: the case of mutagenicity prediction, SAR and QSAR in Environmental Research* (2013), vol. 24 issue 5, 365-83.

Existen dos normas: mutagenicidad (112 patrones) y no-mutagenicidad (93 patrones). Si existe, como mínimo, un patrón de mutagenicidad asociada a un compuesto de estudio se da la predicción de compuesto mutagénico. En cambio, si se observa uno o más patrones de no-mutagénesis, se obtiene una predicción de no-mutagénico. Si no hay patrones que coincidan con el compuesto, se da una predicción de posiblemente no mutagénico.

- *Carcinogenicity model (ISS) – v. 1.0.2*

Este modelo proporciona una predicción cualitativa de la potencia carcinogénica de acuerdo con los requisitos específicos de la regulación química. El modelo se ha construido como un conjunto de reglas sacadas del trabajo de Benigni y Bossa (ISS) implementado en el software ToxTree version 2.6 (<http://toxtree.sourceforge.net>): Benigni, R., Bossa, C., Jeliaskova, N., Netzeva, T. and Worth, A. “*The Benigni / Bossa rulebase for mutagenicity and carcinogenicity - a module of Toxtree*” European Commission report EUR 23241 EN; Benigni, R., Bossa, C., Netzeva, T., Rodomonte, A. and Tsakovska, I. “*Mechanistic QSAR of aromatic amines: new models for discriminating between mutagens and nonmutagens, and validation of models for carcinogens*” *Environ mol mutag*, (2007), 48:754-771; Benigni, R., Bossa, C., & Tcheremenskaia, O. “*Nongenotoxic carcinogenicity of chemicals: mechanisms of action and early recognition through a new set of structural alerts*” *Chemical Reviews*, 2013, 113(5), 2940-57.

El modelo implementa las reglas relacionadas con la carcinogénesis. Si, al menos, se detecta un patrón de carcinogénesis en un compuesto dado, la predicción será de carcinógeno. En cambio, si no se detecta ningún patrón, la predicción será de no-carcinógeno.

- *Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) – v. 1.0.0*

El modelo proporciona una predicción cualitativa de la toxicidad reproductiva y del desarrollo. El modelo implementa una librería virtual de compuestos tóxicos descritos en el estudio de Procter & Gamble: Wu, S., Fisher, J., Naciff, J.M., Michael C, Laufersweiler, Lester, C., Daston, G. and Blackburn, K. “*A Framework for Identifying Chemicals with Structural Features Associated with Potential to Act as Developmental or Reproductive Toxicants*” *Chem. Res. Toxicol.*, 2013, 26 (12), pp 1840–1861.

En el trabajo de Practer & Gamble, se identifican 25 categorías de posibles tóxicos y, de cada categoría se genera una extensa lista de compuestos tóxicos virtuales. El modelo implementa estas categorías y trata de encontrar una coincidencia entre el compuesto dado y alguno de los compuestos virtuales del repositorio. Si se encuentra una coincidencia, la predicción es de Tóxico. En cambio, si no existe coincidencia, la predicción es de No-Tóxico.

- *Skin Sensitization model (CAESAR) – v- 2.1.6*

El modelo proporciona una predicción cualitativa de la sensibilización de la piel en ratones (modelo de ensayo en ganglios linfáticos locales).

El modelo consiste en *Adaptive Fuzzy Partition (AFP)* basado en 8 descriptores. El AFP produce como resultados dos valores O (positivo) y O (negativo) que representan la clasificación a las clases sensibilizante y no-sensibilizante. El compuesto dado se asigna a la clase que tiene este valor de grado superior a 0.5, a menos que la diferencia entre los valores de los dos grados sea inferior al umbral 0.001. En este caso, el pertenecer a una clase u otra no está asegurada, por lo cual, no se realiza predicción. Las referencias y detalles se pueden encontrar en: Chaudhry, Q., Piclin, N., Cotterill, J., Pintore, M., Price, N. R., Chrétien, J. R. and Roncaglioni, A. (2010). *Global QSAR models of skin sensitizers for regulatory purposes.*, Chem Cent J 4 Suppl 1, S5.

2.6 Análisis fármaco-cinético de los resultados

El portal web *pkCSM-pharmacokinetics* de la *University of Cambridge* (<http://bleoberis.bioc.cam.ac.uk/pkcsml/>) que permite realizar el estudio de las propiedades farmacocinéticas de pequeñas moléculas. Éste permite el análisis de las siguientes propiedades:

Interpretación de los resultados del *pkCSM-pharmacokinetics*:

a. Absorción:

- Solubilidad en agua (*Water solubility*)

Refleja la solubilidad de un compuesto en agua a 25°C.

Interpretación: Se muestran los resultados mediante el logaritmo de la concentración molar (log mol/L).

- Permeabilidad Caco-2 (*Caco-2 Permeability*)

La línea celular Caco-2 está formada por células del epitelio de adenocarcinoma colorrectal humano. Estas células son utilizadas como modelo *in vitro* de la mucosa intestinal humana para predicciones de la absorción de fármacos administrados por vía oral.

Interpretación: Se considera un componente con elevada permeabilidad si tiene $P_{app} > 8 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, que traducido al modelo de predicción son valores de >0.90 .

- Absorción intestinal (*Intestinal Absorption in Human*)

Modelo para predecir la proporción de componentes que son absorbidos a través del intestino delgado, ya que, normalmente, el intestino es el primer lugar de absorción de un fármaco administrado en solución por vía oral.

Interpretación: Se muestra el porcentaje de absorción del intestino. Una molécula con una absorción menor al 30% se considera con poca absorción.

- Substrato de la glicoproteína-P (*P-glycoprotein substrate*)

La glicoproteína-P es un transportador de flujo de expulsión dependiente de ATP. Funciona como una barrera biológica mediante la extrusión de toxinas y xenobióticos fuera de las células. Los resultados del transporte de glicoproteína-P se obtienen usando ratones *knockout mdr* transgénicos y sistemas celulares *in vitro*.

Interpretación: El modelo predice si un compuesto dado es probable que sea sustrato de glicoproteína-P.

- Inhibición de las glicoproteína-P I y II (*P-glycoprotein I and II inhibitors*)

La modulación del transporte mediado por la glicoproteína-P tiene implicaciones farmacocinéticas significativas para sustratos de glicoproteína-P, que pueden ser explotadas para ventajas terapéuticas específicas o resultar en contradicciones, ya que se modula una enzima relacionada con la extrusión de compuestos tóxicos.

Interpretación: El predictor determina si un compuesto dado es probable que sea un inhibidor de la P-glicoproteína I/II.

- Permeabilidad de la piel (*Skin Permeability*)

La permeabilidad de la piel es un factor significativo para la eficacia de muchos productos de consumo y de interés para el desarrollo de fármacos de administración transdérmica.

Interpretación: El modelo predice si un compuesto dado es permeable a la piel, expresado mediante la constante $\log K_p$ (cm/h). Un compuesto es considerado con baja permeabilidad si tiene un $\log K_p > -2,5$.

b. Distribución:

- El volumen de distribución en estado estacionario (VDss)

El volumen de distribución en estado estacionario (VDss) es el volumen teórico que la dosis total de un fármaco necesitaría para distribuirse de forma uniforme para dar la misma concentración en el plasma sanguíneo. Cuanto más alta es la VDss, más se distribuye un fármaco en el tejido en lugar del plasma. El modelo logarítmico predicho de VDss de un compuesto dado es mostrado como $\log L/Kg$.

Interpretación: El VDss es considerado bajo si se encuentra por debajo de 0.71 L/Kg ($\log VDss < -0.15$) y elevado si supera 2.81 L/Kg ($VDss > 0.45$).

- Fracción libre (*Fraction Unbound in Human*)

La mayoría de fármacos en plasma se encuentran en equilibrio entre la unión o no a las proteínas plasmáticas. La eficacia de un fármaco puede verse afectada por el grado en el que se une a las proteínas sanguíneas, ya que cuanto más ligada se encuentre, menos eficiente mente puede atravesar las membranas celulares o difundirse.

Interpretación: El predictor muestra la relación entre la concentración del compuesto unido y la concentración total. Los valores mayores a 0.9 implican una unión importante a las proteínas plasmáticas, en cambio, valores inferiores a 0.2 implican una escasa unión.

- Permeabilidad de la barrera hemato-encefálica (*BBB Permeability*)

El cerebro se encuentra protegido de componentes exógenos mediante la barrera hemato-encefálica (*Blood-Brain Barrier, BBB*). La habilidad de un fármaco de entrar al cerebro es un parámetro importante a tener en cuenta para ayudar a reducir los efectos secundarios y toxicidades o para mejorar la eficacia de los fármacos cuya actividad está dentro del cerebro. La permeabilidad de la BBB se mide *in vivo* en animales modelo como $\log BB$, el ratio logarítmico de concentración del fármaco en del cerebro al plasma.

Interpretación: Para un compuesto dado, un $\log BB > 0.3$ es considerado como un compuesto con facilidad para cruzar la barrera, mientras que moléculas con $\log BB < -1$ son consideradas como poco distribuidas al cerebro.

- Permeabilidad al Sistema Nervioso Central (*CNS permeability*)

Medir la permeabilidad cerebral de la sangre puede ser difícil con factores confusos. La superficie del producto de la BBB (logPS) es una medida más directa. Se obtiene de *in situ* de perfusión de cerebro con el compuesto inyectado directamente en la arteria carótida. Esto carece de los efectos de la distribución sistémica que puede distorsionar la penetración cerebral.

Interpretación: Se considera que los compuestos con un logPS > -2 penetran en el sistema nervioso central (SNC), en cambio, los que presentan un logPS < -3 no penetran en el SNC.

c. Metabolismo:

- Inhibición del citocromo P450 (*Cytochrome P450 inhibitors*)

El citocromo P450 es un importante enzima de desintoxicación, encontrada principalmente en el hígado. Realiza la función de oxidación de xenobióticos para facilitar su excreción. Muchos fármacos son desactivados por el citocromo P450 y otros son activados por él. Los inhibidores de esta encima, puede afectar al metabolismo de fármacos y está contraindicado. Por lo tanto, es importante evaluar la habilidad de un compuesto a inhibir el citocromo P450. Existen modelos para diversas isoformas (CYP1A2/CYP2C19/CYP2C9/CYP2D6/CYP3A4) de la encima.

Interpretación: Un compuesto es considerado inhibidor de la P450 si la concentración requerida para inhibir el 50% es menor a 10uM. El modelo determina si un compuesto es probable inhibidor de la P450.

- Sustrato de la P450 (*CYP2D6/CYP3A4 substrate*)

El citocromo P450's es responsable del metabolismo de muchos fármacos. Sin embargo, los inhibidores de este citocromo pueden alterar dramáticamente la farmacocinética de estos fármacos. Por lo tanto, es importante evaluar si un compuesto puede ser sustrato de la P450. Las dos isoformas responsables del metabolismo de fármacos son la 2D6 y la 3A4.

Interpretación: El modelo evalúa si una molécula es probable metabolizada por la P450.

d. Excreción:

- Sustrato de la OCT2 renal (*Renal OCT2 substrate*)

La OCT2 (transportador catiónico orgánico 2) es un transportador de captación renal que juega un papel importante en la eliminación renal de fármacos y componentes

endógenos. Los sustratos de OCT2 también tienen potencial en interacciones adversas cuando es coadministrado con inhibidores de OCT2.

Interpretación: El modelo evalúa si un compuesto es probable que sea sustrato de la OCT2.

- Eliminación total (*Total Clearance*)

La eliminación de fármacos se mide mediante la constante de CL_{tot}, y primeramente ocurre como una combinación de la actuación hepática (metabolismo del hígado y la vesícula biliar) y la renal (excreción a través de los riñones). Es importante para determinar los niveles de dosis para conseguir un estado estable de concentración.

Interpretación: El modelo predice la eliminación total de un compuesto en log(ml/min/kg).

e. Toxicidad:

- Dosis letal 50 en ratas (*Rat LD50*)

El valor de la dosis letal (LD50) es una medida estandarizada de toxicidad usada para evaluar la toxicidad relativa de moléculas. La LD50 es la cantidad de un compuesto dado que provoca la muerte del 50% del grupo de animales utilizado como test.

Interpretación: Predicción de la dosis LD50 en ratas en mol/kg.

- Test Ames de mutagénesis (*AMES toxicity*)

El test Ames es un método ampliamente utilizado para evaluar componentes potencialmente mutagénicos usando bacterias.

Interpretación: Un test con resultado positivo indica que el componente es mutagénico, en cambio, el resultado negativo indica que el componente no es mutagénico.

- Toxicidad en *T.pyriformis* (*T. pyriformis toxicity*)

La *T. pyriformis* es un protozoo cuya resistencia a la toxicidad es habitualmente utilizada como punto final tóxico.

Interpretación: Para un compuesto dado, se predice el pIGC50 (logaritmo negativo de concentración requerida para inhibir el 50% del crecimiento en log ug/L). Si se obtiene un valor mayor a -0.5 log ug/L es considerado tóxico.

- Toxicidad en *Fathead Minnows* (*Minnow toxicity*)

La concentración de dosis letal (LC50) representa la concentración de una molécula necesaria para provocar la muerte del 50% de *Fathead Minnows* (*Pimephales promelas*).

Interpretación: Se predice la LC50 de un compuesto dado, los valores por debajo de 0.5mM ($\log LC50 < -0.3$) son considerados como elevada toxicidad.

- Dosis máxima tolerada (*Maximum Recommended Tolerated Dose-MTRD*)

La máxima dosis tolerada recomendada produce un estimador del umbral de la dosis tóxica de químicos en ser humano. Esto ayuda a guiar la dosis de inicio máxima recomendada para los farmacéuticos en ensayos clínicos en fase I, los cuales, actualmente, se basan en extrapolaciones de datos animales.

Interpretación: De un compuesto dado, si el MRTD es menor o igual a 0.477 $\log(\text{mg/kg/day})$ se considera bajo y alto si es superior a 0.447 $\log(\text{mg/kg/day})$.

- Toxicidad crónica oral en Rata (*Oral Rat Chronic Toxicity*)

La exposición de químicos en dosis bajas-moderadas en largos períodos de tiempo es un aspecto significativo en muchos tratamientos. Estudios crónicos permiten identificar la dosis más baja de un componente, mediante la cual se observa un efecto adverso (LOAEL), y la dosis más alta en la que no se observa efecto adverso (NOAEL).

Interpretación: Para un compuesto dado, el predictor genera el *log Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL)* en $\log(\text{mg/kg}_{\text{bw}}/\text{day})$. Los resultados del LOAEL necesitan ser interpretados en relación a la concentración bioactiva y a la duración del tratamiento.

- Toxicidad hepática (*Hepatotoxicity*)

La lesión hepática inducida por fármacos es un importante problema de seguridad para el desarrollo de éstos y una causa importante de su desgaste. Por lo tanto, es un punto crucial en el diseño de nuevos fármacos.

Interpretación: El modelo predice si un compuesto dado es probable que se encuentre asociado con una disfunción en el desarrollo habitual del hígado.

- Sensibilizador de la piel (*Skin Sensitization*)

La sensibilización de la piel es uno de los potenciales efectos adversos en productos aplicados dérmicamente.

Interpretación: El modelo predice si un compuesto dado se puede ver asociado como sensibilizador de la piel.

- Inhibición de la hERG I/II (*hERG I and II Inhibitors*)

La inhibición de los canales de potasio codificados por hERG es la principal causa de desarrollo del síndrome QT largo – conduciendo a una fatal arritmia ventricular, hecho que ha provocado la retirada de numerosas sustancias del mercado farmacéutico.

Interpretación: El modelo predictor determina si un compuesto es probable inhibidor de la hERG I/II.

Obtención de la representación 3D de los compuestos y cavidades mediante los programas *Chimera* (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) del *Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics* (UCSF) y *Jmol* (<http://jmol.sourceforge.net/>). Estos programas permiten la visualización y el análisis de estructuras moleculares.

3. Resultados

3.1. Búsqueda de la estructura de la HTT

a. Obtención de la secuencia

Para la obtención de la secuencia de la HTT se ha recurrido al servidor genómico de la *University of Santa Cruz*. Este servidor permite buscar la proteína por su nombre y proporciona un diagrama mostrando su posición en el genoma humano (versión GRCh38/hg38), tal y como se observa en la imagen 8.

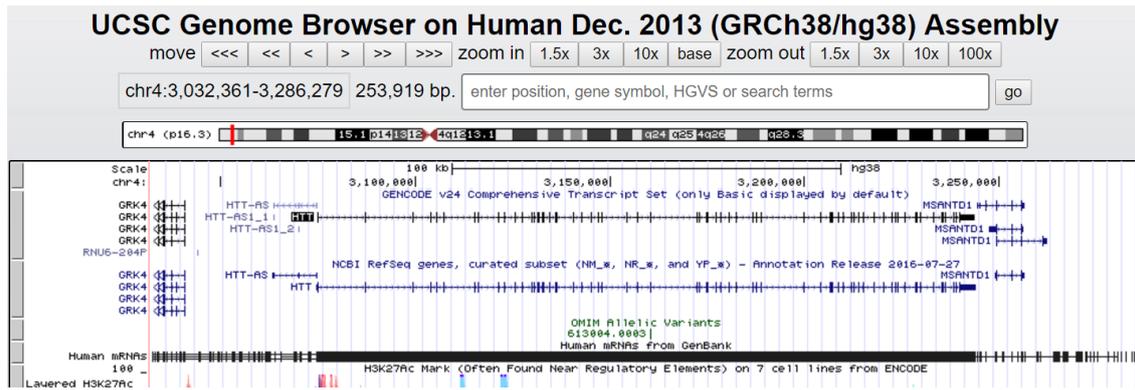


Imagen 8. Posición del gen de la HTT en el genoma humano GRCh38/hg38 en el servidor genómico de la UCSC.

Observamos que el gen de la HTT se encuentra en el cromosoma 4. Su secuencia genómica se encuentra entre las posiciones 3.074.510-3.243.960 con un tamaño de 169.341 nucleótidos en la cadena + (imagen 9).

mRNA/Genomic Alignments (NM_002111.7)

BROWSER	SIZE	IDENTITY	CHROMOSOME	STRAND	START	END	QUERY	START	END	TOTAL
browser	13646	100.0%	4	+	3074510	3243960	NM_002111.7	1	13652	13669

[View details of parts of alignment within browser window.](#)

Position: [chr4:3074510-3243960](#)

Band: 4p16.3

Genomic Size: 169451

Strand: +

Gene Symbol: HTT

CDS Start: complete

CDS End: complete

Imagen 9. Posicionamiento y características del gen de la HTT.

En el mismo servidor Web UCSC podemos obtener la secuencia genómica completa y las predicciones de las secuencias de mRNA y proteica. Ésta última se encuentra adjunta en la sección a. del Anexo 1 debido a su longitud (3144 aminoácidos), pero en la imagen 10 se presenta el fragmento inicial.

```
>NP_002102.4 length=3144
MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPP
PQLPQPPQAQPLLPQPPPPPPPPPPGPAVAEPLHRPKKELSATKKD
RVNHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLLGIAMELFLLCSDDAESDVRMVA
ECLNKVIKALMDSNLPRLQLELYKEIKKNGAPRSLRAALWRFELAHVLR
PQKCRPYLVNLLPCLTRTSKRPEESVQETLAAAVPKIMASFGNFANDNEI
KVLLKAFIANLKSSSPTIRRTAAGSAVSIQHSRRTQYFYSWLLNVLGL
LVPVEDEHSTLLILGVLLTLRYLVPLLQQQVKDTSKGSFGVTRKEMEVS
PSAEQLVQVYELTLHHTQHODHNVVTGALELLQQLFRTPPELQLTAV
GGIGQLTAAKEESGGRSRSGSIVELIAGGGSSCSPVLSRKQKGVLLGEE
EALDDSESRSDVSSALTASVKDEISGELAASSGVSTPGSAGHDIITEQ
PRSQHTLQADSVDLASCDLTSATDGDDEEDILSHSSQVSAVPSDPAMD
NDGTQASSPISDSSQTTTEGPDASVTPSDSSEIVLDGTDNQYLGQLIGQP
QDEDEEATGILPDEASEAFRNSSMALQQAHLKKNMSHCRQPSDSSVDK
LRDEATEPGDOENKPCRIRKGDIGOSTDDDSAPLVHCVRLLSASFLLTG
GK
```

Imagen 10. Secuencia inicial de la

b. Búsqueda estructural por homología

Utilizaremos la secuencia de aminoácidos obtenida en el servidor genómico del UCSC para la búsqueda estructural por homología de estructuras para la HTT, ya que ésta no se encuentra descrita.

Para este paso se utiliza el programa *i-TASSER* que nos permite realizar predicciones de estructura y función de proteínas. Debido a la limitación de un máximo de 1500 aminoácidos por entrada (la HTT tiene 3144) se ha dividido la secuencia en dos, del número 1 al 1500 y del número 1501 al 3000.

Parte	Fragmento (AAs)
1	1-1500
2	1501-3000

Tabla 1. Fraccionamiento de la secuencia aminoacídica de la HTT para su análisis con *I-TASSER*.

Se obtienen como resultado las predicciones de la estructura secundaria, la accesibilidad del solvente, el B-factor normalizado, proteínas estructuralmente parecidas en PDB y función.

El objetivo de este apartado es la búsqueda estructural de la HTT por homología, por lo tanto, se presta atención a los PDBs obtenidos como proteínas estructuralmente parecidas, es decir, PDBs seleccionados como plantilla de alguna fracción de la HTT. Los 10 mejores resultados se encuentran clasificados en la tabla 2:

Parte	PDB	Enlace	TMs
1	5IJO	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=5ijo	0.802
	3S4W	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3s4w	0.285
	3HMJ	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3hmj	0.281
	1XI5	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1xi5	0.279
	2UVC	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4v59	0.279
	2PFF	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2pff	0.278
	5T8V	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=5t8v	0.278
	2BKU	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2bku	0.275
	2X19	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2x19	0.272
	3W3T	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3w3t	0.264

2	5H64	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=5h64	0.939
	5FVM	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=5fvm	0.820
	4JSP	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4jsp	0.396
	5HB4	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=5hb4	0.336
	2BKU	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2bku	0.324
	1WA5	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1wa5	0.323
	1QGK	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1qgk	0.317
	3W3T	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3w3t	0.316
	4XRI	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4xri	0.313
	2Z5N	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2z5n	0.306

Tabla 2. Top 10 mejores resultados obtenidos por I-TASSER como resultado de la búsqueda por homología a la secuencia de aminoácidos de la HTT clasificadas por TM-score.

Seleccionamos sólo aquellos resultados con un *TM score* (TMs) superior a 0.8. Con este método queda seleccionado el PDB 5IJO de la primera parte de la proteína y los PDBs 5H64 y 5FVM de la segunda parte (aunque se ha realizado el estudio con todos los resultados obtenidos como PDB).

Parte	PDB	TM score
1	5IJO	0.802
2	5H64	0.939
	5FVM	0.820

Tabla 3. Resultado del cribado de la predicción por homología según *TM-score*.

En las imágenes siguientes (imágenes 11, 12 y 13) se muestran las estructuras 3D de los PDB seleccionados:

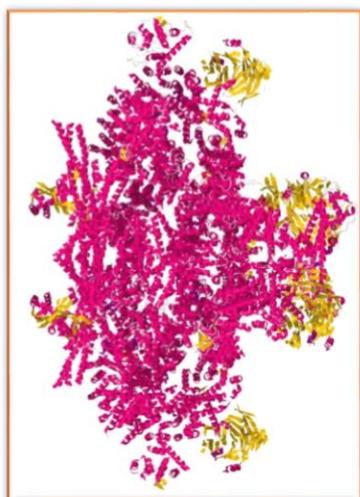


Imagen 11. Estructura 3D del PDB 5IJO.



Imagen 12. Estructura 3D del PDB 5H64.



Imagen 13. Estructura 3D del PDB 5FVM.

Además, para obtener un mayor análisis, se añaden los PDBs almacenados en ZINC como representativos de la HTT, mostrados en la tabla 4:

PDB	Enlace
2D3X	http://www.rcsb.org/pdb/results/modelResults.do
3IO4	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3IO4
3IO6	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3IO6
3IOR	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3IOR
3IOT	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3IOT
3IOU	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3IOU
3IOV	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3IOV
3IOW	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3IOW
3LRH	http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3LRH

Tabla 4. Estructuras del PDB almacenadas en ZINC como representativas de la HTT.

Se adjuntan a continuación las imágenes de la estructura 3D de los PDB anteriores (imágenes de la 14 a la 22):



Imagen 14. Estructura 3D del PDB 2D3X.



Imagen 15. Estructura 3D del PDB 3IO4.

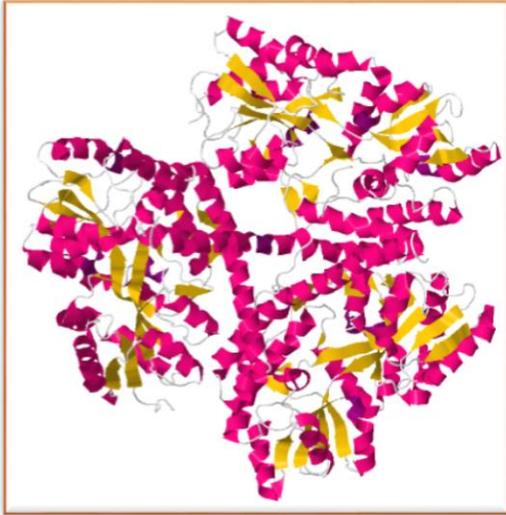


Imagen 16. Estructura 3D del PDB 3IO6.



Imagen 17. Estructura 3D del PDB 3IOR.



Imagen 18. Estructura 3D del PDB 3IOT.

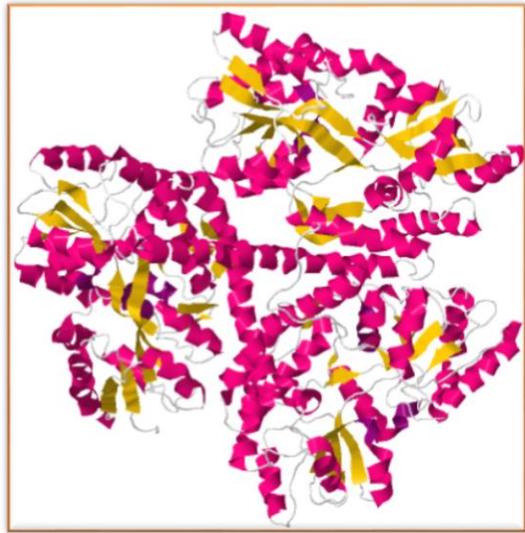


Imagen 19. Estructura 3D del PDB 3IOU.

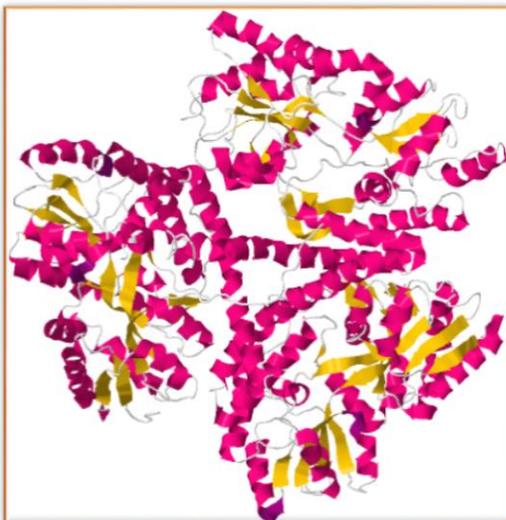


Imagen 20. Estructura 3D del PDB 3IOV.



Imagen 21. Estructura 3D del PDB 3IOW.

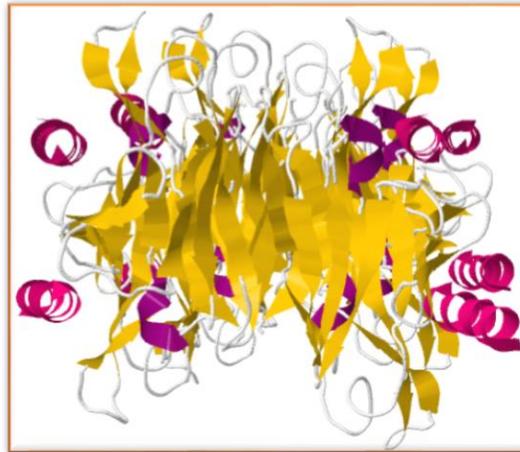


Imagen 22. Estructura 3D del PDB 3LRH.

c. Búsqueda estructural por modelaje

La obtención de modelos predictores de la estructura de la HTT, como en el apartado anterior, se realiza mediante el programa *I-TASSER*. Como resultado obtenemos 10 modelos, 5 por parte analizada con sus respectivas imágenes de la estructura 3D y *c-score*. En la tabla 5 se muestra el *c-score* de los modelos y, a continuación, las imágenes de la estructura de los modelos (imágenes de la 23 a la 32).

Parte	Modelo	C-score
1	1	-1.66
	2	-2.53
	3	-2.59
	4	-2.62
	5	-2.72
2	1	-0.63
	2	-1.56
	3	-1.97
	4	-2.91
	5	-2.92

Tabla 5. *C-score* de los modelos obtenidos por *I-TASSER*.

Parte 1

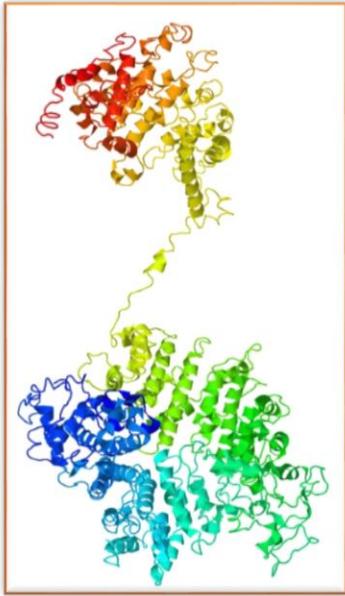


Imagen 23. Estructura 3D del Modelo 1.

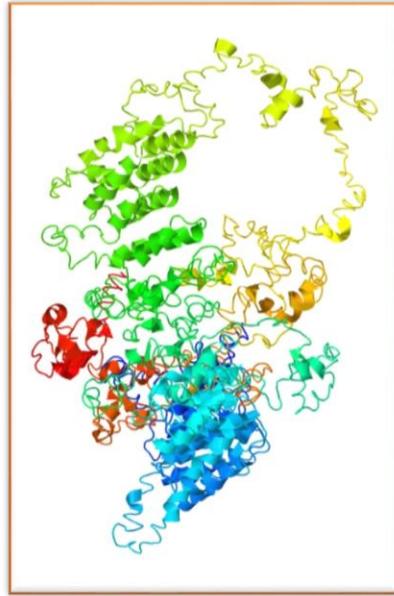


Imagen 24. Estructura 3D del Modelo 2.

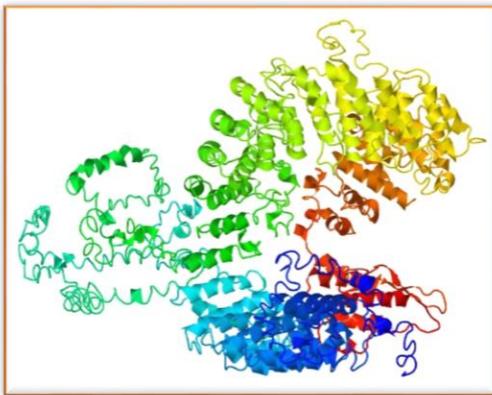


Imagen 25. Estructura 3D del Modelo 3.

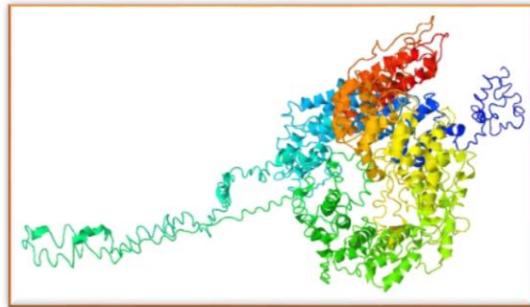


Imagen 26. Estructura 3D del Modelo 4.

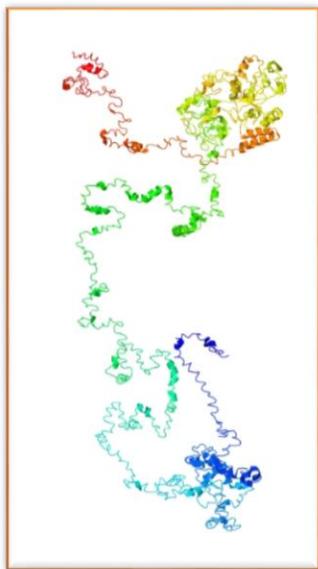


Imagen 27. Estructura 3D del Modelo 5.

Parte 2

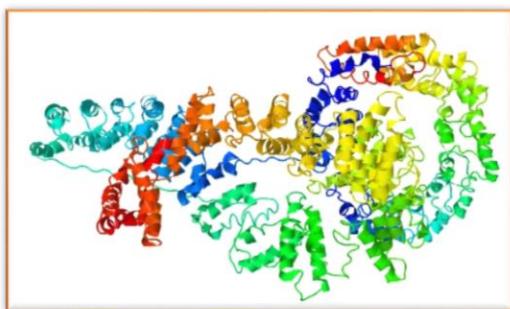


Imagen 28. Estructura 3D del Modelo 1.

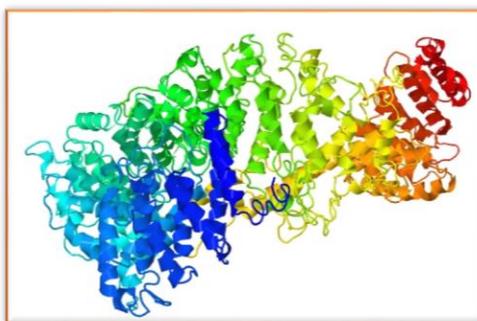


Imagen 29. Estructura 3D del Modelo 2.

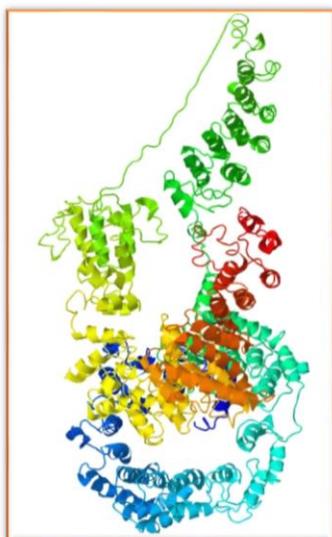


Imagen 30. Estructura 3D del Modelo 3.

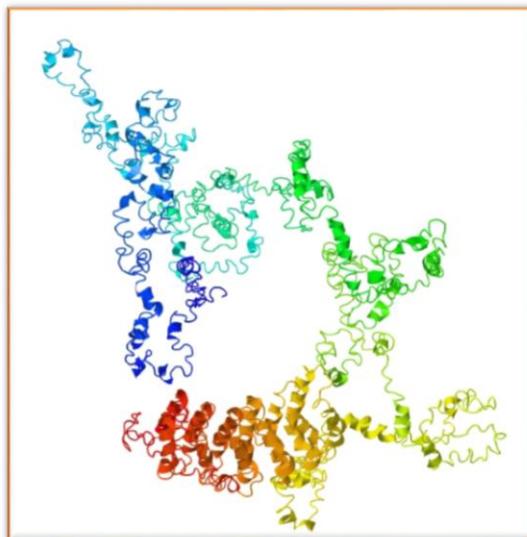


Imagen 31. Estructura 3D del Modelo 4.

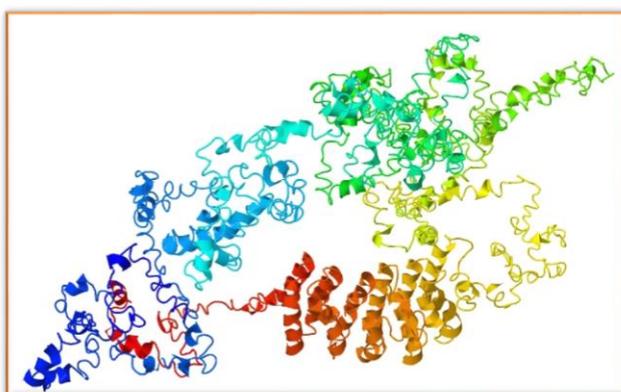


Imagen 32. Estructura 3D del Modelo 5.

Para el análisis de los modelos se seleccionan los dos mejores resultados de cada parte, en este caso seleccionaremos los modelos 1 y 2 de la parte 1 con c-score -1.66 y -2.53, respectivamente, y los modelos 1 y 2 de la parte 2 con c-score -0.63 y -1.56, respectivamente.

3.2. Obtención de ligandos que se unan a la predicción de la HTT

a. Búsqueda de cavidades

Con los PDBs y los modelos seleccionados para analizar obtenidos de I-TASSER, y los PDBs representativos de la HTT obtenidos de ZINC, se realiza la búsqueda de sus cavidades. Esta tarea la permite realizar el programa *fpocket* del RPBS.

Fpocket permite, a partir de los archivos en formato *.pdb*, identificar cavidades en las diferentes estructuras analizadas y representar los resultados mediante los residuos que forman dichas cavidades para su posterior *virtual screening*.

Se utiliza el PDB 5FVM como ejemplo de los pasos realizados (el PDB 5FVM se ha seleccionado como ejemplo, ya que ofrece diferentes resultados muy ilustrativos para representar los pasos seguidos en el trabajo. Este análisis se ha realizado con todas las plantillas seleccionadas que se muestran en el apartado b. del Anexo):

- i. Obtención del archivo *.pdb* en la web del Protein Data Bank y carga en *fpocket* (imagen 33).

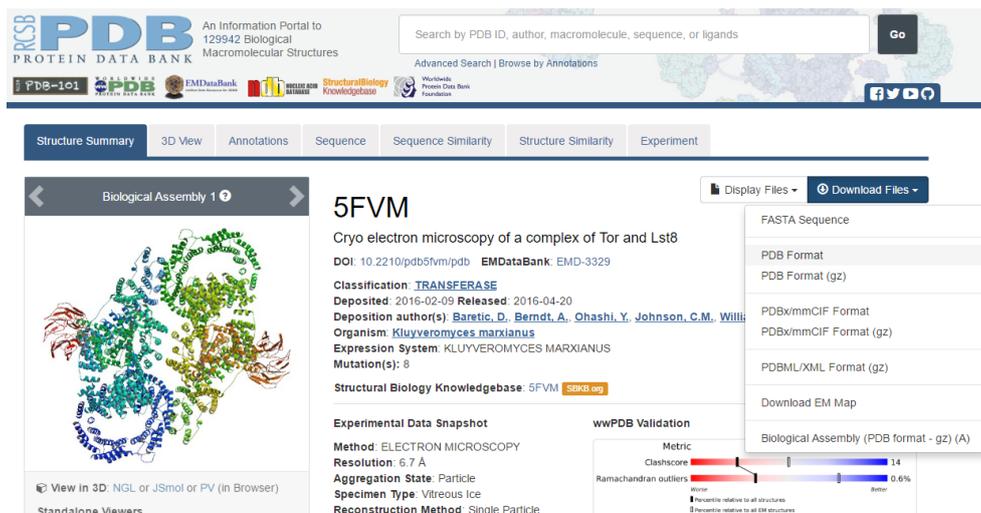


Imagen 33. Entrada del PDB para la estructura 5FVM.

- ii. Obtención de las cavidades y selección de las 3 primeras, mejores cavidades (imagen 34).

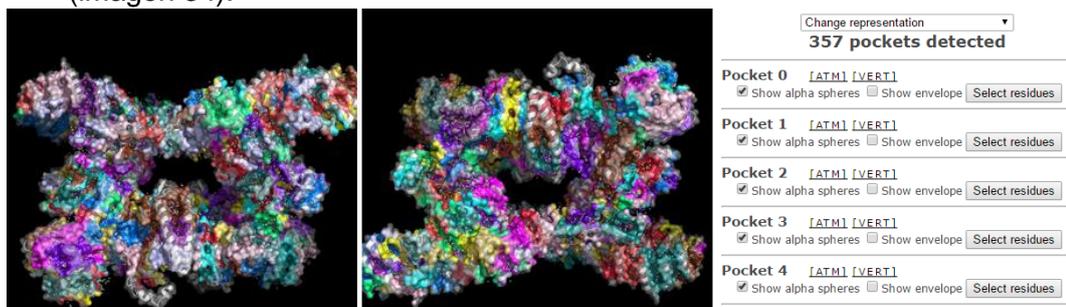


Imagen 34. Resultados parciales obtenidos del análisis del PDB 5FVM en *fpocket*. Las estructuras de la izquierda son la representación 3D de las dos mejores cavidades que se encuentran 5FVM.

- iii. Cambio del formato de los de residuos para la realización del *virtual screening*.

Residuos de la cavidad 1 del PDB 5FVM:

_A_PRO_1313_,_A_PRO_1313_,_A_LYS_1312_,_A_LEU_888_,_A_GLY_891_,_A_M
ET_889_,_A_MET_889_,_A_LEU_2222_,_A_LEU_2222_,_A_VAL_885_,_A_SER_22
26_,_A_ARG_2225_,_A_HIS_1309_,_A_ARG_2225_,_A_HIS_1309_,_A_LYS_1312_,
_A_SER_2227_,_A_SER_2224_,_A_SER_2227_,_A_GLU_1308_,_A_SER_2224_,_A
_SER_2227_,_A_TRP_2221_,_A_SER_2224_,_A_ARG_2225_,_A_GLU_1308_,_A_H
IS_1309_,_A_GLU_1308_,_A_PRO_1313_,_A_LYS_1312_,_A_LEU_888_,_A_MET_8
89_,_A_VAL_885_,_A_MET_889_,_A_LEU_2222_,_A_VAL_885_,_A_HIS_1309_,_A_
LEU_888_,_A_PRO_1313_,_A_GLU_1305_,_A_SER_2226_,_A_SER_2226_,_A_GL
U_1305_,_A_SER_2226_,_A_ARG_864_

b. *Virtual Screening* basado en estructura

Obtenidas las 3 cavidades y sus respectivos residuos en el formato mostrado anteriormente, se realiza el *virtual screening* mediante *MTiOpenScreen*.

- iv. Selección de la opción *Grid calculation>List of residues* para la realización del *screening* en una cavidad concreta, definida por sus residuos.
- v. Una vez realizado el *screening* se seleccionan los 15 primeros ligandos (tabla 6).

Ligando	Model ID	Energy	nRot	Library	isLeadLike	HBA	HBD	LogP	MW	TPSA
57263673_Intermediate	1	-10.0	7	iPPI-lib	Y	8	1	3.67	488.987	111.82
17450998_Accepted	1	-10.0	4	iPPI-lib	Y	7	1	4	395.413	88.55
134215354_Accepted	1	-10.0	3	iPPI-lib	Y	4	0	3.32	447.589	62.83
24340809_Intermediate	1	-9.9	3	iPPI-lib	Y	6	2	4.8	357.408	83.56
3711353_Intermediate	1	-9.9	4	iPPI-lib	Y	8	2	2.12	414.359	105.56
859284_Intermediate	1	-9.9	2	diverse-lib	N	9	1	1.72	359.338	97.19
49822553_Intermediate	1	-9.8	7	iPPI-lib	N	5	4	4.48	500.499	144.69
4260948_Intermediate	1	-9.8	4	diverse-lib	N	8	0	5.08	534.513	84.53
26617933_Accepted	1	-9.8	4	iPPI-lib	Y	5	1	2.35	420.439	93.01
22411472_Intermediate	1	-9.8	5	diverse-lib	N	5	1	5.39	453.409	66.84
26616550_Accepted	1	-9.8	3	diverse-lib	Y	7	1	1.95	420.504	82.44
17460498_Intermediate	1	-9.8	2	iPPI-lib	N	6	0	4.35	368.341	84.48
17512216_Intermediate	1	-9.8	10	diverse-lib	N	7	1	5.33	511.446	94.84
24315179_Intermediate	1	-9.7	5	diverse-lib	N	7	0	3.25	458.532	106.61
124756657_Intermediate	1	-9.7	5	diverse-lib	N	8	0	2.8	456.374	91.63

Tabla 6. Ligandos obtenidos como resultado del virtual screening del PDB 5FVM en la cavidad 1.

3.3. Analizar las propiedades físico-químicas de los ligandos obtenidos

Los ligandos seleccionados en los apartados anteriores, atendiendo a su estructura molecular, tienen unas propiedades físico-químicas determinadas. Un ejemplo de ello es, como se muestra a continuación, ligandos con propiedades mutagénicas. Esta mutagenicidad es detectada mediante la comparación molecular con patrones ya conocidos como mutagénicos. Se observa, como ejemplo, que el ligando **17450998_Accepted** seleccionado en la cavidad 1 del PDB 5FVM ha sido clasificado como mutagénico (Tabla 7):

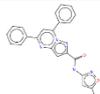
	Mut	Car	Tox	Sens
	●	●	●	●

Tabla 7. Análisis de propiedades fármaco-químicas del compuesto 17450998_Accepted.

Esta clasificación es debida a que en su estructura se encuentra un patrón que, en otros compuestos ha demostrado ser mutagénico. En la imagen 35 se observa, en la parte izquierda, la estructura del compuesto y, en la parte derecha, la estructura del patrón mutagénico que se detecta en ella.

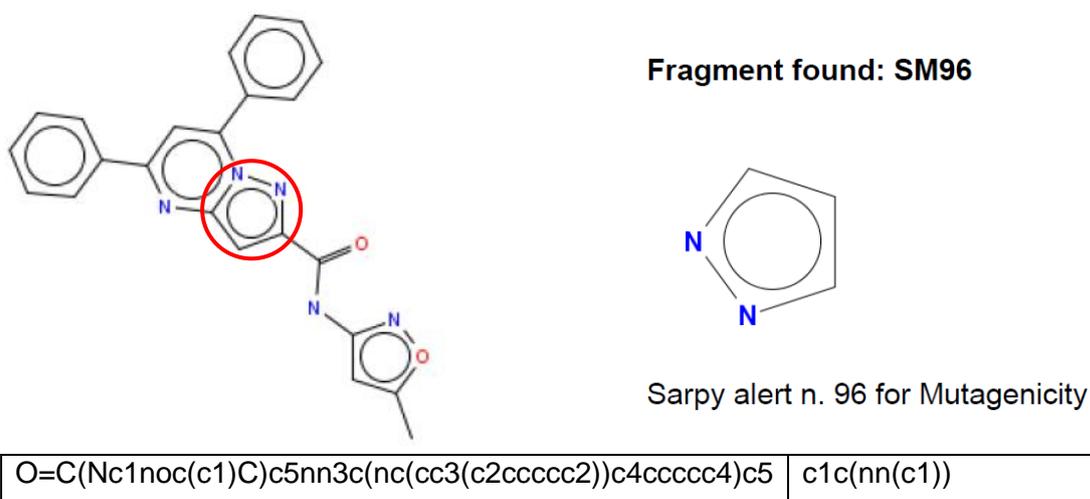


Imagen 35. Estructura del compuesto 17480998_Accepted, parte izquierda, junto a la estructura que lo clasifica como mutagénico, parte derecha.

En cambio, encontramos también el caso opuesto, es decir, compuestos que presentan estructuras clasificadas como no mutagénicas. Un ejemplo de ello es el ligando **134215354_Accepted** seleccionado en la cavidad 1 del PDB 5FVM (presentado en la Tabla 8).

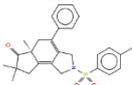
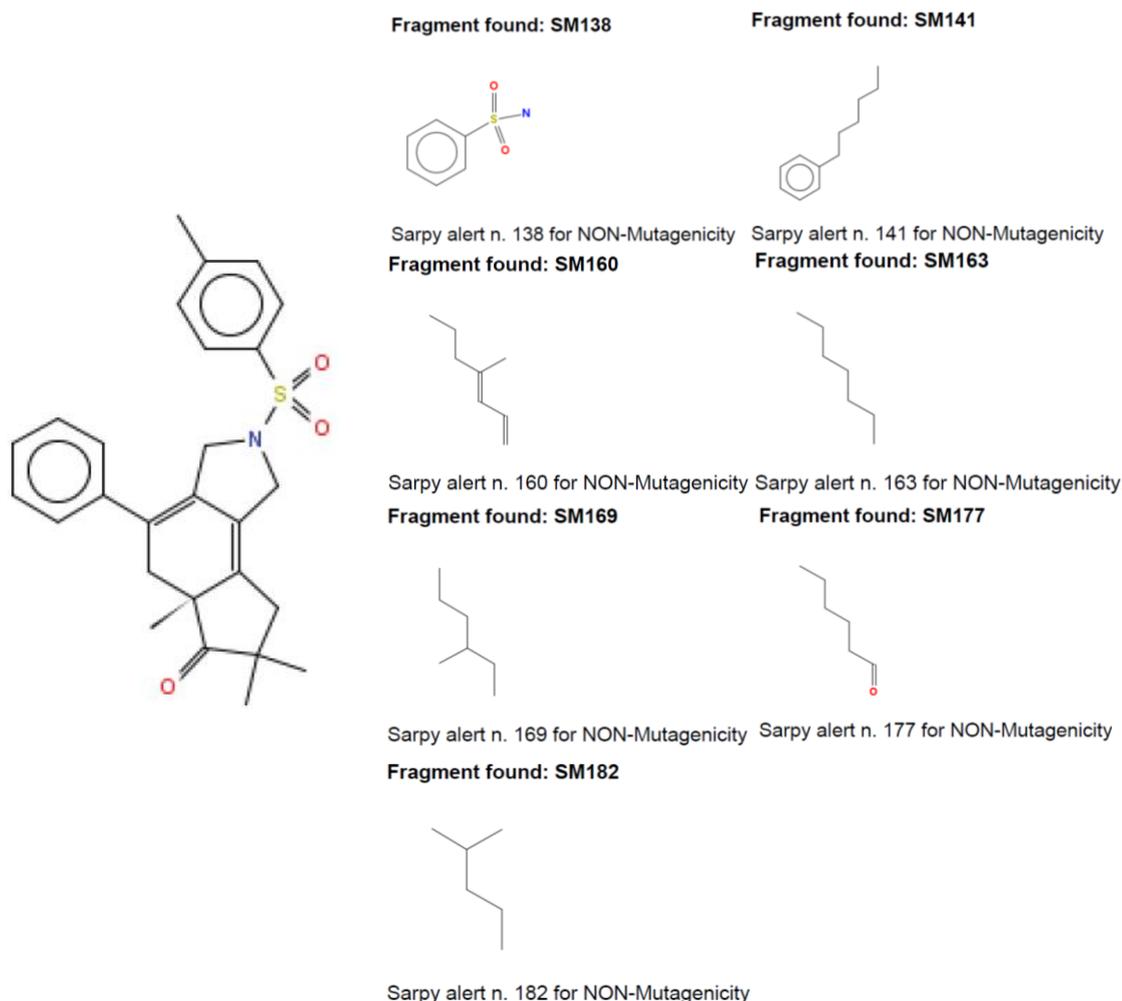
		Mut	Car	Tox	Sens
	134215354_Accepted				

Tabla 8. Análisis de propiedades físico-químicas del compuesto 134215354_Accepted.

Esta clasificación es debida a que en su estructura se encuentran siete patrones que, en otros compuestos han demostrado ser no mutagénicos. En la imagen 36 se muestra, en la parte izquierda, la estructura del ligando **134215354_Accepted** y en la parte derecha se muestran los patrones que clasifican este ligando como no mutagénico



134215354_Accepted	
<chem>O=C5C2(C(=C3C(=C(c1ccccc1)C2)CN(C3)S(=O)(=O)c4ccc(cc4)C)CC5(C)C)(C)</chem>	
SM138	<chem>S(=O)(=O)(c1ccccc1)N</chem>
SM141	<chem>c1(CCCCC)cccc1</chem>
SM160	<chem>C=CC=C(CCC)C</chem>
SM163	<chem>CCCCCCC</chem>
SM169	<chem>CC(CC)CCC</chem>
SM177	<chem>C(=O)CCCC</chem>
SM182	<chem>CCCC(C)C</chem>

Imagen 36. Estructura del compuesto 134215354_Accepted, parte izquierda, junto a las estructuras que lo clasifican como no mutagénico, parte derecha.

Como se presenta más adelante, esta clasificación puede extrapolarse al análisis de otras propiedades como puede ser la carcinogénesis.

A continuación, se analizan las propiedades físico-químicas de los ligandos seleccionados anteriormente en el *virtual screening*.

Para realizar dicho análisis se utiliza el programa VEGA QSAR. El programa nos permite seleccionar diferentes test, de los cuales, se han seleccionado los siguientes:

- ***Mutagenicity (Ames test) model (ScarPy/IRFMN) – v. 1.0.7.***
- ***Carcinogenicity model (ISS) – v. 1.0.2***
- ***Developmental/Reproductive Toxicity library (PG) – v. 1.0.0***
- ***Skin Sensitization model (CAESAR) – v- 2.1.6***

Se han generado diversas tablas con los resultados de los test de propiedades físico-químicas de las plantillas y modelos analizados. Éstas se encuentran en el apartado b. del Anexo. A continuación, se muestra la tabla 9 con los datos del ejemplo comentado hasta ahora del PDB 5FVM en la cavidad 1.

5FVM Cavity 1

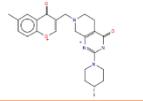
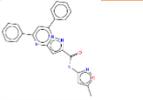
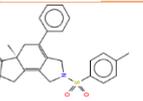
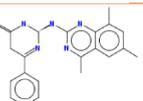
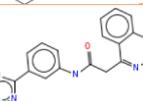
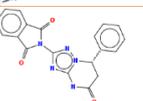
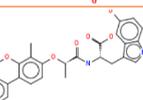
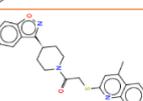
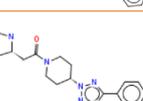
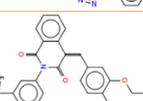
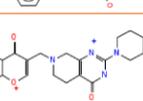
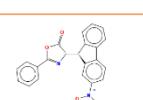
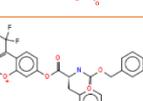
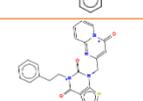
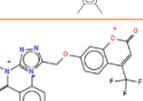
		Mut	Car	Tox	Sens
	26616550_Accepted	●	●	●	●
	17450998_Accepted	●	●	●	●
	134215354_Accepted	●	●	●	●
	24340809_Intermediate	●	●	●	●
	3711353_Intermediate	●	●	●	●
	859284_Intermediate	●	●	●	●
	49822553_Intermediate	●	●	●	●
	4260948_Intermediate	●	●	●	●
	26617933_Accepted	●	●	●	●
	22411472_Intermediate	●	●	●	●
	26616550_Accepted	●	●	●	●
	17460498_Intermediate	●	●	●	●
	17512216_Intermediate	●	●	●	●
	24315179_Intermediate	●	●	●	●
	124756657_Intermediate	●	●	●	●

Tabla 9. Análisis de las propiedades físico-químicas de los 15 ligandos seleccionados de la cavidad 1 del PDB 5FVM.

Tal y como se observa en la tabla 9, se analizan los ligandos mediante los 4 test:

- Mut. Test de mutagénesis.
- Car. Test de carcinogénesis.
- Tox. Test de toxicidad.
- Sens, Test de sensibilidad a la piel.

Y los resultados se han representado en colores:

- Círculo verde. Resultado negativo.
 - o No mutagénico, No-carcinógeno, No-tóxico o No-sensibilizador.
- Círculo rojo. Resultado positivo.
 - o Mutagénico, carcinógeno, tóxico o sensibilizador.
- Círculo amarillo. Resultado posiblemente negativo.
 - o Posiblemente no-mutagénico.

Por lo tanto, de la tabla 9 se observa que en la cavidad 1 del PDB 5FVM existen dos ligandos que no presentan positividad en ningún test:

- La molécula **134215354_Accepted** que presenta negatividad en los 4 test.
- La molécula **24340809_Intermediate** que presenta posibilidad de no mutagénesis y negatividad en los otros 3 test.

Este proceso de búsqueda y selección de las 3 cavidades, el *virtual screening*, la selección de los 15 primeros ligandos y el análisis de las propiedades fármaco-químicas, se ha realizado con las plantillas encontradas en PDBs que han sido seleccionados como representativos de la HTT, con los modelos de predicción por modelaje y con los PDB representativos de ZINC, analizando así un total de 720 ligandos.

En la tabla 10, mostrada a continuación, se muestran los 64 ligandos que han pasado los 4 test negativos (nombre en color verde) o posiblemente negativos (nombre en color amarillo) de los analizados.

PDB	Cavidad	Compuesto	SMILE
5IJO	1	24384739_Intermediate	<chem>O=C(C2C(=O)C1CC(F)CC(F)C1[NH+](C2)CC3CCC(F)CC3)C4CCC(OC)CC4</chem>
		49736207_Intermediate	<chem>O=C(Nc1ncc(cc1)C)CCc3nnc2ccc(nn23)N5CCN(c4cccc(OC)c4)CC5</chem>
	2	24285578_Intermediate	<chem>O=C(c2ccc(Oc1ccc(cc1)[NH+](O)O)C(F)(F)F)cc2)N4Cc3ccccc3CC4</chem>
		103060909_Accepted	<chem>O=C(NC)c1ccc(cc1)CN(C(=O)c2cccc(c2)S(=O)(=O)N4Cc3ccccc3CC4)C</chem>
	3	22402942_Intermediate	<chem>O=C(OCC(=O)NC(=O)NC(C)(C)C)c2nc(c1cccc1)n(n2)c3cccc(c3)C(F)(F)F</chem>
		26636173_Intermediate	<chem>O=C1[NH+]c4cc5OCCOc5(cc4(C=C1CN(C(=O)c2ccc(cc2)C(C)(C)C)C3CCCC3))</chem>
	14741630_Accepted	<chem>O=C1C2(CN(CC1(CN(C2)S(=O)(=O)c3ccc(cc3)C)CC)S(=O)(=O)c4ccc(cc4)C)CC</chem>	
5FVM	1	134215354_Accepted	<chem>O=C5C2(C(=C3C(=C(c1cccc1)C2)CN(C3)S(=O)(=O)c4ccc(cc4)C)CC5(C)C)(C)</chem>
		24340809_Intermediate	<chem>O=C2NC(N=C(c1cccc1)C2)Nc4nc3c(cc(cc3C)C)c(n4)C</chem>
	2	24395117_Intermediate	<chem>O=C4c1cccc1[n+]3c(n[nH]c3(c2cc(OC)ccc2(OC)))[NH+]4CCc5ccccc5</chem>
5H64	2	17506462_Intermediate	<chem>O[NH+](O)c2cc(ccc2(Oc1ccc(c(c1)C)C))c3nnc(o3)c4ccccc4</chem>
	3	124948715_Accepted	<chem>O=C(OC)c1cccc(c1)c4cc3c(OC(CNC(=O)c2cnccc2)C3)c(c4)Cl</chem>
2D3X	1	56321493_Intermediate	<chem>O=C(Oc1ccc(cc1)N(C)S(=O)(=O)c2ccc(c(c2)C)C)CN3C(=O)NC4(C3(=O))(CCCC4)</chem>
		24280435_Intermediate	<chem>O=C(NCC1CCCCC1(OC))C2C(=O)C3CC(CCC3([NH+]C2))S(=O)(=O)N(C)CC4CCCCC4</chem>
3IO6	1	24275095_Intermediate	<chem>O=C(Nc1cccc(c1)C(F)(F)F)c2ccc(cc2)C3=N[NH+](C(=O)c4ccccc34)C</chem>
		99494974_Intermediate	<chem>O=C(NCc1cccc(c1)C(F)(F)F)c4ccc3c(nc(C=2OC(CO)C(O)C(O)C=2)s3)c4</chem>
		26729711_Intermediate	<chem>O=C(Nc1ccc(OC(F)(F)F)cc1)NCc2nc(no2)c3ccc(cc3)C(F)(F)F</chem>
		93575679_Accepted	<chem>O=C(NCC[NH+](Cc1cccc1)C(C)C)c2ccc3c(c2)CN(CC3)S(=O)(=O)c4ccc(cc4)C</chem>
	2	24708148_Intermediate	<chem>O=C(NC(c1cccc1)C4(C)(CC4(C(C(=O)Nc2ccc3ccccc3(c2))C))c5noc(c5)C</chem>
		26644266_Intermediate	<chem>O=C1[NH+]C(=Nc3c1c2c(CC(CC2)C(C)(C)C)s3)CN5CCN(C(=O)c4ccc(OC)cc4)CC5</chem>
	3	24285578_Intermediate	<chem>O=C(c2ccc(Oc1ccc(cc1)[NH+](O)O)C(F)(F)F)cc2)N4Cc3ccccc3CC4</chem>
		24305643_Intermediate	<chem>O=C(N2CCN(c1cccc(c1)C)CC2)C4CCC(CNS(=O)(=O)c3ccc(cc3)C)CC4</chem>
	57581506_Intermediate	<chem>OS(O)(c1ccc(cc1)C)N5CCN(c3nc(nc2ccccc23)c4ccccc4)CC5</chem>	
3IOR	1	160654107_Accepted	<chem>O=S(=O)(c1ccc(cc1)C)N4CC5(Cc2ccccc2)(Cc3ccccc3CC45)</chem>
		24274677_Intermediate	<chem>O=C(Nc2c(c1c(CC(C)CC1)s2)CN)C4c5ccccc5(Oc3ccccc34)</chem>
		103073961_Intermediate	<chem>FC(F)(F)c1ccc(cc1)CC(c4nc(Nc2ncnc(c2)NCc3occc3)sc4)[NH3+]</chem>
		124949702_Intermediate	<chem>O=C(NCc1nc(oc1C)c2cccc(c2)NC(=O)c3ccoc3C)c4cccc(C#CC(O)(C)C)c4</chem>
	2	24313594_Intermediate	<chem>O=C2c1cccc1c4ccccc4(C(=O)N2c3ccccc3)C(F)(F)F</chem>
		134215354_Accepted	<chem>O=C5C2(C(=C3C(=C(c1cccc1)C2)CN(C3)S(=O)(=O)c4ccc(cc4)C)CC5(C)C)(C)</chem>
	3	24350099_Intermediate	<chem>O=C(Nc4ncnc3oc(c1cccc1)c(c2ccccc2)c34)C(C)(C)C</chem>
26541323_Intermediate		<chem>O=C(NC(=O)c2nc(c1cccc1)c(o2)C)Nc3ccccc3)C(F)(F)F</chem>	

			24389531_Intermediate	<chem>O=C(NC1CCCC(C1)C(F)(F)F)C3C(N)C(C(=O)C2CCCC2)[NH+]4CCCC34</chem>
3IOT		2	17459615_Intermediate	<chem>O=C(O)c1cccc(c1)NC(=O)C(=NC(=O)c2ccccc2)Cc3cccc(c3)[NH+](O)O</chem>
		3	56321393_Accepted	<chem>O=C(Nc1ncc(cc1)C)c2cccc(c2)S(=O)(=O)N4Cc3cccc3CC4</chem>
			50086151_Accepted	<chem>O=S(=O)(NCc1cccc1)c2ccc(cc2)c3noc(n3)C4CN(CCC4)S(=O)(=O)C</chem>
3IOU		2	124948193_Intermediate	<chem>O=C(NCc1nc(oc1C)c3cccc3(NC(=O)C2OCCC2))c4cc(F)c(F)cc4(F)</chem>
		3	26533929_Intermediate	<chem>O=C(NC2=Nc3c1c(nc(cc1)C)C)sc3(C(=O)S2))c4ccc(nc4C)C(F)(F)F</chem>
			24366176_Intermediate	<chem>O=S(=O)(Nc3cc1c(OC2CCC(C)CC12)c4cccc34)c5cccc(c5)[NH+](O)O</chem>
3IOV		1	849918_Intermediate	<chem>O=C(c3n[n+]1c(nc(cc1C(F)(F)F)c2ccccc2)[nH]3)N4CCOCC4</chem>
			24814817_Accepted	<chem>O=C(Nc1nc(cc(n1)C(F)(F)F)c2ccccc2)NC(=O)c3cccc3(OC)</chem>
		2	935175676_Accepted	<chem>O=C(NC2CC[NH+](Cc1cccc1)C2)c3ccc(cc3)CNS(=O)(=O)c4ccc(cc4)C</chem>
3LRH		1	57267229_Intermediate	<chem>O=C(NC1(C)(CCS(=O)(=O)C1))c2cc(ccc2(OC))S(=O)(=O)n4ccc3cccc34</chem>
			56316950_Accepted	<chem>O=C(OCC(=O)NC(=O)N)c1cccc(c1)S(=O)(=O)N2CC3(C)(CC2CC(C)(C)C3)</chem>
		2	144089203_Accepted	<chem>O=C4NCC(c1cccc(OC)c1)C3C(C)C2CCC(=O)NC(C(=CC23(OC))C)C(C=CC4)C</chem>
Parte	Modelo	Cavidad	Compuesto	SMILE
1	1	1	24351364_Intermediate	<chem>O=S(=O)(NCC)c1cc(ccc1C)c3nnc(Nc2cccc(c2)C(F)(F)F)c4cccc34</chem>
		2	161004162_Intermediate	<chem>O=C(Nc1nc(cs1)c2ccccc2)c3cn(c4ccccc34)S(O)(O)c5ccc(cc5)C</chem>
		3	26533773_Intermediate	<chem>O=C(Nc1cccc1)N4CCc2c(ccs2)C4(c3ccc(cc3)C(F)(F)F)</chem>
	2	1	3712316_Intermediate	<chem>O=C(OCC(=O)NC(=O)C1Oc2ccccc2(OC1))c4ccc(OCc3c(noc3C)C)cc4</chem>
		2	24407388_Intermediate	<chem>O=C(OCC)c1ccc3c(c1)N(C(=O)c2ccccc2S3)Cc4cccc(c4)[NH+](O)O</chem>
		3	57269213_Intermediate	<chem>O=C(N)c1ccc(cc1)c2nnn(n2)CC(=O)Nc3ccc(OCC)c(c3)S(=O)(=O)N4CCCC4</chem>
			26616319_Intermediate	<chem>O=C1NC(=[NH+]c3c1c2c(CCCC2)s3)C5CN(C(=O)c4cc(F)cc(F)c4)CCC5</chem>
		14745330_Intermediate	<chem>O=C(NC(c1nnc2n1CCCC2)Cc4c[nH]c3cccc34)c5cccc5</chem>	
2	1	1	103060909_Accepted	<chem>O=C(NC)c1ccc(cc1)CN(C(=O)c2cccc(c2)S(=O)(=O)N4Cc3cccc3CC4)C</chem>
		3	3716316_Intermediate	<chem>O=C1NC5(C(=O)N1Cc4[nH]nc2[n+]4(c3cccc3(C(=O)[NH+]2CCC(C)C)))(CCC(C)CC5)</chem>
	2	1	85146724_Accepted	<chem>O=C(OC(C1=Cc2ccccc2(C(=O)[OH+](1)))(C)C)c3ccc(cc3)C(F)(F)F</chem>
			124755824_Accepted	<chem>O=C4c1cccc1C(c2nnnn2Cc3cccc3)N4Cc5ccc(OC)cc5</chem>
			87349039_Intermediate	<chem>O=C(N2CCN(c1cc(ccc1)C)CC2)CCc3cccc(c3)c4ccc(OC)cc4</chem>
		2	161004162_Intermediate	<chem>O=C(Nc1nc(cs1)c2ccccc2)c3cn(c4ccccc34)S(O)(O)c5ccc(cc5)C</chem>
			56320148_Intermediate	<chem>O=C(NCC(=O)Nc1cccc1CC)c2cccc(c2)S(=O)(=O)N4CCN(Cc3cccc3)CC4</chem>
		126496946_Intermediate	<chem>O=C(Nc2c(C(=O)NC)c1c(CCCC1)s2)c3nc(ncc3Cl)SCc4cccc4</chem>	
		14726530_Accepted	<chem>FC(F)(F)c1cccc(c1)C4(O)(CCN(Cc2nnnn2CCc3cccc3)CC4)</chem>	

		3	24364317_Intermediate	<chem>O=C3[NH+]N=C(c1ccc(c(c1)S(=O)(=O)Nc2ccccc2)C)c4ccccc34</chem>
			24413249_Intermediate	<chem>O=C(Nc1cccc(OC)c1)C2CCN(CC2)S(=O)(=O)c3cc(ccc3C)c4noc(n4)C</chem>

Tabla 10. Ligandos seleccionados por superar los test de las propiedades físico-químicas con resultado negativo en todos ellos, nombre en verde, o con posibilidad de no-mutagénesis y los demás test negativos, nombre en amarillo. Además, en la columna derecha, se muestra la estructura en formato SMILE.

3.4. Analizar las propiedades farmacocinéticas de los ligandos seleccionados

Los compuestos seleccionados anteriormente por presentar negatividad en los test de mutagénesis, carcinogénesis, toxicidad y sensibilidad a la piel, tienen diferentes comportamientos una vez son utilizados como posible fármaco dentro del organismo. Para un primer análisis de su comportamiento como fármaco se realizan una serie de test, también a partir de su estructura. Estos test se realizan a través del programa *Web pkCSM (pharmacokinetic properties)* de la *University of Cambridge*.

Se utilizan los test de forma eliminatoria, empezando por su toxicidad hepática, seguido su clasificación como inhibidor de la hERGII y, por último, la dosis máxima tolerada en humanos (observamos si es positiva o negativa).

Los resultados se muestran en la tabla 10, siguiendo un código de colores. Si el predictor es positivo se marca en color rojo y queda eliminado para el siguiente test. Si el resultado es negativo se marca en color verde y se procede a realizar el siguiente test.

PDB	Cavidad	Compuesto	HEPATOX	hERG II	MTRD
5IJO	1	24384739_Intermediate	NO	SI	
		49736207_Intermediate	SI		
	2	24285578_Intermediate	SI		
		103060909_Accepted	SI		
	3	22402942_Intermediate	SI		
		26636173_Intermediate	NO	SI	
5FVM	1	134215354_Accepted	NO	NO	0.354
		24340809_Intermediate	SI		
	2	24395117_Intermediate	NO	SI	
5H64	2	17506462_Intermediate	SI		
	3	124948715_Accepted	SI		
2D3X	1	56321493_Intermediate	SI		
		24280435_Intermediate	NO	SI	
3IO6	1	24275095_Intermediate	SI		
		99494974_Intermediate	SI		
		26729711_Intermediate	SI		
		93575679_Accepted	SI		
	2	24708148_Intermediate	SI		
		26644266_Intermediate	SI		
		24285578_Intermediate	SI		
	3	24305643_Intermediate	NO	SI	
57581506_Intermediate		SI			
3IOR	1	160654107_Accepted	NO	SI	
		24274677_Intermediate	SI		
		103073961_Intermediate	SI		
		124949702_Intermediate	NO	SI	
	2	24313594_Intermediate	SI		
	3	134215354_Accepted	NO	NO	0.354
		24350099_Intermediate	SI		
		26541323_Intermediate	SI		

			24389531_Intermediate	NO	SI		
3IOT	2		17459615_Intermediate	SI			
		3		56321393_Accepted	SI		
				50086151_Accepted	SI		
3IOU	2		124948193_Intermediate	SI			
			26533929_Intermediate	SI			
	3		24366176_Intermediate	SI			
			26728287_Accepted	SI			
3IOV	1		849918_Intermediate	SI			
			24814817_Accepted	SI			
	2		935175676_Accepted	SI			
3LRH	1		57267229_Intermediate	SI			
			56316950_Accepted	SI			
	2		144089203_Accepted	SI			
Parte	Modelo	Cavidad	Compuesto	HEPATOX	hERG II	MTRD	
1	1	1	24351364_Intermediate	SI			
		2	161004162_Intermediate	SI			
		3	26533773_Intermediate	SI			
	2	1	3712316_Intermediate	SI			
		2	24407388_Intermediate	SI			
		3		57269213_Intermediate	SI		
				26616319_Intermediate	SI		
				14745330_Intermediate	SI		
		2	1	1	103060909_Accepted	SI	
3	3716316_Intermediate			NO	SI		
2	1			85146724_Accepted	SI		
				124755824_Accepted	SI		
				87349039_Intermediate	SI		
2	2			161004162_Intermediate	SI		
				56320148_Intermediate	SI		
				126496946_Intermediate	NO	SI	
				14726530_Accepted	SI		

		3	24364317_Intermediate	SI		
			24413249_Intermediate	SI		

Tabla 11. Análisis de las propiedades farmacocinéticas de los ligandos seleccionados por superar los test de las propiedades fármaco-químicas. El color rojo representa positividad en el test y el verde, negatividad.

Observamos que 52 de los 64 ligandos, es decir, el 81.25% de ellos, son eliminados en el primer test. Como se ha comentado este detecta si el ligando provoca una disfunción en el hígado.

De los 12 que no presentan toxicidad hepática, según el test utilizado, sólo 2 de ellos son no inhibidores de la hERG II y, si nos fijamos, resulta ser el mismo ligando unido a dos estructuras PDBs diferentes.

PDB	Cavidad	Compuesto	HEPATOX	hERG II	MTRD
5FVM	1	134215354_Accepted	NO	NO	0.354
3IOR	3	134215354_Accepted	NO	NO	0.354

Tabla 12. Ligandos que han superado los 3 test farmacocinéticos.

El tercer predictor muestra la Máxima Dosis Tolerada Recomendada (MTRD) la cual observamos que es positiva.

Por lo tanto, obtenemos el ligando **134215354_Accepted** como compuesto que ha superado los test. A continuación, se realizan la totalidad de los test que nos ofrece el programa *pkCSM* con la finalidad de obtener más información farmacocinética que nos permita seleccionar a este compuesto como un posible fármaco para la enfermedad de Huntington.

Test	Resultado	Unidades
<i>Water Solubility</i>	-5.88	log mol/L
<i>Caco-2 Permeability</i>	1.411	log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s
<i>Intestinal Absorption (Human)</i>	97.276	% Absorbed
<i>Skin Permeability</i>	-2.644	log Kp
<i>P-glycoprotein substrate</i>	No	Categorical (Yes/No)
<i>P-glycoprotein I inhibitor</i>	Yes	Categorical (Yes/No)
<i>P-glycoprotein II inhibitor</i>	No	Categorical (Yes/No)
<i>VDss (Human)</i>	0.215	log L/Kg
<i>Fraction unbound (Human)</i>	0	Fu
<i>BBB Permeability</i>	0.016	log BB
<i>CNS Permeability</i>	-1.595	log PS
<i>CYP2D6 substrate</i>	No	Categorical (Yes/No)
<i>CYP3A4 substrate</i>	Yes	Categorical (Yes/No)
<i>CYP1A2 inhibitor</i>	No	Categorical (Yes/No)
<i>CYP2C19 inhibitor</i>	Yes	Categorical (Yes/No)
<i>CYP2C9 inhibitor</i>	Yes	Categorical (Yes/No)
<i>CYP2D6 inhibitor</i>	No	Categorical (Yes/No)
<i>CYP3A4 inhibitor</i>	Yes	Categorical (Yes/No)
<i>Total Clearance</i>	0.234	log ml/min/Kg
<i>Renal OCT2 substrate</i>	No	Categorical (Yes/No)
<i>AMES Toxicity</i>	No	Categorical (Yes/No)
<i>Max. Tolerated Dose (Human)</i>	0.354	log mg/Kg_bw/day
<i>hERG I inhibitor</i>	No	Categorical (Yes/No)
<i>hERG II inhibitor</i>	No	Categorical (Yes/No)
<i>Oral Rat Acute Toxicity (LD50)</i>	2.927	mol/Kg

<i>Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL)</i>	1.391	log mg/Kg_bw/day
<i>Hepatotoxicity</i>	No	Categorical (Yes/No)
<i>Skin Senitisation</i>	No	Categorical (Yes/No)
<i>T. pyriformis Toxicity</i>	0.435	log ug/L
<i>Minnow Toxicity</i>	-1.184	log mM

Tabla 13. Análisis de las propiedades fármaco-químicas del compuesto 134215354_Accepted.

El compuesto **134215354_Accepted** presenta la estructura mostrada en la imagen 37.

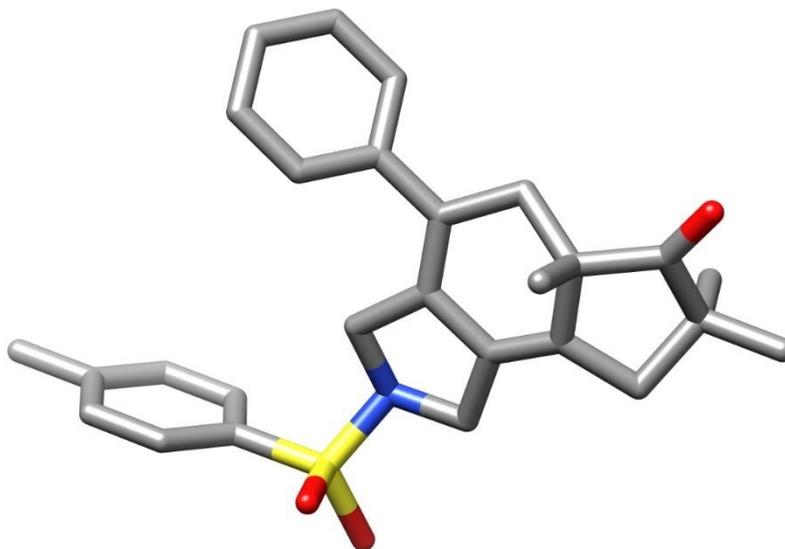


Imagen 37. Representación 3D del compuesto 134215354_Accepted.

También es posible obtener el compuesto unido a la cavidad 1 del PDB 5FVM, mostrado en la imagen 38.

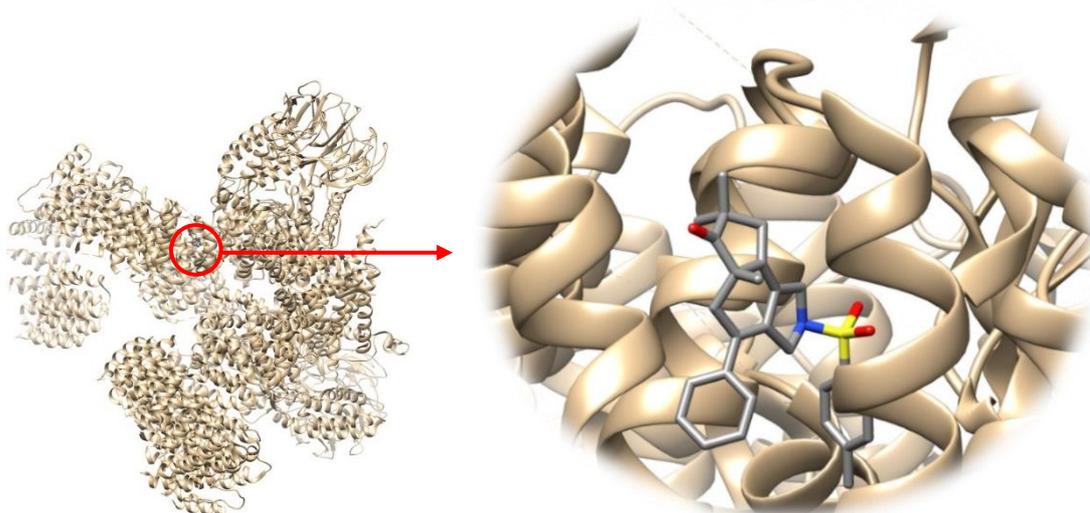


Imagen 38. Representación 3D del compuesto 134215354_Accepted unido a la cavidad 1 del PDB 5FVM.

4. Discusión

Mediante la secuencia de aminoácidos de la Huntingtina, se ha realizado la predicción de su estructura, ya que esta no se encuentra descrita. Mediante predicción por homología se han seleccionado plantillas descritas en PDB con *TM-score* superior a 0.8 para obtener la mayor homología posible y descartar aquellos *hits* que resultan poco similares. Estas estructuras PDB no son la HTT, pero representan una plantilla de alguna región de la misma. Además, el programa de predicción *I-TASSER* genera modelos propios de predicción. Seleccionamos los dos mejores resultados, como en el caso de la homología, para descartar aquellos modelos menos fiables. Por último, y con el fin de evaluar mejor la proteína, se han seleccionado diversos PDBs representativos de la Huntingtina del repositorio ZINC.

El primer paso del estudio ha sido la búsqueda de las cavidades (sitios de unión a posibles ligandos) de todas las estructuras seleccionadas, permitiendo así potenciar aquellas con una mayor puntuación. Se seleccionaron los tres mejores resultados en cada caso.

El segundo paso ha sido realizar la búsqueda virtual (o *virtual screening*) de ligandos con capacidad de unión a las diferentes cavidades seleccionadas previamente de cada estructura. Se seleccionaron los 15 mejores resultados con el fin de maximizar la calidad de los resultados. A continuación, se realizó un *docking* para comprobar la unión de un ligando a su cavidad correspondiente.

El tercer paso se ha centrado en el análisis de las propiedades físico-químicas de los ligandos seleccionados, permitiendo así realizar un primer cribado a los 720 posibles fármacos. Mediante cuatro test (mutagénesis, carcinogénesis, toxicidad y sensibilidad de la piel) se han seleccionado 64 ligandos. Todos ellos han resultado negativos en los test (algunos con resultado posiblemente negativo en mutagénesis) y quedan seleccionados para el siguiente paso: el análisis del efecto del organismo sobre el fármaco, es decir, la farmacocinética.

El cuarto y último paso fue la farmacocinética. Mediante diversos test se analizaron la absorción, la distribución, el metabolismo y la toxicidad del ligando. Se utilizó, como primer factor, el efecto del ligando sobre el hígado, es decir, si este produce o no un funcionamiento anormal en el órgano (toxicidad). Observamos que, de los 64 ligandos que pasaron los test físico-químicos, hay 12 (el 18,75 %) de ellos que no presentan toxicidad al hígado. El segundo factor a analizar fue la capacidad de los ligandos a inhibir la encima hERG II (ningún ligando era inhibidor de la hERG I por lo que no se tuvo en cuenta para la selección). Este es un punto importante, ya que la encima hERG es un

transportador de potasio, la inhibición del cual se ha visto relacionada con la aparición de arritmias ventriculares por el síndrome del QT largo (Sanguinetti, Tristani-Firouz, 2006). Este hecho ha provocado la retirada de numerosos productos farmacológicos del mercado y el descarte de fármacos en estado de fases preclínicas. En este punto nos encontramos que dos ligandos de los 12 de los que se ha analizado la inhibición a la hERG II presentan negatividad. Como último factor se observaron sus dosis máximas toleradas en humanos para descartar resultados negativos. Los dos ligandos presentaron una dosis positiva, más concretamente de 0.354.

Llegados a este punto y como los ligando presentaban la misma dosis máxima tolerada en humanos, se observó que se trataba del mismo compuesto. Éste se encontraba unido a dos estructuras PDB distintas.

El compuesto seleccionado fue el **134215354_Accepted** que lo encontramos unido a la cavidad 1 del PDB 5FVM y a la cavidad 3 del PDB 3IOR.

En resumen, de los 720 ligando iniciales:

- 64 resultaron negativos en los test de propiedades fármaco-químicas, es decir, el 8,89%.
- 12 de los anteriores fueron seleccionados por su negatividad en la toxicidad hepática, es decir, el 18,75% de éstos y el 1,67% del total.
- 2 de los seleccionados anteriormente resultaron no inhibir la hERG II, es decir, el 16,6% de éstos y el 0,27% del total (aunque se observó que eran el mismo compuesto).

Como resultado se obtuvo un ligando capaz de superar los test impuestos. En este momento se decidió analizar todas sus propiedades farmacocinéticas en busca de la obtención de un posible fármaco potencial para la enfermedad de Huntington.

Tal y como se presenta en la tabla 13 del apartado de resultados, se analiza la absorción, la distribución, el metabolismo y la toxicidad del ligando **134215354_Accepted** dentro del organismo.

En cuanto a la absorción: este compuesto no es soluble en agua (-5.88 log mol/L a 25°C), es permeable a las células Caco-2 utilizadas como modelo *in vitro* de la mucosa intestinal humana (1.411 log Papp en 10⁻⁶cm/s), presenta una elevada absorción intestinal (97.276%), no es sustrato de la *P-glycoprotein* por lo que este transportador no expulsaría el compuesto fuera de la célula, no es inhibidor de la *P-glycoprotein II* pero si inhibidor de la *P-glycoprotein I* y es impermeable a la piel (-2.644 log Kp).

En cuanto a la distribución: tiene un volumen de distribución estacionario (VD_{ss}) que se encuentra entre los valores mínimo y máximo (0.215 log L/Kg), la fracción libre o unión a proteínas plasmáticas es nula (0 Fu), es decir, no existe unión a estas, es permeable a la barrera hemato-encefálica (0.016 log BB) y es capaz de penetrar al sistema nervioso central (-1.595 log PS).

En cuanto al metabolismo este ligando presenta las siguientes características frente a las isoformas del citocromo P450: es sustrato de la CYP2D6, pero no de la CYP3A4, es inhibidor de la CYP2C19, de la CYP2C9 y de la CYP3A4, pero no de la CYP1A2 y de la CYP2D6. Por lo tanto, no es metabolizado por la CYP2D6 ya que no es sustrato de ella, pero sí lo es de la CYP3A4, provocando la inhibición de la encima. No es un buen resultado, ya que, se está inhibiendo una encima relacionada con el metabolismo de productos xenobióticos, al igual que la inhibición de CYP2C19 y CYP2C9.

En cuanto a la excreción: no es sustrato de la OCT2 renal, eliminador de fármacos y compuestos endógenos de los riñones, y presenta un valor de eliminación o depuración de 0.234 log ml/min/Kg (mililitros de plasma que se depura de una sustancia determinada por minuto en relación a los Kg).

En cuanto a la toxicidad: no presenta mutagénesis en el test Ames utilizado en bacterias, tiene una dosis tolerada máxima baja (0.354 log mg/Kg_{bw/day}), no inhibe las enzimas hERG I/II, tiene un valor de dosis letal 50 en ratas (LD₅₀) de 2.927 mol/Kg, presenta una dosis mínima de efecto adverso de 1.391 log mg/Kg_{bw/day}, no es hepatotóxico, no presenta sensibilidad a la piel (coincide con el test realizado en el apartado de propiedades físico-químicas), es tóxico para *T.pyriformis* (0.435 log ug/L) y, también, presenta una elevada toxicidad en la especie *Fathead Minnows* (-1.184 log mM).

En resumen, el compuesto **134215354_Accepted** tiene aspectos muy buenos, como puede ser la no inhibición de las enzimas hERG I/II o una elevada absorción intestinal, pero presenta propiedades adversas importantes como pueden ser la inhibición a las isoformas CYP3A4, CYP2C19 y CYP2C9 del citocromo P450 provocando la inactivación de enzimas relacionadas con la desintoxicación del organismo. Por tanto, el ligando obtenido mediante el *virtual screening* para la Huntingtina no sería un buen candidato a fármaco contra ésta.

Teniendo en cuenta el resultado final, que de 720 analizados solo un compuesto sea seleccionado y, finalmente descartado, hace reflexionar en la dificultad de encontrar firmes candidatos para una estructura proteica concreta. La parte positiva de ello es que las nuevas tecnologías hacen más accesible la obtención de herramientas de análisis

de estructuras, permitiendo así un primer barrido de compuestos y “facilitando” la realización de las mismas tareas que hace unos años.

Como complemento, una vez terminado el trabajo, se podrían aprovechar los resultados obtenidos por el programa *VEGA QSAR* para aumentar el número de compuestos que obtienen negatividad en la físico-química. Además del análisis de las propiedades físico-químicas, el programa devuelve compuestos similares a los analizados, los cuales pueden ser negativos para los test que nuestro compuesto fue positivo. Podríamos obtener una mayor batería de compuestos y, realizando el *docking* con el PDB o modelo al que se une el compuesto inicial, se comprobaría su unión.

5. Conclusiones

- A partir de la secuencia genómica y aminoacídica de la Huntingtina, se han obtenido 12 plantillas estructurales almacenadas en el PDB y 4 modelos a analizar, ya que su estructura no se encuentra descrita.
- Del *virtual screening* se han obtenido 720 ligandos, de los cuales, 64 de ellos han resultado negativos en los test de propiedades físico-químicas.
- De los ligandos seleccionados en las propiedades físico-químicas, 12 han resultado negativos en toxicidad hepática y, uno de ellos, en inhibición a la hERG II.
- Finalmente, este compuesto presenta aspectos muy buenos, como puede ser la no inhibición de las enzimas hERG I/II o una elevada absorción intestinal, pero presenta propiedades adversas importantes como pueden ser la inhibición a las isoformas CYP3A4, CYP2C19 y CYP2C9 del citocromo P450 provocando la inactivación de enzimas relacionadas con la desintoxicación del organismo. Por tanto, el ligando obtenido mediante el *virtual screening* para la Huntingtina no sería un buen candidato a fármaco contra ésta.
- Aunque no se ha obtenido un fármaco ideal para la enfermedad, este método realizado a gran escala por una empresa farmacéutica o grupo de investigación puede llevar al descubrimiento de alguno de ellos.

6. Glosario

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BBB	Barrera hemato-encefálica
CAG	Citosina-Adenina-Guanina
c-score	<i>confidence score</i>
Car	Test de carcinogénesis
Caco-2	<i>Colorectal adenocarcinoma cells</i>
CNS	Sistema Nervioso Central
CYP	Citocromo P450
EH	Enfermedad de Huntington
HEPATOX	<i>Hepatotoxicity</i>
hERG I	<i>human Ether-à-go-go-Related Gene I</i>
hERG II	<i>human Ether-à-go-go-Related Gene II</i>
HTT	Huntingtina
I-TASSER	<i>Iterative Threading ASSEmby Refinement</i>
LC50	Concentración letal del 50%
LD50	Dosis letal del 50%
LOAEL	<i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>
LOMETS	<i>Local Meta-Threading-Server</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTRD	<i>Maximum Recommended Tolerated Dose</i>
Mut	Test de mutagénesis
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
OCT2	Transportador catiónico orgánico 2
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pkCSM	<i>Small-molecule pharmacokinetics prediction</i>
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
RPBS	<i>Ressource Parisienne en Bioinformatique Structurale</i>
Sens	Test de sensibilidad a la piel
TMs	<i>Template Modeling score</i>
Tox	Test de toxicidad
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
UCSF	<i>University of California, San Francisco</i>
VDss	Volumen de distribución en estado estacionario
VEGA	<i>Virtual Evaluation of chemical properties and Toxicity</i>
ZINC	<i>ZINC Is Not Commercial</i>

7. Bibliografía

Webs:

Asociación Corea de Huntington Española: <http://www.e-huntington.es/%C2%BFque-es-la-enfermedad-de-huntington/>, Mayo 2017

Chimera: <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>, Mayo 2017

Fpocket: <http://mobyli.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=fpocket#forms::fpocket>, Abril 2017

Genetics Home Reference: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/huntington-disease#genes>, Mayo 2017

I-TASSER: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>, Marzo 2017

Jmol: <http://jmol.sourceforge.net/>, Mayo 2017

JPND: <http://www.neurodegenerationresearch.eu/>, Mayo 2017

MTiOpenScreen: <http://mobyli.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::MTiOpenScreen>, Abril 2017

OpenBabel: http://openbabel.org/wiki/Main_Page, Abril 2017

pkCSM pharmacokinetics: <http://bleoberis.bioc.cam.ac.uk/pkcsml/>, Mayo 2017

Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, Marzo 2017

Ressource Parisienne en Bioinformatique Structurale: <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/index.html>, Abril 2017

ToxTree: <http://toxtree.sourceforge.net>, Abril 2017

UCSC Genome Browser: <https://genome.ucsc.edu/>, Marzo 2017

VEGA QSAR: <https://www.vegahub.eu/>, Abril 2017

ZINC: <http://zinc.docking.org/>, Abril 2017

Artículos de revista:

Benigni, R., Bossa, C., Jeliaskova, N., Netzeva, T. and Worth, A. “*The Benigni / Bossa rulebase for mutagenicity and carcinogenicity - a module of Toxtree*” European Commission report EUR 23241 EN

Benigni, R., Bossa, C., Netzeva, T., Rodomonte, A. and Tsakovska, I. “*Mechanistic QSAR of aromatic amines: new models for discriminating between mutagens and nonmutagens, and validation of models for carcinogens*” *Environ mol mutag*, (2007), 48:754-771

Benigni, R., Bossa, C., Tcheremenskaia, O. “*Nongenotoxic carcinogenicity of chemicals: mechanisms of action and early recognition through a new set of structural alerts*” *Chemical Reviews*, 2013, 113(5), 2940-57

Chaudhry, Q., Piclin, N., Cotterill, J., Pintore, M., Price, N. R., Chrétien, J. R. and Roncaglioni, A. (2010). *Global QSAR models of skin sensitizers for regulatory purposes.*, *Chem Cent J* 4 Suppl 1, S5.

Ferrari, T., Cattaneo, D., Gini, G., Golbamaki, N., Bakhtyari, Manganaro, A., Benfenati, E., *Automatic knowledge extraction from chemical structures: the case of mutagenicity prediction*, SAR and QSAR in Environmental Research (2013), vol. 24 issue 5, 365-83.

Heemels, MT. (2016). *Neurodegenerative diseases*. *Nature* 539, 179.

Sanguinetti, M.C., Tristani-Firouzi, M (2006). *Review article hERG potassium channels and cardiac arrhythmia*. *Nature* 440, 463-469.

Wu, S., Fisher, J., Naciff, J.M., Michael C, Laufersweiler, Lester, C., Daston, G. and Blackburn, K. “*A Framework for Identifying Chemicals with Structural Features Associated with Potential to Act as Developmental or Reproductive Toxicants*” *Chem. Res. Toxicol.*, 2013, 26 (12), pp 1840–1861.

8. Anexo

a. Secuencia de aminoácidos de la HTT

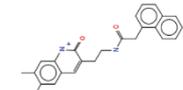
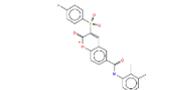
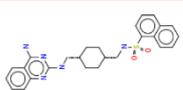
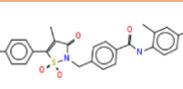
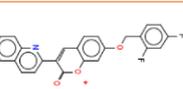
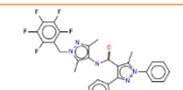
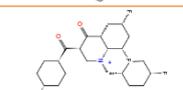
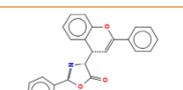
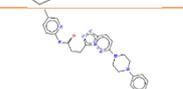
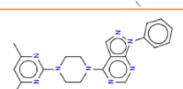
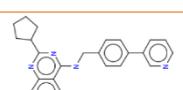
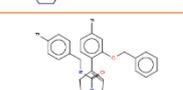
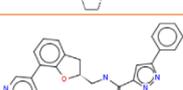
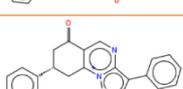
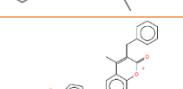
>NP_002102.4 length=3144

MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPPPQLP
QPPPPQAQPLLQPQPPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKDRVNHCLTICENI
VAQSVRNSPEFQKLLGIAMELFLLCSDDAESDVRMVADECLNKVIKALMDSNLPRLQL
ELYKEIKKNGAPRSLRAALWRFAELAHLVLPQKCRPYLVNLLPCLTRTSKRPEESVQE
TLAAAVPKIMASFGNFANDNEIKVLLKAFIANLKSSSPTIRRTAAGSAVSICQHSRRTQY
FYSWLLNVLLGLLVPVEDEHSTLLILGVLLTLRYLVPLLQQQVKDTSLKGSFGVTRKEM
EVSPSAEQLVQVYELTLHHTQHGDHNVVTGALELLQQLFRTPPELLQTLTAVGGIGQ
LTAAKEESGGRSRSRGSIVELIAGGGSSCSPVLSRKQKGVLLGEEEALEDDSESRSRV
SSSALTASVKDEISGELAASSGVSTPGSAGHDIITEQPRSQHTLQADSVDLASCDLTSS
ATDGDEEDILSHSSSQVSAVPSDPAMDNDGTQASSPISDSSQTTTEGPDSA VTPSD
SSEIVLDGTDNQYLGLQIGQPQDEDEEATGILPDEASEAFRNSSMALQQAHLKNMESH
CRQPSDSSVDKFLRDEATEPGDQENKPCRIGDIGQSTDDDSAPLVHCVRLLSASF
LLTGKKNVLPDRDVRVSVKALALSCVGAVALHPESFFSKLYKVPDTEEYPEEQYV
SDILNYIDHGDQPVRGATAILCGTLICILSRSRFHVGDWMTIRTTLTGNTFSLADCIPL
LRKTLKDESSVTCKLACTAVRNCVMSLCSSSYSELGLQLIIDVLTNRNSSYWLVRTELL
ETLAEIDFRLVSFLEAKAENLHRGAHHTYGLLKLQERVLNNVVIHLLGDEDPVRHVAA
ASLIRLVPKLFYKCDQGGQADPVVAVARDQSSVYLKLLMHETQPPSHFSVSTITRIYRGY
NLLPSITDVTMENNLSRVIAAVSHELITSTRALTFCCEALCCLSTAFPVCIWVSLGWHC
GVPPLSASDESRSKCTVGMATMILTLLSSAWFPLDLSAHQDALILAGNLLAASAPKSLR
SSWASEEEANPAATKQEEVWPALGDRALVPMVEQLFSHLLKVINICAHVLDVAPGP
AIKAALPSLTNPPSLSPIRRKKGKEKEPGEQASVPLSPKKGSEASAASRQSDTSGPVTT
SKSSSLGSEFYHLPYKLVKATHANYKVTLDLQNSTEKFGGFLRSALDVLQILEL
ATLQDIGKCVVEILGYLKSCFSREPMMATVCVQQLLKTFLGTNLASQFDGLSSNPSKS
QGRAQRLGSSSVRPGLYHYCFMAPYTHFTQALADASLRNMVQAEQENDTSGWFDV
LQKVSTQLKTNLTSVTKNRADKNAIHNRHRLFELVIKALKQYTTTTTCVQLQKQVLDLLA
QLVQLRVNYCLLDSDQVFIGFVLKQFEYIEVGGFRESEAIIPNIFFLVLLSYERYHASKI
IGIPKIIQLCDGIMASGRKAVTHAIPALQPIVHDLFVLRGTNKADAGKELETQKEVVVSM
LLRLIQYHQVLEMFILVLQQCHKENEDKWKRLSRQIADIILPMLAKQQMHIDSHEALGV
LNTLFEILAPSSLRPVDMLLRSMFVTPNTMASVSTVQLWISGILAILRVLISQSTEDIVLS
RIQELSFSPYLISCTVINRLRDGDSTSTLEEHSEGKQIKNLPEETFSRFLQLVGLLEDI
VTKQLKVMEMSEQQHTFYCQELGTLMLIHFKSGMFRRITAAATRLFRSDGCGGSFY
TLDSLNLRRARSMITTHPALVLLWCQILLVNHNTDYRWWAEVQQTPKRHSLSSTKLLSP
QMSGEEEDSDLAALGMCNREIVRRGALILFCDYVCQNLHDSEHLTWLIVNHIQDLISL
SHEPPVQDFISAVHRNSAASGLFIQAIQSRCENLSTPTMLKKTLCLEGIHLSQSGAVL
TLYVDRLLCTPFRVLARMVDILACRRVEMLLAANLQSSMAQLPMEELNRIQEYLQSSG
LAQRHQRLYSLLDRFRLSTMQDSLSPSPVSSHPLDGDGHVSLETVSPDKDWYVHVLV
KSQCWTRSDSALLEGAEVNRIPAEDMNAFMNNEFNLSLLAPCLSLGMSEISGGQK
SALFEAAREVTLARVSGTVQQLPAVHHVFQPELPAEPAAYWSKLNDLFGDAALYQSL
PTLARALAQYLVVSKLP SHLHLPPEKEKDIVKFVVATLEALSWHLIHEQIPLSLDLQAG
LDCCCLALQLPGLWSVVSSTEFVTHACSLIYCVHFILEAVAVQPGEQLLSPERRTNT
KAISEEEEEVDPNTQNPKYITAACEMVAEMVESLQSVLALGHKRNLSGVPFLTPLLRNI
IISLARLPLVNSYTRVPPPLVWKLGWSPKPGGDFGTAFPEIPVEFLQEKEVFKEFIYRINT
LGWTSRTQFEETWATLLGVLVTPQPLVMEQEEESPPEEDTERTQINVLAQAITSLVLSA
MTVPVAGNPAVSCLEQQPRNKPLKALDTRFGRKLSIIRGIVEQEIQAMVSKRENIATHH
LYQAWDPVPSLSPATTGALISHEKLLLQINPERELGSMYSYKLGQVSIHVS VWLGNISITPL
REEEWDEEEEEEEADAPAPSSPPTSPVNSRKHRAGVDIHSCSQFLLELYSRWILPSSS
ARRTPAILISEVVRSLLVSDLFTERNQFELMYVTLTELRRVHPSEDEILAQYLV PATCK
AAAVLGMKDKAVAEPVSRLLLESTLRSSHLP SRV GALHGVLYVLECDLLDDTAKQLIPVIS
DYLLSNLKGIAHCVNHSQQHVLVMCATAFYLIENYPLDVGPEFSASIIQMCGVMLSGS
EESTPSIIYHCALRGLERLLLSEQLSRLDAESLVKLSVDRVNVHSPHRAMAALGLMLTC

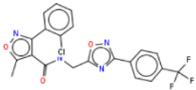
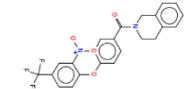
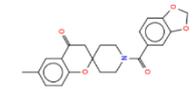
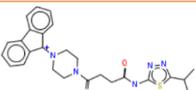
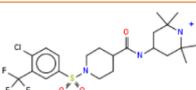
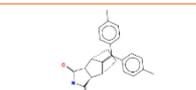
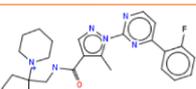
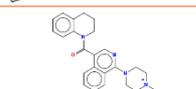
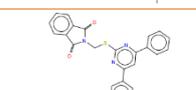
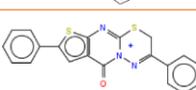
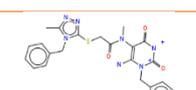
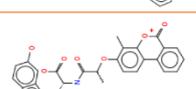
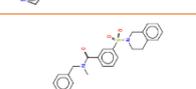
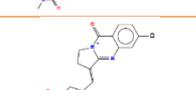
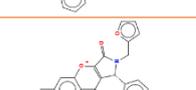
MYTGKEKVSPGRTSDPNPAAPDSESVIVAMERVSVLFDRIKGFPCEARVVARILPQF
LDDFFPPQDIMNKVIGEFLSNQQPYPQFMATVVYKVFQTLHSTGQSSMVRDWVMLS
SNFTQRAPVAMATWSLSCFFVSASTSPWVAAILPHVISRMGKLEQVDVNLFCCLVATDF
YRHQIEEELDRRAFQSVLEVVAAPGSPYHRLTCLRNVHKVT

b. Resultados de los test de las propiedades físico-químicas de los ligandos seleccionados:

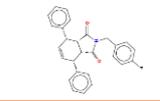
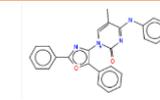
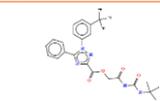
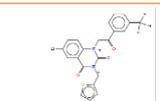
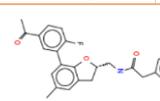
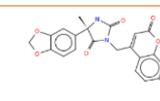
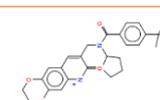
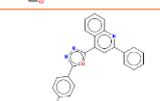
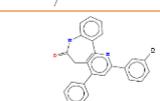
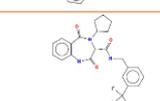
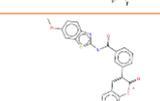
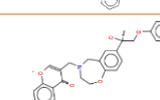
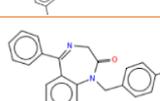
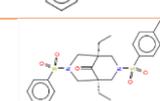
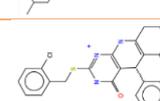
5IJO – Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	24299056_Intermediate	●	●	●	●
	24384915_Intermediate	●	●	●	●
	124892234_Intermediate	●	●	●	●
	24404451_Intermediate	●	●	●	●
	17431912_Intermediate	●	●	●	●
	17387919_Intermediate	●	●	●	●
	24384739_Intermediate	●	●	●	●
	17439543_Intermediate	●	●	●	●
	49736207_Intermediate	●	●	●	●
	17438810_Intermediate	●	●	●	●
	144116870_Intermediate	●	●	●	●
	99360326_Intermediate	●	●	●	●
	124948577_Accepted	●	●	●	●
	14743346_Accepted	●	●	●	●
	24342454_Intermediate	●	●	●	●

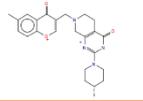
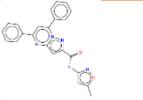
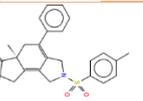
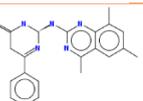
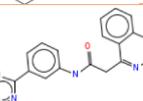
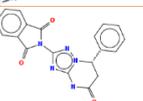
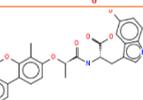
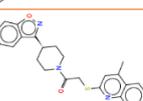
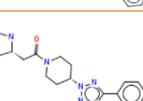
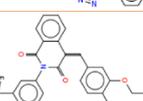
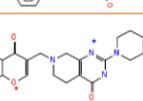
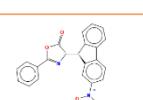
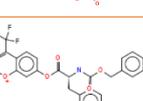
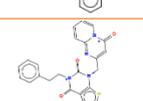
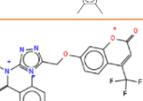
5IJO – Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	26729428_Accepted				
	24285578_Intermediate				
	26614318_Intermediate				
	17514051_Accepted				
	57258252_Accepted				
	14731202_Accepted				
	124949041_Accepted				
	4250533_Intermediate				
	17480242_Accepted				
	26729149_Intermediate				
	24827612_Accepted				
	49822553_Intermediate				
	103060909_Accepted				
	49680835_Intermediate				
	24390997_Intermediate				

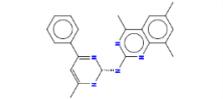
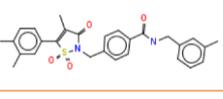
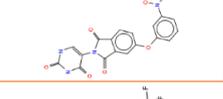
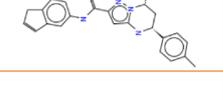
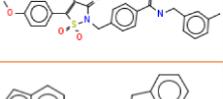
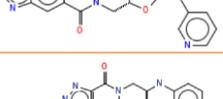
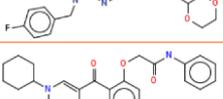
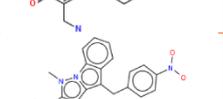
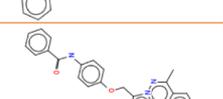
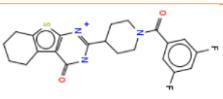
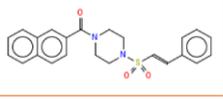
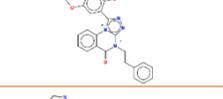
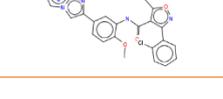
5IJO – Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	17449961_Accepted	●	●	●	●
	24310309_Intermediate	●	●	●	●
	22402942_Intermediate	●	●	●	●
	24323489_Intermediate	●	●	●	●
	124949653_Intermediate	●	●	●	●
	3712815_Intermediate	●	●	●	●
	26636173_Intermediate	●	●	●	●
	24326684_Intermediate	●	●	●	●
	92764366_Intermediate	●	●	●	●
	125306930_Intermediate	●	●	●	●
	17513384_Intermediate	●	●	●	●
	124948313_Accepted	●	●	●	●
	17402185_Intermediate	●	●	●	●
	14741630_Accepted	●	●	●	●
	24355892_Intermediate	●	●	●	●

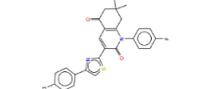
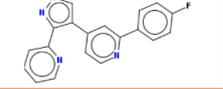
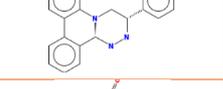
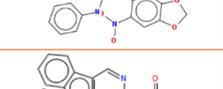
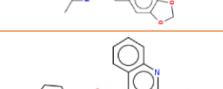
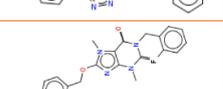
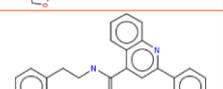
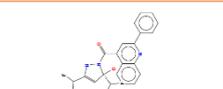
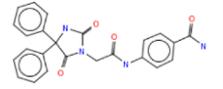
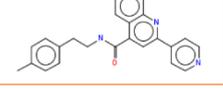
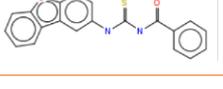
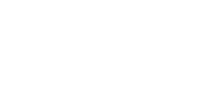
5FVM Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	26616550_Accepted	●	●	●	●
	17450998_Accepted	●	●	●	●
	134215354_Accepted	●	●	●	●
	24340809_Intermediate	●	●	●	●
	3711353_Intermediate	●	●	●	●
	859284_Intermediate	●	●	●	●
	49822553_Intermediate	●	●	●	●
	4260948_Intermediate	●	●	●	●
	26617933_Accepted	●	●	●	●
	22411472_Intermediate	●	●	●	●
	26616550_Accepted	●	●	●	●
	17460498_Intermediate	●	●	●	●
	17512216_Intermediate	●	●	●	●
	24315179_Intermediate	●	●	●	●
	124756657_Intermediate	●	●	●	●

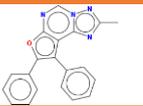
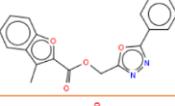
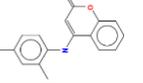
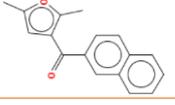
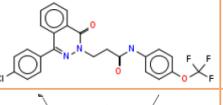
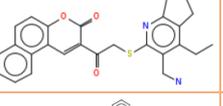
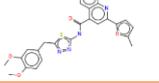
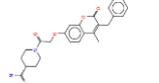
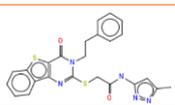
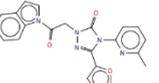
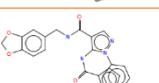
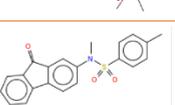
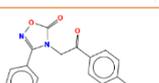
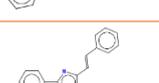
5FVM Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	24294988_Intermediate	●	●	●	●
	24387925_Intermediate	●	●	●	●
	24335388_Intermediate	●	●	●	●
	24280415_Intermediate	●	●	●	●
	24404483_Intermediate	●	●	●	●
	124948790_Intermediate	●	●	●	●
	49736163_Intermediate	●	●	●	●
	17516816_Intermediate	●	●	●	●
	92764856_Intermediate	●	●	●	●
	17505157_Intermediate	●	●	●	●
	22400991_Intermediate	●	●	●	●
	26615551_Intermediate	●	●	●	●
	24837121_Accepted	●	●	●	●
	24395117_Intermediate	●	●	●	●
	24702552_Intermediate	●	●	●	●

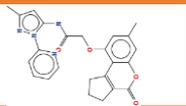
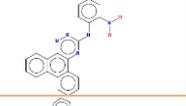
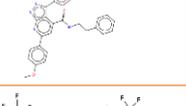
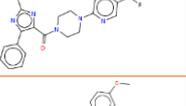
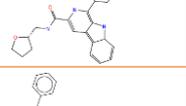
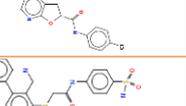
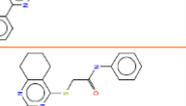
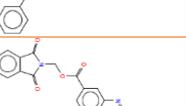
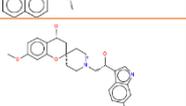
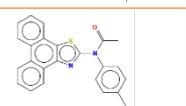
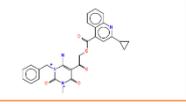
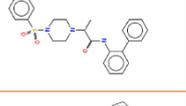
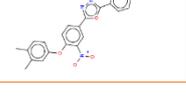
5FVM Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	24268757_Intermediate	●	●	●	●
	124349941_Accepted	●	●	●	●
	26652826_Intermediate	●	●	●	●
	49645949_Intermediate	●	●	●	●
	89852073_Intermediate	●	●	●	●
	24308788_Intermediate	●	●	●	●
	24388623_Intermediate	●	●	●	●
	862678_Intermediate	●	●	●	●
	24326684_Intermediate	●	●	●	●
	24342434_Intermediate	●	●	●	●
	24358978_Intermediate	●	●	●	●
	17388570_Intermediate	●	●	●	●
	49680895_Intermediate	●	●	●	●
	24813925_Intermediate	●	●	●	●
	17467019_Intermediate	●	●	●	●

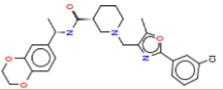
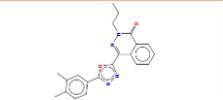
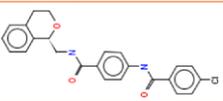
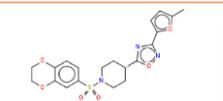
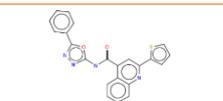
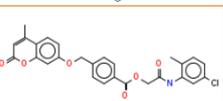
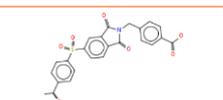
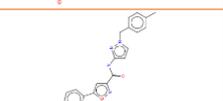
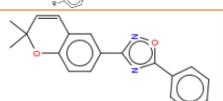
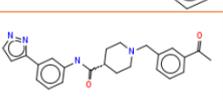
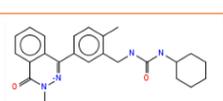
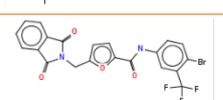
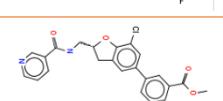
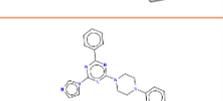
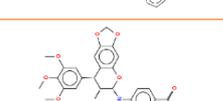
5H64 Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	865017_Intermediate				
	85200055_Intermediate				
	17414852_Intermediate				
	47196216_Intermediate				
	24276371_Intermediate				
	24835024_Intermediate				
	24375622_Intermediate				
	96099256_Intermediate				
	49824862_Intermediate				
	14738446_Intermediate				
	26649250_Intermediate				
	26668284_Intermediate				
	121286209_Intermediate				
	24787154_Accepted				
	104231818_Accepted				

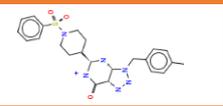
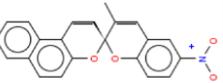
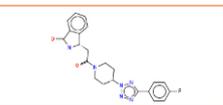
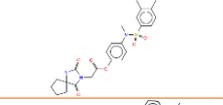
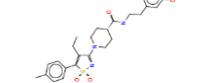
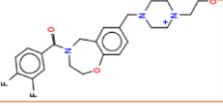
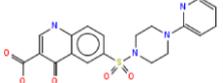
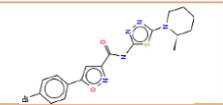
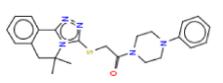
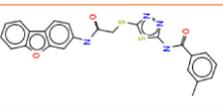
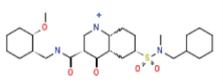
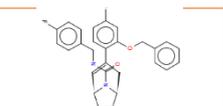
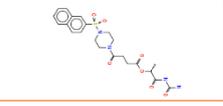
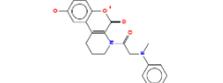
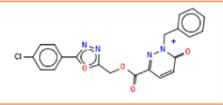
5H64 Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	864899_Intermediate	●	●	●	●
	17454063_Intermediate	●	●	●	●
	24403832_Accepted	●	●	●	●
	121285810_Accepted	●	●	●	●
	49824701_Intermediate	●	●	●	●
	99454736_Intermediate	●	●	●	●
	24313639_Intermediate	●	●	●	●
	24288742_Intermediate	●	●	●	●
	3713757_Intermediate	●	●	●	●
	26534472_Accepted	●	●	●	●
	26651302_Intermediate	●	●	●	●
	17481473_Intermediate	●	●	●	●
	22434416_Intermediate	●	●	●	●
	22410720_Intermediate	●	●	●	●
	17506462_Intermediate	●	●	●	●

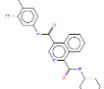
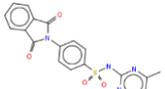
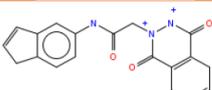
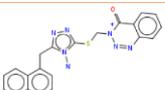
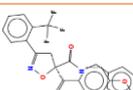
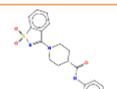
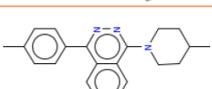
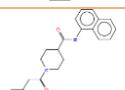
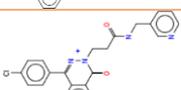
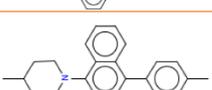
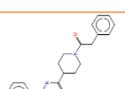
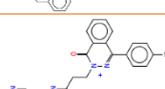
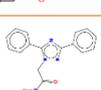
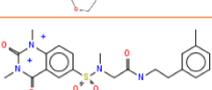
5H64 Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	7966878_Accepted	●	●	●	●
	3713517_Accepted	●	●	●	●
	22401812_Intermediate	●	●	●	●
	844547_Intermediate	●	●	●	●
	17515708_Intermediate	●	●	●	●
	22401022_Intermediate	●	●	●	●
	24314133_Intermediate	●	●	●	●
	4242176_Accepted	●	●	●	●
	26528299_Accepted	●	●	●	●
	49720953_Intermediate	●	●	●	●
	26663782_Accepted	●	●	●	●
	26541311_Intermediate	●	●	●	●
	124948715_Accepted	●	●	●	●
	4248241_Intermediate	●	●	●	●
	92764279_Intermediate	●	●	●	●

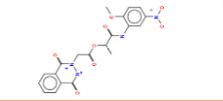
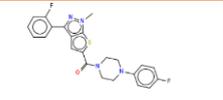
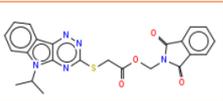
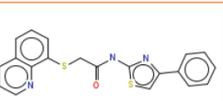
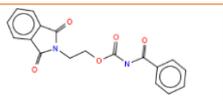
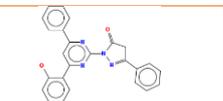
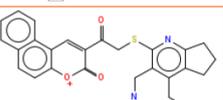
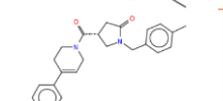
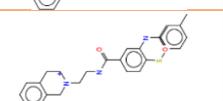
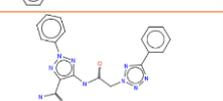
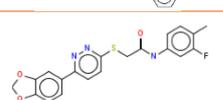
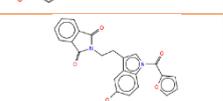
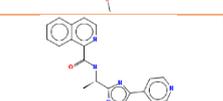
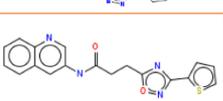
2D3X Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	26669149_Accepted	●	●	●	●
	17443717_Intermediate	●	●	●	●
	26617933_Accepted	●	●	●	●
	56321493_Intermediate	●	●	●	●
	24388087_Accepted	●	●	●	●
	124947970_Accepted	●	●	●	●
	24308871_Intermediate	●	●	●	●
	14738275_Accepted	●	●	●	●
	850146_Intermediate	●	●	●	●
	17504660_Intermediate	●	●	●	●
	24280435_Intermediate	●	●	●	●
	99360326_Intermediate	●	●	●	●
	49672711_Accepted	●	●	●	●
	24320355_Intermediate	●	●	●	●
	24839892_Accepted	●	●	●	●

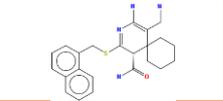
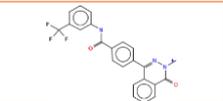
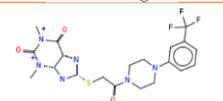
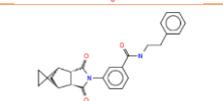
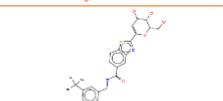
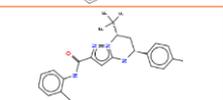
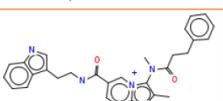
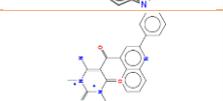
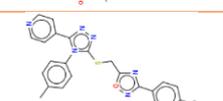
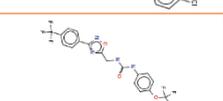
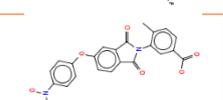
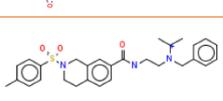
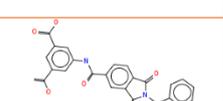
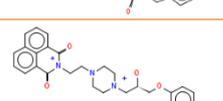
2D3X Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	17461088_Intermediate	●	●	●	●
	24310500_Intermediate	●	●	●	●
	17505173_Intermediate	●	●	●	●
	3715251_Intermediate	●	●	●	●
	14747069_Intermediate	●	●	●	●
	144097156_Intermediate	●	●	●	●
	24831957_Intermediate	●	●	●	●
	24838160_Accepted	●	●	●	●
	14726292_Intermediate	●	●	●	●
	24303824_Accepted	●	●	●	●
	24838160_Accepted	●	●	●	●
	14726292_Intermediate	●	●	●	●
	24303824_Accepted	●	●	●	●
	852133_Intermediate	●	●	●	●
	26724478_Intermediate	●	●	●	●

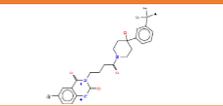
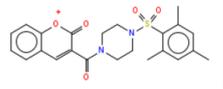
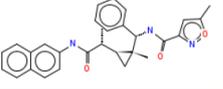
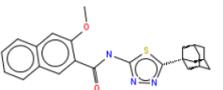
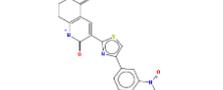
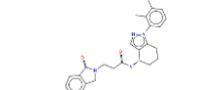
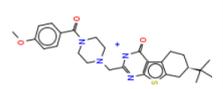
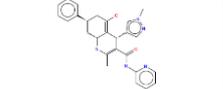
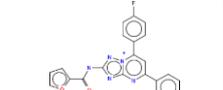
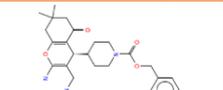
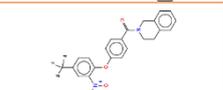
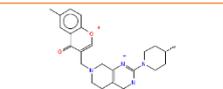
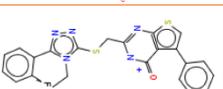
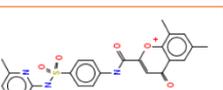
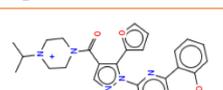
2D3X Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	56314719_Intermediate	●	●	●	●
	24398604_Intermediate	●	●	●	●
	7977497_Intermediate	●	●	●	●
	17474984_Intermediate	●	●	●	●
	24783455_Intermediate	●	●	●	●
	17441309_Intermediate	●	●	●	●
	24375622_Intermediate	●	●	●	●
	49819585_Intermediate	●	●	●	●
	24286792_Intermediate	●	●	●	●
	17504677_Intermediate	●	●	●	●
	103050902_Intermediate	●	●	●	●
	17514770_Intermediate	●	●	●	●
	7977853_Intermediate	●	●	●	●
	26649553_Accepted	●	●	●	●
	4243831_Intermediate	●	●	●	●

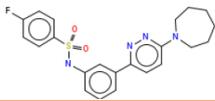
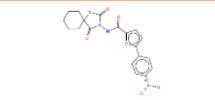
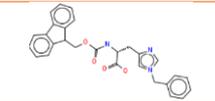
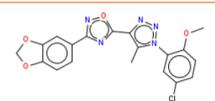
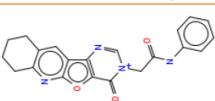
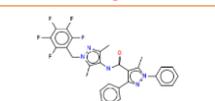
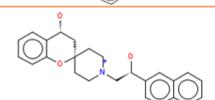
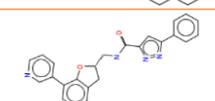
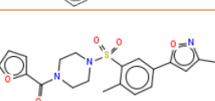
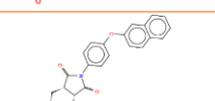
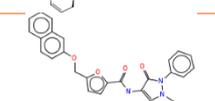
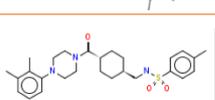
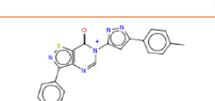
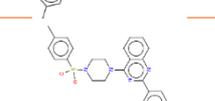
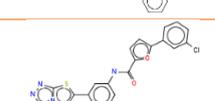
3IO6 Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	16953455_Intermediate	●	●	●	●
	14744810_Intermediate	●	●	●	●
	24275095_Intermediate	●	●	●	●
	144097613_Intermediate	●	●	●	●
	24378337_Intermediate	●	●	●	●
	99494974_Intermediate	●	●	●	●
	24286680_Intermediate	●	●	●	●
	103073663_Intermediate	●	●	●	●
	17388443_Intermediate	●	●	●	●
	24390050_Intermediate	●	●	●	●
	26729711_Intermediate	●	●	●	●
	17453871_Intermediate	●	●	●	●
	93575679_Accepted	●	●	●	●
	49816130_Intermediate	●	●	●	●
	104222965_Accepted	●	●	●	●

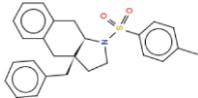
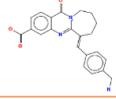
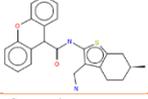
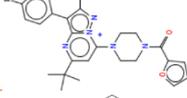
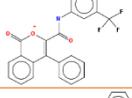
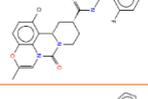
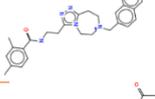
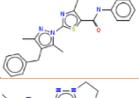
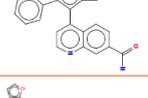
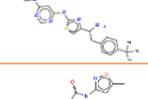
3IO6 Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	24369059_Intermediate	●	●	●	●
	57267578_Intermediate	●	●	●	●
	24708148_Intermediate	●	●	●	●
	24297758_Intermediate	●	●	●	●
	24268765_Intermediate	●	●	●	●
	49737376_Intermediate	●	●	●	●
	26644266_Intermediate	●	●	●	●
	22401815_Intermediate	●	●	●	●
	24394295_Intermediate	●	●	●	●
	7997204_Intermediate	●	●	●	●
	24285578_Intermediate	●	●	●	●
	26616550_Accepted	●	●	●	●
	22409240_Intermediate	●	●	●	●
	49722292_Intermediate	●	●	●	●
	124948961_Intermediate	●	●	●	●

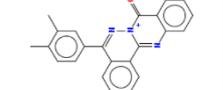
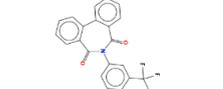
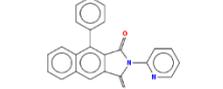
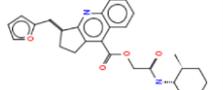
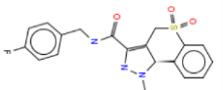
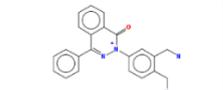
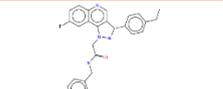
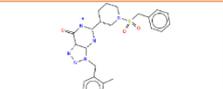
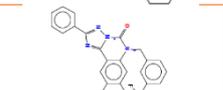
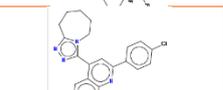
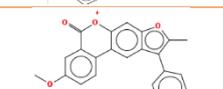
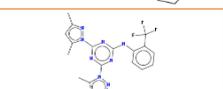
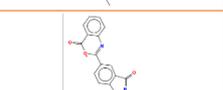
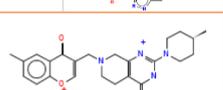
3IO6 Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	49719376_Intermediate	●	●	●	●
	49818241_Intermediate	●	●	●	●
	121283135_Intermediate	●	●	●	●
	24404023_Intermediate	●	●	●	●
	49820100_Intermediate	●	●	●	●
	17387919_Intermediate	●	●	●	●
	26651285_Accepted	●	●	●	●
	124948577_Accepted	●	●	●	●
	49734701_Intermediate	●	●	●	●
	24288162_Intermediate	●	●	●	●
	4262624_Intermediate	●	●	●	●
	24305643_Intermediate	●	●	●	●
	26649005_Accepted	●	●	●	●
	57581506_Intermediate	●	●	●	●
	4262465_Intermediate	●	●	●	●

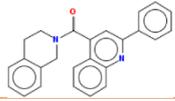
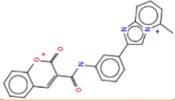
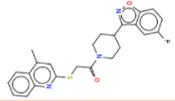
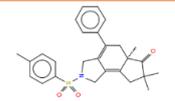
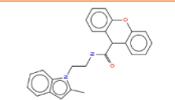
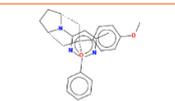
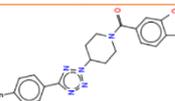
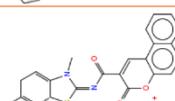
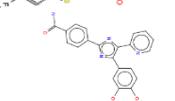
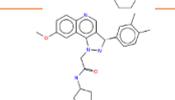
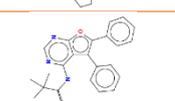
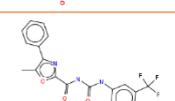
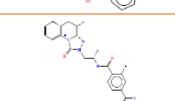
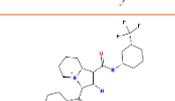
3IOR Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	160654107_Accepted	●	●	●	●
	49675584_Intermediate	●	●	●	●
	24274677_Intermediate	●	●	●	●
	14741324_Intermediate	●	●	●	●
	24378797_Intermediate	●	●	●	●
	24396030_Intermediate	●	●	●	●
	124948291_Accepted	●	●	●	●
	24393002_Intermediate	●	●	●	●
	124955471_Intermediate	●	●	●	●
	103073961_Intermediate	●	●	●	●
	24280440_Accepted	●	●	●	●
	124948034_Accepted	●	●	●	●
	57287986_Intermediate	●	●	●	●
	24268608_Intermediate	●	●	●	●
	124949702_Intermediate	●	●	●	●

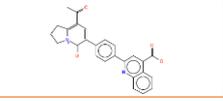
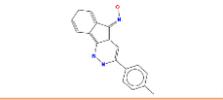
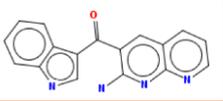
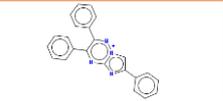
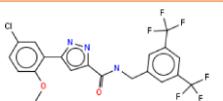
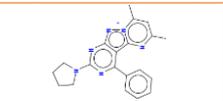
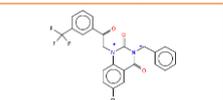
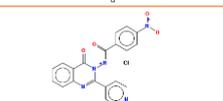
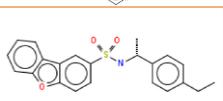
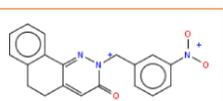
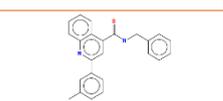
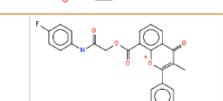
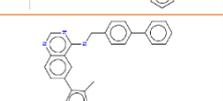
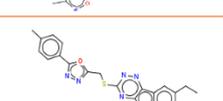
3IOR Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	24339291_Intermediate	●	●	●	●
	24313594_Intermediate	●	●	●	●
	22404025_Accepted	●	●	●	●
	22407941_Intermediate	●	●	●	●
	49736076_Accepted	●	●	●	●
	24331480_Intermediate	●	●	●	●
	24405808_Intermediate	●	●	●	●
	49733032_Accepted	●	●	●	●
	24312446_Intermediate	●	●	●	●
	24268562_Intermediate	●	●	●	●
	22403701_Intermediate	●	●	●	●
	24297356_Intermediate	●	●	●	●
	17474197_Intermediate	●	●	●	●
	17454984_Intermediate	●	●	●	●
	26616550_Accepted	●	●	●	●

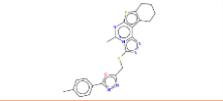
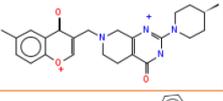
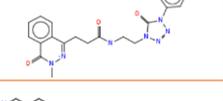
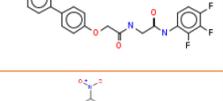
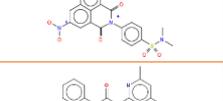
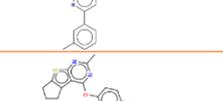
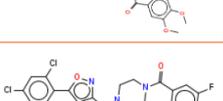
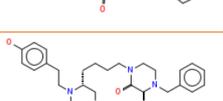
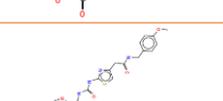
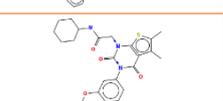
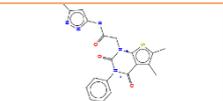
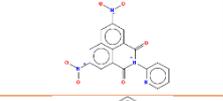
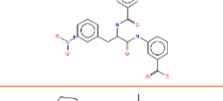
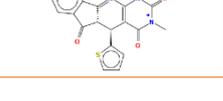
3IOR Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	17507341_Intermediate	●	●	●	●
	24301518_Intermediate	●	●	●	●
	4260948_Intermediate	●	●	●	●
	134215354_Accepted	●	●	●	●
	24321499_Intermediate	●	●	●	●
	852440_Accepted	●	●	●	●
	26614211_Intermediate	●	●	●	●
	24375539_Intermediate	●	●	●	●
	124950699_Accepted	●	●	●	●
	24405732_Intermediate	●	●	●	●
	24350099_Intermediate	●	●	●	●
	26541323_Intermediate	●	●	●	●
	26650161_Intermediate	●	●	●	●
	24389531_Intermediate	●	●	●	●
	4260045_Intermediate	●	●	●	●

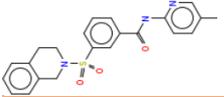
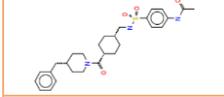
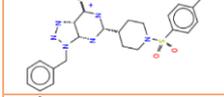
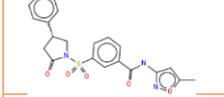
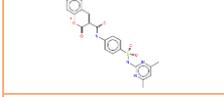
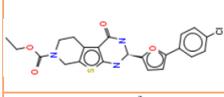
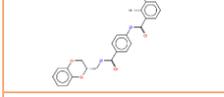
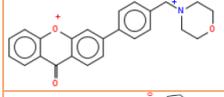
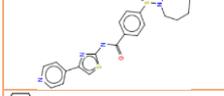
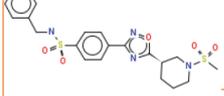
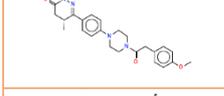
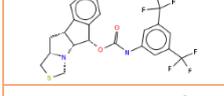
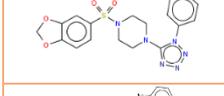
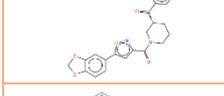
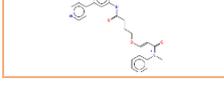
3IOT Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	144090268_Intermediate	●	●	●	●
	24824473_Intermediate	●	●	●	●
	144095453_Intermediate	●	●	●	●
	17413291_Accepted	●	●	●	●
	99454886_Accepted	●	●	●	●
	4244022_Accepted	●	●	●	●
	24352057_Intermediate	●	●	●	●
	24823237_Intermediate	●	●	●	●
	24279070_Intermediate	●	●	●	●
	24819355_Intermediate	●	●	●	●
	24322147_Intermediate	●	●	●	●
	49668662_Intermediate	●	●	●	●
	29216949_Intermediate	●	●	●	●
	29216949_Intermediate	●	●	●	●
	14725770_Intermediate	●	●	●	●

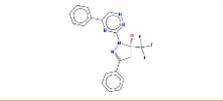
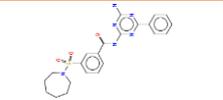
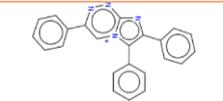
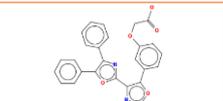
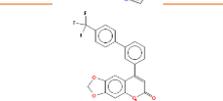
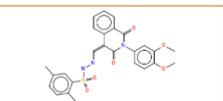
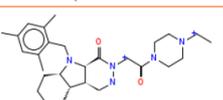
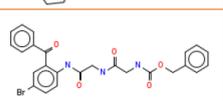
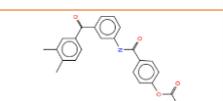
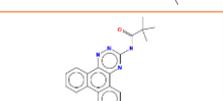
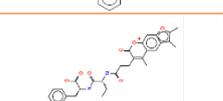
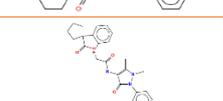
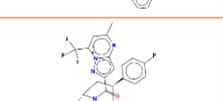
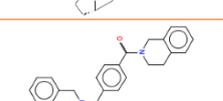
3IOT Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	26639453_Intermediate				
	26616550_Accepted				
	26618177_Intermediate				
	22407189_Intermediate				
	24314324_Intermediate				
	24362889_Intermediate				
	24320109_Intermediate				
	26669035_Accepted				
	124753655_Intermediate				
	51085955_Intermediate				
	24356720_Intermediate				
	24369459_Intermediate				
	17431724_Intermediate				
	17459615_Intermediate				
	24295091_Intermediate				

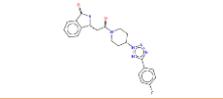
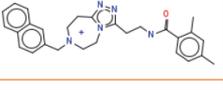
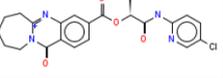
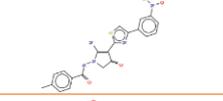
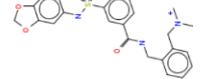
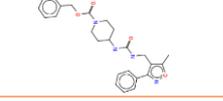
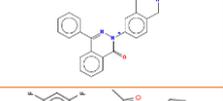
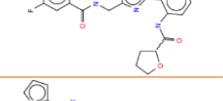
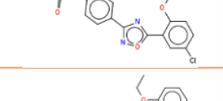
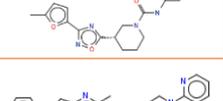
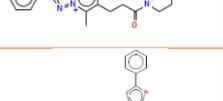
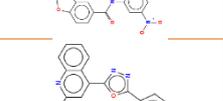
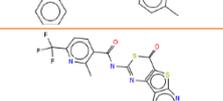
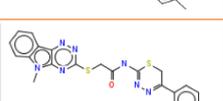
3IOT Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	56321393_Accepted	●	●	●	●
	7999833_Intermediate	●	●	●	●
	24803617_Accepted	●	●	●	●
	24838758_Accepted	●	●	●	●
	24332503_Intermediate	●	●	●	●
	4251632_Intermediate	●	●	●	●
	144098278_Intermediate	●	●	●	●
	85146491_Intermediate	●	●	●	●
	24362423_Intermediate	●	●	●	●
	50086151_Accepted	●	●	●	●
	17406733_Intermediate	●	●	●	●
	124752952_Intermediate	●	●	●	●
	847657_Intermediate	●	●	●	●
	26618367_Intermediate	●	●	●	●
	143472066_Intermediate	●	●	●	●

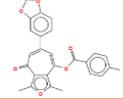
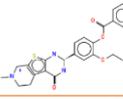
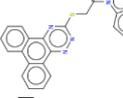
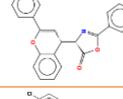
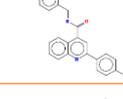
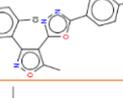
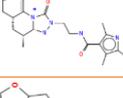
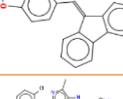
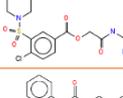
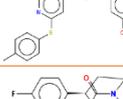
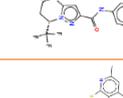
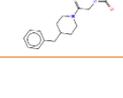
3IOU Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	24339507_Accepted	●	●	●	●
	24840422_Accepted	●	●	●	●
	24316632_Intermediate	●	●	●	●
	11114086_Accepted	●	●	●	●
	29215783_Intermediate	●	●	●	●
	22409459_Intermediate	●	●	●	●
	24388515_Intermediate	●	●	●	●
	17507211_Intermediate	●	●	●	●
	17415790_Intermediate	●	●	●	●
	26665439_Accepted	●	●	●	●
	49820907_Intermediate	●	●	●	●
	24306308_Accepted	●	●	●	●
	24825707_Intermediate	●	●	●	●
	26648576_Intermediate	●	●	●	●
	14731076_Accepted	●	●	●	●

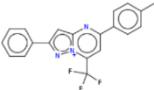
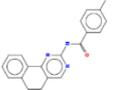
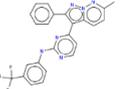
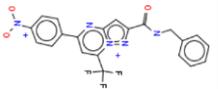
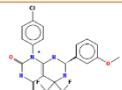
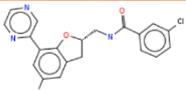
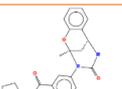
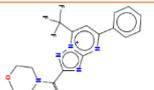
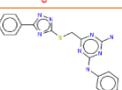
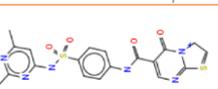
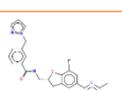
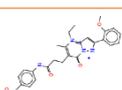
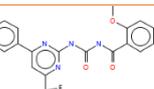
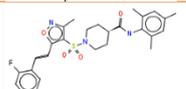
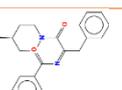
3IOU Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	26617933_Accepted	●	●	●	●
	124948291_Accepted	●	●	●	●
	22408705_Intermediate	●	●	●	●
	24781065_Intermediate	●	●	●	●
	99494570_Intermediate	●	●	●	●
	26538458_Accepted	●	●	●	●
	24331480_Intermediate	●	●	●	●
	124948193_Intermediate	●	●	●	●
	24286932_Intermediate	●	●	●	●
	24780612_Intermediate	●	●	●	●
	14731765_Accepted	●	●	●	●
	24367859_Intermediate	●	●	●	●
	24326684_Intermediate	●	●	●	●
	26533929_Intermediate	●	●	●	●
	17431950_Intermediate	●	●	●	●

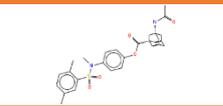
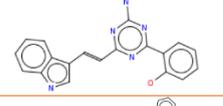
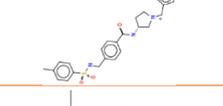
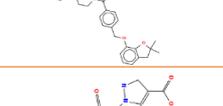
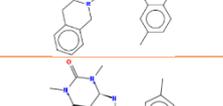
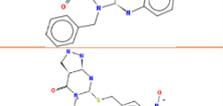
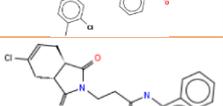
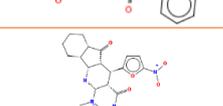
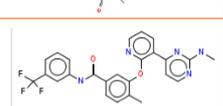
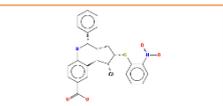
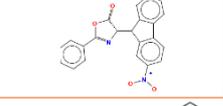
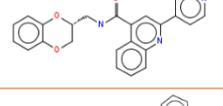
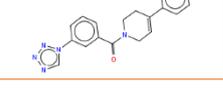
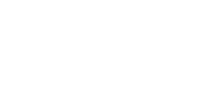
3IOU Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	24390633_Intermediate	●	●	●	●
	24274025_Intermediate	●	●	●	●
	24366176_Intermediate	●	●	●	●
	17409311_Intermediate	●	●	●	●
	17439543_Intermediate	●	●	●	●
	24358518_Intermediate	●	●	●	●
	26728287_Accepted	●	●	●	●
	26650197_Intermediate	●	●	●	●
	24308164_Intermediate	●	●	●	●
	17401168_Accepted	●	●	●	●
	22402043_Accepted	●	●	●	●
	24330171_Intermediate	●	●	●	●
	26648646_Intermediate	●	●	●	●
	24280415_Intermediate	●	●	●	●
	7968855_Accepted	●	●	●	●

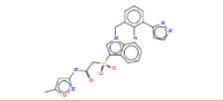
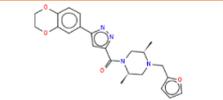
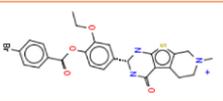
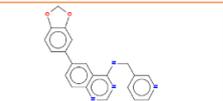
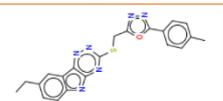
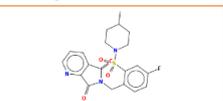
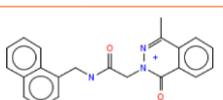
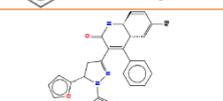
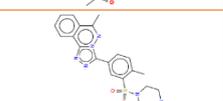
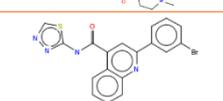
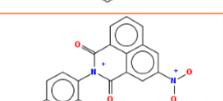
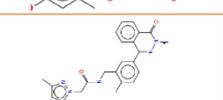
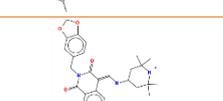
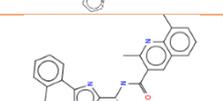
3IOV Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	17486239_Accepted	●	●	●	●
	17402129_Accepted	●	●	●	●
	124350036_Intermediate	●	●	●	●
	24340143_Intermediate	●	●	●	●
	24327083_Intermediate	●	●	●	●
	124948339_Accepted	●	●	●	●
	24299083_Intermediate	●	●	●	●
	849918_Intermediate	●	●	●	●
	843048_Intermediate	●	●	●	●
	24779270_Intermediate	●	●	●	●
	124949851_Accepted	●	●	●	●
	24384782_Intermediate	●	●	●	●
	24814817_Accepted	●	●	●	●
	24408051_Intermediate	●	●	●	●
	49726216_Intermediate	●	●	●	●

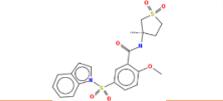
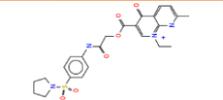
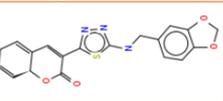
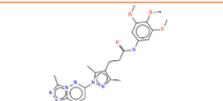
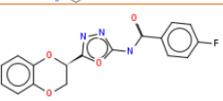
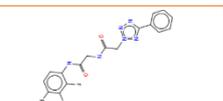
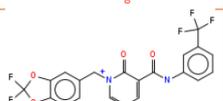
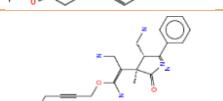
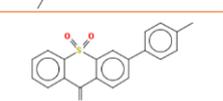
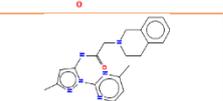
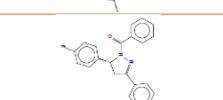
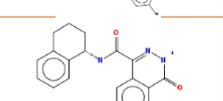
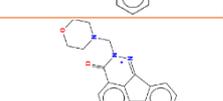
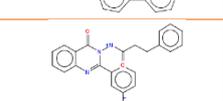
3IOV Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	56321763_Intermediate	●	●	●	●
	26620814_Intermediate	●	●	●	●
	93575676_Accepted	●	●	●	●
	17403488_Intermediate	●	●	●	●
	51085782_Intermediate	●	●	●	●
	7965742_Intermediate	●	●	●	●
	842792_Intermediate	●	●	●	●
	24374208_Intermediate	●	●	●	●
	24337896_Intermediate	●	●	●	●
	17472659_Intermediate	●	●	●	●
	137276043_Intermediate	●	●	●	●
	24336228_Intermediate	●	●	●	●
	17460498_Intermediate	●	●	●	●
	24340347_Intermediate	●	●	●	●
	3716932_Intermediate	●	●	●	●

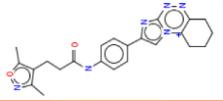
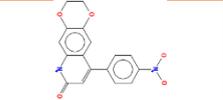
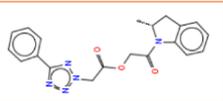
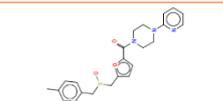
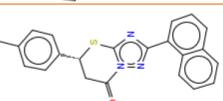
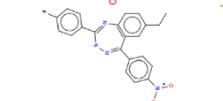
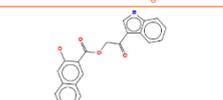
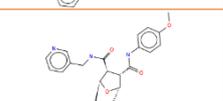
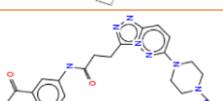
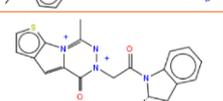
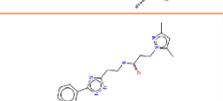
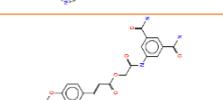
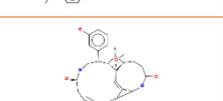
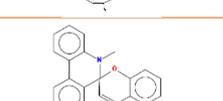
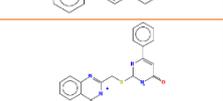
3IOV Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	85756536_Intermediate	●	●	●	●
	26617289_Intermediate	●	●	●	●
	24272318_Intermediate	●	●	●	●
	85146085_Intermediate	●	●	●	●
	14725770_Intermediate	●	●	●	●
	49717583_Accepted	●	●	●	●
	14723885_Accepted	●	●	●	●
	24312238_Intermediate	●	●	●	●
	56424154_Accepted	●	●	●	●
	17452610_Intermediate	●	●	●	●
	24789719_Intermediate	●	●	●	●
	4263046_Accepted	●	●	●	●
	24834078_Intermediate	●	●	●	●
	26647049_Intermediate	●	●	●	●
	17465009_Intermediate	●	●	●	●

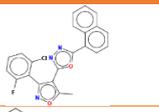
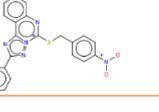
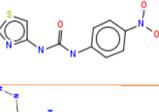
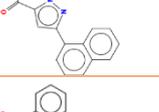
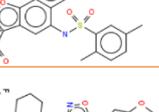
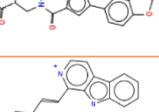
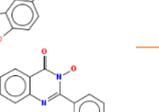
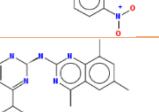
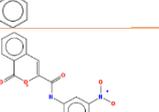
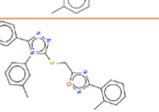
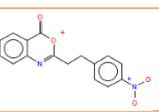
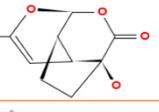
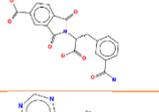
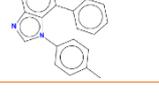
3LRH Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	57267229_Intermediate	●	●	●	●
	24840383_Intermediate	●	●	●	●
	24305123_Intermediate	●	●	●	●
	24410147_Intermediate	●	●	●	●
	17514765_Accepted	●	●	●	●
	85270423_Intermediate	●	●	●	●
	56316950_Accepted	●	●	●	●
	17410771_Intermediate	●	●	●	●
	4254939_Intermediate	●	●	●	●
	49645630_Accepted	●	●	●	●
	3711237_Accepted	●	●	●	●
	47194431_Intermediate	●	●	●	●
	24833886_Accepted	●	●	●	●
	4246813_Accepted	●	●	●	●
	17509337_Intermediate	●	●	●	●

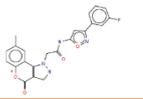
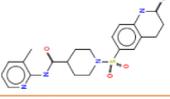
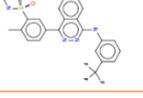
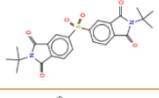
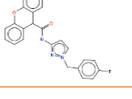
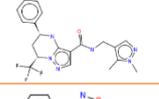
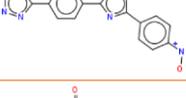
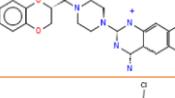
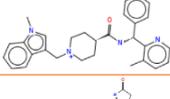
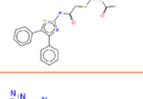
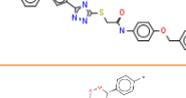
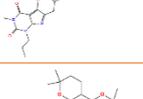
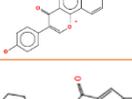
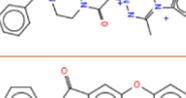
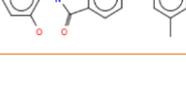
3LRH Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	26618343_Intermediate				
	24836883_Intermediate				
	3714261_Intermediate				
	49722083_Intermediate				
	24326102_Intermediate				
	17408526_Intermediate				
	22401381_Intermediate				
	17408338_Intermediate				
	49724136_Intermediate				
	26615356_Intermediate				
	26648095_Accepted				
	24791758_Intermediate				
	144089203_Accepted				
	24302740_Intermediate				
	24376380_Intermediate				

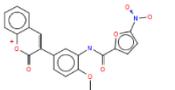
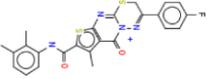
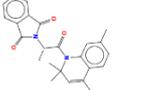
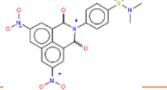
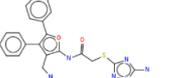
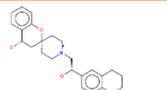
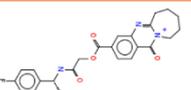
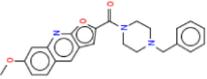
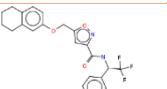
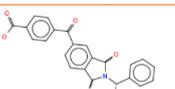
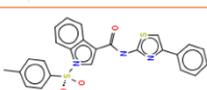
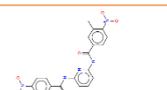
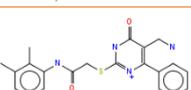
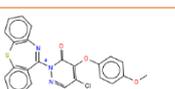
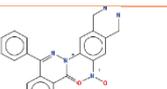
3LRH Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	26728288_Accepted	●	●	●	●
	24337206_Intermediate	●	●	●	●
	26533525_Intermediate	●	●	●	●
	17464313_Intermediate	●	●	●	●
	24314034_Intermediate	●	●	●	●
	26618367_Intermediate	●	●	●	●
	24793844_Intermediate	●	●	●	●
	24824363_Intermediate	●	●	●	●
	24294988_Intermediate	●	●	●	●
	24341545_Intermediate	●	●	●	●
	24390795_Intermediate	●	●	●	●
	24293650_Intermediate	●	●	●	●
	92763871_Intermediate	●	●	●	●
	26740862_Accepted	●	●	●	●
	24781080_Intermediate	●	●	●	●

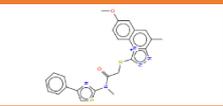
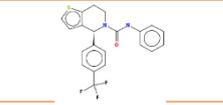
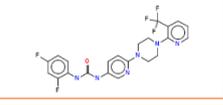
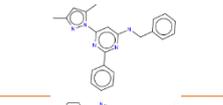
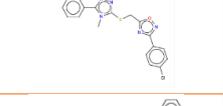
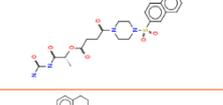
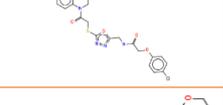
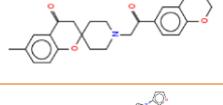
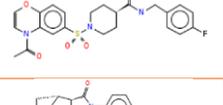
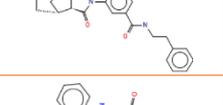
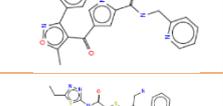
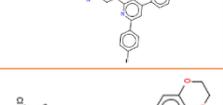
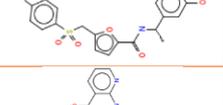
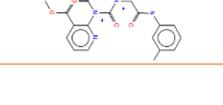
Modelo 1 Parte 1 – Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	22411598_Intermediate	●	●	●	●
	7966291_Intermediate	●	●	●	●
	24351364_Intermediate	●	●	●	●
	24300127_Intermediate	●	●	●	●
	24314235_Accepted	●	●	●	●
	26669016_Accepted	●	●	●	●
	26534106_Intermediate	●	●	●	●
	11113052_Intermediate	●	●	●	●
	103163390_Intermediate	●	●	●	●
	22404556_Intermediate	●	●	●	●
	136947679_Intermediate	●	●	●	●
	3717746_Intermediate	●	●	●	●
	24823970_Intermediate	●	●	●	●
	26615411_Intermediate	●	●	●	●
	24301633_Intermediate	●	●	●	●

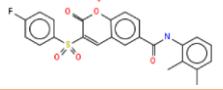
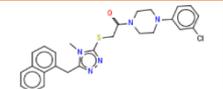
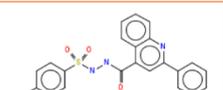
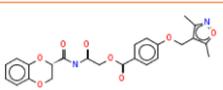
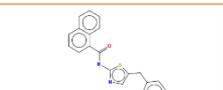
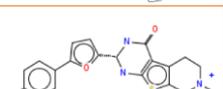
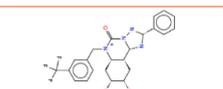
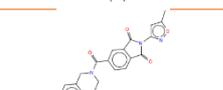
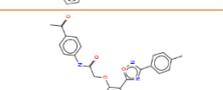
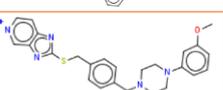
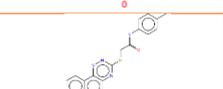
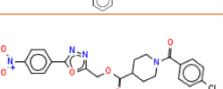
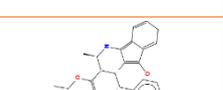
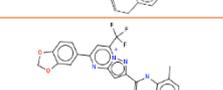
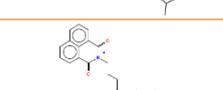
Modelo 1 Parte 1 – Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	17416014_Intermediate	●	●	●	●
	24414191_Intermediate	●	●	●	●
	17454032_Intermediate	●	●	●	●
	24314324_Intermediate	●	●	●	●
	14746694_Intermediate	●	●	●	●
	26651249_Accepted	●	●	●	●
	103074284_Intermediate	●	●	●	●
	24296038_Intermediate	●	●	●	●
	49826545_Accepted	●	●	●	●
	17462949_Accepted	●	●	●	●
	161004162_Intermediate	●	●	●	●
	24360040_Intermediate	●	●	●	●
	17409235_Intermediate	●	●	●	●
	117682944_Intermediate	●	●	●	●
	24308238_Intermediate	●	●	●	●

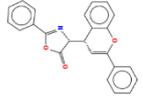
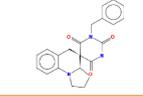
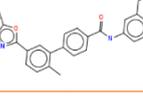
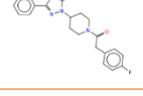
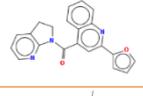
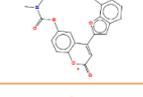
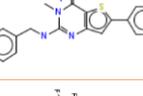
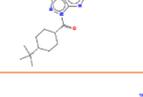
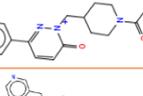
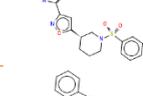
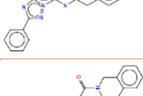
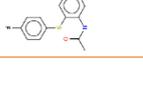
Modelo 1 Parte 1 – Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	87225725_Intermediate	●	●	●	●
	26533773_Intermediate	●	●	●	●
	26542090_Intermediate	●	●	●	●
	17439451_Accepted	●	●	●	●
	14730647_Accepted	●	●	●	●
	49672711_Accepted	●	●	●	●
	24838363_Intermediate	●	●	●	●
	26651313_Accepted	●	●	●	●
	49731467_Intermediate	●	●	●	●
	49717112_Intermediate	●	●	●	●
	24378337_Intermediate	●	●	●	●
	24821453_Intermediate	●	●	●	●
	22402194_Intermediate	●	●	●	●
	14734139_Intermediate	●	●	●	●
	24268369_Intermediate	●	●	●	●

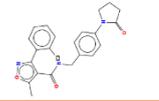
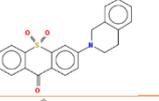
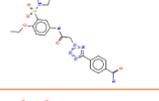
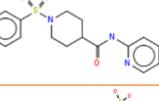
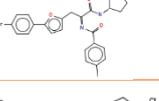
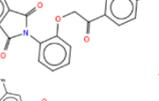
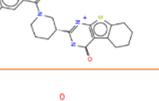
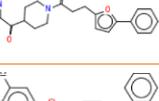
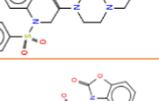
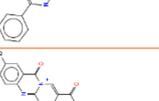
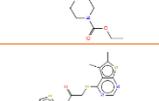
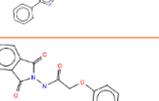
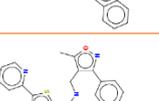
Modelo 2 Parte 1 – Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	24384915_Intermediate				
	14736117_Intermediate				
	17517143_Intermediate				
	3712316_Intermediate				
	24347702_Intermediate				
	26661453_Intermediate				
	24268562_Intermediate				
	24280440_Accepted				
	24393896_Intermediate				
	22400613_Intermediate				
	17466615_Intermediate				
	57259361_Intermediate				
	24779336_Intermediate				
	24301892_Intermediate				
	17484845_Accepted				

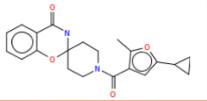
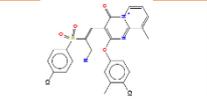
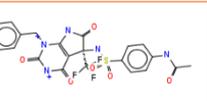
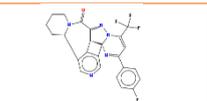
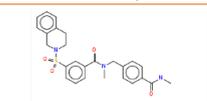
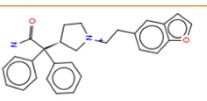
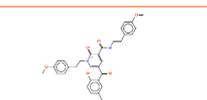
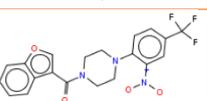
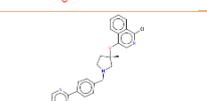
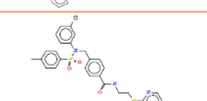
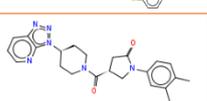
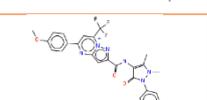
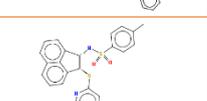
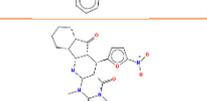
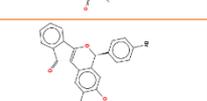
Modelo 2 Parte 1 – Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	17439543_Intermediate				
	865595_Intermediate				
	124349856_Intermediate				
	99303150_Accepted				
	87692466_Intermediate				
	49676871_Intermediate				
	99456417_Intermediate				
	24300932_Intermediate				
	22413951_Intermediate				
	22411701_Intermediate				
	26616029_Accepted				
	103060487_Accepted				
	24407388_Intermediate				
	24387334_Intermediate				
	17510593_Intermediate				

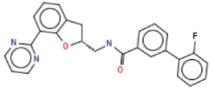
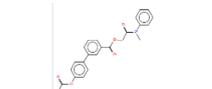
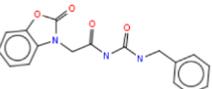
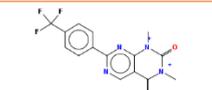
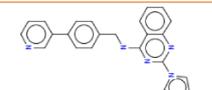
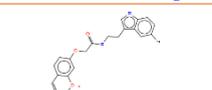
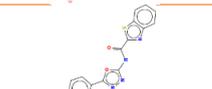
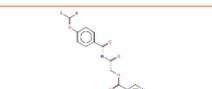
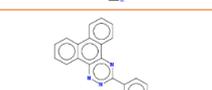
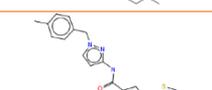
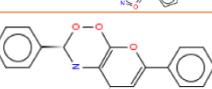
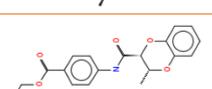
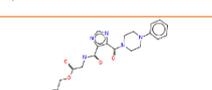
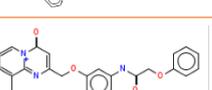
Modelo 2 Parte 1 – Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	4261333_Intermediate	●	●	●	●
	49640654_Intermediate	●	●	●	●
	57269213_Intermediate	●	●	●	●
	57257700_Accepted	●	●	●	●
	17507391_Intermediate	●	●	●	●
	17412540_Intermediate	●	●	●	●
	26616319_Intermediate	●	●	●	●
	26616420_Intermediate	●	●	●	●
	24364078_Intermediate	●	●	●	●
	17410613_Intermediate	●	●	●	●
	14745330_Intermediate	●	●	●	●
	51088719_Intermediate	●	●	●	●
	26638442_Intermediate	●	●	●	●
	22416631_Accepted	●	●	●	●
	26527793_Intermediate	●	●	●	●

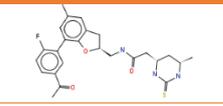
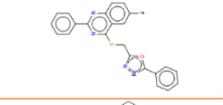
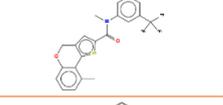
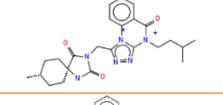
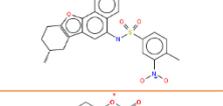
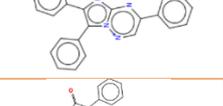
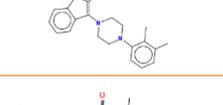
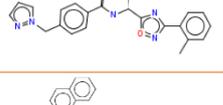
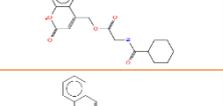
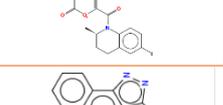
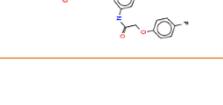
Modelo 1 Parte 2 – Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	26618084_Intermediate	●	●	●	●
	17513106_Intermediate	●	●	●	●
	22416469_Intermediate	●	●	●	●
	24811600_Accepted	●	●	●	●
	103060909_Accepted	●	●	●	●
	144206189_Accepted	●	●	●	●
	22411287_Intermediate	●	●	●	●
	24281287_Intermediate	●	●	●	●
	99454546_Accepted	●	●	●	●
	17474083_Intermediate	●	●	●	●
	26616378_Intermediate	●	●	●	●
	85305349_Intermediate	●	●	●	●
	24365785_Accepted	●	●	●	●
	17472659_Intermediate	●	●	●	●
	17454129_Intermediate	●	●	●	●

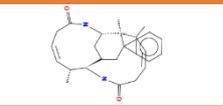
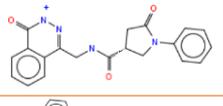
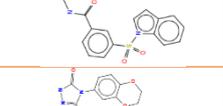
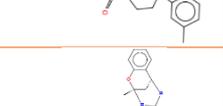
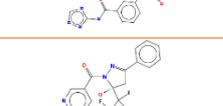
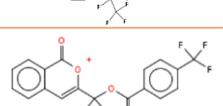
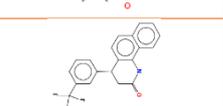
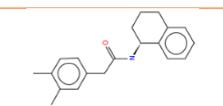
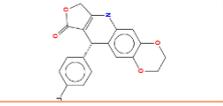
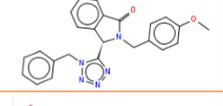
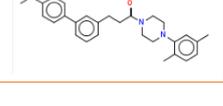
Modelo 1 Parte 2 – Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	124949346_Accepted				
	22406478_Intermediate				
	14745494_Intermediate				
	26730624_Accepted				
	144116867_Intermediate				
	49821651_Intermediate				
	14733523_Intermediate				
	56316453_Intermediate				
	104222904_Intermediate				
	17512835_Accepted				
	4241197_Intermediate				
	24821073_Accepted				
	47213019_Intermediate				
	49733434_Intermediate				
	24409359_Intermediate				

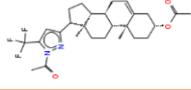
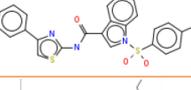
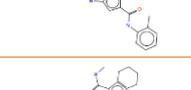
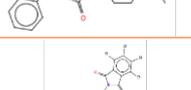
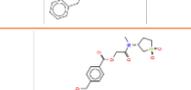
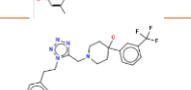
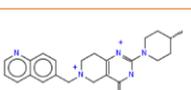
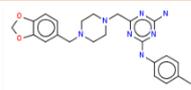
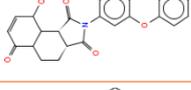
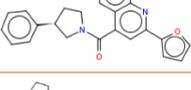
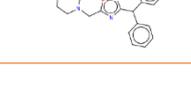
Modelo 1 Parte 2 – Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	124948065_Intermediate				
	842275_Intermediate				
	24386912_Intermediate				
	3716316_Intermediate				
	24347499_Intermediate				
	24365260_Intermediate				
	17457340_Intermediate				
	125268082_Intermediate				
	17511794_Accepted				
	24270821_Intermediate				
	26647333_Accepted				
	22407979_Intermediate				
	24366756_Intermediate				
	124384772_Intermediate				
	24406009_Intermediate				

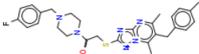
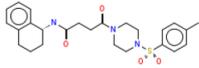
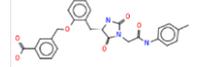
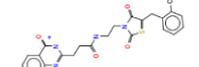
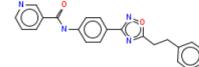
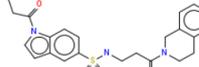
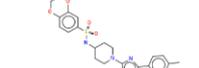
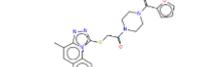
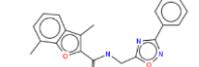
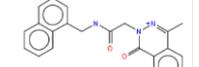
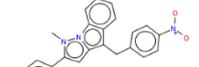
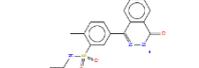
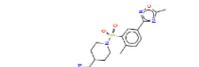
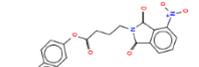
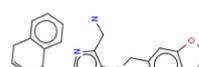
Modelo 2 Parte 2 – Cavidad 1

		Mut	Car	Tox	Sens
	144089244_Accepted	●	●	●	●
	51086970_Intermediate	●	●	●	●
	24300215_Intermediate	●	●	●	●
	24348317_Intermediate	●	●	●	●
	56318694_Intermediate	●	●	●	●
	26533290_Intermediate	●	●	●	●
	26618429_Accepted	●	●	●	●
	4241350_Intermediate	●	●	●	●
	17463008_Intermediate	●	●	●	●
	85146724_Accepted	●	●	●	●
	17464793_Intermediate	●	●	●	●
	49675955_Accepted	●	●	●	●
	24824513_Intermediate	●	●	●	●
	124755824_Accepted	●	●	●	●
	87349039_Intermediate	●	●	●	●

Modelo 2 Parte 2 Cavidad 2

		Mut	Car	Tox	Sens
	26653430_Intermediate	●	●	●	●
	161004162_Intermediate	●	●	●	●
	56320148_Intermediate	●	●	●	●
	24358553_Intermediate	●	●	●	●
	126496946_Intermediate	●	●	●	●
	26665424_Intermediate	●	●	●	●
	46493459_Accepted	●	●	●	●
	26657714_Intermediate	●	●	●	●
	14726530_Accepted	●	●	●	●
	26649215_Intermediate	●	●	●	●
	26668626_Intermediate	●	●	●	●
	24290997_Intermediate	●	●	●	●
	26751429_Intermediate	●	●	●	●
	87349811_Intermediate	●	●	●	●
	24785264_Accepted	●	●	●	●

Modelo 2 Parte 2 Cavidad 3

		Mut	Car	Tox	Sens
	124349347_Intermediate				
	24840530_Accepted				
	87544704_Intermediate				
	56315178_Intermediate				
	4249960_Intermediate				
	4251145_Intermediate				
	26667989_Intermediate				
	852594_Intermediate				
	26651010_Intermediate				
	14723885_Accepted				
	92764856_Intermediate				
	24364317_Intermediate				
	24413249_Intermediate				
	24310252_Intermediate				
	863668_Intermediate				