



Universidad de Valparaíso
Facultad de Ciencias
Programa de Licenciatura en Ciencias
Mención Biología o Química

**Diseño asistido por QSAR de nuevas moléculas orgánicas
agonistas TRPC6 como potencial tratamiento del TEA**

Tesis de título para optar al grado de Licenciado en Ciencias Mención Química.

ESTEBAN FRANCISCO DIAZ SANCHEZ

DR. QF. JAIME MELLA RAIPAN

Valparaíso – Chile

2024

Universidad de Valparaíso
Facultad de Ciencias
Programa de Licenciatura en Ciencias
Mención Biología o Química

**Diseño asistido por QSAR de nuevas moléculas orgánicas
agonistas TRPC6 como potencial tratamiento del TEA**

Tesis de título para optar al grado de Licenciado en Ciencias Mención Química.

ESTEBAN FRANCISCO DIAZ SANCHEZ
DR. QF. JAIME MELLA RAIPAN

Valparaíso – Chile
2024

AGRADECIMIENTOS

Durante mi tiempo en la universidad conocí muchas personas que me generaron un aporte significativo ya sea en el ámbito personal y/o profesional, además de que muchas personas que ya se encontraban presente en mi vida se volvieron parte fundamental y por esto deseo expresar mi más profundo agradecimiento y cariño a todas y cada una de estas personas que hicieron de este periodo de tiempo, uno de los mejores de mi vida hasta ahora.

Comenzando por mis padres, Magaly y Mario, aquellos que me entregaron las herramientas necesarias y valores que acompañan hoy en día para enfrentar la vida. También me dieron su confianza y amor incondicional que me hizo crecer como persona. Agradecer a mis hermanos Alexis, Savka y Gabriel por siempre estar presentes y dispuestos a escucharme, y siempre buscar la forma para subirme el ánimo cuando más lo necesitaba. Igualmente agradecer a al resto de mi familia por siempre estar preocupados de mi y darme su cariño y ánimo. A mi padrino y madrina, mis primos y mis primas, mis tíos y tías, que siempre me hacían sentir parte de la familia y todo el cariño que esta tenía dentro de ella, además de siempre darme ánimos para seguir adelante.

De igual modo darle las gracias a mi profesor guía y mentor, el Dr. QF. Jaime Mella, el cual ha sido un aporte fundamental en mi formación y me ha ayudado en incontables ocasiones para lograr que existiese esta investigación, además de su confianza e infaltable apoyo incondicional a través de sus palabras que subían siempre mi moral y me ayudaban a mantenerme concentrado, además de su pasión por la enseñanza con la cual siempre busco la mejor manera de guiarme y enseñarme sobre el siguiente paso. Paralelamente deseo agradecer a la institución y al cuerpo docente, cuya pasión por el área de cada uno de los docentes me ha marcado y me ha generado un amor tremendo por esta disciplina. También por otorgarme el espacio para mi desarrollo profesional, por siempre estar disponibles para guiarme además de siempre estar dispuestos ayudar y enseñar.

Y por último agradecer a mis amigos, Sebastián Neira, Victoria Reyes, Khriss Barrera, Yeremit Ortiz, Matías Silva y Matías Rojas, por siempre ser un pilar emocional en mi vida y a lo largo de este proceso. Por siempre recordarme de lo que soy capaz, lo que valgo y brindarme un apoyo incondicional cada vez que sentía que el mundo se desmoronaba ante mí.

INDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	
a) Aspectos generales del TEA	3
b) Targets biológicos potenciales para el TEA	5
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	7
MARCO TEORICO	
a) Aspectos generales de los canales TRPC.....	8
b) Estructura del TRPC6	9
c) Moléculas antagonistas al TRPC6	12
d) Moléculas agonistas al TRPC6.....	14
e) Contexto de la metodología QSAR	16
METODOLOGIA	18
RESULTADOS	21
DISCUSION	
a) Descriptores.....	33
b) Ecuaciones QSAR	37
c) Diseño molecular.....	38
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFIA	41
ANEXO	44

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS	
Figura N°1 - Mecanismos involucrados de la actividad de los canales TRPC.....	8
Figura N°2 - Mapa Cryo-EM de estructura del canal TRPC6 y su visión paralela a la membrana.....	9
Figura N°3 - Estructura de una única subunidad de TRPC6.....	10
Figura N°4 - Vista superior del mapa Cryo-EM del canal TRPC6 de sus sitios activos conjunto a la presencia de lípidos	11
Figura N°5 - Estructura molecular de SAR7334	12
Figura N°6 - Estructura molecular de GSK2833503A	13
Figura N°7 - Estructura molecular general de las pirazolopirimidinas.....	14
Figura N°8 - Estructura molecular del Acido 20-Hidroxieicosatetraenoico	15
Figura N°9 - Estructura molecular de las moléculas GSK1702934A y M085.....	15
Figura N°10 - Histograma de las moléculas utilizadas para el QSAR	22
Figura N°11 - Grafico de pEC50 Predicho Promedio contra pEC50 Experimental..	31
Figura N°12 - Grafico de CLogP contra el aporte de lipófilia de la base de datos inicial	32
Figura N°13 - Tablas de valores estadísticos de las ecuaciones 11, 12, 34, 40.....	37
TABLAS	
Tabla N°1 - Estructura molecular de las moléculas utilizadas para la base de datos inicial junto a su valor de actividad biológica y su referencia asociada	20
Tabla N°2 - Base de datos inicial utilizada descrita a través de los efectos seleccionados para el uso del análisis QSAR.....	21
Tabla N°3 - Mejores Ecuaciones QSAR obtenidas a través del procedimiento y su valor de R ²	23
Tabla N°4 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 101-111	24
Tabla N°5 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 111'-122.....	25
Tabla N°6 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 122'-135.....	26
Tabla N°7 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 136-149.....	27
Tabla N°8 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 150-163.....	28
Tabla N°9 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 164-177.....	29
Tabla N°10 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 178-191	30
Tabla N°11 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 192-193	31

ABREVIATURAS Y/O SIGLAS

TEA: Trastorno del espectro autista

TDHA: Trastorno de déficit atencional humano

TAG: Trastorno de Ansiedad Generalizada

miRNA: Micro Ácidos Ribonucleicos

RNA: Ácido Ribonucleico

USA: *United States of America* (Estados Unidos de América)

TRPC6: *Transient Receptor Potential Channel 6*
(Canal Receptor Potencial Transitorio 6)

mGluR5: Receptor metabotrópico de glutamato tipo 5

GABA-R: Canales Gabaérgicos

PTPRD: *Protein Tyrosine 12 Phosphatase Receptor Type D*
(Proteína tirosina fosfatasa tipo receptor D)

VPA: Acido Valproico

5HT-R: Receptores de serotonina

trpy: *Transient Receptor Potential Channel Gamma*
(Canal Receptor Potencial Transitorio Gamma)

2D-QSAR: *Two-dimensional Quantitative Structure Activity Relationships*
(Relación de Estructura-Actividad Cuantitativa Bidimensional)

3D-QSAR: *Three-dimensional Quantitative Structure Activity Relationships*
(Relación de Estructura-Actividad Cuantitativa Tridimensional)

QSAR: *Quantitative Structure Activity Relationships*
(Relación de Estructura-Actividad Cuantitativa)

TRPC: Transient Receptor Potencial Channel
(Receptor Transitorio de Potencial Canónico)

DAG: Diacilglicerol

CTD: Capa de dominio citoplasmático

TMD: Capa de dominio transmembrana

PLC: Fosfolipasa-C

PIP3: Fosfatidil inositol (3,4,5)-trifosfato

Cryo-EM: *Cryogenic Electron Microscopy*
(Crio-microscopia electrónica)

PKC: Proteína quinasa C

IC₅₀: *Half maximal inhibitory concentration*
(Concentración Inhibitoria Media)

EC₅₀: *Half maximal effective concentration*
(Concentración Efectiva Media)

OAG: 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol

CoMFA: *Comparative molecular field analysis*
Análisis comparativo de campos moleculares

CLogP: *Calculated lipophilicity*
(Lipofilia Calculada)

CMR: *Coefficient of Molar Refractivity*
(Coeficiente de Refractivida Molar)

tPSA: *Topological Polar Surface Area*
(Área de Superficie Polar Topológica).

MLR: Multilinear Regression
(Regresión Multilineal General)

ABSTRACT

The Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder that currently affects 1% of the global population, a figure that has been steadily increasing over the years. This trend underscores the urgent need to optimize diagnostic and therapeutic approaches for this disorder. Since there is currently no effective treatment for ASD symptoms, the objective of this research was to develop a 2D-QSAR mathematical model to derive equations capable of predicting the biological activity of compounds based on an initial dataset of agonist molecules with experimental EC₅₀ values on the TRPC6 protein channel. The goal was to generate useful information to guide the molecular design of proposals that could have an excitatory effect on the channel, as some studies suggest that TRPC6 is a highly relevant target for mitigating the symptoms of ASD. The 2D-QSAR model generated in this study exhibited high statistical precision, achieving an R² value of 0.9909. A positive correlation was identified between increased biological activity and the following molecular features: a higher number of oxygen atoms, the presence of NH fragments, high molar refractivity, and the presence of esters. Consequently, designing drugs that enhance these characteristics could be beneficial for the research objective. Conversely, a negative correlation was observed between biological activity and the presence of sulfur, alcoholic OH fragments, and a high squared coefficient of lipophilicity. These components should therefore be avoided, as they reduce biological activity. This research presents statistically significant results regarding the generated mathematical model, as it maintains an X=Y trend when comparing experimental and predicted pEC₅₀ values. Furthermore, the study successfully proposed synthetically feasible compounds that align with the pharmacophoric cores identified in literature and avoid chiral centers. For future endeavors, the synthesis of some of the proposed compounds will be pursued, with subsequent testing on TRPC6 models and *Drosophila melanogaster* autism models.

KEYWORDS: 2D-QSAR, TRPC6, ASD, autism, Agonist, molecular design, pEC₅₀ Prom, AM-0883.

RESUMEN

El Trastorno del espectro autista (o TEA) es un trastorno del neurodesarrollo que afecta en la actualidad al 1% de la población mundial. Cifra que ha ido incrementando al paso de los años, razón por la cual ha nacido la necesidad de buscar optimizaciones a la hora de diagnosticar y tratar este trastorno. Debido a que actualmente no existe un tratamiento efectivo contra los síntomas del TEA, el objetivo de esta investigación ha sido generar un modelo matemático 2D-QSAR para así obtener ecuaciones capaces de predecir la actividad biológica de un compuesto desde una base de datos inicial compuesta por moléculas agonistas que tuvieran un valor de EC_{50} experimental en el canal proteico TRPC6, con la finalidad de generar información de utilidad para guiar el diseño de propuestas moleculares que podrían tener un efecto excitatorio del canal ya que algunas investigaciones proponen al TRPC6 como uno de los blancos de alto interés para reducir el efecto de los síntomas de este trastorno. El modelo 2D-QSAR generado, resultó tener una alta precisión estadística debido a que obtuvo un valor de $R^2=0,9909$. Se encontró una relación positiva entre el aumento de la actividad biológica y un mayor número de oxígenos, presencia de fragmentos de NH, una alta refractividad molar y presencia de Esteres por lo tanto se cree que diseñar fármacos que potencien estas características podría ser beneficioso para el objetivo de la investigación. Por otra parte, se encontró una relación negativa entre la actividad biológica y la presencia de azufre, presencia de fragmento de OH alcohólico y un alto valor del cuadrado del coeficiente de lipofilia, por lo que se recomienda evitar estos componentes ya que generan una disminución de la actividad biológica. Esta investigación presenta valores de alto interés estadístico respecto al modelo matemático generado ya que logra mantener la tendencia $X=Y$ en cuanto a los valores de pEC_{50} experimentales contra los valores de pEC_{50} predichos. Finalmente, gracias a la información recopilada y a los análisis realizados, se logró generar propuestas de factibilidad sintética, las cuales respetan los núcleos farmacóforos estudiados desde la bibliografía y que evitan los centros quirales. Para futuras proyecciones, se buscará sintetizar algunas de las propuestas estipuladas en esta investigación y probarlas en modelos de TRPC6 y modelos de autismo de *Drosophila m.*

PALABRAS CLAVE: 2D-QSAR, TRPC6, TEA, autismo, agonista, diseño molecular, pEC_{50} Prom, AM-0883.

INTRODUCCIÓN

a). Aspectos generales del TEA

El Trastorno del Espectro Autista (TEA), es un desorden del neurodesarrollo que provoca dificultades principalmente en el área de desarrollo social, comunicacional, sensorial y comportamiento de las personas quienes lo padecen, generando que este trastorno se suela diagnosticar en base a comportamientos del individuo [1]. El diagnóstico de este trastorno puede significar un desafío debido a la variabilidad en la expresión de este, impidiendo que exista algún algoritmo que permita sistematizar el diagnóstico de este desorden [2].

El diagnóstico del TEA puede existir en conjunto a otras condiciones secundarias de comportamiento y/u otros trastornos mentales tales como TDAH (Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad), Trastorno negativista desafiante, Fobia social, TAG (Trastorno de Ansiedad Generalizada) y Depresión [3]. Se han realizado estudios con la finalidad de encontrar algún biomarcador para el diagnóstico del TEA, y si bien existen algunas propuestas prometedoras con respecto a este tema, aún se está buscando una mayor cantidad de investigaciones en este área, ya que varias de estas publicaciones poseen una baja cantidad de población de análisis o una necesidad de un mayor estándar clínico, por lo que esta área de estudio ha estado en ascenso en los últimos años. Uno de los potenciales biomarcadores es medir los miRNA (micro RNA) que se encuentran en el cuerpo humano a través de la saliva, ya que varias investigaciones han demostrado que la presencia de algunos de estos fragmentos específicos de RNA están fuertemente implicados en el desarrollo del TEA.[4] También existen otros posibles biomarcadores tales como el "*Eye Tracking*", Pupilometría, análisis de metabolitos, entre otros [5-6]. Esta búsqueda de nuevos biomarcadores para el diagnóstico del TEA ha sido impulsada los últimos años porque se ha comprobado que una intervención temprana trae grandes beneficios, ya que puede reducir los síntomas y, en algunos casos, prevenir la manifestación completa del trastorno [7].

A nivel global, se estima que la prevalencia del TEA es del 1% en la población mundial. [8]. Cabe considerar que la prevalencia de este trastorno en el año 2020 en Estados Unidos es de 1 cada 36 niños de 8 años, cifra que registro un aumento del 317% desde el año 2000 donde la prevalencia era de 1:1000 [9]. Debido a este incremento

masivo es que se hace necesaria la investigación de nuevos fármacos para el tratamiento de esta condición o de sus comorbilidades asociadas.

En Chile, según el censo realizado el año 2017, de una población total de 17.574.003 habitantes, existiría un total de 175.740 personas que viven con este trastorno [10]. Si bien es cierto en nuestro país no existía históricamente un registro oficial sistemático de la prevalencia del autismo, no obstante, el año 2020 se estimó que el TEA en el país posee una prevalencia de 1:54 habitantes entre los 18 a 30 meses de vida con una relación de 4:1 entre niños y niñas [11]. Debido al gran impacto que ha tenido el TEA en los últimos años, en Chile el día 2 de marzo del 2023 se promulgo la ley 21.545 también conocida como "ley TEA", la cual "establece la promoción de la inclusión, la atención integral, y la protección de los derechos de las personas con trastorno del espectro autista en el ámbito social, de salud y educación" [12]. Por lo tanto, nuestro país no está muy alejado de la situación de USA, y sería por lo tanto de gran beneficio nacional contar con un arsenal de nuevos medicamentos contra el TEA.

Debido a la inexistencia de un biomarcador que permita detectar el TEA en el transcurso del desarrollo de un individuo, se han realizado varios estudios con el fin de generar algún cambio al respecto. Se cree que generando una clasificación en base al tipo de crecimiento físico y psicológico que un afectado pudiese tener, se podría investigar algún tipo de fármaco específico según si el estado del cerebro se ve afectado por un sobrecrecimiento o una disminución del desarrollo de este. Se sabe que el crecimiento anormal de un cerebro se relaciona con este trastorno debido a estudios experimentales con niños con TEA y modelos de ratones con el trastorno [13]. En la presente tesis abordamos una estrategia basada en ligandos, en que tomamos como base un potencial blanco terapéutico para el tratamiento del TEA, como lo es el Canal Receptor Potencial Transitorio 6 (TRPC6, de sus siglas en inglés *Transient Receptor Potential Channel 6*). A continuación, discutiremos los posibles targets biológicos presentes en la literatura actual para los cuales podrían diseñarse y sintetizarse prometedores fármacos.

b). Targets Biológicos Potenciales para el TEA

Existen varios targets biológicos potenciales para el tratamiento del TEA, siendo estos: el receptor metabotrópico de glutamato tipo 5 (mGluR5); los canales gabaérgicos (GABA-R); los receptores de serotonina (5HT-R), PTPRD; la proteína tirosina fosfatasa tipo receptor D (PTPRD, de sus siglas en inglés *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type D*) y el canal TRPC6, dentro de los más relevantes. El mGluR5 es un importante regulador de vías excitatorias e inhibitoras [14]. Este receptor proteico se ve expresado en gran cantidad dentro de las neuronas y se ve regulado por el glutamato intercelular [15], además algunas de sus expresiones atípicas y/o interrumpidas se asocian a diferentes condiciones neurológicas y psiquiátricas tales como epilepsia, ansiedad y autismo [14,16]. En una investigación, se utilizó un antagonista del mGluR5 en modelos de ratones con autismo por VPA (autismo inducido por ácido valproico) con comportamiento repetitivo (conocido como "movimiento estereotipado") con el fin de reducir este tipo de comportamiento en los animales, lo que demostró que el uso de antagonistas del mGluR5 podría reducir las acciones repetitivas relacionadas al autismo [16]. Con respecto al GABA-R, se ha encontrado evidencia de que una alteración en la señalización gabaérgica y un desbalance en la actividad excitatoria e inhibitora cerebral pueden generar algunos desórdenes del neuro-desarrollo, incluidos en estos el TEA [17-19]. Esto se ve reforzado por el hecho que niños autistas experimentan trastornos del sueño, lo que se puede tratar con el uso de fármacos agonistas alostéricos de los canales de GABA como las benzodiazepinas. Sobre los receptores de serotonina (5HT-R), se ha encontrado que este conjunto de receptores posee un amplio espectro de posibles agonistas y antagonistas los cuales han mostrado disminuir el comportamiento autista estereotipado y mejorar las interacciones sociales, demostrando así que poseen potencial para tratar las principales comorbilidades del TEA [20]. Dentro de los receptores serotoninérgicos que más llaman la atención hoy en este sentido se encuentran los subtipos 5-HT6 y 5-HT7. En el caso del receptor PTPRD, se hallaron múltiples genes que tienen implicancia en el TDAH conjunto a otros desordenes y trastornos, siendo algunos de estos esquizofrenia, síndrome de Tourette, autismo [21]. La Proteína PTPRD y el autismo se ven relacionados ya que algunas de las eliminaciones homocigotas de genes que se ven en el gen del PTPRD están relacionadas con retardo mental y conductas autistas [22]. En cuanto al canal TRPC6, se ha encontrado que tratar con hiperforina (un agonista del canal) a moscas de la

fruta con el gen *trpy* mutado (gen de mayor similitud al TRPC6 presente en humanos) disminuía los déficits que existían en el comportamiento de estas moscas (movimiento estereotipado excesivo) [23]. Esta evidencia experimental fue encontrada por investigadores del proyecto Fondecyt regular que ha financiado la presente tesis. A esto se suma el hecho que existen muy pocas moléculas capaces de regular el TRPC6, comparado con otros targets como los canales gabaérgicos o los receptores de serotonina, lo que nos permite dejar una contribución en el diseño de compuestos agonistas para TRPC6. Cabe señalar además que el canal TRPC6 presenta dos sitios de unión para ligandos, uno para agonistas y otro para antagonistas, por este motivo la probabilidad de obtener moléculas con un perfil más bien agonista que antagonista se incrementa. Por todas estas razones es que emprendimos la búsqueda y diseño de nuevas moléculas para TRPC6 de tipo agonista como potenciales agentes para el tratamiento de los desórdenes de espectro autista.

HIPOTESIS

Es posible hallar relaciones cuantitativas de estructura actividad para ligandos agonistas de TRPC6 reportados en literatura mediante técnicas 2D-QSAR como análisis de Free-Wilson y correlaciones de Hansch. La actividad biológica de los compuestos dependerá de las propiedades estéricas, electrostáticas y de hidrofobicidad, así como de la presencia o ausencia de determinados fragmentos dentro de la estructura química.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Obtener ecuaciones QSAR estadísticamente significativas para el diseño de nuevos compuestos con potencial actividad agonista de TRPC6 como potenciales fármacos para el tratamiento del Autismo.

Objetivos específicos:

- Definir descriptores estéricos, electrostáticos y estructurales para la realización de una base de datos que permita ejecutar un cálculo del tipo QSAR.
- Analizar los valores estadísticos obtenidos de las ecuaciones QSAR y comprobar que estos cumplan los parámetros estadísticos correspondientes para validar el modelo matemático.
- Diseñar propuestas moleculares en base a las ecuaciones QSAR obtenidas a través del modelamiento matemático que presenten un incremento en la actividad biológica.

MARCO TEORICO

a). Aspectos generales de los canales TRPC

Los canales TRPC (Receptor Transitorio de Potencial Canónico) son una familia de canales proteicos catiónicos permeables a los iones de Ca^{2+} y en menor medida a Na^+ , pertenecientes a la familia TRP de canales catiónicos, originalmente encontrados en *Drosophila melanogaster* [24]. Estos canales se expresan en diversos tipos de células y se activan por el agotamiento de las reservas intracelulares de Ca^{2+} o por moléculas agonistas de los receptores de la proteína G heterotrimérica [25]. Dentro de esta familia existen 7 miembros denominados TRPC1-7, los cuales se subdividen en 4 grupos: TRPC1, TRPC2, TRPC4/5 y TRPC3/6/7 [24]. El TRPC1 suele considerarse muy similar a los TRPC4/5, mientras que el canal TRPC2 no se ve expresado en humanos [26]. Respecto los canales TRPC3/6/7, son 75% idénticos, poseen relativamente baja selectividad para Ca^{2+} y Na^+ , son sensibles al Ca^{2+} intracelular y son activados por diacilglicerol (DAG) [26]. El TRPC6 y su familia comparten, dos capas en su estructura que se denominan la capa de dominio citoplasmático (CTD) y la capa de dominio transmembrana (TMD) [27].

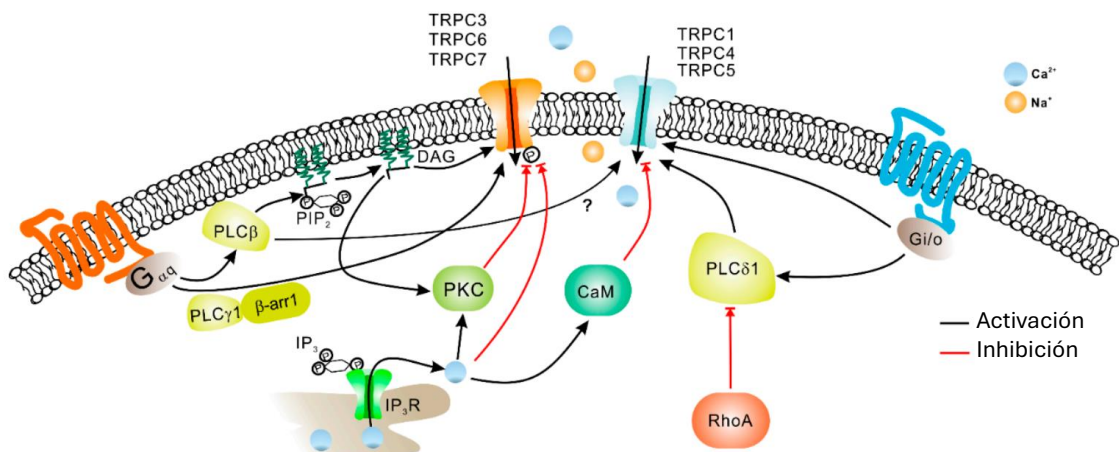


Figura N° 1 – Mecanismos involucrados de la actividad de los canales TRPC: La regulación de la actividad de los canales TRPC involucra múltiples mecanismos, entre ellos la activación de receptores acoplados a proteínas G $\alpha_q/11$, que desencadena la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) a través de la fosfolipasa C (PLC), generando inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). **Adaptado desde** [24]

b). Estructura del TRPC6

El TRPC6 es un canal catiónico no selectivo que se expresa en células del sistema inmune, glóbulos rojos, en el riñón, músculos lisos y el cerebro [28]. El mecanismo más estudiado de este canal es su activación directa por DAG y sus análogos sintéticos independiente de fosfolipasa-C (PLC) [29]. Otros mecanismos de modulación incluyen la acción del fosfatidil inositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), que es capaz de regular directamente la actividad de este canal proteico mediante la modulación de su tráfico y su inserción en la membrana plasmática, así como a través de la regulación dependiente del ion Ca^{2+} /Calmodulina. [30,31].

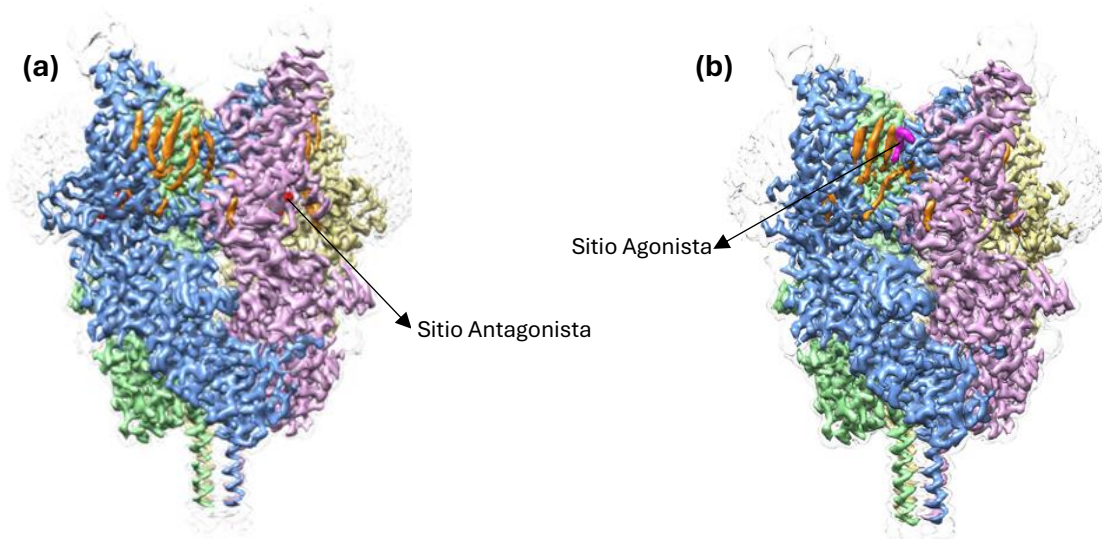


Figura N° 2 – Mapa Cryo-EM de estructura del canal TRPC6 y su visión paralela a la membrana: (a) Sitio antagonista (Color Rojo). (b) Sitio agonista (Color Magenta). **Adaptado desde** [32]

El TRPC6 desempeña un papel crucial en la regulación de la homeostasis del calcio intracelular. Pertenece a la familia de los canales de potencial receptor transitorio (TRP), específicamente al subgrupo de los canales TRPC (canónicos) [33]. Su estructura proteica se caracteriza por la formación de un homotetrámero, es decir, un complejo compuesto por cuatro subunidades idénticas que atraviesan la membrana plasmática. Cada subunidad posee seis segmentos transmembrana (S1-S6), con un poro entre los segmentos S5 y S6 que permite el paso de iones. Además, en la región citoplasmática, TRPC6 contiene cuatro repeticiones de anquirina, que son motivos estructurales implicados en interacciones proteína-proteína y en la estabilización del canal en la membrana celular [34].

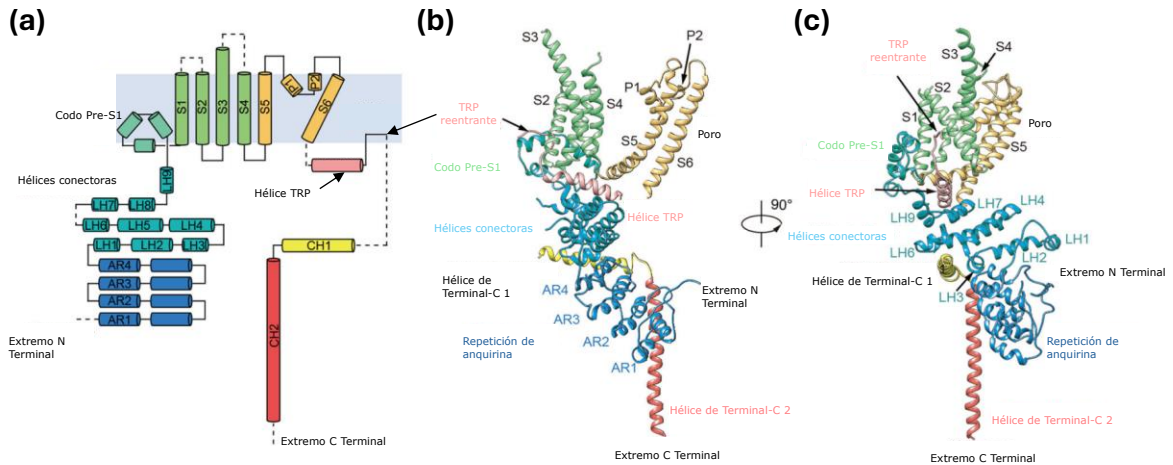


Figura N° 3 – Estructura de una única subunidad de TRPC6: (a) Topología y organización de dominio de un TRPC6 humano. Las hélices alfas son mostradas como cilindros. Las líneas punteadas representan regiones flexibles. (b) y (c) Diagrama de listón de dos vistas diferentes de una subunidad de TRPC6 manteniendo el código de colores de (a). **Adaptado desde** [33]

Funcionalmente, TRPC6 se activa principalmente por diacilglicerol (DAG), un segundo mensajero producido tras la estimulación de receptores acoplados a proteínas G que activan la fosfolipasa C. A diferencia de otros canales que requieren la participación de la proteína quinasa C (PKC) para su activación, TRPC6 puede ser activado directamente por DAG de manera independiente de PKC [34].

Una vez activado, TRPC6 permite la entrada de cationes, especialmente calcio (Ca^{2+}) y sodio (Na^+), lo que conduce a la despolarización de la membrana y a la activación de diversas vías de señalización intracelular. Es importante destacar que, aunque TRPC6 es un canal no selectivo, exhibe una mayor permeabilidad al calcio en comparación con el sodio, con una relación de permeabilidad $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ de aproximadamente 6:1 [33].

En cuanto a las zonas de unión para agonistas y antagonistas, estudios de criomicroscopía electrónica (Cryo-EM) han proporcionado información detallada sobre los sitios específicos en TRPC6. Por ejemplo, se ha identificado que el inhibidor de alta afinidad BTDM se une en una cavidad localizada entre las hélices transmembrana, estabilizando el canal en una conformación cerrada [33]. Asimismo, se han determinado las estructuras de TRPC6 en complejos con agonistas y antagonistas, lo que ha permitido mapear los sitios de unión y entender los mecanismos de modulación farmacológica del canal [32]. El hecho que posea dos cavidades distintas, tanto para agonistas como antagonistas, hace a este canal muy atractivo para el

diseño de fármacos altamente selectivos y, por lo tanto, con menores efectos adversos.

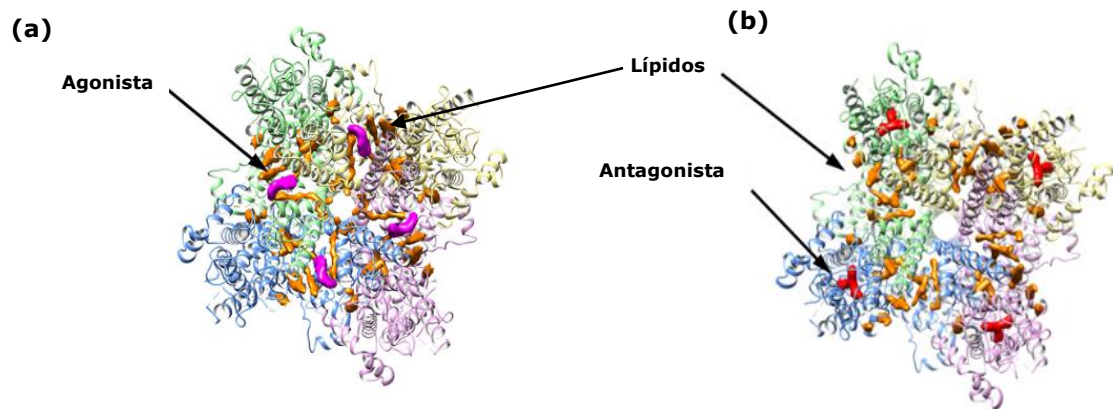


Figura N° 4 – Vista superior del mapa Cryo-EM del canal TRPC6 de sus sitios activos conjunto a la presencia de lípidos (color naranja) (a) Sitio activo agonista (color magenta) (b) Sitio activo antagonista (color rojo). **Adaptado desde** [32]

esta proteína se han asociado con enfermedades como la glomeruloesclerosis segmentaria focal tipo 2 [34]. La disfunción de TRPC6 se ha implicado en diversas patologías, incluyendo trastornos cardiovasculares y renales. Por ejemplo, se ha observado que TRPC6 desempeña un papel en los trastornos tubulares renales, como la lesión renal aguda y la fibrosis intersticial renal [35]. Además, se ha encontrado que TRPC6 puede atenuar la lesión renal inducida por isquemia-reperfusión al promover la afluencia de zinc y la autofagia [36]. Por ello, la comprensión detallada de su estructura y de los sitios de unión para moduladores farmacológicos es esencial para el desarrollo de terapias dirigidas que puedan corregir o mitigar las alteraciones funcionales asociadas con este canal. A continuación, presentaremos los compuestos antagonistas y agonistas que se han reportado para este canal.

c). Moléculas Antagonistas al TRPC6

La modulación del canal iónico TRPC6 mediante antagonistas específicos ha emergido como una estrategia terapéutica prometedora en diversas patologías. A continuación, se detallan dos antagonistas de TRPC6, sus efectos sobre este canal y su relevancia en estudios recientes:

- i. **SAR7334**: Este compuesto es un inhibidor potente y selectivo de TRPC6, con una IC_{50} de 7.9 nM. SAR7334 ha demostrado eficacia en la reducción de la entrada de calcio mediada por TRPC6 en células musculares lisas vasculares, lo que sugiere su potencial en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares asociadas con la hiperactividad de TRPC6. En modelos animales, SAR7334 ha mostrado disminuir la presión arterial en casos de hipertensión inducida, indicando su posible aplicación en terapias antihipertensivas. [37]

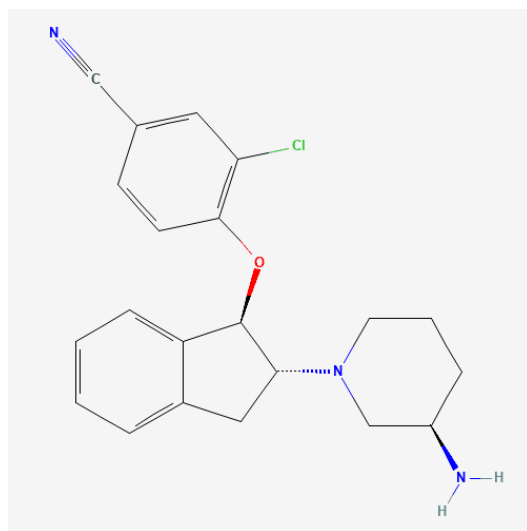


Figura N° 5 – Estructura molecular de SAR7334. Imagen obtenida desde PubChem.

- ii. **GSK2833503A** : Es un antagonista selectivo de los canales TRPC3 y TRPC6 que ha sido evaluado en diversos modelos patológicos. Aunque su uso ha sido ampliamente documentado en enfermedades renales, también se ha investigado su eficacia en patologías cardíacas, en donde se demostró que GSK2833503A inhibe la señalización hipertrofia en miocitos cardíacos adultos inducida por angiotensina II y endotelina-1. Además, en modelos murinos sometidos a sobrecarga de presión, la administración de este compuesto

mostró efectos anti-fibróticos, sugiriendo su potencial terapéutico en enfermedades cardíacas asociadas con la activación de TRPC6. Estos hallazgos indican que GSK2833503A podría ser una herramienta valiosa para modular la actividad de TRPC6 en contextos patológicos más allá de las enfermedades renales, abriendo la posibilidad de su aplicación en el tratamiento de condiciones cardíacas donde TRPC6 desempeña un papel crucial.[38]

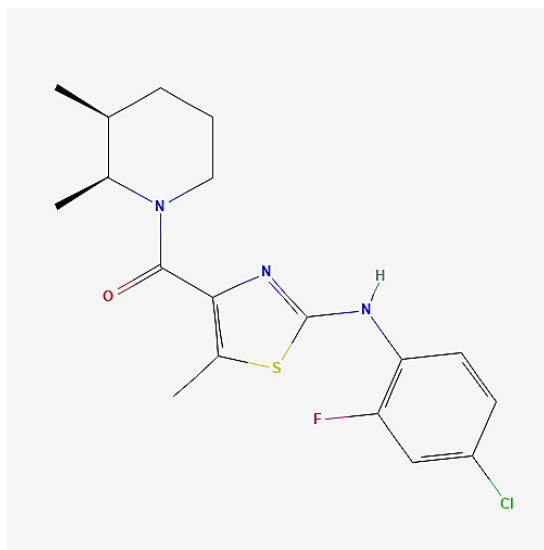


Figura N° 6 – Estructura molecular de GSK2833503A. Imagen obtenida desde PubChem.

La investigación sobre estos antagonistas ha proporcionado información valiosa sobre la fisiología de TRPC6 y su implicación en diversas enfermedades. La modulación de TRPC6 mediante estos compuestos ofrece perspectivas prometedoras para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a condiciones patológicas donde TRPC6 desempeña un papel crucial.

d). Moléculas Agonistas del TRPC6.

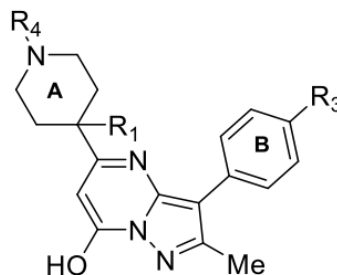
La activación de TRPC6 puede ser modulada por diversas moléculas agonistas que se unen a sitios específicos en la estructura del canal, induciendo cambios conformacionales que permiten el flujo de iones a través de la membrana plasmática.

Los sitios activos para la unión de agonistas en TRPC6 se han identificado principalmente en la interfaz entre los segmentos transmembrana S6 y la hélice del poro (PH). Estudios de mutagénesis y modelado molecular han revelado que existen interacciones hidrofóbicas con Phe675, y Trp680 en la hélice del poro, e interacciona con Tyr705, Val706 y Val710 en la zona S6 [39].

Diversas moléculas han sido identificadas como agonistas de TRPC6, interactuando con los sitios activos mencionados y modulando la actividad del canal. A continuación, se detallan algunos de estos agonistas:

- i. **Diacilglicerol (DAG) y derivados:** TRPC6 puede ser activado directamente por diacilglicerol (DAG) de manera independiente de la proteína quinasa C (PKC). Este mecanismo de activación es compartido con los canales TRPC3 y TRPC7, que son altamente homólogos a TRPC6 [32]. Derivados sintéticos de DAG, como el 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol (OAG), también pueden activar TRPC6, aunque no son selectivos y pueden activar otros canales relacionados.
- ii. **Compuestos de pirazolopirimidina:** A través de una estrategia de cribado de alto rendimiento, se identificaron compuestos con un esqueleto de pirazolopirimidina como agonistas de TRPC6. Algunos de estos compuestos mostraron una activación potente y selectiva de los canales TRPC3/6/7, con valores de EC_{50} inferiores a 20 nM para TRPC6. Es importante destacar que estos compuestos no exhibieron actividad estimuladora en otros canales TRP relacionados, (exceptuando el canal TRPC3) lo que sugiere una alta selectividad [41].

Figura N° 7 – Estructura molecular general de las pirazolopirimidinas.
Adaptada desde [28]



- iii. **Ácido 20-Hidroxieicosatetraenoico (20-HETE):** Este ácido araquidónico ha sido identificado como un activador de TRPC6. La aplicación de 20-HETE induce una corriente de cationes no selectiva en células que sobre expresan TRPC6, aumentando la probabilidad de apertura del canal de manera dependiente de la membrana. Este efecto es específico para TRPC6 y no provoca cambios en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , lo que indica un mecanismo de activación distinto [39].

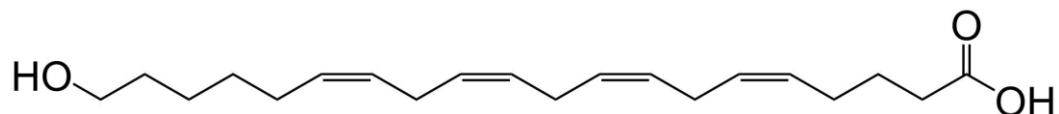


Figura N° 8 – Estructura molecular del Acido 20-Hidroxieicosatetraenoico.

Imagen generada por ChemDraw.

- iv. **GSK1702934A y M085:** GSK1702934A y M085 son agonistas que activan el canal TRPC6 mediante unión a un sitio ortostérico extracelular, formado por la hélice del poro (PH) y la hélice transmembrana S6. Este sitio incluye residuos clave como W680, E672, N702 y Y705, cuya mutación reduce significativamente la afinidad y la eficacia de estos agonistas. GSK1702934A muestra un EC_{50} de $0.78 \mu\text{M}$, mientras que M085 tiene un EC_{50} de $3.80 \mu\text{M}$, destacando una mayor afinidad del primero. Ambos compuestos actúan desde el exterior celular, como lo demuestran ensayos de parche macro "inside-out" y "outside-out", sin requerir permeabilidad celular [41].

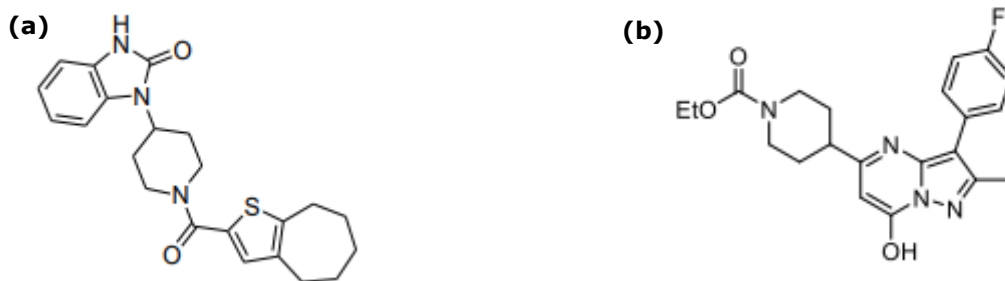


Figura N° 9 – Estructura molecular de las moléculas (a) GSK1702934A y (b) M085. Adaptada desde [31].

La activación de TRPC6 por agonistas implica cambios conformacionales que permiten el flujo de cationes a través del canal. La unión de agonistas en los sitios activos, como la interfaz entre S6 y la hélice del poro, induce una apertura del poro del canal, facilitando la entrada de Ca^{2+} y Na^+ en la célula. Este proceso es crucial para la transducción de señales y la regulación de diversas funciones celulares y neurales que

podrían ser altamente beneficiosas en los trastornos de espectro autista [32,39-42]. En base a lo anterior, nuestra meta en la presente tesis es la recopilación de todas las moléculas agonistas disponibles en literatura para crear varias ecuaciones matemáticas que permitan el diseño de potenciales fármacos, a través de la metodología QSAR, la cual describimos en la siguiente sección.

e). Contexto de la metodología QSAR

La metodología de Relaciones de Estructura-Actividad cuantitativas (QSAR, por sus siglas en inglés *quantitative structure activity relationships*) es una herramienta fundamental en el diseño moderno de fármacos. Esta técnica establece correlaciones matemáticas entre propiedades físico-químicas, estructurales y electrónicas de los compuestos y sus actividades biológicas, permitiendo predecir el comportamiento de moléculas similares [43]. Desde los años 60, los métodos clásicos de QSAR, como el análisis de Hansch y el modelo de Free-Wilson, han demostrado su utilidad al asociar propiedades moleculares como la lipofilia (o hidrofobicidad), la polarizabilidad y las características electrónicas con afinidades de unión o constantes de inhibición [43,44]. Por ejemplo, el modelo de Hansch integra parámetros como la constante de partición octanol/agua para representar la relación entre lipofilia y la actividad biológica, mientras que el modelo de Free-Wilson utiliza características estructurales específicas como variables binarias para describir la actividad biológica de un conjunto de compuestos [44].

Del mismo modo, los enfoques tridimensionales (3D-QSAR), como el Análisis Comparativo de Campos Moleculares (CoMFA), han evolucionado para incorporar conformaciones bioactivas y modos de unión tridimensionales, logrando así una descripción más precisa de las interacciones ligando-receptor. Este enfoque utiliza campos energéticos para mapear regiones espaciales que favorecen o desfavorecen la interacción, contribuyendo significativamente al diseño de moléculas con propiedades óptimas [43,44]. No obstante, hoy en día se ha vuelto a los métodos clásicos de tipo 2D-QSAR debido a que los métodos 3D tienen que presuponer una conformación activa tridimensional para cada molécula, además que no son tan fácilmente reproducibles como los modelos 2D. Es por ello que nosotros hemos optado por una estrategia de alta reproducibilidad y capacidad de expansión (en la medida

que se descubran nuevas moléculas), como es una estrategia combinada de análisis de Hansch y de Free-Wilson.

En el diseño de fármacos, QSAR no solo optimiza propiedades moleculares que afectan la biodisponibilidad, afinidad y selectividad de los compuestos hacia sus objetivos biológicos, sino que también identifica regiones críticas del farmacóforo para la actividad biológica. Adicionalmente, permite predecir la toxicidad potencial de nuevas moléculas, lo que es crucial para priorizar candidatos en las etapas iniciales del descubrimiento de fármacos [44,45]. Este enfoque ayuda a reducir costos y acelerar el desarrollo de medicamentos específicos. Por ejemplo, mediante la implementación de modelos QSAR validados, se han derivado ecuaciones predictivas que correlacionan parámetros como la energía de los orbitales frontera (HOMO/LUMO) y descriptores químicos con la actividad biológica. Estas correlaciones han sido fundamentales en la generación de compuestos con propiedades deseadas, como una mayor afinidad y menor toxicidad [45].

En conjunto, la integración de modelos QSAR en el diseño de fármacos ha evolucionado desde técnicas lineales hacia enfoques avanzados que combinan herramientas computacionales modernas como el aprendizaje automático y la selección automatizada de descriptores moleculares. Esto permite construir modelos robustos que mejoran la capacidad predictiva, reducen el riesgo de sobreajuste y maximizan la eficacia en la selección de compuestos prometedores [45]. Nuestro enfoque basado en los métodos clásicos de tipo 2D se centra en el descubrimiento de ecuaciones mediante métodos de regresión multilínea exhaustivos, los que detallamos en el siguiente apartado metodológico.

METODOLOGIA

Inicialmente, se compiló una base de datos basada en todos los estudios disponibles a la fecha sobre agonistas del canal TRPC6. De esta base de datos, se obtuvieron 10 moléculas con potencial agonista para activar este canal proteico. Se tabularon datos de EC₅₀ experimental (Concentración Efectiva del 50%, esto es: la concentración molar necesaria del compuesto para producir una activación del 50% del canal), junto a valores de CLogP (Lipofilia Calculada), CMR (Coeficiente de Refractividad Molar), tPSA (Área de Superficie Polar Topológica), todos los cuales se obtuvieron utilizando el software ChemDraw V17.0.0.206. El valor de EC₅₀ de actividad biológica fue convertido a pEC₅₀, donde $pX = -\log X$. Esta conversión se hace necesaria dado que en todo análisis QSAR la actividad biológica corresponde a la variable dependiente, y el presupuesto de estas formulaciones es que la actividad seguirá una distribución logarítmica respecto los descriptores fisicoquímicos o estructurales de cada compuesto (variables independientes).

Se definieron varios descriptores estructurales para las moléculas seleccionadas con el fin de identificar las características más importantes y así poder hallar una correlación multilineal con los valores de EC₅₀ de cada compuesto. Los descriptores estructurales de tipo Free-Wilson considerados fueron:

- Número de Oxígenos (nO)
- OH alcohólicos (OH-ol)
- Número de Carbonilos (nC=O)
- Presencia de Ácido Carboxílico (COOH)
- Presencia de Éster (Ester)
- Número de Éter (nEter)
- Número de Nitrógenos de hibridación sp² (nNsp²)
- Número de Metil (nMetil)
- Número de Etil (nEtil)
- Número de enlaces pi (n en π)
- Presencia de NH (NH)
- Número de Flúor (nF)
- Número de Cloro (nCl)
- Presencia de Bromo (Br)
- Presencia de Azufre (S)

Estos descriptores fueron escogidos basados en los criterios de a) consistencia lógica estructural: esto es, tras una inspección visual de la base de datos, determinar qué fragmentos están presentes en los compuestos (en al menos una molécula en cada caso), y b) criterios electrónicos: o sea incorporar variables electrónicas que son claves en la interacción fármaco receptor, como la hibridación atómica y el grado de aromaticidad o enlaces pi.

Los datos recopilados se ingresaron en el programa STATISTICA para realizar una Regresión Multilineal General (MLR) con el objetivo de encontrar correlaciones entre el valor de la actividad biológica (EC_{50}) y los descriptores de la estructura molecular. Cabe señalar que los valores de CLogP y CMR se elevaron al cuadrado para capturar posibles efectos no lineales. Esto es habitual en la búsqueda de ecuaciones de tipo QSAR, pues de acuerdo con los postulados de Hansch la actividad biológica sigue una tendencia parabólica negativa respecto la hidrofobicidad.

Se generaron 191 ecuaciones del tipo "*Best Subset*", de las cuales se seleccionaron 40 para un análisis más detallado considerando que estas ecuaciones tuvieran un R^2 entre 0,9 a 0,8. Estas ecuaciones fueron elegidas por la cantidad de efectos (coeficientes de las variables independientes) que podían presentar, seleccionándose aquellas con 3 a 6 descriptores utilizados por ecuación. En términos generales se prefieren las ecuaciones con una menor número de descriptores dado que: a) se busca de este modo evitar el sobreajuste, y b) son más fácil de explicar y comprender la correlación de un descriptor con otro.

Se analizaron las ecuaciones seleccionadas de manera individual utilizando la opción "*All Effects*" de STATISTICA. Cada ecuación utilizó diferentes efectos o descriptores para calcular teóricamente la actividad biológica, permitiendo generar un modelo matemático capaz de predecir la actividad biológica (expresada como $pEC_{50} = -\log EC_{50}$) de un compuesto basado en su estructura. De las 40 ecuaciones filtradas, se seleccionaron 16 ecuaciones que cumplieran con los parámetros estadísticos correspondientes, o sea un valor de r^2 superior a 0.8, y que además cada coeficiente, incluyendo el intercepto, tuviesen un $p < 0.05$.

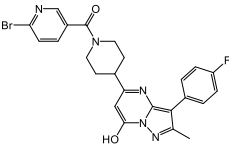
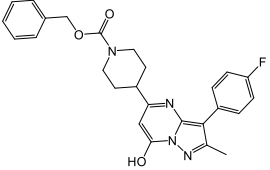
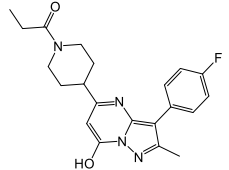
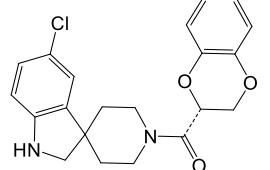
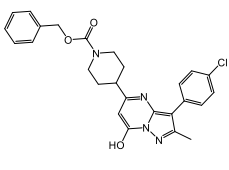
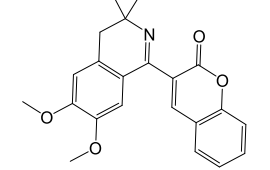
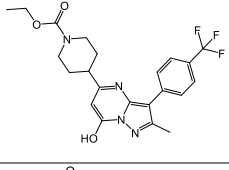
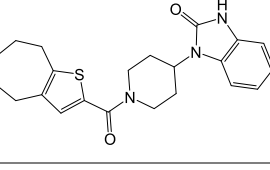
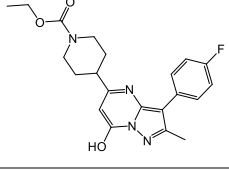
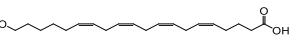
Las 16 ecuaciones seleccionadas se utilizaron para calcular el EC_{50} de las moléculas originales de la base de datos. Con el objetivo de medir la precisión del método, se realizó una regresión lineal entre el valor de pEC_{50} Experimental ($pEC_{50}Exp$) versus el

valor de pEC₅₀ Predictivo (pEC₅₀Pred). Gracias a este análisis es posible determinar los residuales (Res = pEC₅₀Exp - pEC₅₀Pred), y evaluar la desviación del modelo de la recta ideal Y = X.

Finalmente, se creó una tabla con las 16 ecuaciones seleccionadas para identificar los descriptores que contribuyen más a un mayor pEC₅₀ promedio. Esta información se utilizó para guiar el diseño molecular inteligente de nuevos agonistas potenciales para el canal TRPC6, optimizando así la efectividad de los compuestos diseñados.

A continuación, se adjuntan las 10 moléculas utilizadas para la base de datos inicial:

Tabla N° 1 - Estructura molecular de las moléculas utilizadas para la base de datos inicial junto a su valor de actividad biológica y su referencia asociada

N°	Estructura	EC ₅₀ [μM]	Ref.	N°	Estructura	EC ₅₀ [μM]	Ref.
001		12,3	[40]	006		3,91	[40]
002		28,8	[40]	007		0,090	[32]
003		7,79	[40]	008		2,37	[42]
004		1,39	[40]	009		0,78	[41]
005		4,66	[40]	010		0,8	[39]

RESULTADOS

A continuación, se presentaran los resultados obtenidos a lo largo de la investigación.

Tabla N° 2- Base de datos inicial utilizada descrita a través de los efectos seleccionados para el uso del análisis QSAR

N°	pEC ₅₀	CLogP	CLogP ²	CMR	CMR ²	tPSA	nO	OH-ol	n C=O	COOH	Ester	n Éter	n Nsp2	n Metil	n Etil	n en π	NH	nF	nCl	Br	S
001	4,91	3,67	13,46	12,61	159,12	80,86	2	1	1	0	0	0	5	1	0	11	0	1	0	1	0
002	4,54	2,58	6,65	10,46	109,51	68,50	2	1	1	0	0	0	4	1	1	8	0	1	0	0	0
003	5,11	6,69	44,73	13,14	172,69	77,73	3	1	1	0	1	0	4	1	0	11	0	0	1	0	0
004	5,86	4,97	24,70	11,11	123,49	77,73	3	1	1	0	1	0	4	1	1	8	0	3	0	0	0
005	5,33	4,23	17,89	10,62	112,74	77,73	3	1	1	0	1	0	4	1	1	8	0	1	0	0	0
006	5,41	6,12	37,43	12,67	160,41	77,73	3	1	1	0	1	0	4	1	0	11	0	1	0	0	0
007	7,04	3,68	13,51	10,41	108,42	50,80	3	0	1	0	0	2	2	0	0	7	1	0	1	0	0
008	5,63	3,13	9,83	10,39	108,01	57,12	4	0	1	0	1	2	1	4	0	9	0	0	0	0	0
009	6,11	4,00	15,99	11,28	127,23	52,65	2	0	2	0	0	0	3	0	0	7	1	0	0	0	1
010	6,10	5,41	29,21	9,69	93,97	57,53	3	1	1	1	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0

De la tabla 2 podemos ver que para cada compuesto se determinó un total de 20 descriptores (Xi) como variables independientes. Dentro de los descriptores tenemos valores continuos como la lipófilia, superficie polar y refractividad molar, así como valores discretos (Xi=1 o 0), los cuales describen la presencia (Xi=1) o ausencia (Xi=0) de determinados sustituyentes en la estructura molecular. Debido a que solo se contaba con un total de 10 compuestos no fue posible hacer una división del conjunto de compuestos en conjunto de entrenamiento, y conjunto de prueba. Además, el empleo de variable de tipo Free-Wilson se vería fuertemente desfavorecido al eliminar moléculas con fragmentos relevantes.

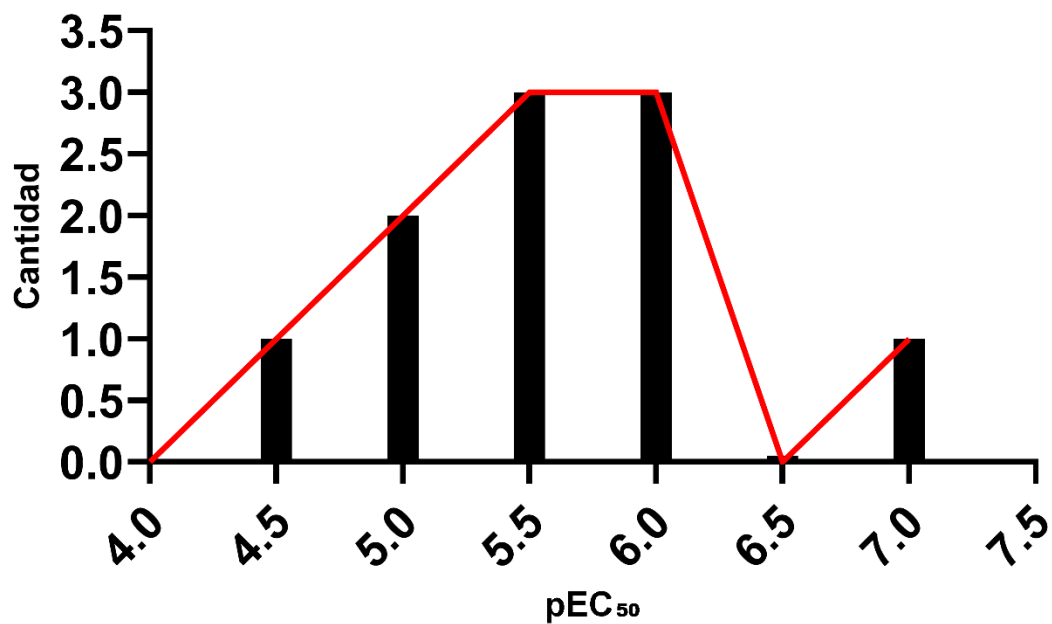


Figura N° 10 - Histograma de las moléculas utilizadas para el QSAR

La figura N°11 muestra el histograma de potencias. Como se aprecia en la imagen las 10 moléculas cubren un rango de 3 unidades logarítmicas, lo cual es bastante bueno en términos estadísticos para la obtención de ecuaciones con un mejor valor de R^2 . La mayoría de los compuestos, no obstante, están en el rango de 5 a 6 de pEC₅₀.

Tabla N°3 - Mejores Ecuaciones QSAR obtenidas a través del procedimiento y su valor de R².

N°	Int.	CLogP	CLogP ²	CMR	CMR ²	tPSA	nO	OH-ol	nC=O	COOH	Ester	nEter	nNsp ₂	nMetil	nEtil	nen π	NH	nF	nCl	Br	S	R ²	
1	-2,88	3,63	-0,37	0,77		-0,13									1,14						-1,62	0,9997	
2	-1,25	3,63	-0,37	0,77		-0,13			-1,62						1,14								0,9997
3	4,75						0,83	-1,14					-0,10	-0,59			0,25			0,47			0,9993
4	0,97					0,09							-0,72	0,07			2,98	0,25			-0,39		0,9993
5	1,36					0,09			-0,39				-0,72	0,07			2,98	0,25					0,9993
6	9,01									-2,91	0,82		-0,98	-0,81				0,25		1,34			0,9992
7	1,24					0,09		-0,26					-0,70				2,68	0,25			-0,40		0,9991
11	0,74					0,09						0,16	-0,71				2,65	0,25					0,9980
12	1,63					0,08							-0,68				2,73	0,25			-0,41		0,9917
13	2,04					0,08			-0,41				-0,68				2,73	0,25					0,9917
22	3,14						0,65			1,02							1,82	0,27					0,9724
31	4,60						0,80	-0,97						-0,54									0,9144
33	3,21						0,88							-0,29			1,18						0,8909
34	3,64						0,57			0,76							1,52						0,8815
37	5,77				0,04							0,71				-0,59							0,8454
40	4,73									1,37	0,74						1,85						0,8189

La tabla 3 muestra las mejores ecuaciones QSAR obtenidas. Se calcularon un total de 191 ecuaciones, pero acá se muestran las 16 ecuaciones finales de un total de 40 filtradas inicialmente. Se muestran los valores de los coeficientes para cada descriptor, así como el valor del intercepto en cada caso.

Tabla N°4 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 101-111

N°	Estructura	pEC ₅₀ Pred	N°	Estructura	pEC ₅₀ Pred
101		6,84	105		7,20
101'		6,68	106		6,46
102		6,98	107		7,09
103		7,00	108		4,74
104		7,13	109		7,21
104'		6,60	110		7,01
104'		6,80	111		6,59

Tabla N° 5 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 111'-122

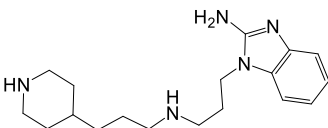
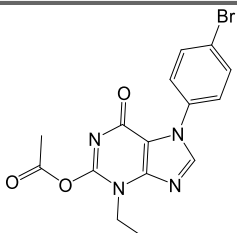
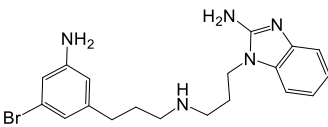
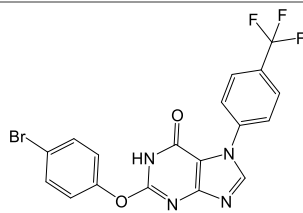
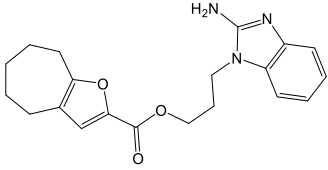
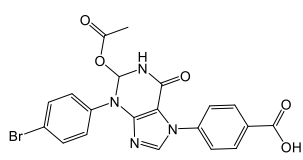
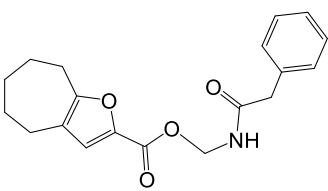
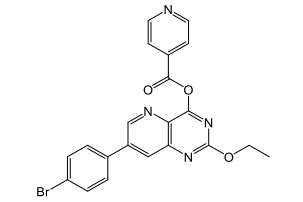
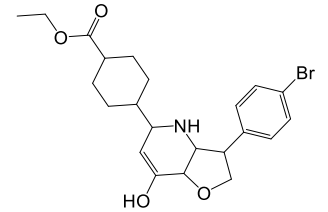
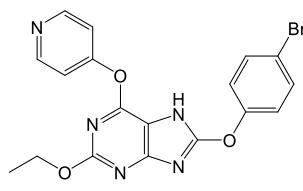
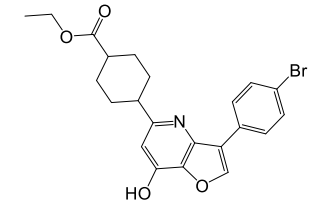
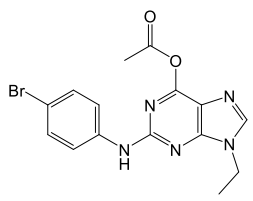
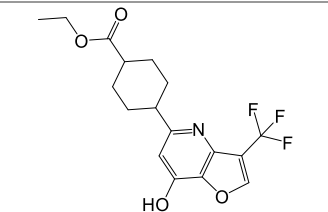
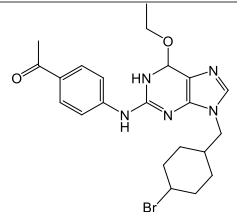
	Estructura	pEC₅₀Pred	N°	Estructura	pEC₅₀Pred
111'		5,81	116		4,67
111'		6,18	117		6,70
112		5,68	118		7,47
113		7,49	119		5,72
114		8,51	120		7,23
114'		8,32	121		6,08
115		6,56	122		6,61

Tabla N° 6 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 122'-135

N°	Estructura	pEC ₅₀ P. P.	N°	Estructura	pEC ₅₀ P.P.
122'		7,93	129		5,91
123		6,37	130		6,86
124		8,38	131		7,25
125		7,09	132		5,47
126		8,41	133		5,35
127		7,77	134		7,12
128		7,90	135		6,72

Tabla N° 7 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 136-149

N°	Estructura	pEC ₅₀ Pred	N°	Estructura	pEC ₅₀ Pred
136		5,93	143		7,08
137		7,50	144		6,01
138		6,75	145		6,28
139		5,18	146		6,38
140		5,26	147		6,11
141		7,50	148		7,63
142		7,43	149		7,96

Tabla N° 8 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 150-163

N°	Estructura	pEC ₅₀ Pred	N°	Estructura	pEC ₅₀ Pred
150		5,80	157		5,49
151		8,00	158		6,16
152		7,08	159		7,49
153		6,52	160		7,35
154		7,24	161		6,65
155		6,50	162		8,07
156		7,46	163		8,38

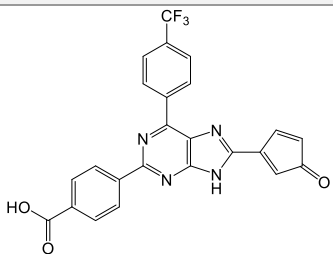
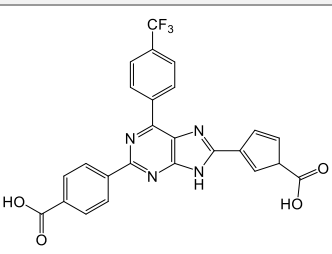
Tabla N°9 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 164-177

N°	Estructura	pEC ₅₀ Pred	N°	Estructura	pEC ₅₀ Pred
164		8,30	171		7,92
165		8,44	172		8,65
166		8,94	173		8,40
167		7,83	174		8,60
168		7,69	175		7,64
169		7,42	176		7,25
170		7,89	177		7,34

Tabla N°10 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado 178-191

N°	Estructura	pEC ₅₀ Pred	N°	Estructura	pEC ₅₀ Pred
178		6,84	185		8,29
179		8,06	186		7,04
180		8,69	187		8,80
181		8,75	188		8,15
182		9,17	189		7,82
183		8,91	190		7,30
184		7,96	191		8,46

Tabla N°11 - Propuestas Moleculares al modelo QSAR calculado (Parte 8 de 8)

N°	Estructura	pEC ₅₀ Pred	N°	Estructura	pEC ₅₀ Pred
192		7,30	193		8,03

A continuación, se presentaran algunos gráficos realizados con el software "GraphPad 8" con la información obtenida desde el modelo QSAR.

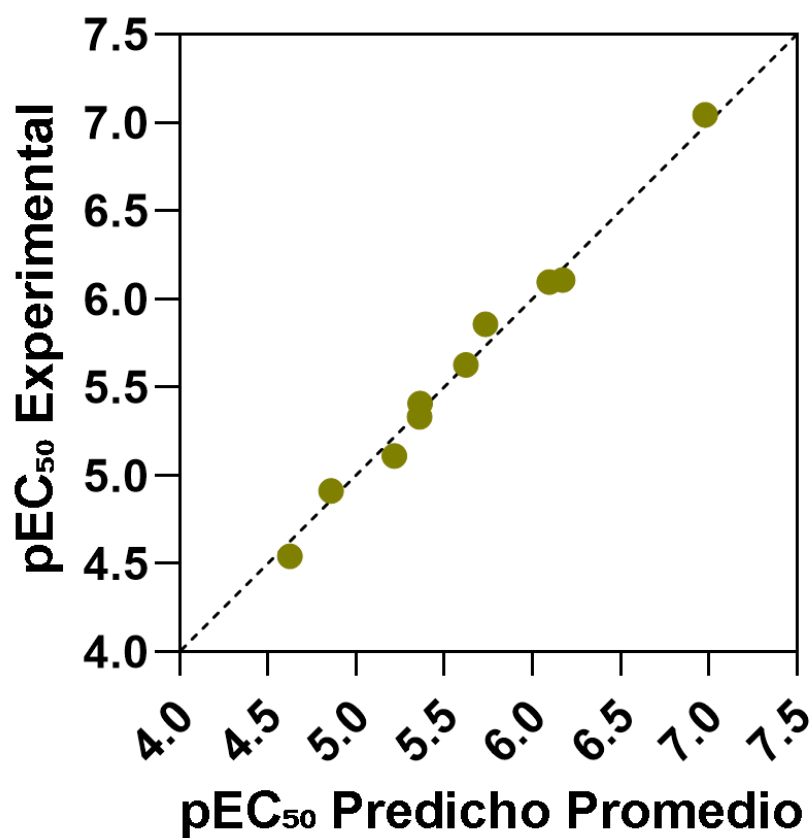


Figura N° 11 - Grafico de pEC₅₀ Predicho Promedio contra pEC₅₀ Experimental: R²=0,9909

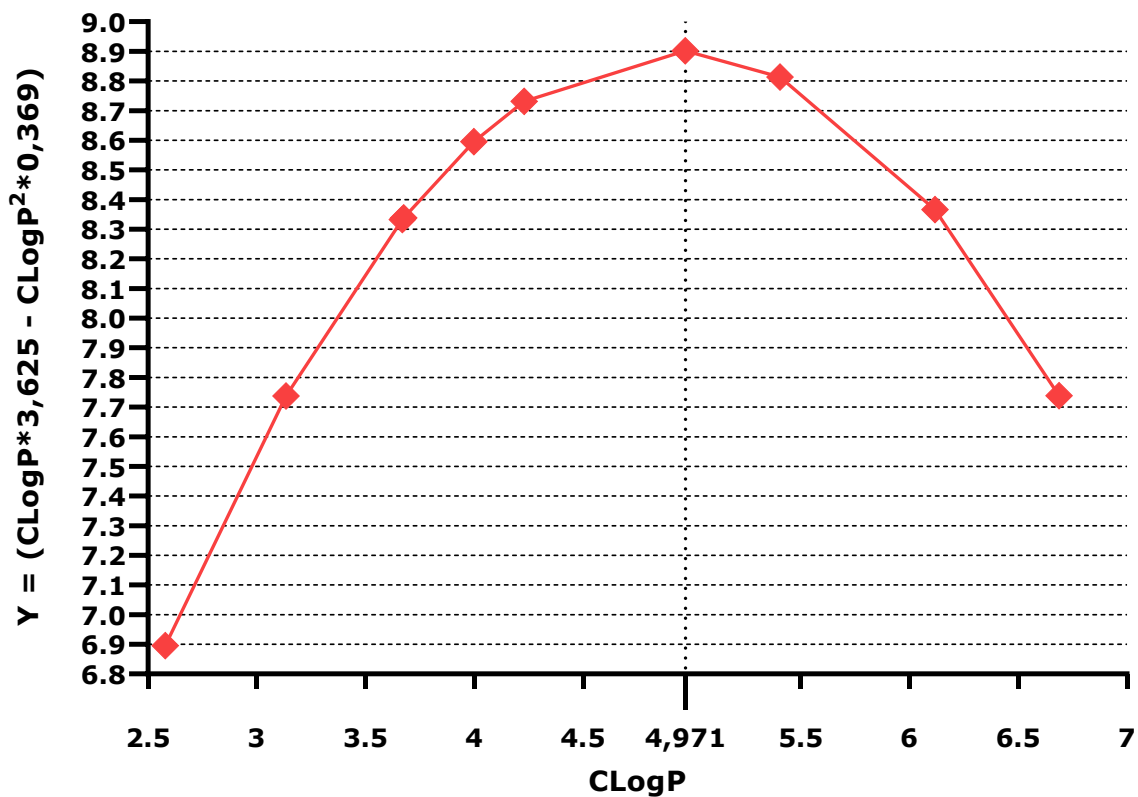


Figura N° 12 - Grafico de CLogP contra el aporte de lipófilia de la base de datos inicial: Calculo del valor de aporte límite de la lipófilia a la actividad biológica (expresado como $Y = ((CLogP * 3,625) + (CLogP^2 * (-0,369)))$), dando como resultado un valor de CLogP = 4,971 como el valor de mayor aporte a la ecuación. La intención de esta figura es mostrar el efecto cuadrático obtenido por las ecuaciones 1 y 2.

DISCUSION

a. Descriptores

Como se mencionó con anterioridad, se utilizaron los descriptores "CLogP", "CMR", "CLogp²" y "CMR²" con la finalidad de capturar posibles efectos no lineales respecto a la lipofilia y las propiedades fisicoquímicas, en cuanto a esto, una vez analizadas las ecuaciones utilizadas para el modelo QSAR, se apreció que en tan solo 3 ecuaciones de las 16 obtenidas, aparece al menos uno de los descriptores antes mencionados. Esto podría indicar una baja influencia de estos parámetros en el modelo final obtenido, además de que tan solo los indicadores "CLogP" y "CLogp²" aparecen juntos en solo dos ecuaciones, lo que sugiere que tan solo estos tengan repuesta no lineal relacionada a su efecto en el diseño molecular obteniendo un límite de optimización de 4,971 aproximadamente se muestra en la figura N°12. Respecto a los coeficientes "CMR" y "CMR²", estos no poseen ninguna ecuación en común en el modelo donde pueda verificarse el límite del efecto de la respuesta no lineal por lo que a la hora de realizar propuestas de diseños moleculares, se buscaba que este bordeara un valor de 13 para así no generar un aporte excesivo a la actividad por este descriptor y no superar con creces el valor más alto de CMR existente en la base de datos inicial.

Sobre el descriptor "tPSA", este tuvo una gran participación respecto a las ecuaciones de los modelos, estando presente en 8 de las 16 ecuaciones utilizadas, y al ser mayormente un aporte positivo a la actividad biológica según la información obtenida en el modelo, se buscó maximizar la actividad biológica considerando un valor de tPSA mayor.

Debido a que todas las moléculas de la base de datos poseían oxígeno en su composición molecular, se incluyeron 6 descriptores dedicados a este elemento, siendo estos "nO", "OH-ol", "nCarbonilo", "COOH", "Ester" y "nEter" con la finalidad de obtener un resultado más detallado sobre como este átomo se distribuía en la composición de las diversas moléculas y así poder considerar diferentes sustituyentes y sus cantidades según el resultado del modelo. Considerando que toda la base de datos presentaba oxígeno de manera global, se utilizó el descriptor "nO" para describir la cantidad exacta y así poder verificar que tan favorable era el añadir una mayor cantidad de estos en las nuevas propuestas, ante lo cual se puede notar un efecto positivo en la actividad biológica según el modelo, ya que todas las apariciones de este descriptor en las ecuaciones poseen un coeficiente positivo.

En relación con el descriptor "OH-ol", este buscaba determinar la presencia de un fragmento de OH alcohólico, el cual se diferenciaba de los ácidos carboxílicos y benzoicos para así dar más especificidad estructural al modelo QSAR. Este descriptor resultó en un resultado negativo de bajo aporte por lo que se evitó añadir fragmentos de OH alcohólico a los nuevos compuestos diseñados.

Sobre el "nCarbonilos", la idea principal era determinar la cantidad de oxígenos unidos por un doble enlace a un carbono y así tener información sobre el aporte que esta unión podría generar en la actividad biológica, el cual resultó tener un aporte negativo por lo que se evitó el uso de este sustituyente en las propuestas. Cabe considerar que dentro de este descriptor se consideró todo oxígeno que cumpliera con la descripción de un carbonilo, incluyendo aquellos que podrían formar parte de otros fragmentos.

Respecto al descriptor "COOH", se buscaba representar a través de este la presencia del fragmento de ácido carboxílico ya que una de las moléculas de la base de datos inicial presentaba este sustituyente. Debido a que un fragmento de ácido benzoico se compone de un anillo de benceno y un ácido carboxílico, se tomó la decisión de considerar la presencia de este último sustituyente a través del descriptor "COOH". Esto se realizó de esta manera debido a que no existe una molécula de la base inicial de datos que posea un ácido benzoico en su estructura molecular, ni tampoco se encontró en la bibliografía una molécula que poseyera un ácido benzoico en su estructura y tuviera un valor de actividad biológica medido de manera experimental. Esto último género que a lo largo de la fase del diseño molecular se comenzara a notar un aumento en el pEC₅₀Pred. en diseños que presentaban un sustituyente de ácido benzoico como una tendencia. Esto se puede verificar en el hecho de que entre los 10 diseños que presentan un mayor valor de pEC₅₀Pred al menos 5 presentan un ácido benzoico en su composición.

Sobre los descriptores "Ester" y "nEter", el primero buscaba describir la presencia o ausencia del grupo funcional Ester y el segundo, la cantidad de Éteres que pudieran existir en una molécula. Ambos descriptores generan un aporte positivo, aunque de baja participación en las ecuaciones, por lo que se buscó incluirlos según si se necesitaba aumentar el valor de otros parámetros tales como el CLogP, CMR, tPSA o número de oxígenos.

En el caso del "nNsp2", se utilizó este descriptor con la finalidad de expresar la cantidad exacta de Nitrógenos de hibridación sp² poseía cada molécula, ya que se notó que 9 de 10 moléculas de la base de datos inicial presentaban este átomo en su estructura molecular, misma razón por la cual se decidió mantener el diseño de las nuevas propuestas

en línea con esta tendencia incluyendo en su gran mayoría moléculas que presentaran nitrógenos sp^2 en su estructura molecular, a pesar de que este generara un efecto negativo en la actividad biológica. Similar a como se realizó con el descriptor del "nCarbonilos", este descriptor consideró todo nitrógeno que cumplirá con la hibridación descrita, sin importar si este se presentaba en otro descriptor. Debido a la presencia que tenía este elemento en la estructura molecular general de la base de datos, también se incluyó un descriptor "NH" que describe la existencia de algún enlace único entre un nitrógeno e hidrógeno, ya que algunas moléculas de la base de datos presentaban algún enlace de este tipo en su estructura.

Se tomaron en cuenta como descriptores los fragmentos del tipo "Metil" y "Etil" que estuvieran en las moléculas con la finalidad de obtener información sobre el aporte de estos sustituyentes, donde se obtuvo que el sustituyendo Metil reducía el valor de actividad biológica mientras que el sustituyente Etil lo aumentaba por lo que se evitó añadir metilos a las nuevas propuestas.

También se consideró la cantidad de enlaces π que presentaba cada molécula como un descriptor (n en π) con la finalidad de observar si una molécula con mayor resonancia generaba un mayor o menor aporte en la actividad biológica a lo cual se observó que este aporte era negativo, pero de muy baja participación al aparecer en solo 1 ecuación por lo que se tomó muy poco en cuenta esta consideración.

En cuanto a los sustituyentes halógenos, se consideraron la cantidad de átomos de flúor y de cloro y la presencia de bromo. Respecto a los átomos de flúor, estos demostraron ser de gran aporte debido a que se presentan valores en 9 ecuaciones diferentes por lo que se consideraron en gran manera a la hora de diseñar moléculas, debido a que estos aumentaban significativamente la actividad biológica, por lo que se buscó aplicar sobre todo en fragmentos de tri-fluorocarbono.

Tras obtener los resultados, se notó inmediatamente que ninguna de las ecuaciones presentó algún valor en el descriptor "Cl" lo que conlleva a no poseer información sobre el efecto de la presencia o ausencia de este sustituyente para el diseño molecular. La única molécula de la base inicial de datos que presenta este átomo en su estructura molecular es la molécula numerada como "007", también conocida como "AM-0883" en la bibliografía. Este átomo de Cloro presente en la molécula no genera una interacción fuerte con el TRPC6 y también queda en contacto con el disolvente, lo que podría verse relacionado con la ausencia de efecto del descriptor "Cl" en nuestras ecuaciones.

En cuanto al átomo de Bromo, éste generó un efecto positivo, pero de poca presencia por lo que se consideró para aumentar o disminuir otros valores subyacentes relacionados a la lipófilia, refractividad molar, peso molecular, etc.

El descriptor "S" buscaba representar la presencia o ausencia de algún átomo de azufre en la estructura molecular de la base de datos y propuestas, ya que este elemento se vio presente en una de las moléculas de la base de datos. Debido a que este descriptor presentó un valor de poca presencia y altamente negativo, este se evitó añadir a nuevas propuestas moleculares con la finalidad de evitar disminuir el valor de la actividad biológica.

Analizando los resultados obtenidos, se puede observar que existe una clara tendencia de algunos descriptores a aumentar en gran medida la actividad biológica, siendo estos los llamados "nO", "NH" y "nF" los cuales generan visiblemente un mayor aporte a este valor ya sea través de una presencia mayor en las diferentes ecuaciones y/o con valores muy altos en sus coeficientes. Cabe considerar de que el descriptor "COOH" presenta en la ecuación N°6 un valor de coeficiente extremadamente negativo (-2,91) lo que podría generar la impresión de que la presencia de este descriptor provocaría una disminución del valor de pEC₅₀Pred, no obstante, esto no está del todo claro, ya que como se mencionó con anterioridad, este sustituyente genera un aumento del valor si se considera la presencia de los ácidos benzoicos en este mismo, ante esto existe la duda de que si se hubiera encontrado una molécula que posea efecto agonista en el TRPC6 y esta tuviera un valor de actividad biológica medido de manera experimental y esta se hubiese incluido en la base de datos inicial, este valor podría verse totalmente alterado y quizás generar mayor información de utilidad para el diseño molecular.

b. Ecuaciones QSAR

En el modelo QSAR realizado, existen cuatro ecuaciones que poseen un error ligeramente superior al 5% en alguno de los descriptores o intercepto que poseen. Normalmente estas ecuaciones se descartarían ya que este error podría significar una reducción en la precisión de la aproximación del método, pero debido a que existen una cantidad acotada de ecuaciones que generan un aporte significativo al modelo, se tomó la decisión de considerar estas ecuaciones con tal de generar un valor de pEC₅₀Pred más preciso, ya que a una mayor cantidad de ecuaciones individuales que se utilicen para calcular este promedio, este valor se verá afectado con una mayor precisión.

Effect (a)	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std. Err.	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St. Err. β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	0,744953	0,294439	2,5301	0,064660	-0,072541	1,562447				
tPSA	0,092843	0,005171	17,9553	0,000057	0,078486	0,107199	1,56157	0,086970	1,32010	1,80304
nEter	0,162808	0,023797	6,8416	0,002388	0,096738	0,228878	0,19188	0,028045	0,11401	0,26974
nNsp ₂	-0,713966	0,027539	-25,9254	0,000013	-0,790427	-0,637505	-1,59166	0,061394	-1,76212	-1,42120
NH	2,651208	0,090710	29,2272	0,000008	2,399356	2,903061	1,56228	0,053453	1,41387	1,71069
nF	0,253928	0,021302	11,9203	0,000284	0,194784	0,313072	0,33667	0,028244	0,25826	0,41509

Effect (b)	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std. Err.	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St. Err. β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	1,627475	0,598984	2,7171	0,053148	-0,035572	3,290522				
tPSA	0,079481	0,010764	7,3842	0,001793	0,049597	0,109366	1,33684	0,181039	0,83419	1,83948
nNsp ₂	-0,675155	0,058989	-11,4454	0,000333	-0,838935	-0,511375	-1,50514	0,131506	-1,87026	-1,14002
NH	2,729984	0,189229	14,4269	0,000134	2,204600	3,255368	1,60870	0,111507	1,29911	1,91829
nF	0,245122	0,043868	5,5877	0,005032	0,123325	0,366919	0,32500	0,058163	0,16351	0,48648
S	-0,408773	0,144391	-2,8310	0,047297	-0,809668	-0,007878	-0,18066	0,063814	-0,35784	-0,00348

Effect (c)	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std. Err.	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St. Err. β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	3,639598	0,484015	7,519591	0,000286	2,455255	4,823941				
nO	0,565183	0,164638	3,432877	0,013922	0,162328	0,968038	0,499569	0,145525	0,143482	0,855655
COOH	0,761764	0,323343	2,355901	0,056600	-0,029428	1,552956	0,336664	0,142903	-0,013006	0,686334
NH	1,523795	0,248910	6,121883	0,000868	0,914735	2,132854	0,897929	0,146675	0,539027	1,256830

Effect (d)	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std. Err.	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St. Err. β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	4,725351	0,263731	17,91732	0,000002	4,080025	5,370677				
COOH	1,371559	0,456795	3,00257	0,023929	0,253821	2,489297	0,606165	0,201882	0,112177	1,100153
Ester	0,740676	0,312051	2,37358	0,055250	-0,022884	1,504236	0,545574	0,229853	-0,016856	1,108004
NH	1,850998	0,372972	4,96284	0,002545	0,938369	2,763627	1,090740	0,219782	0,552954	1,628526

Figura N°13 – Tablas de valores estadísticos de las ecuaciones 11(a), 12(b), 34(c), 40(d) recuperadas directamente desde el software "STATISTICA".

Las ecuaciones afectadas por esto fueron las enumeradas como 11, 12, 34 y 40. En el caso de las ecuaciones N°11 y N°12, el porcentaje de error afecta al intercepto y poseen un valor de error de 6,47% y 5,31% respectivamente. En cuanto a la ecuación N°34, el porcentaje de error posee un valor de 5,66% en el descriptor "COOH", mientras que la ecuación N°40 posee un valor de 5,26% en el descriptor "Ester" (Véase Figura N°13). Si bien, el error en estas ecuaciones podría afectar directamente en el promedio final del modelo, este no muestra recibir un mayor impacto negativo debido a la precisión obtenida de este la cual posee un R^2 igual a 0,9909.

El valor obtenido por la regresión lineal comparativa fue de un $R^2 = 0,9909$ lo que nos da un indicador extremadamente positivo respecto a la precisión del método. Si bien existe un valor notablemente alejado de la tendencia (Véase Figura N°11), es correspondiente al AM-0883, molécula que está presente en una investigación donde se utiliza esta molécula como agonista para cristalizar y analizar el TRPC6 de modo tridimensional a través de simulaciones y así generar información específica sobre cómo actúa este canal, además de la zona del target biológico, por lo que se decidió considerarla a pesar de que esto podría generar un "efecto de apalancamiento", además de que no considerar este fármaco significaba utilizar menos moléculas para la base de datos inicial, lo cual podría mermar la estadística predictiva.

c. Diseño Molecular

Las propuestas de diseños se realizaron utilizando la información recopilada desde las 16 ecuaciones QSAR obtenidas, las cuales entregaron información sobre que sustituyentes aportarían más al $pEC_{50}Pred$ siendo aquellas que presentaban un valor positivo y de mayor magnitud, además de una mayor presencia a lo largo de las ecuaciones utilizadas, siendo los descriptores "nO", "COOH", "Ester", "nEter", "nEtil", "NH", "nF" y "Br" los más utilizados y considerados a la hora de diseñar una propuesta molecular para aumentar el valor del promedio de la actividad biológica predicha. En contraparte, también se utilizó la información otorgada por las ecuaciones QSAR sobre que sustituyentes se debería evitar y considerar en menor medida para realizar diseños ya que estos poseían un valor negativo de los coeficientes en las ecuaciones QSAR. Si bien algunos de estos descriptores eran esenciales en la composición de los diseños, se trató de utilizarlos en la menor medida posible, siendo estos descriptores estructurales los llamados, "OH-ol", "nCO", "nNsp²", "nMetil", y "S".

Se consideró la factibilidad sintética de cada molécula, pero sin tener en cuenta el número de pasos para la obtención del compuesto final en cada caso. Se revisaron los grupos funcionales presentes y el tipo de conectividad interatómica, para evitar así la propuesta de moléculas inviables.

CONCLUSIONES

Se comprueba la hipótesis, dado que fue posible la obtención de ecuaciones QSAR que correlacionaran significativamente la actividad biológica con descriptores estructurales y fisicoquímicos.

Se logró proponer 16 nuevas ecuaciones finales para un total de 10 compuestos agonistas TRPC6 de literatura, de alta predictibilidad y significancia estadística.

Las mejores ecuaciones fueron las números 1 y 2, con un valor de $R^2 = 0,9997$ ambas por igual.

Podemos concluir en base a las ecuaciones que las características a tener presente para el diseño de nuevos ligandos agonistas de TRPC6 que respeten los farmacóforos acá estudiados son: nO, NH, CMR y éster. Por lo tanto, proponemos que compuestos promisorios debiesen tener átomos de oxígeno en la estructura, grupos NH y ésteres, así como una elevada refractividad molar. Esto está en línea con la necesidad de establecer interacciones de puente de hidrógeno relevantes con el canal de calcio TRPC6 como el puente de hidrógeno con Trp680, así como de contar con una estructura de alta lipofilia dado la elevada presencia de residuos hidrofóbicos en la cavidad del target.

Los descriptores que merman la actividad biológica son OH, CLogP2 y S, por lo tanto, proponemos que deben ser evitados en el diseño de futuras nuevas moléculas. Esto podría deberse a la que la alta polaridad de OH interfiere con los contactos hidrofóbicos de la cavidad del receptor. Por otra parte, una lipofilia muy elevada puede traducirse en efectos fisicoquímicos de membrana (por ejemplo, retención), y, por otra el efecto del átomo de azufre es algo que todavía debería estudiarse con más detención.

La capacidad predictiva promedio de las 16 ecuaciones fue notable y siguió la tendencia $y=x$. Esto indica que nuestras ecuaciones pueden formar la base para modelos más expandidos en el futuro, cuando se dispongan de nuevas moléculas.

Finalmente, gracias a nuestras ecuaciones fue posible el diseño de una gran cantidad de nuevas moléculas basadas en los criterios de: a) factibilidad sintética, b) respeto de los núcleos farmacofóricos previamente estudiados y c) evitar en lo posible centros asimétricos.

Como futuras proyecciones de nuestro trabajo está llevar a cabo la síntesis de algunas de las propuestas acá reportadas, y evaluarlas en experimentos funcionales en el canal de calcio TRPC6, y en modelos de autismo en *Drosophila*.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *The Lancet*, 392(10146), 508-520.
- 2.- Huerta, M., & Lord, C. (2012). Diagnostic Evaluation of Autism Spectrum Disorders. *Pediatric Clinics of North America*, 59(1), 103-111.
- 3.- Kaat, A. J., Gadow, K. D., & Lecavalier, L. (2013). *Psychiatric Symptom Impairment in Children with Autism Spectrum Disorders. Journal of Abnormal Child Psychology*, 41(6), 959-969.
- 4.- Garrido-Torres, N., Guzmán-Torres, K., García-Cerro, S., Pinilla Bermudez, G., Cruz-Baquero, C., Ochoa, H., ... & Ruiz-Veguilla, M. (2024). miRNAs as biomarkers of autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 33(9), 2957-2990.
- 5.- Del Valle Rubido, M., McCracken, J. T., Hollander, E., Shic, F., Noeldeke, J., Boak, L., ... & Umbricht, D. (2018). In search of biomarkers for autism spectrum disorder. *Autism research*, 11(11), 1567-1579.
- 6.- Shen, L., Liu, X., Zhang, H., Lin, J., Feng, C., & Iqbal, J. (2020). Biomarkers in autism spectrum disorders: Current progress. *Clinica Chimica Acta*, 502, 41-54.
- 7.- Rojas, V., Rivera, A., & Nilo, N. (2019). Actualización en diagnóstico e intervención temprana del Trastorno del Espectro Autista. *Revista Chilena de Pediatría*, 90(5).
- 8.- Lyall, K., Croen, L., Daniels, J., Fallin, M. D., Ladd-Acosta, C., Lee, B. K., Park, B. Y., Snyder, N. W., Schendel, D., Volk, H., Windham, G. C., & Newschaffer, C. (2017). The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annual Review of Public Health*, 38(1), 81-102.
- 9.- CDC: Autism rate rises to 1 in 36 children | AAP News | American Academy of Pediatrics.
- 10.- Instituto Nacional de Estadísticas. Censos de Población y Vivienda [Internet]. Gobierno de Chile. 2017. [Citado el 29 de Junio de 2024]. Disponible en:
- 11.- Yáñez, C., Maira, P., Elgueta, C., Brito, M., Crockett, M. A., Troncoso, L., López, C., & Troncoso, M. (2021). Estimación de la prevalencia de trastorno del Espectro Autista en población urbana chilena. *Andes Pediátrica*, 92(4), 519.
- 12.- Ministerio de Salud (MINSAL). Ley 21545| Establece la promoción de la inclusión, la atención integral, y la protección de los derechos de las personas con trastorno del espectro autista en el ámbito social, de salud y educación. Biblioteca del Congreso Nacional (BCN); 2 de marzo de 2023.
- 13.- Subramanian, M., Timmerman, C. K., Schwartz, J. L., Pham, D. L., & Meffert, M. K. (2015). Characterizing autism spectrum disorders by key biochemical pathways. *Frontiers in Neuroscience*, 9.
- 14.- Carey, C. et al. From bench to bedside: The mGluR5 system in people with and without Autism Spectrum Disorder and animal model systems. *Translational Psychiatry* 2022 12:1 12, 1-10 (2022).
- 15.- Jong YJI, O'Malley KL. Mechanisms Associated with Activation of Intracellular Metabotropic Glutamate Receptor, mGluR5. *Neurochem Res.* enero de 2017;42(1):166-72.
- 16.- Mehta, M. V., Gandal, M. J., & Siegel, S. J. (2011). mGluR5-Antagonist Mediated Reversal of Elevated Stereotyped, Repetitive Behaviors in the VPA Model of Autism. *PLoS ONE*, 6(10), e26077.

- 17.- Frye RE, Rossignol D, Casanova MF, Brown GL, Martin V, Edelson S, et al. A review of traditional and novel treatments for seizures in autism spectrum disorder: findings from a systematic review and expert panel. *Front Public Health* (2013) 1:31.
- 18.- Cellot, G., & Cherubini, E. (2014). GABAergic Signaling as Therapeutic Target for Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Pediatrics*, 2
- 19.- Fatemi, S. H., Reutiman, T. J., Folsom, T. D., & Thuras, P. D. (2009). GABAA Receptor Downregulation in Brains of Subjects with Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 39(2), 223-230.
- 20.- Lee, A., Choo, H., & Jeon, B. (2022). Serotonin Receptors as Therapeutic Targets for Autism Spectrum Disorder Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6515.
- 21.- Elia, J. et al. Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. *Molecular Psychiatry* 2010 15:6 15, 637–646 (2009).
- 22.- Choucair, N., Mignon-Ravix, C., Cacciagli, P., Abou Ghoch, J., Fawaz, A., Mégarbané, A., Villard, L., & Chouery, E. (2015). Evidence that homozygous PTPRD gene microdeletion causes trigonocephaly, hearing loss, and intellectual disability. *Molecular Cytogenetics*, 8(1), 39.
- 23.- Palacios-Muñoz, A., De Paula Moreira, D., Silva, V., García, I. E., Aboitiz, F., Zarrei, M., Campos, G., Rennie, O., Howe, J. L., Anagnostou, E., Ambrozewicz, P., Scherer, S. W., Passos-Bueno, M. R., & Ewer, J. (2022). Mutations in trpy, the homologue of TRPC6 autism candidate gene, causes autism-like behavioral deficits in Drosophila. *Molecular Psychiatry*, 27(8), 3328-3342.
- 24.- Chen, X., Souch, G., Demaree, I. S., White, F. A., & Obukhov, A. G. (2020). Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells*, 9(9), 1983.
- 25.- Saqib, U., Munjuluri, S., Sarkar, S., Biswas, S., Mukherjee, O., Satsangi, H., Baig, M. S., Obukhov, A. G., & Hajela, K. (2023). Transient Receptor Potential Canonical 6 (TRPC6) Channel in the Pathogenesis of Diseases: A Jack of Many Trades. *Inflammation*, 46(4), 1144-1160.
- 26.- Clapham, D. E., Runnels, L. W., & Strübing, C. (2001). The trp ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(6), 387-396.
- 27.- Guo, W., & Chen, L. (2019). Recent progress in structural studies on canonical TRP ion channels. *Cell calcium*, 83, 102075.
- 28.- Dietrich, A., & Gudermann, T. (n.d.). TRPC6. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 125–141. doi:10.1007/978-3-540-34891-7_7
- 29.- Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., & Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397(6716), 259–263.
- 30.- Kwon Y, Hofmann T, Montell C. Integration of Phosphoinositide- and Calmodulin-Mediated Regulation of TRPC6. *Molecular Cell*. febrero de 2007;25(4):491-503.
- 31.- Chaudhuri P, Rosenbaum MA, Sinharoy P, Damron DS, Birnbaumer L, Graham LM. Membrane translocation of TRPC6 channels and endothelial migration are regulated by calmodulin and PI3 kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 23 de febrero de 2016;113(8):2110-5.

- 32.- Bai, Y., Yu, X., Chen, H., Horne, D., White, R., Wu, X., ... & Huang, X. (2020). Structural basis for pharmacological modulation of the TRPC6 channel. *Elife*, 9, e53311.
- 33.- Tang, Q., Guo, W., Zheng, L., Wu, J. X., Liu, M., Zhou, X., ... & Chen, L. (2018). Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell research*, 28(7), 746-755.
- 34.- Feng, S. (2017). TRPC channel structure and properties. *Transient Receptor Potential Canonical Channels and Brain Diseases*, 9-23.
- 35.- Sheng, A., Liu, F., Wang, Q., Fu, H., & Mao, J. (2024). The roles of TRPC6 in renal tubular disorders: a narrative review. *Renal Failure*, 46(2), 2376929.
- 36.- Pu, Y., Zhao, H., Shen, B., Zhou, Q., Xie, P., & Wu, X. (2022). TRPC6 ameliorates renal ischemic reperfusion injury by inducing Zn²⁺ influx and activating autophagy to resist necrosis. *Annals of Translational Medicine*, 10(5).
- 37.- Maier, T., Follmann, M., Hessler, G., Kleemann, H. W., Hachtel, S., Fuchs, B., ... & Strübing, C. (2015). Discovery and pharmacological characterization of a novel potent inhibitor of diacylglycerol-sensitive TRPC cation channels. *British Journal of Pharmacology*, 172(14), 3650-3660.
- 38.- Seo, K., Rainer, P. P., Shalkey Hahn, V., Lee, D. I., Jo, S. H., Andersen, A., ... & Kass, D. A. (2014). Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4), 1551-1556.
- 39.- Basora, N., Boulay, G., Bilodeau, L., Rousseau, E., & Payet, M. D. (2003). 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) activates mouse TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. *Journal of biological chemistry*, 278(34), 31709-31716.
- 40.- Qu, C., Ding, M., Zhu, Y., Lu, Y., Du, J., Miller, M., ... & Hong, X. (2017). Pyrazolopyrimidines as potent stimulators for transient receptor potential canonical 3/6/7 channels. *Journal of medicinal chemistry*, 60(11), 4680-4692.
- 41.- Yang, P. L., Li, X. H., Wang, J., Ma, X. F., Zhou, B. Y., Jiao, Y. F., ... & Yu, Y. (2021). GSK1702934A and M085 directly activate TRPC6 via a mechanism of stimulating the extracellular cavity formed by the pore helix and transmembrane helix S6. *Journal of Biological Chemistry*, 297(4).
- 42.- Häfner, S., Urban, N., & Schaefer, M. (2019). Discovery and characterization of a positive allosteric modulator of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) channels. *Cell calcium*, 78, 26-34.
- 43.- Dudek, A. Z., Arodz, T., & Gálvez, J. (2006). Computational Methods in Developing Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR): A Review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 9, 213-228
- 44.- Kubinyi, H. (1997). QSAR and 3D QSAR in drug design. Part 1: Methodology. *Drug Discovery Today*, 2(11), 457-464
- 45.- Danishuddin, & Khan, A. U. (2016). Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: Paradigm for drug design. *Drug Discovery Today*, 21(8), 1291-1300

ANEXOS

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	-2,87757	0,191978	-14,9891	0,000645	-3,48853	-2,26661				
CLogP	3,62530	0,052492	69,0645	0,000007	3,45825	3,79236	6,68525	0,096797	6,37719	6,99330
CLogP ₂	-0,36930	0,005674	-65,0834	0,000008	-0,38736	-0,35124	-6,41856	0,098621	-6,73241	-6,10470
CMR	0,77105	0,019217	40,1230	0,000034	0,70990	0,83221	1,26154	0,031442	1,16148	1,36160
tPSA	-0,12687	0,002025	-62,6530	0,000009	-0,13331	-0,12042	-2,13386	0,034058	-2,24225	-2,02547
nEtil	1,14481	0,032595	35,1225	0,000051	1,04108	1,24854	0,77286	0,022005	0,70283	0,84289
S	-1,62361	0,037138	-43,7184	0,000026	-1,74180	-1,50542	-0,71756	0,016413	-0,76979	-0,66532

Anexo N° 1 - Valores estadísticos ecuación N°1

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	-1,25396	0,170783	-7,3424	0,005220	-1,79747	-0,71046				
CLogP	3,62530	0,052492	69,0645	0,000007	3,45825	3,79236	6,68525	0,096797	6,37719	6,99330
CLogP ₂	-0,36930	0,005674	-65,0834	0,000008	-0,38736	-0,35124	-6,41856	0,098621	-6,73241	-6,10470
CMR	0,77105	0,019217	40,1230	0,000034	0,70990	0,83221	1,26154	0,031442	1,16148	1,36160
tPSA	-0,12687	0,002025	-62,6530	0,000009	-0,13331	-0,12042	-2,13386	0,034058	-2,24225	-2,02547
nCarbonilo	-1,62361	0,037138	-43,7184	0,000026	-1,74180	-1,50542	-0,71756	0,016413	-0,76979	-0,66532
nEtil	1,14481	0,032595	35,1225	0,000051	1,04108	1,24854	0,77286	0,022005	0,70283	0,84289

Anexo N° 2 - Valores estadísticos ecuación N°2

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	4,75214	0,093000	51,0982	0,000017	4,45617	5,04810				
nO	0,82860	0,030051	27,5731	0,000105	0,73296	0,92423	0,732402	0,026562	0,64787	0,816935
OH -ol	-1,13995	0,027965	-40,7635	0,000032	-1,22894	-1,05095	-0,769573	0,018879	-0,82965	-0,709491
nNsp ₂	-0,09896	0,010533	-9,3959	0,002554	-0,13248	-0,06544	-0,220622	0,023481	-0,29535	-0,145896
nMetil	-0,58551	0,013539	-43,2466	0,000027	-0,62860	-0,54242	-0,944887	0,021849	-1,01442	-0,875354
nF	0,24833	0,014748	16,8378	0,000456	0,20139	0,29526	0,329247	0,019554	0,26702	0,391476
Br	0,47272	0,041935	11,2726	0,001497	0,33926	0,60617	0,208918	0,018533	0,14994	0,267899

Anexo N° 3 - Valores estadísticos ecuación N°3

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	0,969692	0,235073	4,1251	0,025832	0,221584	1,717800				
tPSA	0,089172	0,004049	22,0249	0,000205	0,076287	0,102056	1,49982	0,068097	1,28311	1,71654
nNsp ₂	-0,715044	0,021292	-33,5825	0,000058	-0,782805	-0,647283	-1,59406	0,047467	-1,74513	-1,44300
nMetil	0,069515	0,012377	5,6165	0,011158	0,030126	0,108904	0,11218	0,019974	0,04862	0,17575
NH	2,975271	0,077804	38,2407	0,000039	2,727664	3,222877	1,75324	0,045848	1,60733	1,89915
nF	0,249822	0,014951	16,7096	0,000467	0,202242	0,297403	0,33123	0,019823	0,26814	0,39431
S	-0,386811	0,049289	-7,8479	0,004309	-0,543670	-0,229953	-0,17095	0,021783	-0,24028	-0,10163

Anexo N° 4 - Valores estadísticos ecuación N°4

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	1,356503	0,250797	5,4088	0,012392	0,558354	2,154652				
tPSA	0,089172	0,004049	22,0249	0,000205	0,076287	0,102056	1,49982	0,068097	1,28311	1,71654
nCarbonilo	-0,386811	0,049289	-7,8479	0,004309	-0,543670	-0,229953	-0,17095	0,021783	-0,24028	-0,10163
nNsp ₂	-0,715044	0,021292	-33,5825	0,000058	-0,782805	-0,647283	-1,59406	0,047467	-1,74513	-1,44300
nMetil	0,069515	0,012377	5,6165	0,011158	0,030126	0,108904	0,11218	0,019974	0,04862	0,17575
NH	2,975271	0,077804	38,2407	0,000039	2,727664	3,222877	1,75324	0,045848	1,60733	1,89915
nF	0,249822	0,014951	16,7096	0,000467	0,202242	0,297403	0,33123	0,019823	0,26814	0,39431

Anexo N° 5 - Valores estadísticos ecuación N°5

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	9,01052	0,063509	141,8771	0,000001	8,80841	9,21264				
COOH	-2,91361	0,073007	-39,9087	0,000035	-3,14595	-2,68127	-1,28768	0,032266	-1,39037	-1,18500
Ester	0,81709	0,039682	20,5912	0,000250	0,69081	0,94338	0,60186	0,029229	0,50884	0,69488
nNsp ₂	-0,97520	0,019160	-50,8981	0,000017	-1,03618	-0,91423	-2,17404	0,042714	-2,30998	-2,03811
nMetil	-0,80743	0,018817	-42,9093	0,000028	-0,86731	-0,74754	-1,30302	0,030367	-1,39966	-1,20638
nF	0,24599	0,016280	15,1095	0,000629	0,19417	0,29780	0,32614	0,021585	0,25745	0,39484
Br	1,33703	0,061332	21,7998	0,000211	1,14184	1,53221	0,59090	0,027106	0,50464	0,67717

Anexo N° 6 - Valores estadísticos ecuación N°6

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	1,240505	0,236925	5,2359	0,013559	0,486505	1,994505				
tPSA	0,089000	0,004447	20,0113	0,000273	0,074846	0,103154	1,49694	0,074804	1,25887	1,73500
OH -ol	-0,257213	0,050889	-5,0544	0,014942	-0,419163	-0,095263	-0,17364	0,034355	-0,28298	-0,06431
nNsp ₂	-0,698926	0,022576	-30,9584	0,000074	-0,770774	-0,627079	-1,55813	0,050330	-1,71831	-1,39796
NH	2,680947	0,071494	37,4989	0,000042	2,453421	2,908474	1,57981	0,042129	1,44573	1,71388
nF	0,251084	0,016463	15,2513	0,000612	0,198691	0,303478	0,33290	0,021828	0,26344	0,40237
S	-0,402611	0,054063	-7,4471	0,005012	-0,574663	-0,230559	-0,17794	0,023893	-0,25397	-0,10190

Anexo N° 7 - Valores estadísticos ecuación N°7

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	0,744953	0,294439	2,5301	0,064660	-0,072541	1,562447				
tPSA	0,092843	0,005171	17,9553	0,000057	0,078486	0,107199	1,56157	0,086970	1,32010	1,80304
nEter	0,162808	0,023797	6,8416	0,002388	0,096738	0,228878	0,19188	0,028045	0,11401	0,26974
nNsp ₂	-0,713966	0,027539	-25,9254	0,000013	-0,790427	-0,637505	-1,59166	0,061394	-1,76212	-1,42120
NH	2,651208	0,090710	29,2272	0,000008	2,399356	2,903061	1,56228	0,053453	1,41387	1,71069
nF	0,253928	0,021302	11,9203	0,000284	0,194784	0,313072	0,33667	0,028244	0,25826	0,41509

Anexo N° 8 - Valores estadísticos ecuación N°11

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	1,627475	0,598984	2,7171	0,053148	-0,035572	3,290522				
tPSA	0,079481	0,010764	7,3842	0,001793	0,049597	0,109366	1,33684	0,181039	0,83419	1,83948
nNsp ₂	-0,675155	0,058989	-11,4454	0,000333	-0,838935	-0,511375	-1,50514	0,131506	-1,87026	-1,14002
NH	2,729984	0,189229	14,4269	0,000134	2,204600	3,255368	1,60870	0,111507	1,29911	1,91829
nF	0,245122	0,043868	5,5877	0,005032	0,123325	0,366919	0,32500	0,058163	0,16351	0,48648
S	-0,408773	0,144391	-2,8310	0,047297	-0,809668	-0,007878	-0,18066	0,063814	-0,35784	-0,00348

Anexo N° 9 - Valores estadísticos ecuación N°12

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	2,036248	0,645538	3,1543	0,034370	0,243946	3,828550				
tPSA	0,079481	0,010764	7,3842	0,001793	0,049597	0,109366	1,33684	0,181039	0,83419	1,83948
nCarbonilo	-0,408773	0,144391	-2,8310	0,047297	-0,809668	-0,007878	-0,18066	0,063814	-0,35784	-0,00348
nNsp ₂	-0,675155	0,058989	-11,4454	0,000333	-0,838935	-0,511375	-1,50514	0,131506	-1,87026	-1,14002
NH	2,729984	0,189229	14,4269	0,000134	2,204600	3,255368	1,60870	0,111507	1,29911	1,91829
nF	0,245122	0,043868	5,5877	0,005032	0,123325	0,366919	0,32500	0,058163	0,16351	0,48648

Anexo N° 10 - Valores estadísticos ecuación N°13

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	3,137907	0,284141	11,04347	0,000106	2,407498	3,868316				
nO	0,645915	0,089271	7,23545	0,000787	0,416437	0,875392	0,570928	0,078907	0,368091	0,773765
COOH	1,021259	0,182483	5,59645	0,002515	0,552171	1,490348	0,451349	0,080649	0,244034	0,658664
NH	1,823656	0,150895	12,08558	0,000068	1,435768	2,211544	1,074628	0,088918	0,846057	1,303200
nF	0,271028	0,066776	4,05879	0,009741	0,099376	0,442681	0,359346	0,088535	0,131759	0,586933

Anexo N° 11 - Valores estadísticos ecuación N°22

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	4,595012	0,476109	9,65119	0,000071	3,43002	5,760008				
nO	0,796593	0,171642	4,64101	0,003537	0,37660	1,216586	0,704114	0,151716	0,33288	1,075348
OH -ol	-0,969031	0,181970	-5,32521	0,001786	-1,41430	-0,523766	-0,654188	0,122847	-0,95478	-0,353592
nMetil	-0,544105	0,093623	-5,81166	0,001139	-0,77319	-0,315017	-0,878068	0,151087	-1,24777	-0,508371

Anexo N° 12 - Valores estadísticos ecuación N°31

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	3,208156	0,495940	6,46884	0,000648	1,994635	4,421678				
nO	0,875939	0,192393	4,55285	0,003880	0,405169	1,346709	0,774249	0,170058	0,358132	1,190365
nMetil	-0,293410	0,114674	-2,55864	0,042987	-0,574007	-0,012812	-0,473501	0,185059	-0,926325	-0,020677
NH	1,178346	0,257367	4,57846	0,003777	0,548591	1,808100	0,694365	0,151659	0,323269	1,065461

Anexo N° 13 - Valores estadísticos ecuación N°33

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	3,639598	0,484015	7,519591	0,000286	2,455255	4,823941				
nO	0,585183	0,164638	3,432877	0,013922	0,162328	0,968038	0,499569	0,145525	0,143482	0,855655
COOH	0,761764	0,323343	2,355901	0,056600	-0,029428	1,552956	0,336664	0,142903	-0,013006	0,686334
NH	1,523795	0,248910	6,121883	0,000868	0,914735	2,132854	0,897929	0,146675	0,539027	1,256830

Anexo N° 14 - Valores estadísticos ecuación N°34

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	5,766383	0,633142	9,10756	0,000098	4,217139	7,315626				
CMR ²	0,035720	0,010685	3,34297	0,015554	0,009574	0,061865	1,34687	0,402897	0,36102	2,332722
nEter	0,705465	0,165064	4,27388	0,005241	0,301567	1,109363	0,83142	0,194535	0,35541	1,307432
n en pi	-0,588466	0,133685	-4,40190	0,004559	-0,915580	-0,261352	-1,65624	0,376256	-2,57690	-0,735576

Anexo N° 15 - Valores estadísticos ecuación N°37

Effect	pEC ₅₀ Param.	pEC ₅₀ Std.Err	pEC ₅₀ t	pEC ₅₀ p	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt	pEC ₅₀ Beta (β)	pEC ₅₀ St.Err.β	-95,00% Cnf.Lmt	+95,00% Cnf.Lmt
Intercept	4,725351	0,263731	17,91732	0,000002	4,080025	5,370677				
COOH	1,371559	0,456795	3,00257	0,023929	0,253821	2,489297	0,606165	0,201882	0,112177	1,100153
Ester	0,740676	0,312051	2,37358	0,05250	-0,022884	1,504236	0,545574	0,229853	-0,016856	1,108004
NH	1,850998	0,372972	4,96284	0,002545	0,938369	2,763627	1,090740	0,219782	0,552954	1,628526

Anexo N° 16 - Valores estadísticos ecuación N°40