

Métodos computacionales en toxicología predictiva: aplicación a la reducción de ensayos con animales en el contexto de la legislación comunitaria REACH

Gozalbes R^{1*}, de Julián-Ortiz JV¹, Fito-López C²

¹ProtoQSAR SL, Vivero de Empresas Creix, Paseo de la Pechina 15, 46008 Valencia. ²Instituto Tecnológico del Embalaje, Transporte y Logística (ITENE), Parque Tecnológico de Valencia, C/ Albert Einstein 1, 46980 Paterna (Valencia).

Recibido 12 septiembre de 2014 / Aceptado 29 octubre de 2014

Resumen: Los métodos de química informática y modelado molecular han sido utilizados desde hace décadas para la selección y optimización de nuevos compuestos con propiedades terapéuticas. Su aplicación en toxicología predictiva es más reciente, y dadas las nuevas necesidades regulatorias impuestas por la normativa europea REACH, estas técnicas gozan actualmente de un interés creciente. En efecto, el reglamento REACH supone a priori la necesidad de una cantidad ingente de ensayos con animales para demostrar la seguridad de los nuevos compuestos químicos sometidos a registro, ensayos que pueden reducirse mediante el uso de métodos alternativos como los estudios *in vitro* e *in silico*, siempre que cumplan ciertas condiciones específicas que garanticen su calidad y eficacia predictiva. La toxicología computacional es pues una subdisciplina de la toxicología que tiene como objetivo utilizar las matemáticas, la estadística, el modelado químico y las herramientas informáticas para predecir los efectos tóxicos de las sustancias químicas en la salud humana y/o el medio ambiente, y adicionalmente comprender mejor los mecanismos por los que un producto químico determinado induce daño. En esta revisión resumimos el estado del arte de los diferentes métodos existentes en materia de toxicología computacional, citamos las bases de datos y programas más adecuados para la generación de predicciones robustas y fiables, y se discuten sus limitaciones y el grado de aceptación en el ámbito normativo.

Palabras clave: toxicología computacional, REACH, QSAR, extrapolación, acoplamiento molecular, cribado virtual.

Abstract: Computational methods in predictive toxicology: application to the reduction of animal tests in the context of the EU REACH regulation. Molecular modeling and chemoinformatics have been used for decades for the selection and optimization of new compounds with therapeutic properties. The application of these techniques in predictive toxicology is more recent, and they are experiencing an increasingly interest because of the new legal requirements imposed by the EU REACH regulation. Indeed, a large amount of animal testing is needed under REACH to demonstrate the safety of new chemical entities subjected to registration, and these assays can be significantly reduced by using alternative *in vitro* and *in silico* methods, provided they meet specific conditions to ensure their quality and predictive power. Computational toxicology is as a subdiscipline of toxicology that aims to use mathematics, statistics, chemistry and computer modeling tools to predict the toxic effects of chemicals on human health and/or environment. Additionally, computation studies can help also to better understand the mechanisms by which a given chemical induces harm. In this review we summarize the state of art of the main *in silico* methods, the

toxicological databases and computer programs more suitable for the generation of robust and reliable predictions will be listed, and the limitations and acceptability of computational toxicology will be discussed in the context of the UE regulation.

Key words: computational toxicology, REACH, QSAR, read-across, docking, virtual screening.

Introducción

El Reglamento REACH

El reglamento de ámbito comunitario europeo 1907/2006 para el Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas (abreviadamente “REACH”, del inglés Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals), fue aprobado el 18 de diciembre de 2006 y entró en vigor el 1 de junio de 2007 [1], siendo su principal objetivo la protección de la salud humana y el medio ambiente. Para alcanzar dicho objetivo REACH regula tanto la producción como el uso de sustancias químicas cuando son producidas/importadas en/a Europa en una cantidad superior a una tonelada al año. Según este reglamento, se exige a fabricantes e importadores de sustancias químicas de la Unión Europea (UE) que registren dichas sustancias y comuniquen la información necesaria para garantizar su uso seguro (como tales, en mezclas o como parte de la composición de artículos), remitiendo un expediente de registro a la Agencia Europea de Productos Químicos (European Chemicals Agency, ECHA, www.echa.europa.eu/). El grado de información requerida depende del nivel de preocupación por la sustancia, siendo más completa por ejemplo para productos carcinógenos, mutágenos y tóxicos para la reproducción (CMR) o para sustancias altamente tóxicas para los organismos acuáticos. Asimismo, los productores de artículos, distribuidores y usuarios intermedios deben ser rigurosos en la identificación de estas sustancias, y actualizar y comunicar la información de las mismas tras el registro.

El reglamento REACH ha supuesto una revolución en el mundo de la regulación de compuestos químicos, por primera vez la industria debe asumir el control del riesgo potencial que comportan los productos que genera y su potencial impacto tanto sobre la salud humana como sobre el ecosistema. Continuar en el mercado exige adoptar las nuevas obligaciones impuestas por REACH, ya que no se pueden fabricar o importar sustancias que no hayan sido previamente registradas y autorizadas por la ECHA, ni tampoco utilizarlas para usos distintos de los registrados. REACH constituye el paradigma de un cambio internacional hacia un uso responsable de los productos químicos, y de hecho otros países están estudiando/adoptando legislaciones similares [2].

* e-mail: rgozalbes@protoqsar.com

Pese a su importancia e impacto positivo, el reglamento REACH también suscita fuertes críticas, especialmente por parte de los industriales que deben adoptar esta legislación. Los puntos objeto de controversia son fundamentalmente dos:

i) Los costes del proceso de registro son muy elevados, debido al alto grado de trabajo experimental y administrativo requerido. Estos costes inciden directamente en la competitividad de las empresas que deben aplicar el reglamento, siendo ésta una cuestión especialmente sensible en un momento de crisis económica mundial como el actual. Las pequeñas y medianas empresas están particularmente expuestas a este riesgo, hasta el punto de que en algunos casos pueden verse en el impedimento de continuar produciendo algunos de sus productos.

ii) A nivel social se plantea además el problema ético de la enorme cantidad de ensayos con animales necesarios para cumplir con los requisitos de información demandados [3]. Se calcula que en la UE se practican anualmente experimentos con alrededor de doce millones de animales vertebrados con distintos fines (científicos, toxicológicos, regulatorios) [4]. Las estimaciones sobre el gran incremento en el número de dichos experimentos que REACH implica para la evaluación de riesgos han alertado y movilizado así a múltiples organizaciones de defensa del bienestar animal y a amplios sectores sociales.

Así pues, la necesidad de métodos alternativos para reducir o sustituir la experimentación animal es más fuerte que nunca. De hecho, el uso de dichos métodos en lugar de las pruebas con animales es claramente estimulado por la propia reglamentación REACH, que en su texto establece que “el máximo esfuerzo debe realizarse para la reducción de los ensayos de productos químicos en animales, que deben realizarse exclusivamente como la última opción, cuando no hay otra manera científicamente fiable de demostrar el impacto de dichos productos en el ser humano o el ecosistema”. Este estímulo institucional de los métodos alternativos no es nuevo, y por ejemplo la Comisión Europea ya lanzó en 1991 el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, European Centre for the Validation of Alternative Methods), con los objetivos de validar técnicas que reduzcan, refinen o reemplacen a los ensayos en animales de productos químicos, biológicos o vacunas, y promover el desarrollo y diseminación de los métodos alternativos, su aplicación a nivel industrial y su aceptación por las entidades reguladoras. Este centro sigue vigente, desde 2011 bajo el nombre de “European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing” (EURL-ECVAM, http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam).

Toxicología computacional

Actualmente, el potencial tóxico de un gran número de sustancias químicas industriales -incluyendo productos farmacéuticos, cosméticos, pesticidas y otros productos químicos sintéticos o semi-sintéticos- se determina mediante el uso de modelos animales estándar, siendo estos estudios requeridos para su aprobación como productos registrados que se pueden lanzar al mercado. Existen diversos métodos alternativos para la sustitución de los ensayos con animales, como las técnicas *in vitro* (que se sirven de porciones de tejidos, órganos perfundidos y cultivos celulares o subcelulares), o el uso de organismos inferiores como bacterias, algas u hongos [5]. Entre dichas alternativas se encuentran también los métodos computacionales o “*in silico*”, que permiten la simulación de mecanismos de acción y la predicción de valores de toxicidad humana o medioambiental mediante el uso de modelos computacionales: es la llamada Toxicología Computacional. Los métodos computacionales se han aprovechado de tres avances

tecnológicos significativos: la disponibilidad creciente de información química y biológica (por ejemplo, a partir de microarrays o de experimentos de cribado de alto rendimiento *in vitro* -high throughput screening, HTS-), el incremento de la potencia de cálculo para analizar informáticamente estos datos, y el desarrollo de métodos bioestadísticos novedosos. Los antecesores de la toxicología computacional son la química informática (“chemoinformatics”) y el modelado molecular, disciplinas en la interfaz entre la química, la biología y la informática que han sido utilizadas durante años en el mundo del descubrimiento y/o diseño de fármacos (“drug discovery”)[6].

Los experimentos *in vivo* requieren mucho tiempo para su preparación y ejecución, y son costosos y éticamente cuestionables. Frente a ellos, los modelos computacionales tienen la capacidad de predecir las propiedades físico-químicas o biológicas de compuestos sin tener que llevar a cabo necesariamente su síntesis química en laboratorio. El uso de los enfoques *in silico* representa pues un ahorro muy significativo de tiempo, recursos y dinero [7], y se caracteriza asimismo por la aplicabilidad de los modelos resultantes de forma fácil e inmediata a nuevas estructuras. A nivel de la industria farmacéutica, es muy frecuente el cribado virtual de grandes colecciones de estructuras (“virtual screening”), que es típicamente un proceso de alto rendimiento a bajo costo que proporciona una indicación rápida de la eficacia y los riesgos potenciales de compuestos, facilitando así su priorización: como no se requieren compuestos físicos estos estudios se pueden ejecutar en las primeras etapas del descubrimiento para seleccionar los productos con mejores propiedades y menor toxicidad [7,8]. Además, las herramientas computacionales también pueden ayudar en algunos casos a proporcionar una comprensión mecanística de estas predicciones, por ejemplo para explicar por qué se prevé que un compuesto muestre cierto tipo de toxicidad.

Existen diversas técnicas de toxicología computacional, y el uso de una u otra depende del grado de complejidad del tipo de toxicidad objeto de estudio y de la información de partida de la que disponemos. La herramienta más potente y eficaz es el desarrollo y aplicación de modelos matemáticos de predicción QSAR, y por tanto los veremos con más detalle. Otros enfoques predictivos reseñables son el acoplamiento molecular (“docking”) para analizar las interacciones de compuestos químicos con receptores biológicos, el estudio sistemático de las relaciones estructura-actividad basado en el conocimiento y la experiencia previos (“knowledge-based SAR systems”), la extrapolación de propiedades por similitud estructural (read-across), y el estudio de la farmacocinética basado en la fisiología (PBPK).

Modelado por QSAR/QSTR

Una de las primeras aplicaciones de la química computacional fue la predicción de la actividad biológica basada en la estructura química: los modelos QSAR (del inglés “Quantitative Structure-Activity Relationships”). Esta técnica consiste en la construcción de un modelo matemático relacionando por medio de herramientas estadísticas la estructura química de una serie de moléculas -caracterizadas previamente por una serie de descriptores moleculares numéricos- con una propiedad fisicoquímica o actividad biológica. Una vez se ha establecido dicha correlación, la misma puede usarse para predecir la propiedad/actividad en nuevas moléculas cuya estructura química sea conocida. Debido al gran coste y tiempo necesarios para la investigación y desarrollo de medicamentos, los modelos QSAR se vienen utilizando desde hace décadas en “drug discovery”, en donde forman parte del protocolo estándar para el

descubrimiento de fármacos y su posterior optimización, referida tanto a los efectos terapéuticos [7] como tóxicos [8,9]. Los modelos QSAR se usan también para proporcionar predicciones de las propiedades farmacocinéticas (ADME) en etapas tempranas del proceso [10-14]. Cuando la actividad biológica estudiada es un dato de toxicidad, sería más propio hablar de modelos QSTR (“Quantitative Structure-Toxicity Relationships”), aunque esta nomenclatura no se ha generalizado completamente y muchos autores siguen hablando globalmente de QSAR.

La utilización de los QSARs/QSTRs presenta varias ventajas frente a otras metodologías, entre las que destaca el hecho de que, una vez se ha desarrollado un modelo, la predicción de toxicidad de un compuesto se puede hacer a partir únicamente del conocimiento de su estructura química, así como el hecho de que los modelos pueden automatizarse fácilmente, proporcionando así un medio extremadamente rápido para evaluar un alto número de estructuras químicas. Hay un gran número de usos potenciales de las QSTR en la industria para la predicción de la toxicidad [7-9]. Por ejemplo en la industria farmacéutica permiten aumentar la probabilidad de identificación temprana de toxicidad de los candidatos a fármacos mucho antes de invertir cantidades enormes de tiempo y recursos en su desarrollo, a fin de reducir las tasas de abandono del desarrollo de fármacos [15,16]. Además, la predicción de la toxicidad se puede aplicar a las evaluaciones de riesgo ambiental para los contaminantes comunes. No obstante, su uso puede verse afectado por ciertas limitaciones, entre las que cabe destacar la falta de datos de toxicidad adecuados disponibles en ciertos casos, y la inadecuación de modelos excesivamente simplistas para la predicción de valores toxicológicos dependientes de mecanismos de acción complejos o múltiples. Además, a diferencia de los animales o las pruebas *in vitro*, hay que tener en cuenta que los QSTRs deben revisarse periódicamente y refinarse a medida que se disponga de nuevos datos, de modo que los modelos validados en un momento dado tiene que re-validarse cada cierto tiempo para no resultar obsoletos.

Modelos QSTR en la literatura científica

Un gran número de modelos QSTR han sido desarrollados para estimar diferentes parámetros toxicológicos de los productos químicos -tanto relacionados con los efectos en la salud humana como con el impacto ambiental- empleando diferentes metodologías. En términos generales, los modelos publicados se pueden clasificar en función del tipo de toxicidad que intentan predecir:

- i) Toxicidad sistémica en humanos: fundamentalmente predicciones de carcinogénesis, mutagénesis, toxicidad reproductiva y toxicidad aguda. Además, hay un interés considerable en la predicción de parámetros farmacocinéticos que pueden influir en la biodisponibilidad de los compuestos, particularmente de fármacos.
- ii) Toxicidad en humanos a nivel local: predicción de toxicidad sobre la piel, sensibilización respiratoria, irritación cutánea y ocular, fototoxicidad.
- iii) Distribución ambiental: se refiere a la dispersión y destino final de compuestos químicos con efectos tóxicos en el ambiente, que se puede modelar en términos de su persistencia (es decir, la biodegradación, hidrólisis, etc.), distribución y bioacumulación.
- iv) Ecotoxicidad: predicciones de efectos tóxicos en plantas, organismos acuáticos y terrestres (invertebrados y vertebrados) y pájaros.

Los primeros modelos QSTR se basaron en la premisa de que la toxicidad podría ser correlacionada con ciertas características

moleculares de los agentes químicos que la causan [17]. Estos primeros modelos fueron limitados por el número de parámetros que podían ser modelados y tendían a no ser muy predictivos, especialmente para las toxicidades complejas que se pueden producir a través de diferentes mecanismos de acción. Actualmente la lista de estudios predictivos publicados es muy amplia, de entre los que destacaremos modelos QSTR para predecir los efectos en el hígado de los fármacos candidatos [18], toxicidad cardíaca [19,20], carcinogenicidad [21] o mutagenicidad [22].

QSTRs en las normativas regulatorias internacionales

Diversos organismos internacionales permiten la utilización de los métodos computacionales (en general, y sobre todo los QSARs/QSTRs en particular) con distintos fines relacionados con la regulación de las entidades químicas nuevas y existentes. El uso de QSTRs para ayudar en la regulación de productos químicos se divide en tres grandes áreas: la clasificación y el etiquetado, evaluación de riesgos y el establecimiento de prioridades. Históricamente, fueron inicialmente las agencias reguladoras en América del Norte las que tomaron la delantera en el desarrollo y empleo de estos métodos para la reglamentación de nuevas sustancias. Así por ejemplo, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency, EPA, www.epa.gov) reglamentó la utilización de modelos QSAR en el proceso de notificación previa a la fabricación de nuevos productos químicos, sobre todo cuando no había datos previos de toxicidad disponibles [23]. Otro ejemplo fue la Ley Canadiense de Protección del Medio Ambiente (Canadian Environmental Protection Act, CEPA), según la cual unas 23.000 sustancias de una lista de productos de uso doméstico debían cribarse y agruparse por categorías según sus valores de persistencia, bioacumulación y toxicidad inherentes [23]. Dada la falta de información experimental para una gran mayoría de estas sustancias, las ventajas e inconvenientes del uso de QSTR fueron analizados [23,24]. Más recientemente, las agencias reguladoras de Estados Unidos como la “Food and Drug Administration” (FDA, www.fda.gov) han invertido tiempo y recursos en la evaluación de la utilidad de los métodos computacionales orientados a la detección de señales de riesgo toxicológico, incluyendo los QSTRs [25, 26]. En la FDA, estos esfuerzos se concretaron en forma de modelos basados en parámetros toxicológicos que no pueden ser probados en seres humanos, incluyendo los QSTRs de toxicidad genética, toxicidad reproductiva y carcinogenicidad [27-30].

A pesar del uso relativamente limitado entonces en Europa, la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Dinamarca (<http://eng.mst.dk/>) utilizó una variedad de métodos QSAR para establecer prioridades entre unos aproximadamente 166.000 productos químicos según sus efectos potenciales en la salud humana [23]. Finalmente, el incentivo para un mayor uso de estos métodos ha sido la reglamentación comunitaria, inicialmente impulsada por la publicación por la Comisión Europea del Libro Blanco que establecía una estrategia para una futura política sobre productos químicos [31] que finalmente se convertiría en la reglamentación REACH [1]. En definitiva, podemos afirmar que las políticas gubernamentales, tanto en la UE como en América del Norte, han animado -y en algunos casos ordenado en su legislación- el uso de técnicas computacionales para predecir la toxicidad. De entre ellas, los modelos QSTRs son los que presentan una mayor validez desde el punto de vista regulatorio.

Una cuestión fundamental que se plantea a nivel legal es la de la validez de los modelos QSTR a la hora de considerarlos para tomar una decisión de autorización de un compuesto químico. Lógicamente, la decisión sobre la aplicación de los QSTRs para

sustancias cuyos efectos aún se desconocen es sostenible sólo cuando un modelo tiene una base sólida y no es el resultado de especulaciones teóricas. No obstante, varios estudios retrospectivos han demostrado la falta de calidad y capacidad predictiva de algunos modelos QSTR desarrollados previamente, abriendo pues el debate sobre la pertinencia de su utilización convencional [32,33]. En los últimos años se ha iniciado pues un replanteamiento crítico e imparcial para evaluar la fiabilidad de los resultados de los modelos computacionales. De acuerdo con la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE, www.oecd.org/) se pueden definir una serie de reglas generales que ayuden a determinar si un modelo QSTR es apropiado para uso regulatorio [34]. Se conocen como “reglas de Setúbal” porque se derivaron en la reunión “International Workshop on the Regulatory Acceptance of QSARs for Human Health and Environment Endpoints”, que tuvo lugar en dicha ciudad portuguesa en marzo de 2002. Este evento fue organizado por las dos organizaciones profesionales más representativas de la industria química, el Consejo Europeo de la Industria Química (CEFIC, acrónimo de su nombre original en francés, *Conseil Européen des Fédérations de l'Industrie Chimique*) y el Consejo Internacional de Asociaciones Químicas (*International Council of Chemical Associations, ICCA*). Y las reglas enunciadas son las siguientes:

- i) Los modelos deben orientarse a parámetros toxicológicos (“endpoints”) bien definidos y de clara importancia regulatoria,
- ii) deben tomar la forma de un algoritmo inequívoco,
- iii) su dominio de aplicabilidad tiene que estar claramente definido y justificado,
- iv) deben cumplir con las medidas reconocidas científicamente para demostrar la bondad de su ajuste, robustez y capacidad de predicción,
- v) en la medida de lo posible, es conveniente que aporten una posible interpretación sobre mecanismos de acción toxicológica de los compuestos estudiados [34].

Estas reglas fueron definitivamente adoptadas por todos los países miembros de la OCDE en el “37th Joint Meeting of the Chemicals Committee and Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology”, en noviembre de 2004. La Unión Europea las ha incluido también en el anexo XI del Reglamento REACH [1] y en el anexo IV de las Normas para Productos Biocidas [35], prácticamente sin modificaciones.

Una prueba de este cambio hacia un uso más exigente de las técnicas QSTR es que incluso muchos de los mejores modelos desarrollados para el descubrimiento de fármacos podrían no cumplir con estas condiciones (es decir, teóricamente podrían no ser aceptados desde un punto de vista reglamentario). Esto es lógico, porque de hecho el objetivo principal del descubrimiento de fármacos es el de derivar modelos predictivos, relegando la transparencia y la adecuación de los resultados a un papel secundario, y por otra parte su validación se suele basar en datos internos que pueden no estar disponibles a efectos reguladores de REACH.

Fuentes de datos toxicológicos

Un factor absolutamente clave para la eficacia predictiva de los modelos computacionales es la cantidad y calidad de los datos a partir de los que se construyen. Estos datos pueden provenir de ensayos *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, ensayos de carcinogenicidad en animales vs. ensayos de mutación bacteriana de Ames), pero en este caso hay que tener en cuenta su interrelación, pues generalmente el objetivo final es predecir los efectos *in vivo* en humanos. Una de las mayores

limitaciones a las que se enfrentan los especialistas para desarrollar modelos QSTR eficientes es la falta de suficientes datos toxicológicos de calidad, indispensables para su desarrollo y validación. Hasta ahora los datos disponibles han sido muy limitados en términos de espacio químico y biológico para la gran mayoría de parámetros toxicológicos. La necesidad de más datos para aumentar la cobertura de los modelos no debe ser vista como una necesidad de realización de más ensayos en animales, sino de la aplicación de un mayor esfuerzo para utilizar los datos existentes (por ejemplo, en bases de datos corporativas o reglamentarias). En el pasado se alzaron voces para compilar este tipo de bases [23], y hay varios ejemplos de publicación de datos propietarios para el desarrollo de modelos *in silico*. Entre ellos cabe citar el acuerdo de investigación y desarrollo en colaboración (CRADA, del inglés “*Cooperative Research and Development Agreement*”) entre la FDA estadounidense y la compañía Multicase, Inc. Esta colaboración, que implicó la liberación de datos reglamentarios (aunque las estructuras químicas no se pusieron a disposición del público) y el codesarrollo de un programa de evaluación automatizada de estructuras químicas, supuso una gran mejora en la cobertura y la capacidad de predicción de los modelos de carcinogenicidad [36]. Los problemas de sensibilidad comercial y la confidencialidad deben ser tenidos en cuenta en la recogida y el uso de estos datos.

Más recientemente, los avances en técnicas de alto rendimiento (HTS) y metodologías “ómicas” han permitido la generación de datos multidimensionales de toxicidad en grandes bibliotecas químicas, representando una vía interesante para futuros desarrollos en toxicología computacional. Actualmente hay una mayor cantidad de recursos en forma de datos públicos y privados disponibles para el desarrollo de modelos de toxicidad, entre los que cabría resaltar algunos casos de integración de datos aportados por la colaboración entre investigadores en proyectos como el DSSTox (de “*Distributed Structure-Searchable Toxicity*”), la CPDB (de “*Carcinogenic Potency Database*”, con informes de tests de cáncer en animales para más de 1,500 productos químicos, que son accesibles gratuitamente vía la web de la Toxicology Data Network, TOXNET®, <http://toxnet.nlm.nih.gov>), o PubChem (repositorio público de estructuras químicas y propiedades biológicas asociadas, la mayor parte de los datos provenientes del centro de cribado del programa de librerías moleculares del NIH, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) [37].

Un problema que plantea la existencia de diferentes fuentes de información es la comparación de datos entre ellas y su validez. Antes de iniciar el modelado, el especialista tiene que garantizar la calidad de los conjuntos de datos, que en muchos casos provienen de fuentes diversas y se presentan en formatos diferentes, y planificar procedimientos de normalización [38]. A pesar de los esfuerzos de una serie de organizaciones internacionales que intentan armonizar dicha información, ésta sigue siendo una necesidad crítica. En la Tabla 1 se listan algunos recursos electrónicos útiles que contienen datos adecuados para la construcción de modelos de toxicología, siendo todos ellos públicos y accesibles gratuitamente.

Programas especializados para el desarrollo de QSTRs

Las etapas de desarrollo de un modelo QSAR son siempre similares:

- i) la base de datos inicial con información estructural y biológica precisa de cada uno de los compuestos que la componen se descompone aleatoriamente en dos grupos, “entrenamiento” y “validación”. El primero servirá para desarrollar el modelo, y el segundo para verificar su eficacia predictiva.

Tabla 1. Selección de bases públicas de datos toxicológicos disponibles gratuitamente.

Base de datos	Breve descripción	Página web de acceso
ACToR (Aggregated Computational Toxicology Resource)	Recopilación por la "US EPA Computational Toxicology Research Program", a partir de fuentes de información pública. Aporta datos toxicológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> sobre unos 500,000 productos químicos en el medio ambiente, sobre todo pesticidas y contaminantes terrestres y acuáticos.	www.epa.gov/actor
CCRIS (Chemical Carcinogenesis Research Information System)	Resultados de ensayos de carcinogenicidad y mutagenicidad para unos 8,000 compuestos químicos. Esta base fue desarrollada por el National Cancer Institute (NCI), a partir fundamentalmente de datos derivados de estudios citados en revistas científicas e informes de la propia NCI, y fue revisada por expertos en carcinogénesis y mutagénesis. Esta base no se actualiza desde 2011.	http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/ccris.htm
CPDB (Carcinogenic Potency Database)	Resultados de tests de carcinogenicidad a largo plazo en animales (ratones, ratas, perros, primates) para más de 1,500 compuestos químicos. No actualizada desde 2005.	http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/
DART (Developmental and Reproductive Toxicology Database)	Recopilación de la National Library of Medicine (NLM) que aporta información específica en toxicología reproductiva y del desarrollo publicada desde 1965.	http://www.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/dartfs.html
DSSTox (Distributed Structure-Searchable Toxicity Database)	Iniciativa de la EPA cuya principal característica es que propone un conjunto descentralizado de bases de datos de toxicidad navegables por estructura y que se pueden telecargar en formatos estándar como SDF.	http://www.epa.gov/nccet/dsstox/
GENE-TOX (Genetic Toxicology Data Bank)	Datos de mutagenicidad para unos 3,000 productos químicos de la EPA. Estos datos son revisados por un panel de expertos a partir de la literatura científica. Esta base no se ha actualizado desde 1998.	http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/genctox.htm
PAN (Pesticide Action Network) Database	Información sobre pesticidas a partir de muchas fuentes diversas, incluyendo toxicidad humana (aguda y crónica), ecotoxicidad e información regulatoria para unos 6,400 ingredientes activos de pesticidas y sus productos de transformación.	http://www.pesticideinfo.org/
RepDose (Repeated Dose Toxicity)	Base financiada por la CEFIC, con información de toxicidad aguda y crónica de unos 1,200 compuestos químicos en ratones, ratas y perros. Incluye valores en órganos concretos, y los estudios de cuyos datos se sirve están ordenados por su credibilidad, según su grado de cumplimiento de las reglas de la OCDE.	http://fraunhofer-rcpdose.de/
TETRATOX	Colección del Instituto de Agricultura de la Universidad de Tennessee (US), compuesta por datos de toxicidad acuática de más de 2,400 compuestos orgánicos de origen industrial usando el ciliado <i>Tetrahymena pyriformis</i> .	http://www.vet.utk.edu/TETRATOX/index.php
ToxRefDB (Toxicity Reference Database)	Contiene fundamentalmente información de toxicidad crónica-subcrónica y toxicidad reproductiva y del desarrollo de centenares de compuestos químicos, muchos de ellos ingredientes activos de pesticidas y otros productos que afectan al medio ambiente.	http://www.epa.gov/nccet/toxrefdb/

ii) A continuación los compuestos deben ser caracterizados por una serie de descriptores moleculares numéricos, de forma que cada una de las moléculas sea inequívocamente representada por los mismos.

iii) Aplicación de las técnicas estadísticas apropiadas al grupo de compuestos de entrenamiento para la generación de los modelos.

iv) Validación de los modelos mediante la evaluación de los parámetros estadísticos estandarizados obtenidos, y comprobación de la calidad de ajuste entre valores experimentales y predichos para el grupo de validación.

Los programas especializados necesarios en QSAR deben pues referirse tanto al cálculo de los descriptores numéricos necesarios para caracterizar las moléculas como a las técnicas estadísticas para el desarrollo de los modelos matemáticos. Los tipos de descriptores pueden ser muy variados, desde sencillas cuentas de características estructurales simples (p. ej. número de heteroátomos, de anillos aromáticos, etc.) o de determinados fragmentos o subestructuras (p. ej. número de grupos carbonilo, carboxilo, etc.), a propiedades fisicoquímicas (peso molecular, LogP, solubilidad, etc.), índices topológicos (que tienen en cuenta exclusivamente la estructura plana o grafo molecular) o índices tridimensionales que dependen de la conformación estructural. Existen cientos de ellos, y no hay una definición clara de cuáles son los mejores, pues codifican información diferente y los estudios comparativos realizados proveen resultados contradictorios [39]. No obstante, podemos considerar que los descriptores más simples son probablemente más prácticos porque permiten una rapidez de computación superior todo y manteniendo una capacidad predictiva equiparable, lo cual resulta de gran utilidad cuando se tienen que cribar posteriormente grandes bases de datos de miles de estructuras químicas [40]. En cuanto al

número de algoritmos y técnicas estadísticas útiles para llevar a cabo el modelado QSAR también es muy amplio (por ejemplo, regresión lineal, clustering, métodos kernel, análisis discriminante...), y su selección depende de la naturaleza del conjunto de datos con los que se trabaja, y el tipo de predicción que se desea extraer (clasificación binaria -tipo "activo/inactivo"-, estimación cuantitativa de toxicidad -por ejemplo de DL₅₀-, etc) [41,42].

Existe un panel muy amplio de programas especializados, tanto para el cálculo de descriptores como para la aplicación de métodos estadísticos, o bien paquetes que integran ambos aspectos del desarrollo de modelos QSAR [43]. Un aspecto importante a reseñar es que buena parte de estas herramientas están disponibles gratuitamente, y en un buen número de casos a través de páginas web de acceso público [44]. La Tabla 2 muestra una selección de programas y aplicaciones gratuitos para el desarrollo de modelos QSAR o la aplicación de modelos previamente desarrollados y validados.

Otras técnicas de química computacional

Acoplamiento molecular ("docking")

Existen distintos receptores intracelulares conocidos por su importancia en mediar en respuestas toxicológicas. En muchos casos, la toxicidad de los compuestos químicos se origina en su afinidad de unión hacia uno de estos receptores biológicos específicos, unión que resulta en una disfunción de procesos como biosíntesis, transducción de señales, transporte, metabolismo... Ejemplos de este tipo de receptores pueden ser el receptor glucocorticoide (cuya inhibición puede causar daños en el sistema inmune y diversas funciones corporales) o el gen hERG (cuya inhibición produce alteración cardíaca y arritmias).

Tabla 2. Selección de software gratuito para la generación y/o aplicación de modelos QSAR/QSTR.

Software	Breve descripción	Página web
CAESAR-VEGA	CAESAR fue un Proyecto financiado por la UE con el objetivo específico de desarrollar modelos QSAR adaptados a la legislación REACH. Cinco modelos predictivos fueron implementados para cinco propiedades de alta relevancia en REACH: factor de bioconcentración, sensibilización cutánea, carcinogenicidad, mutagenicidad, toxicidad del desarrollo. Dichos modelos fueron desarrollados según los principios OCDE, y se aplicaron diversas técnicas estadísticas y el uso de sets externos de validación para certificar su predictibilidad. Actualmente las herramientas CAESAR se han implementado en la plataforma VEGA.	http://www.caesar-project.eu/ http://www.vega-qsar.eu/
ChemProp	Consta de varios módulos, dependiendo de los métodos de cálculo que se desee utilizar. Las técnicas implementadas se basan fundamentalmente en la estructura química en 2D (fragmentos, índices topológicos, etc.). Se incorporan varios modelos a partir de bases de datos internas. Los modelos se acompañan de herramientas para caracterizar el dominio de aplicabilidad y proveer estimaciones de incertidumbre.	http://www.ufz.de/index.php?en=6738
CORAL-SEA	Interfaz simple, posibilidad de generar modelos de regresión o clasificación binaria, tiene el inconveniente de ser excesivamente lento para sets de compuestos excesivamente grandes (máximo análisis posible de 5,000 estructuras).	http://www.insilico.eu/coral/CORALSEA.html
QSAR-Toolbox	Es el programa oficial de la OCDE, y en consecuencia facilita al usuario el cumplimiento de las normas REACH. Se caracteriza sobre todo por la posibilidad de agrupar sustancias químicas en función de su similitud estructural, permitiendo el uso de datos experimentales existentes para cubrir vacíos de información.	http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm http://www.qsartoolbox.org
Lazar	Interfaz web a través de la cual se pueden generar diversas predicciones de toxicidad a partir de una estructura química. Incluye un informe racional sobre dichas predicciones, estimaciones del dominio de aplicabilidad y resultados de validación.	http://lazar.in-silico.ch/predict
RmSquare	Es una herramienta web para estimar la capacidad predictiva de un modelo a partir de datos sobre los valores experimentales y predichos en un grupo de estructuras reservadas para la validación.	http://aptsoftware.co.in/rmsquare/
TEST	Programa desarrollado por la EPA para estimar la toxicidad aguda a partir únicamente de la estructura de compuestos químicos. Se sirve de distintas técnicas QSAR, y consta de modelos de predicción variados: LC ₅₀ en <i>Fathead minnow</i> o <i>Daphnia magna</i> , DL ₅₀ oral en ratas, factor de bioconcentración, test de mutagenicidad de Ames, toxicidad del desarrollo, etc. También contiene modelos de predicción de diversas propiedades físicas (punto de ebullición, viscosidad, densidad, solubilidad en agua, punto de fusión, etc.)	http://www.cpa.gov/nrmrl/std/qsar/qsar.html#TEST
Tox-Comp	Sistema modular para la evaluación temprana de la cardiotoxicidad de nuevas entidades químicas. Esta plataforma consiste en varios elementos interconectados, entre los que destaca un calculador del potencial de inhibición de hERG.	http://tox-comp.net/
Toxtree	Aplicación "open-source" desarrollada por la compañía Ideacon Ltd. por encargo del Joint Research Center (JRC) de la Comisión Europea. Es una herramienta que agrupa las estructuras químicas por categorías y predice varios tipos de efectos tóxicos mediante la aplicación de árboles de decisión. Entre los modelos disponibles: irritación cutánea, irritación ocular, mutagenicidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (test de Ames), carcinogenicidad, biodegradación y persistencia, unión a DNA, unión a proteínas.	http://toxtree.sourceforge.net/
Virtual Computational Chemistry Laboratory	Acceso gratuito a través de la web a un conjunto de programas QSAR variados, que van desde el cálculo de descriptores moleculares numéricos (PCLIENT o E-DRAGON), herramientas estadísticas (ASNN, PNN o PLS) o modelos QSAR previamente desarrollados y listos para su aplicación (ALOGPS, software de referencia para la predicción de lipofiliidad y solubilidad acuosa de moléculas).	http://www.vcclab.org/
VirtualToxLab	Herramienta "on line" para la predicción del potencial toxicológico en 16 proteínas biológicas conocidas por su capacidad de desencadenar efectos adversos, usando una combinación de métodos computacionales (docking y QSAR)	http://www.chemic.unibas.ch/~vbc/molmod/virtualtox/index.html

En ese contexto, los estudios de acoplamiento molecular ("docking") pueden ser de una gran ayuda predictiva, pues permiten determinar computacionalmente la conformación óptima y la orientación preferidas por una molécula para unirse a uno de esos receptores y generar un complejo estable en el que la energía libre del sistema completo se ve minimizada. Los estudios de docking consisten generalmente en cuatro partes:

- i) en primer lugar, las estructuras de los ligandos potenciales han de ser diseñadas *in silico* y minimizadas.
- ii) un muestreo conformacional es llevado a cabo, de manera a tener un número predeterminado de conformaciones posibles de cada ligando,
- iii) los ligandos deben centrarse en el bolsillo ("pocket") de unión a su receptor, y diferentes movimientos de translación y rotación de las distintas conformaciones son evaluadas energéticamente, y
- iv) un "score" es asignado para cada una de ellas, con el fin de poder ordenar todas las hipótesis posibles en función de las interacciones establecidas y su energía [45].

En la práctica industrial lo habitual es que esta técnica se utilice como un cribado computacional para series con centenares o incluso miles de compuestos ("virtual screening").

Existe un buen número de programas de docking, de entre los que destacan DOCK -que fue el primer programa de docking descrito- (<http://dock.compbio.ucsf.edu/>) [46] y AutoDock -que es probablemente el programa de docking más citado- (<http://autodock.scripps.edu/>) [47]. Otra herramienta destacable es el VirtualToxLab, una plataforma diseñada en el "Biographics

Laboratory 3R", un organismo suizo de investigación para el reemplazo de ensayos con animales por métodos computacionales (<http://www.biograf.ch/>), que ha diseñado una estrategia combinando docking y QSAR para el estudio de 16 receptores cuya inhibición puede inducir efectos adversos [48].

Extrapolación por similitud estructural ("read-across")

La extrapolación de los datos de riesgo es un método bien conocido para predecir el perfil de peligrosidad de una sustancia vinculándolo a compuestos estructuralmente similares para los que se poseen datos experimentales sobre un efecto determinado [6,49]. Esta metodología se basa en la asunción bien establecida entre los químicos farmacéuticos de que características estructurales comunes conducen a propiedades similares [50]. Una predicción por extrapolación puede derivarse a partir de una propiedad de un compuesto o conjunto de compuestos estructuralmente similar(es) al que queremos predecir: por ejemplo, si se sabe de una determinada sustancia que es cancerígena, puede considerarse que otra muy similar estructuralmente tiene una alta probabilidad de serlo también. La predicción será tanto más fiable cuanto mayor sea el número de estructuras químicas similares agrupadas en una categoría. De modo análogo al QSAR/QSTR, uno de los criterios para que una predicción por read-across sea válida es que el producto químico candidato esté dentro del ámbito de aplicabilidad del modelo, es decir, dentro de los rangos de los descriptores y/o clases de sustancias químicas asociadas con el mecanismo propuesto.

A la diferencia del QSAR/QSTR, la metodología read-across es fundamentalmente cualitativa, y su piedra angular es la correcta identificación del producto químico de partida sobre el que se realiza

la medida de similitud. A este respecto, otros aspectos deben ser considerados además de la similitud química, para que el enfoque sea significativo es importante contar también con un modo común de acción y vías metabólicas similares. El read-across presenta la ventaja de que es una metodología transparente y se puede entender fácilmente, lo que favorece su aceptabilidad por los usuarios finales y las entidades reguladoras. El reglamento REACH permite de hecho el uso de la extrapolación de los datos toxicológicos de un producto químico para predecir la toxicidad de otro.

Un programa útil para la generación de predicciones por read-across es la QSAR-Toolbox, una herramienta disponible públicamente que permite la selección de análogos, la construcción de categorías según bases mecanicistas, inferir tendencias y realizar análisis de extrapolación/predicciones. Es una herramienta que forma parte del Proyecto QSAR de la OCDE y se co-desarrolló con la ECHA (www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdquantitativestructure-activityrelationshipsprojectqsars.htm), con el objetivo general de aumentar la aceptación reglamentaria de las predicciones *in silico*.

Relaciones estructura-actividad basadas en el conocimiento ("knowledge-based SAR systems")

Este enfoque se asocia con la reactividad de los grupos funcionales de los productos químicos, es decir los grupos que presentan el conjunto de rasgos estéricos y electrónicos de la estructura química que son responsables de la interacción con una diana biológica específica, induciendo así sus consiguientes efectos toxicológicos (grupos "toxicóforos"). Las características típicas de los toxicóforos son la hidrofobicidad, aromaticidad, carácter catiónico o aniónico, y la posibilidad de establecer puentes hidrógeno. El aspecto fundamental de esta metodología es partir de una base de conocimiento humano para establecer un conjunto de reglas codificadas que permitan predecir si un producto químico presenta una determinada toxicidad. Estos sistemas emiten alertas estructurales en las moléculas químicas consultadas cuando se identifican los toxicóforos para los que existe evidencia científica significativa. Las predicciones se apoyan en referencias o citas que se pueden seguir para determinar la relevancia de su idoneidad. El desarrollo de la base de conocimiento o base de reglas requiere obviamente de un análisis cuidadoso de extensas bases de datos, y representa esencialmente un enfoque basado en el consenso. Un inconveniente inherente a este enfoque es que los expertos humanos pueden estar equivocados o incluso inadvertidamente sesgados en la formulación de las reglas [51].

La principal ventaja es que la base de conocimientos utilizada para introducir normas en el sistema está basada en evidencias empíricas, por lo general vinculadas a una comprensión mecanicista de la toxicidad, y en las que se integra el juicio o razonamiento humano [52]. Una desventaja es que una característica subestructural es sólo una parte del conjunto más amplio de características de una molécula, y por tanto las predicciones pueden tender a sobreestimar la toxicidad porque no consideran potenciales características atenuantes o factores moduladores. Otro punto interesante es que en realidad la predicción negativa es inexistente: si no hay alerta estructural con la molécula de consulta, esto simplemente significa que no hay reglas que hayan sido codificadas en el programa para alertar de una toxicidad (porque no hay suficiente representación de la función subestructural en la literatura disponible con el fin de apuntar a ella como una característica de toxicidad).

Un malentendido frecuente es creer que los programas informáticos para los estudios del tipo "knowledge-based SAR systems" se limitan a contener y gestionar una base de datos de información sobre la

toxicidad. Eso no es así, estas aplicaciones no son simples sistemas de gestión de bases de datos, sino programas informáticos de alta complejidad que integran conocimientos y reglas de expertos derivadas del análisis de datos químicos y toxicológicos. Diversos programas informáticos generan alertas estructurales preventivas de la existencia de grupos toxicóforos [53,54], siendo el más popular y usado de ellos Derek Nexus de Lhasa Ltd. (www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm) [55]. La mayor parte de estos programas presentan un aspecto versátil, de manera que tienen una funcionalidad de edición personalizada de reglas para que el usuario pueda derivar las suyas propias en función de sus datos internos.

PBPK

Los efectos adversos y tóxicos de compuestos (contaminantes ambientales, fármacos, etc.) en los seres vivos dependen en buena medida de sus propiedades farmacocinéticas (ADME), es decir de cómo son absorbidos, se distribuyen por todo el organismo, y cómo se metabolizan y son finalmente excretados. El modelado PBPK (del inglés "physiologically-based pharmacokinetic modeling") es una técnica de simulación matemática de la farmacocinética de compuestos para la predicción de sus propiedades ADME, y se usa tanto para la investigación y desarrollo farmacéuticos, como para la evaluación de riesgos en la salud [56,57]. Es una metodología que pretende considerar las diferencias farmacocinéticas entre especies al estimar el riesgo humano a partir de los datos de animales, y las diferencias individuales intra-especie (edad, sexo, raza, etc.) al evaluar el impacto de la variabilidad farmacocinética en los riesgos individuales. En pocas palabras, el modelado PBPK intenta describir la relación entre las medidas externas de dosis aplicada (por ejemplo, cantidad suministrada de alimentos, drogas o fármacos, o bien concentración de contaminantes en el agua o el aire) y las medidas internas de la dosis encontrada (por ejemplo, cantidad metabolizada o concentración en el tejido que muestra la respuesta tóxica), utilizando de la forma más realista posible una descripción de la fisiología y la bioquímica de los animales/humanos [58].

Las aplicaciones en toxicología de los modelos PBPK se han incrementado en los últimos años, incluyendo la predicción de exposición a contaminantes ambientales y sus metabolitos, las concentraciones en órganos particulares de compuestos con potenciales efectos adversos, o el cálculo de las dosis apropiadas a suministrar de medicamentos a partir de la información sobre su mecanismo de acción. La mayor parte de estos modelos han sido desarrollados y validados con datos experimentales provenientes de ensayos con animales y extrapolados posteriormente al ser humano. Dada la tendencia a limitar los ensayos con animales, la información obtenida por esta vía es menor, y por tanto las técnicas *in vitro* están reemplazándolas [59]. Hay un gran interés en la extrapolación de datos de toxicidad *in vitro* con modelos PBPK para calcular las dosis equivalentes humanas para una concentración dada, y diversas publicaciones han dado cuenta de esta extrapolación *in vitro-in vivo* para evaluación del riesgo [60,61]. Aunque los modelos PBPK están diseñados para predecir las concentraciones tisulares o en sangre, se necesitan nuevos modelos de relación dosis-respuesta con base biológica que utilicen las estimaciones de las dosis internas para predecir la respuesta o toxicidad a través de correlaciones estadísticas. Este tipo de estudios ofrece una oportunidad única para incorporar información sobre mecanismos de acción.

En cuanto al software utilizado para este tipo de estudios, la referencia sin duda en este campo es GastroPlus, un paquete de simulación capaz de predecir la absorción, farmacocinética,

farmacodinamia e interacciones fármaco-fármaco para compuestos administrados por distintas vías (oral, ocular, intravenosa, pulmonar) a animales y humanos (<http://www.simulations-plus.com>) [62].

Perspectivas: nanotoxicología predictiva

En los últimos años la utilización de nanomateriales en diferentes sectores industriales está experimentando un incremento espectacular y sus aplicaciones en la vida real son cada vez más diversas. Sin embargo, existe un vacío de conocimiento enorme en la comprensión de los efectos tóxicos de estas nanopartículas, y la preocupación acerca de su seguridad es consiguientemente cada vez mayor. Las nanopartículas poseen propiedades únicas respecto a los productos químicos tradicionales, que se observan en la materia exclusivamente a nivel nanométrico, tales como su mayor superficie con respecto a su volumen, o su mayor capacidad de paso de las membranas biológicas. Estas propiedades físico-químicas ejercen una influencia importante en las interacciones con los sistemas biológicos, sobre todo porque al tener un tamaño comparable al de las macromoléculas los nanomateriales podrían estar involucrados en interacciones no observadas normalmente con los productos químicos tradicionales, y producir efectos en gran parte desconocidos, pero potencialmente tóxicos para las células [63].

Las metodologías computacionales pueden ayudar a entender las características intrínsecas de los nanomateriales y sus mecanismos de acción, pero su desarrollo se ha producido hasta ahora en base a la química clásica, y necesitan adaptarse a los parámetros de los nanomateriales para evaluar cuantitativamente sus riesgos y, en caso necesario, poder proponer soluciones de reemplazo de nanopartículas con efectos tóxicos por otras más seguras. Pueden citarse algunos ejemplos de trabajos predictivos utilizando docking/dinámica molecular para investigar la unión de fullerenos a canales de potasio [64] o la evaluación de la afinidad de fármacos a los nanotubos de carbono en un medio acuoso [65].

Las técnicas computacionales de naturaleza estadística como read-across o QSAR son las que más se han utilizado en nanomateriales. La mayor dificultad que presentan estos estudios es que las estructuras moleculares tienen que ser previamente caracterizadas por descriptores que se correlacionen con las propiedades experimentales, y en el caso de los nanomateriales esto es bastante complicado y no hay un conjunto único de descriptores numéricos adaptados a las partículas nanométricas [66]. El desarrollo y la validación de los modelos computacionales estadísticamente fiables son pues difíciles porque hasta ahora son raros los estudios geométricos, estructurales, físico-químicos y biológicos de los nanomateriales. Pese a ello, el número de modelos "Nano-QSAR" relevantes está creciendo significativamente, y entre ellos cabría destacar:

- i) Varios modelos han tratado la predicción de solubilidad de nanomateriales en distintos solventes, dado que éste es uno de los parámetros más influyentes sobre su comportamiento en el medioambiente. Destacaremos el trabajo de predicción de solubilidad de fullerenos con índices topológicos simples de Petrova *et al.* [67].
- ii) Liu y Hopfinger estudiaron los cambios estructurales de las membranas celulares después de la inserción de nanotubos de carbono, y desarrollaron modelos QSAR predictivos de la influencia de dichos nanotubos en la toxicidad [68].
- iii) Fourches *et al.* desarrollaron diferentes modelos con dos sets de moléculas nanométricas y diversos ensayos celulares *in vitro*: i) 51 nanopartículas conteniendo diversos núcleos metálicos, y ii) 109

nanopartículas compartiendo un mismo núcleo metálico pero presentando diferentes modificadores de superficie. Los modelos Nano-QSAR desarrollados a partir de estos compuestos tuvieron una alta capacidad predictiva, y pueden ser utilizados para priorizar el diseño y manufactura de nanomateriales más seguros [66].

En definitiva, los modelos Nano-QSAR están todavía en una fase incipiente, dada la falta de datos disponibles para su generación y la necesidad de desarrollar nuevos descriptores capaces de identificar claramente sus propiedades estructurales. No obstante los ejemplos citados dan buena muestra de sus posibilidades, y científicos, industriales y entidades nacionales deben armonizar esfuerzos para su desarrollo regulatorio [69, 70].

Conclusiones finales

Existe un interés creciente en el uso de las tecnologías computacionales para predecir la toxicidad. En la industria, estos métodos permiten evaluar nuevos compuestos en las fases más tempranas de su desarrollo. Presentan una serie de limitaciones frente al empleo de ensayos con animales, sobre todo la escasez de datos toxicológicos disponibles y la escasa explicación de mecanismos de acción que proporcionan algunos modelos excesivamente simplistas para parámetros complejos. Las predicciones *in silico* son particularmente difíciles debido a que la toxicidad es un fenómeno multidimensional, de modo que muchos efectos toxicológicos son el resultado de cambios en múltiples procesos fisiológicos. La fiabilidad de las predicciones a menudo no está documentada suficientemente para tomar decisiones seguras y justificar la renuncia a ensayos con animales. En consecuencia, se requieren nuevos modelos y un uso más crítico de los mismos para obtener predicciones sólidas que sean aceptables también desde un punto de vista normativo. Otro problema es la ausencia de la estandarización de la información disponible tanto para las bases de datos como para el software, inconveniente caracterizado no sólo por la "dispersión metodológica", sino también la geográfica, ya que los criterios para la estimación de los datos pueden variar notablemente entre países. Por tanto, la armonización, sistematización y estandarización de criterios y métodos empleados a nivel internacional son cruciales para el futuro cercano.

A pesar de esto, el uso cuidadoso de estas técnicas por parte de especialistas convenientemente formados podría conducir a una reducción de las pruebas con animales. Entre la gran variedad de usos potenciales se pueden citar las relacionadas con el entorno regulatorio, como la clasificación y el etiquetado de compuestos químicos, su evaluación de riesgos y el establecimiento de prioridades en función de la predicción de valores toxicológicos. Los modelos predictivos *in silico* han experimentado un auge notable tras las restricciones de ensayos con animales en áreas concretas como el desarrollo de cosméticos. La aceptación de estas técnicas bajo REACH requiere del cumplimiento de condiciones más restrictivas que las requeridas en los procesos internos en las industrias especializadas, como por ejemplo en el descubrimiento de fármacos. Esto es así porque se necesita garantizar la adecuación de los resultados a los fines regulatorios (es decir, evitando riesgos innecesarios para la salud humana y el medio ambiente). Una evaluación crítica, caso por caso y la discusión de la fiabilidad de los resultados es fundamental para dar credibilidad a estas metodologías.

En definitiva, la toxicología computacional está en una fase de desarrollo, pero ya hay muchos ejemplos de su aplicación exitosa.

Muchos científicos, reguladores y el público en general creen que ahora se necesitan nuevas y mejores formas de evaluar la toxicidad humana, y los avances tecnológicos están haciendo posible su aplicación incluso a nivel regulatorio. Su mejora se acompaña por la expansión del número de grandes bases de datos y de diferentes programas especializados, y dependerá de la integración armónica de las diferentes técnicas computacionales ya existentes. En la práctica regulatoria su uso ya es posible en la UE, y así la herramienta de registro IUCLID (International Uniform Chemical Information Database, <http://iuclid.eu/>), es una aplicación que permite capturar, gestionar e intercambiar datos sobre las propiedades de las sustancias químicas, preparar los dossiers con dichos datos y enviarlos a las autoridades competentes de los diferentes países) incluye la posibilidad de aportar predicciones de QSAR siempre que sigan las directrices de la OCDE y se presenten en un formato específico denominado “QSAR Model Reporting Format” (QMRF). Las técnicas computacionales deben desempeñar pues un papel clave en la UE para reducir los ensayos con animales a gran escala de productos químicos regulados por el reglamento REACH.

Bibliografía

- European Commission (2006) Regulation (EC) No 1907/2006 of The European Parliament and The Council of 18 December 2006. Off J Eur Union Lett 396:1-849.
- Van Heerden S (2012) Recent developments in global regulatory framework in the chemical industry. Popul Plast Packag 57:46-50.
- Rovida C, Hartung T (2009) Re-evaluation of animal numbers and costs for *in vivo* tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals: a report by the Transatlantic Think Tank for Toxicology (T⁴). ALTEX 26:187-208.
- Scholz S, Sela E, Blaha L, Braunbeck T, Galay-Burgos M, García-Franco M, Guinea J, Klüver N, Schirmer K, Tanneberger K, Tobor-Kapłon M, Witters H, Belanger S, Benfenati E, Creton S, Cronin MT, Eggen RI, Embry M, Ekman D, Gourmelon A, Halder M, Hardy B, Hartung T, Hübesh B, Jungmann D, Lampi MA, Lee L, Léonard M, Küster E, Lillicrap A, Luckenbach T, Murk AJ, Navas JM, Peijnenburg W, Repetto G, Salinas E, Schüürmann G, Spielmann H, Tollefsen KE, Walter-Rohde S, Whale G, Wheeler JR, Winter MJ (2013) A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. Regul Toxicol Pharmacol 67:506-530.
- Repetto G, Zurita JL, Jos A, del Peso A, Salguero M, Ríos JC, Repetto M (2005) Modelos alternativos *in vitro* para el estudio y la evaluación de neurotoxicidad. Rev Tox 22 (Suplemento).
- Nicolotti O, Benfenati E, Carotti A, Gadaleta D, Gissi A, Mangiatordi GF, Novellino E (2014) REACH and *in silico* methods: an attractive opportunity for medicinal chemists. Drug Discov Today (en prensa, DOI: 10.1016/j.drudis.2014.06.027.)
- Modi S, Hughes M, Garrow A, White A (2012) The value of *in silico* chemistry in the safety assessment of chemicals in the consumer goods and pharmaceutical industries. Drug Discov Today 17:135-142.
- Merlot C (2010) Computational toxicology - a tool for early safety evaluation. Drug Discov Today 15:16-22.
- Valerio LG Jr (2013) Predictive computational toxicology to support drug safety assessment. Methods Mol Biol 930:341-354.
- van de Waterbeemd H, Gifford E (2003) ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise?. Nat Drug Discov Rev 2:192-204.
- Dickins M, Modi S (2002) Importance of predictive ADME simulation. Drug Discov Today 7:755-756.
- Duart MJ, Antón-Fos GM, de Julián-Ortiz JV, Gozalbes R, Gálvez J, García-Domenech R (2002) Use of molecular topology for the prediction of physicochemical, pharmacokinetic and toxicological properties of a group of antihistaminic drugs. Int J Pharm 246:111-119.
- Gozalbes R, Pineda-Lucena A (2010) QSAR-based solubility model for drug-like compounds. Bioorg Med Chem 18:7078-7084.
- Gozalbes R, Jacewicz M, Annand R, Tsaïou K, Pineda-Lucena A (2011) QSAR-based permeability model for drug-like compounds. Bioorg Med Chem 19:2615-2624.
- Merlot C (2008) *In silico* methods for early toxicity assessment. Curr Opin Drug Discov Dev 11:80-85.
- Boyer S (2009) The use of computer models in pharmaceutical safety evaluation. Altern Lab Anim 37:467-475.
- García-Domenech R, de Julián-Ortiz JV, Duart MJ, García-Torrecillas JM; Antón-Fos GM; Ríos-Santamarina I; de Gregorio Alapont C, Gálvez J (2001) Search of a topological pattern to evaluate toxicity of heterogeneous compounds. SAR QSAR Environ Res 12:237-254.
- Fourches D, Barnes JC, Day NC, Bradley P, Reed JZ, Tropsha A (2010) Cheminformatics analysis of assertions mined from literature that describes drug-induced liver injury in different species. Chem Res Toxicol 23:171-183.
- Frid AA, Matthews EJ (2010) Prediction of drug-related cardiac adverse effects in humans-B: use of QSAR programs for early detection of drug-induced cardiac toxicities. Regul Toxicol Pharmacol 56:276-289.
- Obiol-Pardo C, Gomis-Tena J, Sanz F, Saiz J, Pastor M (2011) A multiscale simulation system for the prediction of drug-induced cardiotoxicity. J Chem Inf Model 51:483-92.
- Kar S, Roy K (2011) Development and validation of a robust model for prediction of carcinogenicity of drugs. Indian J Biochem Biophys 48:111-122.
- Valerio LG Jr, Cross KP (2012) Characterization and validation of an *in silico* toxicology model to predict the mutagenic potential of drug impurities. Toxicol Appl Pharmacol 260:209-221.
- Cronin MT (2002) The current status and future applicability of quantitative structure-activity relationships (QSARs) in predicting toxicity. Altern Lab Anim 30 (Suppl 2):81-84.
- MacDonald D, Breton R, Sutcliffe R, Walker JD (2002) Uses and limitations of quantitative structure-activity relationships (QSARs) to categorize substances on the Canadian Domestic Substance List as persistent and/or bioaccumulative, and inherently toxic to non-human organisms. SAR QSAR Environ Res 13:43-55.
- Yang C, Valerio LG Jr., Arvidson KB (2009) Computational toxicology approaches at the US Food and Drug Administration. Altern Lab Anim 37:523-531.

26. Valerio LG Jr (2011) *In silico* toxicology models and databases as FDA Critical Path Initiative toolkits. *Hum Genomics* 5:200-207.
27. Matthews EJ, Contrera JF (2007) *In silico* approaches to explore toxicity end points: issues and concerns for estimating human health effects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3:125-134.
28. Contrera JF, Matthews EJ, Kruhlak NL, Benz RD (2005) *In silico* screening of chemicals for bacterial mutagenicity using electrotopological E-state indices and MDL QSAR software. *Regul Toxicol Pharmacol* 43:313-323.
29. Matthews EJ, Kruhlak NL, Benz RD, Ivanov J, Klopman G, Contrera, JF (2007) A comprehensive model for reproductive and developmental toxicity hazard identification: II. Construction of QSAR models to predict activities of untested chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 47:136-155.
30. Contrera JF, Matthews EJ, Benz RD (2003) Predicting the carcinogenic potential of pharmaceuticals in rodents using molecular structural similarity and E-state indices. *Regul Toxicol Pharmacol* 38:243-259.
31. European Parliament Resolution on the Commission White Paper on Strategy for a future Chemicals Policy, COM (2001) 88-C5-0258/2001-2001/2118 (COS) in OJ C140E of 13.6.2002.
32. Tropsha A, Gramatica P, Gombar VK (2003) The importance of being earnest: validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models. *QSAR Comb Sci* 22:69-77.
33. Gramatica P (2013) On the development and validation of QSAR models. *Methods Mol Biol* 930:499-526.
34. Guidance document on the validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationships [(Q)SAR] models. OECD Environment Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 69, Paris 2007, (www.oecd.org/ehs/).
35. European Union (2012) Regulation (EU) No 528/2012 of The European Parliament and of The Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. *Off J Eur Union Lett* 167:1-123.
36. Matthews EJ, Contrera JF (1998) A new highly specific method for predicting the carcinogenic potential of pharmaceuticals in rodents using enhanced MCASE QSAR-ES software. *Regul Toxicol Pharmacol* 28:242-264.
37. Richard AM, Gold LS, Nicklaus MC (2006) Chemical structure indexing of toxicity data on the Internet: moving toward a flat world. *Curr Opin Drug Discov Dev* 9:314-325.
38. Fourches D, Muratov E, Tropsha A (2010) Trust, but verify: on the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. *J Chem Inf Model* 50:1189-1204.
39. Livingstone DJ (2000) The characterization of chemical structures using molecular properties. A survey. *J Chem Inf Comput Sci* 40:195-209.
40. Gozalbes R, Doucet JP, Derouin F (2002) Application of topological descriptors in QSAR and drug design: history and new trends. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2:93-102.
41. Nantasenamat C, Isarankura-Na-Ayudhya C, Prachayasittikul V (2010) Advances in computational methods to predict the biological activity of compounds. *Expert Opin Drug Discov* 5:633-654.
42. Gedeck P, Kramer C, Ertl P (2010) Computational analysis of structure-activity relationships. *Prog Med Chem* 49:113-160.
43. Toropov AA, Toropova AP, Raska I Jr, Leszczynska D, Leszczynski J (2014) Comprehension of drug toxicity: software and databases. *Comput Biol Med* 45:20-25.
44. Singla D, Dhanda SK, Chauhan JS, Bhardwaj A, Brahmachari SK, Open Source Drug Discovery Consortium, Raghava GP (2013) Open source software and web services for designing therapeutic molecules. *Curr Top Med Chem* 13:1172-1191.
45. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J (2004) Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 3:935-949.
46. Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, Langridge R, Ferrin TE (1982) A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol* 161:269-288.
47. Goodsell DS, Morris GM, Olson AJ (1996) Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J Mol Recognit* 9:1-5.
48. Vedani A, Smiesko M, Spreafico M, Peristera O, Dobler M (2009) *VirtualToxLab™* - *in silico* prediction of the toxic (endocrine-disrupting) potential of drugs, chemicals and natural products. Two years and 2,000 compounds of experience: a progress report. *ALTEX* 26:167-176.
49. Vink SR, Mikkers J, Bouwman T, Marquart H, Kroese ED (2010) Use of read-across and tiered exposure assessment in risk assessment under REACH - a case study on a phase-in substance. *Regul Toxicol Pharmacol* 58:64-71.
50. Patlewicz G, Ball N, Booth ED, Hulzebos E, Zvinavashe E, Hennes C (2013) Use of category approaches, read-across and (Q)SAR: general considerations. *Regul Toxicol Pharmacol* 67:1-12.
51. Guzelian PS, Victoroff MS, Halmes NC, James RC, Guzelian CP (2005) Evidence-based toxicology: a comprehensive framework for causation. *Hum Exp Toxicol* 24:161-201.
52. Valerio LG Jr, Long A (2010) The *in silico* prediction of human-specific metabolites from hepatotoxic drugs. *Curr Drug Discov Technol* 7:170-187.
53. Kazius J, McGuire R, Bursi R (2005) Derivation and validation of toxicophores for mutagenicity prediction. *J Med Chem* 48:312-320.
54. Judson PN (2006) Using computer reasoning about qualitative and quantitative information to predict metabolism and toxicity. In: Testa B, Krämer SD, Wunderli-Allenspach H, Folkers G (eds) *Pharmacokinetic profiling in drug research: biological, physicochemical, and computational strategies*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (Alemania). 183-215.
55. Marchant CA, Briggs KA, Long A (2008) *In silico* tools for sharing data and knowledge on toxicity and metabolism: Derek for Windows, Meteor, and Vitic. *Toxicol Mech Methods* 18:177-187.
56. Bartels M, Rick D, Lowe E, Loizou G, Price P, Spendiff M, Arnold S, Cocker J, Ball N (2012) Development of PK- and PBPK-based modeling tools for derivation of biomonitoring guidance values. *Comput Methods Programs Biomed* 108:773-788.
57. Chen A, Yarmush ML, Maguire T (2012) Physiologically based

- pharmacokinetic models: integration of *in silico* approaches with micro cell culture analogues. *Curr Drug Metab* 13:863-880.
58. Caldwell JC, Evans MV, Krishnan K (2012) Cutting edge PBPK models and analyses: providing the basis for future modeling efforts and bridges to emerging toxicology paradigms. *J Toxicol*, (Article ID 852384, 10 pages, doi:10.1155/2012/852384).
59. Kleinstreuer NC, Judson RS, Reif DM, Sipes NS, Singh AV, Chandler KJ, Dewoskin R, Dix DJ, Kavlock RJ, Knudsen TB (2011) Environmental impact on vascular development predicted by highthroughput screening. *Environ Health Perspect* 119:1596-1603.
60. Wetmore BA, Wambaugh JF, Ferguson SS, Sochaski MA, Rotroff DM, Freeman K, Clewell HJ 3rd, Dix DJ, Andersen ME, Houck KA, Allen B, Judson RS, Singh R, Kavlock RJ, Richard AM, Thomas RS (2012) Integration of dosimetry, exposure, and high-throughput screening data in chemical toxicity assessment. *Toxicol Sci* 125:157-174.
61. Clewell HJ, Andersen ME (2004) Applying mode-of-action and pharmacokinetic considerations in contemporary cancer risk assessments: an example with trichloroethylene. *Crit Rev Toxicol* 34:385-445.
62. Kuentz M, Nick S, Parrott N, Röthlisberger D (2006) A strategy for preclinical formulation development using GastroPlus as pharmacokinetic simulation tool and a statistical screening design applied to a dog study. *Eur J Pharm Sci* 27:91-99.
63. Zhu M, Nie G, Meng H, Xia T, Nel A, Zhao Y (2013) Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Acc Chem Res* 46:622-631.
64. Kraszewski S, Tarek M, Treptow W, Ramseyer C (2010) Affinity of C₆₀ neat fullerenes with membrane proteins: a computational study on potassium channels. *ACS Nano* 4:4158-4164.
65. Liu J, Yang L, Hopfinger AJ (2009) Affinity of drugs and small biologically active molecules to carbon nanotubes: a pharmacodynamics and nanotoxicity factor?. *Mol Pharm* 6:873-882.
66. Fourches D, Pu D, Tassa C, Weissleder R, Shaw SY, Mumper RJ, Tropsha A (2010) Quantitative nanostructure-activity relationship modeling. *ACS Nano* 4:5703-5712.
67. Petrova T, Rasulev BF, Toropov AA, Leszczynska D, Leszczynski J (2011) Improved model for fullerene C₆₀ solubility in organic solvents based on quantum-chemical and topological descriptors. *J Nanopart Res*, 13:3235-3247.
68. Liu J, Hopfinger AJ (2008) Identification of possible sources of nanotoxicity from carbon nanotubes inserted into membrane bilayers using membrane interaction quantitative structure-activity relationship analysis. *Chem Res Toxicol* 21:459-466.
69. Puzyn T, Leszczynska D, Leszczynski J (2009) Toward the development of "nano-QSARs": advances and challenges. *Small* 5:2494-2509.
70. Winkler DA, Mombelli E, Pietroiusti A, Tran L, Worth A, Fadeel B, McCall MJ (2013) Applying quantitative structure-activity relationship approaches to nanotoxicology: current status and future potential. *Toxicology* 313:15-23.