



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

DISEÑO Y DESARROLLO DE NUEVOS LIGANDOS A RECEPTORES DE MELATONINA

T E S I S

Que presenta:

M en C HUMBERTO L. MENDOZA FIGUEROA

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en la Especialidad de Farmacología

Directora de Tesis:

Dra. Martha Sonia Morales Ríos

Ciudad de México, Junio de 2017.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 30 del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la **Dra. Martha Sonia Morales Ríos** (smorales@cinvestav.mx) en el marco del Programa de posgrado de Farmacología con una beca otorgada por el CONACyT, con número de registro **CVU 217519**.

A mis hermanos y primos

Ing. Arq. Zambri Mendoza Figueroa
C. D. Ángel Neftalí Mendoza Figueroa
Dr. Noé Valentín Durán Figueroa
Ing. Met. Danny Durán Figueroa

*Su ejemplo de dedicación y superación siempre influyó positivamente en mis decisiones,
generando la motivación para enfrentar cualquier adversidad.*

“No es valiente aquel que no tiene miedo, sino el que sabe conquistarlo”
N. Mandela

Agradecimientos

La realización de este trabajo de tesis nunca hubiera sido posible sin el apoyo sobre ostentado de la **Dra. Martha Sonia Morales Ríos**, a quien agradezco infinitamente su dedicación a brindarme sus conocimientos y consejos, así como por aceptarme en su grupo de investigación. Pero sobre todo, agradezco la confianza depositada en mi persona.

Agradezco también, al jurado, por dedicar su valioso tiempo en la revisión de este escrito, siendo sus observaciones necesarias para el enriquecimiento de este trabajo. Aprovecho para expresarles mi profunda admiración y respeto.

Dra. Maria Estela Meléndez Camargo – ENCB-IPN

Dr. Hugo Alejandro Jiménez Vázquez – ENCB-IPN

Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo – CINVESTAV-IPN

Dr. Benjamín Floran Garduño – CINVESTAV-IPN

Agradezco el apoyo constante de los auxiliares de investigación, ya que sin su trabajo el desarrollo de la investigación no sería el adecuado.

QFB. Nadia Azucena Pérez Rojas – Espectrometría de Masas

QFB. Joel de Jesús Trujillo Serrato – Síntesis y Espectroscopia de IR

QFB. Yolanda Mora Pérez – Espectroscopia de RMN

QFB. Elvia Celina Álvarez Cisneros – Espectroscopia de RMN

QFB. Angelina Hernández Barragán – Difracción de Rayos X

El compañerismo, la amistad, solidaridad y honestidad fueron elementos que hicieron mi estancia durante el doctorado más llevadera y confortable, sobre todo en momentos difíciles. Por ello, agradezco a todos aquellos compañeros que compartieron su tiempo en las interminables pláticas constructivas, en especial a **Dr. Benjamín García, Dra. Daphne González, MC Gelacio M. Gudiño, MC Tonatiuh Benítez, MC Maria Trinidad Serrano, MC Erick Salinas y MC Saúl Frias.**

Es un hecho irrefutable que, sin el apoyo incondicional de mis padres, **Julia Figueroa Camargo** y **Ángel Mendoza García**, nada de lo académico se hubiera logrado. Siempre estaré agradecido por sus consejos y enseñanzas porque han trascendido de tal forma que siempre me esfuerzo en desempeñar de manera comprometida y con una alta responsabilidad ética las actividades sociales y académicas que realizo. Soy afortunado de contar con los consejos de personas de intachable calidad moral como ellos. Así mismo, quiero agradecer a mis hermanos por siempre confiar en mí y motivarme a seguir adelante.

Finalmente, agradezco a la **Dra. Verónica Moreno Hernández** por su comprensión, confianza y apoyo incondicional desde que la conocí. Gracias también, por permitirme compartir objetivos y aspiraciones en común, tanto profesionales como personales.

Productividad

Parte de los resultados obtenidos durante la realización del presente trabajo de tesis fueron publicados en el siguiente artículo:

Mendoza-Figueroa, H., Martínez-Gudiño, G., Villanueva-Luna, J. E., Morales-Ríos, M. S.*, Synthesis, pharmacophore modeling and theoretical conformational analysis in the gas phase and in aqueous solution of regioisomeric melatonin analogs. *J Mol Struct*, **2017**, 1133, 534-545.

Y presentados en los siguientes congresos nacionales:

1. **48° Congreso Mexicano de Química, 32° Congreso de Educación Química** Realizado por la Sociedad Química de México. *"Síntesis de Isotriptaminas por reordenamiento de cetenacetales"*. Guanajuato Gto., Agosto 2013. (Exposición Oral).
2. **10a. Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica.** Realizado por la Academia Mexicana de Química Orgánica. *"Síntesis de isotriptaminas y su evaluación como ligandos melatoninérgicos"*. San Luis Potosí, SLP., Mayo 2014. (Cartel).
3. **XXIII Congreso Nacional de Educación Química Farmacéutica Biológica y XIX Reunión Nacional de Estudiantes de Farmacia.** Realizado por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. *"Síntesis y caracterización fisicoquímica de 3-alkil-2-N-acetilriptaminas"*. México DF., Octubre 2014. (Cartel)
4. **XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas y VI Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas.** Realizado por la Asociación Farmacéutica Mexicana *"Análisis Conformacional de Feniletilamidas como Potenciales Ligandos Melatonérgicos"* Cancún, Q Roo., Septiembre 2015. (Cartel).

5. **52° Congreso Mexicano de Química y el 36° Congreso Nacional de Educación Química.** *"Mapeo farmacofórico y análisis conformacional de regioisómeros análogos a la melatonina"* Pachuca, Hgo., Septiembre 2016.
(Exposición Oral)

Summary/Resumen

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Diseño de Fármacos	1
1.1.1 Diseño racional de fármacos	2
1.2 Melatonina	5
1.2.1 Receptores a melatonina	9
1.3 Diseño de Ligandos Melatoninérgicos	13
1.3.1 Agonistas y antagonistas melatoninérgicos	15
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivos Específicos	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 Síntesis Química	26
5.1.1 Síntesis de 2-indolilcianomalonatos 5	27
5.1.2 Síntesis de 3-alkuil-2- <i>N</i> -acetiltriptaminas	33
5.1.2.1 Tratamiento del 2-acetonitrilindol 6b con MeI	35
5.1.2.2 Preparación de los 2-indolil- β -amidoésteres 936	
5.2 Modelado Molecular	37
5.2.1 Predicción del blanco terapéutico por topología molecular	38
5.2.2 Generación del diagrama de PEM	40
5.2.3 Mapas farmacofóricos	45

5.2.3.1 Hipótesis farmacofórica agonista y antagonista	45
5.2.3.2 Influencia de los enlaces de hidrógeno en las preferencias conformacionales	49
5.2.3.3 Alineamiento de las isotriptaminas 1b , 1e 1f y 1g con modelos agonista y antagonista	55
5.2.4 Modelado por homología de receptores MT1 y MT2	57
5.2.4.1 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos	58
5.2.4.2 Diseño y alineamiento 3D de los receptores MT1 y MT2	60
5.2.4.3 Validación funcional e identificación del sitio activo	63
5.2.5 Análisis docking de las 3-alkil-2- <i>N</i> -acetilriptaminas 1a-1d	65
5.2.6 Análisis docking dirigido de las <i>N</i> -carbometoxi isotriptaminas 9a-9d	67
5.2.6.1 Aminoácidos esenciales en el reconocimiento molecular de la MLT	69
5.2.6.3 Predicción de la energía del complejo proteína (MT1, MT2)-ligando (8S)- 9a-9d	70
5.2.6.3.1 Modo de unión sobre el receptor MT1	72
5.2.6.3.2 Modo de unión sobre el receptor MT2	73
6. CONCLUSIÓN	78
7. METODOS EXPERIMENTALES Y TEÓRICOS	
7.1 Química	80
7.1.1 Procedimientos generales	
7.1.1.1 Síntesis de 2-hidroxiindolinas 3a y 3b	81

7.1.1.2	Procedimiento general para la conversión de γ -hidroxiésteres 3 en γ -lactonas 4	83
7.1.1.3	Síntesis de la fenetil γ -lactona 4d	85
7.1.1.4	Procedimiento general para la conversión de γ -lactonas 4 en 2-indolilcianomalonatos de metilo 5	86
7.1.1.5	Procedimiento general para la conversión de 2-indolilcianomalonatos de metilo 5 en 2-acetonitrilindoles 6	88
7.1.1.6	Procedimiento general de hidrogenación catalítica de 2-acetonitrilindoles 6 para obtener las isotriptaminas 1	90
7.1.1.7	Procedimiento general de hidrogenación catalítica de 2-indolilcianomalonatos de metilo 5 para dar los 2-indolil- β -amidoésteres 9	92
7.1.1.8	Formación de 3-oxoisotriptaminas 7	94
7.1.1.9	Tratamiento del 2-acetonitrilindol 6b con MeI	95
7.2 Métodos Computacionales		
7.2.1	Búsqueda conformacional	97
7.2.2	Optimización de la geometría conformacional	97
7.2.3	Generación del diagrama de potencial electrostático molecular (PEM)	98
7.2.4	Mapeo del grupo farmacóforo	98
7.2.5	Modelado por homología de los receptores MT1 y MT2	99
7.2.6	Docking molecular	100

8. ANEXO	102
8.1 Datos de caracterización por RMN ^1H y ^{13}C	
8.2 Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C	127
8.3 Predicción de la energía del complejo proteína-ligando (8<i>R</i>)-9a frente a los receptores MT1 y MT2	171
8.4 Datos cristalográficos	172

ABREVIATURAS

5-HT_{2C}	Receptor 5-hidroxitriptamina (serotonina) 2C
AMP_c	Adenosina monofosfato cíclico
Bn	Bencilo
CAAD	Diseño de fármacos asistido por computadores
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
DFT	Teoría del funcional de la densidad
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
GMP_c	Guanosina monofosfato cíclico
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GTP_γS	Análogo no hidrolizable de guanosina trifosfato
HBA	Aceptor de enlaces de hidrógeno
HBD	Donador de enlaces de hidrógeno
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HMBC	Correlación heteronuclear multienlace
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple
LZ	Luzindol
MLT	Melatonina
PDB	Banco de datos de proteínas
PEM	Potencial electrostático molecular
PLC	Fosfolipasa C

QSAR	Relación cuantitativa estructura-actividad
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Desviación cuadrática media
RZR/ROR	Receptor nuclear retinoide huérfano/ Receptor de ácido retinoico
SNC	Núcleo supraquiasmático
NOESY	Espectroscopía nuclear Overhauser

SUMMARY

Melatonin (MLT) is a neurohormone mainly secreted by the pineal gland following a circadian rhythm. Numerous physiological effects of MLT are mediated via activation of the high-affinity G-protein-coupled MT1 and MT2 receptors subtypes, such as immune system regulation, blood pressure control, bone formation, and neuronal firing modulation. Therefore, current efforts in the drug discovery of melatonergic drugs are directed towards the development of selective agonists and antagonists of MT1 and MT2 receptors. In this context, Computed Assisted Drug Design (CADD) has become a widely used tool because it offers great promise to drastically reduce costs and time requirements for discovery of a potent drug.

In this work, experimental and theoretical studies have been devoted to the synthesis and development of alternate molecules capable of mimicking the MLT effects. For this purpose, ligand-based virtual screening methods were used aiming to explore essential features required for melatonergic activity and to determine important interaction patterns between melatonin receptors and ligands. The 3D structures of the MT1 and MT2 receptors were designed by homology, using the crystallographic coordinates of β_2 -adrenergic receptor (PDB 2RH1) as the template.

For ligand-based pharmacophoric modeling, high-affinity ligands were used as query molecules. Molecular modeling studies using the Polarizable Continuum Model (PCM), predicted that the most stable conformers of isotryptamines **1a-1d** meet the requirements for the antagonistic pharmacophore hypothesis. In order to investigate the binding interactions between *N*-carbomethoxy isotryptamines **9a-9d** and the active sites of both MT1 and MT2 receptors, molecular docking simulations were carried out using the Autodock tool. From these studies it was clear that isotryptamines **9a-9d** have higher binding affinities for the MT1 receptor than for the MT2 receptor. They also show binding free energies that are better than that resulting from the luzindole (selective antagonist) when docked with the MT1 receptor. The predominant interactions in the complex formed between **9a-9d** and MT1 were of the hydrophobic

binding nature, while the stabilization of the complex formed between **9a-9d** and MT2 was a combination of a network of hydrogen bonds and hydrophobic interactions

Based on these CADD studies, the novel 2-(*N*-acylaminoalkyl)indoles **1** and **9** (Figure 1), characterized by its good in silico predicted antagonist melatonergic activity, were synthesized. Subsequent integration of these studies with experimental routines might be performed later.

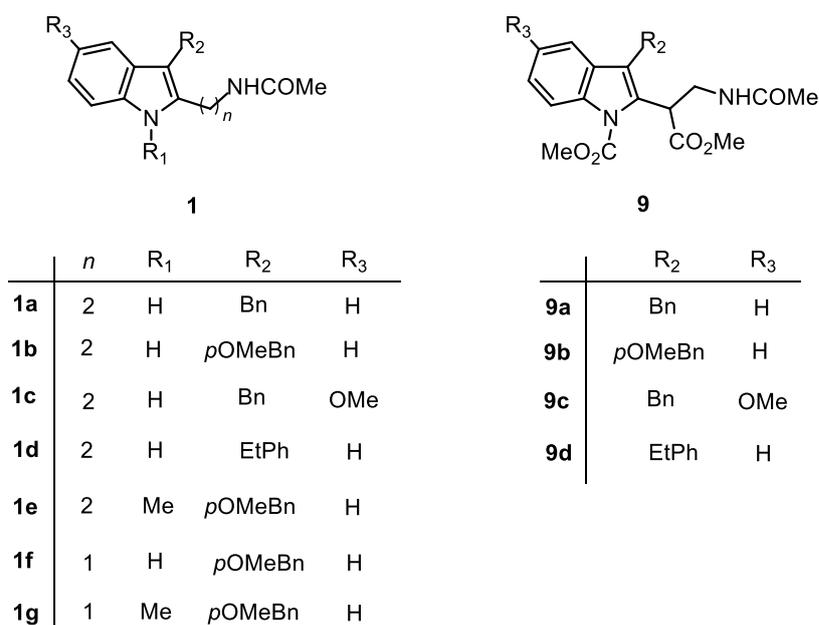


Figure 1. Novel 2-(*N*-acylaminoalkyl)indoles **1** and **9**

RESUMEN

La melatonina (MLT) es una neurohormona secretada principalmente por la glándula pineal siguiendo un ritmo circadiano. Numerosos efectos fisiológicos de la MLT son mediados a través de la activación de los subtipos de receptores MT1 y MT2 acoplados a proteínas G, tales como la regulación del sistema inmune, control de la presión arterial, la formación de hueso y la modulación del disparo neuronal. Por tales motivos, los esfuerzos actuales en el descubrimiento de fármacos melatoninérgicos están dirigidos al desarrollo de agonistas y antagonistas selectivos de los receptores MT1 y MT2, ya sea como herramientas farmacológicas o terapéuticas. Bajo este contexto, el diseño de fármacos asistido por computadora (<CADD>, por sus siglas en inglés) se ha convertido en una herramienta ampliamente utilizada, ya que ofrece una gran promesa de reducir drásticamente los costos y el tiempo requerido para el descubrimiento de fármacos potenciales.

Este trabajo está dirigido al diseño y síntesis de moléculas alternativas capaces de imitar los efectos de la MLT mediante estudios teóricos y experimentales. Para este propósito, se emplearon métodos de exploración virtual basados en ligandos bioactivos, con el objetivo de explorar las características esenciales requeridas para la actividad melatoninérgica, así como para determinar patrones de interacción molecular relevantes entre los receptores melatoninérgicos y los ligandos. Las estructuras 3D de los receptores MT1 y MT2 se diseñaron por homología, utilizando las coordenadas cristalográficas del receptor β_2 -adrenérgico (PDB: 2RH1) como plantilla.

Para el modelado farmacofórico se utilizaron ligandos de alta afinidad como moléculas de referencia. Los estudios de modelado molecular, usando el Modelo Continuo Polarizable (<PCM>), predijeron que los conformeros más estables de las isotriptaminas **1a-1d** cumplen con los requisitos de la hipótesis farmacófora antagonista. Con el fin de investigar las interacciones de unión entre las *N*-carbometoxi isotriptaminas **9a-9d** y los sitios activos de los receptores MT1 y MT2, se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular utilizando la herramienta Autodock. De estos

estudios resultó claro que las isotriptaminas **9a-9d** presentan afinidades de unión más altas para el receptor MT1 que para el receptor MT2. También muestran energías libres de unión que son mejores que aquellas que resultan del acoplamiento entre el luzindol (antagonista selectivo) y el receptor MT1. Las interacciones predominantes en el complejo formado entre **9a-9d** y MT1 fueron de carácter hidrófobo, mientras que la estabilización del complejo formado entre **9a-9d** y MT2 fue una combinación de una red de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.

Basándose en estos estudios CADD, se sintetizaron los nuevos 2-(*N*-acilaminoalquil)indoles **1** y **9** (Figura 1) que podrían actuar como antagonistas melatoninérgicos según las predicciones *in silico*. La integración subsecuente de estos estudios con rutinas experimentales podría ser realizada posteriormente.

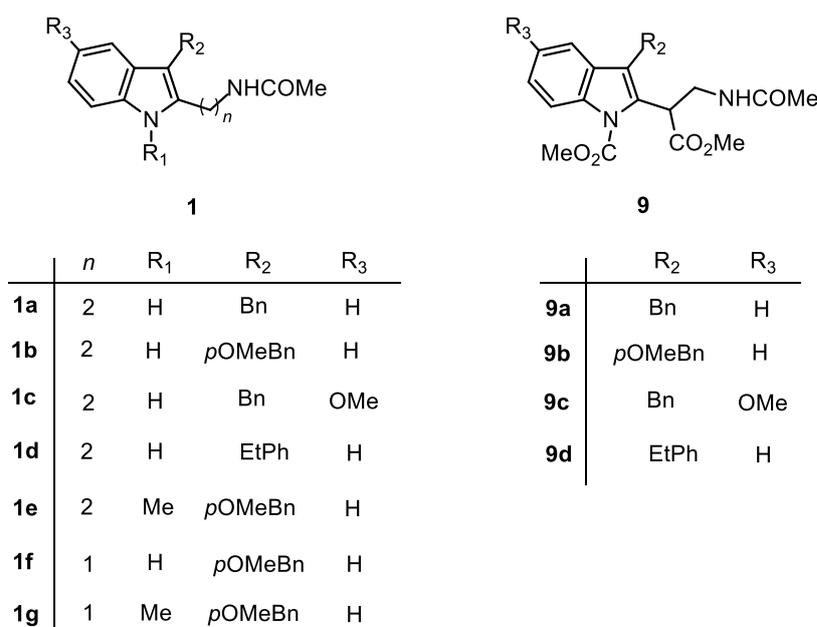


Figure 1. 2-(*N*-acilaminoalquil)indoles **1** and **9**

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diseño de Fármacos

Indiscutiblemente la naturaleza proporciona una fuente inagotable de compuestos químicos, muchos de los cuales son farmacológicamente activos, que están distribuidos y son biosintetizados por diversas plantas, hongos, insectos y animales superiores.¹ Por tanto, la importancia de los productos naturales radica en la propia función biológica en la que son biosintetizados, ya que pueden ser útiles por: *a)* su aplicación directa como fármacos, *b)* pueden ser utilizados en la producción de compuestos bioactivos novedosos por semisíntesis, *c)* son utilizados como herramientas farmacológicas en la identificación y reconocimiento de enfermedades² y *d)* son considerados como *estructuras privilegiadas* por tener la propiedad de ser reconocidos bioquímicamente por múltiples receptores proteicos y por lo tanto, exhibir múltiples actividades biológicas.³ Con raras excepciones, las moléculas disponibles para uso humano antes del siglo XX fueron obtenidas principalmente de fuentes naturales y su aplicación terapéutica fue relacionada por ensayo–error o serendipia.⁴ El concepto del diseño de fármacos cambió drásticamente con el desarrollo de métodos de síntesis química y la evolución de los métodos de instrumentación analítica.⁵

La síntesis química se convirtió en el punto convergente entre el descubrimiento de nuevos fármacos y su aplicación clínica,⁶ papel que sigue desempeñando hoy en día

¹ Bauer A., Brönstrup M., Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Nat Prod Rep* (2014), 31, 35-60.

² Koehn F. E., Carter G. T., The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Rev Drug Discov* (2005), 4, 206-220.

³ Welsch M. E., Snyder S. A., Stockwell B. R., Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* (2010), 14, 347–361.

⁴ Drews J., Drug discovery: A historical perspective. *Science* (2000) 287, 1960-1964.

⁵ Havlicek V. and Spizek J., Natural products analysis: Instrumentation, methods, and applications. *John Wiley & Sons* (2014).

⁶ MacCoss M., Baillie T. A., Organic chemistry in drug discovery. *Science* (2004), 303, 1810-1813.

ya que permite obtener fármacos basados en productos naturales que son escasos o inaccesibles, así como modificar las propiedades farmacocinéticas de moléculas ya existentes. Sin embargo, la demanda industrial y el claro compromiso de ofrecer fármacos más selectivos, potentes, menos tóxicos, en menor tiempo y a bajo costo han propiciado una reconsideración de los métodos tradicionales en el descubrimiento de fármacos.⁷ Para cumplir con estos retos fue indispensable considerar un enfoque multidisciplinario que sustentó las bases para el diseño racional de fármacos. Así, el desarrollo de la biología molecular y en particular de las ciencias genómicas, está teniendo un profundo impacto en el descubrimiento de biofármacos (proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales) que han enriquecido enormemente las opciones terapéuticas. Además, las ciencias genómicas junto con herramientas bioinformáticas y biomarcadores sintéticos, permiten establecer la base genética de las enfermedades multifactoriales y determinar los puntos más adecuados de ataque para futuros medicamentos, aumentando el número de alternativas quimioterapéuticas.

1.1.1 Diseño Racional de Fármacos

El diseño racional de nuevos fármacos es cada vez más popular y tiende a sustituir los métodos clásicos en el que se sintetizan nuevas moléculas basadas en la intuición química y experiencia experimental. Existen varios factores que contribuyeron a la preferencia del diseño racional en comparación con el enfoque clásico:⁸

1. El avance de la bioinformática;
2. El desarrollo de paquetes estadísticos que pueden incorporar bases de datos que contienen datos teóricos y experimentales que son sometidos a la relación cuantitativa de estructura–actividad (métodos QSAR);

⁷ Cressey D., Traditional drug-discovery model ripe for reform. *Nature* (2011), 471, 17-18.

⁸ Hongmao S., A practical guide to rational drug design. *Elsevier Ltd.* (2015), ISBN: 978-0-08-100105-9.

3. El desarrollo de nuevas técnicas experimentales de caracterización estructural de objetivos biológicos (es decir, la cristalografía de rayos X y espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear, RMN);
4. Nuevas metodologías de cálculos teóricos empleando mecánica molecular y mecánica cuántica para la optimización de la geometría y el cálculo de la energía total del sistema ligando–receptor o individual;
5. La correcta caracterización molecular del mecanismo de acción de los fármacos, gracias a los avances en enzimología, biología molecular, farmacocinética y farmacodinámica; por mencionar sólo unos pocos campos representativos que experimentaron grandes pasos en su desarrollo;
6. La aplicación de metodologías de búsqueda conformacional (Dinámica Molecular y simulaciones por Monte Carlo);
7. Las simulaciones del sistema ADMET (adsorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) también han contribuido de manera significativa al desarrollo de fármacos.

En general los factores enlistados previamente persiguen un objetivo común, fundamental para que el diseño de un fármaco sea exitoso; esto se refiere a consolidar de manera efectiva la complementariedad fisicoquímica del complejo ligando–receptor.

Ya que los receptores, o biomoléculas, juegan un papel crítico en la progresión de las enfermedades mediante la comunicación a través de interacciones proteína–proteína o proteína–ácido nucleico que llevan al desencadenamiento de eventos y/o alteración de los procesos metabólicos de señalización, es potencialmente benéfica la modulación de sus funciones biológicas con el uso de moléculas orgánicas que puedan competir por el sitio de unión (en el receptor) con los ligandos naturales

inhibiendo las vías de señalización o activando otras según lo requiera el padecimiento a considerar.⁹

A pesar que el descubrimiento de medicamentos ha aumentado significativamente gracias a la disponibilidad de las estructuras tridimensionales de biomoléculas obtenidas por difracción de rayos X, por RMN, por modelado molecular (*docking*), y por el desarrollo de metodologías asistidas por computadora, se siguen enfrentando cuatro escenarios principales que pueden ser resueltos por las diversas estrategias que involucra el diseño racional de fármacos:¹⁰ 1) existen casos en los que no hay información disponible de la estructura terciaria del receptor y por lo tanto de la conformación bioactiva de sus ligandos; 2) se conoce la estructura tridimensional del receptor pero ha sido construida por homología con un receptor cristalizado; 3) se conoce plenamente la estructura cristalina del receptor; 4) se conoce la estructura cristalina del complejo ligando–receptor. Específicamente, las propiedades de las nuevas moléculas pueden ser deseables o en su caso definidas dependiendo de la información experimental de sus receptores.

Particularmente, en el presente trabajo de investigación se abordó el diseño de ligandos melatoninérgicos. Esta línea de investigación de acuerdo a los resultados teóricos y experimentales hasta ahora descritos se encuentra en un panorama de tipo 2 y la estrategia a seguir para el diseño de nuevos ligandos involucra: a) cálculos

⁹ Fuller J. C., Burgoyne N. J., Jackson R. M., Predicting druggable binding sites at the protein–protein interface. *Drug Discov Today* (2009), 14, 155–161.

¹⁰ El diseño racional no sigue una estrategia determinada; sin embargo, la estrategia a seguir para un sistema específico de estudio es una consecuencia de la experiencia del investigador, del grupo multidisciplinario o del nivel de conocimiento de los procesos moleculares que rigen algún padecimiento. En las siguientes revisiones se desarrollan estrategias de diseño de nuevos fármacos dependiendo del escenario en el que se encuentre el problema a abordar. a) Mandal S., Moudgil M., Mandal S. K., Rational drug design. *Eur J Pharmacol* (2009), 62, 590-100. b) Mavromoustakos T., Durdagi S., Koukoulitsa C., Simcic M., Papadopoulos M.G., Hodoscek M., Grdadolnik S. G., Strategies in the rational drug design. *Curr Med Chem* (2011), 18, 2517-2530. c) Nepali K., Sharma S., Sharma M., Bedi P. M. S., Dhar K. L., Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *Eur J Med Chem* (2014), 77, 422-487. d) Bullock Lao B., Drew K., Guarracino D. A., Brewer T. F., Heindel D. W., Bonneau R., Arora P. S., Rational desing topographical helix mimics as potent inhibitors of protein-protein interactions. *J Am Chem Soc* (2014), 136, 7877-7888. e) Chen H., Zhou X., Wang A., Zhen Y., Gao Y., Zhou J., Evolutions in fragment-based drug design: the deconstruction-reconstruction approach. *Drug Discov Today* (2015), 20, 105-113.

teóricos y su relación con experimentos de RMN; b) simulaciones *in silico*, docking molecular; c) simulaciones de dinámica molecular en diferentes ambientes; d) análisis de las propiedades biofísicas de las moléculas y e) estudios QSAR–3D (Figura 1).¹⁰ Por tanto en el siguiente capítulo se describe la importancia y la necesidad de diseñar y sintetizar nuevas moléculas orgánicas que mimeticen la actividad endógena de la melatonina.

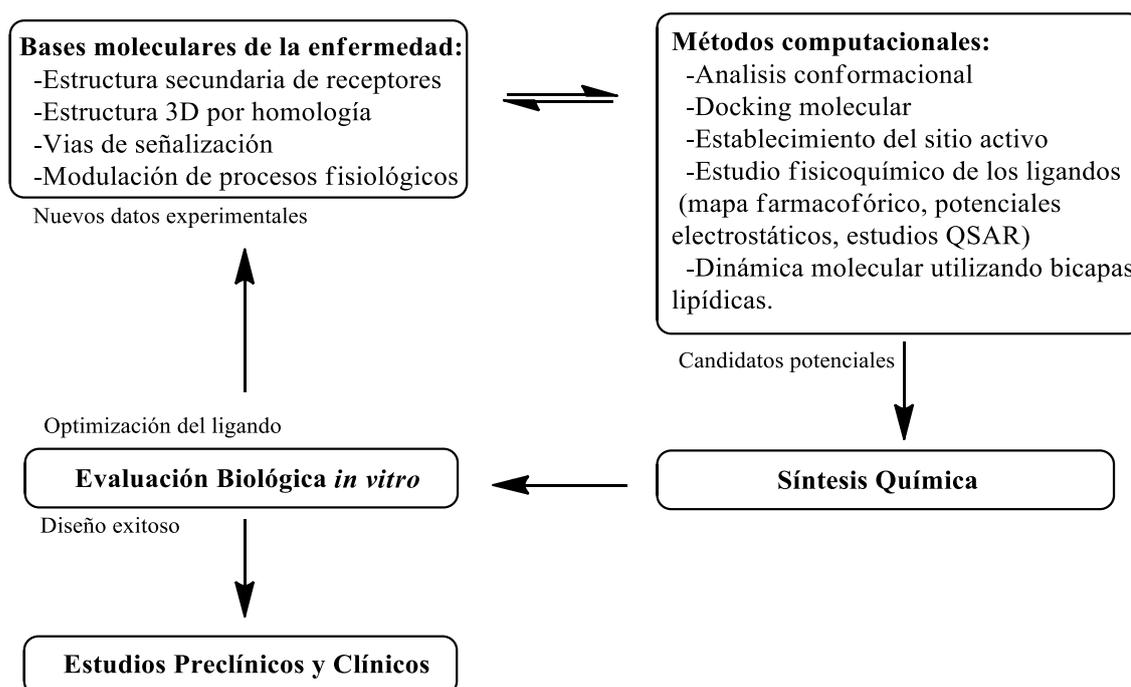


Figura 1. Estrategia general para el diseño racional de ligandos melatoninérgicos.

1.2 Melatonina

La melatonina (MLT) fue aislada en 1958 por Aron B. Lerner y colaboradores¹¹ de tejido pineal bovino. Su nombre está relacionado con el primer experimento de actividad al que fue sometida, donde mostró efecto aclarante de células melanóforas dérmicas de anfibios como resultado de la promoción en la agregación de gránulos de melanina;¹² basado en este efecto, el nombre fue compuesto por *mela* y *tonina*

¹¹ Lerner A. B, Case J. D., Takahashi Y., Lee T. H., Mori W., Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* (1958), 80, 2587–2592.

¹² McCord C. P., Allen F. P., Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* (1917), 23, 207–224.

por su relación estructural a la serotonina. Un año después de su aislamiento fue dilucidada su estructura química, que corresponde a un derivado indólico, específicamente, a *N*-acetil-5-metoxitriptamina (Figura 2).¹³

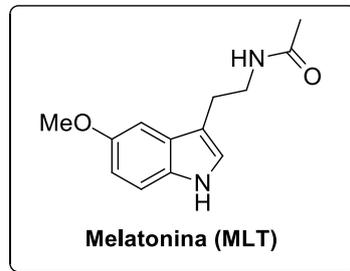


Figura 2. Estructura química de la melatonina.

El precursor biosintético de MLT es el aminoácido triptófano que es tomado de la circulación sanguínea por los pinealocitos. Ya internalizado le ocurre una hidroxilación aromática formando el 5-hidroxitriptófano, posteriormente por acción de la 5-hidroxitriptofano descarboxilasa (5HTPD) se forma la serotonina.

La MLT se sintetiza principalmente en la glándula pineal por las células parenquimatosas en respuesta a la estimulación luminosa recibida a través de vías retinohipotalámicas. La intensidad luminosa alcanza el núcleo supraquiasmático (SCN), núcleo donde es regulado el ciclo circadiano. Esto permite la sincronización de las fases del ciclo circadiano con el periodo de luz–oscuridad. La información relacionada con el tiempo pasa desde el SCN al ganglio cervical superior y finalmente a la glándula pineal. Esta vía es estimulada durante la noche y la actividad de la región cervical superior es inhibida por la estimulación de luz. La noradrenalina es secretada por las terminales nerviosas de la región cervical superior y activa los β -receptores en la glándula pineal. Como resultado, la síntesis de AMPc aumenta, lo que a su vez aumenta la actividad de las enzimas aralkilamina *N*-acetiltransferasa (AANAT) y serotonina *N*-acetiltransferasa (NAT), enzimas limitantes de la velocidad en la síntesis de melatonina. Estas enzimas convierten la serotonina en *N*-acetilserotonina que con la ayuda adicional de la hidroxiindol-*O*-metiltransferasa

¹³ Lerner A. B., Case J. D., Structure of melatonin. *J Am Chem Soc* (1959), 81, 6084-6085.

(HIOMT), también conocida como serotonina acetil *N*-metiltransferasa (ASMT), se convierte en melatonina (Figura 3).¹⁴

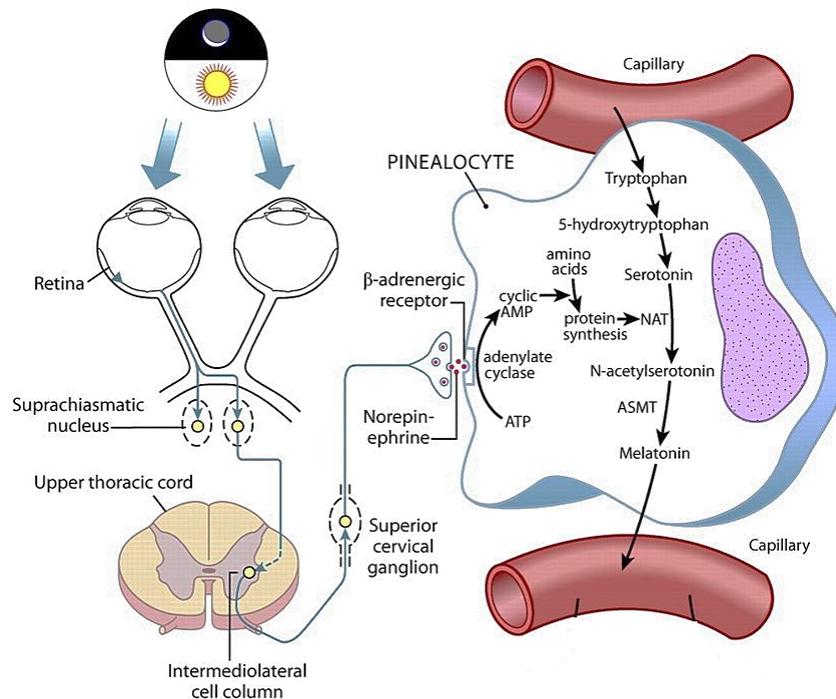


Figura 3. Biosíntesis de melatonina [tomada de *Biology of Reproduction* (2009), 81, 445].

La MLT circulante se metaboliza principalmente en el hígado por una C6-hidroxilación aromática y posterior conjugación de sulfato. Una reacción metabólica menos frecuente es una desmetilación a *N*-acetilserotonina.¹⁵ En tejidos extrahepáticos puede ocurrir una metabolización enzimática de desacetilación de 5-metoxitriptamina. Por otra parte, puede también experimentar biotransformaciones oxidativas no enzimáticas y enzimáticas. Por ejemplo, en el cerebro, ocurre una ciclización oxidativa produciendo 3-hidroximelatonina cíclica¹⁶ que tras la apertura del tercer anillo heterocíclico forma *N*1-acetil-*N*2-formil-5-metoxikinuramina (AFMK)

¹⁴ a) Reiter R. J., Tan D. X., Galano A., Melatonin: exceeding expectations. *Physiology* (2014), 29, 325-333. b) Singh M., Jadhav H. R., Melatonin: functions and ligands. *Drug Discov Today* (2014), 19, 1410-1418. c) Reiter R. J., Tan Dun-Xian, Manchester L. C., Paredes S. D., Mayo J. C., Sainz R. M., Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod* (2009), 81, 445-456. d) Hickman A. B., Klein D. C., Dyda F., Melatonin biosynthesis: The structure of serotonin *N*-acetyltransferase at 2.5 Å resolution suggests a catalytic mechanism. *Molecular Cell* (1999), 3, 23-32.

¹⁵ Pandi-Perumal S. R., Srinivasan V., Maestroni G. J. M., Cardinali D. P., Poeggeler B., Hardeland R., Melatonin: nature's most versatile biological signal?. *FEBS J* (2006), 273, 2813-2838.

¹⁶ Tan D. X., Manchester L. C., Reiter R. J., Plummer B. F., Hardies L. J., Weintraub S. T., Vijayalaxmi Shepherd A. M., A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* (1998), 253, 614-620.

y la posterior reacción de desformilación genera la M1-acetil-5-metoxikinuramina (AMK).¹⁷ Estos metabolitos son de suma importancia porque tienen una alta capacidad antioxidante al igual que MLT. Se prevé que la AMK sea mejor que la MLT frente a radicales hidroxilo aunque su eficiencia de eliminación depende de la naturaleza química del radical con el que reaccione.¹⁸

A la MLT se le han atribuido numerosos efectos fisiológicos en los animales, por ejemplo, modula el sistema cardiovascular¹⁹ e inmunológico,²⁰ la biogénesis ósea,²¹ la secreción de hormonas,²² el ritmo circadiano y el sueño, todo esto mediado por la estimulación de sus receptores.⁴ Por tal motivo la MLT se ha propuesto como un agente terapéutico en una variedad de estados patológicos (molécula multipropósito),²³ tales como trastornos del sueño,²⁴ trastornos psiquiátricos,²⁵

¹⁷ Hirata F., Hayaishi O., Tokuyama T., Seno S., In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem* (1974), 249, 1311-1313.

¹⁸ a) Cavanaugh J. E., Witt-Enderby P. A., CNS melatonin receptors and signaling: focus on ageing related disease and future perspective. *Open Neuroendocrinol J* (2010), 3, 96-104. b) Hardeland R. Tan D. X., Reiter R. J., Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amine. *J Pineal Res* (2009), 47, 109-126. c) Tan D. X., Manchester L. C., Reiter R. J., Plummer B. F., Limson J., Qi W., Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radical Bio Med* (2000), 29, 1177-1185.

¹⁹ Scheer F. A., Van Montfrans G. A., Van Someren E. J., Mairuhu G., Buijs R. M., Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension. *Hypertension* (2004), 43, 192-197.

²⁰ Carrillo-Vico A., Reiter R. J., Lardone P. J., Herrera J. L., Fernandez-Montesinos R., Guerrero J. M., Pozo D., The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Invest Drugs* (2006), 7, 423-431.

²¹ Satomura K, Tobiume S., Tokuyama R., Yamasaki Y., Kudoh K., Maeda E., Nagayama M., Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res* (2007), 42, 231-239.

²² Bae Sung-Eun, Wright I. K., Wyse C., Samson-Desvignes N., Le Blanc P., Laroche S., Hazlerigg D. G., Johnston J. D., Regulation of pituitary MT1 melatonin receptor expression by gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and early growth response factor-1 (Egr-1): in vivo and in vitro studies. *PLOS One* (2014), 9, e90056.

²³ Reiter R. J., Dun-Xian T., Fuentes-Broto L., Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* (2010), 181, 127-151.

²⁴ a) Keijzera H., Smits M. G., Duffy J. F., Curfsb L. M. G., Why the dim light melatonin onset (DLMO) should be measured before treatment of patients with circadian rhythm sleep disorders. *Sleep Med Rev* (2014), 18, 333-339. b) Turek, F. W.; Gillette, M. U., Melatonin, sleep, and circadian rhythms: rationale for development of specific melatonin agonists. *Sleep Med* (2004), 5, 523-532.

²⁵ Maldonado M. D., Perez-San-Gregorio M. A., Reiter R. J., The role of melatonin in the immuno-neuro-psychology of mental disorders. *Recent Pat CNS Drug Discov* (2009), 4, 61-69.

cáncer,²⁶ enfermedades neurodegenerativas,²⁷ además recientemente se ha estudiado su aplicación en el tratamiento de la diabetes.²⁸

Un rasgo que caracteriza a la MLT es la variedad de mecanismos que emplea para modular la fisiología y la biología molecular de las células. Si bien muchas de estas acciones están mediadas por los receptores que activa, otras propiedades se las confiere el grupo indol, como la interacción con receptores nucleares huérfanos y con otras macromoléculas, por ejemplo, la calmodulina, en el citosol. En la siguiente sección de este capítulo se abordarán las características principales de los receptores a melatonina y las vías de señalización que desencadenan.

1.2.1 Receptores a Melatonina

Los efectos fisiológicos y farmacológicos que ejerce la MLT están mediados, principalmente, por la activación de receptores transmembranales acoplados a proteína G, receptores de tipo 1 (MT1) y de tipo 2 (MT2) pertenecen a este grupo de GPCR's. También se han encontrado sitios de unión en receptores nucleares como RZR/ROR α y RZR/ROR β .²⁹ Aunque la discusión respecto a otros sitios de unión sigue incompleta, se han encontrado otros en diferentes partes de la célula: en el citosol se

²⁶ a) Hevia D., González-Menéndez P., Quiros-González I., Miar A., Rodríguez-García A., Tan Dun-Xian, Reiter R. J., Mayo J. C., Sainz R. M., Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer. *J Pineal Res* (2015), 58, 234–250. b) Di Bella G., Mascia F., Gualano L., Di Bella L., Melatonin anticancer effects: review. *Int J Mol Sci* (2013), 14, 2410–2430. c) Shi-Young P., Won-Jon J., Eui-Yeun Y., Yung-Jin K., Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under hypoxia. *J Pineal Res*, (2010), 48, 178-184. d) Wang J., Xiao X., Zhang Y., Shi D., Chen W., Fu L., Liu L., Xie F., Kang T., Huang W., Deng W., Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *J Pineal Res*, (2012), 53, 77-90.

²⁷ a) Pandi-Perumal S. R., BaHammam A. S., Brown G. M., Spence D. W., Bharti V. K., Kaur C., Hardeland R., Cardinali D. P., Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox Res* (2013), 23, 267-300. b) Suzen S., Sezen S., Coban T., Synthesis and comparison of antioxidant properties of indole-based melatonin analogue indole amino acid derivatives. *Chem Biol Drug Des*, (2012), 79, 76-83.

²⁸ Zibolka J., Mühlbauer E., Peschke E., Melatonin influences somatostatin secretion from human pancreatic δ -cells via MT1 and MT2 receptors, *J Pineal Res* (2015), 58, 198-209.

²⁹ Slominskia R. M., Reiter R. J., Schlabritz-Loutsevitch N., Ostroma R. S., Slominskib A. T., Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Mol. Cell Endocrinol* (2012), 35, 152-166.

localizó un sitio de unión en una enzima quinona reductasa (MT3),³⁰ en las membranas (GPR50), y en las mitocondrias.³¹

Los receptores MT1 y MT2 están compuestos por siete dominios α -hélice transmembranales y están expresados en el hipotálamo, la glándula pituitaria, corteza cerebral, tálamo, hipocampo, cerebelo, la córnea y retina, arterias, corazón, pulmones, hígado, riñón, glándula adrenal, piel y linfocitos. Los mecanismos de señalización intracelular que se desencadenan al activar los receptores difieren considerablemente, dependiendo del tejido estimulado. La vía más común para ambos receptores es la inhibición de la síntesis de AMPc por efecto de la activación de la proteína G_i .³²

Específicamente los receptores MT1 se expresan en retina, ovario, testículo, glándula mamaria, las arterias coronarias, aorta, vesícula biliar, hígado y riñón.³³ El receptor a melatonina tipo 1 humano fue clonado hace casi 20 años y está constituido por 350 aminoácidos.³⁴ La activación de este receptor inhibe la adenilato ciclasa, disminuyendo la producción de AMPc y reduciendo la actividad de la proteína cinasa. El resultado de estos eventos es la fosforilación de proteínas que funcionan como factor de transcripción (CREB). El receptor MT1 también activa la fosfolipasa, que regula el flujo de iones dentro de la célula.^{23, 24}

Por otro lado, el receptor MT2 fue clonado en 1995 demostrando que el cDNA del receptor codifica para una proteína de 362 aminoácidos, que es 60% idéntica en el

³⁰ Nosjean O., Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin J. M., Lefoulon F., Delegrande P., Canet E., Boutin J. A., Identification of the melatonin binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* (2001), 275, 31311–31317.

³¹ Hardeland R., Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *BioFactors* (2009), 35, 183–192.

³² Dubocovich M., Markowska M., Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* (2005), 27, 101–110.

³³ Slominski M.R. et al., Melatonin membrane receptors in peripheral tissue: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* (2012), 351, 152–166.

³⁴ Reppert S. M., Weaver D. R., Ebisawa T., Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* (1994), 13, 1177–1185.

nivel de aminoácidos con el receptor MT1.³⁵ La activación de MT2 por su ligando natural (MLT) inhibe la adenilato ciclasa y disminuye cAMP. A través del receptor MT2, la melatonina también inhibe la adenilato ciclasa reduciendo la formación de cGMP; además, a través de la vía de la fosfolipasa C (PLC), la melatonina afecta a la proteína quinasa que es responsable de flujo de iones dentro de la célula.³⁶

El receptor MT3 aún no ha sido identificado en humanos, aunque se expresan en hámster principalmente en el hígado y riñón, en menor proporción en el corazón, tejido adiposo y cerebro.

Sin embargo, los GPCRs son extremadamente difíciles de aislar y cristalizar dado que su inclusión en la membrana celular contribuye a su estabilidad estructural y eso provoca que su purificación sea sumamente complicada. Esto conduce a la imposibilidad de determinar directamente su estructura por métodos convencionales. La única manera de hacer frente a este problema es mediante la construcción de modelos teóricos basados en la estructura cristalográfica de un GPCR disponible, utilizando un enfoque de modelado de homología.³⁷

Aunque el modelado de receptores a MLT no puede basarse en plantillas estructurales validadas de las interacciones ligando–receptor, se han diseñado un número de modelos tridimensionales de MT1 y MT2 y se han propuesto diferentes modos de unión de diversos ligandos desarrollados. La mayoría de estos modelos fueron construidos con la primera estructura de rayos X de un GPCR cristalizado (Figura 4).³⁸ La mayoría de modelos tridimensionales de MT1 y MT2 fueron

³⁵ Reppert S. M., Godson C., Mahle C. D., Weaver D. R., Slaugenhaupt S. A., Gusella J. F., Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* (1995), 92, 8734-8738.

³⁶ Yonei Y., Hattori A., Tsutsui K., Okawa M., Ishizuka B., Effects of melatonin: Basics studies and clinical applications. *Anti-Ageing Med* (2010), 7, 85–91.

³⁷ Levit A., Barak D., Behrens M., Meyerhof W., Niv M. Y., Cap II. Homology model-assisted elucidation of binding sites in GPCRs, en *Membrane Protein Structure and Dynamics* (2012), 914, 179-205. En el capítulo del libro se describe a detalle los pasos a seguir para el modelado por homología de receptores acoplados a proteínas G. En la sección de resultados se describe la secuencia seguida para diseñar los receptores MT1 y MT2.

³⁸ Farce A., Chugunov A. O., Logé C., Sabaouni A., Yous S., Dilly S., Renault N., Vergoten G., Efremov R. G., Lesieur D., Chavatte P., Homology modeling of MT1 and MT2 receptors. *J Eur Med Chem* (2008), 43, 1926-1944.

construidos partiendo de la estructura de la rodopsina bovina, que era la única plantilla estructural disponible. Actualmente ya se han construido modelos por homología con GPCR's cristalizados tales como el receptor β_1 y β_2 -adrenérgico, el receptor de adenosina, dopamina y quimocina.³⁹

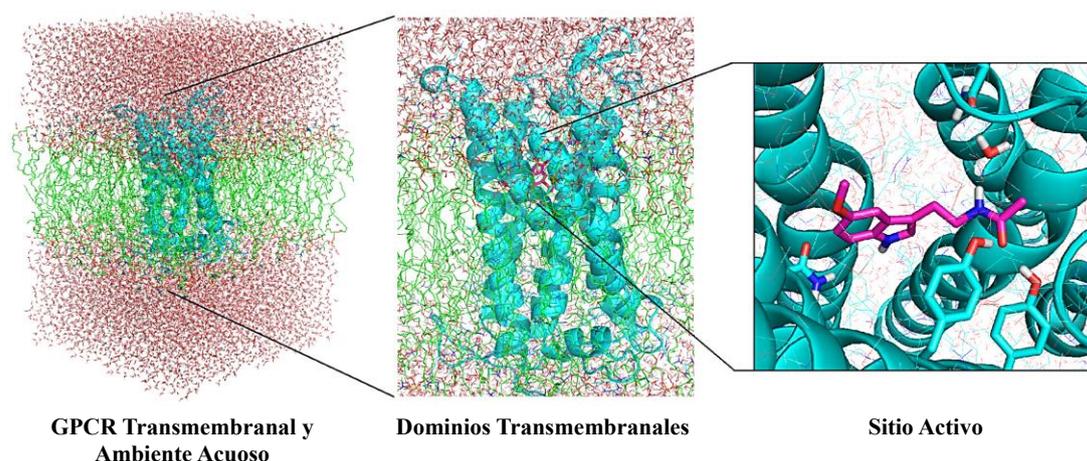


Figura 4. Modelo del receptor MT2 humano incorporado longitudinalmente en una membrana de lípidos y rodeado a ambos lados de la membrana por moléculas de agua y contraiones, utilizando como plantilla el receptor de rodopsina bovina. Modificado de: *dianas* (2013), 2, e20130905, 1-8.

Con los avances en el modelado molecular se han podido desarrollar nuevos ligandos melatoninérgicos y la investigación está centrada en el descubrimiento de nuevos ligandos basados en la estructura teórica del sitio activo de los receptores de MLT. Hoy en día, están disponibles un gran número de ligandos melatoninérgicos que se caracterizan por presentar una alta afinidad de unión y una selectividad y actividad intrínseca diferente para los dos subtipos de receptores. El diseño de estos ligandos fue impulsado principalmente por técnicas basadas en el análisis fisicoquímico de moléculas activas, tales como modelos de mapas del grupo farmacóforo y estudios

³⁹ a) Pala D., Beuning T., Sherman W., Lodola A., Rivara S., Mor M., Structure-based virtual screening of MT2 melatonin receptor: influence of template choice and structural refinement. *J Chem Inf Model* (2013), 53, 821-835. b) Pala D., Lodola A., Bedini A., Spadoni G., Rivara S., Homology models of melatonin receptors: challenges and recent advances. *Int J Mol Sci* (2013), 14, 8093-8121. c) Darius. P. Zlotos D. P, Jockers R., Cecon E., Rivara S., Witt-Enderby P. A., MT1 and MT2 Melatonin receptors: ligands, models, oligomers, and therapeutic potential. *J Med Chem* (2014), 57, 3161-3185.

cuantitativos de relación estructura–actividad (QSAR).⁴⁰ Por el contrario, la aplicación del diseño basado en estructura se ve obstaculizada por la falta de estructuras determinadas experimentalmente de los receptores MT1 y MT2. En este escenario, el modelado de homología ha sido aplicado exitosamente para investigar las características indispensables para la unión del ligando a un nivel molecular.⁴⁰

1.3 Diseño de ligandos melatoninérgicos

A pesar de que se desconoce la determinación exacta de las funciones fisiológicas de los subtipos de receptores MT1 y MT2 de melatonina, ha sido posible caracterizarlos molecularmente utilizando ligandos altamente selectivos como herramientas farmacológicas. En este sentido, la clonación de los receptores humanos MT1 y MT2, el desarrollo de modelos celulares con receptores recombinantes que expresan poblaciones homogéneas de un subtipo de GPCR⁴¹ y el diseño reciente de modelos estructurales por homología, utilizando herramientas bioinformáticas, facilitó el desarrollo de ligandos melatoninérgicos selectivos y de alta afinidad.⁴²

El diseño y síntesis de nuevos ligandos a receptores MT1 y MT2, principalmente, está fundamentado por el gran potencial terapéutico, las limitaciones por sus efectos agonistas indiscriminados y por sus propiedades farmacocinéticas desfavorables, tales como el metabolismo de primer paso alto, vida media corta y una pobre biodisponibilidad oral, situación que ha impactado en el campo de la síntesis química buscando moléculas biomiméticas, selectivas y con mejores propiedades farmacocinéticas. De hecho, durante las últimas dos décadas varias investigaciones se han centrado en el desarrollo de agonistas y antagonistas selectivos que puedan funcionar como herramientas farmacológicas y agentes terapéuticos potenciales.⁴³

⁴⁰ Zlotos D. P., Development of agonists and antagonists for melatonin receptors en: *Melatonin and melatonergic drugs in clinical practice*. Springer (2013), pp. 97-116.

⁴¹ Legros C., Devavry S., Caignard S., Tessier C., Delagrangé P., Ouvry C., Boutin J. A., Nosjean O., Melatonin MT1 and MT2 receptors display different molecular pharmacologies only in the G-protein coupled state. *Br J Pharmacol* (2014), 171 186–201.

⁴² Cavasotto C. N., Phatak S. S., Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov Today* (2009), 14, 676-683.

⁴³ a) Kostiuik N. V., Belyakova M. B., Leshchenko D. V., Zhigulina V. V., Miniaev M. V., Synthetic melatonergic ligands: achievements and prospects. *ISRN Biochemistry* (2014), 1, 1-11. b) Carocci A., Catalano A., Sinicropi M. S., Melatonergic drugs

Tabla 1. Resumen de requerimientos estructurales para la unión y activación de receptores MT1 y MT2⁴⁴

**Grupos farmacóforos en la MLT que rigen la afinidad y activación
frente a sus receptores**

- Tanto el grupo MeO y la cadena lateral etilamida (-CH₂CH₂NHCOCH₃) en la MLT son críticos para la afinidad.
- La eliminación del grupo MeO reduce hasta 1000 veces* la afinidad por los receptores.
- La ausencia del grupo acetilo en la cadena lateral de la MLT provoca una nula afinidad sobre los receptores.
- La reubicación del grupo 5-MeO a las posiciones 4, 6 ó 7 conduce a una pérdida dramática en la afinidad. El remplazo del MeO por grupos OH, halógenos u otros alcóxidos también disminuyen la afinidad.
- El aumento en la longitud del sustituyente aquilo unido al grupo carbonilo de la amida hasta tres átomos de carbono, intensifica la afinidad.
- Las sustituciones en la posición 2 de la MLT con halógenos, grupos alquilo o un grupo fenilo favorecen la unión a los receptores.
- El núcleo indólico es indispensable para el reconocimiento molecular, sin embargo, puede ser intercambiado por otros grupos que cumplan con propiedades fisicoquímicas semejantes, tales como naftaleno, benzofurano, benzotiofeno, indano, tetralina, quinolina.

*De acuerdo con la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica, un ligando selectivo debe mostrar aproximadamente 50-100 veces mayor afinidad y/ o potencia de unión para un subtipo de receptor con respecto al otro.

A pesar que el efecto farmacológico de los primeros ligandos melatoninérgicos fue evaluado en tejidos nativos como el cerebro y la retina de pollo, cerebro de hámster,

in development. *Clin Pharmacol.: Advances and Applications* (2014), 6 127–137. c) Rivara S., Mor M., Bedini A., Spadoni G., Tarzia G., Melatonin receptor agonists: SAR and applications to the treatment of sleep-wake disorders. *Curr Topics Med. Chem.* (2008), 8, 954–968. d) Zlotos D. P., Recent advances in melatonin receptor ligands. *Archiv der Pharmazie* (2005), 338, 229–247.

⁴⁴ Zlotos D. P., Recent progress in the development of agonists and antagonists for melatonin receptors. *Curr Med. Chem.* (2012), 19, 3532-3549.

retina de conejo, pars tuberalis ovina y melanóforos *Xenopus*, que contienen una proporción inespecífica de receptores MT1 y MT2, fue de suma importancia para establecer con certeza los requerimientos estructurales básicos para la unión y activación de dichos receptores (Tabla 1).⁴⁵

1.3.1 Agonistas y Antagonistas melatoninérgicos

Conocer y analizar las propiedades químicas de las moléculas pequeñas (fármacos o ligandos) es indispensable para asegurar que el reconocimiento molecular sea exitoso frente a su receptor. Los requerimientos estructurales descritos en la Tabla 1 marcaron las bases de los grupos funcionales (sobre la MLT) requeridos para la activación de los receptores melatoninérgicos. Sin embargo, dentro de las estrategias del diseño racional, el análisis conformacional y la disposición geométrica del grupo farmacóforo adquieren importancia en la relación estructura-actividad, ya que se deben considerar los grupos funcionales que favorecen la afinidad y aquellos cambios estructurales que modifican la actividad como agonista o antagonista.

Los receptores MT1 y MT2 pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, se rigen por un modelo binario conformacional, es decir, los receptores presentan un equilibrio entre un estado activo e inactivo que puede ser desplazado por el ligando natural, MLT. El perfil del ligando se caracteriza por su afinidad hacia el receptor y su actividad intrínseca o eficacia. El fármaco o ligando que se une ávidamente con el receptor (afinidad) produce cambios conformacionales que desplazan el equilibrio hacia el estado activo provocando una respuesta intracelular que moviliza los mecanismos efectores subcelulares (actividad intrínseca, Figura 5). De acuerdo a la hipótesis anterior, los receptores en estado inactivo que son estimulados por ligandos afines a él son conocidos como agonistas. Los antagonistas no tienen actividad intrínseca y por lo tanto se oponen a los efectos agonistas tanto en la afinidad como actividad. Por otro lado, los agonistas parciales tienen diferentes

⁴⁵ Spadoni G., Bedini A., Advances on the development of subtype selective melatonin ligands. En: *Melatonin: From molecules to therapy*, Pandi-Perumal S. R., Cardinali D.P., editorial Nova Scotia Publishers Inc. (2007), Hauppauge, pp. 33-45.

grados de afinidad y actividades intrínsecas y producen respuestas tisulares submáximas en cualquier grado de ocupación del receptor (por lo general menos de 100%).⁴⁶

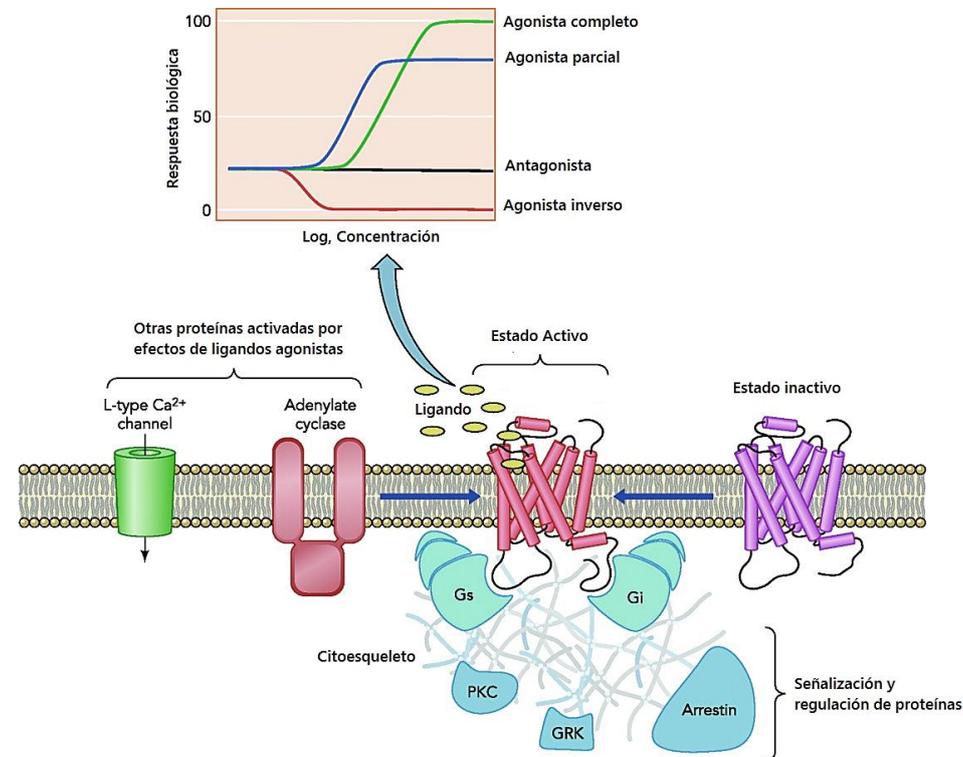


Figura 5. Activación de receptores GPCR's. Deupi X., *Physiology* (2010), 25, 293.

La mayoría de los ligandos melatoninérgicos desarrollados no son capaces de distinguir entre los receptores MT1 y MT2, o muestran sólo una preferencia en afinidad de unión por uno de los subtipos. Sus estructuras corresponden comúnmente a análogos bioisostéricos de la MLT y son obtenidos por: a) intercambio del núcleo indólico por otras entidades heterocíclicas o b) derivados acíclicos y otros análogos conformacionalmente restringidos.

Hoy en día muchos agonistas melatoninérgicos ya están disponibles; sin embargo, todavía son necesarias investigaciones adicionales para lograr una mayor comprensión del papel fisiológico de la MLT. La falta de antagonistas melatoninérgicos potentes y selectivos sigue siendo una limitación para la investigación en este ámbito. De acuerdo con los informes más recientes sobre el

⁴⁶ Kenakin T. P., Drug efficacy at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2002), 42, 349–79.

diseño y desarrollo de ligandos melatoninérgicos, se ha podido demostrar que es más factible lograr la unión y actividad específica de dichos ligandos hacia el receptor MT2, que en comparación al receptor MT1, por lo que se puede encontrar un número importante de moléculas que de acuerdo a sus características estructurales favorecen el adecuado anclaje y compatibilidad con las propiedades fisicoquímicas del sitio activo del receptor MT2. Se sabe que dicho receptor posee un bolsillo hidrofóbico adicional en un área correspondiente a la región de unión del átomo de nitrógeno (N1) y el átomo de carbono C2 de la MLT, que no está presente en el subtipo MT1. Esta región lipofílica, espacialmente, se localiza fuera del plano del núcleo indólico de la melatonina y cuando está ocupado, las moléculas correspondientes muestran reducción de la actividad intrínseca comportándose como antagonista o agonista parcial MT2-selectivo. En consecuencia, todos los antagonistas selectivos MT2 publicados a la fecha incluyen un sustituyente hidrófobo, voluminoso y flexible que rodea la posición equivalente topológicamente a N1 o C2 en la melatonina. La importancia de este elemento estructural se ha confirmado por análisis 3D-QSAR y por estudios de docking molecular.⁴⁷ Ejemplos representativos tanto de agonistas como antagonistas melatoninérgicos se muestran en la Figura 6.

Agonistas

El ramelteon (Figura 6) fue el primer agonista melatoninérgico aprobado para uso humano en el tratamiento del insomnio. Los estudios de *binding* han demostrado que la afinidad de ramelteon para los receptores MT1 ($K_i = 0.014$ nM) y MT2 ($K_i = 0.112$ nM) es de 3 a 16 veces mayor que para MLT. Se ha podido demostrar también, que la selectividad de ramelteon es mayor para MT1 que para MT2, favoreciendo que induzca la aparición del sueño más selectivamente que la propia MLT.⁴⁸

⁴⁷ a) Ning W., Fang-Fang Z., Jia J., Dao-Zhou L., Si-Yuan Z., Bang-Le Z., Investigational selective melatonergic ligands for receptor subtype MT2. *Mini Rev Med Chem* (2013), 13, 1462-1474. b) Bedini A., Spadoni G., Rivara S., et al., Toward the definition of stereochemical requirements for MT2-selective antagonists and partial agonists by studying 4-Phenyl-2-propionamidotetralin derivatives. *J Med Chem* (2011), 54, 8362-8372.

⁴⁸ Reynoldson J. N., Elliott E. S., Nelson L. A., Ramelteon: a novel approach in the treatment of insomnia. *Ann Pharmacother* (2008), 42, 1262-1271.

Por otro lado, la agomelatina es un potente agonista MT1 y MT2 (con valores de pK_i de 10.21 y 9.57, respectivamente) pero también muestra un comportamiento como antagonista de los receptores a serotonina 5-HT_{2C} ($pK_i = 6.68$). Esta dualidad provoca un efecto sinérgico entre los mecanismos de señalización melatonérgicos y serotoninérgicos (5-HT_{2C}), hecho que explica la acción antidepresiva de este fármaco. Por lo tanto, la agomelatina es la única molécula empleada eficazmente para el tratamiento del insomnio causado por la depresión.⁴⁹

Recientemente fueron diseñados novedosos ligandos derivados de la 2-acilaminometiltetrahydroquinolina. Los ensayos de *binding* y actividad intrínseca frente a los receptores MT1 y MT2 humanos mostraron que el derivado *N*-[(1-bencil-1,2,3,4-tetrahydro-5-metoxiquinolin-2-il)metil] propionamida (UCM1014, Fig. 6) presenta una afinidad de unión del orden picomolar para MT2 ($K_i = 0.001$ nM), siendo más de 10,000 veces más selectivo que para el receptor MT1; también se mostró como un agonista completo en los ensayos de actividad intrínseca con GTPγS. Por ello, el UCM1014 es hasta ahora el mejor agonista completo de receptores MT2 que se ha publicado. La alta afinidad, estereoselectividad y actividad agonista se justificó por medio de simulaciones de dinámica molecular, análisis conformacional y modelos de superposición geométrica.⁵⁰

Antagonistas

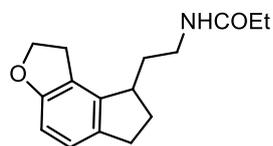
De la misma forma como se fueron descubriendo los agonistas, algunos cambios estructurales sobre la estructura de la melatonina modificaron su actividad. Por ejemplo, los datos de estructura actividad dictaban, inicialmente, que derivados de *N*-acetilriptaminas que carecían del grupo metoxilo funcionaban como antagonistas de los receptores melatonérgicos. Bajo esta estrategia se sintetizó el luzindol (LZ,

⁴⁹ De Bodinat C., Guardiola-Lemaitre B., Mocaër E., Renard P., Muñoz C., Millan M. J., Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nat Rev Drug Discov* (2010), 9, 628-642.

⁵⁰ Spadoni G., Bedini A., Lucarini S., Mari M., Caignard D. H., Boutin J. A., Delagrangé P., Lucini V., Scaglione F., Lodola A., Zanardi F., Pala D., Mor M., Rivara S., Highly potent and selective MT2 melatonin receptor full agonists from conformational analysis of 1-benzyl-2-acylaminomethyl-tetrahydroquinolines. *J Med Chem* (2015), 58, 7512-7525.

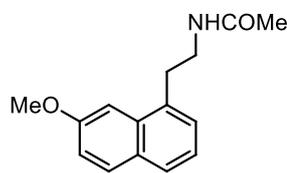
Figura 6), el cual mostró una marcada competencia con otros agonistas por el mismo sitio del receptor presináptico en retina de conejo.⁵¹

Agonistas



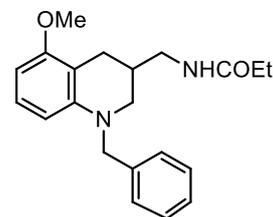
ramelteon

Agonista MT1 y MT2



agomelatina

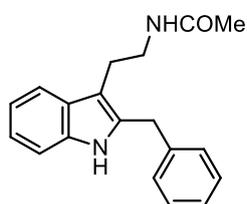
Agonista MT1 y MT2



UCM1014

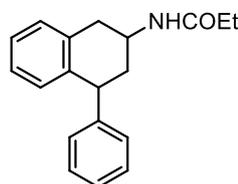
Agonista MT2

Antagonistas



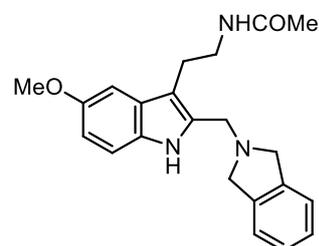
luzindol (LZ)

Antagonista MT1 y MT2



4P-PDOT

Antagonista MT2



2-dihidro-isoindol melatonina

Antagonista MT2

Figura 6. Agonistas y antagonistas melatonérgicos representativos.

Gracias a los avances en análisis QSAR, mapas farmacofóricos y modelado por homología de los receptores, se establecieron los requerimientos estructurales para lograr mejor selectividad sobre los receptores melatonérgicos. De acuerdo a estas consideraciones se sintetizó la 4-fenil-2-propenamida (4P-PDOT, Fig. 6),⁵² que cumple con las propiedades necesarias de selectividad sobre el receptor MT2 con una afinidad 330 veces mayor que para el receptor MT1.⁴⁷ Se observó que la afinidad y la selectividad sobre el receptor MT2 aumentan por sustitución en la posición C2 de la melatonina con diferentes heterociclos. Este hecho se ejemplifica con la síntesis de la 2-[(1,3-dihidro-2*H*-isoindol-2-il)metil]melatonina, cuya sustitución en C2 con la

⁵¹ Dubocovich M., Luzindole (N-0774): A novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* (1988), 246, 902-910.

⁵² Lucarini S., Bedini A., Spadoni G., Piersanti G., An improved synthesis of cis-4-phenyl-2-propionamidotetralin (4-P-PDOT): a selective MT2 melatonin receptor antagonist. *Org Biomol Chem* (2008), 6, 147-150.

isoindolina condujo a un antagonista MT2 con una alta afinidad de unión al receptor MT2 ($K_i = 2$ nM) y una alta selectividad (K_i MT1/ K_i MT2 = 124).⁵³

De acuerdo a la perspectiva que se ha abordado, esta investigación está enfocada al desarrollo de posibles ligandos melatoninérgicos análogos de la MLT y el luzindol que se caracterizan por presentar cambios estructurales que a la fecha han sido poco explorados. Debido a que en el proceso racional de desarrollo de fármacos han surgido muchas técnicas asistidas por computadora para aumentar la eficiencia en la búsqueda de nuevos líderes, la actividad intrínseca de los nuevos análogos de la MLT y su afinidad a los receptores melatoninérgicos se predecirán con base en la aplicación de una combinación de enfoques asistidos por computadora.

⁵³ Heckman D., Attia M. I., Behnam M. A. M., Mohsen A. M. Y., Markl C., Julius J., Sethi S., Witt-Enderby P. A., Zlotos D. P., 2-[(1,3-Dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl]-melatonin a novel MT2-selective melatonin receptor antagonist. *Med Chem Commun* (2011), 2, 991-994.

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los grandes avances, el desarrollo de nuevos ligandos melatonérgicos sigue jugando un papel clave como una herramienta farmacológica para el estudio de los efectos específicos de la MLT, dentro del amplio espectro terapéutico que la caracteriza. Debido a que las investigaciones sobre el papel de los receptores de la MLT dependen en gran medida de la disponibilidad de nuevos ligandos potentes y selectivos, es necesario ampliar el espectro de ligandos agonistas y antagonistas que puedan utilizarse tanto en investigación científica como en la práctica médica.

3. HIPÓTESIS

Las zonas de sustitución que favorecen la afinidad, actividad y selectividad de ligandos melatoninérgicos se han identificado con base en la diversidad estructural de ligandos hasta ahora conocidos, tal como se muestra en la Figura 7a. En consecuencia, el diseño de moléculas que además de mantener los grupos farmacóforos característicos de ligandos melatoninérgicos, presenten grupos funcionales que les permitan generar un mayor número de interacciones con los aminoácidos del sitio activo de su receptor, mostrarán una mejor afinidad y actividad en comparación con el ligando natural.

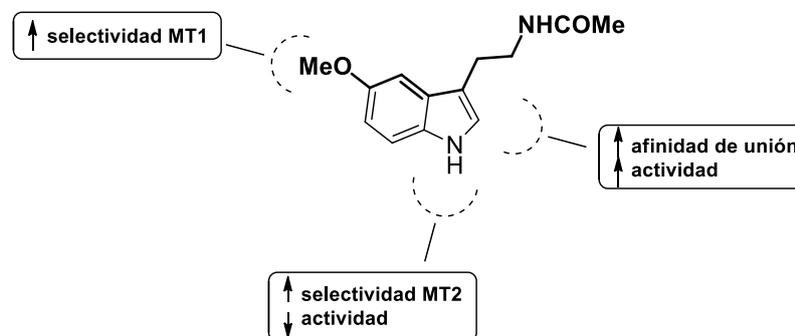


Figura 7a. Efecto de los sustituyentes sobre afinidad de unión y la actividad intrínseca en MT1 y MT2.

Por ello, la inclusión de sustituyentes Bn, *p*OMeBn ó fenetilo en la posición 3 y de un grupo éster en la posición N1 del núcleo indólico de isotriptaminas generarán sitios adicionales de interacción con los receptores, tales como interacciones aromáticas, hidrofóbicas y electrostáticas, sin modificar sustancialmente las propiedades fisicoquímicas de la molécula. En otras palabras, se espera que las isotriptaminas de tipo **1** y **9** (Figura 7b) muestren una mejor energía de interacción, en los estudios de *docking* molecular, sobre los receptores MT1 y MT2 en comparación con el agonista MLT y el antagonista luzindol.

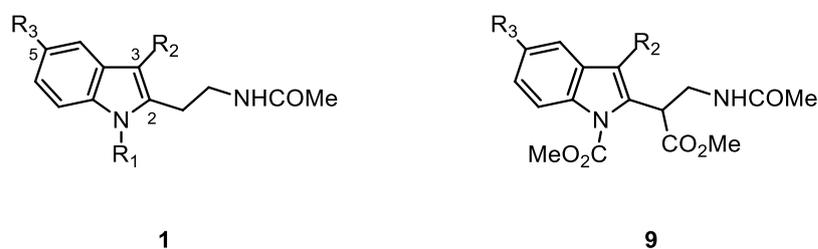


Figura 7b. Isotriptaminas **1** y **9**

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar una ruta de síntesis novedosa y versátil para la preparación de una serie de isotriptaminas **1a-d** y **9a-d** cuya cadena *N*-etilamida se encuentre transpuesta de la posición C3 a C2 del indol, en combinación con la eliminación del grupo MeO en C5 y la inserción de grupos Bn, *p*OMeBn ó fenetilo en C3 y de un grupo éster en N1 del anillo indólico (Figura 8a). Además, con el uso de herramientas de modelado molecular, predecir el efecto que dichos cambios estructurales ejercen en las interacciones moleculares que rigen la formación del complejo proteína–ligando frente a los receptores MT1 y MT2 diseñados por métodos bioinformáticos.

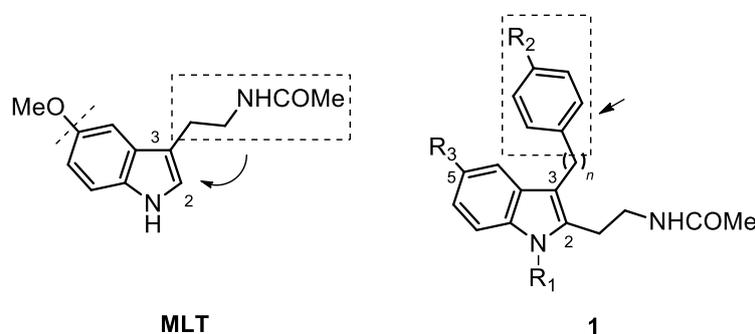


Figura 8. Cambios estructurales sobre la MLT y estructura general de isotriptaminas **1a-d** y **9a-d** planteadas.

Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar una serie de 2-(*N*-acilaminoalquil)indoles **1** y **9** (Figura 8b)

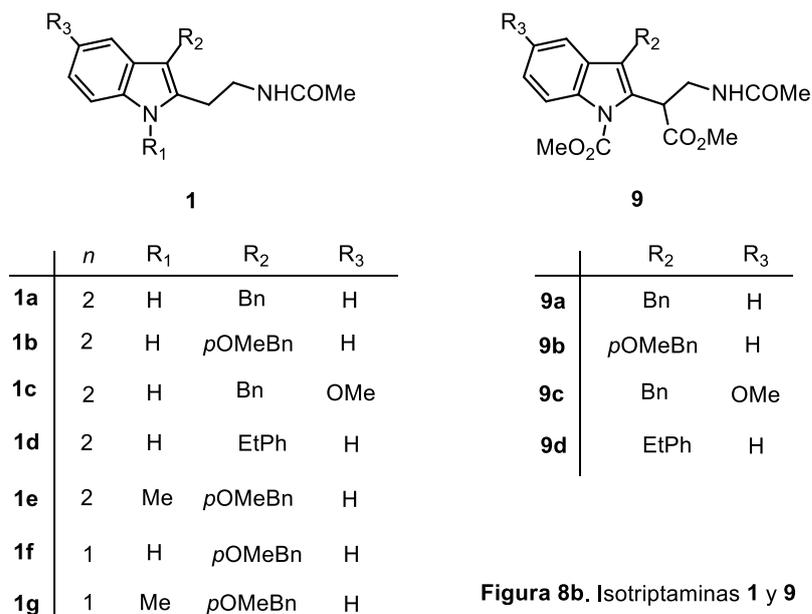


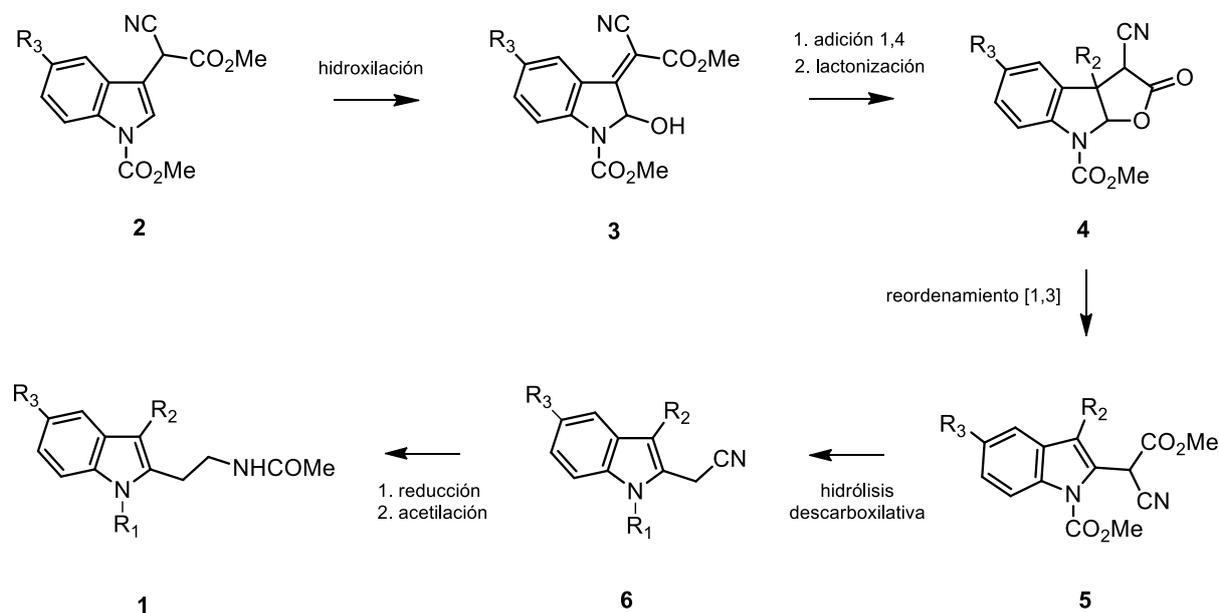
Figura 8b. Isotriptaminas 1 y 9

- Realizar la búsqueda conformacional y optimización de las isotriptaminas **1a-g** por cálculos mecanocuánticos.
- Generar diagramas de potencial electrostático molecular de los confórmeros de mínima energía de **1a-d** con la finalidad de analizar las propiedades estereoelectrónicas que favorecen la afinidad sobre el sitio activo de los receptores y comparar los resultados con las propiedades estereoelectrónicas determinadas para la MLT y el antagonista luzindol.
- Generar el mapa farmacofórico de una serie de ligandos melatoninérgicos, tanto agonistas como antagonistas, para identificar la distribución geométrica de los grupos funcionales que rigen la unión y afinidad a los receptores de melatonina.
- Realizar un alineamiento geométrico de los confórmeros de mínima energía de las isotriptaminas **1a-g** para establecer si cumplen con las condiciones fisicoquímicas necesarias que activan a los receptores MT1 y MT2.
- Calcular la energía de interacción de los compuestos a sintetizar con los receptores modelados por homología a través de un estudio de *docking* molecular de las isotriptaminas **1a-d** y **9a-d**.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Síntesis Química

La estrategia de síntesis de las 3-alkil-2-*N*-acetiltryptaminas **1**, de manera general, se puede dividir en dos secuencias de reacciones (Esquema 1).⁵⁴ La primera de ellas consiste en la preparación de los 2-indolilcianoacetatos de metilo **5** a partir de 3-indolilcianoacetatos de metilo **2**. En esta primera serie de reacciones, la transposición del grupo cianoacetato de la posición C3 a C2 del grupo indol se lleva a cabo en tres etapas que consisten en una hidroxilación en C2, seguida por una adición nucleofílica de un reactivo de Grignard para formar **4** vía lactonización del intermedio de reacción γ -hidroxiéster, y finalmente un reordenamiento sigmatrópico [1,3] por acción del diazometano que dirige a la formación de los 2-indolilcianoacetatos de metilo **5**.



Esquema 1. Secuencia general de síntesis de 3-alkil-2-*N*-acetiltryptaminas **1**.

La segunda secuencia de reacciones involucra la transformación del grupo acetónitrilo en C2 a la correspondiente *N*-etilacetamida. Se inicia con una hidrólisis

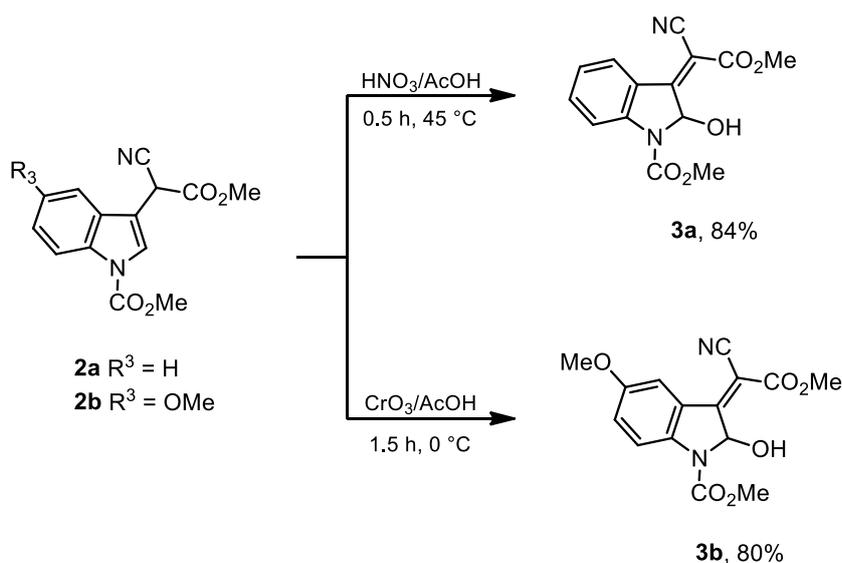
⁵⁴ López-Camacho P. Y., Joseph-Nathan P., Gordillo-Román B, Suárez-Castillo O. R., Morales-Ríos M. S., Cascade [1,3]-Sigmatropic Rearrangements of Ketene *O,O*-Acetals: Kinetic and DFT Level Mechanistic Studies, *J Org Chem* (2010), 75, 1898–1910.

N,C-descarboxilativa de **5** para formar el correspondiente 2-acetonitrilindol **6** que, por reducción del grupo nitrilo a la amina y la subsecuente acetilación *in situ*, generarán los productos deseados **1**.

Considerando el esquema de síntesis arriba descrito, en la siguiente sección, se describe a detalle la metodología, resultados y las correspondientes discusiones, de acuerdo a la secuencia de reacciones propuestas.

5.1.1 Síntesis de 2-indolilcianomalonatos **5**.

Como se describió previamente, la primera secuencia de reacciones comienza con la hidroxilación del 3-indolilcianomalonato **2** en las condiciones de reacción que se muestran en el Esquema 2. Dicha reacción de oxidación se llevó a cabo siguiendo la metodología establecida previamente en el grupo de investigación.⁵⁵



Esquema 2. Reacción de hidroxilación de **2**.

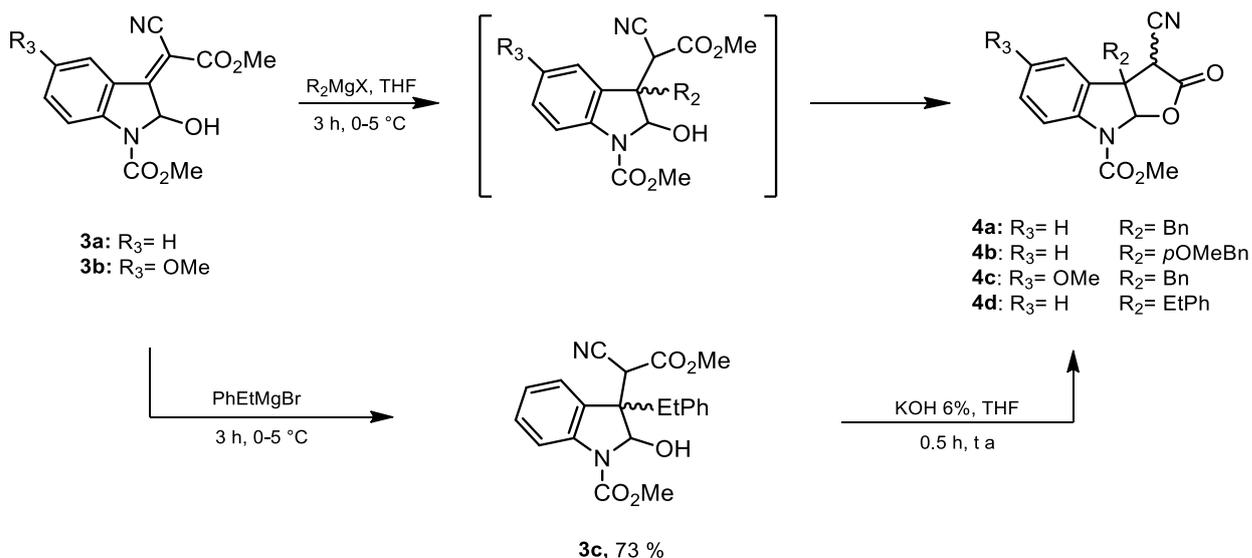
Como se muestra en el Esquema 2, la selección del agente oxidante cambió en función del sustituyente en C5. Se ha observado que cuando R_3 es hidrógeno, la oxidación con HNO_3/AcOH ocurre con buen rendimiento, en contraste, bajo estas condiciones la presencia del grupo activante MeO en **2b** conduce a productos de descomposición, situación que se ha resuelto usando CrO_3 como agente oxidante.

⁵⁵ Morales-Rios M. S., Bucio M. A., Joseph-Nathan P., Formal synthesis of (+)-physostigmine. *Tetrahedron* (1996), 52, 5339-5348.

Los productos hidroxilados **3a** y **3b** se obtuvieron en buenos rendimientos; sus puntos de fusión y su caracterización estructural por espectrometría de masa (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN) coincidió con los datos descritos previamente.

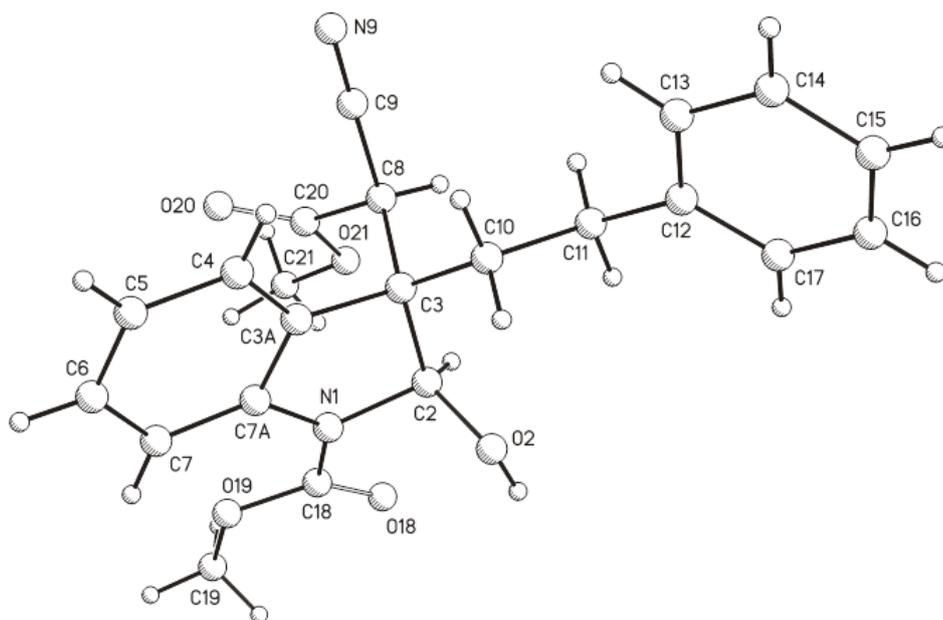
La alquilación de los derivados 2-hidroxilados **3a** y **3b** condujo a las α -ciano- γ -lactonas **4** vía la adición conjugada 1,4 del reactivo de Grignard (4 equivalentes) y la subsecuente lactonización *in situ*, del producto intermedio β -alquil- γ -hidroxiéster. Específicamente, esta sucesión de reacciones únicamente se observó en los productos sustituidos en C3 por Bn y *p*OMeBn **4a-4c**, que se obtuvieron como mezclas diastereoméricas resultantes de la epimerización parcial del centro estereogénico ácido C3, una vez forma la lactona (Esquema 3). En tanto que la reacción de adición nucleofílica del bromuro de fenetil magnesio (PhEtMgBr) al doble enlace proquiral de **3a** condujo a la formación del producto intermedio acíclico estable **3c**. La estabilidad de **3c** se atribuye al menor efecto estérico del grupo fenetilo con respecto a los grupos bencilo y *p*-OMe-bencilo.

El análisis por RMN ^1H del crudo de reacción del intermedio β -alquil- γ -hidroxiéster **3c** demostró que este compuesto existe en solución como una mezcla diastereomérica 5:4 de sólo dos diastereómeros de entre cuatro posibles, en 73% de rendimiento global. Los componentes de dicha mezcla no pudieron separarse por cromatografía, sin embargo, uno de entre ellos cristalizó de la mezcla epimérica. Cabe señalar que el análisis por RMN ^1H de las aguas madres del compuesto cristalizado demostró que en solución (CDCl_3) **3c** existe en una mezcla de dos componentes en una relación 5:4, idéntica a la observada en el crudo de la mezcla de reacción.



Esquema 3. Síntesis de las α -ciano- γ -lactonas **4**.

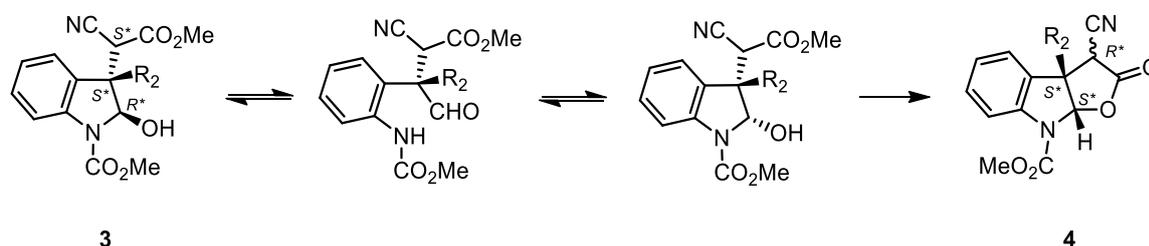
La estereoquímica relativa de los dos nuevos centros estereogénicos en C3 y C8 del racemato de **3c** se estableció por análisis de difracción de rayos X un cristal. La estructura cristalina de $2R^*,3S^*,8S^*$ -**3c** se presenta en la Figura 9. Formalmente, el epímero $2S^*,3S^*,8S^*$ -**3c** puede generarse por inversión del carbono C2 del grupo hemiaminal. Se sabe que la oxidación de mezclas diastéricas de este tipo de compuestos conduce a los 2-oxoindoles correspondientes, cuyo espectro de RMN de ^1H , indica que se trata de un solo isómero.⁵⁶



⁵⁶ Morales-Rios M. S., Bucio M. A., Joseph-Nathan P., Nouvelle voie d'accès us squelette de la (\pm)-physostigmine. *Tetrahedrom Lett* (1994), 35, 881-882.

Figura 9. Estructura de rayos X de $2R^*,3S^*,8S^*$ **3c**.

La transformación quimioselectiva de la 3-fenetil-2-hidroxiindolina $2R^*,3S^*,8S^*$ -**3c** en la correspondiente indolilcianolactona **4d** se llevó a cabo por tratamiento con una solución al 5% KOH en agua usando THF como disolvente. La formación preferida del sistema fusionado *cis*-5,5 en **4a-4d** es posible debido a la existencia de un equilibrio tautomérico cadena-anillo que ocurre a través del grupo hemiaminal de **3a-3d** como se muestra en el Esquema 4.

**Esquema 4.** Equilibrio tautomérico cadena-anillo que ocurre a través del grupo hemiaminal de **3a-3d**.

Las α -ciano- γ -lactonas **4** se encuentran en solución de CDCl_3 como una mezcla diastereomérica *anti/syn* (ca. 5:1) con respecto a los sustituyentes en los centros estereogénicos C3 y C3a. El equilibrio *anti/syn* es función del efecto estérico ejercido por el sustituyente en C3a y ocurre a través de la formación de un tautómero enol. Aunado al equilibrio *anti/syn*, las α -ciano- γ -lactonas **4** exhiben procesos dinámicos que resultan de la rotación restringida alrededor del enlace sencillo C-N del grupo carbamato, ocasionando señales significativamente anchas en el espectro de ^1H para H-7, H-8a y el metilo del carbamato y en el espectro de ^{13}C para el carbono del metino C-8a y del metilo de carbamato.

La asignación por RMN de las α -ciano- γ -lactonas **4** como mezcla de dos diastereómeros (ver anexo espectroscópico) se basó en los correspondientes espectros de RMN ^1H , ^{13}C , gHSQC, gHMBC y NOESY. En particular, en el espectro gHSQC de **4c** se observa una correlación entre la señal ancha característica del carbono de metino C-8a, que coincide para ambos diastereómeros, ($\delta = 94.0$) con las señales significativamente anchas en $\delta = 6.35$ y 6.48 debidas al hidrógeno H-8a

de cada diastereómero. En tanto que las señales de C-3 para cada diastereómero en $\delta = 42.4$ y 40.6 correlacionan con las señales simples en $\delta = 4.05$ y 4.15 , respectivamente, debidas al hidrógeno H-8a. Los rendimientos obtenidos para **4** fueron moderados (53% **4a**, 42% **4b**, 55% **4c**, 49% **4d**) y su estabilidad química se ve comprometida en ambientes húmedos y en condiciones ácidas, transformándose en los correspondientes derivados desnitrilados.

La confirmación estructural de **4**, particularmente de **4c**, se obtuvo por difracción de rayos X (Figura 10). En la estructura cristalina se observa la disposición geométrica del diastereoisómero con fusión *cis* furo[3,2-*b*]indol, la orientación *anti* de los grupos nitrilo y bencilo, en tanto que el carbonilo del carbamato se encuentra orientado hacia el anillo de lactona en una configuración *s-Z* alrededor al enlace sencillo N-C.

El tratamiento de las α -ciano- γ -lactonas **4a-d** con un exceso de una solución etérea de diazometano, durante 1 h a temperatura ambiente dio los 2-indolilcianomalonatos **5**. El mecanismo de reacción en cascada involucra tres etapas consecutivas que ocurren a través de los intermediarios ceteno-*O,O*-acetales **A** y ciclopropan[*b*]indoles **B**. Los ceteno-*O,O*-acetales **A** se formaron por la *O*-metilación de un intermediario enol, en tanto que los ciclopropan[*b*]indoles **B** se obtuvieron mediante un reordenamiento sigmatrópico [1,3] de los ceteno-*O,O*-acetales **A**. En la tercera etapa, la fuerza impulsora es probablemente la liberación de la deformación angular del anillo de ciclopropano por escisión del enlace ciclopropilo más sustituido de **B**. Este último proceso es exotérmico e irreversible, dando lugar a la terminación de las reacciones en cascada para dar los 2-indolilcianomalonatos **5a-d** (Esquema 5).⁵⁴ Los 2-indolilcianomalonatos **5a-d** se obtuvieron como cristales blancos amorfos en buenos rendimientos después de su purificación por cromatografía en columna.

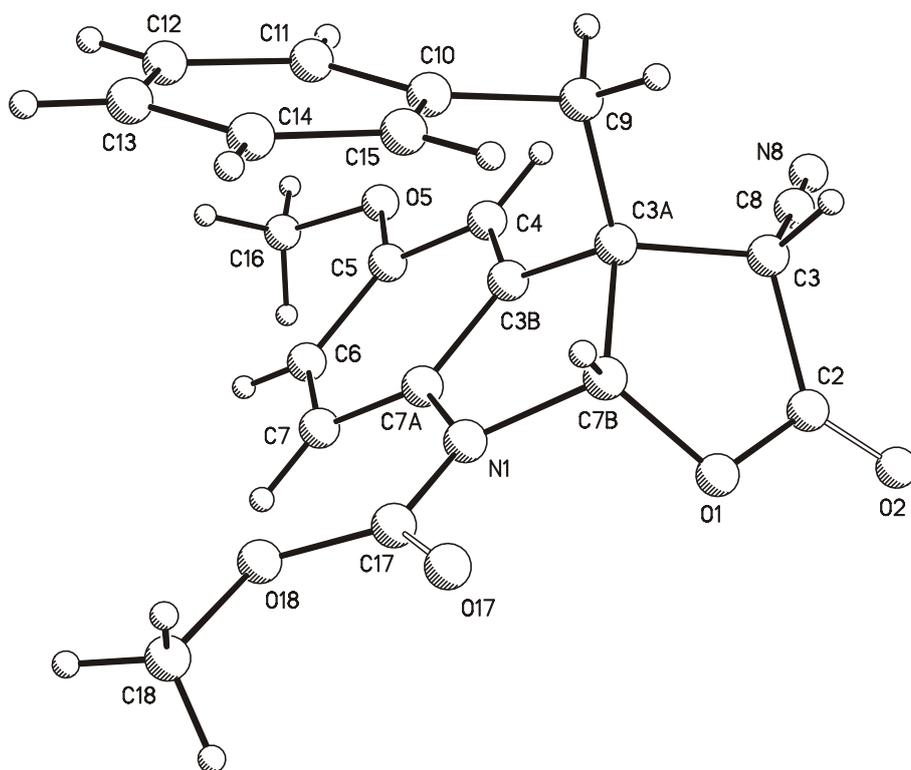
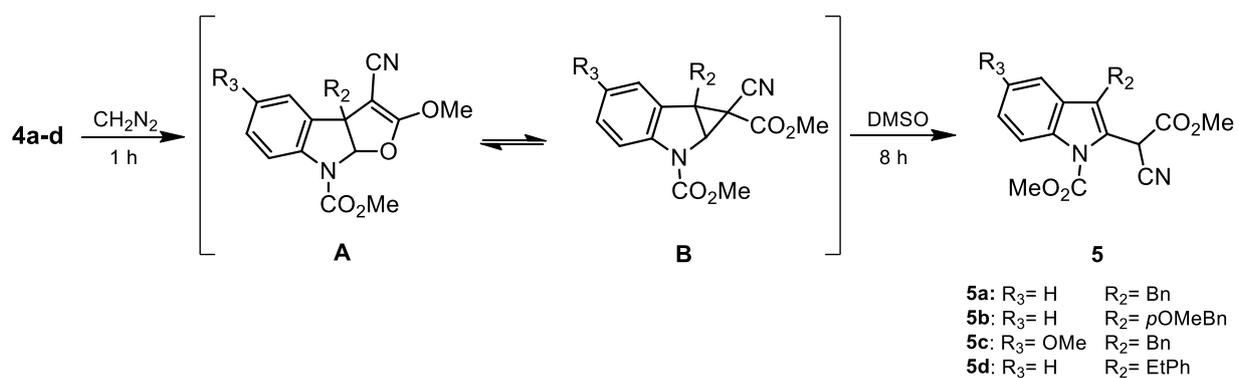


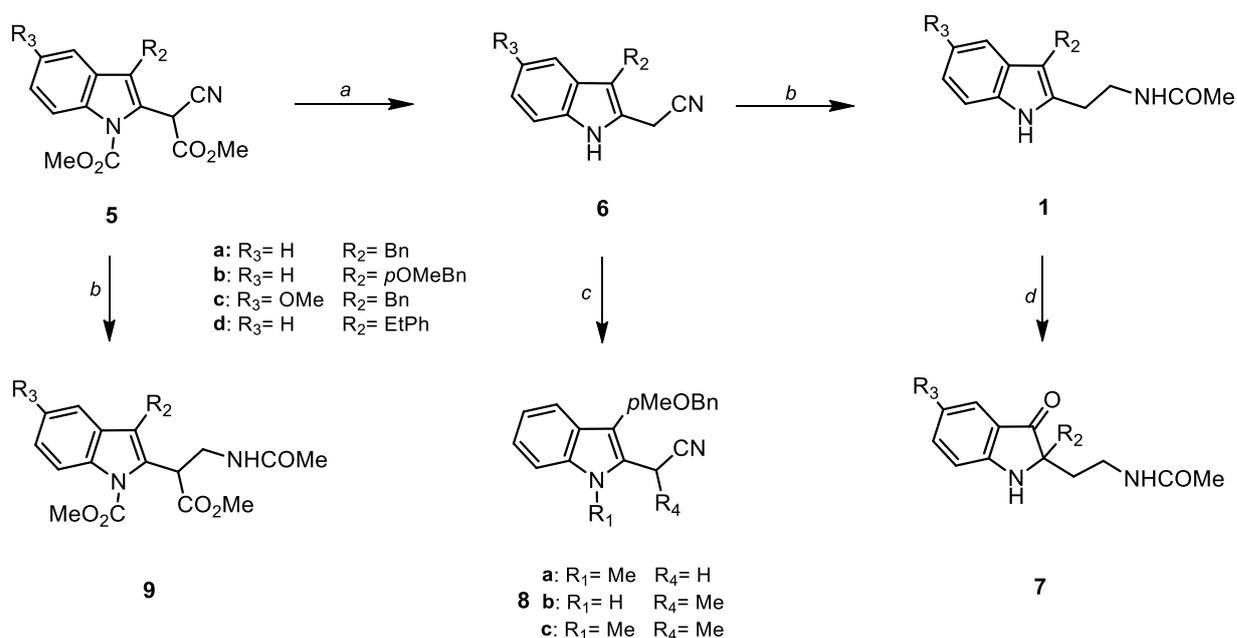
Figura 10. Estructura de rayos X de la α -ciano- γ -lactona $3R^*,3aS,*8S^*$ **4c**.



Esquema 5. Reordenamiento en cascada que dirige a los 2-indolilcianomalonatos **5**.

5.1.2 Síntesis de 3-alkil-2-*N*-acetiltriptaminas

A continuación se llevó a cabo la hidrólisis *N,C*-descarboxilativa de **5a-5d** empleando 10 equivalentes de K_2CO_3 en una mezcla de MeOH/H₂O (3:1) a reflujo durante 5 h para dar los 2-acetonitrilindoles **6a-6d** en buenos rendimientos (64-70%), obteniéndose como aceites de color rojizo. Los espectros de RMN ¹H de la serie de **6a-6d** se caracterizaron por mostrar una señal simple que integra para dos átomos de hidrógeno entre δ 3.7 y 4.1, que corresponde al metileno del acetonitrilo en posición C2 del anillo indólico. Además, se observó una señal simple ancha asignada al grupo NH alrededor de δ 8.0 que intercambia con D₂O, así como las señales típicas de un benceno *orto*-disustituído para **6a**, **6b** y **6d** y de un benceno 1,2,4-trisustituído para **6c**. La asignación estructural completa por RMN se encuentra resumida en el Anexo de esta tesis.



Esquema 6. Síntesis de 3-alkil-2-*N*-acetiltriptaminas **1** y otros derivados relacionados. Condiciones de reacción: a) K_2CO_3 (10 eq), MeOH/H₂O (3:1), reflujo, 5 h; b) H₂, Ni-Raney, Ac₂O, 3 atm, ta, 8 h; c) MeI, Cs₂CO₃, DMF, ta, 24 h; d) O₂, luz, ta.

La última etapa en la síntesis de las 3-alkil-2-*N*-acetiltriptaminas **1a-1d** consistió en la hidrogenación catalítica de **6a-6d** bajo 3 atmósferas de H₂ en presencia de Ni-Raney y anhídrido acético durante 8 h. Bajo estas condiciones el grupo nitrilo se

redujo a la correspondiente amina que, *in situ*, reaccionó con el anhídrido acético formando de esta manera las 3-alkil-2-*N*-acetiltriptaminas **1** (Esquema 6) en rendimientos moderados.

Es interesante señalar que durante el proceso de purificación de las 2-*N*-acetiltriptaminas **1a-1c** se aisló en cada caso un subproducto **7a-7c** (Esquema 6), cuyo ión molecular determinado por EM contenía 16 unidades de masa más que aquella debida a la 2-*N*-acetiltriptamina **1** ($M^+ + 16$), situación que se atribuye a la presencia adicional de un átomo de oxígeno en **7**. El análisis del espectro de RMN ^1H de **7b** mostró en la región alifática la presencia de 2 señales simples debidas a grupos metilo de OMe y NHCOMe, similares a las señales observadas para **1b**, así como señales múltiples atribuidas a hidrógenos diasterotópicos de 3 grupos metileno, cuyo patrón de acoplamiento y desplazamientos químicos difieren marcadamente de aquellos encontrados para **1b** (Figura 11). Además, el análisis del espectro de RMN ^{13}C de **7b** mostró además de la señal esperada de un carbonilo de amida la presencia de una señal de carbonilo de cetona, en concordancia con lo observado en el espectro de masa. El patrón de sustitución del anillo de oxindolina de **7a-7b** se estableció inequívocamente mediante el análisis de los espectros de RMN en 2D gHSQC y gHMBC.

El mecanismo por el cual las 2-*N*-acetiltriptaminas **1** se transformaron en las correspondientes indolin-3-onas 2,2-disustituidas ocurre por una oxidación aeróbica (Esquema 6). La oxidación en C3 y la migración del grupo bencilo o *p*OMe-bencilo de C3 a C2 en **1a-1c** ocurrió bajo condiciones estándar de almacenamiento (temperatura ambiente, sin protección de luz y libre de disolvente) en aproximadamente 5 semanas.

Se determinó que el orden de estabilidad de las 2-*N*-acetiltriptaminas **1** decrece en el orden **1d** > **1b** > **1a** > **1c**.

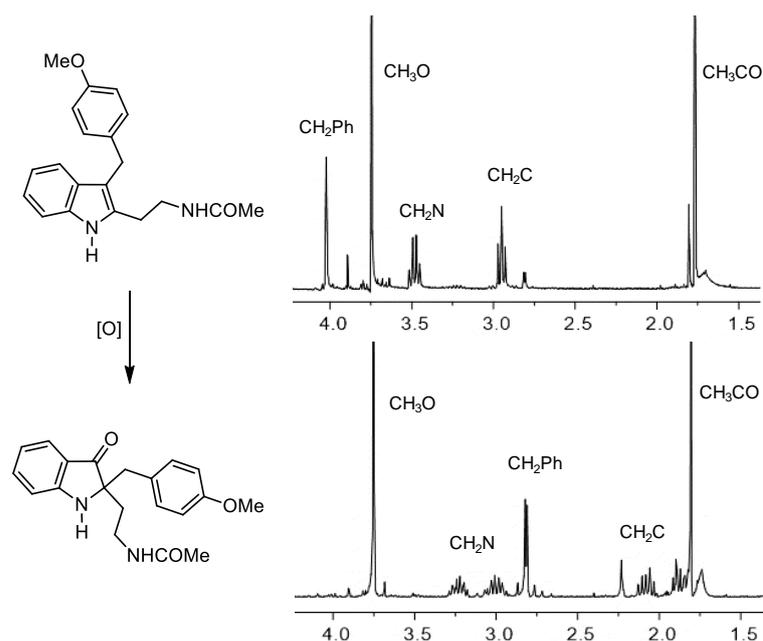


Figura 11. Espectro de RMN ^1H en CDCl_3 de **1b** y del derivado oxidado **7b**.

El mecanismo implica una oxidación aerobia fotocatalizada en C3 que promueve, de manera concertada, una trasposición semipinacólica en donde el sustituyente en C3 cambia a la posición C2 del anillo indólico (Figura 12).⁵⁷ Si bien es cierto que las nuevas indolil-3-onas 2,2-disustituidas **7a-7c** se obtuvieron de forma fortuita, su importancia no es poca, ya que mantienen estrictamente los grupos farmacóforos que las hacen ser consideradas como una serie alternativa de potenciales ligandos melatoninérgicos.

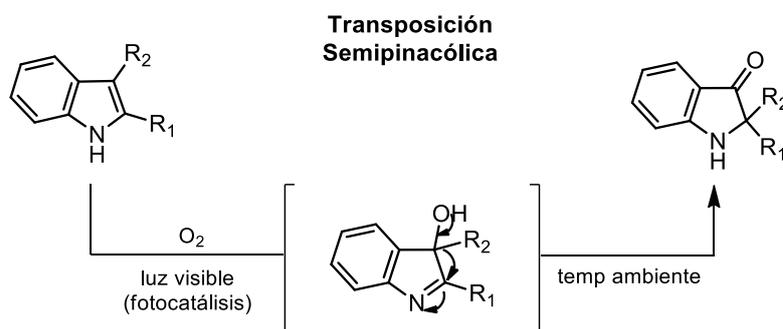


Figura 12. Preparación de derivados indolil-3-ona 2,2-disustituidos vía trasposición semipinacólica.

⁵⁷ Ding W., Zhou Quan-Quan, Xuan J., Li Tian-Ren, Lu Liang-Qiu, Xiao Wen-Jing, Photocatalytic aerobic oxidation/semipinacol rearrangement sequence: a concise route to the core of pseudoindoxyl alkaloids. *Tetrahedron Letts* (2014), 55, 4648–4652.

5.1.2.1 Tratamiento del 2-acetonitrilindol **6b** con MeI

Como resultado de la baja estabilidad de las isotriptaminas **1a-1c**, los esfuerzos se enfocaron en sintetizar derivados más estables, por lo que se decidió investigar de manera preliminar la sustitución del hidrógeno del NH indólico por un grupo alquilo en un precursor selecto de las isotriptaminas **1**. Para ello, se consideró interesante analizar la reactividad del 2-acetonitrilindol **6b** con un agente alquilante. Así, el tratamiento de **6b** con MeI usando como base Cs_2CO_3 dio el producto *N*-metilado **8a** en mezcla con los productos *C*-monometilado y *C, N*-dimetilado **8b** y **8c** en una relación 5:2:4, respectivamente, con un rendimiento global del 55% (Esquema 6). Se espera que la reducción de los 2-acetonitrilindoles metilados **8a-8c** conduzca a las isotriptaminas correspondientes que serán estudiadas desde un punto de vista de su estabilidad ante la oxidación aeróbica y como potenciales ligandos melatoninérgicos.

5.1.2.2 Preparación de los 2-indolil-6-amidoésteres **9**

Siguiendo con el objetivo de obtener isotriptaminas estables se decidió reducir el grupo ciano de los 2-indolilcianomalonatos **5** bajo las mismas condiciones de hidrogenación catalítica que las usadas para reducir este mismo grupo en los 2-acetonitrilindoles **6**. Así, la hidrogenación catalítica de **5a-5d** bajo 3 atmósferas de H_2 en presencia de Ni-Raney y anhídrido acético durante 8 h dio las 2-*N*-acetiltriptaminas sustituidas en N y C por un éster metílico **9a-d** (Esquema 6). Las 2-*N*-acetiltriptaminas **9a-d** se obtuvieron en buenos rendimientos como sólidos cristalinos estables. Es posible que la presencia de los grupos éster en las 2-*N*-acetiltriptaminas **9a-d** favorezcan efectos sinérgicos en el reconocimiento molecular frente a los receptores melatoninérgicos.

5.2 Modelado Molecular

Actualmente hay cuatro métodos en el diseño molecular caracterizadas por la técnica empleada: (i) QSAR (quantitative structure activity relationship), basada en descriptores moleculares fisicoquímicos; (ii) mecánica molecular, basada en la mecánica clásica y en programas modeladores-constructores de representación gráfica tridimensional de moléculas; (iii) mecánica cuántica, que tiene en cuenta las posiciones y energías de los átomos y moléculas; (iv) topología molecular.

La topología molecular nació del estudio de las propiedades fisicoquímicas de compuestos orgánicos. El objetivo de la topología molecular es la caracterización estructural de moléculas mediante unos invariantes sencillos, llamados índices topológicos. Los índices topológicos son una serie de parámetros que, a través de valores numéricos, codifican una información estructural, electrónica, estérica, así como una determinada propiedad fisicoquímica de la molécula bajo estudio, más allá de su naturaleza química. Estos índices, una vez procesados estadísticamente, juegan un papel decisivo en el diseño de moléculas con propiedades químicas y farmacológicas específicas.

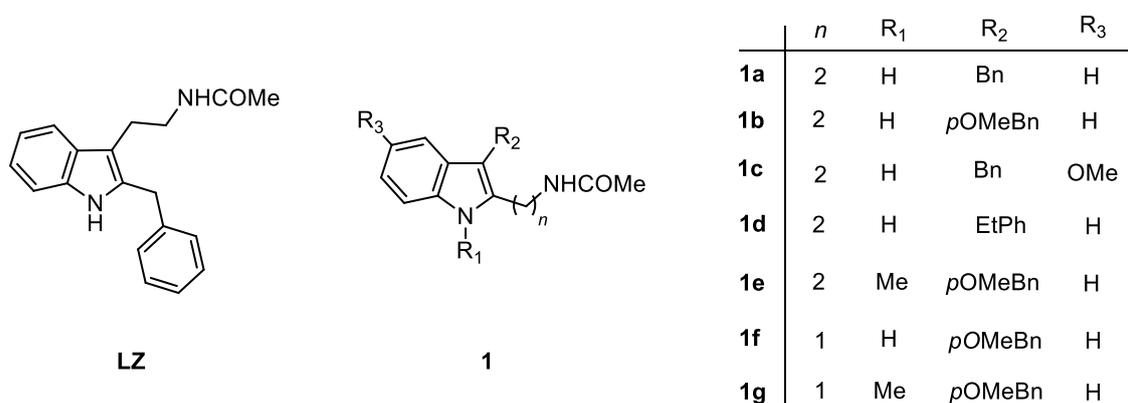


Figura 13. Luzindol (LZ) e isotriptaminas **1**.

En la siguiente sección se presentan los resultados obtenidos en la predicción de propiedades específicas de las isotriptaminas de tipo **1** como nuevos ligandos a receptores de melatonina usando como modelo de referencia al luzindol (LZ), una 2-benciltriptamina con reconocida actividad antagonista selectiva sobre los

receptores de melatonina. Los métodos utilizados involucran topología molecular, mecánica molecular y mecánica cuántica.

5.2.1 Predicción del blanco terapéutico por topología molecular

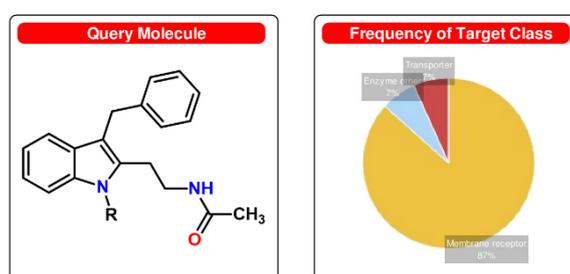
Una aplicación de la topología molecular es buscar nuevos compuestos con determinada actividad farmacológica. La metodología consiste en que una vez calculados los índices topológicos de compuestos conocidos con dicha propiedad, se obtienen (por lo común, mediante análisis lineal discriminante) funciones de clasificación que permiten discriminar entre compuestos activos e inactivos. A continuación, las funciones de clasificación se aplican a bases de datos de estructuras químicas, para la selección de sustancias potencialmente activas. Una característica de la topología molecular es el hecho de no requerir un conocimiento previo de la estructura del receptor para generar nuevas cabezas de serie. En la práctica, el análisis topológico molecular se puede realizar mediante alguno de los softwares disponibles en el mercado.

El servidor molecular *SwissTargetPrediction*, usa un algoritmo basado en la combinación de diferentes medidas de similitud química (tanto en la estructura como en la geometría molecular) para predecir los blancos terapéuticos de moléculas pequeñas, comparando índices de similitud 2D y 3D de ligandos conocidos. Este software determina la similitud química mediante el uso de huellas moleculares (*'molecular fingerprints'*, similitud 2D); los compuestos que muestran una alta similitud bajo esta consideración claramente tienen una mayor probabilidad de interactuar con blancos similares, sin embargo, la biofísica del reconocimiento molecular sugiere que la similitud en la forma del ligando o la distribución del potencial electrostático podría también dar lugar a un efecto similar (similitud 3D). Por tanto, la combinación de índices de similitud 2D y 3D aumenta significativamente la precisión de la predicción del blanco terapéutico,

especialmente interesante cuando la molécula a analizar es nueva y no pertenece a una serie química ya estudiada.⁵⁸

El análisis topológico 2D-3D discriminante de las isotriptaminas **1**, indicó que el 87% del total de las moléculas con las que mostraron similitud estructural, actúan sobre receptores de membrana. De estas proteínas destacan los receptores a dopamina (D2 y D3) y a melatonina (MT1 y MT2), que están relacionados ambos por pertenecer a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Figura 14).

SwissTargetPrediction report:



Target	Uniprot ID	Gene code	ChEMBL ID	Probability	# sim. cmpds (3D / 2D)	Target Class
D(2) dopamine receptor	P14416	DRD2	CHEMBL217	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	180 / 230	Membrane receptor
D(3) dopamine receptor	P35462	DRD3	CHEMBL234	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	128 / 131	Membrane receptor
Melatonin receptor type 1A	P48039	MTNR1A	CHEMBL1945	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	435 / 97	Membrane receptor
Melatonin receptor type 1B	P49286	MTNR1B	CHEMBL1946	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	435 / 97	Membrane receptor
Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1	Q9NUW8	TDP1	CHEMBL1075138	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	353 / 8	Enzyme
Melatonin-related receptor (by homology)	Q13585	GPR50		<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	435 / 97	Membrane receptor
D(4) dopamine receptor	P21917	DRD4	CHEMBL219	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	100 / 25	Membrane receptor
D(1A) dopamine receptor	P21728	DRD1	CHEMBL2056	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	36 / 23	Membrane receptor
D(1B) dopamine receptor	P21918	DRD5	CHEMBL1850	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	30 / 23	Membrane receptor
Mu-type opioid receptor	P35372	OPRM1	CHEMBL233	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	191 / 94	Membrane receptor
Delta-type opioid receptor	P41143	OPRD1	CHEMBL236	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	191 / 94	Membrane receptor
Sodium-dependent serotonin transporter (by homology)	P31645	SLC6A4	CHEMBL228	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	190 / 29	Transporter
5-hydroxytryptamine receptor 2A	P28223	HTR2A	CHEMBL224	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	200 / 147	Membrane receptor
5-hydroxytryptamine receptor 2C	P28335	HTR2C	CHEMBL225	<div style="width: 80%; background-color: green;"></div>	160 / 94	Membrane receptor

Figura 14. Predicción del blanco terapéutico de las isotriptaminas **1** por SwissTargetPrediction.

⁵⁸ a) Gfeller D., Michielin O., Zoete V., Shaping the interaction landscape of bioactive molecules. *Bioinformatics* (2013), 29, 3073-3079. b) Gfeller D., Grosdidier A., Wirth M., Daina A., Michielin O., Zoete V., SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucl Acids Res* (2014), 42, W32-W38. c) <http://www.swisstargetprediction.ch/>

Estos resultados son muy significativos en cuanto a que el análisis topológico indica que las isotriptaminas **1** tienen similitud estructural 3D con 435 ligandos melatoninérgicos y similitud estructural 2D con 97 ligandos, en ambos tipos de receptores a MLT (1A y 1B, Figura 14). Los puntajes de índices de similitud 2D y 3D de las isotriptaminas **1** fueron de 0.83 y 0.92, respectivamente, para ambos receptores (MT1, MT2). Cabe señalar que estos valores son comparables a los obtenidos del análisis discriminante realizado al luzindol, usado como referencia. En resumen, el análisis topológico predice que las isotriptaminas **1** cumplen con las propiedades estructurales que definen el reconocimiento molecular por los receptores melatoninérgicos.

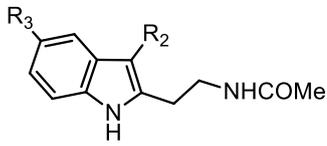
5.2.2 Generación del diagrama de potencial electrostático molecular (PEM)

La complementariedad molecular juega un papel central en el proceso de reconocimiento molecular y el potencial electrostático molecular (PEM) es una de las propiedades más aceptadas de sistemas moleculares para interpretar dichas interacciones. Las moléculas deben estar en la orientación correcta y conformación apropiada para aumentar la probabilidad de interactuar entre sí. Esta ruta de reacción, denominada etapa de reconocimiento, es esencial en las interacciones fármaco-receptor. Cuando dos moléculas se acercan para reaccionar o interactuar, el componente principal de la energía de interacción es coulombiana. Esta energía es esencial para la orientación de las moléculas con el fin de lograr una disposición espacial favorable, de grupos funcionales, antes de reaccionar. Este paso de reacción corresponde al paso cinético y el PEM desempeña un papel importante en el nivel de entropía ya que cuando las moléculas están muy próximas el PEM sufre una deformación. En términos de reconocimiento fármaco-receptor, la estabilidad del complejo puede relacionarse con los valores PEM y estos valores pueden expresar la actividad del fármaco.⁵⁹

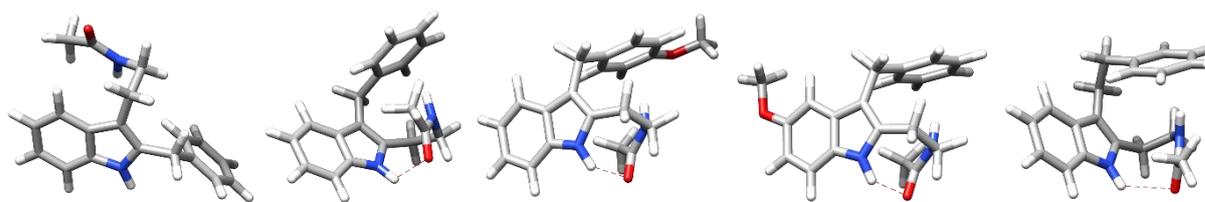
⁵⁹ a) Pepe G., Siri D., Fleboulb J. P., The molecular electrostatic potential and drug design. *J Mol Struct* (1996), 256, 175-165. b) Sizochenko N, Majumdar D., Roszak S., Leszczynski J., Capitulel, Application of quantum

Considerando que las isotriptaminas **1** presentaron una buena similitud estructural tanto 2D como 3D con el luzindol (LZ), resultaba interesante hacer un análisis comparativo del diagrama PEM entre estas moléculas por métodos de mecánica cuántica. La finalidad fue determinar el efecto que ejerce la transposición de los grupos farmacóforos de **1** con respecto al LZ en la distribución del potencial electrostático como una medida de su potencial actividad melatoninérgica.

Tabla 1. Energía de Gibbs relativa (kcal/mol) en fase gas, fracciones molares (χ , %) y geometrías de los conforméres de mínima energía del LZ y **1a-1d**.



1a: R₃= H R₂= Bn
1b: R₃= H R₂= pOMeBn
1c: R₃= OMe R₂= Bn
1d: R₃= H R₂= EtPh



LZ
1a
1b
1c
1d

	LZ		1a		1b		1c		1d	
	ΔE	χ								
C1	0.00	62.32	0.00	45.62	0.00	28.03	0.00	40.44	0.00	69.91
C2	0.65	20.78	0.15	35.49	0.08	24.28	0.25	26.47	0.53	28.69
C3	1.21	8.06	0.58	17.25	0,12	23.02	0.59	15.06	2.32	1.40
C4	1.61	4.11	1.97	1.64	0.42	13.74	0.78	10.83	-	-
C5	1.83	2.83	-	-	0.94	5.78	1.18	5.54	-	-
C6	2.07	1.90	-	-	1.00	5.15	1.89	1.66	-	-

El análisis se inició con la búsqueda conformacional de las isotriptaminas **1** empleando el algoritmo Monte Carlo en combinación con el campo de fuerzas Merck (MMFF), los conforméres resultantes que aportaron >2% en la distribución de Boltzmann fueron agrupados por nivel de energía y su relación geométrica, reduciendo la distribución poblacional. Sucesivamente, los conforméres seleccionados se optimizaron a los niveles de cálculo HF/3-21G, HF/6-31G(d) y

finalmente al nivel de DFT M06-2X/6-31+G(d,p) utilizando Gaussian 09. En la optimización con el último nivel de cálculo se eligieron como los conformeros estadísticamente significativos aquellos que aportaron más del 2% en la distribución de Boltzmann y que fueron geoméricamente diferentes (Tabla 1). Posteriormente, los mínimos encontrados fueron empleados para analizar sus propiedades estereoelectrónicas.

El análisis geométrico de los conformeros de mínima energía sugiere que la estabilidad de **1a-1d** en fase gas está condicionada por interacciones intramoleculares del tipo N-H...O. De acuerdo a las geometrías obtenidas, la formación de un enlace de hidrógeno N-H...O intramolecular entre el hidrógeno sp^2 -NH del indol y el átomo de oxígeno carbonílico del grupo amida cierran un anillo de siete miembros con una distancia de enlace de ca. 2.2 Å en cada conformero. Dicha interacción limita la flexibilidad de la cadena de etilamida, por lo tanto la libertad conformacional está dada principalmente por el sustituyente en la posición C3 del núcleo indólico.

Los diagramas de potencial electrostático molecular (PEM) fueron generados con la herramienta Cubegen de Gaussian09. Los diagramas PEM de los conformeros más estables de las isotriptaminas **1** fueron comparados con el diagrama PEM del Luzindol (Figura 15).

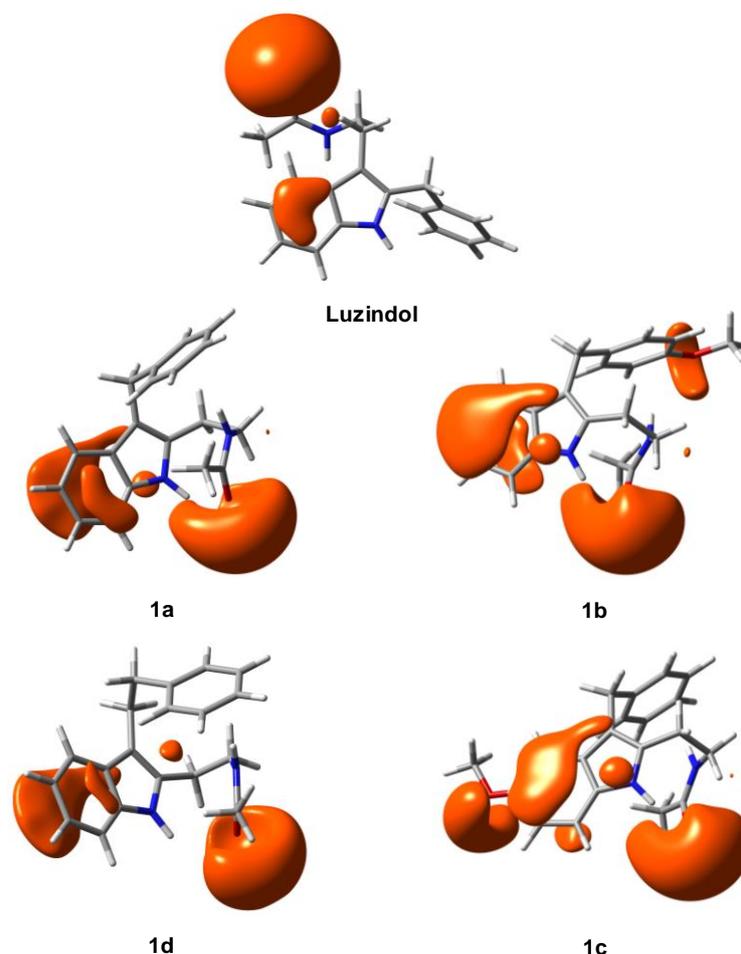


Figura 15. Diagramas PEM de luzindol y 3-alkil-2-*N*-acetiltryptaminas **1a-d**.

Los diagramas PEM de la Figura 15 muestran únicamente los potenciales electrónicos negativos y tiene un isovalor de 0.03, para todos los compuestos. Este volumen corresponde al potencial electrostático que se sitúa en un plano paralelo a 1.5 Å por encima del plano del anillo indólico, justo sobre de la región de los electrones π .

El volumen isovalente del luzindol mostró un lóbulo superior por encima del anillo de benceno (cubriendo los átomos C4, C5 y C6), otro lóbulo de mayor densidad negativa localizado sobre el grupo carbonilo de la cadena de etilamida en posición C3 del anillo indólico y finalmente, se localizó una pequeña densidad negativa sobre el átomo de nitrógeno del grupo amida. Este resultado es consistente con el

diagrama PEM del agonista natural, la MLT, salvo por el lóbulo faltante que corresponde al átomo de oxígeno del grupo metoxilo en posición C5.⁶⁰

La comparación de los diagramas de PEM del LZ con su regioisómero **1a** mostró que las regiones de carga negativa observadas en el LZ se mantienen en **1a** a pesar de la transposición de los sustituyentes en C2 y C3. Aún mejor, el volumen de los lóbulos aumentó y se distribuyeron por ambas caras del sistema indólico. Las isotriptaminas con grupos electrodonadores **1b** y **1c** modificaron significativamente la topología de los lóbulos observando un claro aumento en el volumen y distribución de carga sobre el sistema aromático, manteniendo la región negativa sobre el grupo carbonilo. Específicamente la isotriptamina **1b** fue la que mostró el PEM más negativo. En lo que respecta a **1d**, ésta mantuvo un diagrama similar a **1a** ligeramente disminuido. En resumen, el diagrama de potencial electrostático molecular predice que las isotriptaminas **1** cumplen con las propiedades electrónicas que definen el reconocimiento molecular por los receptores melatoninérgicos.

⁶⁰ a) Mor M., Rivara S., Silva C., Bordi F., Plazzi P. V., Melatonin receptor ligands: synthesis of new melatonin derivatives and comprehensive comparative molecular field analysis (CoMFA) study. *J Med Chem* (1998), 41, 3831-3844. b) Lira-Rocha A., Espejo-González O., Naranjo-Rodríguez E. B., Receptor-binding studies of 1-N-substituted melatonin analogues. *Eur J Med Chem* (2002), 37, 945-951.

5.2.3 Mapas Farmacofóricos

Las definiciones más recientes de un *modelo de farmacóforo* o *mapa farmacofórico* convergen en la idea que se trata de "un conjunto de características estéricas y electrónicas que son necesarias para asegurar las interacciones supramoleculares óptimas con un objetivo biológico específico y desencadenar (o inhibir) su respuesta biológica". En otras palabras, un mapa farmacofórico es el arreglo espacial de interacciones moleculares que explican concisamente la actividad biológica de una molécula.⁶¹

Un modelo farmacofórico se puede establecer ya sea basado en ligandos, superponiendo un conjunto de moléculas activas en 3D y extrayendo sus características químicas comunes que son esenciales para su bioactividad, o de una manera estructurada, analizando todos los posibles puntos de interacción entre el blanco macromolecular y su ligando (complejo proteína-ligando). Los modelos farmacofóricos basados en ligandos son la estrategia computacional clave que facilita el descubrimiento de nuevas moléculas cuando se desconoce la estructura tridimensional del objetivo macromolecular.⁶⁰

5.2.3.1 Hipótesis farmacofórica agonista y antagonista

Una característica o entidad, como una porción de un mapa farmacofórico, es la representación de una colección de un cierto tipo de grupos funcionales, or lo que el conjunto de características o entidades farmacofóricas en un mapa, forman una hipótesis que describe las interacciones responsables de la bioactividad en las moléculas.

Con el fin de predecir si las isotriptaminas **1** cumplen los requisitos de alguna de las hipótesis farmacofóricas agonista o antagonista y, por tanto, si pueden funcionar como potenciales ligandos melatoninérgicos, se realizó el diseño de

⁶¹ Pirhadi S., Shiri F., Ghasemi J. B., Methods and applications of structure based pharmacophores in drug discovery. *Curr Top Med Chem* (2013), 13, 1036-1047.

mapas farmacofóricos de moléculas bioactivas que actúan como agonistas ó antagonistas en los receptores de melatonina. La identificación de las entidades farmacofóricas se basó en conjuntos de moléculas representativas, ocho agonistas y ocho antagonistas. La selección de estas moléculas se apoyó en su diversidad estructural, afinidad y potencia. Los mapas fueron diseñados empleando el programa LigandScout 3.12, y fueron clasificados por el puntaje de ajuste, es decir, por la desviación cuadrática media (RMSD). Los modelos agonista y antagonista generados se analizaron usando varios criterios: a) el número de elementos farmacofóricos; b) el ajuste RMSD de los correspondientes elementos farmacofóricos; c) el grado de superposición de los volúmenes moleculares y d) las distancias entre las entidades farmacofóricas. Las estructuras 2D de los ligandos utilizados para el diseño de los mapas farmacofóricos, pueden ser consultadas en la referencia 61.⁶²

De los resultados obtenidos, se encontró que la mejor hipótesis agonista se compone de seis características químicas esenciales para la actividad: dos grupos aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA), un donante de enlace de hidrógeno (HBD), una zona hidrofóbica (H) y dos entidades aromáticas (AR). En la Figura 16, se muestran los elementos farmacofóricos con las esferas de tolerancia menores a 1.5 Å, las cuales indican la posición ideal de una característica particular en el espacio 3D (Tabla 2). Los resultados fueron consistentes con un modelo farmacofórico previamente desarrollado.^{39a}

Por otro lado, la hipótesis farmacofórica antagonista se muestra en la Figura 17. En este caso, la mejor solución se compone de ocho características químicas clave (2 HBA, 1 HBD, 2 H y 3 AR), seis de las cuales son comunes con el modelo agonista descrito anteriormente. La interacción hidrofóbica adicional (H) identificada como

⁶² Mendoza-Figueroa H., Martínez-Gudiño G., Villanueva-Luna J. E., Trujillo-Serrato J. J., Morales-Ríos M. S., Pharmacophore modeling and conformational analysis in the gas phase and in aqueous solution of regioisomeric melatonin analogs. A theoretical and experimental study. *J Mol Struct* (2017), 1133, 534–545.

una característica de anillo aromático, podría contribuir a conferir actividad antagonista.

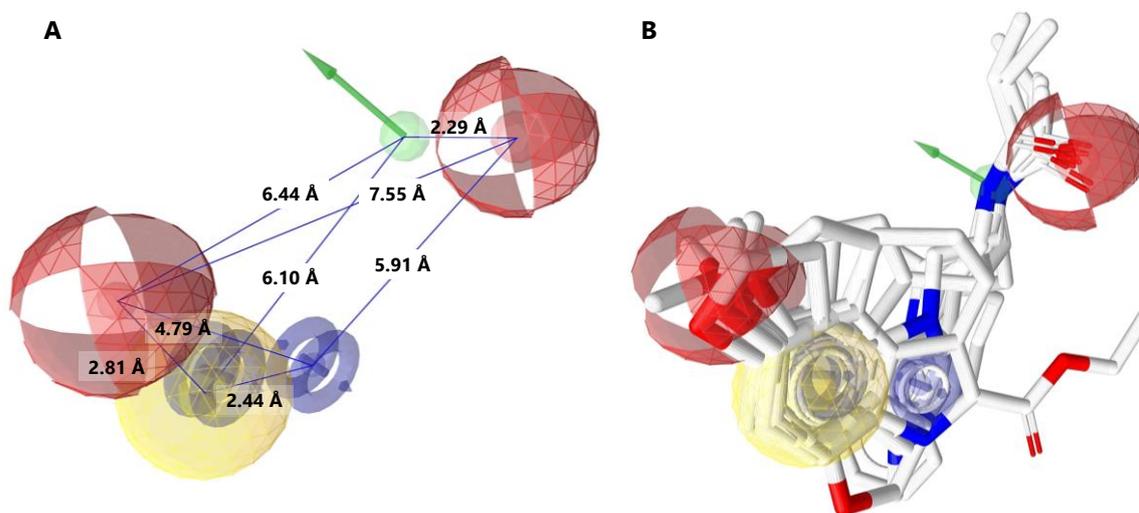


Figura 16. Mapa farmacofórico agonista; **A.** Hipótesis agonista, consta de 6 entidades químicas 2 HBA (rojo), 1 HBD (verde), 1 H (amarillo) y 2 AR_{ind} (azul); **B.** Superposición de los 8 agonistas melatonérgicos representativos sobre el mapa farmacofórico de 6 entidades.

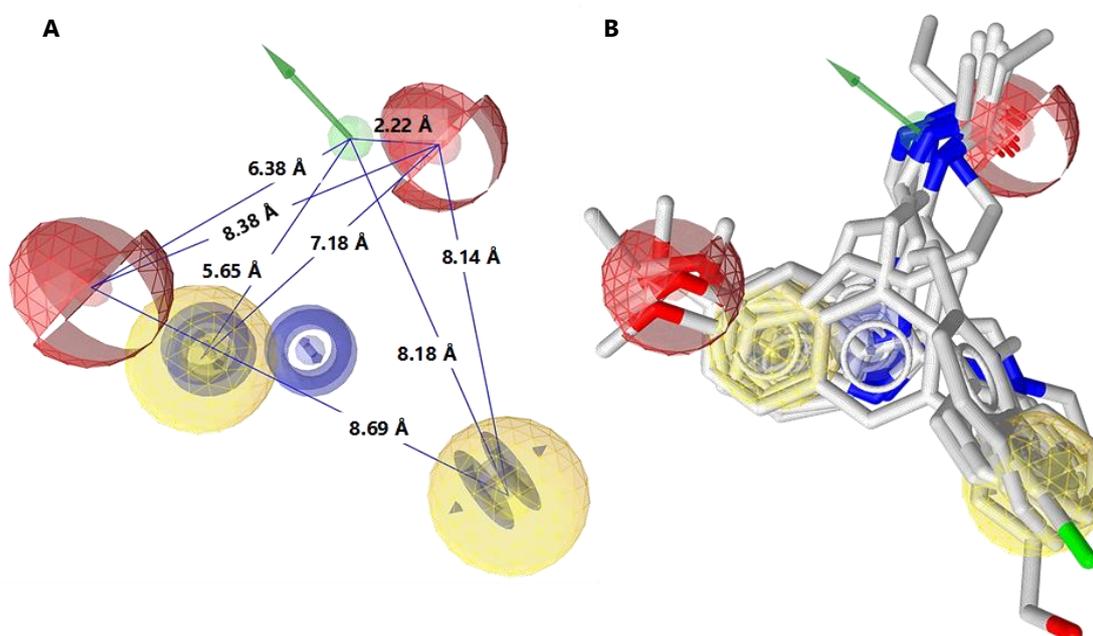


Figura 17. Mapa farmacofórico antagonista; **A.** Hipótesis antagonista, consta de 8 entidades químicas 2 HBA (rojo), 1 HBD (verde), 2 H (amarillo) y 3 AR_{ind} y B_n (azul); **B.** Superposición de los 8 antagonistas melatonérgicos representativos sobre el mapa farmacofórico de 8 entidades.

Estos modelos sugieren que las moléculas agonistas y antagonistas comparten una misma disposición con respecto a las características farmacofóricas. Las coordenadas geométricas de las entidades farmacofóricas de ambos modelos se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Coordenadas de las entidades farmacofóricas en los mapas 3D agonista y antagonista

Hipótesis Agonista				Hipótesis Antagonista					
	Tolerancia	x	y	z		Tolerancia	x	y	z
HBA ₁	1.5	-1.20	-0.76	1.61	HBA ₁	1.5	3.61	1.80	0.73
HBA ₂	1.5	0.56	-7.66	4.11	HBA ₂	1.5	0.53	3.80	8.27
HBD	1.5	1.30	-5.66	4.95	HBD	1.5	2.04	3.55	6.66
H	1.5	1.36	-1.37	0.62	H ₁	1.5	1.17	1.16	1.62
AR _{ind}	0.9	1.34	-1.58	0.93	H ₂	1.5	-4.68	4.04	2.02
AR _{ind}	0.9	2.98	-3.09	1.24	AR _{ind}	0.9	1.20	1.34	1.76
					AR _{ind}	0.9	-0.29	2.19	2.80
					AR _{Bn}	0.9	-4.35	4.03	2.12

5.2.3.2 Influencia de los enlaces de hidrógeno en las preferencias conformacionales

Las preferencias conformacionales pueden hacer que los átomos no contiguos dentro de una molécula aislada se conviertan en vecinos cercanos. Estas disposiciones espaciales pueden ser impulsadas por interacciones electrostáticas favorables o por la formación de un "enlace de hidrógeno" (enlace-H).

Como se describe en la Sección 5.2.2 de esta tesis, el análisis geométrico de los conformeros de mínima energía en fase gas de **1a-1d** sugiere que las preferencias conformacionales de estos compuestos están condicionadas por la presencia de interacciones intramoleculares del tipo enlace-H. Al respecto, cabe mencionar que a pesar de que los estudios en fase gaseosa permiten aislar una sola molécula, pudiendo analizar sus propiedades individuales sin ninguna interferencia, es obvio que la fase gas está muy alejada del medio fisiológico o biológico donde las moléculas ejercen su función. De aquí, el interés en realizar un análisis conformacional tanto en fase gas como en un entorno acuoso de una serie de derivados de 2-(*N*-acilaminoalquil)indoles que incluye a la isotriptamina **1b** sustituida en C3 por un grupo *p*MeO-bencilo teniendo la posición N1 libre ó sustituida por un grupo metilo **1e**, así como la de los homólogos menores con una cadena metilamido en C2 **1f** y **1g**. La estructura, la numeración de átomos y las definiciones de ángulo diedro de los compuestos estudiados **1b**, **1e**, **1f** y **1g** se muestran en la Figura 18.

La finalidad de este estudio es determinar si el enlace-H intramolecular que se supone existen en algunas conformaciones en fase gaseosa de **1b** (sección 4.2.2), se mantienen después de la solvatación acuosa, ya que en estas condiciones pueden establecerse nuevas interacciones intermoleculares tipo enlace-H con el disolvente, que pueden influir en las preferencias conformacionales de este compuesto y de sus análogos **1e**, **1f** y **1g**.

Para tal efecto se realizaron estudios de modelado molecular usando el método de polarización continua (PCM) implementado en Gaussian 09. En este modelo, el disolvente se representa como un medio polarizable caracterizado principalmente por su constante dieléctrica ϵ ($\epsilon_{\text{agua}} = 78.4$). Los cálculos se llevaron a cabo usando la teoría de la funcional densidad (DFT), con el funcional B3LYP y la base 6-31+G(d,p). La caracterización de los confórmeros de mínima energía en fase gas (C_g) y solución acuosa (C_s) de **1b**, **1e**, **1f** y **1g**, (energía libre de Gibbs, las respectivas fracciones molares dadas por la distribución de Boltzmann y ángulos diedros relevantes) se presentan en la Tabla 3.

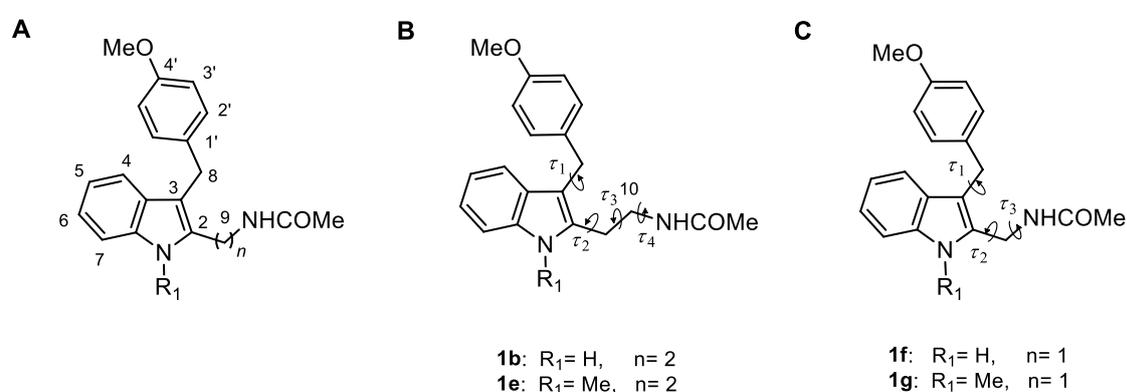


Figura 18. A. Estructuras y numeración de los compuestos **1b**, **1e**, **1f** y **1g**. El átomo de nitrógeno del indol se designó como N1 y el átomo de nitrógeno de la amida como N2. **B.** Definición de ángulo diedro para **1b** y **1e**: $\tau_1 = \angle(\text{C2C3C8C10})$; $\tau_2 = \angle(\text{C3C2C9N2})$; $\tau_3 = \angle(\text{C2C9N2C}_{=O})$. **C.** Definición de ángulo diedro para **1f** y **1g**: $\tau_1 = \angle(\text{C2C3C8C10})$; $\tau_2 = \angle(\text{C3C2C9C10})$; $\tau_3 = \angle(\text{C2C9C10N2})$; $\tau_4 = \angle(\text{C9C10N2C}_{=O})$.

El análisis de las distancias y los parámetros angulares obtenidos en fase gas sugiere que la estabilidad conformacional de **1b**, **1f** y **1g** se ve afectada por interacciones intramoleculares de tipo N-H...O o N-CH...O (Figura 19). Por ejemplo, en **1b** se identificaron seis conformaciones estables, observándose que la conformación C_g1 y el par de conformaciones especulares C_g2/C_g2' , que aportan más del 90% de la población total, se estabilizan mediante un enlace-H intramolecular formando un ciclo de ocho miembros, cuya distancia de interacción N-H...O es $< 2.1 \text{ \AA}$. Para el caso del homólogo inferior **1f**, cuyo par de confórmeros

especulares más estables $Cg1/Cg1'$ y $Cg2/Cg2'$ aportan el 91% de la población total, los cálculos sugieren la formación de un enlace de hidrógeno N-H...O intramolecular entre el hidrógeno indólico sp^2 -NH y el átomo de O del grupo amida, cerrando un anillo de siete miembros, favorecido por la distancia relativamente corta de la interacción N-H...O < 2.2 Å.

En cuanto a los conformeros de mínima energía encontrados para los derivados de *N*-metilados **1g** ($Cg1$ y $Cg2$) y **1e** (par especular $Cg1/Cg1'$) que contribuyen con una densidad poblacional de Boltzman superior al 85%, presentan características direccionales típicas que concuerdan con la formación de un enlace de hidrógeno carbono-oxígeno N-CH...O entre el N-CH₃ y el átomo de oxígeno del grupo carbonilamida.⁶³

Por otro lado, en fase acuosa, el análisis de los ángulos diedros así como las distancias y las preferencias angulares de las interacciones por puente de hidrógeno (Figura 20), proporcionan evidencia de que los conformeros de **1f** en fase gas ($Cg1/Cg1'$ y $Cg2/Cg2'$) y en solución ($Cs1$ y $Cs2$) no son muy diferentes, a excepción de los ángulos diedros que caracterizan la orientación del grupo *p*OMe-bencilo. La corta distancia entre los átomos N-H...O (<2.3 Å) en los conformeros obtenidos en fase acuosa $Cs1$ y $Cs2$, que aportan el 100% de la población total, sugiere la presencia de una interacción intramolecular por puente de hidrógeno. Por lo tanto, la interacción intramolecular N-H...O que existente en fase gas permanece después de la solvatación acuosa. En contraste, como puede constatarse en la Tabla 3 y en la Figura 20, el ambiente solvataado modifica significativamente las geometrías de los conformeros de **1b**, **1e** y **1g**, alterando los ángulos diedros implicados en la interacción intramolecular por puente de hidrógeno predicha en las estructuras en fase gas. Como resultado de estos cambios geométricos la fuerza de enlace-H intramolecular estabilizante,

⁶³ a) Desiraju G. R., The C-H...O hydrogen bond: structural implications and supramolecular design, *Acc. Chem. Res.* (1996), 29, 441-449.; b) Horowitz S., Trievel R. C., Carbon-oxygen hydrogen bonding in biological structure and function, *J. Biol. Chem.* (2012), 287, 41576-41582.; c) para detalles estructurales de los conformeros se recomienda consultar la referencia 61, así como la información de soporte.

importante en fase gas, puede romperse en agua muy probablemente para permitir la formación de interacciones de enlace-H intermoleculares con el disolvente.

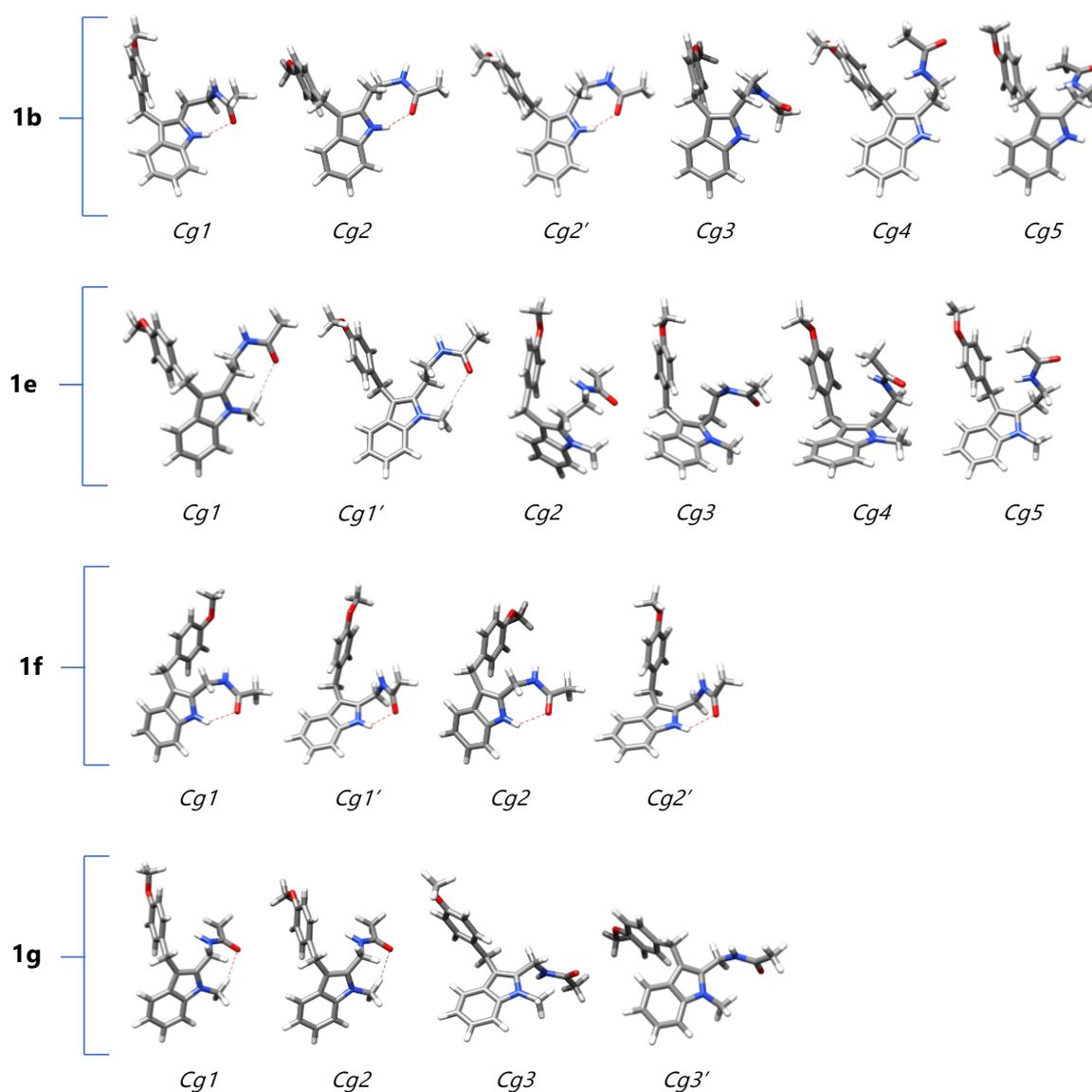


Figura 19. Geometrías obtenidas para los conformeros de mínima energía en fase gas [DFT B3LYP/6-31+G (d,p)] para **1b**, **1e**, **1f** y **1g**. La estabilidad aumenta de derecha a izquierda en cada fila. Las conformaciones especulares, con los mismos valores absolutos de ángulos diedros (τ) pero signos opuestos, fueron encontradas para los conformeros de energía mínima de **1b** ($Cg2/Cg2'$), **1e** ($Cg1/Cg1'$), **1f** ($Cg1/Cg1'$; $Cg2/Cg2'$) y **1g** ($Cg3/Cg3'$). El enlace-H intramolecular se indica con una línea segmentada roja.

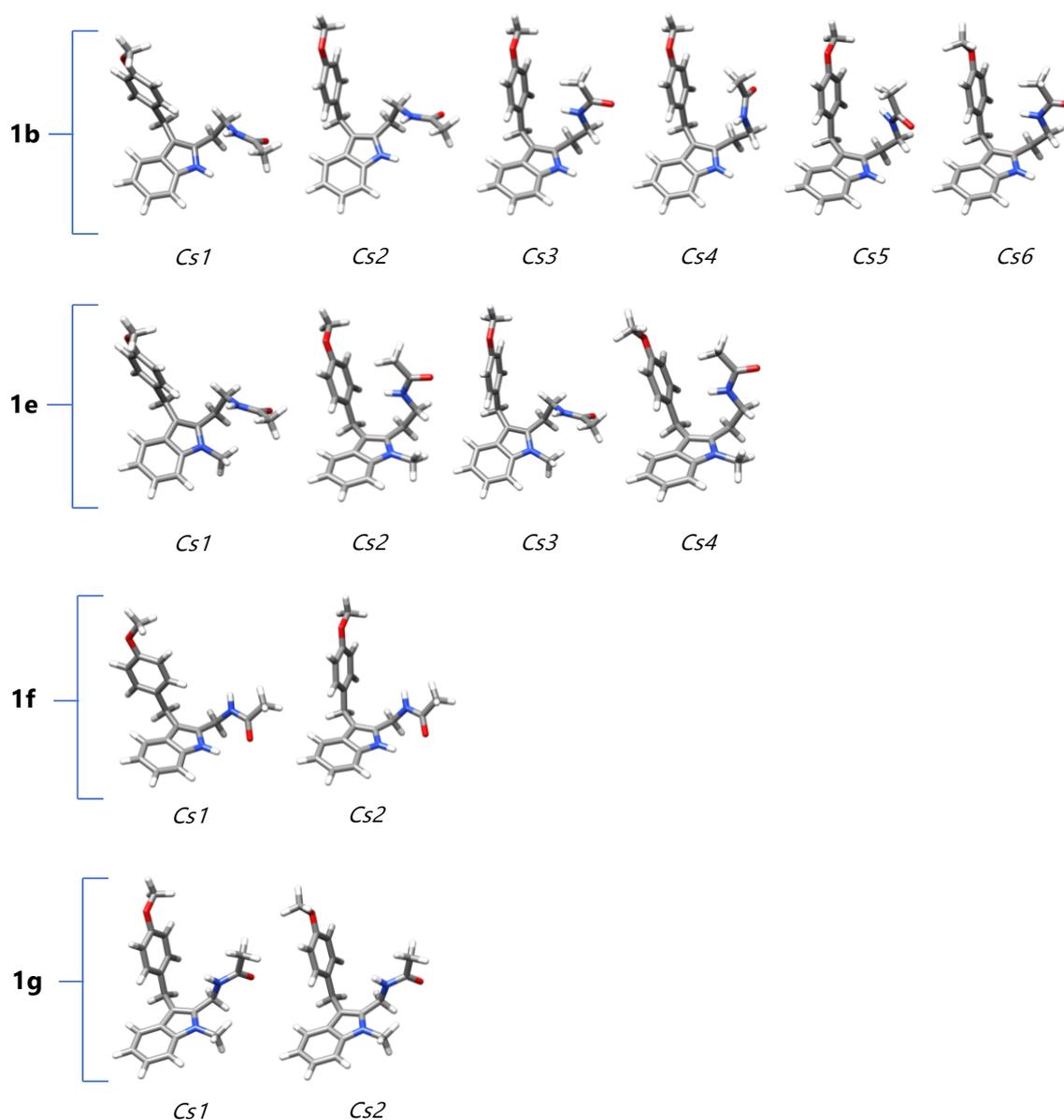


Figura 20. Geometrías obtenidas para los conformeros de mínima energía en solución acuosa [DFT B3LYP/6-31+G (d,p), solvatación por el método CPCM] para **1b**, **1e**, **1f** y **1g**. La estabilidad aumenta de derecha a izquierda en cada fila.

Tabla 3. Energías relativas en fase gas ($G_{\text{gas,rel}}$) y solución acuosa ($G_{\text{soln,rel}}$), fracciones molares (χ %) y ángulos diedros relevantes para los conformeros de mínima energía de **1b**, **1e** **1f** y **1g**. Todos los valores energéticos se dan en kcal/mol

FASE GAS							SOLUCIÓN ACUOSA						
	$G_{\text{gas,rel}}^b$	χ_{gas}^b	τ_1^c	τ_2^c	τ_3^c	τ_4^c		$G_{\text{soln,rel}}^b$	χ_{soln}^b	τ_1^c	τ_2^c	τ_3^c	τ_4^c
1b							1b						
<i>Cg1</i>	0.00	42.59	-75.6	158.7	-60.1	107.1	<i>Cs1</i>	0.00	42.17	112.3	92.1	61.8	88.9
<i>Cg2</i>	0.35	23.47	80.9	-119.2	-124.2	74.8	<i>Cs2</i>	0.32	18.68	-82.8	95.5	64.7	89.0
<i>Cg2'</i>	0.35	23.47	-80.8	119.2	124.1	-74.7	<i>Cs3</i>	0.44	15.26	-84.8	120.0	-61.6	178.3
<i>Cg3</i>	1.17	5.95	86.5	-75.9	-45.3	-61.7	<i>Cs4</i>	0.59	11.85	-90.2	125.3	-62.6	-91.8
<i>Cg4</i>	1.69	2.45	-102.2	99.2	-71.3	-127.5	<i>Cs5</i>	0.62	11.26	-85.2	121.0	-61.6	137.1
<i>Cg5</i>	1.79	2.07	91.4	-112.7	64.2	158.5	<i>Cs6</i>	0.64	10.89	-86.5	119.9	-62.1	-176.8
1e							1e						
<i>Cg1</i>	0.00	43.00	80.5	-97.5	-171.8	78.4	<i>Cs1</i>	0.00	36.67	-112.0	85.0	61.4	88.6
<i>Cg1'</i>	0.01	42.46	-80.6	97.2	171.6	-78.7	<i>Cs2</i>	0.27	23.25	-89.1	113.5	-60.6	173.7
<i>Cg2</i>	1.35	4.39	81.0	-112.8	46.9	-115.0	<i>Cs3</i>	0.31	21.73	-85.5	88.1	63.1	89.4
<i>Cg3</i>	1.39	4.15	-89.2	73.8	50.5	76.7	<i>Cs4</i>	0.41	18.35	-93.0	112.0	-63.2	-174.3
<i>Cg4</i>	1.47	3.61	-84.6	112.2	-47.0	114.2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cg5</i>	1.71	2.39	-96.3	106.7	-65.9	-154.3	-	-	-	-	-	-	-
1f							1f						
<i>Cg1</i>	0.00	28.36	55.2	-108.5	-77.2	-	<i>Cs1</i>	0.00	74.57	-111.2	115.4	79.6	-
<i>Cg1'</i>	0.00	28.36	-55.3	108.5	77.2	-	<i>Cs2</i>	0.64	25.43	-82.3	112.7	78.8	-
<i>Cg2</i>	0.16	21.64	68.5	-108.4	-77.0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cg2'</i>	0.16	21.64	-68.6	108.4	77.0	-	-	-	-	-	-	-	-
1g							1g						
<i>Cg1</i>	0.00	46.68	68.5	-92.0	-110.4	-	<i>Cs1</i>	0.00	58.35	-78.7	105.1	164.4	-
<i>Cg2</i>	0.08	40.59	73.3	-90.9	-109.1	-	<i>Cs2</i>	0.20	41.65	-81.2	105.6	159.4	-
<i>Cg3</i>	1.18	6.36	-110.3	-104.8	-120.6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cg3'</i>	1.18	6.36	110.3	104.8	120.6	-	-	-	-	-	-	-	-

^b Valores relativos y distribución de Boltzman respecto al conformero más estable. ^c Definiciones de ángulos diedros Fig. 18.

5.2.3.3 Alineamiento de **1b**, **1e**, **1f** y **1g** con los modelos agonista y antagonista

Con la información obtenida sobre la preferencia conformacional en fase gas y en ambiente acuoso, se procedió a la evaluación del alineamiento de los conformeros de mínima energía sobre los mapas farmacofóricos tanto agonista como antagonista, diseñados previamente. Cabe señalar que las geometrías de los conformeros obtenidos en fase gas no mostraron alineamiento significativo con los modelos agonista o antagonista, ya que todos superaron la desviación cuadrática media (RMSD $< 1.0 \text{ \AA}$) establecida en los parámetros de alineamiento.

En contraste, las geometrías de los conformeros calculados en medio acuoso, particularmente, los dos conformeros más estables de **1b** (*Cs1*, *Cs2*), **1e** (*Cs1*, *Cs3*), **1f** (*Cs1*, *Cs2*), y **1g** (*Cs1*, *Cs2*) mapearon razonablemente con la hipótesis antagonista. A excepción de *Cs1* en **1b**, *Cs1* en **1e** y *Cs2* en **1f**, todos los conformeros correlacionaron con las seis características farmacofóricas antagonistas: dos sitios que funcionan como enlace por puente de hidrógeno aceptor, un sitio donante de enlace de hidrógeno y dos regiones aromáticas hidrofóbicas. Cabe enfatizar que las geometrías de los conformeros de **1b**, **1e**, **1f** y **1g** no mostraron alineamiento con el modelo agonista. El alineamiento geométrico de los conformeros en fase acuosa sobre los modelos farmacofóricos melatoninérgicos se muestran en la Figura 21 y las puntuaciones de ajuste (*pharmacophore fit*) a los modelos agonista y antagonista se indican en la Tabla 4.

En resumen, el diseño de los modelos farmacofóricos de ligandos agonistas y antagonistas melatoninérgicos permitió realizar un screening virtual de los derivados de 2-(*N*-acilaminoalquil)indoles **1b**, **1e**, **1f** y **1g**. El análisis de alineación estructural mostró que el mejor ajuste fue sobre el mapa farmacofórico antagonista de ocho entidades químicas, en gran parte porque el centro hidrofóbico que proporciona el grupo bencilo no tiene ningún componente comparable en el modelo agonista. Dicho alineamiento fue exitoso para los

conformeros estadísticamente significativos optimizados en un ambiente de polarización continua solvatado con agua.

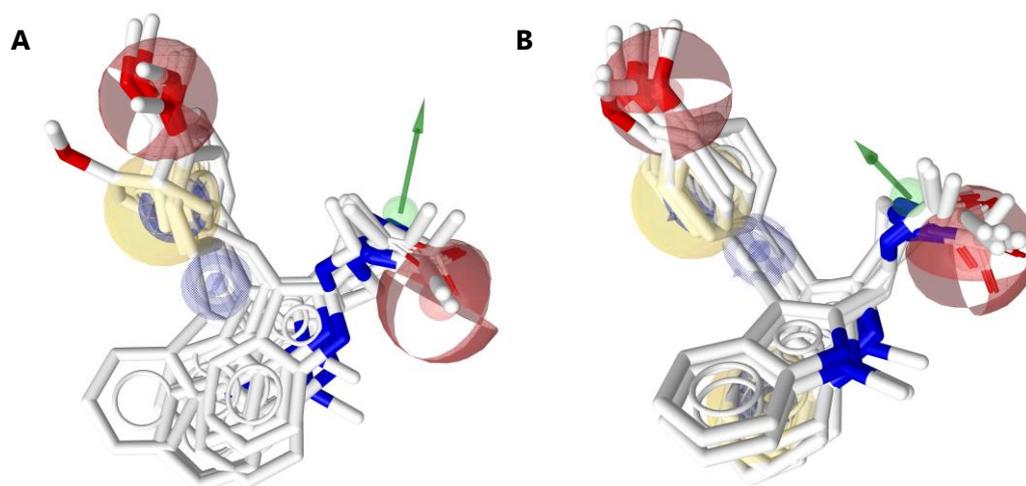


Figura 21. Alineamiento de conformeros de mínima energía en ambiente acuoso sobre los modelos farmacofóricos melatoninérgicos **(A)** agonista y **(B)** antagonista.

Tabla 4. Características funcionales de las hipótesis agonista y antagonista de los conformeros de mínima energía en solución acuosa de **1b**, **1e**, **1f** y **1g**

	Agonista					Antagonista					
	HBA	HBD	H	Ar	score	HBA	HBD	H	Ar	score	
1b						1b					
<i>Cs1</i>	-	-	-	-	-	<i>Cs1</i>	2	1	1	1	48.61
<i>Cs2</i>	2	0	1	0	31.73	<i>Cs2</i>	2	1	2	0	52.98
<i>Cs3</i>	2	0	1	0	32.30	<i>Cs3</i>	2	0	2	0	43.58
<i>Cs4</i>	-	-	-	-	-	<i>Cs4</i>	1	1	2	0	43.30
<i>Cs5</i>	2	0	1	0	32.55	<i>Cs5</i>	2	0	2	0	44.57
<i>Cs6</i>	2	0	1	0	31.73	<i>Cs6</i>	2	0	2	0	43.10
1e						1e					
<i>Cs1</i>	-	-	-	-	-	<i>Cs1</i>	2	1	1	1	53.08
<i>Cs2</i>	2	0	1	0	32.20	<i>Cs2</i>	2	0	2	0	44.42
<i>Cs3</i>	2	0	1	0	31.80	<i>Cs3</i>	2	1	2	0	53.26
<i>Cs4</i>	2	0	1	0	32.30	<i>Cs4</i>	2	0	2	0	44.21
1f						1f					
<i>Cs1</i>	1	1	1	0	36.80	<i>Cs1</i>	2	1	2	0	53.43
<i>Cs2</i>	2	0	1	0	32.42	<i>Cs2</i>	2	0	2	1	54.04
1g						1g					
<i>Cs1</i>	-	-	-	-	-	<i>Cs1</i>	2	1	2	0	52.90
<i>Cs2</i>	-	-	-	-	-	<i>Cs2</i>	2	1	2	0	53.04

5.2.4 Modelado por homología de receptores MT1 y MT2

La predicción de la estructura tridimensional (3D) de los receptores de melatonina acoplados a proteínas G (GPCR) representa un problema complejo debido a diferentes razones, incluyendo a) la falta de una adecuada estructura de plantilla, b) la ausencia de un patrón validado de interacciones ligando-receptor y c) la naturaleza del ligando endógeno y la composición de aminoácidos del sitio de unión. La primera cuestión está relacionada con la disparidad entre el número de secuencias de GPCR identificadas y el número de estructuras determinadas experimentalmente disponibles a la fecha. De hecho, las estructuras de rayos X de GPCRs actualmente descritas en *Protein Data Bank* cubren sólo el ~2% de las casi 800 secuencias de GPCRs identificadas hasta ahora en el genoma humano.⁶⁴ En consecuencia, la mayoría de los GPCR tienen que ser modelados usando plantillas "estructuralmente remotas", es decir, proteínas que tienen menos del 30% de identidad de secuencia. Otra cuestión que hace que el modelado de los receptores de melatonina sea aún más difícil es la falta de interacciones bien caracterizadas entre los ligandos y los receptores. De hecho, aunque se llevaron a cabo estudios de mutagénesis dirigida en un número de diferentes residuos, abarcando todos los dominios transmembranales de los receptores MT1 y MT2, no se ha identificado un modo de unión inequívoca para la melatonina.⁶⁵ Las dificultades en el modelado de los receptores MT1 y MT2 también están relacionadas con las propiedades fisicoquímicas del ligando endógeno, así como con la composición de aminoácidos del sitio de reconocimiento de los receptores. Ambos receptores carecen de un patrón de residuos polares y cargados que puedan anclar a neurotransmisores polares en el sitio de unión. Debido a la presencia de tal ambiente hidrófobo y al notable carácter lipofílico de la MLT, es poco probable

⁶⁴ Xiang J., Chun E., Liu C., Jing L., Al-Sahouri Z., Zhu L., Liu W., Successful strategies to determine high-resolution structures of GPCRs, *Trends. Pharmacol. Sci.* (2016), 37, 1055–1069.

⁶⁵ Mazna P., Obsilova V., Jelinkova I., Balik A., Berka K., Sovova Z., Ettrich R., Svoboda P., Obsil T., Teisinger J., Molecular modeling of human MT2 melatonin receptor: the role of Val204, Leu272 and Tyr298 in ligand binding, *J. Neurochem.*, (2004), 91, 836–842.

que los compuestos melatoninérgicos puedan formar interacciones polares dentro del sitio de unión.⁶⁶

A pesar de las dificultades, las herramientas computacionales y el constante desarrollo de nuevas estructuras de ligandos han permitido generar modelos de receptores melatoninérgicos cada vez más confiables.³⁹

5.2.4.1 Alineamiento de secuencia de aminoácidos

Particularmente, para el diseño de los receptores MT1 y MT2 se empleó el método de modelado por homología⁶⁷ utilizando como platilla el receptor β_2 -adrenérgico humano (código Uniprot: P07550; PDB: 2RH1, Resolución: 2.4 Å). La secuencia de aminoácidos de los receptores melatoninérgicos fue obtenida de la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) con los códigos P48039 para MT1 (hMTNR1A) y P49286 para MT2 (hMTNR1B). Se realizó el alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de los tres receptores prestando mayor atención en los dominios transmembranales que forman el núcleo de los GPCRs (Figura 22).

Se sabe que las hélices de los receptores de melatonina son superponibles con las hélices conocidas experimentalmente del receptor β_2 -adrenérgico. En esta perspectiva, por lo tanto, fue importante crear el menor número posible de espacios en los dominios transmembranales.

Comparando las alineaciones, se observó que MT1 está ligeramente más cerca de la secuencia del receptor β_2 -adrenérgico que MT2, con un 28 % de identidad de secuencia, mientras que MT2 muestra aproximadamente 26% de residuos idénticos. Sin embargo, todos los aminoácidos comúnmente conservados en las hélices de los GPCR están presentes y superpuestos como se muestra en la figura del alineamiento (Figura 22).

⁶⁶ Jockers R., Delagrangé P., Dubocovich M. L., Markus L. P., Renault N., Tosini G., Cecon E., Zlotos D. P., Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20, *Br. J. Pharmacol.*, (2016), 173, 2702–2725.

⁶⁷ Levit A., Barak D., Behrens M., Meyerhof W., Niv M. Y., Homology model-assisted elucidation of binding sites in GPCRs. En: *Cap 11 Methods in molecular biology*, editorial *Springer Protocols* (2012), 914, pp. 179-205.

5.2.4.2 Diseño y alineamiento 3D de receptores MT1 y MT2

El alineamiento tridimensional complementa y refina el alineamiento de las secuencias primarias y proporciona información valiosa sobre la posición espacial de residuos equivalentes, en particular sobre aquellos que conforman la arquitectura de los respectivos sitios de unión específicos. En nuestro caso, la construcción de la estructura 3D de los receptores melatoninérgicos se llevó a cabo en el servidor web SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>), soportado por el Instituto Suizo de Bioinformática SIB.⁶⁸

Se empleó la resolución más alta disponible para el receptor β_2 -adrenérgico (PDB: 2RH1, Resolución: 2.4 Å). Los modelos obtenidos directamente a partir de estos alineamientos se comprobaron con una minimización de energía, empleando ModRefiner,⁶⁹ diseñada para reducir los efectos estéricos de las cadenas laterales sin modificar la estructura de la proteína, permitiendo esencialmente la optimización de la geometría de la secuencia de aminoácidos evitando la menor interferencia de las cadenas laterales tanto como sea posible.

Después de la minimización, ambos modelos fueron validados evaluando la calidad de la estructura 3D utilizando MolProbity.⁷⁰ Dicho servidor proporciona un análisis detallado del efecto estérico que provocan todos los átomos que conforman los aminoácidos, así como el análisis de ángulos diedros y calcula las interacciones por puente de hidrógeno y Van der Waals en las interfaces entre

⁶⁸ Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Cassarino T. G., Bertoni M., Bordoli L., Schwede T., SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information, *Nucleic Acids Research*, (2014), 42, W252-W258.

⁶⁹ Xu D., Zhang Y., Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization., *Biophys. J.*, (2011), 101, 2525-2534.

⁷⁰ Chen V. B., Arendall III W. B., Headd J. J., Keedy D. A., Immormino R. M., Kapral G. J., Murray L. W., Richardson J. S., Richardson D. C., MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica* (2010), D66, 12-21.

componentes. Los resultados del análisis de ángulos de torsión ϕ - ψ del esqueleto de la proteína se muestran en los diagramas de Ramachandran⁷¹ de la Figura 23A.

Se observó que el 92% de los aminoácidos que conforma la estructura del receptor MT1 tiene la geometría adecuada, mientras que para MT2 más del 94%. Este resultado hace que los modelos 3D sean adecuados, ya que los aminoácidos que conforman los siete dominios transmembranales se encuentran con la geometría correcta de las α -hélices. El porcentaje de residuos localizados en regiones menos favorables fue bajo, con valores de 2.4% y 1.5%, respectivamente. A pesar de encontrar residuos en zonas no favorables, todos ellos pertenecen a espacios permitidos de acuerdo a la geometría que adoptan en la estructura secundaria de la proteína. Los valores obtenidos para cada parámetro geométrico evaluado se muestran en la Tabla 5.

El alineamiento de los modelos 3D de los receptores melatoninérgicos con el receptor β_2 -adrenérgico cristalizado, mostró una baja variabilidad estructural, confirmando la correcta disposición espacial de los residuos de aminoácidos (Figura 23B).

⁷¹ El diagrama de Ramachandran muestra los ángulos de torsión ϕ - ψ del esqueleto de la proteína. Proporciona una visión simple de la conformación de una proteína. Los ángulos ϕ - ψ se agrupan en regiones distintas en el diagrama de Ramachandran donde cada región corresponde a una estructura secundaria particular. a) Ramachandran G. N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V., Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* (1963), 7, 95–99.; b) Ho B. K., Brasseur R., The Ramachandran plots of glycine and pre-proline, *BMC Struc. Biol.* (2005), 5, 14.; c) Hollingsworth S. A., Karplus P. A., A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. *Biomol. Concepts*, (2010), 1, 271-283.

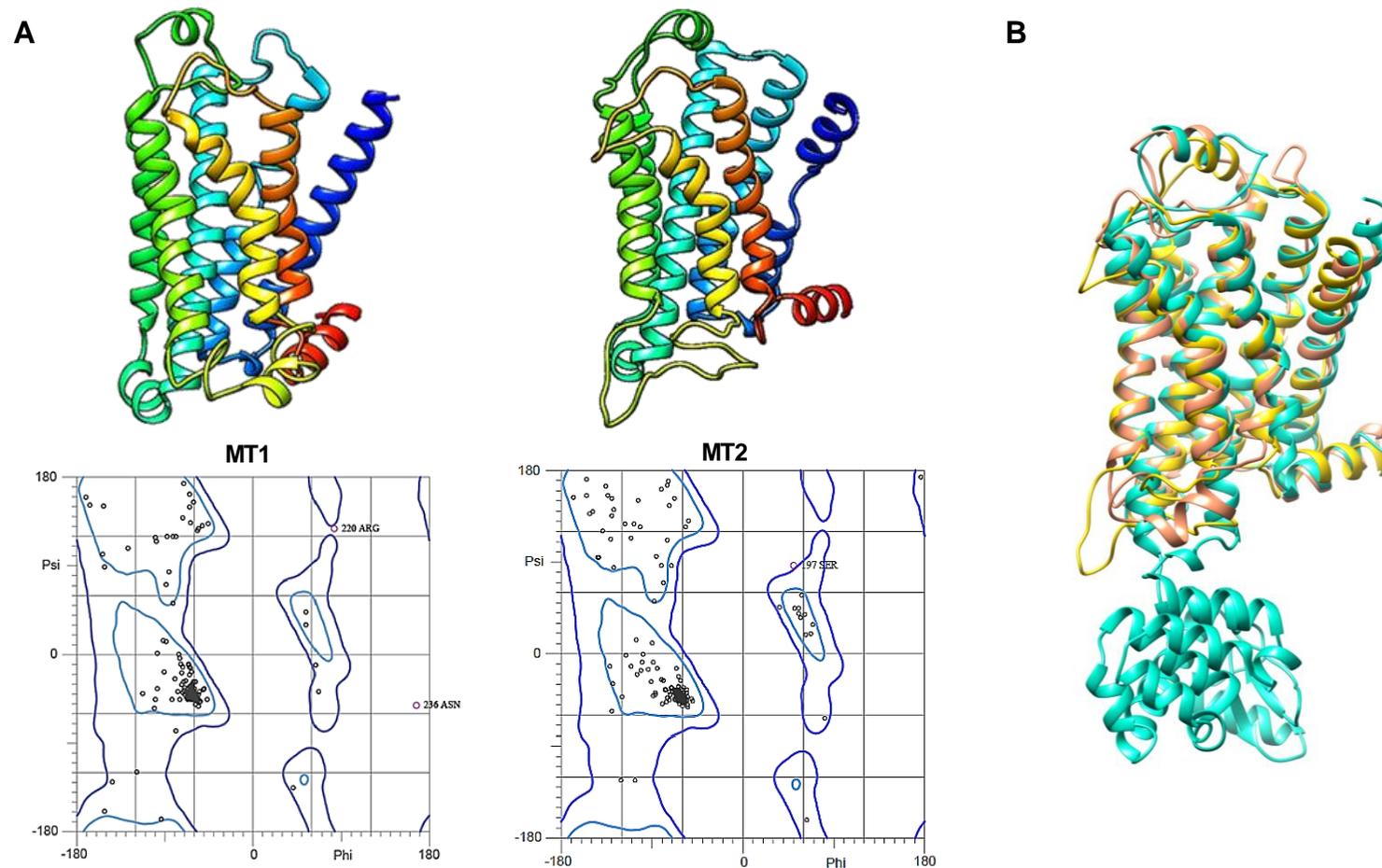


Figura 23. A. Modelos 3D de MT1 y MT2 generados por homología con el receptor β_2 -adrenérgico (arriba). Gráficos de Ramachandran obtenidos para los modelos de MT1 y MT2. Las regiones más favorables encierran a los aminoácidos representados en círculos dentro del valle del cuadrante. **B.** Alineamiento 3D de MT1 (beige), MT2 (amarillo) y β_2 -adrenérgico (verde, el asa intracelular está sustituida para facilitar la cristalización y no es funcional).

Tabla 5. Resultados de la validación geométrica de los modelos de los receptores

Parámetro geométrico	MT1		MT2		Valores esperados
Rotámeros desfavorecidos	7	2.72%	3	1.20%	<1%
Residuos fuera de zona	7	2.43%	4	1.39%	<0.05%
Residuos favorecidos	265	92.01%	272	94.77%	>98%
Desviaciones de Cβ >0.25 Å	1	0.36%	0	0.00%	0%
Enlaces erróneos	157/2390	6.57%	143/2363	6.05%	0%
Ángulos erróneos	64/3261	1.96%	55/3232	1.70%	<0.1%

Con los modelos validados geoméricamente, se continuó con la validación funcional, específicamente con el reconocimiento molecular del sitio activo hacia el ligando natural, la melatonina.

5.2.4.3 Validación funcional e identificación del sitio activo

Para considerar totalmente válidos los modelos melatoninérgicos diseñados por homología, es imprescindible la identificación del sitio activo y a su vez, que este mismo logre el reconocimiento molecular de su ligando natural. Para esto, se emplearon métodos automáticos de acoplamiento molecular soportados en SwissDock (<http://www.swissdock.ch/>).⁷²

Se sometieron ambos receptores, MT1 y MT2, a un análisis de acoplamiento molecular exhaustivo para explorar las posiciones relativas que adoptan todos los posibles confórmeros de la MLT, el conjunto de clusters obtenidos se muestran en la Figura 24. En el análisis, "docking ciego" realizado, todos los aminoácidos de la proteína que presentaron interacción con la MLT hasta los 5 Å, en cada sitio de unión predicho, se consideraron como potencialmente en contacto. En general, se encontraron tres posibles sitios de unión, de los cuales, dos de ellos fueron

⁷² Grosdidier A., Zoete V., Michielin O., SwissDock. A protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* (2011), 39, W270–W277.

automáticamente descartados por localizarse en la porción intracelular. Por lo tanto, como se muestra en la Figura 24, el mayor número de conformeros de la MLT fue reconocido en un bolsillo localizado entre los dominios transmembranales TM3, TM4, TM5 y TM6 siendo este sitio de unión el energéticamente más favorable.

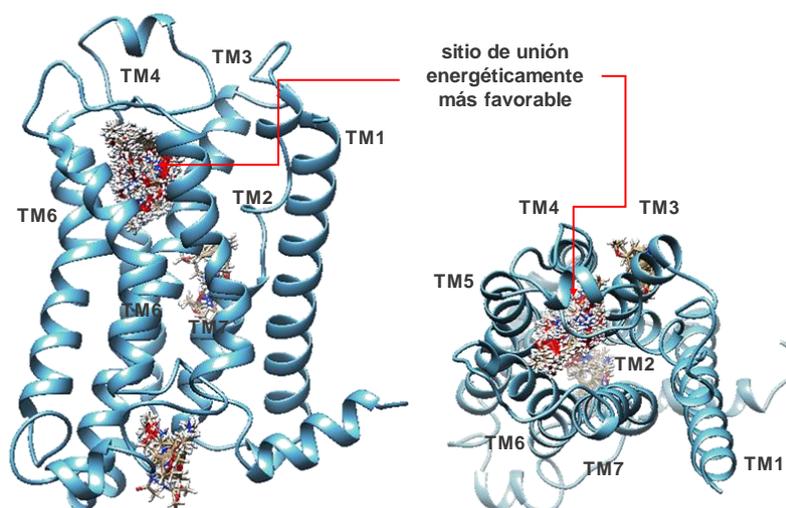


Figura 24. Sitios de reconocimiento molecular por "docking ciego" entre MT1, MT2 y MLT. Izq. vista lateral del modelo MT2; der. vista superior del modelo MT1.

De acuerdo con trabajos previos, la mayoría de los datos para el sitio activo de los GPCRs en general apuntan hacia el mismo bolsillo como el sitio de unión, que se extiende desde el dominio TM3 al TM7 y se sitúan en la porción extracelular del haz helicoidal.⁷³ Particularmente en los trabajos relacionados con los receptores MT1 y MT2, a pesar de que existen diversas opiniones relacionadas con el tipo de aminoácidos que llevan a cabo el reconocimiento molecular de la MLT, sí se ha podido establecer con claridad que los residuos críticos para el reconocimiento se encuentran localizados en los dominios TM3, TM5 y TM6. Por ejemplo, la histidina (195 en MT1 y 208 en MT2) de la hélice TM3 es indispensable para el

⁷³ Kratochwil N. A., Gatti-McArthur S., Hoener M. C., Lindemann L., Christ A. D., Green L. G., Guba W., Martin R. E., Malherbe P., Porter R. H., Slack J. P., Winnig M., Dehmlow H., Grether U., Hertel C., Narquizian R., Panousis C. G., Kolczewski S., Steward L., G protein-coupled receptor transmembrane binding pockets and their applications in GPCR research and drug discovery: a survey. *Curr. Top. Med. Chem.* (2011), *11*, 1902-1924.

reconocimiento, específicamente, del átomo de oxígeno del grupo 5-MeO en la MLT a través de una interacción por puente de hidrógeno. Por otro lado, también se ha propuesto que dos serinas conservadas en el segmento TM3 de ambos receptores (110 en MT1, 123 en MT2 y 114 en MT1, 127 en MT2) interaccionan con los grupos NH y CO de la cadena etilamida, logrando con esto la activación de los receptores por agonistas (Figura 25).⁷⁴

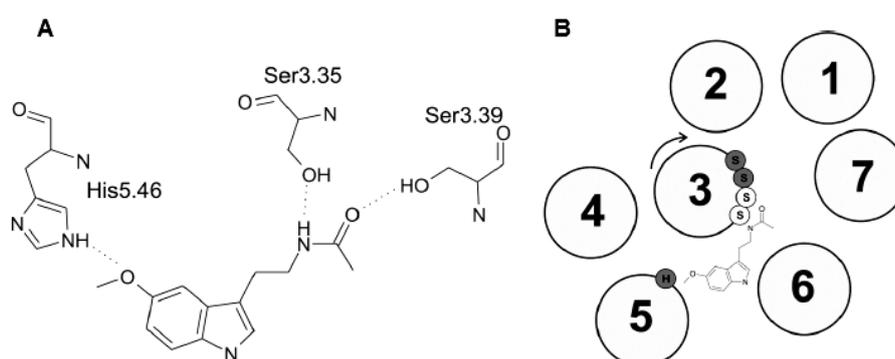


Figura 25. Esquema general de las interacciones de la MLT en el sitio de unión de los receptores MT1 y MT2. A) interacciones por puente de hidrógeno funcionalmente importantes. B) Dominios transmembranales vistos desde el lado extracelular. En los dominios TM4 y TM6 se han propuesto interacciones π - π con el sistema indólico.

En concreto, el diseño por homología de los receptores melatoninérgicos, utilizando como platilla el receptor β_2 -adrenérgico, resultó válido y los modelos son apropiados para evaluar la relación estructura-actividad de las 3-alkyl-2-N-acetyltryptamines **1a-1d**.

5.2.5 Análisis docking de las 3-alkyl-2-N-acetyltryptamines

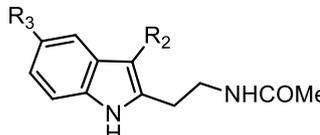
Con los modelos 3D validados de los receptores MT1 y MT2, se procedió a evaluar el acoplamiento molecular de las 3-alkyl-2-N-acetyltryptamines, que implica la predicción de la conformación y orientación del ligando dentro del sitio de unión, así como el efecto que tienen los diferentes sustituyentes en la energía de interacción.

⁷⁴ Chugunov A. O., Farce A., Chavatte P., Efremov R. G., Differences in binding sites of two melatonin receptors help to explain their selectivity to some melatonin analogs: a molecular modeling study. *J Biomol. Struct. Dyn.* (2006), 24, 91-107.

El análisis se realizó bajo el mismo protocolo de validación, empleando el método automático de acoplamiento molecular ciego ejecutado en SwissDock. Los ligandos utilizados en el estudio docking fueron los conformeros de mínima energía de las 3-alkil-2-*N*-acetiltryptaminas **1a-1d** encontrados en el análisis del potencial electrostático molecular. Para poder contar con una referencia en la energía de interacción, el luzindol (LZ) fue considerado como el control positivo de reconocimiento, específicamente (a) por ser regioisómero de los compuestos analizados **1a-1d**, (b) mantener un PEM topológicamente equivalente y (c) por ser el ligando sintético del que se conoce ampliamente su afinidad y actividad intrínseca frente a los receptores melatoninérgicos.

Los resultados de $\Delta G_{\text{unión}}$ se muestran en la Tabla 6, se da el mejor valor encontrado dentro del clúster localizado en el sitio de unión de la MLT.

Tabla 6. Energía de interacción de las isotriptaminas frente a los receptores MT1 y MT2, obtenidas por docking ciego en SwissDock



1a: R₃= H R₂= Bn
1b: R₃= H R₂= *p*OMeBn
1c: R₃= OMe R₂= Bn
1d: R₃= H R₂= EtPh

ENERGÍA DE INTERACCIÓN, $\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol).						
	MLT	LZ	1a	1b	1c	1d
MT1	-7.30	-7.93	-8.11	-8.60	-8.53	-8.28
MT2	-7.31	-7.83	-8.02	-7.86	-8.07	-8.21

Inicialmente, las energías de interacción obtenidas muestran una unión no selectiva de la MLT y el LZ, siendo este último quien presentó el complejo proteína-ligando más estable para los receptores MT1 y MT2, en comparación con la melatonina. Por su parte, las isotriptaminas **1a-1d** mostraron, en general, una mejor energía de unión en ambos receptores, teniendo una ligera tendencia a ser más afines por el receptor MT1. Las energías de unión en el docking molecular

fueron consistentes con los resultados obtenidos en los diagramas de potencial electrostático molecular. Es decir, los derivados con grupos electrodonadores **1b** y **1c** tuvieron una mejor $\Delta G_{\text{unión}}$ que la melatonina y el luzindol frente al receptor MT1 y ligeramente mayor para MT2, mientras que para las isotriptaminas **1a** y **1d** las energías se mantuvieron muy cercanas a las mostradas por el control positivo (LZ).

Por el hecho de observar que el cambio posicional de los grupos farmacóforos en el sistema indólico de las isotriptaminas **1a-1d** no afecta la energía de unión en los estudios de docking molecular, resulta interesante analizar cuáles son las interacciones que condicionan la formación de un complejo proteína-ligando más estable que la melatonina y el luzindol. Sin embargo, la baja estabilidad que mostraron los compuestos **1a-1d** al transformarse en los 3-oxiindoles **7** (Esquema 6, sección 5.1.2) limita su posible evaluación biológica. Por esto, se decidió realizar lo que el análisis docking dirigido sobre los análogos estables **9a-9d**; los resultados se discuten en la siguiente sección.

5.2.6 Análisis docking dirigido de *N*-carbometoxi isotriptaminas **9a-9d**

Diversos estudios se han enfocado a discutir la influencia de la estereoselectividad de una variedad de ligandos a receptores de MLT con la finalidad de determinar la capacidad de los enantiómeros para reproducir la conformación activa de la melatonina. En la Figura 26 se muestran ejemplos en donde se ha demostrado que el enantiómero *S* funciona como el eutómero,⁷⁵ e incluyen derivados de

⁷⁵ a) Davies D. J., Garratt P. J., Tocher D. A., Vonhoff S., Mapping the melatonin receptor. 5. Melatonin agonists and antagonists derived from tetrahydrocyclopent[b]indoles, tetrahydrocarbazoles and hexahydrocyclohept[b]indoles. *J Med Chem* (1998), 41, 451-467. b) Rivara S., Diamantini G., Di Giacomo B., Lamba D., Gatti G., Lucini V., Pannacci M., Mor M., Spadoni G., Tarzia G., Reassessing the melatonin pharmacophore-enantiomeric resolution, pharmacological activity, structure analysis, and molecular modeling of a constrained chiral melatonin analogue. *Bioorg Med Chem* (2006), 14, 3383-3391. c) Simpson D., Curran M. P., Ramelteon, a review of its use in insomnia. *Drugs* (2008), 68, 1901-1919. d) Bedini A., Lucarini S., Spadoni G., Tarzia G., Scaglione F., Dugnani S., Pannacci M., Lucini V., Carmi C., Pala D., Rivara S., Mor M., Toward the definition of stereochemical requirements for MT2-Selective antagonists and partial agonists by studying 4-Phenyl-2-propionamidotetralin derivatives. *J Med Chem* (2011) 54, 8362-8372.

tetrahydrocarbazoles (**a**),^{74a} 1,3,4,5-tetrahidrobenzo[*c,d*]indoles (**b**),^{74b} ramelteon® (**c**),^{74c} y 2-propionamidotetralinas (**d**).^{74d}

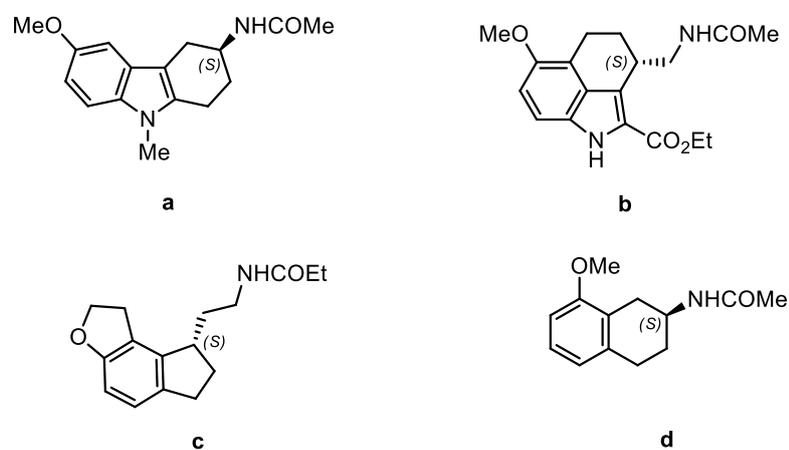


Figura 26. Eutómeros *S* de ligandos melatoninérgicos quirales.

En esta tesis se discuten los resultados del análisis de los estudios docking para los enantiómeros *S* de los compuestos **9a-9d**. Los estudios de modelado molecular de los enantiómeros *R* correspondientes, se encuentran actualmente en curso (Figura 50, anexo).

Por otro lado, para analizar el tipo de interacciones que mostraron las *N*-carbometoxi isotriptaminas **9a-9d** en los estudios de acoplamiento molecular docking sobre los receptores MT1 y MT2, es importante considerar previamente las investigaciones realizadas respecto a cambios puntuales en la secuencia de aminoácidos que se han hecho sobre estos receptores y que han puesto en relieve el papel que juegan ciertos residuos de aminoácidos en el reconocimiento molecular e interacción con la MLT.

5.2.6.1 Aminoácidos esenciales en el reconocimiento molecular de la MLT

Para investigar el papel que juegan residuos específicos de aminoácidos en la unión de la MLT a sus receptores, se han realizado experimentos de mutagénesis dirigida en combinación con la identificación de grupos farmacóforos. A partir de estos estudios se ha establecido que el residuo de histidina en la hélice TM5 (His 195 en MT1, His 208 en MT2) es crítico para la unión de alta afinidad en ambos subtipos de receptores.⁷⁶ Se ha asumido que esta histidina forma una interacción por puente de hidrógeno con el grupo 5-metoxi del ligando natural (MLT). En tanto que la afinidad en ligandos antagonistas, que no poseen el grupo metoxilo como el luzindol, no se ve afectada (ver Sección 5.2.4.3).

Como se mencionó anteriormente, se han propuesto dos serinas indispensables para el reconocimiento molecular (Ser 110 en MT1, Ser 123 en MT2 y Ser 114 en MT1, Ser 127 en MT2. Figura 25), propiedad que resultó relevante para los ligandos que son agonistas, pero no para los antagonistas.⁷⁷ La mutación de los residuos Val 204, Leu 272 y Tyr 294 a Ala suprimieron totalmente la unión de la melatonina al receptor MT2. Además, se ha encontrado que los residuos Cys 113 y Cys 190 de MT2 (residuos correspondientes en MT1: Cys 100 y Cys 177) que forman un puente disulfuro conservado, son importantes para la unión de ligandos agonistas; la mutación de al menos uno de ellos suprime totalmente la unión de la MLT.^{16b}

⁷⁶ a) Gerdin M. J., Mseeh F., Dubocovich M. L., Mutagenesis studies of the human MT2 melatonin receptor. *Biochem. Pharmacol.* (2003), 15, 315-320. b) Kokkola T., Foord S. M., Watson M. A., Vakkuri O., Laitinen J. T., Important amino acids for the function of the human MT1 melatonin receptor. *Biochem. Pharmacol.* (2003), 65, 1463-1471.

⁷⁷ a) Conway S., Mowat E. S., Drew J. E., Barrett P., Delagrangé P., Morgan P. J., Serine residues 110 and 114 are required for agonist binding but not antagonist binding to the melatonin MT1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001), 282, 1229-1236. b) Mazna P., Obsilova V., Jelinkova I., Balik A., Berka K., Sovova Z., Etrich R., Svoboda P., Obsil T., Teisinger J., Molecular modeling of human MT2 melatonin receptor: the role of Val204, Leu272 and Tyr298 in ligand binding. *J. Neurochem.* (2004), 91, 836-842.

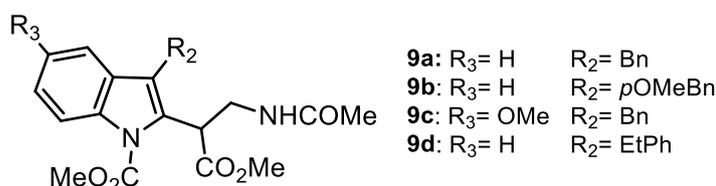
5.2.6.3 Predicción de la energía del complejo proteína (MT1, MT2)-ligando (9a-9d)

Con base en los resultados de validación de los modelos tridimensionales de los receptores MT1 y MT2 en el reconocimiento de la MLT, el estudio de docking dirigido se llevó a cabo en la región energéticamente más favorable, estrictamente en el sitio de unión putativo.

En dicho estudio se utilizó el software Autodock 4.2 y el criterio de búsqueda y flexibilidad conformacional se refinó dentro del sitio activo entre los dominios transmembranales TM3-TM6, para ambos receptores. El análisis jerárquico de los clústers se llevó a cabo sobre 60 ciclos de cálculo del algoritmo genético, analizando la frecuencia de ocurrencia y la energía más baja del complejo proteína-ligando. En la Tabla 7 se indican las energías libres de unión (ΔG) de los complejos y los residuos de aminoácidos con los que interaccionan las isotriptaminas **9** en el sitio de unión con los receptores MT1 y MT2. Así mismo, se compara la $\Delta G_{\text{unión}}$ de **9a-9d** con la del luzindol (LZ), un compuesto que ha mostrado gran afinidad y actividad antagónica frente a los receptores melatoninérgicos.

La detección de los residuos de aminoácido que mostraron interacción con **9a-9d** se basó en la localización experimental (con base en mutaciones puntuales) de aquellos residuos que resultaron ser esenciales en el reconocimiento molecular de los receptores melatoninérgicos hacia diversos ligandos. Hay tres aspectos relevantes que, en general, definieron el comportamiento de unión de **9a-9d** sobre los receptores MT1 y MT2. Primero, como es evidente en la Tabla 7, se puede observar que las mejores energías de unión se obtuvieron sobre el receptor MT1, segundo, la mayoría de los aminoácidos con quienes mostraron interacción son de carácter hidrofóbico en ambos receptores y, por último, sólo en el receptor MT2 se observaron interacciones por puente de hidrógeno.

Tabla 7. Energía de interacción y residuos de aminoácidos que estabilizan el complejo ligando-receptor entre las *N*-cabometoxi isotriptaminas (**8S**)-**9a-9d** y los receptores MT1 y MT2, obtenidas por docking molecular dirigido. $\Delta G_{\text{unión}}$ en kcal/mol.



	MT1		MT2	
	$\Delta G_{\text{unión}}$	Residuos de aa	$\Delta G_{\text{unión}}$	Residuos de aa
LZ	-8.72	Gly 104, Gly 108, Val 111, Ile 112, Ile 115, Leu 168, Thr 178, Phe 179, Gln 181, Phe 196, Leu 254, Asn 255, Gly 258, Tyr 281	-8.26	Met 120, Gly 121, Val 124, Val 128, Asn 175, Tyr 201, Val 204, Val 205, His 208, Phe 209, Trp 264, Asn 268, Tyr 294
9a	-9.82	Gly 108, Val 111, Phe 179, Try 187, Val 191, Val 192, His 195, Phe 196, Gln 181, Phe 247, Trp 251, Leu 254, Gly 258, Tyr 281	-7.56	Gly 121, Val 124, Asn 175, Tyr 200, Tyr 201, Val 204, Val 205, His 208, Phe 209, Trp 264, Leu 267, Asn 268, Tyr 294
9b	-9.64	Gly 104, Met 107, Gly 108, Val 111, Ile 112, Thr 178, Phe 179, Gly 181, Try 187, Val 191, Val 192, Phe 196, Lue 254, Asn 255, Tyr 281	-8.53	Met 120, Gly 121, Val 124, Asn 175, Tyr 201, Val 204, Val 205, His 208, Trp 264, Leu 267, Asn 268, Gly 271, Phe 290, Tyr 294
9c	-9.71	Gly 104, Met 107, Val 111, Ile 112, Val 159, Thr 178, Phe 179, Val 191, Val 192, Phe 179, Phe 196, Asn 255, Tyr 281	-8.54	Met 120, Gly 121, Val 124, Tyr 201, Val 204, Val 205, His 208, Phe 209, Trp 264, Leu 267, Asn 268, Gly 271, Phe 290, Tyr 294
9d	-9.86	Gly 104, Gly 108, Val 111, Ile 112, Tyr 178, Phe 179, Gln 181, Val 191, Val 192, Phe 198, Leu 254, Asn 255, Gly 258, Tyr 281	-9.08	Gly 121, Val 124, Val 128, Asn 175, Tyr 201, Val 204, Val 205, His 208, Phe 209, Trp 264, Leu 267, Asn 268, Gly 271, Phe 290

5.2.6.3.1 Modo de unión sobre el receptor MT1

Estudios derivados de la relación estructura-actividad sobre el receptor MT1 indican que la estabilidad del complejo formado específicamente en una unión agonista (por ejemplo, con la MLT) depende de interacciones tipo puente de hidrógeno que involucran a los aminoácidos His 195, Ser 110 y Ser 114. En tanto que el mismo tipo de estudios también han demostrado que la ausencia de interacciones por puente de hidrógeno no afectan la afinidad en una unión antagonista sobre el receptor MT1, como es el caso del luzindol.

El análisis docking de las *N*-carbometoxi isotriptaminas **9a-9d** indicó que estos compuestos no favorecen la formación de interacciones puente de hidrógeno con el receptor MT1, situación que coincide con la hipótesis farmacofórica antagonista postulada previamente para las isotriptaminas. Dicho lo anterior, el ambiente de las *N*-carbometoxi isotriptaminas **9a-9d** en MT1 se puede analizar considerando tres aspectos: (a) de acuerdo a la disposición espacial de los sustituyentes R₂ y R₃, (b) la orientación del núcleo indólico y (c) la orientación de la cadena etilacetamida. En las isotriptaminas **9a** y **9d** el sustituyente R₂ (Bn y CH₂Bn) mantiene una orientación similar. Los sustituyentes bencilo en **9a** y fenetilo en **9d** muestran interacciones hidrofóbicas con aminoácidos localizados sobre la hélice TM3, tales como Gly 104, Gly 108 y Val 111 (Figura 26). El anillo aromático (R₂) es estabilizado por interacciones de tipo π - π con los residuos Phe 247 y Phe 179. Mientras que el sistema indólico en **9a** y **9d** mantiene interacciones π - π con el residuo Trp 251 y está rodeado por interacciones hidrofóbicas ejercidas por Leu 254 y Tyr 281 desde el dominio transmembranal TM6. La cadena de etilacetamida en C2 está orientada hacia la cavidad hidrofóbica localizada entre las hélices TM3 y TM5, sobresaliendo las interacciones con los residuos Ile 112 en TM3, Val 191 y Val 192 en TM5. Finalmente, los grupos éster en la cadena etilacetamida y carbamato en N1 están orientados hacia la porción intracelular y por sus características electrostáticas están estabilizados por aminoácidos de carácter polar localizados

en TM5 como Gln 181, His 195 y en TM6 Asn 255. El aminoácido Gly 258 interactúa directamente con **9a** y **9d**, este residuo es considerado importante ya que su mutación por un residuo más voluminoso afecta negativamente la facilidad con la que el ligando puede acceder al sitio de unión y en consecuencia disminuye los valores de unión observados. En lo que respecta a las isotriptaminas **9b** y **9c**, éstas mantuvieron las mismas interacciones π - π e hidrofóbicas antes descritas, con la diferencia que en estas moléculas el grupo metoxilo de **9b** (en R₂) ó de **9c** (en R₃) favorece interacciones con los aminoácidos Gly 104 y Met 107 localizados sobre el dominio transmembranal TM3.

5.2.6.3.2 Modo de unión sobre el receptor MT2

El modo de unión de **9a-9d** en el receptor MT2 se caracteriza por la formación de interacciones por puente de hidrógeno (Figura 27). En general, los residuos de carácter hidrofílico como Asn 175, Asn 268 tiene la posibilidad de crear fuertes interacciones electrostáticas con los electrones π del sistema aromático del indol, estabilizando de esta forma el complejo proteína-ligando. Así como también a través de interacciones π - π e hidrofóbicas con residuos aromáticos Tyr 201, Phe 209, Trp 264, Phe 290.

Específicamente, el complejo formado por **9a** está estabilizado por una interacción por puente de hidrógeno del tipo O \cdots H-N= entre el átomo de oxígeno del grupo amida y el grupo donador =NH de la His 208 en la hélice TM5; por interacciones π - π entre el sistema indólico y el residuo Trp 264 y entre el grupo fenilo y el residuo Phe 209, así como por interacciones hidrofóbicas con Gly 121, Val 124, Val 204, Val 205, Leu 267. En lo que respecta a la isotriptamina **9b** ésta mostró una interacción por puente de hidrógeno del tipo O \cdots H-N entre al átomo de oxígeno del grupo OMe y el grupo donador N δ H de la Asn 268 (TM6), manteniendo el mismo tipo de interacciones hidrofóbicas que las mostradas por **9a**. El complejo formado por **9c** fue estabilizado por dos interacciones por puente de hidrógeno, una del tipo O \cdots H-N entre el átomo de oxígeno del grupo amida y el grupo

donador N_δH de la Asn 268 y otra del tipo O··H-N= entre el átomo de oxígeno del grupo carbamato y el grupo donador =NH de la His 208. Al igual que en **9a** y **9b**, se observaron interacciones hidrofóbicas entre **9c** y Met 120, Gly 121, Val 124, Val 204, Val 205, Leu 267, Gly 271, Phe 290. Finalmente, **9d** presentó una interacción por puente de hidrógeno del tipo O··H-N entre el átomo de oxígeno del grupo amida y el grupo donador N_δH de la Asn 268 en la hélice TM6, en tanto que las interacciones hidrofóbicas prevalecieron al igual que en los casos anteriores.

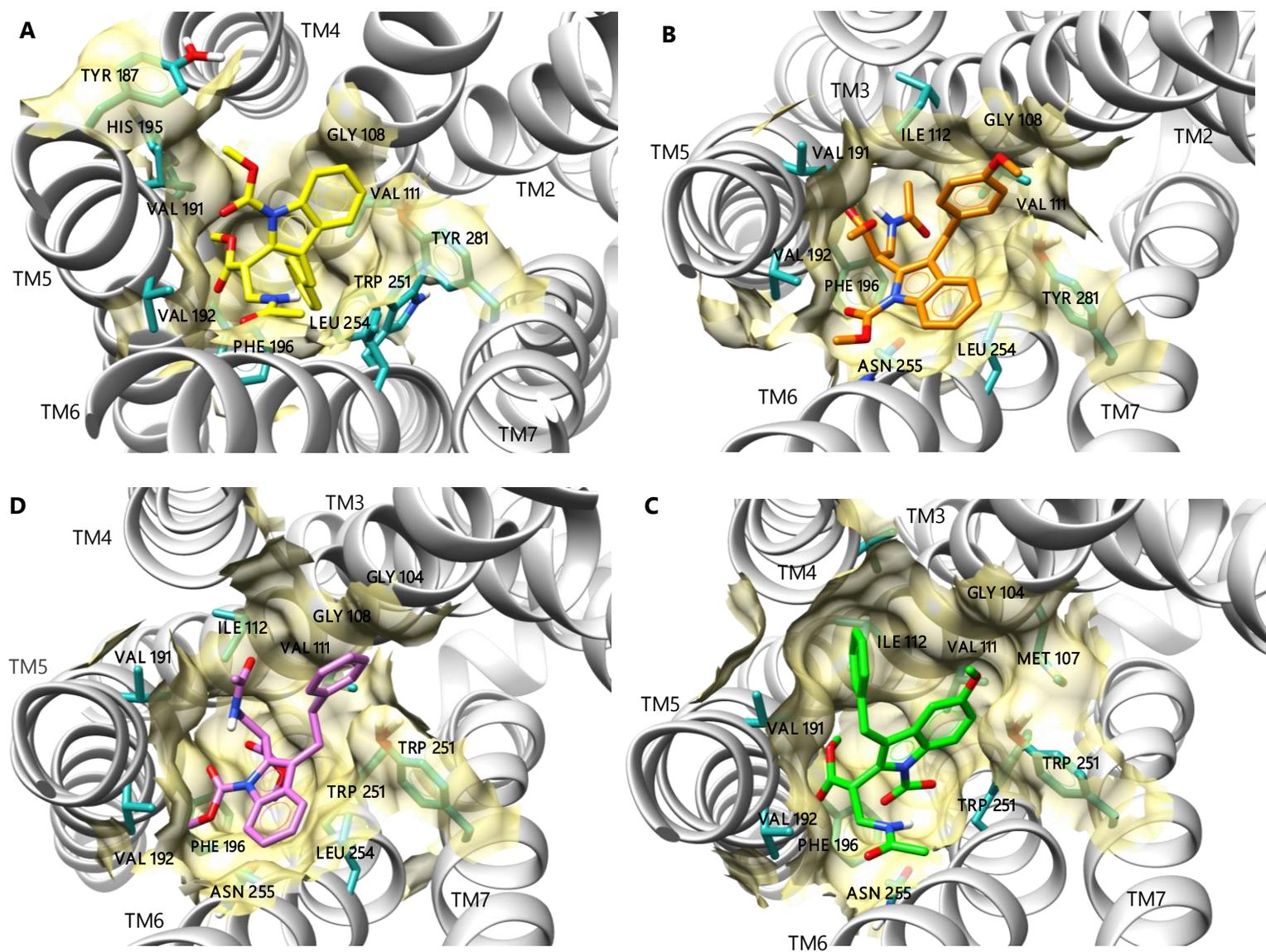


Figura 26. Complejo proteína-ligando entre el receptor MT1 y (8S)-9a (A), (8S)-9b (B), (8S)-9c (C) y (8S)-9d (D).

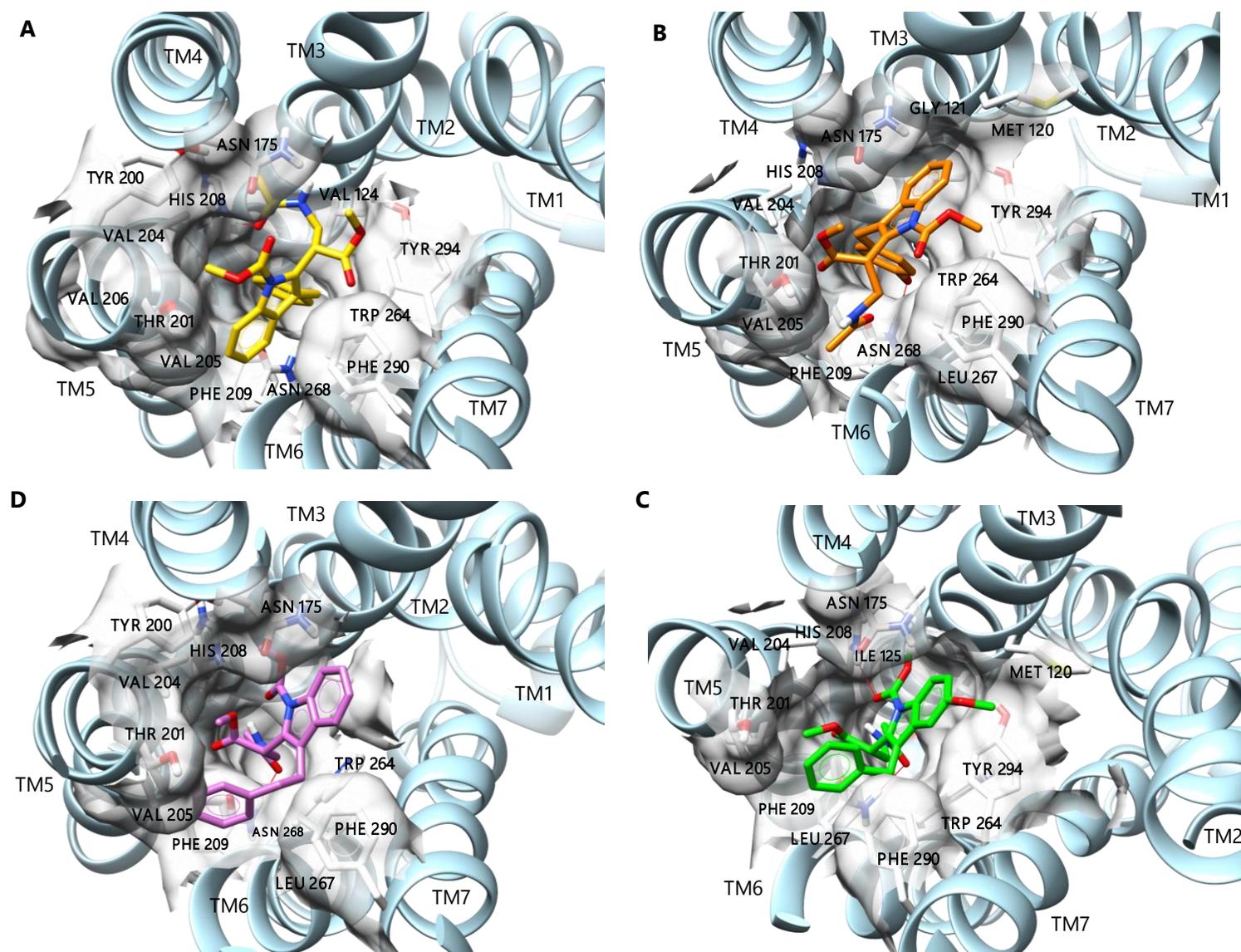


Figura 27. Complejo proteína-ligando entre el receptor MT2 y (8S)-9a (A), (8S)-9b (B), (8S)-9c (C) y (8S)-9d (D).

En concreto, el análisis docking indica la formación de complejos estables entre las (8*S*)-*N*-carbometoxi isotriptaminas **9** y los receptores MT1 y MT2, en donde las fuerzas que participan en la unión son principalmente de carácter hidrofóbico. Es importante resaltar que los residuos de aminoácidos implicados en la unión de las (8*S*)-*N*-carbometoxi isotriptaminas **9** en el complejo, coinciden con aquellos propuestos para otros ligandos melatoninérgicos de alta afinidad localizados en los dominios transmembranales TM3, TM5 Y TM6, principalmente.^{43, 47}

El programa Autodock predice una mejor energía de interacción para los complejos que forman las isotriptaminas **(8*S*)-9a-9d** con los receptores MT1 y MT2 que la encontrada cuando el ligando es el luzindol. Este resultado puede atribuirse al carácter polar del sustituyente CO₂Me en N y C en las isotriptaminas **9** y está en concordancia con ensayos experimentales que demostraron que la inclusión de grupos polares del tipo CO₂Me en la posición C2 del grupo indol resultó en una afinidad significativamente mayor en el orden picomolar.⁷⁸ Así mismo, los cálculos docking predicen una mejor energía de interacción para los complejos que forman las isotriptaminas **(8*S*)-9a-9d** con el receptor MT1, en comparación con la energía de unión del complejo que forman con el receptor MT2. Esta situación puede atribuirse a la diferencia en las propiedades hidrofóbicas del sitio de reconocimiento de cada receptor, ya que el sitio de unión en MT2 es más hidrófobo que en MT1.⁷³

En conclusión, este estudio permitió proponer un modo de unión de las (8*S*)-*N*-carbometoxi isotriptaminas **9a-9d** a los receptores melatoninérgicos MT1 y MT2, situándolas como una nueva serie de potenciales ligandos melatoninérgicos.

⁷⁸ a) Tarzia G., Diamantini G., Di Giacomo B, Spadoni G., 1-(2-Alkanamidoethyl)-6-methoxyindole derivatives: A new class of potent indole melatonin analogues. *J Med Chem* (1997), 40, 2003-2010.; b) Tarzia G., Diamantini G., Spadoni G., Indole melatonin agonists and antagonists derived by shifting the melatonin side chain from the C-3 to the N-1 or to the C-2 indole position. *Biol Signals Recept* (1999), 8, 24-31.

6. CONCLUSIÓN

La tendencia actual en el diseño biodirigido de fármacos considera a las herramientas bioinformáticas como necesarias para lograr la mayor especificidad posible de las moléculas sobre el blanco terapéutico. En este contexto, la síntesis química sigue siendo el punto convergente entre el diseño racional y la aplicación en modelos *in vitro* o *in vivo* de los nuevos fármacos para consolidar su bioactividad. Por ello, la aplicación de metodologías novedosas de síntesis se convierte en primordial en el diseño y desarrollo de nuevos fármacos.

En este trabajo de investigación se desarrolló un método para la síntesis de 2-(*N*-acilaminoalquil)indoles del tipo **1** y **9**, estructuralmente relacionados con ligandos melatoninérgicos clásicos (por ejemplo, MLT y LZ), con un anillo indólico como núcleo central. En estos nuevos derivados del indol, el cambio principal es la transposición de la cadena lateral alquilamido que se encuentra unida a la posición C2 del indol, con uno o dos átomos de carbono como "linker" entre el núcleo central y el grupo amida.

Los cambios posicionales de los grupos farmacóforos OMe y la cadena lateral alquilamida influyeron positivamente en las propiedades electrónicas de los 2-(*N*-acilaminoalquil)indoles **1**, según el análisis de sus diagramas de potencial electrostático molecular. Sin embargo, estos indoles se fotooxidan para dar los 2-(*N*-acilaminoalquil)-3-oxindoles **7**, situación que pone en evidencia la inestabilidad de las isotriptamidas de tipo **1**. La inclusión de grupos electroattractores CO₂Me en el indol y en la cadena alquilamido favoreció la estabilidad química de los 2-(*N*-acilaminoalquil)indoles **9**. El análisis de reconocimiento molecular *in silico* de las (8*S*)-isotriptamidas **9** indicó que forman complejos más estables que los fármacos de referencia, la melatonina (MLT) y el luzindol (LZ).

Finalmente, las isotriptamidas **9** se suman a una nueva serie de potenciales ligandos melatoninérgicos que dejan en perspectiva la inquietante exploración de sus propiedades *in vitro* para corroborar su actividad intrínseca, y de ser posible, su selectividad.

7. MÉTODOS EXPERIMENTALES Y TEÓRICOS

7.1 Química

7.1.1 Procedimientos generales

El material de vidrio, cánulas, agujas, agitadores magnéticos, etc., utilizados en la preparación de los reactivos de Grignard fueron secados con anticipación durante 12 h a 90 °C. Las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de argón con disolventes anhidros recién destilados. Los disolventes tetrahidrofurano y éter etílico se destilaron de sodio usando benzofenona como indicador. Las purificaciones cromatográficas se realizaron en gel de sílice 60 de Merk (230-400 mallas) y las cromatografías en capa fina utilizando placas recubiertas de sílice 60 F254 de Merk, con un indicador fluorescente. La visualización se realizó con luz UV (254 nm), $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ amoniacal o cristales de yodo molecular. Los puntos de fusión fueron determinados en un fusiómetro Fisher-Johns y se describen sin corregir. Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer 16 FPC FT-IR en solución de CH_2Cl_2 o CHCl_3 . Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C fueron obtenidos en espectrómetros Varian Mercury operados a 300 y 75.4 MHz respectivamente, utilizando CDCl_3 como disolvente y SiMe_4 como referencia interna. La multiplicidad de las señales se indica por medio de una o más de las siguientes abreviaciones: a (ancha), s (simple), d (doble), t (triple), q (cuádruple), m (múltiple). Los espectros de masa de baja resolución se obtuvieron en un espectrómetro Varian Saturn 2000 a 70 eV por impacto electrónico. Los espectros de masa de alta resolución (HRMS, de sus siglas en inglés) fueron obtenidos en un espectrómetro Waters Synapt G2 en el Departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Colorado, Boulder, CO, EUA.

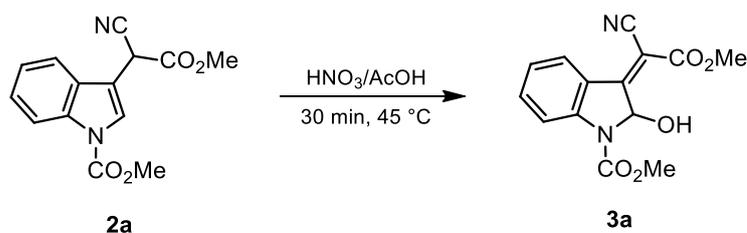
Las estructuras de Rayos X de las moléculas cristalizadas se determinaron en un difractómetro Brucker-Nonius CAD4 con radiación de cobre $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$). Los datos se colectaron a 293 K en el modo de escaneo ω - 2θ . Las celdas unitarias se

refinaron usando los programas SHELXS97 incluidos en el paquete de programas cristalográficos WinGX v.1.64.05. El refinamiento estructural se determinó por matrices totales de mínimos cuadrados en F^2 . Los átomos, excepto hidrógenos, fueron tratados anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno, incluidos en el factor de estructura, se refinaron isotrópicamente. Las estructuras se resolvieron por métodos directos.

Los sustratos **2a** y **2b** se prepararon siguiendo los procedimientos descritos en la literatura.⁷⁹

7.1.1.1 Síntesis de 2-hidroxiindolinas **3a** y **3b**

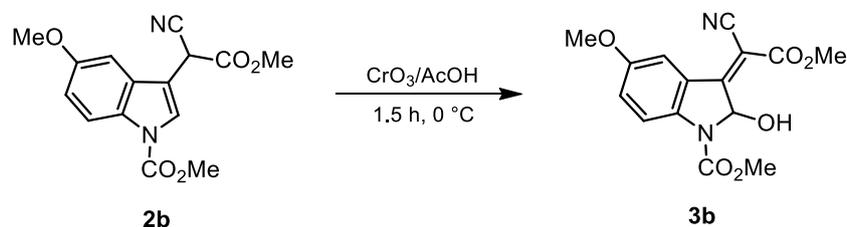
(Z)-Metil 3-(1-ciano-2-metoxi-2-oxoetiliden)-2-hidroxiindolina-1-carboxilato (**3a**).



A una solución de **2a** (10.0 g, 36.73 mmol) en ácido acético glacial (50 mL) mantenida a una temperatura de 40-45 °C, se le adicionó HNO₃ conc. (35 mL) gota a gota con ayuda de un embudo de adición en un tiempo de 30 min. Terminada la adición, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 40-45 °C por 30 min más. La solución resultante se vertió sobre hielo y se dejó en agitación durante 30 min. El precipitado obtenido se filtró al vacío y se lavó con agua (3 x 60 mL). El sólido resultante se disolvió en AcOEt (300 mL), la fase orgánica se lavó con agua (3 x 50 mL) seguido de una solución saturada de NaCl; se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y evaporó al vacío. El residuo se purificó por recristalización de AcOEt, obteniendo **3a** en un rendimiento del 84% (9.10 g, 31.57 mmol). Sólido amarillo, los datos espectroscópicos concordaron con los descritos.

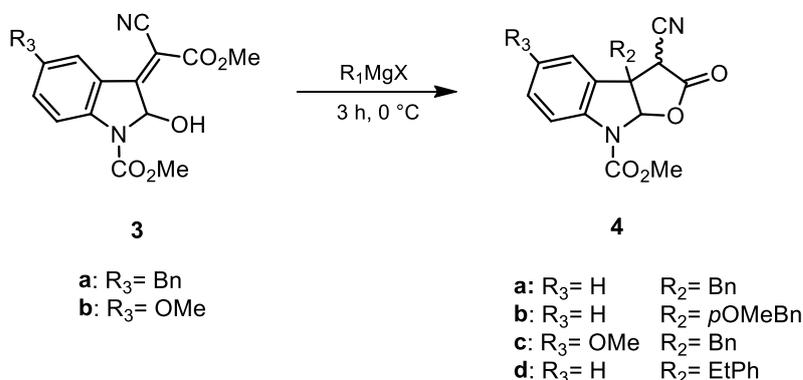
⁷⁹ Morales-Ríos S. M., Bucio-Vásquez M. A., Joseph-Nathan P., Novel oxidations of 1,3-disubstituted indoles. *J Heterocycl Chem* (1993), 30, 953–956.

(Z)-Metil 3-(1-ciano-2-metoxi-2-oxoetiliden)-2-hidroxi-5-metoxiindolina-1-carboxilato (**3b**)



A una solución de **2b** (10.0 g, 33.08 mmol) en ácido acético glacial (60 mL) enfriada a 0 °C se le adicionó una solución de CrO₃ (11.54 gr) en agua (64 mL), gota a gota con ayuda de un embudo de adición en un tiempo de 30-35 min. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 0°C durante 1.5 h. Transcurrido el tiempo de reacción la solución se vertió sobre hielo y se dejó en agitación durante 30 min. El precipitado obtenido se filtró al vacío y se lavó con agua (3 x 50 mL). El sólido resultante se disolvió en AcOEt (300 mL), la fase orgánica se lavó con agua (3 x 50 mL) seguido de una solución saturada de NaCl, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y evaporó al vacío. El residuo se purificó por recristalización en AcOEt, obteniendo **3b** en un rendimiento del 80% (8.43 g, 26.49 mmol). Sólido anaranjado p.f. 163–164 °C. (Lit.⁵⁵ 162-164 °C_i). Los datos espectroscópicos concordaron con los descritos.⁵⁵

7.1.1.2 Procedimiento general para la conversión de γ -hidroxiésteres **3** en γ -lactonas **4**



A un matraz conteniendo magnesio en virutas (3.5 mmol) bajo atmósfera de argón y enfriado a 0 °C se le adicionó, gota a gota vía un embudo de adición y con agitación, una solución del correspondiente halogenuro de alquilo (RX, R = Bn y *p*OMeBn) (3.48 mmol) en una mezcla anhidra de éter/THF (3:1, 15 mL). La mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente y se dejó en agitación durante 2 h. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se enfrió a 0 °C y se adicionó vía cánula y presión de argón una solución del correspondiente γ -hidroxiéster **3a** ó **3b** (0.87 mmol) en THF anh. (20 mL) gota a gota en un tiempo de 30 min y se dejó reaccionar 3 h más a 0 °C. Finalmente, se adicionó una solución saturada de NH₄Cl (5 mL) y se dejó calentar hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con AcOEt (35 mL), se transfirió a un embudo de separación, la fase orgánica se lavó con agua (2 x 15 mL) seguido de una solución saturada de NH₄Cl (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó al vacío. El residuo en forma de miel color ámbar se purificó por cromatografía flash utilizando sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de hexano/AcOEt (85:15) como fase móvil. El sólido obtenido se recristalizó de una mezcla de hexano/éter/CH₂Cl₂, obteniéndose las γ -lactonas **4a-4d** como sólidos amorfos incoloros.

cis-(±)-8-Metilcarboxilato del 3a-bencil 3-ciano-2-oxo-2,3,3a,8a-tetrahydro-8H-furo[2,3-b]indol (4a)

Partiendo de **3a** (250 mg, 0.87 mmol). Rendimiento: 53% (175 mg, 0.50 mmol). Sólido incoloro, p.f. 157-158 °C. *R_f*: 0.58 (hexano/AcOEt 7:3); IR (CHCl₃, cm⁻¹) *v*_{max} = 3026, 2256, 1734; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 348 (M⁺, 100), 213 (79). HRMS: *m/z* calculado para C₂₀H₁₆N₂O₄ + H: 349.1188; encontrado: 349.1185.

cis-(±)-8-Metilcarboxilato del 3-ciano-3a(4-metoxibencil)-2-oxo-2,3,3a,8a-tetrahydro-8H-furo[2,3-b]indol (4b)

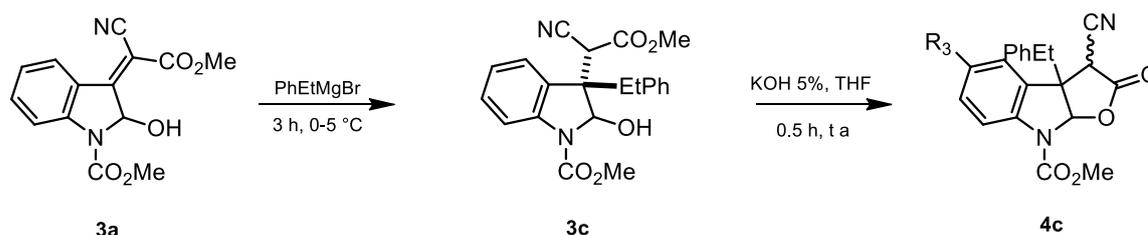
Partiendo de **3a** (250 mg, 0.87 mmol). Rendimiento: 42% (138 mg, 0.36 mmol). Sólido incoloro, p.f. 158-160 °C. *R_f*: 0.45 (hexano/AcOEt 7:3); IR (CHCl₃, cm⁻¹) *v*_{max} = 3034, 2287, 1778, 1764; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 378 (M⁺, 20), 334 (25), 226 (50), 121 (100). HRMS: *m/z* calculado para C₂₁H₁₈N₂O₅ + H: 379,1294; encontrado: 379.1213 (M⁺ + H).

3R,3aS,*8S*-8-Metilcarboxilato del 3a-bencil-3-ciano-5-metoxi-2-oxo-2,3,3a,8a-tetrahydro-8H-furo[2,3-b]indol (4c)*

Partiendo de **3b** (300 mg, 0.94 mmol). Rendimiento: 55% (196 mg, 0.52 mmol). Sólido cristalino incoloro, p.f. 161-163 °C. *R_f*: 0.47 (hexano/AcOEt 7:3); IR (CHCl₃, cm⁻¹) *v*_{max} = 3006, 2360, 1798, 1724; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 378 (M⁺, 100), 288 (25), 244 (50), 91 (30). HRMS: *m/z* calculado para C₂₁H₁₈N₂O₅ + H: 379.1294; encontrado: 379.1292.

7.1.1.3 Síntesis de la fenetil γ -lactona **4d**

Siguiendo el procedimiento general para la conversión de γ -hidroxiésteres **3** en γ -lactonas **4** antes descrito, el tratamiento del γ -hidroxiéster **3d** con el bromuro de fenetilmagnesio condujo a la 3-fenetilindolina **3c** intermediaria, que por tratamiento con una solución acuosa al 5% de KOH en THF a temperatura ambiente durante 0.5 h dio la γ -lactona **4d** como un sólido incoloro.



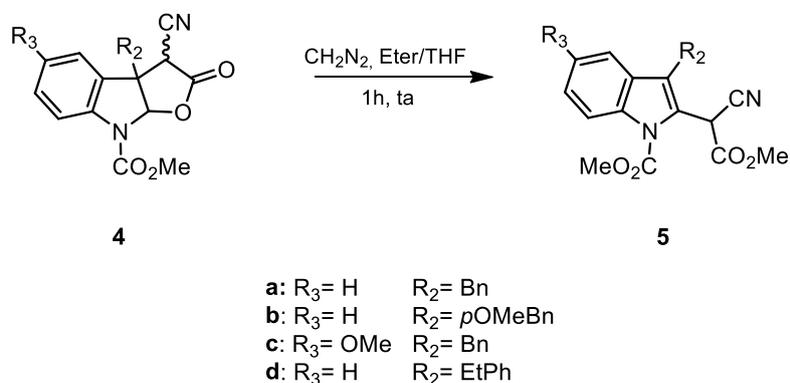
2R,3S*,8S*-1-Metil carboxilato del 3-(1-ciano-2-metoxi-2-oxoetil)-2-hidroxi-3-fenetilindolina (3c)*

Partiendo de **3a** (250 mg, 0.87 mmol). Rendimiento: 73% (240 mg, 0.61 mmol). Sólido cristalino incoloro, p.f. 179-181 °C. R_f : 0.41 (hexano/AcOEt 7:3); IR (CHCl₃, cm⁻¹) ν_{max} = 3595, 2266, 1752, 1706; CG-EM (IE, 70 eV): m/z (% intensidad relativa) = 336 (M⁺ - CO₂Me, 10), 318 (40), 227 (100), 183 (95), 142 (40). HRMS: m/z calculado para C₂₂H₂₂N₂O₅ + H: 395.1607; encontrado: 417.1426 (M⁺ + Na).

cis-(±)-8-Metilcarboxilato del 3-ciano-2-oxo-3a-fenetil-2,3,3a,8a-tetrahidro-8H-furo[2,3-b]indol (4d)

Partiendo de **3c** (200 mg, 0.51 mmol). Rendimiento: 82% (154 mg, 0.42 mmol). Sólido incoloro, p.f. 169-170 °C. R_f : 0.51 (hexano/AcOEt 7:3); IR (CHCl₃, cm⁻¹) ν_{max} = 2254, 1731, 1798 CG-EM (IE, 70 eV): m/z (% intensidad relativa) = 362 (M⁺, 100), 317 (25), 227 (30), 191 (80), 91 (60). HRMS: m/z calculado para C₂₁H₁₈N₂O₄ + H: 363.1345; encontrado: 385.1167 (M⁺ + Na).

7.1.1.4 Procedimiento general para la conversión de γ -lactonas **4** en 2-indolilcianomalonatos de metilo **5**



Preparación de diazometano. A una solución acuosa de KOH al 50% (6 mL) se le agregó éter etílico (20 mL) y se dejó enfriar en baño de hielo durante 10 min. Transcurrido el tiempo de reacción se adicionó *N*-nitroso-*N*-metilurea (250 mg) en frío y agitación lenta hasta observar la formación de una solución amarilla intensa con evolución de un gas. La solución etérea sobrenadante se decantó y se secó sobre lentejas de KOH.

A una solución de **4a-4d** (0.22 mmol) en mezcla de éter (6 mL) y THF (2 mL) se le adicionó lentamente un exceso de la solución etérea de diazometano preparada previamente. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y se evaporó a sequedad a presión atmosférica usando una corriente de aire libre de humedad. El residuo se disolvió en DMSO (2 mL) y se dejó en agitación durante 10 h para eliminar posteriormente el DMSO usando una corriente de aire. El residuo de color ligeramente amarillo se disolvió con CH_2Cl_2 y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 10 mL) seguido de una solución saturada de NaCl (1 x 10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anh. y se evaporó al vacío. El residuo sólido se recrystalizó de una mezcla de CH_2Cl_2 /hexano obteniéndose los 2-indolilcianomalonatos de metilo **5a-5d** como sólidos amorfos incoloros.

1-Metilcarboxilato del 3-bencil-2-(1-ciano-2-metoxi-2-oxoetil)-1H-indol (5a)

Partiendo de **4a** (150 mg, 0.43 mmol). Rendimiento: 91% (142 mg, 0.36 mmol). Sólido incoloro, p.f. 144-145 °C. *R_f*: 0.51 (hexano/AcOEt 7:3); IR (CHCl₃) ν_{\max} = 3024, 2254, 1756, 1604 cm⁻¹; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 363 (M⁺ + H, 25), 331 (50), 265 (100), 244 (25), 218 (25). HRMS: *m/z* calculado para C₂₁H₁₈N₂O₄ + H: 363.1340; encontrado: 363.1338.

1-Metilcarboxilato del 2-(1-ciano-2-metoxi-2-oxoetil)-3-(4-metoxibencil)-1H-indol (5b)

Partiendo de **4b** (120 mg, 0.32 mmol). Rendimiento: 90% (112 mg, 0.28 mmol). Sólido incoloro, p.f. 132-133 °C. *R_f*: 0.49 (hexano/AcOEt 7:3); IR (CHCl₃, cm⁻¹) ν_{\max} = 2254, 1751, 1749; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 393 (M⁺ + H, 10), 334 (13), 295 (100), 285 (42). HRMS: *m/z* calculado para C₂₂H₂₀N₂O₅ + H: 393.1445; encontrado: 393.1423.

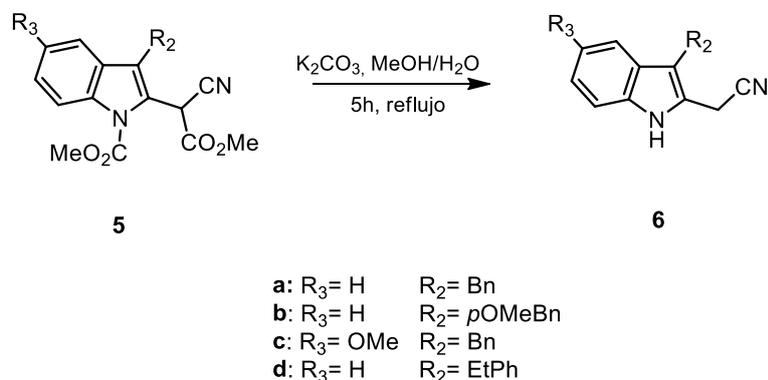
1-Metilcarboxilato del 3-bencil-2-(1-ciano-2-metoxi-2-oxoetil)-5-metoxi-1H-indol (5c)

Partiendo de **4c** (150 mg, 0.40 mmol). Rendimiento: 85% (130 mg, 0.34 mmol). Sólido incoloro, p.f. 119-121 °C. *R_f*: 0.42 (hexano/AcOEt 7:3); IR (CHCl₃, cm⁻¹) ν_{\max} = 2256, 1752, 1730; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 392 (M⁺, 68), 361 (50), 334 (35), 302 (80), 295 (100), 274 (30). HRMS: *m/z* calculado para C₂₂H₂₀N₂O₅ + H: 393.1441; encontrado: 393.1446.

1-Metilcarboxilato del 2-(1-ciano-2-metoxi-2-oxoetil)-3-fenetil-1H-indol (5d)

Partiendo de **4d** (100 mg, 0.27 mmol). Rendimiento: 89% (93 mg, 0.25 mmol). Sólido incoloro, p.f. 148-150 °C. *R_f*: 0.52 (hexano/AcOEt 7:3); CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 376 (M⁺, 14), 345 (14), 286 (35), 254 (100), 242 (24), 183 (30), 91 (38). HRMS: *m/z* calculado para C₂₂H₂₀N₂O₄.

7.1.1.5 Procedimiento general para la conversión de 2-indolilcianomalonatos de metilo **5** en 2-acetonitrilindoles **6**



A una solución de **5a-5d** en MeOH/H₂O 3:1 (9 mL) se le adicionó una solución de K₂CO₃ (10 equivalentes) en mezcla 3:1 de MeOH/H₂O (1 mL) y se calentó a reflujo durante 5 h. Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se diluyó con agua (10 mL) y el metanol se evaporó al vacío. La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL), en seguida, la fase orgánica se lavó con agua (3x 20 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó al vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash, utilizando una mezcla de hexano/AcOEt 85:15 como fase móvil, para dar los 2-acetonitrilindoles **6a-6d** como aceites rojizos.

2-(3-Bencil-1H-indol-2-il)acetonitrilo (6a)

Partiendo de **5a** (80 mg, 0.22 mmol). Rendimiento: 70% (38 mg, 0.15 mmol). Aceite rojizo; *R*_f: 0.65 (hexano/AcOEt 7:3); IR (CHCl₃, cm⁻¹) ν_{max} = 3458, 2258; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 246 (M⁺, 100), 207 (25), 169 (25). HRMS: *m/z* calculado para C₁₇H₁₄N₂ +H: 247.1230; encontrado: 247.1222.

2-(3-(4-Metoxibencil)-1H-indol-2-il)acetonitrilo (6b)

Partiendo de **5b** (100 mg, 0.25 mmol). Rendimiento: 58% (41 mg, 0.15 mmol). Aceite rojizo; *R*_f: 0.61 (hexano/AcOEt 7:3); IR (CHCl₃, cm⁻¹) ν_{max} = 3456, 3408, 2258; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 276 (M⁺, 100), 237 (50), 169 (40). HRMS: *m/z* calculado para C₁₈H₁₆N₂O -H: 275.1179; encontrado: 275.1182.

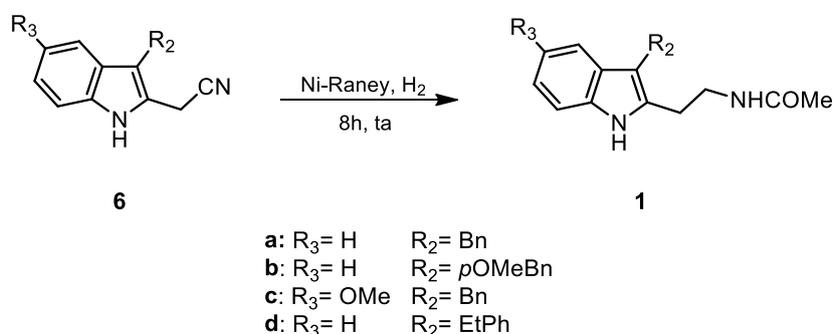
2-(3-Bencil-5-metoxi-1H-indol-2-il)acetonitrilo (6c)

Partiendo de **5c** (100 mg, 0.25 mmol). Rendimiento: 67% (47 mg, 0.17 mmol). Aceite rojizo; *R_f*: 0.63 (hexano/AcOEt 7:3); IR (CHCl₃, cm⁻¹) ν_{max} = 3458, 2261; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) = 276 (M⁺, 100), 237 (25), 200 (25).

2-(3-Fenetil-1H-indol-2-il)acetonitrilo (6d)

Partiendo de **5d** (100 mg, 0.27 mmol). Rendimiento: 60% (41 mg, 0.16 mmol). Aceite rojizo; *R_f*: 0.61 (hexano/AcOEt 7:3); CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (%) = 260 (M⁺, 20), 169 (100).

7.1.1.6 Procedimiento general de hidrogenación catalítica de 2-acetonitrilindoles **6** para obtener las isotriptaminas **1**



Se hidrogenó una solución del correspondiente 2-acetonitrilindol **6** en una bomba Parr sobre el catalizador de Ni-Raney W-2 (225 mg/100 mg de **6**) en Ac₂O (4 mL/100 mg de **6**) a temperatura ambiente bajo 45 psi H₂ durante 8 h. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se filtró a través de Celita y el residuo se lavó con AcOEt (2 x 20 mL). El filtrado se concentró a vacío hasta sequedad, posteriormente el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (30 ml) y se lavó con agua (3 x 15 mL), se secó sobre NaSO₄ anh., se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash (hexano/EtOAc 1:4) para obtener los 2-(*N*-acetilaminoetil)indoles **1a-1d** como aceites amarillentos.

N-(2-(3-Bencil-1*H*-indol-2-il)etil)acetamida (**1a**)

Partiendo de **6a** (50 mg, 0.20 mmol). Rendimiento: 75% (43 mg, 0.11 mmol). Aceite amarillento amarilla; *R*_f: 0.43 (AcOEt); IR (CHCl₃, cm⁻¹) ν_{max} = 3450, 3303, 1670; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 292 (M⁺, 70), 233 (100), 219 (35). HRMS: *m/z* calculado para C₁₉H₂₁N₂O +H: 293.1654; encontrado: 293.1648.

N-(2-(3-(4-Metoxibencil)-1*H*-indol-2-il)etil)acetamida (**1b**)

Partiendo de **6c** (50 mg, 0.18 mmol). Rendimiento: 58% (34 mg, 0.10 mmol). Aceite amarillento; *R*_f: 0.38 (AcOEt); IR (CHCl₃, cm⁻¹) ν_{max} = 3453, 3310, 1670; CG-EM (IE, 70

eV): m/z (% intensidad relativa) = 322 (M^+ , 100), 264 (94), 249 (55). HRMS: m/z calculado para $C_{20}H_{22}N_2O_2$ ($M + Na$) 345.1579, encontrado: 345.1570.

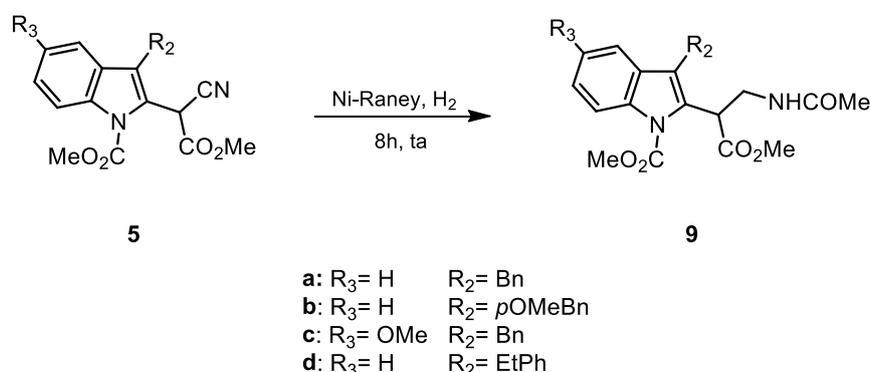
N-(2-(3-Bencil-5-metoxi-1H-indol-2-il)etil)acetamida (**1c**)

Partiendo de **6b** (50 mg, 0.18 mmol). Rendimiento: 67% (39 mg, 12 mmol). Aceite amarillento; R_f : 0.40 (AcOEt); CG-EM (IE, 70 eV): m/z (%) = 322 (M^+ , 100), 264 (99), 251 (33). HRMS: m/z calcd para $C_{20}H_{22}N_2O_2 + H$: 323.4009.

N-(2-(3-Fenetil-1H-indol-2-il)etil)acetamida (**1d**)

Partiendo de **6d** (50 mg, 0.19 mmol). Rendimiento: 65% (38 mg, 13 mmol). Aceite amarillo; R_f : 0.45 (AcOEt); CG-EM (IE, 70 eV): m/z (%) = 306 (M^+ , 8), 215 (96), 156 (100), 91 (10).

7.1.1.7 Procedimiento general de hidrogenación catalítica de 2-indolilcianomalonatos de metilo **5** para dar los 2-indolil- β -amidoésteres **9**



Se hidrogenó una solución del correspondiente indolilcianomalonato de metilo **5** (100 mg) en una bomba Parr sobre el catalizador de Ni-Raney W-2 (225 mg) en Ac₂O (4 mL) a temperatura ambiente bajo 45 psi H₂ durante 8 h. La mezcla se filtró a través de Celita y el residuo se lavó con AcOEt (2 x 20 mL). El filtrado se concentró a vacío hasta sequedad, el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (50 ml) y se lavó con agua (3 x 15 mL), se secó sobre NaSO₄ anh., se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash (hexano/EtOAc 70:30) para dar los 2-indolil- β -amidoésteres **9a-9d** como sólidos incoloros.

Metil carboxilato del 2-(3-acetamido-1-metoxi-1-oxopropan-2-il)-3-bencil-1H-indol (9a)

Partiendo de **5a** (100 mg, 0.28 mmol). Rendimiento: 65% (73 mg, 0.18 mmol). Sólido incoloro; p.f. 152-153 °C. *R*_f: 0.29 (hexano/AcOEt 3:7); IR (CHCl₃, cm⁻¹) ν_{max} = 3444, 1733, 1668; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 408 (M⁺, 5), 376 (80), 334 (93), 318 (82), 305 (45), 275 (100), 218 (45), 198 (37), 91 (50). HRMS: *m/z* calculado para C₂₃H₂₄N₂O₅ + H: 409.1758; encontrado: 409.1765.

Metil carboxilato del 2-(3-acetamido-1-metoxi-1-oxopropan-2-il)-3-(4-metoxibencil)-1H-indol (9b)

Partiendo de **5b** (150 mg, 0.38 mmol). Rendimiento: 62% (104 mg, 0.24 mmol). Aceite beige; R_f : 0.19 (hexano/AcOEt 3:7); CG-EM (IE, 70 eV): m/z (% intensidad relativa) = 438 (M^+ , 6), 407 (58), 364 (61), 295 (100), 198 (37), 122 (38).

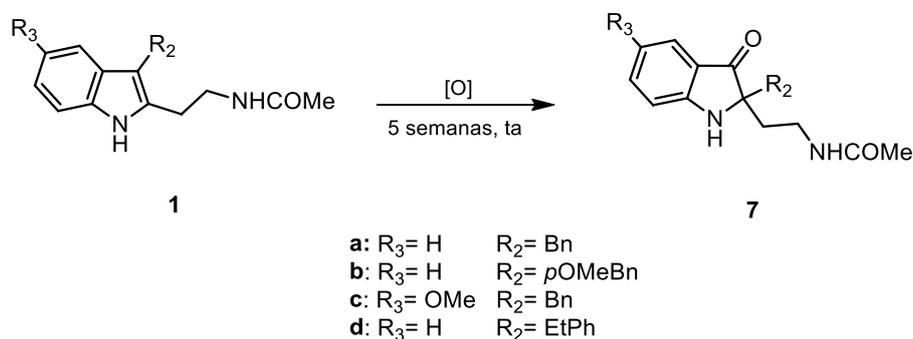
Metil carboxilato del 2-(3-acetamido-1-metoxi-1-oxopropan-2-il)-3-bencil-5-metoxi-1H-indol (9c)

Partiendo de **5c** (100 mg, 0.25 mmol). Rendimiento: 65% (71 mg, 0.16 mmol). Aceite beige; R_f : 0.27 (hexano/AcOEt 3:7); IR (CHCl_3 , cm^{-1}); CG-EM (IE, 70 eV): m/z (% intensidad relativa) = 438 (M^+ , 5), 406 (100), 365 (60), 348 (61), 306 (80), 249 (34), 91 (35). HRMS: m/z calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6 + \text{H}$: 439.1864; encontrado: 439.1872.

Metil carboxilato del 2-(3-acetamido-1-metoxi-1-oxopropan-2-il)-3-fenetil-1H-indol (9d)

Partiendo de **5d** (70 mg, 0.19 mmol). Rendimiento: 56% (46 mg, 0.11 mmol). Sólido incoloro; p.f. 154-155 °C. R_f : 0.33 (hexano/AcOEt 3:7); IR (CHCl_3 , cm^{-1}) ν_{max} = 3444, 1730, 1669; CG-EM (IE, 70 eV): m/z (% intensidad relativa) = 422 (M^+ , 1), 391 (31), 300 (100), 258 (93), 229 (33), 198 (24), 92 (28) HRMS: m/z calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5 + \text{H}$: 423.1914; encontrado: 423.1923.

7.1.1.8 Formación de 3-oxoisotriptaminas **7**



La oxidación aeróbica de las isotriptaminas **1** a temperatura ambiente, sin protección de luz y libre de disolvente condujo a las correspondientes 3-oxoisotriptaminas 2,2-disustituidas **7** en aproximadamente 5 semanas.

2-(2-Acetamidoetil)-2-bencil-3-oxoindolina (7a)

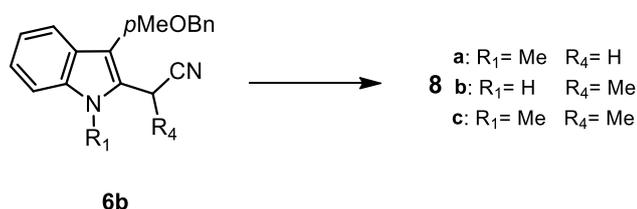
Partiendo de **1a** (100 mg, 0.34 mmol). Rendimiento: 95% (100 mg, 0.32 mmol). Sólido amarillo; p.f. 168-170 °C. *R_f*: 0.19 (hexano/AcOEt 2:8); IR (CHCl₃, cm⁻¹); CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 309 (M⁺ + H, 5), 217 (20), 158 (100), 146 (17), 91 (10). HRMS: *m/z* calculado para C₁₉H₂₀N₂O₂ + H: 309.1598; encontrado: 309.1603.

2-(2-Acetamidoetil)-2-(4-metoxibencil)-3-oxoindolina (7b)

Partiendo de **1b** (80 mg, 0.25 mmol). Rendimiento: 98% (82 mg, 0.24 mmol). Aceite amarillo; *R_f*: 0.17 (hexano/AcOEt 2:8); IR (CHCl₃, cm⁻¹) *v*_{max} = 3441, 3340, 1675, 1618; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 338 (M⁺, 4), 217 (19), 158 (100); HRMS: *m/z* calculado para C₂₀H₂₂N₂O₃ + Na: 361.1528; encontrado: 361.1530.

2-(2-Acetamidoetil)-2-bencil-5-metoxi-3-oxoindolina (7c)

Partiendo de **1c** (82 mg, 0.26 mmol). Rendimiento: 98% (86 mg, 0.25 mmol). Aceite amarillo; *R_f*: 0.17 (hexano/AcOEt 2:8); CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 338 (M⁺, 3), 247 (21), 188 (100), 161 (10), 91 (8). HRMS: *m/z* calculado para C₂₀H₂₂N₂O₃ + H: 339.1704; encontrado: 339.1712.

7.1.1.9 Tratamiento del 2-acetonitrilindol **6b** con MeI⁶¹

A una suspensión bajo agitación del 2-acetonitrilindol **6b** y Cs₂CO₃ (225 mg, 1,4 mmol) en DMF (3 mL) se añadió MeI (120 ml, 1.9 mmoles). Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 h, la reacción se inactivó con agua (20 mL). La capa acuosa se extrajo con AcOEt (3x15 mL), y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (10 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ anh. y se concentraron a vacío para dar una mezcla de compuestos mono- y dimetilados **8a**, **8b** y **8c** en una relación ca. 5: 2: 4, respectivamente, según lo determinado por CG/MS del crudo de reacción. La mezcla se separó por cromatografía flash utilizando una mezcla de disolventes hexano/CH₂Cl₂/EtOAc. La elución con una relación de mezcla disolventes 50:48:2 dio sucesivamente **8c** (27 mg, 0,09 mmol, 20% de rendimiento), **8a** (30 mg, 0,1 mmol, 25% de rendimiento) y **8b** (12 mg, 0,04 mmol, 10%) como aceites amarillos. La elución adicional con una relación de mezcla de disolventes 50:40:10 proporcionó el material de partida **6b** (18 mg).

2-(3-(4-Metoxibencil)-1-metil-1H-indol-2-il) acetonitrilo (8a)

Aceite amarillo; *R*_f: 0.30 (hexano/CH₂Cl₂/AcOEt 50:48:2); IR (CHCl₃, cm⁻¹) *v*_{max} = 2255, 1827; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 290 (M⁺, 100), 250 (9), 182 (43). HRMS: *m/z* calculado para C₁₉H₁₈N₂O (M + Na) 313.1317, encontrado: 313.1320.

2-(3-(4-Metoxibencil)-1H-indol-2-il) propanonitrilo (8b)

Aceite amarillo; *R*_f: 0.22 (hexano/CH₂Cl₂/AcOEt 50:48:2); IR (CHCl₃, cm⁻¹) *v*_{max} = 3450, 2245, 1727; CG-EM (IE, 70 eV): *m/z* (% intensidad relativa) = 290 (M⁺, 100), 236 (68). HRMS: *m/z* calculado para C₁₉H₁₈N₂O (M + Na) 313.1317, encontrado: 313.1319.

2-(3-(4-Metoxibencil)-1-metil-1H-indol-2-il) propanonitrilo (8b)

Aceite amarillo; R_f : 0.43 (hexano/CH₂Cl₂/AcOEt 50:48:2); IR (CHCl₃, cm⁻¹) ν_{\max} = 2245, 1846; CG-EM (IE, 70 eV): m/z (% intensidad relativa) = 305 (M⁺, 100), 251 (62), 197 (23). HRMS: m/z calculado para C₂₀H₂₀N₂O (M + Na) 327.1473, encontrado: 327.1475.

7.2 Métodos Computacionales

7.2.1 Búsqueda conformacional

La búsqueda conformacional de las isotriptaminas **1** se realizó con Spartan '05 o Spartan '14⁸⁰ empleando el algoritmo Monte Carlo en combinación con el campo de fuerzas Merck (MMFF). La selección de los conformeros se hizo por comparación geométrica, valor energético y aporte a la distribución de Boltzmann.

Para la búsqueda conformacional en fase acuosa se empleó el método MMFFaq en Spartan '14 y la selección de conformeros se hizo bajo los mismos criterios de la búsqueda conformacional que la indicada en fase gas.

7.2.2 Optimización de la geometría conformacional

La optimización de la geometría de los conformeros seleccionados de mínima energía de **1** se realizó con Gaussian '09⁸¹ empleando un nivel de cálculo de la teoría de funcionales de la densidad DFT HF/3-21G y HF/6-31G+(d,p) en fase gas. La optimización geométrica bajo influencia de medio acuoso se realizó al mismo nivel de cálculo incorporando el método de polarización continua (CPCM).⁸²

⁸⁰ Spartan'14 for Windows, Macintosh, and Linux; Wavefunction, Inc., <http://downloads.wavefun.com/Spartan14Manual.pdf>. Hehre W., A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations, Wavefunction, Inc. (1993), http://www.wavefun.com/japan/products/books/AGuidetoMM_Ch1-2.pdf.

⁸¹ Gaussian 09, Revision E.01, Frisch, M.J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H.P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J.L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J.A., Jr.; Peralta, J.E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J.J.; Brothers, E.; Kudin, K.N.; Staroverov, V.N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J.C.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J.M.; Klene, M.; Knox, J.E.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Martin, R.L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V.G.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Farkas, Ö.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cioslowski, J.; Fox, D.J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, (2009).

⁸² (a) Miertus S., Scrocco E., Tomasi J., Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *J Chem Phys* (1981) 55, 117-129. (b) Barone V., Cossi M., Tomasi J. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. *J Chem Phys* (1997), 107, 3210-3221. (c) Caricato M., Mennucci B., Tomasi J., Ingrosso F., Cammi R., Corni S., Scalmani G., Formation and relaxation of excited states in solution: A new time dependent polarizable continuum model based on time dependent density functional theory. *J Chem Phys* (2006), 124, 124520-124532.

7.2.3 Generación del diagrama de potencial electrostático molecular (PEM)

La generación de los diagramas PEM se realizó utilizando Gaussian '09 mediante una optimización adicional de los mínimos encontrados previamente, a un nivel de cálculo DFT M06-2X/6-31+G(d,p) aplicando posteriormente el algoritmo *cube* y ajustando los valores de isovalor en la densidad de superficie entre 0.029 y 0.031.

7.2.4 Mapeo del grupo farmacóforo

El análisis de la disposición geométrica tridimensional del número y tipo de grupos funcionales necesarios para producir una respuesta biológica se evaluó mediante el diseño de mapas del grupo farmacóforo basados en ligandos bioactivos, en este caso de ligandos agonistas y antagonistas melatoninérgicos. El estudio se llevó a cabo usando el software LigandScout 3.12 (disponible en: <http://www.inteligand.com/ligandscout3/download.shtml>),⁸³ seleccionando la configuración predeterminada por el programa para generar modelos 3D de los mapas farmacofóricos. Las hipótesis farmacofóricas agonista y antagonista se generaron alineando las entidades químicas de los conformeros obtenidos por mecánica molecular (MMFF) de una serie selecta de moléculas con actividad melatoninérgica, ya sea agonista o antagonista. Los mapas farmacofóricos así obtenidos se usaron como referencia para predecir el carácter agonista o antagonista de las isotriptaminas **1a-1g**.

Alineamiento flexible de las isotriptaminas 1a-1g con los mapas farmacofóricos 3D.

Para identificar el grado de ajuste o alineamiento de las isotriptaminas **1a-1g** con los mapas 3D, se realizó una búsqueda conformacional por MMFF empleando la herramienta de LigandScout, seguida del *screening* de los conformeros encontrados con la finalidad de determinar el valor de ajuste (*pharmacophore fit*) de aquel conformero cuyo alineamiento sea mejor, ya sea al modelo farmacofórico de la hipótesis agonista o antagonista. El nivel de ajuste de la geometría de las entidades

⁸³ Wolber G., Langer T., LigandScout: 3D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J Chem Inf Model* (2005), 45, 160-169.

químicas de los conformeros de **1a-1g** con el mapa farmacofórico, agonista o antagonista, se determinó en función del grado de desviación de las entidades químicas con respecto a los puntos de referencia dados por los modelos agonista y antagonista, bajo los criterios predeterminados en las propiedades de alineamiento de LigandScout.

Alineamiento rígido de isotriptaminas con los mapas farmacofóricos 3D. En este caso, el alineamiento se realizó con los conformeros de mínima energía de **1b, 1e, 1f, 1g** optimizados en fase acuosa.

7.2.5 Modelado por homología de los receptores MT1 y MT2

Para iniciar el modelado por homología fue necesario identificar los receptores cristalizados pertenecientes a la familia de GPCR's en el *Protein Data Bank* (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), de los cuales se descargaron los archivos de texto relacionados con las coordenadas de los átomos y la secuencia de aminoácidos.

La secuencia primaria de aminoácidos que conforman los receptores melatoninérgicos humanos fue obtenida de la base de datos UniProt (The Universal Protein Resource disponible en: <http://www.uniprot.org/>)⁸⁴, descargando los archivos FASTA de cada uno de ellos. Posteriormente, estas secuencias fueron alineadas, por separado, con cada una de las secuencias de aminoácidos de los receptores utilizados como plantilla, descartando aquellas que mostraron una identidad de secuencia menor al 40%. El alineamiento se llevó a cabo con las herramientas de ClustalW⁸⁵ disponibles en SwissMODEL,⁸⁶ servidor del Instituto Suizo de

⁸⁴ Pundir S., Magrane M., Martin M. J., O'Donovan C., UniProt Consortium., Searching and navigating UniProt databases. *Curr Protoc Bioinformatics* (2015), 50, 1-10. b) Magrane M., UniProt Consortium, UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database* (2011), article ID bar009, 1-13.

⁸⁵ Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* (1994), 22, 4673-4680.

⁸⁶ Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Gallo Cassarino T., Bertoni M., Bordoli L., Schwede T., SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* (2014), 42, W252-W258.

Bioinformática (ExPASy-ISB: <http://www.expasy.org/>). Teniendo las secuencias alineadas, se procedió a la generación automática de la estructura 3D por homología de los receptores melatoninérgicos con el servidor SwissMODEL.

Los modelos tridimensionales de MT1 y MT2, generados por homología, fueron minimizados empleando las herramientas de 3DRefine (<http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/>)⁸⁷ y ModRefine (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>).⁸⁸ Finalmente, las estructuras 3D de mínima energía se validaron con MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>).⁸⁹

Validación funcional de los receptores (reconocimiento del sitio activo). El reconocimiento proteína–ligando se realizó con un análisis de docking molecular no dirigido de la melatonina (CAS number: 73-31-4, obtenido de DrugBank <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01065>) sobre los receptores MT1 y MT2. Esto fue, empleando el protocolo automático del servidor SwissDock (<http://www.swissdock.ch/>).⁹⁰ El modelo por homología de los receptores melatoninérgicos se consideró válido cuando se obtuvo el mayor número de clústeres ubicados en el sitio activo previamente descrito.

7.2.6 Docking molecular

El criterio de búsqueda se refinó dentro de una zona de 60x60x60 puntos centrado entre los dominios transmembranales TM3, TM4, TM5 y TM6 con un espaciado de 0.5 Å. Se utilizó un protocolo estándar con una población inicial al azar de 100 posiciones individuales y un número máximo de evaluaciones de energía de 2.5×10^7

⁸⁷ Bhattacharya D., Nowotny J., Cao R., Cheng J., 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. *Nucl Acids Res* (2016), 1-4.

⁸⁸ Xu D., Zhang Y., Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophys J* (2011), 101, 2525-2534.

⁸⁹ Chen V. B., Arendall III W. B., Headd J. J., Keedy D. A., Immormino R. M., Kapral G. J., Murray L. W., Richardson J. S., Richardson D. C., MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr* (2010), D66, 12-21.

⁹⁰ Grosdidier A., Zoete V., Michielin O., SwissDock. A protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucl Acids Res* (2011), 39, W270–W277.

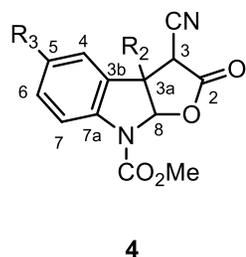
por ciclo de análisis. Todos los parámetros se mantuvieron por default en su posición estándar. Se generaron 100 conformaciones de acoplamiento del receptor para cada ligando, realizando colecciones (*clusterized*) en función de la energía total de acoplamiento ($\Delta G_{\text{unión}}$). Los clusters se mantuvieron con una desviación cuadrática media (RMSD) de 0.3 Å, empleando el software AutoDockTools 1.5.6 (disponible en: <http://autodock.scripps.edu/resources/adt>)⁹¹

⁹¹ Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., Olson A. J., Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Computational Chem* (2009), 16, 2785-91.

8. ANEXO

8.1 Datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C	103
Tabla 8 a Tabla 13	
8.2 Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C	127
Figura 28 a Figura 49	
8.3 Predicción de la energía del complejo proteína – (8<i>R</i>)-9a frente a los receptores MT1 y MT2	171
Figura 50	
8.4 Datos cristalográficos	172
Tabla 14	

Tabla 8a. Datos de RMN ^1H de γ -lactonas **4** en CDCl_3 a 300 MHz. (δ en ppm; J en Hz).



	R ₂	R ₃
4a	Bn	H
4b	<i>p</i> OMeBn	H
4c	Bn	OMe
4d	EtPh	H

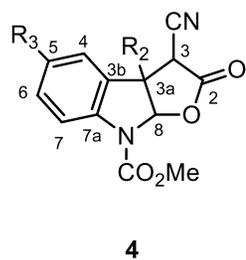
		H-4	H-5	H-6	H-7	H-8a	H-3	CO ₂ Me
4a	δ	7.68 <i>d</i>	7.22 <i>td</i> ^a	7.42 <i>t</i>	7.85 <i>sa</i>	6.38 <i>sa</i>	4.18 <i>s</i>	3.90 <i>s</i>
	J	7.8	7.8, 1.0	7.3	-	-	-	-
4b	δ	7.66 <i>d</i>	7.22 <i>td</i> ^a	7.42 <i>t</i>	7.86 <i>sa</i>	6.37 <i>sa</i>	4.19 <i>s</i>	3.80 <i>s</i>
	J	7.6	7.6, 1.0	7.3	-	-	-	-
4c	δ	7.36 <i>dm</i>	-	6.95 <i>dd</i>	7.78 <i>sa</i>	6.35 <i>sa</i>	4.15 <i>s</i>	3.82 <i>s</i>
	J	6.9	-	9.0, 2.1	-	-	-	-
4d	δ	7.69 <i>d</i>	7.25 <i>m</i> ^b	7.46 <i>t</i>	7.94 <i>sa</i>	6.16 <i>sa</i>	4.15 <i>s</i>	3.87 <i>sa</i>
	J	7.6	-	7.8	-	-	-	-

^a Multiplicidad aparente.

^b Señal traslapada

Continúa ...

Tabla 8a. (continuación)

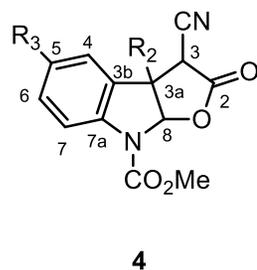


	R ₂	R ₃
4a	Bn	H
4b	<i>p</i> OMeBn	H
4c	Bn	OMe
4d	EtPh	H

		R ²						R ³	
		Ho	Hm	H <i>p</i>	C3-CH ₂	CH ₂	OMe	-	OMe
4a	δ	7.34 <i>m</i> ^b	7.04 <i>m</i>	7.34 <i>m</i> ^b	3.11 <i>s</i>	-	-	-	-
	<i>J</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
4b	δ	6.96 <i>dm</i>	6.87 <i>d</i>	-	3.05 <i>s</i>	-	3.91 <i>s</i>	-	-
	<i>J</i>	8.8	8.7	-	-	-	-	-	-
4c	δ	7.05 <i>m</i> ^b	7.16 <i>m</i> ^b	6.82 <i>dm</i>	3.11 <i>s</i>	-	-	-	3.82 <i>s</i>
	<i>J</i>	-	-	8.1	-	-	-	-	-
4d	δ	7.22 <i>m</i> ^b	7.26 <i>m</i> ^b	7.17	2.28 <i>m</i>	2.42 <i>m</i>	-	-	-

^b Señal traslapada

Tabla 8b. Datos de RMN ^{13}C de γ -lactonas **4** en CDCl_3 a 75 MHz (δ en ppm).

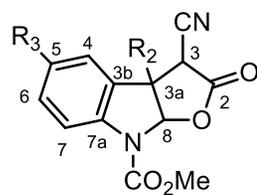


	R ₂	R ₃
4a	Bn	H
4b	<i>p</i> OMeBn	H
4c	Bn	OMe
4d	EtPh	H

	C-2	C-3	C-3a	C-3b	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8
4a	164.7	40.5	55.2	128.0	125.7	124.7	131.0	115.9	133.2	93.7
4b	164.9	40.5	55.3	125.7	125.0	124.6	131.0	115.8	131.0	93.9
4c	164.7	40.6	55.3	127.8	111.0	156.9	116.0	116.6	132.8	94.4
4d	164.9	40.6	55.0	128.9	125.6	124.7	131.0	115.7	139.0	95.2

Continúa

Tabla 8b. (continuación)



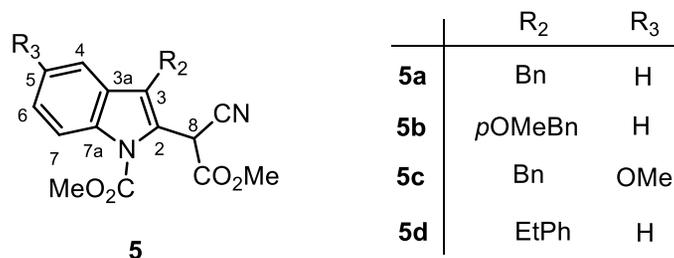
4

	R ₂	R ₃
4a	Bn	H
4b	<i>p</i> OMeBn	H
4c	Bn	OMe
4d	EtPh	H

	R ²											R ³
	C=O ^b	OMe ^b	CN	<i>Ci</i>	<i>Co</i>	<i> Cm</i>	<i>Cp</i>	C3-CH ₂	CH ₂	OMe	OMe	
4a	151.8	53.7	112.4	140.3	129.9	129.3	128.3	42.3	-	-	-	
4b	152.0	53.7	112.5	140.1	130.8	114.7	159.5	41.5	-	55.3	-	
4c	151.7	53.6	112.4	133.2	130.0	129.3	128.3	42.2	-	-	55.8	
4d	151.5	53.7	112.6	140.4	128.7	128.6	126.6	39.7	30.3	-	-	

^bEster

Tabla 9a. Datos de RMN ^1H de 2-indolilcianomalonatos de metilo **5** en CDCl_3 a 300 MHz (δ en ppm; J en Hz).

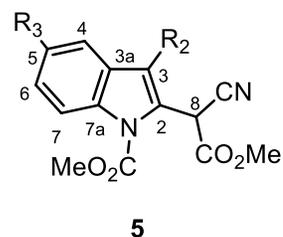


		H-4	H-5	H-6	H-7	H-8
5a	δ	7.42 <i>dd</i>	7.25 <i>m</i> ^a	7.38 <i>td</i> ^b	8.13 <i>da</i>	5.28 <i>sa</i>
	J	7.6, 1.2	-	8.2, 1.2	8.8	-
5b	δ	7.42 <i>dd</i>	7.24 <i>td</i> ^b	7.38 <i>td</i> ^b	8.13 <i>da</i>	5.29 <i>sa</i>
	J	7.6, 1.2	8.2, 1.2	8.8, 1.2	8.2	-
5c	δ	6.83 <i>d</i>	-	6.99 <i>dd</i>	8.02 <i>d</i>	5.27 <i>sa</i>
	J	2.4	-	9.4, 2.9	9.4	-
5d	δ	7.53 <i>dm</i>	7.29 <i>m</i> ^a	7.40 <i>ddd</i>	8.11 <i>da</i>	5.09 <i>sa</i>
	J	7.7	-	8.4, 7.3, 1.3	8.3	-

^a Señal parcialmente traslapada. ^b Multiplicidad aparente.

Continúa

Tabla 9a. (continuación)

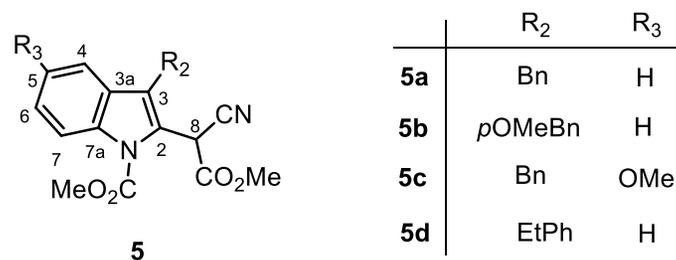


	R ₂	R ₃
5a	Bn	H
5b	<i>p</i> OMeBn	H
5c	Bn	OMe
5d	EtPh	H

		R ₂							R ₃	
		OMe ^c	OMe ^d	H _o	H _m	H _p	C3-CH ₂	CH ₂	OMe	OMe
5a	δ	4.07 <i>s</i>	3.79 <i>s</i>	7.22 <i>m</i>	7.27 <i>m</i>	7.18 <i>m</i>	4.13 <i>s</i>	-	-	-
	<i>J</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5b	δ	4.06 <i>s</i>	3.81 <i>s</i>	7.11 <i>dd</i>	6.81 <i>dt</i>	-	4.06 <i>s</i>	-	4.07 <i>s</i>	-
	<i>J</i>	-	-	8.8, 2.9	8.8, 2.35	-	-	-	-	-
5c	δ	4.06 <i>s</i>	3.79 <i>s</i>	7.20 <i>dd^f</i>	7.28 <i>dt</i>	7.22 ^a	4.10 <i>s</i>	-	-	3.76
	<i>J</i>	-	-	7.6, 2.3	7.6, 1.8	-	-	-	-	-
5d	δ	4.04 <i>s</i>	3.79 <i>s</i>	7.23 <i>m</i>	7.28 <i>m</i>	7.14 <i>m</i>	3.04 <i>m</i>	2.96 <i>m</i>	-	-

^c Carbamato. ^d Éster.

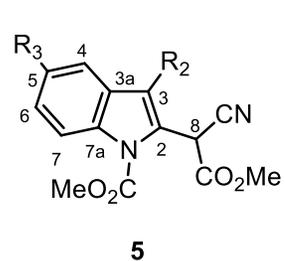
Tabla 9b. Datos de RMN ^{13}C de 2-indolilcianomalonatos de metilo **5** en CDCl_3 a 75 MHz en CDCl_3 (δ en ppm).



	C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	CN
5a	124.3	123.3	128.9	119.8	123.6	126.2	115.9	137.8	36.3	114.3
5b	124.0	123.6	128.8	119.8	123.5	126.1	115.8	135.6	36.2	114.3
5c	124.8	123.0	129.7	102.2	156.3	114.7	116.7	130.2	29.9	114.3
5d	126.5	124.3	128.6	119.3	123.5	126.1	115.9	135.7	36.0	114.3

Continúa

Tabla 9b. (continuación)

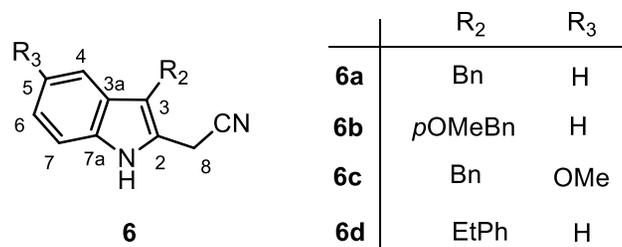


	R ₂	R ₃
5a	Bn	H
5b	<i>p</i> OMeBn	H
5c	Bn	OMe
5d	EtPh	H

					R ₂							R ₃
	C=O ^c	C=O ^d	OMe ^c	OMe ^d	<i>Ci</i>	<i>Co</i>	<i> Cm</i>	<i>Cp</i>	C3-CH ₂	CH ₂	OMe	OMe
5a	151.8	164.6	54.0	53.8	140.7	129.9	130.0	127.9	29.9	-	-	-
5b	151.7	164.4	53.9	53.7	129.7	129.1	114.1	158.3	29.0	-	55.1	-
5c	151.6	164.3	53.9	53.7	137.7	128.7	128.1	126.7	29.9	-	-	55.6
5d	151.7	164.4	53.8	53.9	140.5	128.7	128.3	126.1	26.5	35.8	-	-

^c Carbamato. ^d Éster.

Tabla 10a. Datos de RMN ^1H de 2-acetonitrilindoles **6** en CDCl_3 a 300 MHz (δ en ppm; J en Hz).

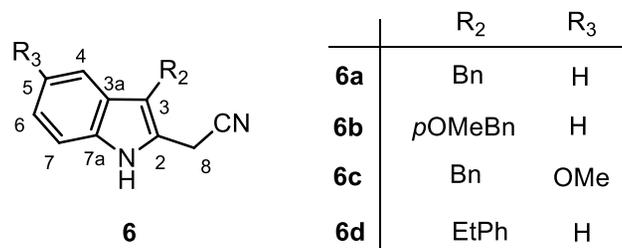


		H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	NH
6a	δ	7.46 <i>dd</i>	7.09 <i>td</i> ^a	7.19 <i>mf</i>	7.34 <i>dd</i>	3.75 <i>s</i>	8.18 <i>sa</i>
	J	7.9, 1.2	7.0, 1.0	-	8.2, 1.2	-	-
6b	δ	7.45 <i>dm</i>	7.09 <i>m</i>	7.21 <i>ddd</i>	7.35 <i>d</i>	3.74 <i>s</i>	8.19 <i>sa</i>
	J	8.2	-	8.2, 7.0, 1.2	8.2	-	-
6c	δ	6.94 <i>d</i>	-	6.84 <i>dd</i>	7.28 ^b	3.71 <i>s</i>	8.10 <i>sa</i>
	J	2.3	-	8.8, 2.5	-	-	-
6d	δ	7.59 <i>dm</i>	7.0 <i>dd</i>	7.18 <i>mf</i>	7.35 <i>dm</i>	3.21 <i>s</i>	7.98 <i>sa</i>
	J	8.4	7.5, 1.8	-	6.0	-	-

^a Multiplicidad aparente. ^b Señal traslapada. ^c Señal parcialmente traslapada.

Continúa...

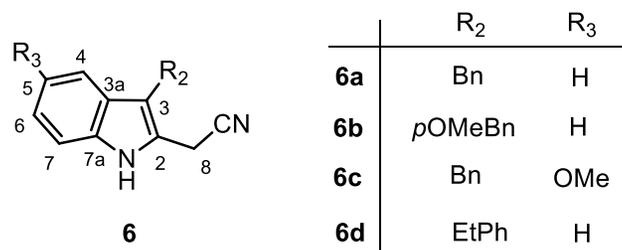
Tabla 10a. (continuación)



		R ₂						R ₃
		Ho	Hm	H _p	C-3 CH ₂	CH ₂	OMe	OMe
6a	δ	7.20 <i>m</i> ^b	7.25 <i>m</i>	7.18 <i>m</i> ^b	4.1 <i>s</i>	-	-	-
	<i>J</i>	-	-	-	-	-	-	-
6b	δ	7.10 <i>dm</i>	6.80 <i>dm</i>	-	4.0 <i>s</i>	-	3.80 <i>s</i>	-
	<i>J</i>	8.8	8.8	-	-	-	-	-
6c	δ	7.20 <i>m</i>	7.26 <i>m</i>	7.17 <i>m</i>	4.1 <i>s</i>	-	-	3.77 <i>s</i>
	<i>J</i>	-	-	-	-	-	-	-
6d	δ	7.23 <i>m</i> ^b	7.26 <i>m</i>	7.20 <i>m</i> ^b	3.00 <i>m</i>	2.91 <i>m</i>	-	-

^b Señal traslapada. ^c Señal parcialmente traslapada.

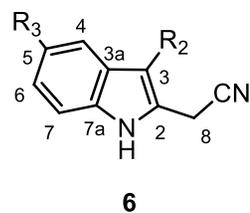
Tabla 10b. Datos de RMN ^{13}C de 2-acetonitrilindoles **6** en CDCl_3 a 75 MHz (δ en ppm).



	C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	CN
6a	122.2	113.2	128.1	119.1	120.1	122.8	110.9	135.7	15.6	116.4
6b	122.1	110.9	128.2	119.1	120.1	122.7	110.9	135.7	15.7	116.3
6c	122.9	111.7	128.2	101.0	154.4	112.9	112.8	128.6	15.8	116.5
6d	122.2	113.3	127.8	118.7	120.0	122.7	111.0	135.8	14.9	116.4

Continúa

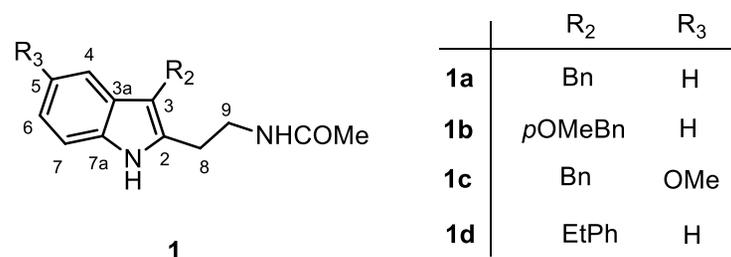
Tabla 10b. (continuación)



	R ₂	R ₃
6a	Bn	H
6b	<i>p</i> OMeBn	H
6c	Bn	OMe
6d	EtPh	H

	R ₂							R ₃
	<i>Ci</i>	<i>Co</i>	<i>Cm</i>	<i>Cp</i>	C3-CH ₂	CH ₂	OMe	OMe
6a	140.7	129.9	130.0	127.9	29.8	-	-	-
6b	132.0	114.0	129.1	158.0	29.0	-	55.2	-
6c	139.9	128.6	128.2	126.2	29.9	-	-	55.8
6d	141.6	128.4	128.8	126.3	26.5	36.4	-	-

Tabla 11a. Datos de RMN ^1H de isotriptaminas **1** en CDCl_3 a 300 MHz (δ en ppm; J en Hz).

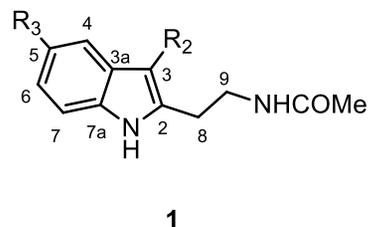


		H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	NH
1a	δ	7.45 <i>d</i>	7.06 <i>ddd</i>	7.14 <i>dm</i>	7.33 <i>d</i>	2.94 <i>t</i>	3.47 <i>q</i>	8.63 <i>sa</i>
	J	7.6	8.2, 7.0, 1.2	8.2	8.2	6.4	6.5	-
1b	δ	7.43 <i>dm</i>	7.05 <i>ddd</i>	7.14	7.33 <i>dm</i>	2.95 <i>t</i>	3.48 <i>q</i>	8.52 <i>sa</i>
	J	7.8	8.2, 7.0, 1.2	-	8.1	6.6	6.6	-
1c	δ	6.88 <i>d</i>	-	6.80 <i>dd</i>	7.21 <i>m</i> ^a	2.91 <i>t</i>	3.45 <i>q</i>	8.52 <i>sa</i>
	J	2.5	-	8.7, 2.4	-	6.6	6.5	-
1d	δ	7.58 <i>dm</i>	7.11 <i>dm</i>	7.03 <i>dm</i>	7.31 <i>dm</i>	2.67 <i>t</i>	3.25 <i>q</i>	8.56 <i>sa</i>
	J	7.6	7.2	8.8	7.9	6.7	6.7	-

^a Señal traslapada.

Continúa

Tabla 11a. (continuación)

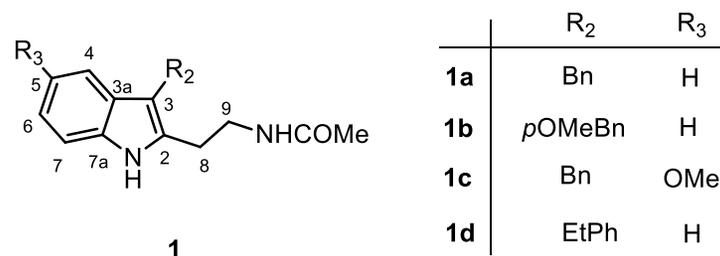


	R ₂	R ₃
1a	Bn	H
1b	<i>p</i> OMeBn	H
1c	Bn	OMe
1d	EtPh	H

		R ₂							R ₃	
		NH	COMe	H _o	H _m	H _p	C3-CH ₂	CH ₂	OMe	OMe
1a	δ	5.41 <i>sa</i>	1.74 <i>s</i>	7.21 <i>dm</i>	7.23 <i>m</i>	7.15 <i>m</i>	4.09 <i>s</i>	-	-	-
	<i>J</i>	-	-	8.8	-	-	-	-	-	-
1b	δ	5.40 <i>ta</i>	1.77 <i>s</i>	7.11 <i>dm</i>	7.05 <i>ddd</i>	-	4.03 <i>s</i>	-	3.75 <i>s</i>	-
	<i>J</i>	6.6	-	8.8	8.2, 7.0, 1.2	-	-	-	-	-
1c	δ	5.43 <i>sa</i>	1.73 <i>s</i>	7.20 <i>m</i>	7.24 <i>m^b</i>	7.16 <i>m^a</i>	5.05 <i>s</i>	-	-	3.78 <i>s</i>
	<i>J</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1d	δ	5.39 <i>sa</i>	1.88 <i>s</i>	7.20 <i>m</i>	7.23 <i>m</i>	7.15 <i>m</i>	2.94 <i>m^b</i>	2.99 <i>m^b</i>	-	-

^a Señal parcialmente traslapada.

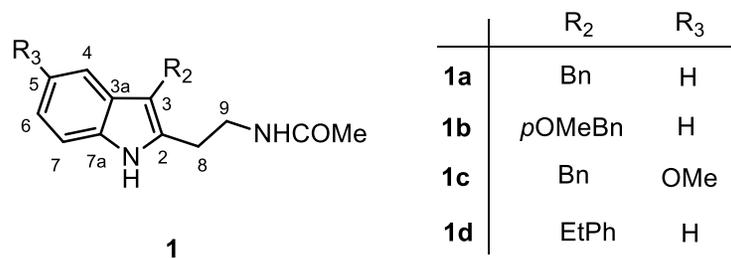
Tabla 11b. Datos de RMN ^{13}C de isotriptaminas **1** en CDCl_3 a 75 MHz (δ en ppm).



	C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-9
1a	132.6	111.3	128.7	118.5	119.3	121.4	110.7	135.6	26.4	38.9
1b	132.5	111.8	128.7	121.5	119.4	118.6	111.8	135.6	26.5	38.9
1c	133.6	111.2	129.2	100.9	154.0	111.2	111.4	130.8	26.6	38.9
1d	132.2	110.7	128.4	118.2	119.1	121.3	111.6	135.7	26.6	38.7

Continúa

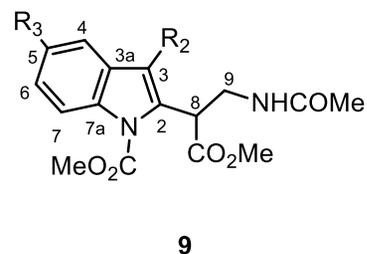
Tabla 11b. (continuación)



			R ₂							R ₃
	C=O ^a	COMe ^a	<i>Ci</i>	<i>Co</i>	<i>Cm</i>	<i>Cp</i>	C3-CH ₂	CH ₂	OMe	OMe
1a	170.6	23.0	141.7	128.1	128.6	125.8	29.8	-	-	-
1b	170.6	23.1	133.7	129.0	113.8	157.8	28.9	-	55.2	-
1c	170.6	23.0	141.6	128.1	128.5	125.9	29.9	-	-	55.9
1d	170.6	23.3	142.3	128.2	128.8	125.8	29.7	36.9	-	-

^a Amida.

Tabla 12a. Datos de RMN ^1H de 2-*N*-acetiltriptaminas **9** en CDCl_3 (δ en ppm; J en Hz).



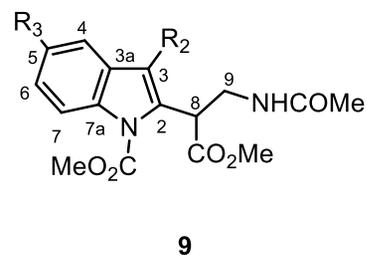
	R ₂	R ₃
9a	Bn	H
9b	<i>p</i> OMeBn	H
9c	Bn	OMe
9d	EtPh	H

		H-4	H-5	H-6	H-7	H _X -8	H _A -9	H _B -9	NH _M
9a	δ	7.70 <i>da</i>	7.18 <i>m</i> ^a	7.30 <i>ddd</i>	8.07 <i>dd</i>	4.38 <i>dd</i>	3.92 <i>ddd</i>	3.78 <i>ddd</i>	6.05 <i>ta</i>
	J	7.1	-	8.8, 8.7, 1.2	7.6, 1.2	7.6, 5.9	13.5, 7.6, 5.9	13.5, 7.6, 5.9	5.9
9b	δ	7.36 <i>da</i>	7.18 <i>td</i> ^f	7.30 <i>ddd</i>	8.06 <i>dm</i>	4.38 <i>dd</i>	3.93 <i>ddd</i>	3.78 <i>ddd</i> ^b	6.18 <i>ta</i>
	J	7.8	7.8, 1.0	8.5, 7.2, 1.3	8.5	7.3, 6.0	14.5, 7.6, 6.0	13.6, 7.6, 6.0	5.3
9c	δ	6.79 <i>d</i>	-	6.90 <i>dd</i>	7.94 <i>d</i>	4.35 <i>dd</i>	3.91 <i>ddd</i>	3.76 <i>ddd</i> ^b	6.11 <i>ta</i>
	J	2.3	-	8.8, 2.3	8.8	7.0, 5.9	13.5, 7.6, 5.9	13.5, 7.6, 5.9	4.7
9d	δ	7.49 <i>ddd</i>	7.26 <i>m</i> ^a	7.33 <i>ddd</i>	8.05 <i>ddd</i>	4.24 <i>dd</i>	3.88 <i>ddd</i>	3.72 <i>ddd</i>	6.17 <i>ta</i>
	J	8.3, 1.3, 0.7	-	8.3, 8.2, 1.6	8.2, 1.3, 0.7	8.1, 5.4	13.4, 8.1, 5.4	13.4, 8.1, 5.4	5.4

^a Señal traslapada. ^b Señal parcialmente traslapada. ^c Multiplicidad aparente.

Continúa

Tabla 12a. (continuación)

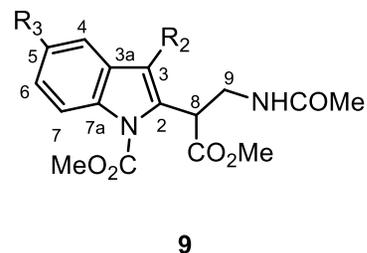


	R ₂	R ₃
9a	Bn	H
9b	<i>p</i> OMeBn	H
9c	Bn	OMe
9d	EtPh	H

		R ²					R ³					
		OMe ^c	OMe ^d	COMe ^e	<i>H_o</i>	<i>H_m</i>	<i>H_p</i>	C3-CH ₂	CH ₂	OMe	OMe	
9a	δ	4.01 <i>s</i>	3.62 <i>s</i>	1.82 <i>s</i>	7.20 <i>m</i>	7.22 <i>m</i>	7.16 <i>m</i>	4.19 <i>d</i>	4.08 <i>d</i>	-	-	-
	<i>J</i>	-	-	-	-	-	-	16.4	16.4	-	-	-
9b	δ	4.01 <i>s</i>	3.63 <i>s</i>	1.83 <i>s</i>	7.12 <i>dm</i>	6.77 <i>dm</i>	-	4.12 <i>d</i>	4.01 <i>d</i>	-	3.74 <i>s</i>	-
	<i>J</i>	-	-	-	8.6	8.8	-	16.4	16.7	-	-	-
9c	δ	4.00 <i>s</i>	3.62 <i>s</i>	1.82 <i>s</i>	7.22 <i>m^a</i>	7.23 <i>m^a</i>	7.17 <i>m</i>	4.17 <i>d</i>	4.04	-	-	3.74 <i>s</i>
	<i>J</i>	-	-	-	-	-	-	17.0	17.0	-	-	-
9d	δ	4.00 <i>s</i>	3.61 <i>s</i>	1.96 <i>s</i>	7.24 <i>m</i>	7.26 <i>m</i>	7.18 <i>m</i>	3.02 <i>m</i>	2.95 <i>m</i>	-	-	-

^c Carbamato. ^d Éster. ^e Amida.

Tabla 12b. Datos de RMN ^{13}C de 2-*N*-acetiltriptaminas **9** en CDCl_3 a 75 MHz (δ en ppm).

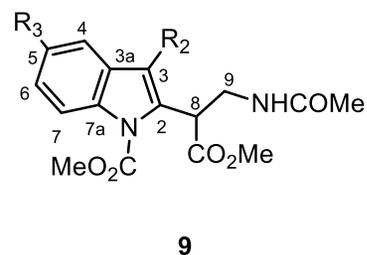


	R ₂	R ₃
9a	Bn	H
9b	<i>p</i> OMeBn	H
9c	Bn	OMe
9d	EtPh	H

	C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-9
9a	131.7	121.6	129.7	119.5	123.2	124.9	115.7	135.6	43.8	40.6
9b	131.5	122.0	129.6	119.5	123.1	124.9	115.6	135.6	43.7	40.6
9c	132.4	121.4	130.6	102.2	156.1	113.2	116.5	130.1	43.8	40.6
9d	130.7	122.9	129.6	118.9	123.1	124.8	115.8	135.5	43.7	40.8

Continúa

Tabla 12b. (continuación)

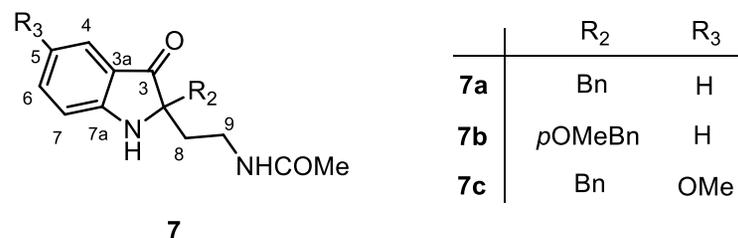


	R ₂	R ₃
9a	Bn	H
9b	<i>p</i> OMeBn	H
9c	Bn	OMe
9d	EtPh	H

	C=O ^a	C=O ^b	C=O ^c	OMe ^a	OMe ^b	COMe ^c	R ₂						R ₃	
							<i>Ci</i>	<i>Co</i>	<i> Cm</i>	<i>Cp</i>	C3-CH ₂	CH ₂	OMe	OMe
9a	152.2	172.0	170.1	53.6	52.0	23.1	139.2	128.2	128.4	126.2	29.7	-	-	-
9b	152.2	172.0	170.2	53.6	52.0	23.0	131.1	129.1	113.8	157.9	29.6	-	55.1	-
9c	152.1	172.0	170.2	53.6	52.0	23.0	139.1	128.2	128.4	126.2	29.7	-	55.6	-
9d	152.2	172.3	170.0	53.6	52.0	23.3	141.4	128.5	128.4	126.0	26.2	36.1	-	-

^a Carbamato. ^b Éster. ^c Amida.

Tabla 13a. Datos de RMN ^1H de 3-oxoisotriptaminas **7** en CDCl_3 a 300 MHz (δ en ppm; J en Hz).

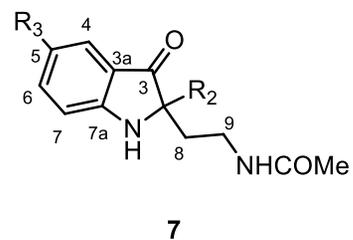


		H-4	H-5	H-6	H-7	H-8a,b		H-9a,b		NH
7a	δ	7.53 <i>da</i>	6.80 <i>da</i>	7.38 <i>ddd</i>	6.76 <i>da</i>	2.10 <i>m</i>	1.89 <i>m</i>	3.24 <i>m</i>	3.01 <i>m</i>	4.94 <i>sa</i>
	J	7.6	8.2	8.2, 7.0, 1.2	7.0	-	-	-	-	-
7b	δ	7.53 <i>da</i>	6.76 <i>m^a</i>	7.40 <i>ddd</i>	6.81 ^a	2.09 <i>m</i>	1.87 <i>m</i>	3.24 <i>m</i>	3.02 <i>m</i>	4.94 <i>sa</i>
	J	8.1	-	8.2, 7.0, 1.2	-	-	-	-	-	-
7c	δ	6.96 <i>da</i>	-	7.09 <i>dd</i>	6.77 <i>dd</i>	2.10 <i>m</i>	1.89 <i>m</i>	3.22 <i>m</i>	3.03 <i>m</i>	4.61 <i>sa</i>
	J	2.6	-	8.8, 2.6	8.8, 0.6	-	-	-	-	-

^aSeñal traslapada.

Continúa

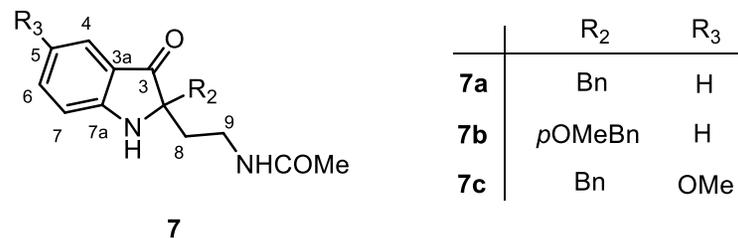
Tabla 13a. (continuación)



	R ₂	R ₃
7a	Bn	H
7b	<i>p</i> OMeBn	H
7c	Bn	OMe

		R ₂							R ₃
		NH	COMe	H _o	H _m	H _p	C3-CH ₂	OMe	OMe
7a	δ	5.59 <i>sa</i>	1.81 <i>s</i>	7.15 <i>dd</i>	7.23 <i>m</i>	7.21 <i>m</i>	2.88 AB	-	-
	<i>J</i>	-	-	7.0, 2.3	-	-	13.5	-	-
7b	δ	5.60 <i>sa</i>	1.81 <i>s</i>	7.06 <i>dm</i>	6.77 <i>dm</i>	-	2.82 AB	3.76 <i>s</i>	-
	<i>J</i>	-	-	8.8	8.8	-	14.1	-	-
7c	δ	5.58 <i>sa</i>	1.82 <i>s</i>	7.14 <i>dd</i>	7.23 <i>m</i>	7.21 <i>m</i>	2.89 AB	-	3.75 <i>s</i>
	<i>J</i>	-	-	7.9, 2.2	-	-	13.8	-	-

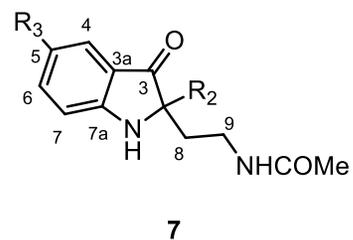
Tabla 13b. Datos de RMN ^{13}C de 3-oxoisotriptaminas **7** en CDCl_3 a 75 MHz (δ en ppm).



	C-2	C-3	C-3a	C-4	C-5	C-6	C-7	C-7a	C-8	C-9
7a	68.8	204.2	120.5	124.3	112.3	137.5	118.7	160.2	35.5	34.8
7b	69.1	204.5	120.7	124.4	118.9	137.5	112.4	160.2	35.5	34.9
7c	69.9	204.5	121.0	104.1	153.4	128.3	114.0	156.2	35.8	35.0

Continúa

Tabla 13b. (continuación)



	R ₂	R ₃
7a	Bn	H
7b	<i>p</i> OMeBn	H
7c	Bn	OMe

			R ₂							R ₃
	C=O ^a	COMe ^a	<i>Ci</i>	<i>Co</i>	<i>Cm</i>	<i>Cp</i>	C3-CH ₂	CH ₂	OMe	OMe
7a	169.9	23.1	135.3	130.1	128.2	127.0	46.3	-	-	-
7b	170.0	23.1	127.3	131.2	113.7	158.6	42.5	-	55.2	-
7c	169.9	23.2	125.4	130.1	128.3	127.1	43.5	-	-	55.7

^a Amida

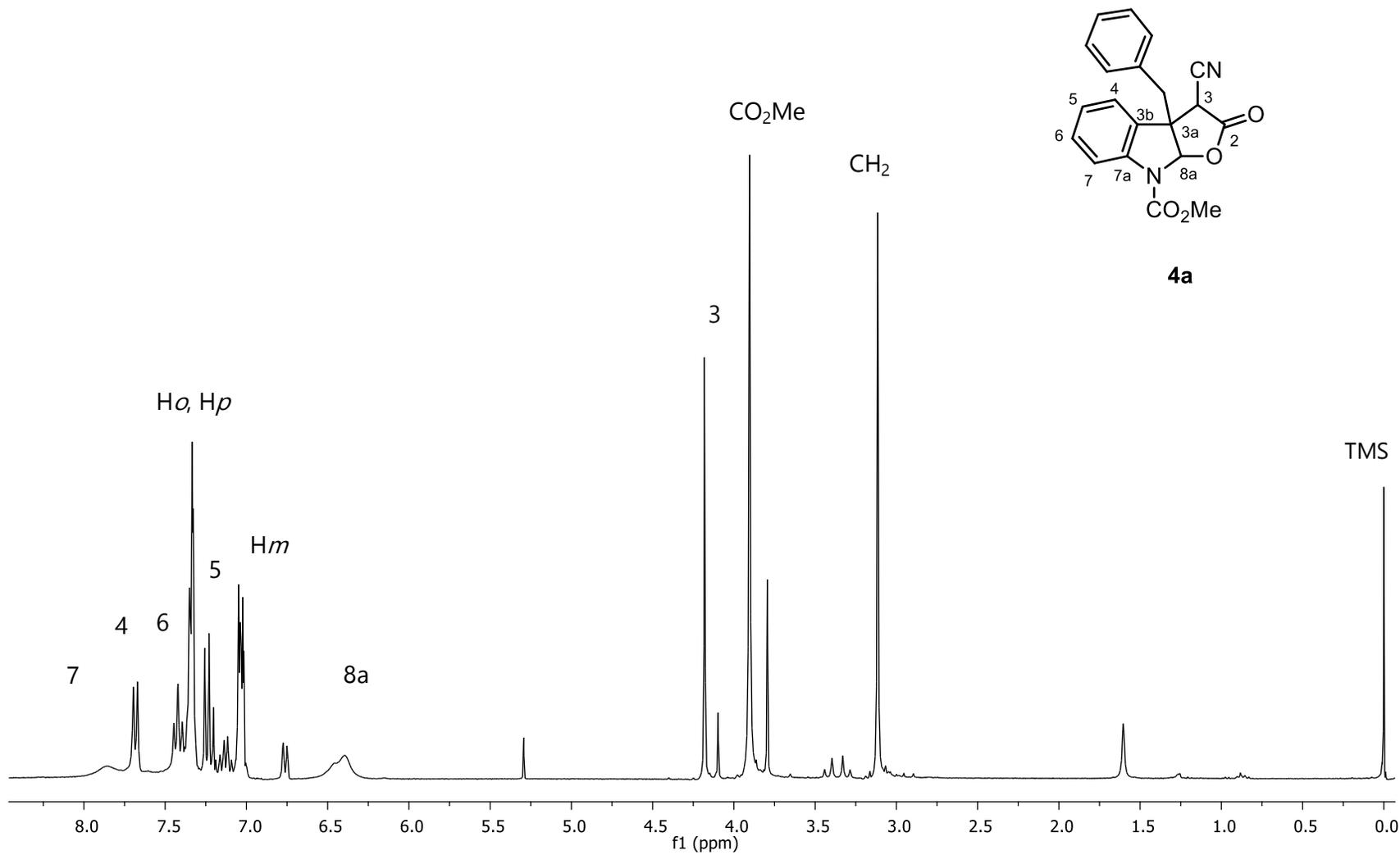


Figura 28a. Espectro de RMN de ¹H de **4a** (300 MHz, CDCl₃).

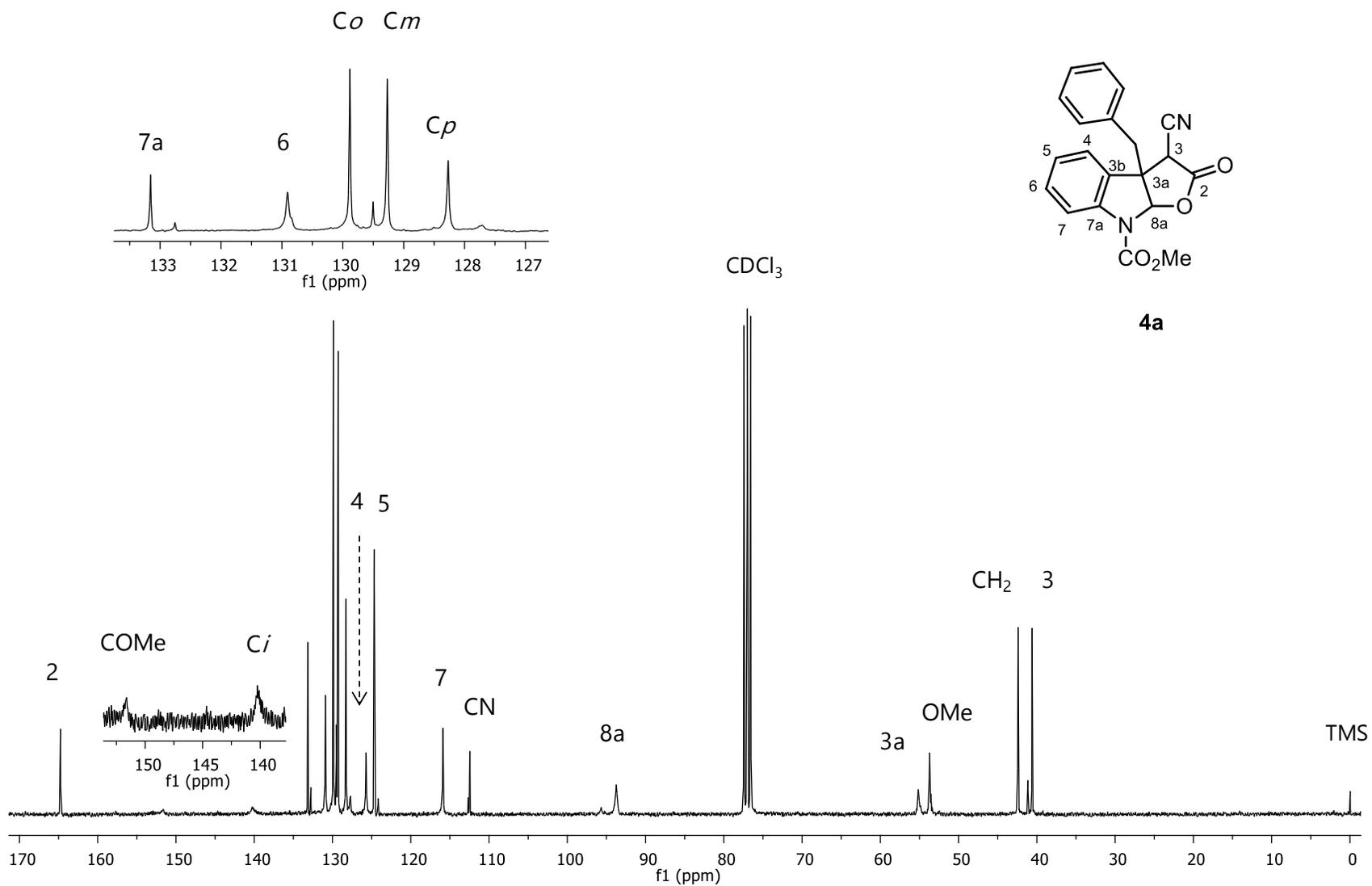


Figura 28b. Espectro de RMN de ^{13}C de **4a** (75 MHz, CDCl_3).

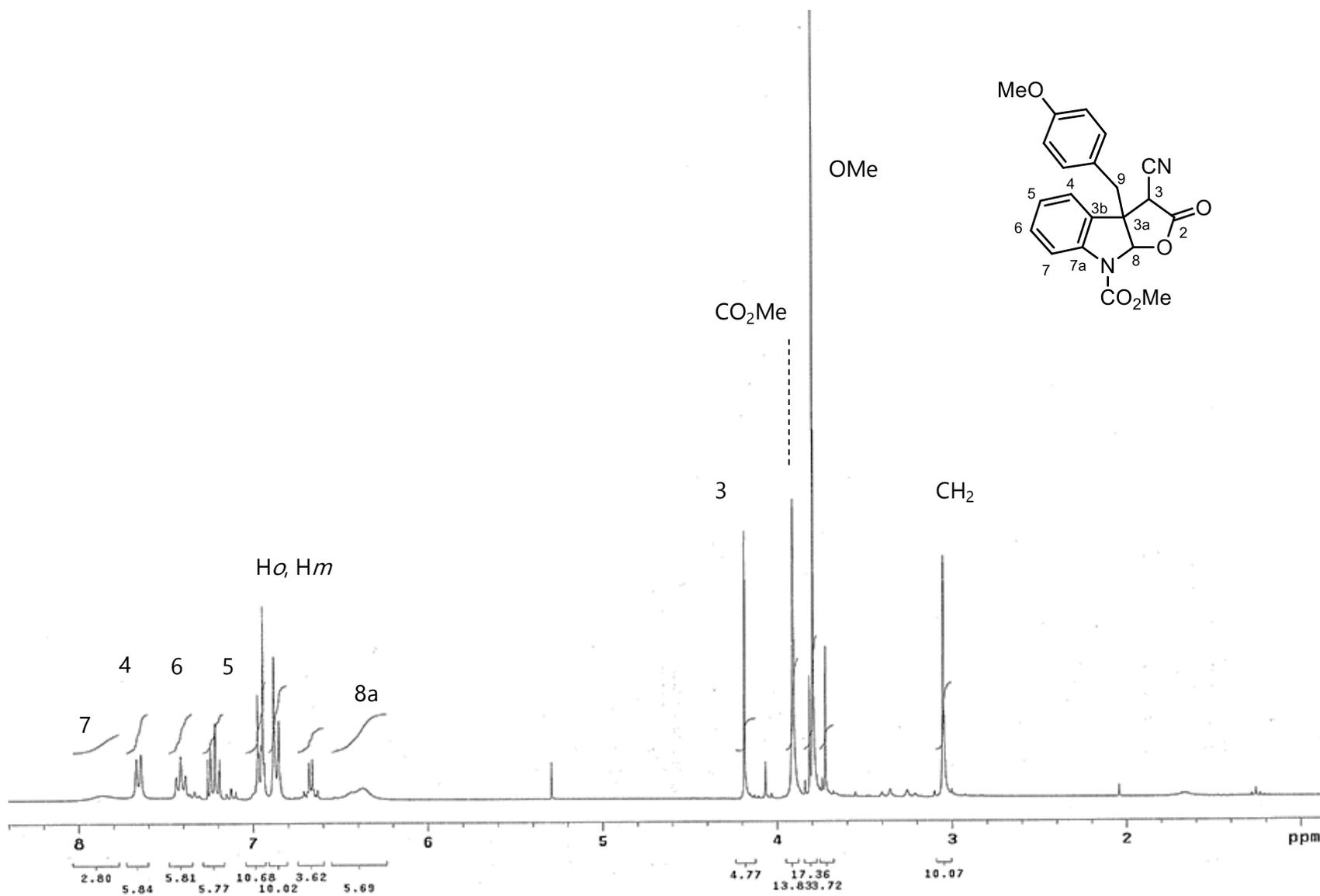


Figura 29a. Espectro de RMN de ¹H de **4b** (300 MHz, CDCl₃).

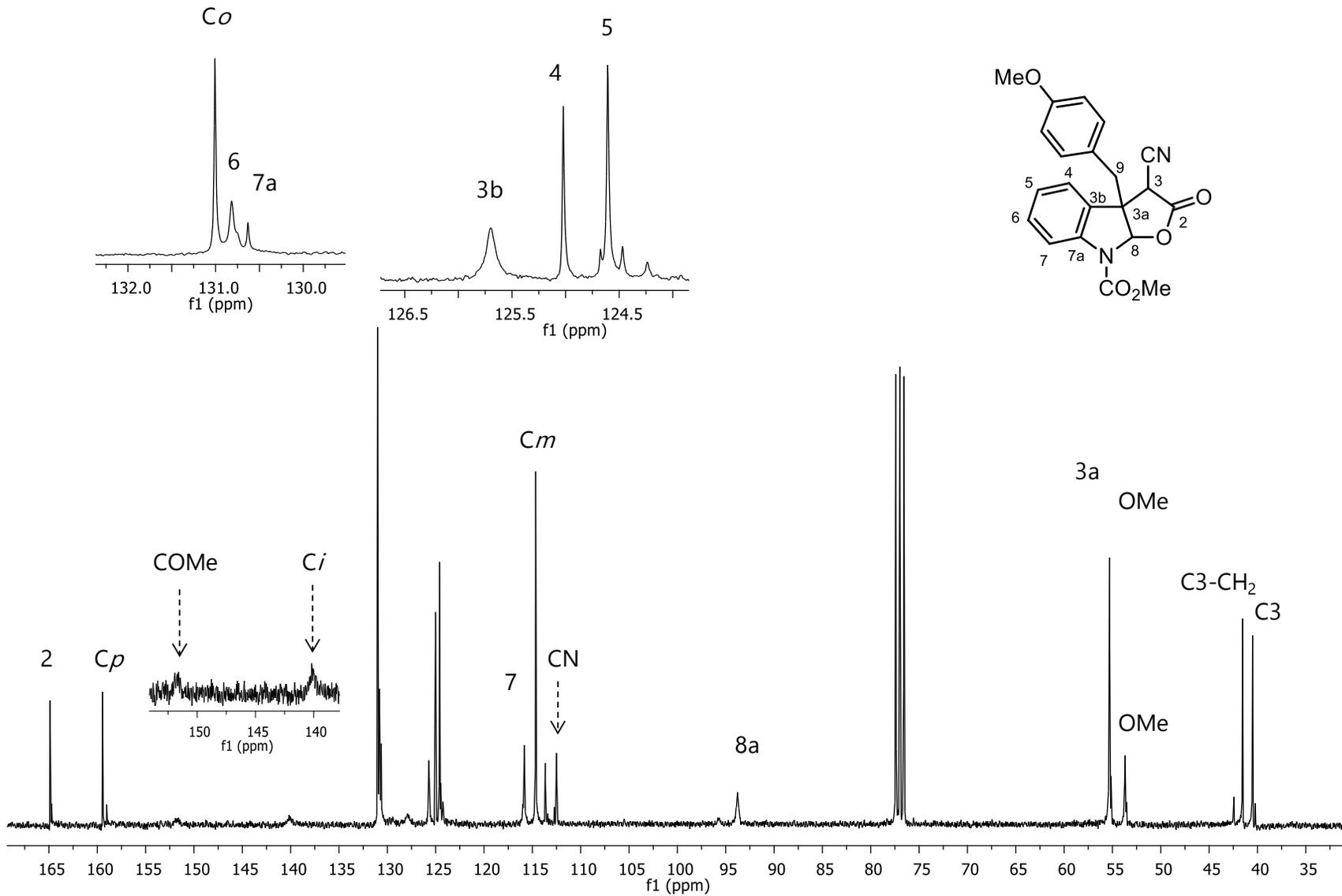


Figura 29b. Espectro de RMN de ^{13}C de **4b** (75 MHz, CDCl_3).

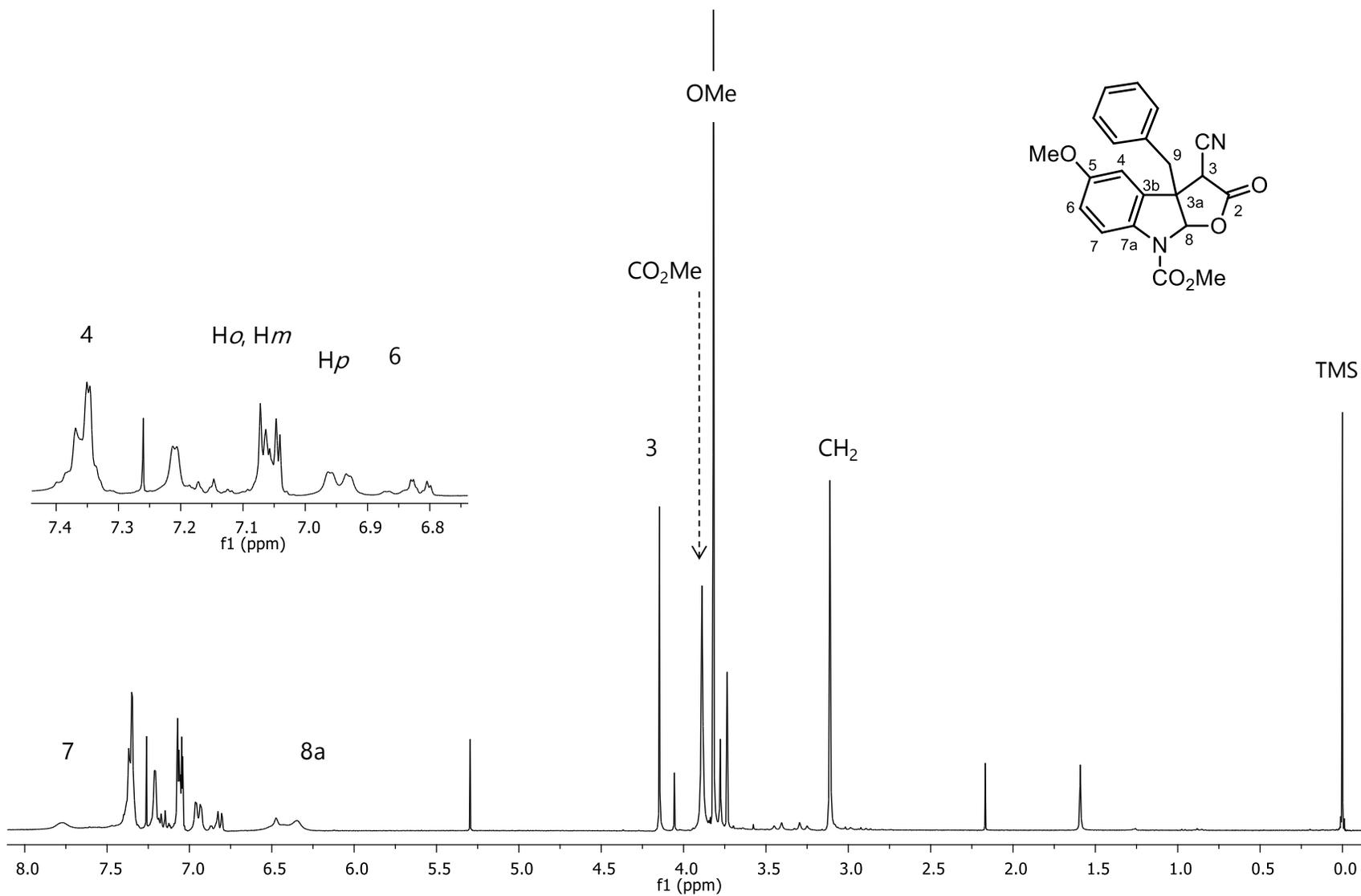


Figura 30a. Espectro de RMN de ^1H de **4c** (300 MHz, CDCl_3).

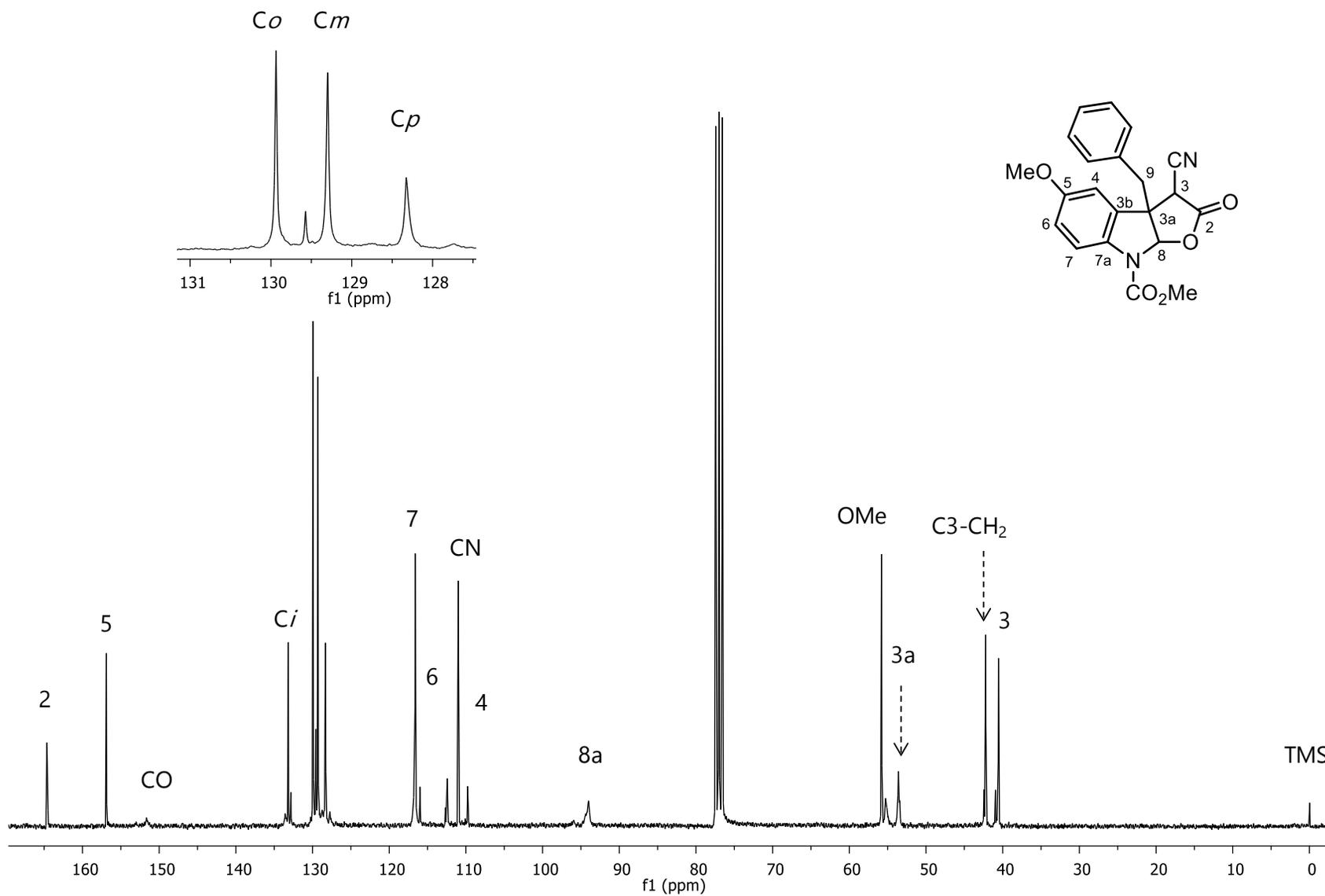


Figura 30b. Espectro de RMN de ^{13}C de **4c** (75 MHz, CDCl_3).

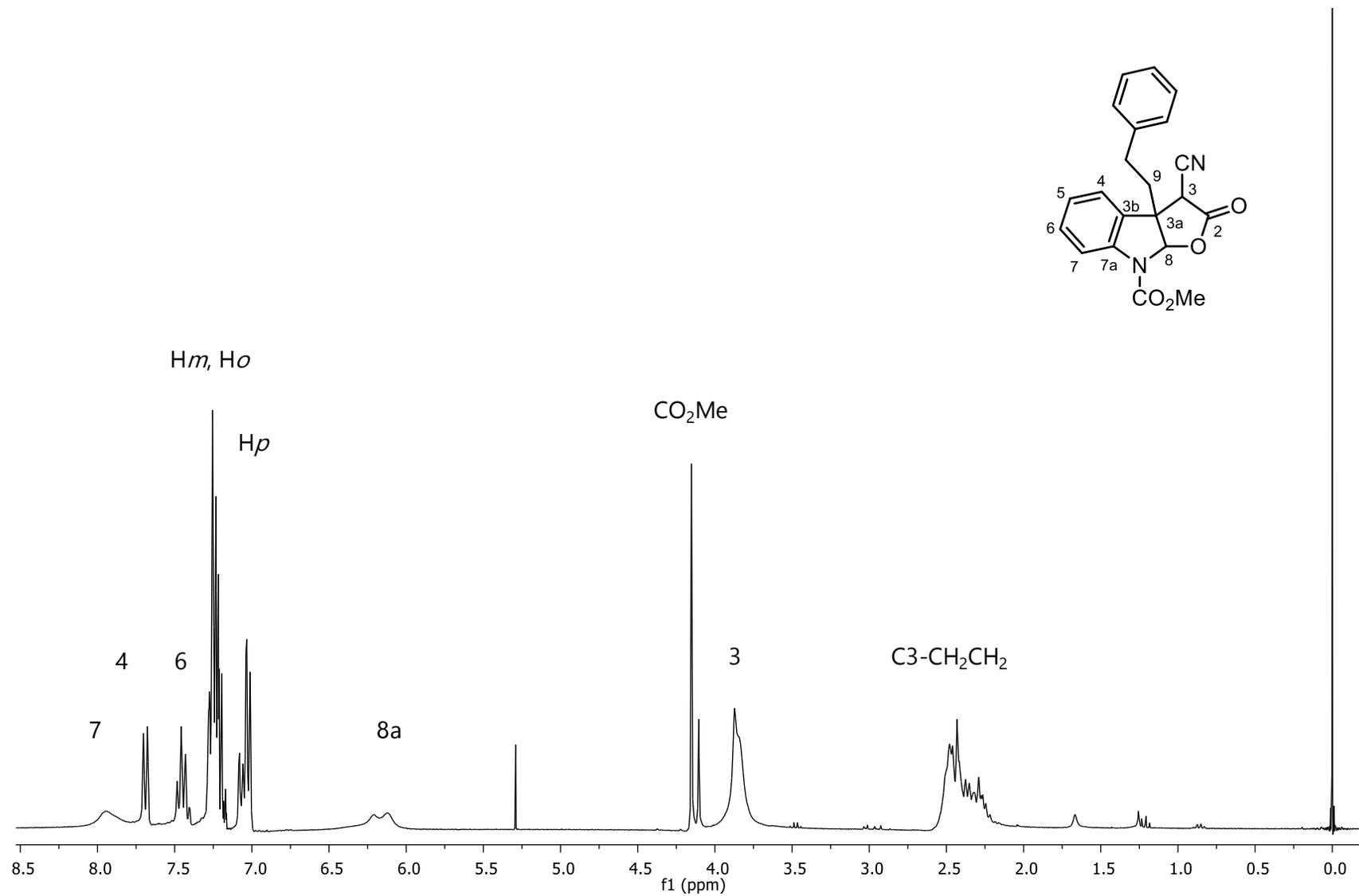


Figura 31a. Espectro de RMN de ^1H de **4d** (300 MHz, CDCl_3).

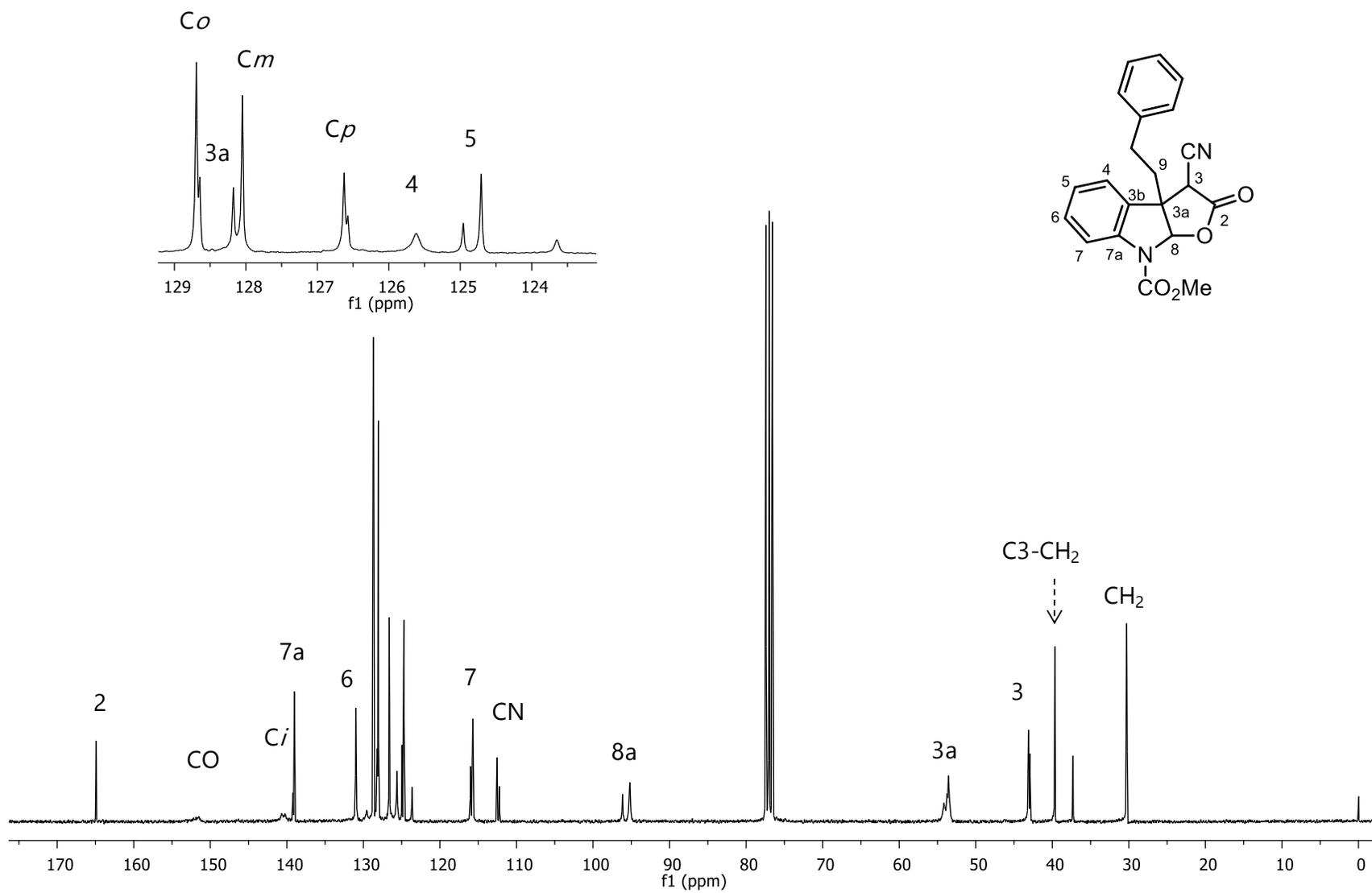


Figura 31b. Espectro de RMN de ^{13}C de **4d** (75 MHz, CDCl_3).

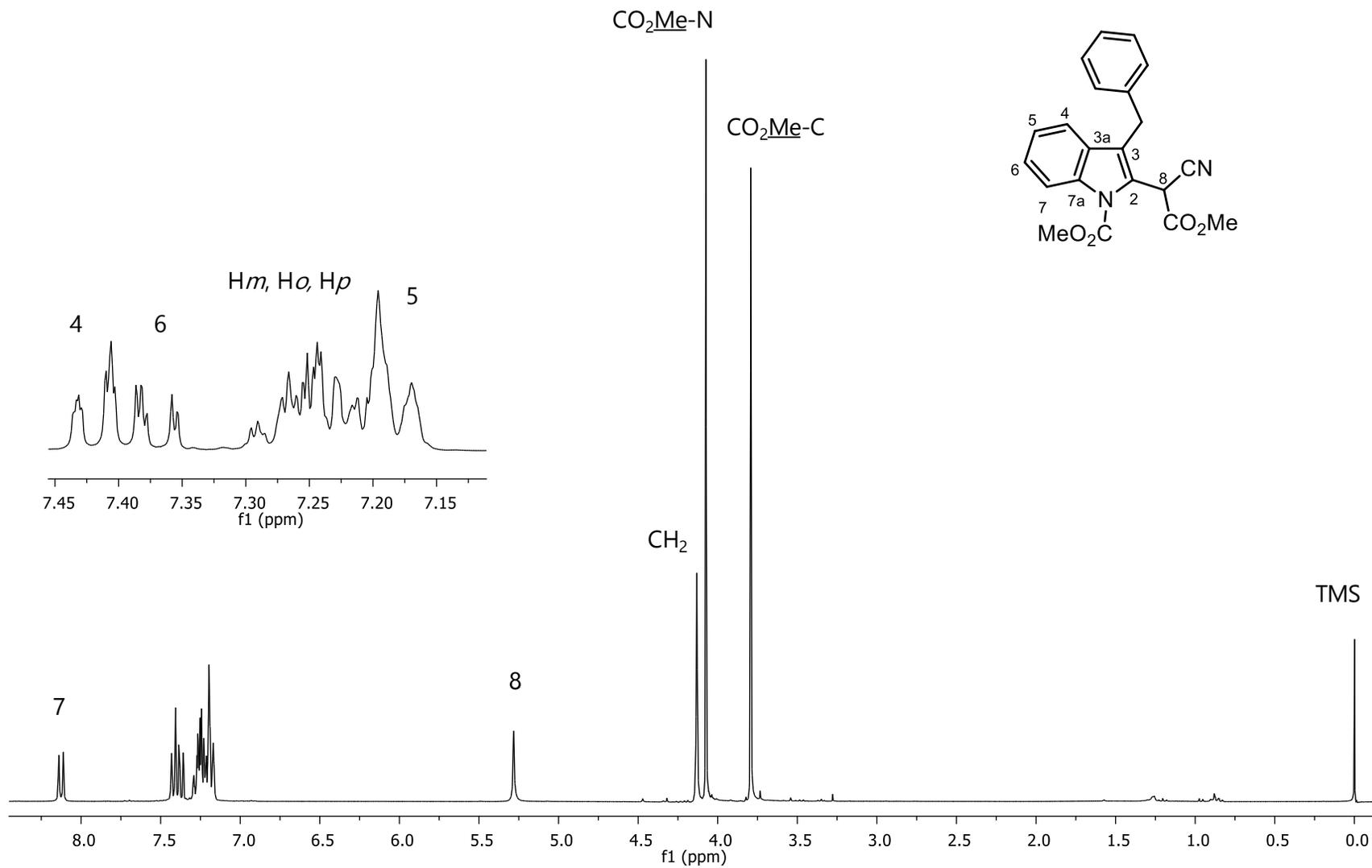


Figura 32a. Espectro de RMN de ¹H de **5a** (300 MHz, CDCl₃).

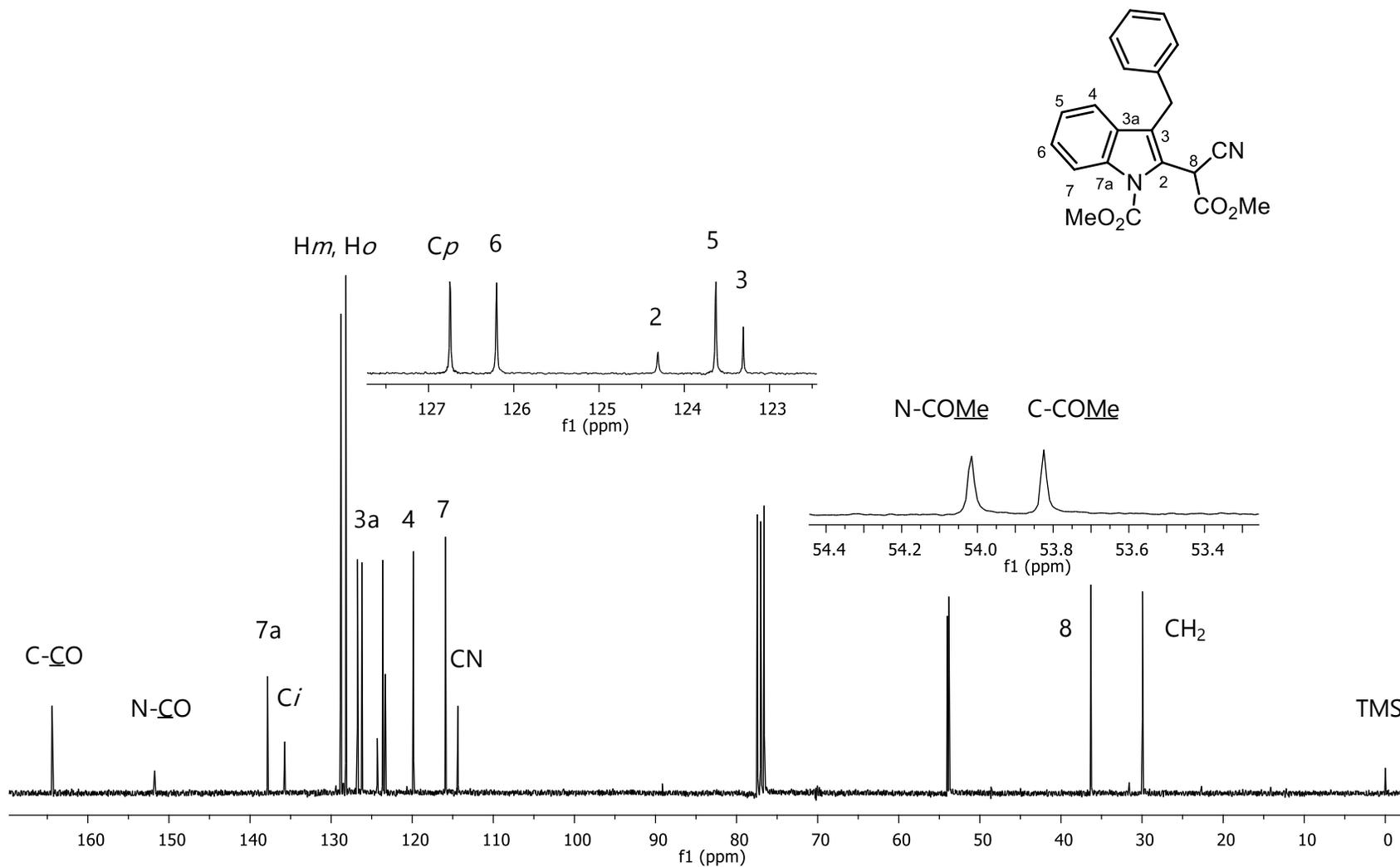


Figura 32b. Espectro de RMN de ^{13}C de **5a** (75 MHz, CDCl_3).

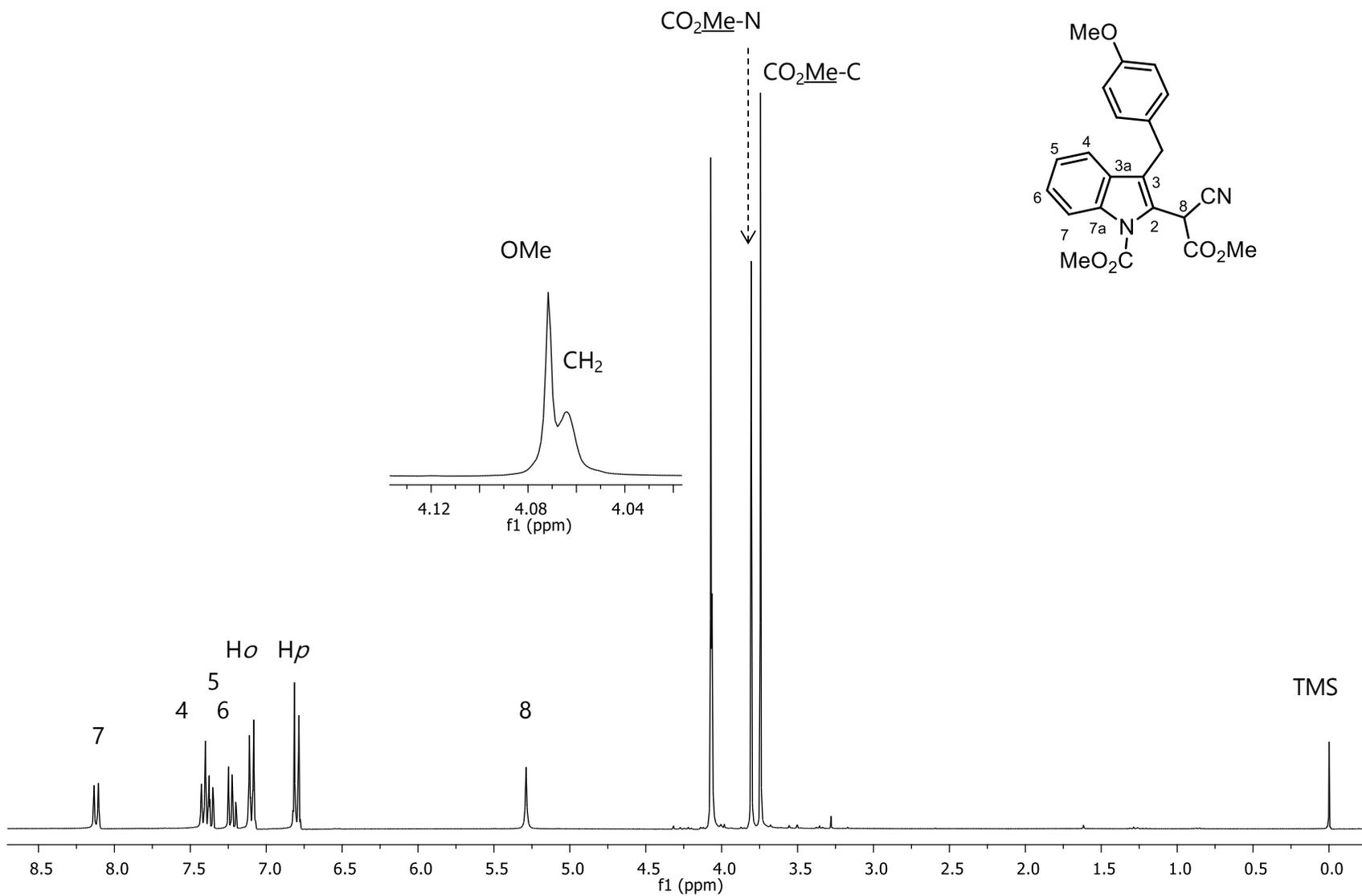


Figura 33a. Espectro de RMN de ^1H de **5b** (300 MHz, CDCl_3).

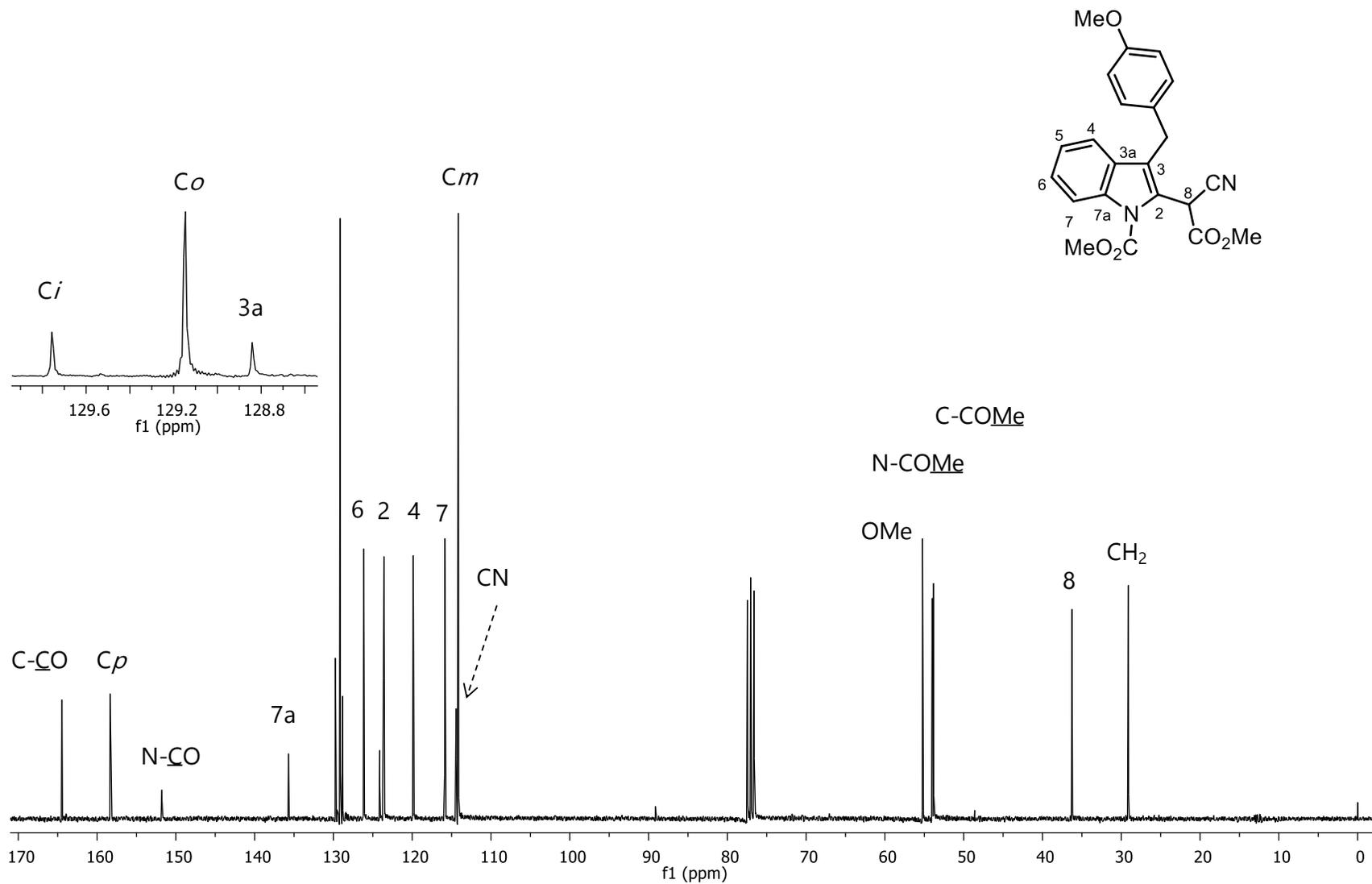


Figura 33b. Espectro de RMN de ^{13}C de **5b** (75 MHz, CDCl_3).

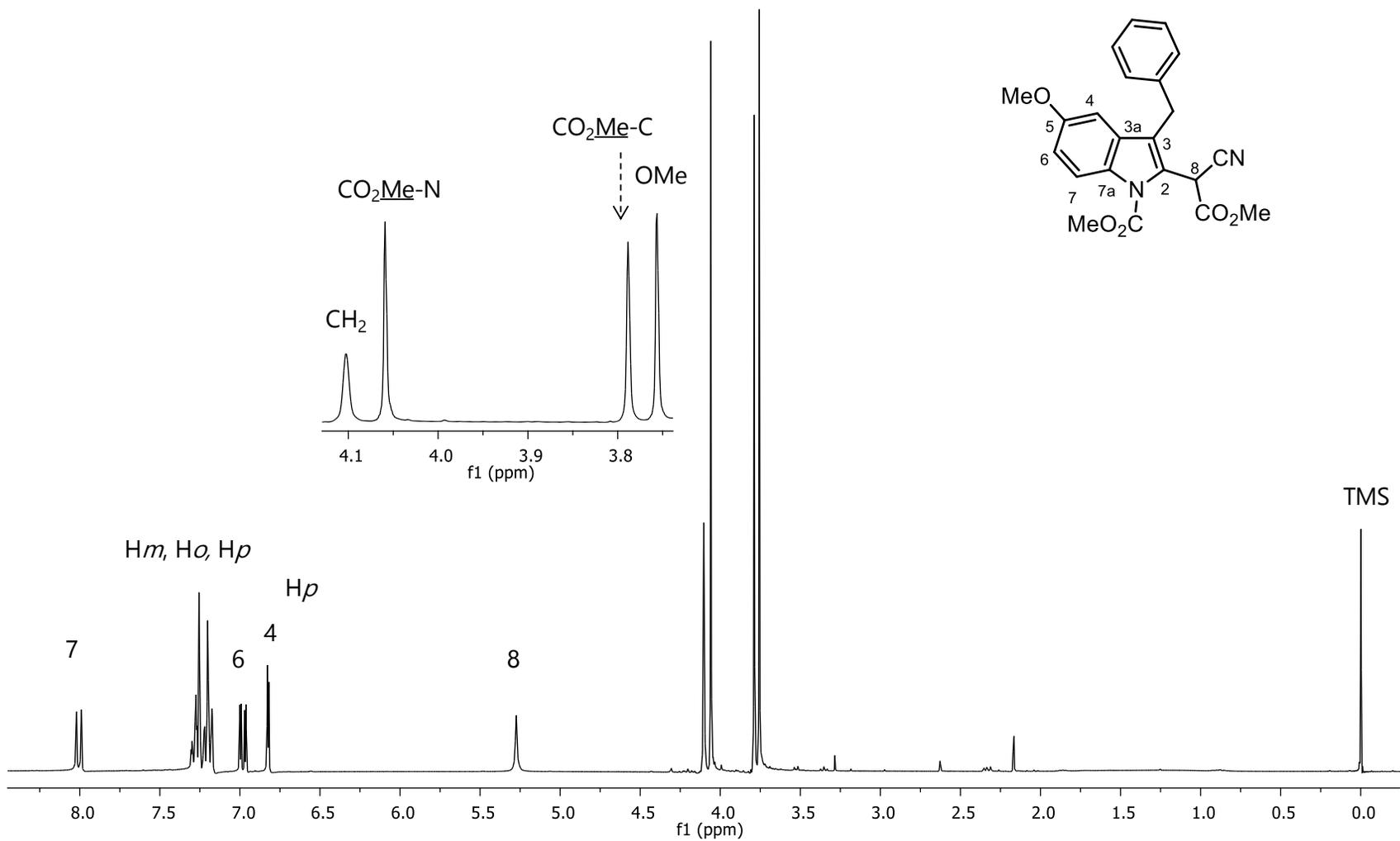


Figura 34a. Espectro de RMN de ^1H de **5c** (300 MHz, CDCl_3).

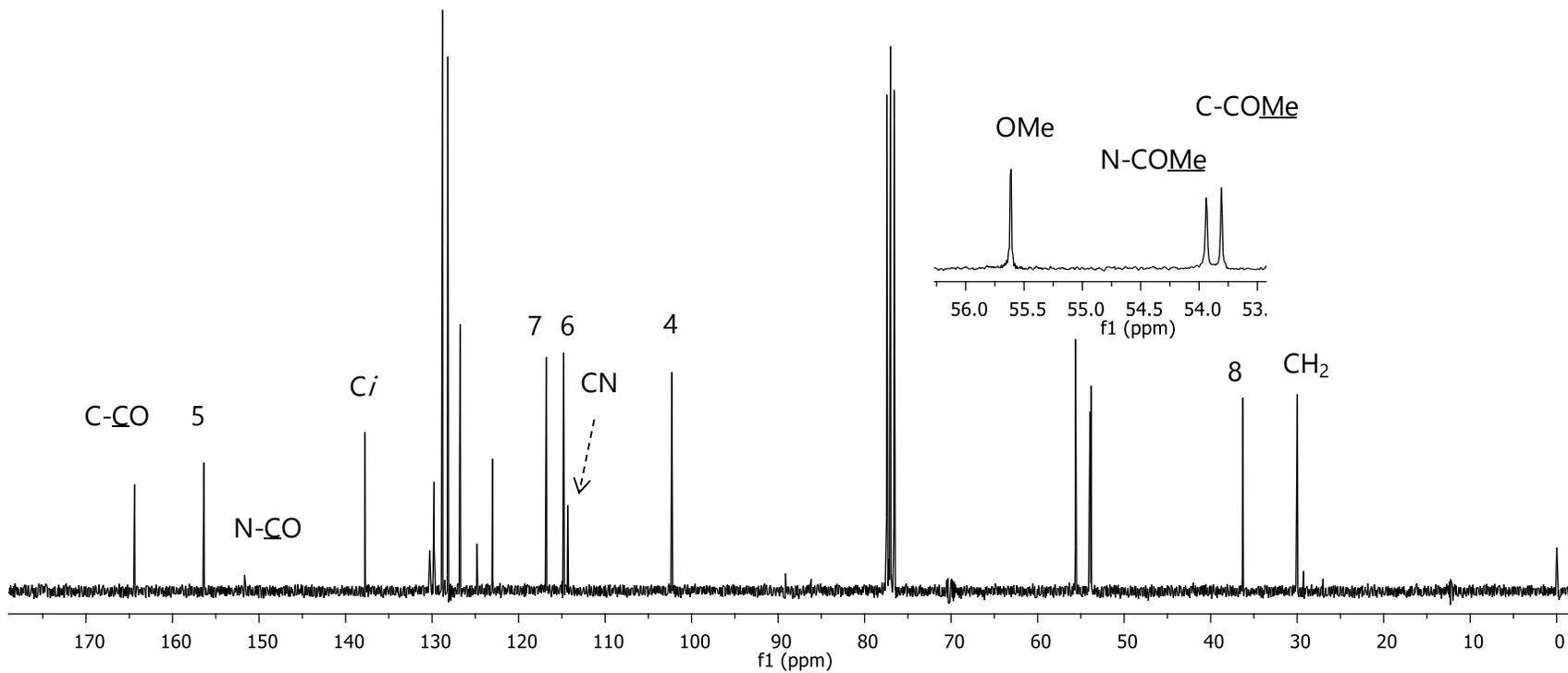
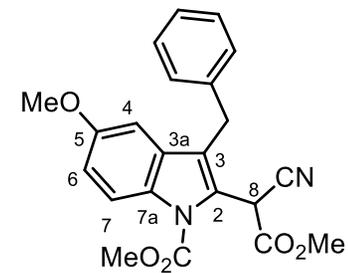
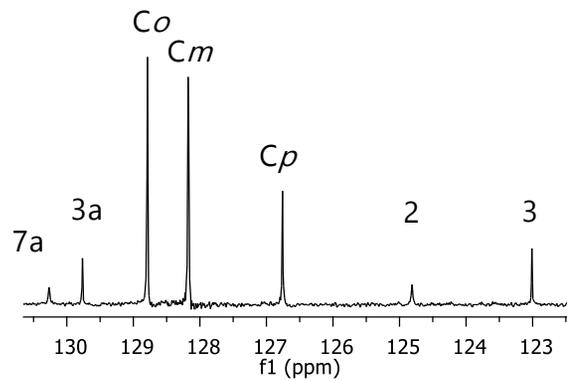


Figura 34b. Espectro de RMN de ^{13}C de **5c** (75 MHz, CDCl_3).

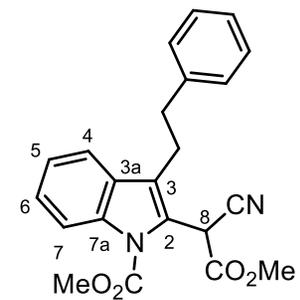
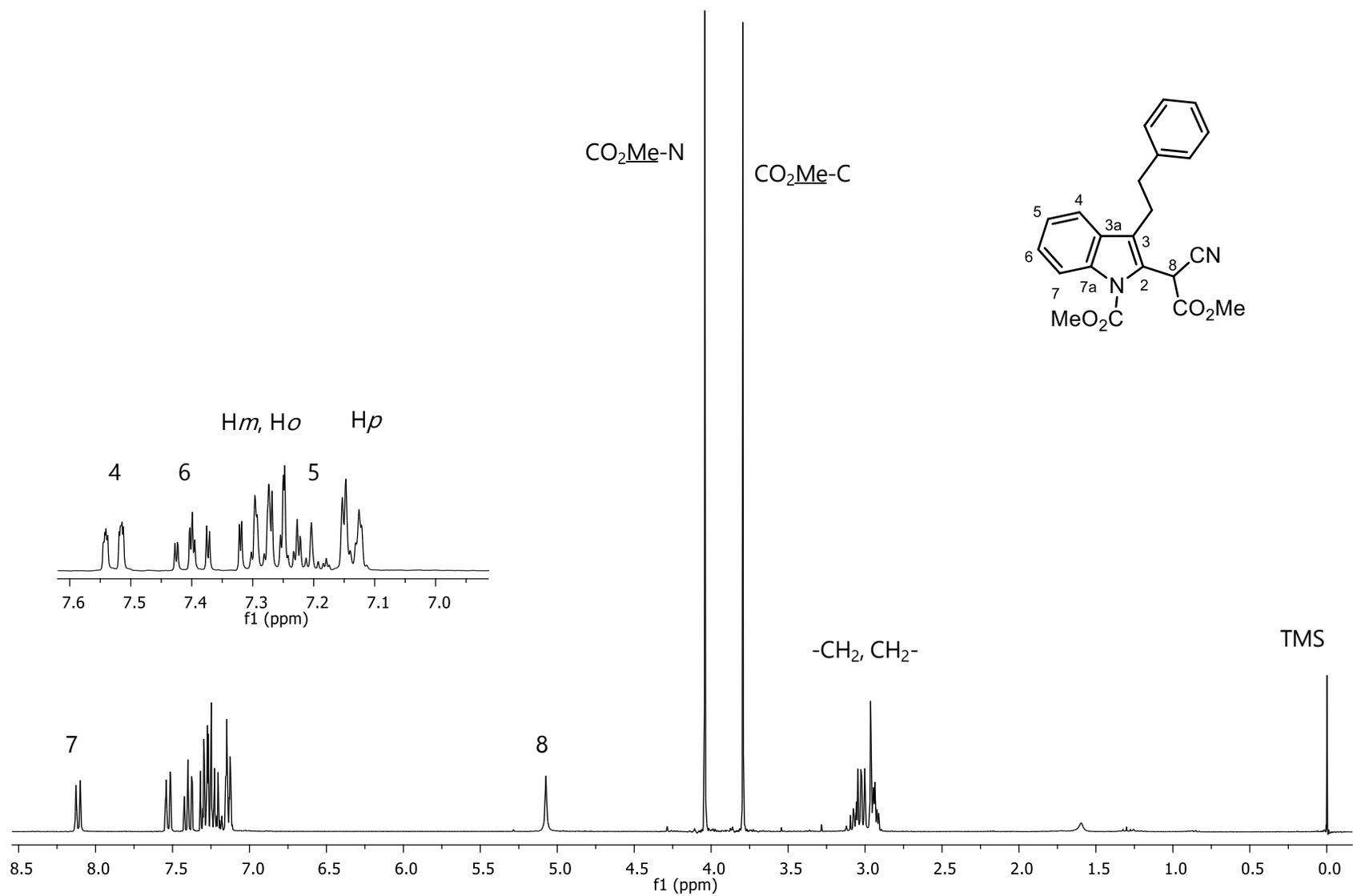


Figura 35a. Espectro de RMN de ^1H de **5d** (300 MHz, CDCl_3).

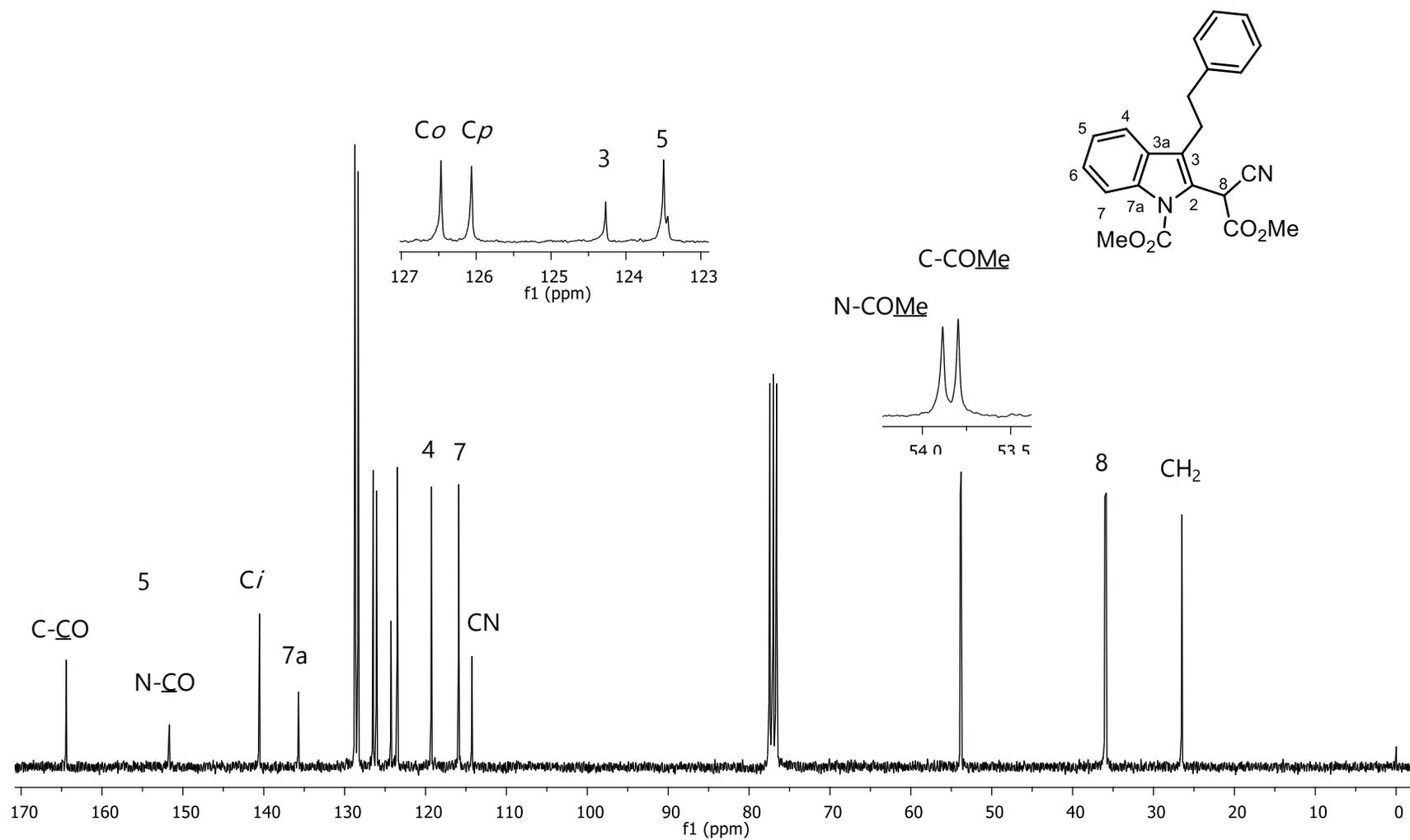


Figura 35b. Espectro de RMN de ^{13}C de **5d** (75 MHz, CDCl_3).

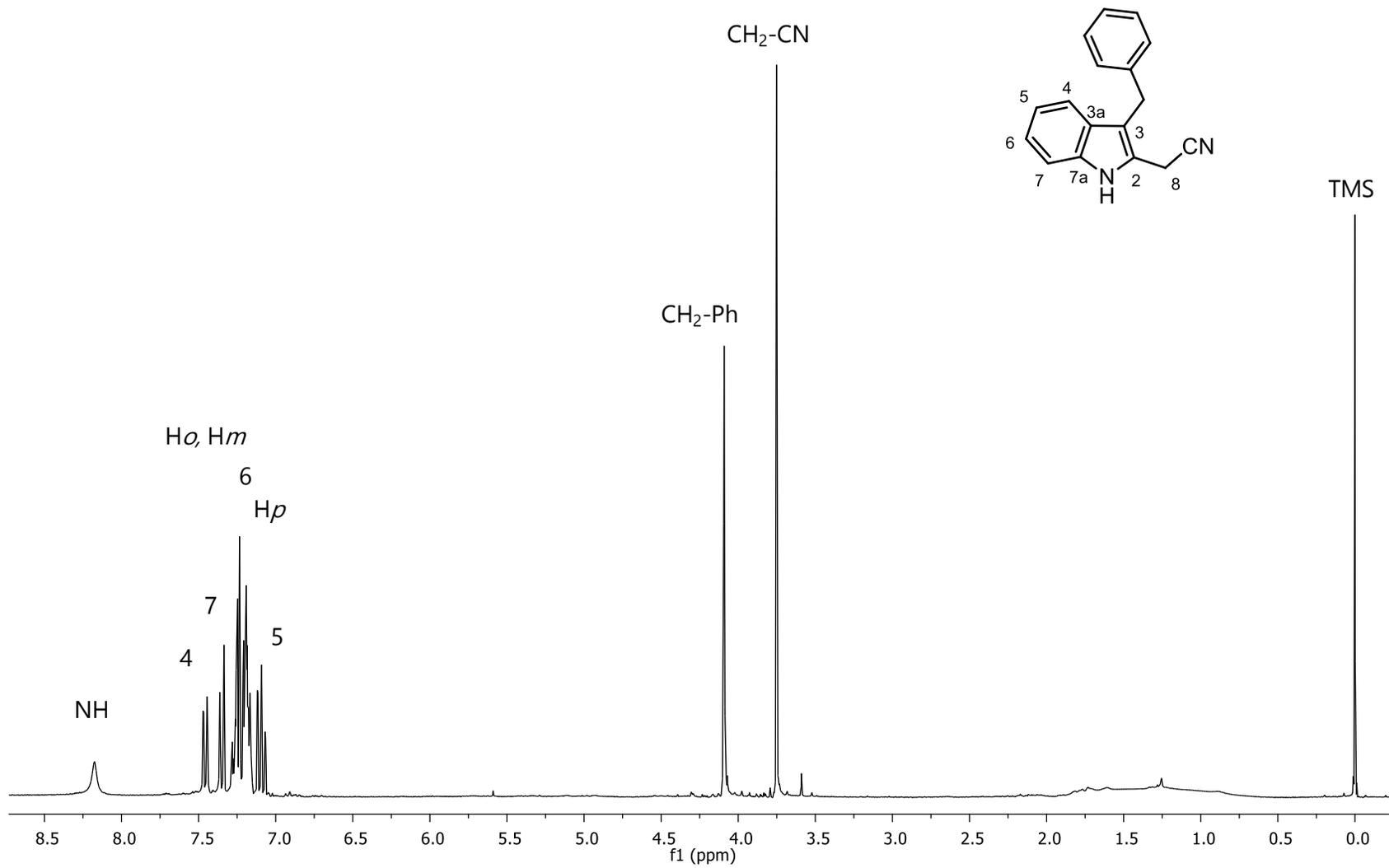


Figura 36a. Espectro de RMN de ^1H de **6a** (300 MHz, CDCl_3).

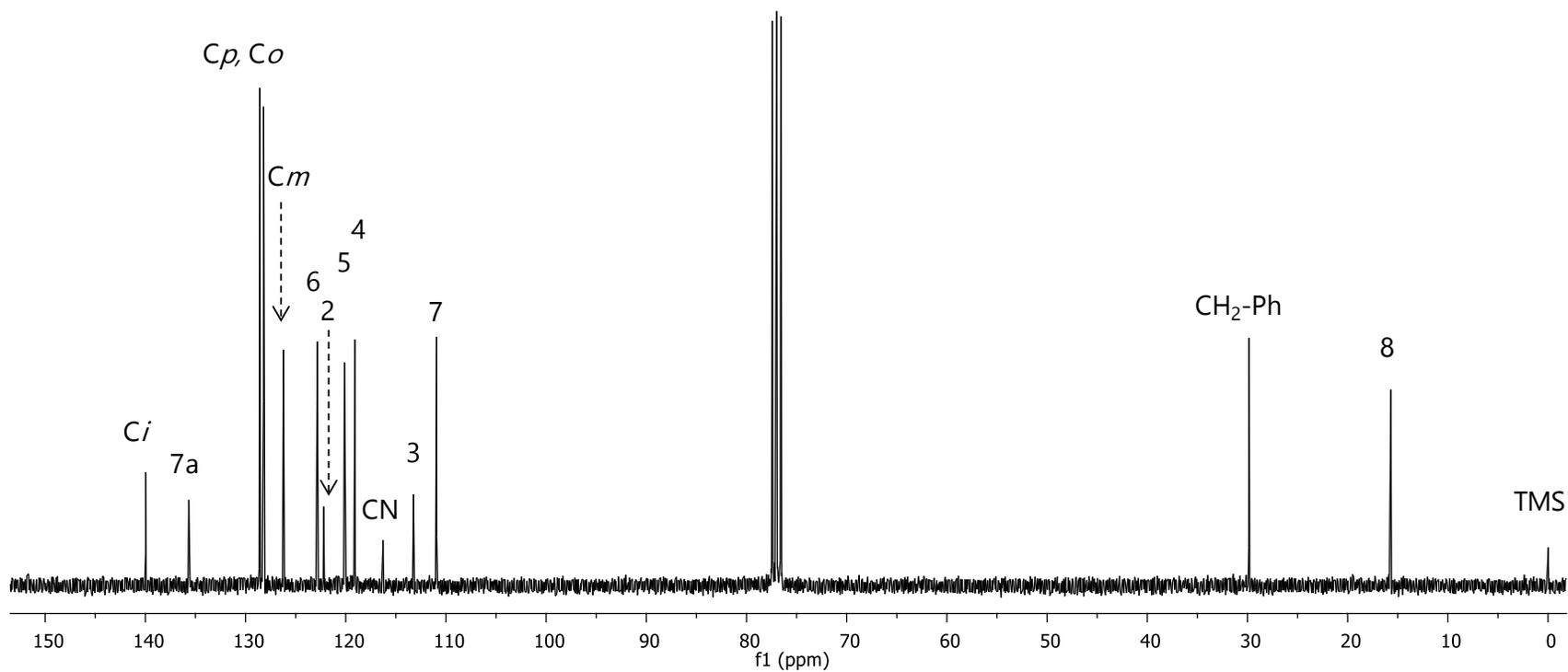
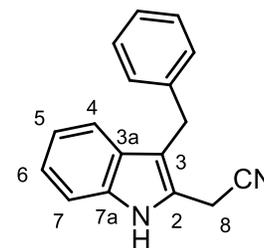


Figura 36b. Espectro de RMN de ^{13}C de **6a** (75 MHz, CDCl_3).

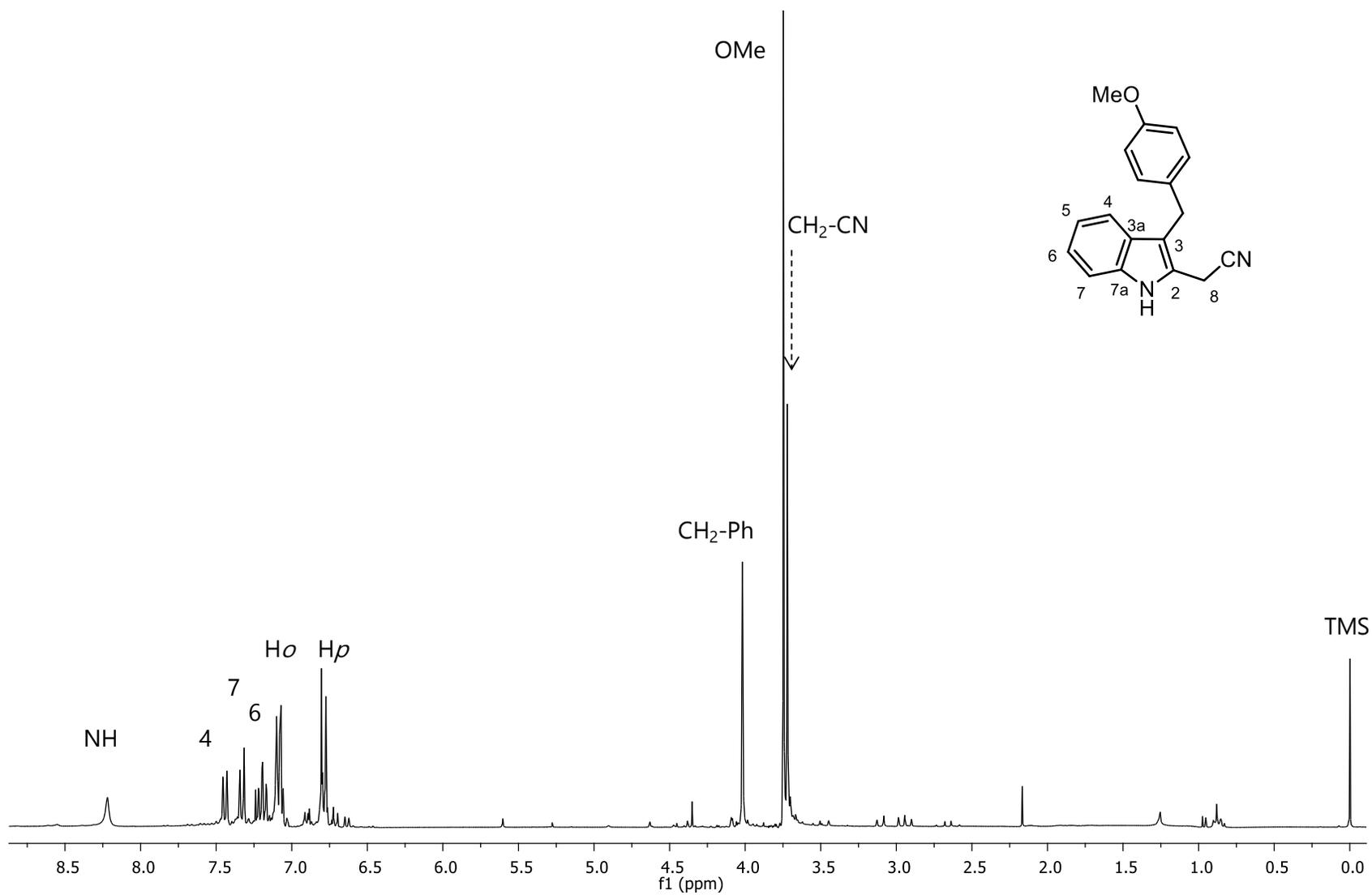


Figura 37a. Espectro de RMN de ^1H de **6b** (300 MHz, CDCl_3).

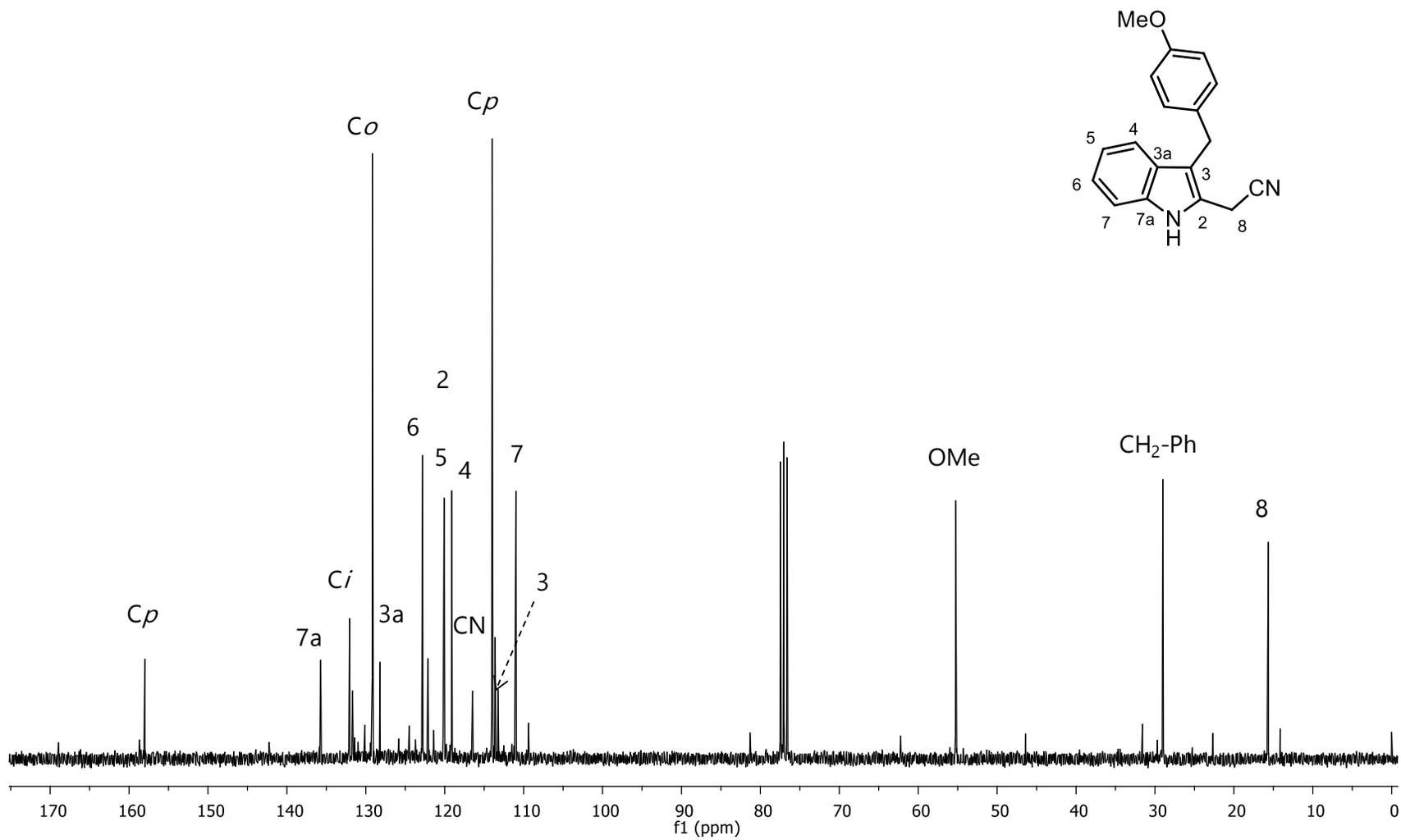


Figura 37b. Espectro de RMN de ^{13}C de **6b** (75 MHz, CDCl_3).

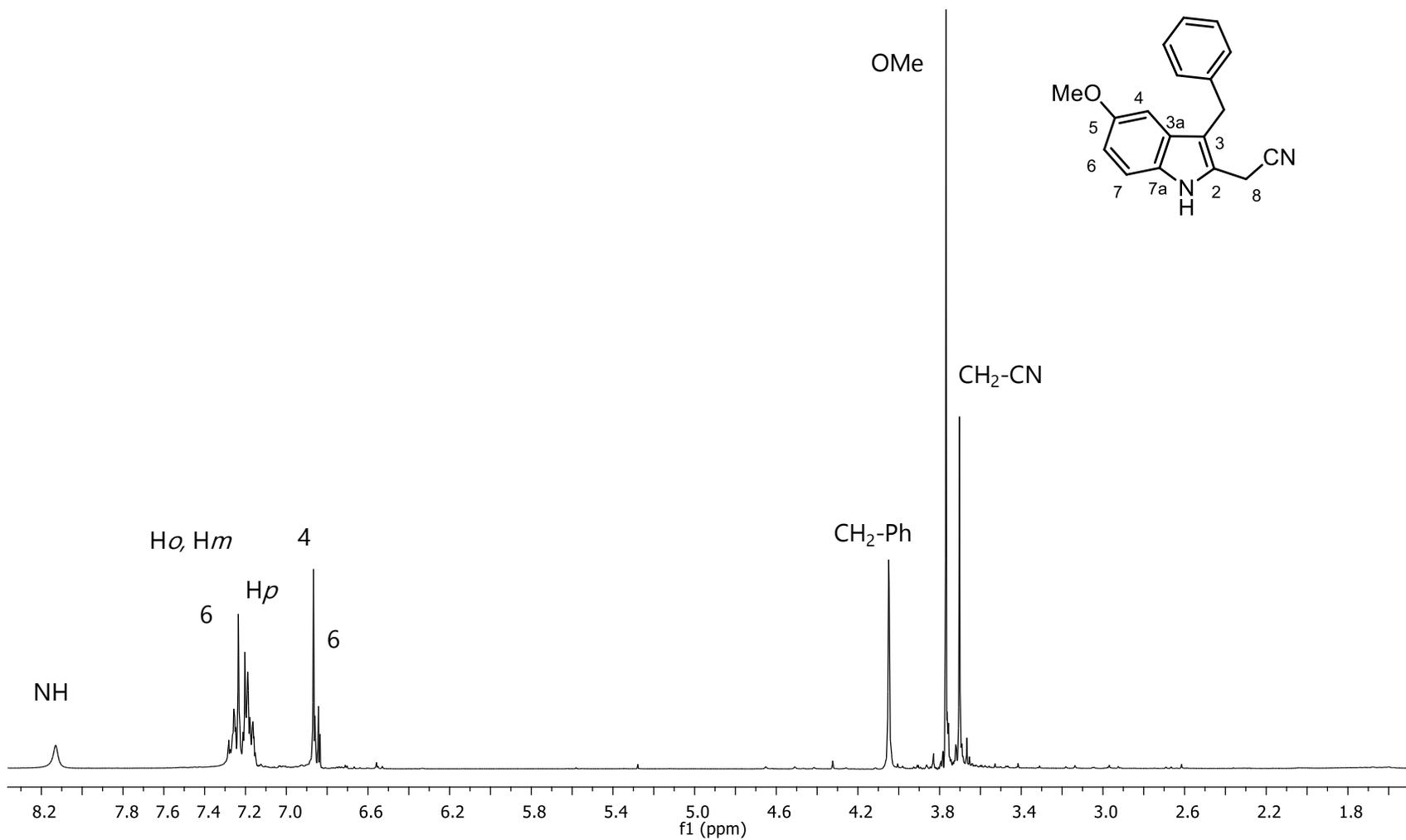


Figura 38a. Espectro de RMN de ¹H de **6c** (300 MHz, CDCl₃).

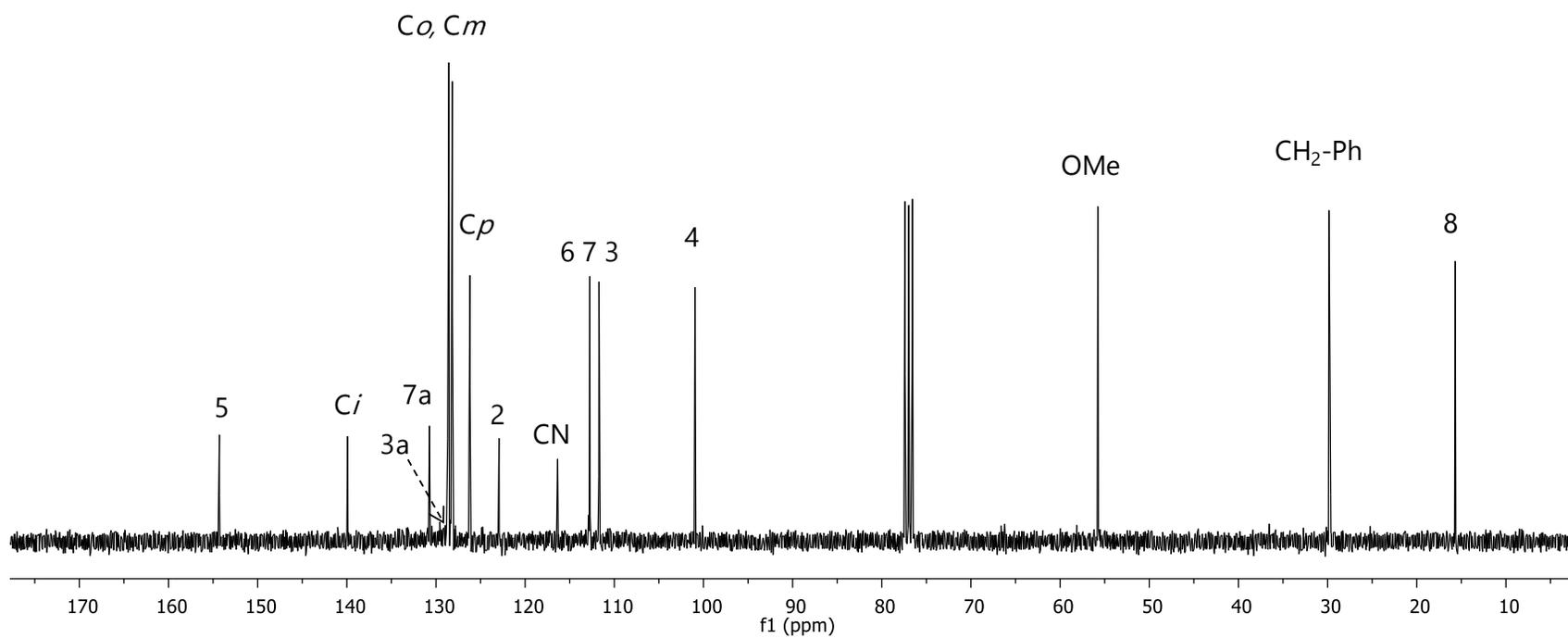
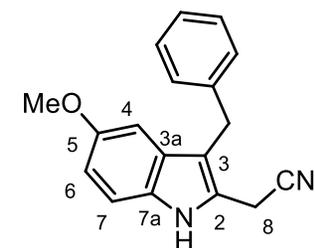


Figura 38b. Espectro de RMN de ^{13}C de **6c** (75 MHz, CDCl_3).

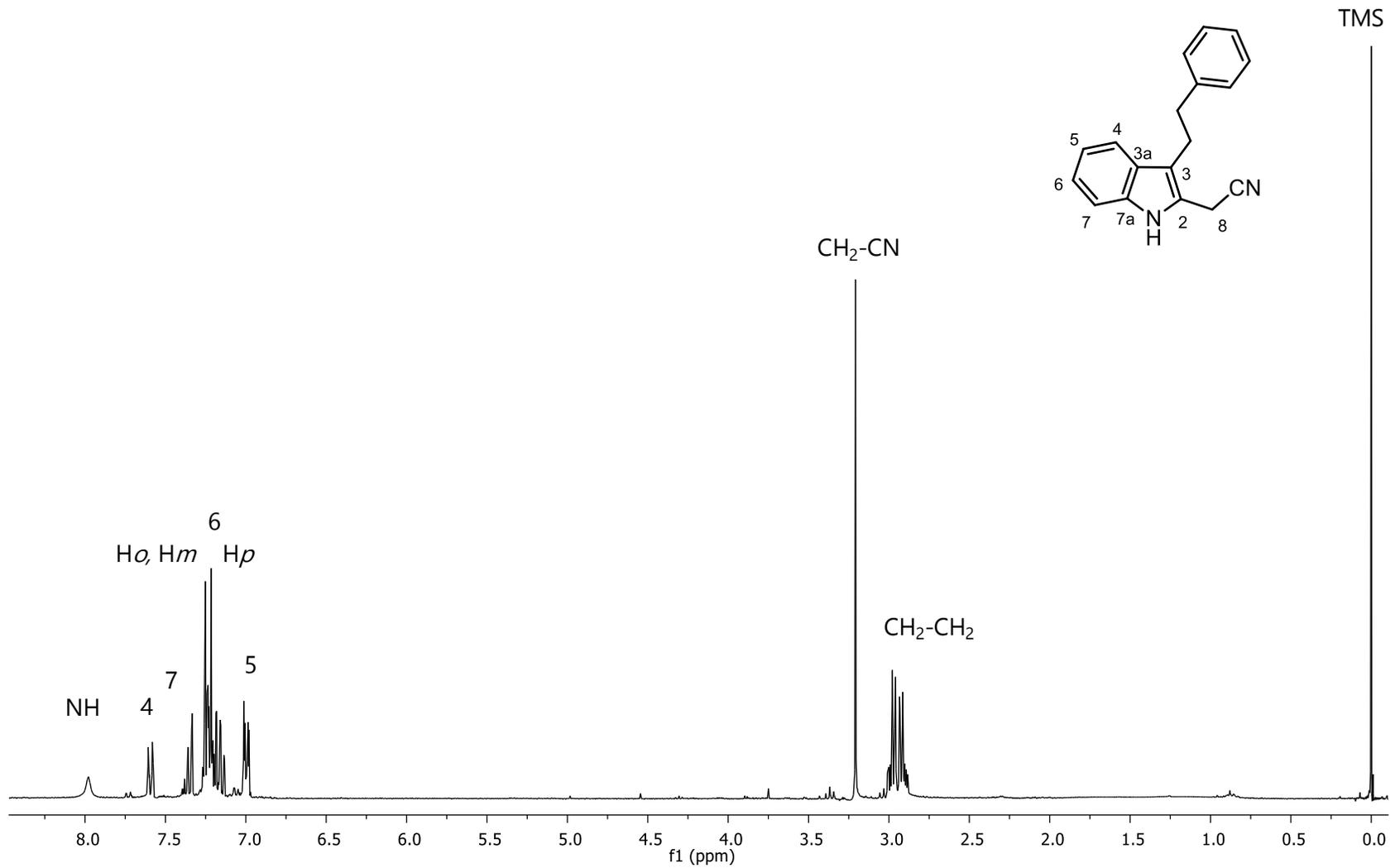


Figura 39a. Espectro de RMN de ^1H de **6d** (300 MHz, CDCl_3).

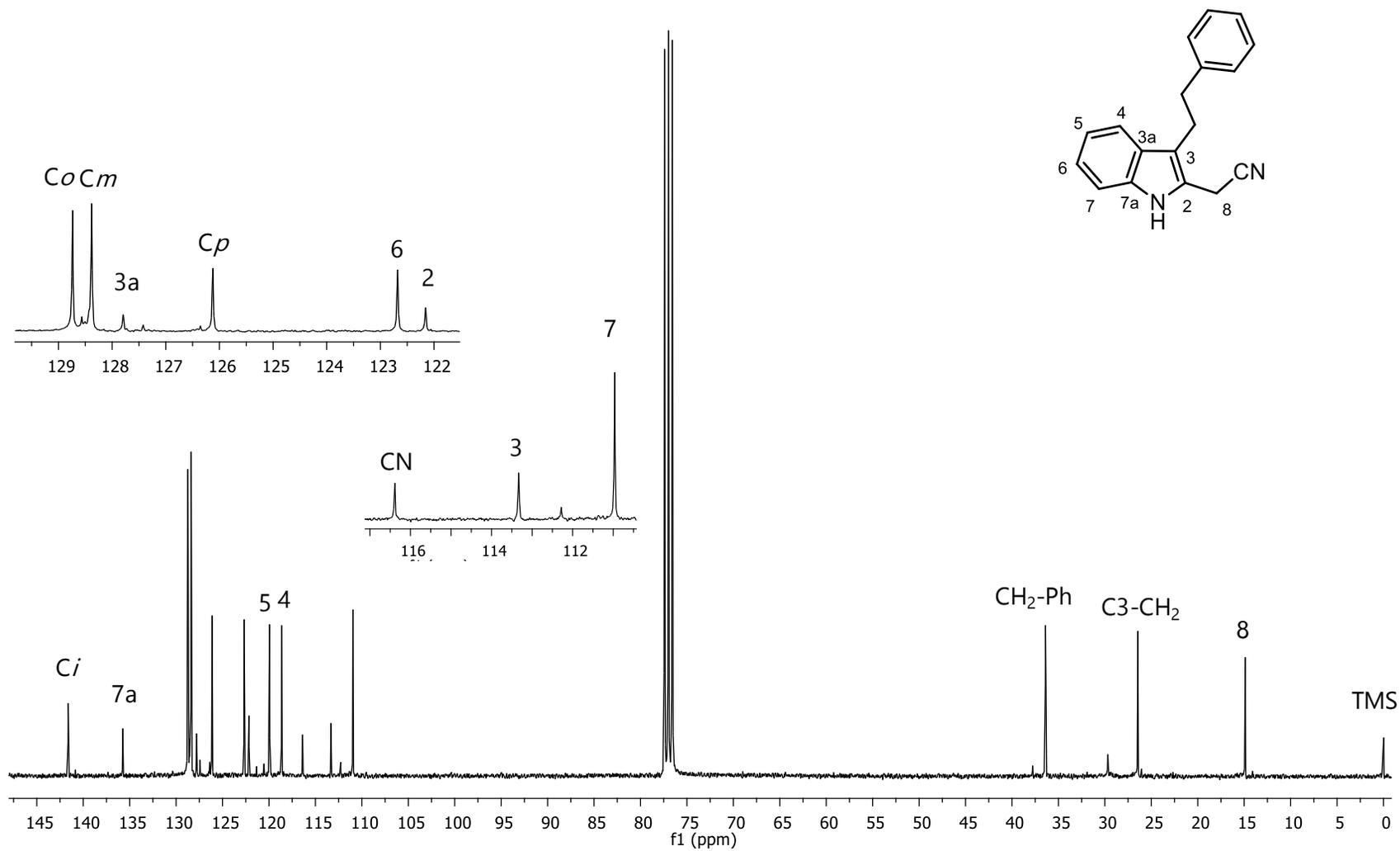
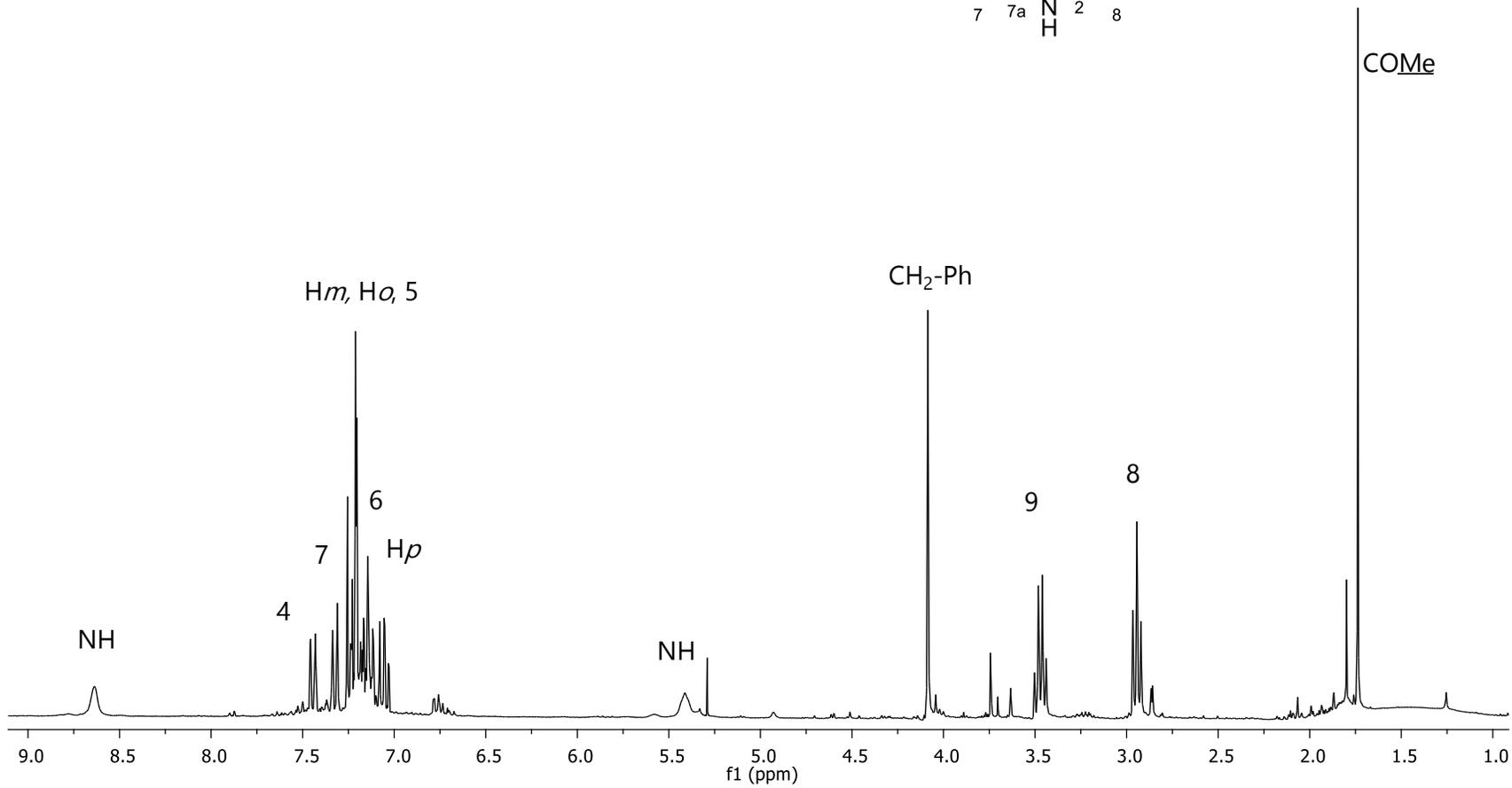
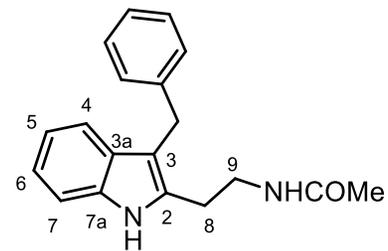


Figura 39b. Espectro de RMN de ^{13}C de **6d** (75 MHz, CDCl_3).



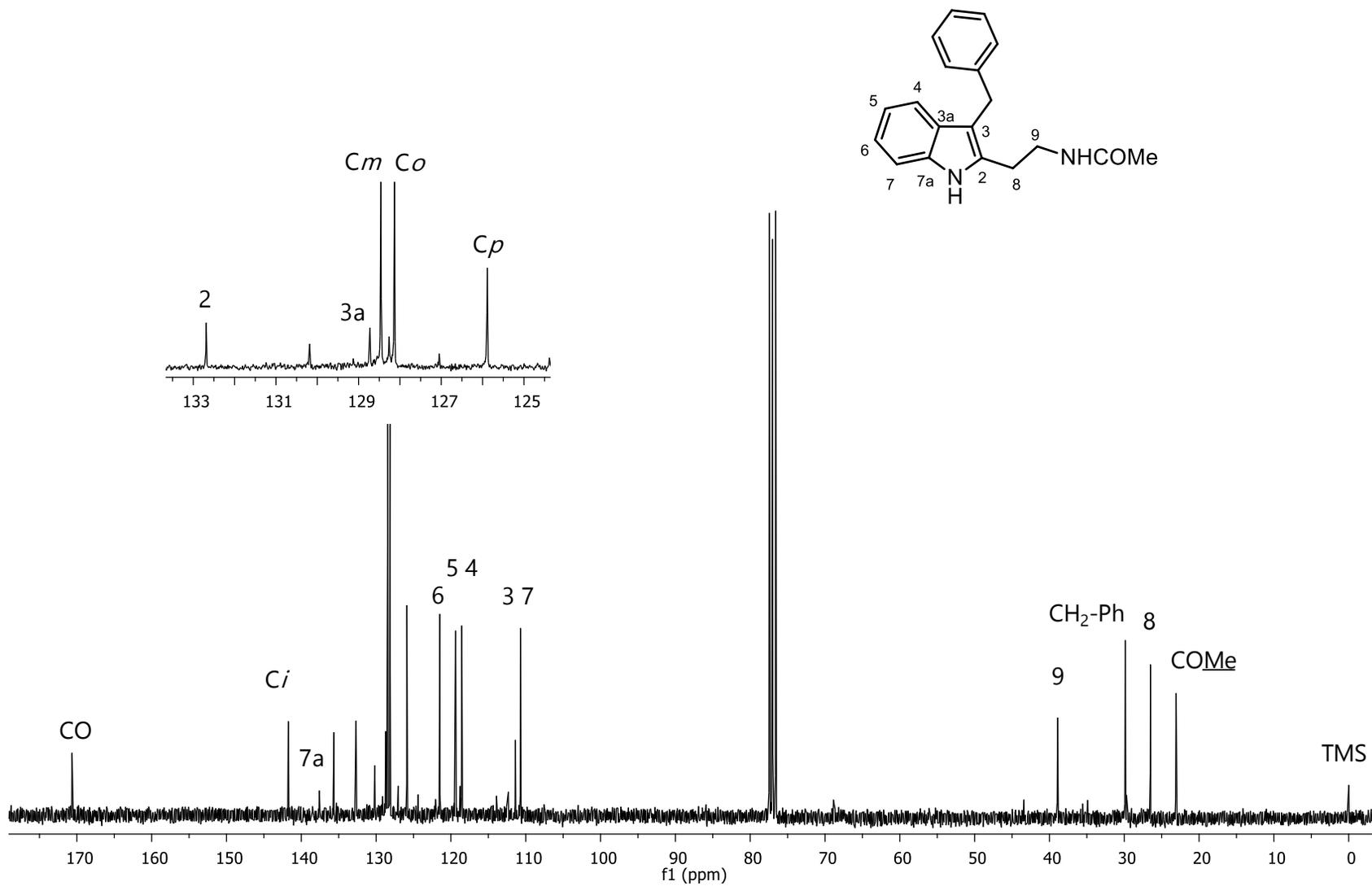


Figura 40b. Espectro de RMN de ¹³C de **1a** (75 MHz, CDCl₃).

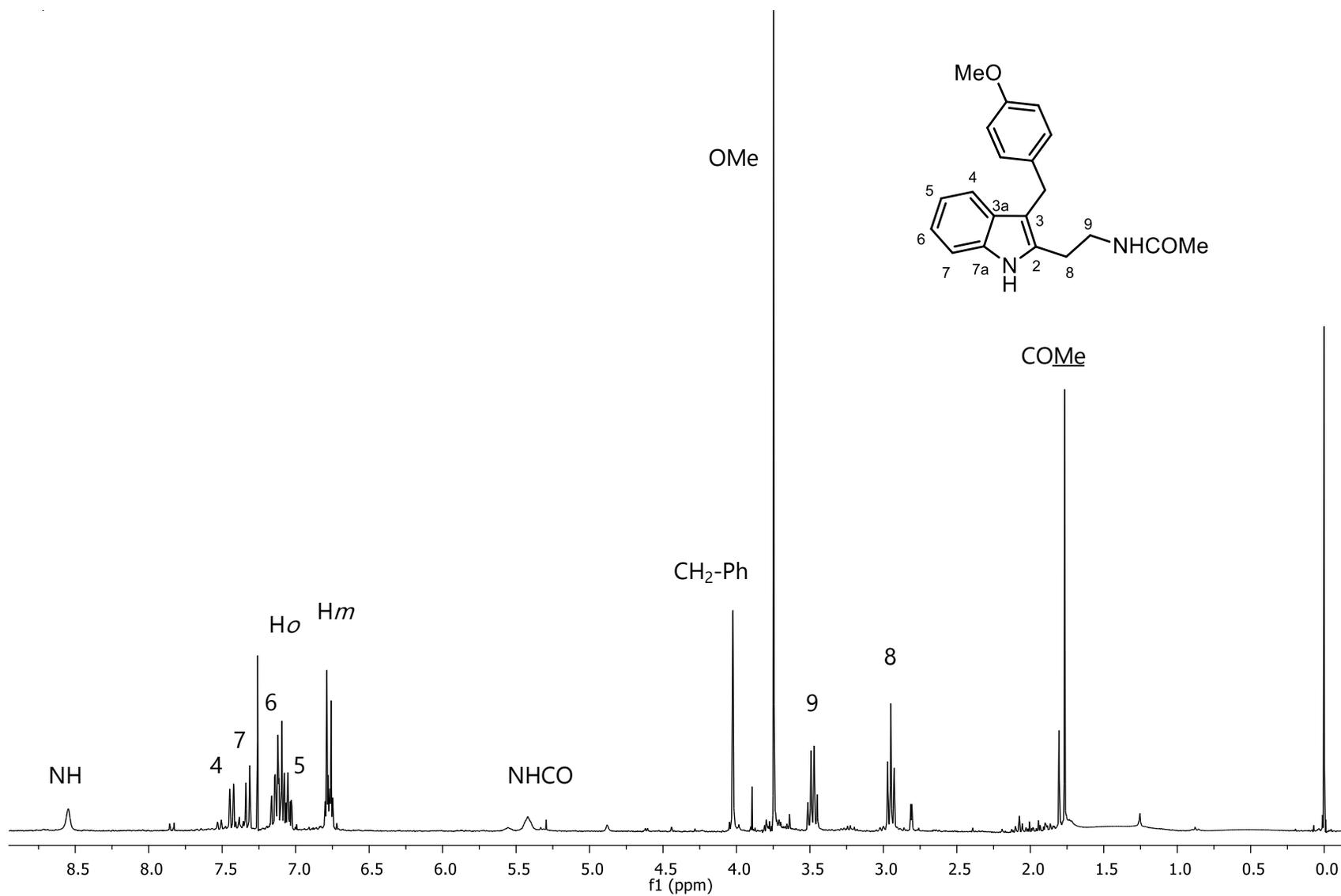


Figura 41a. Espectro de RMN de ¹H de **1b** (300 MHz, CDCl₃).

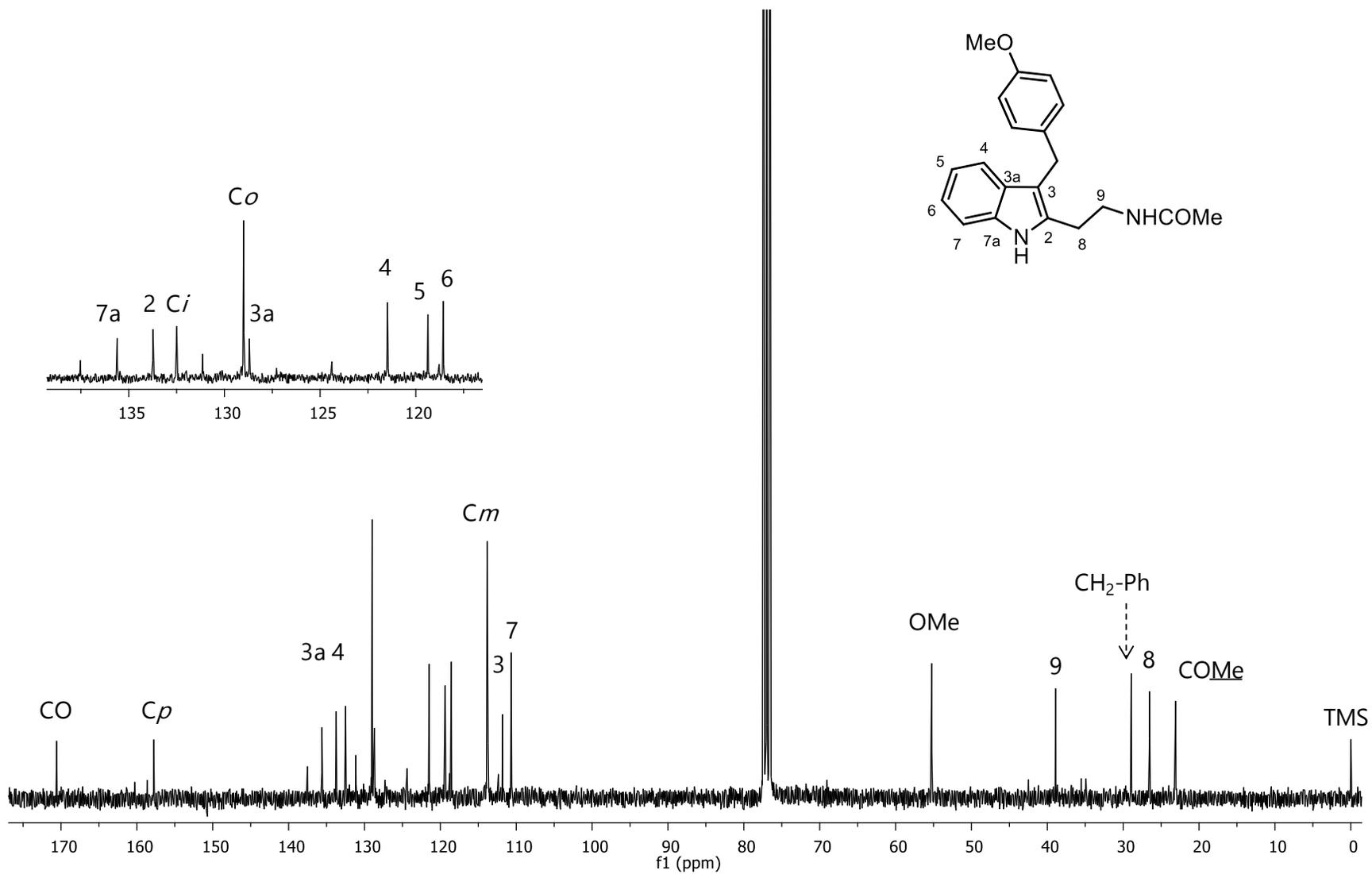


Figura 41b. Espectro de RMN de ^{13}C de **1b** (75 MHz, CDCl_3).

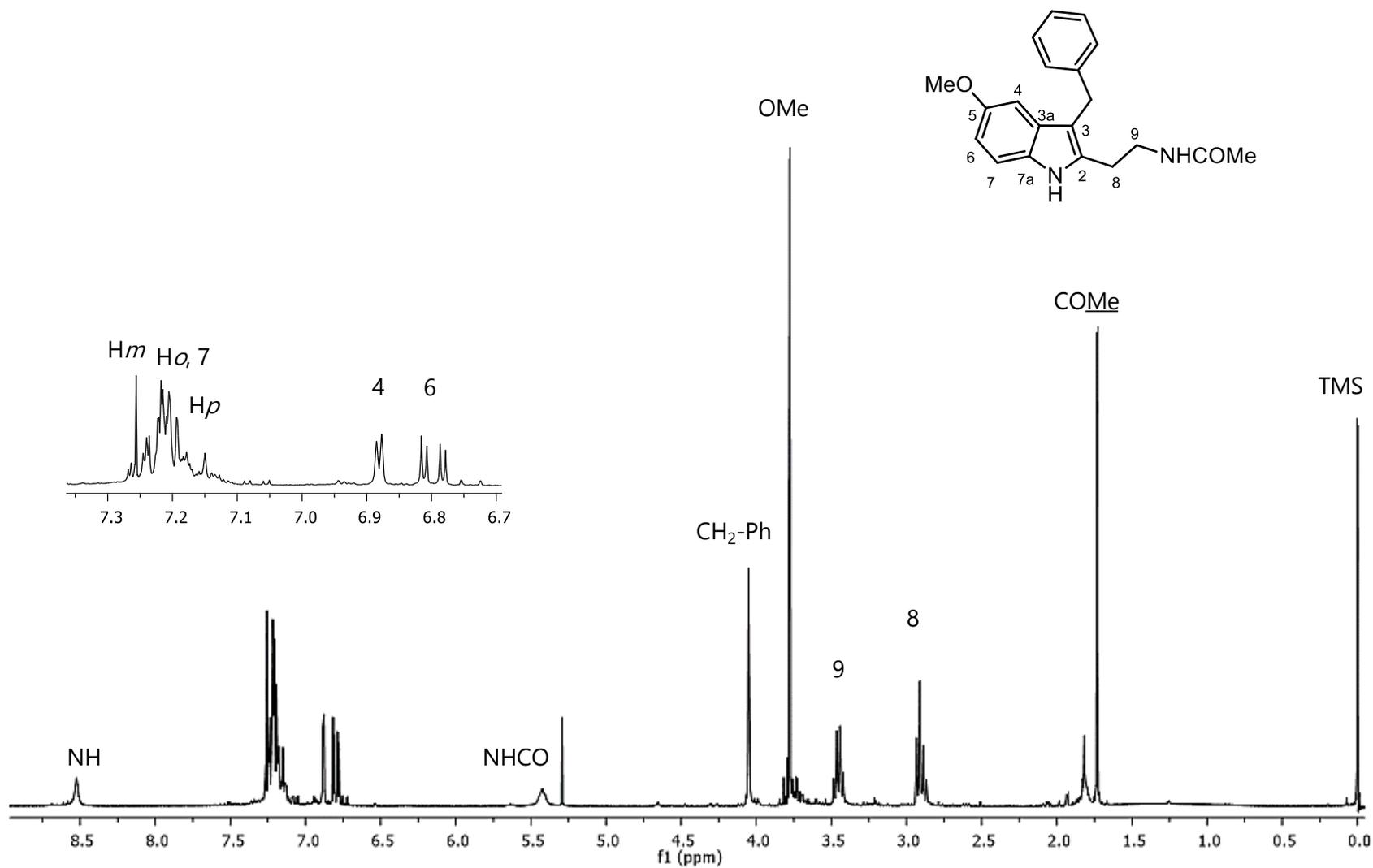


Figura 42a. Espectro de RMN de ^1H de **1c** (300 MHz, CDCl_3).

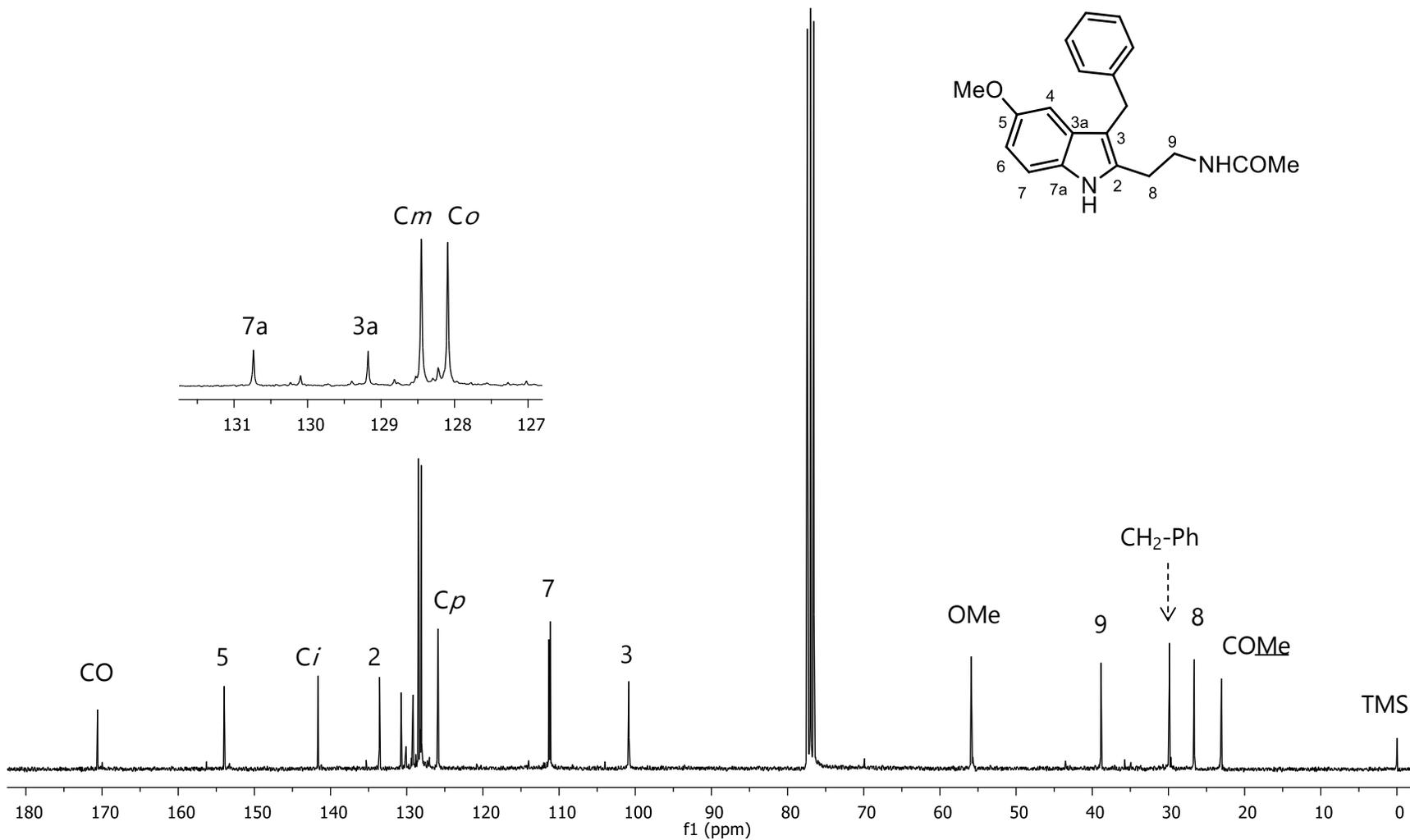


Figura 42b. Espectro de RMN de ^{13}C de **1c** (75 MHz, CDCl_3).

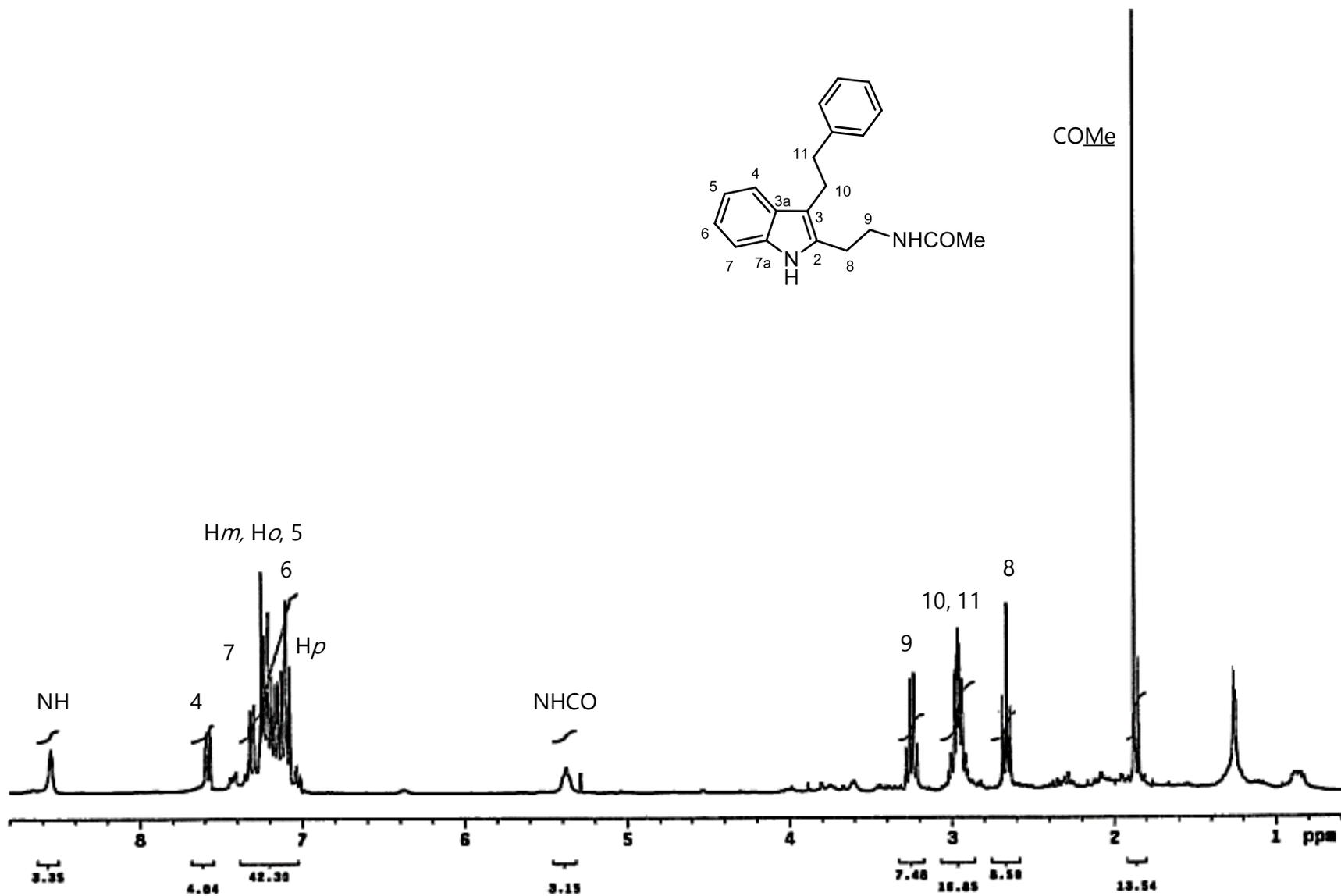


Figura 43a. Espectro de RMN de ^1H de **1d** (300 MHz, CDCl_3).

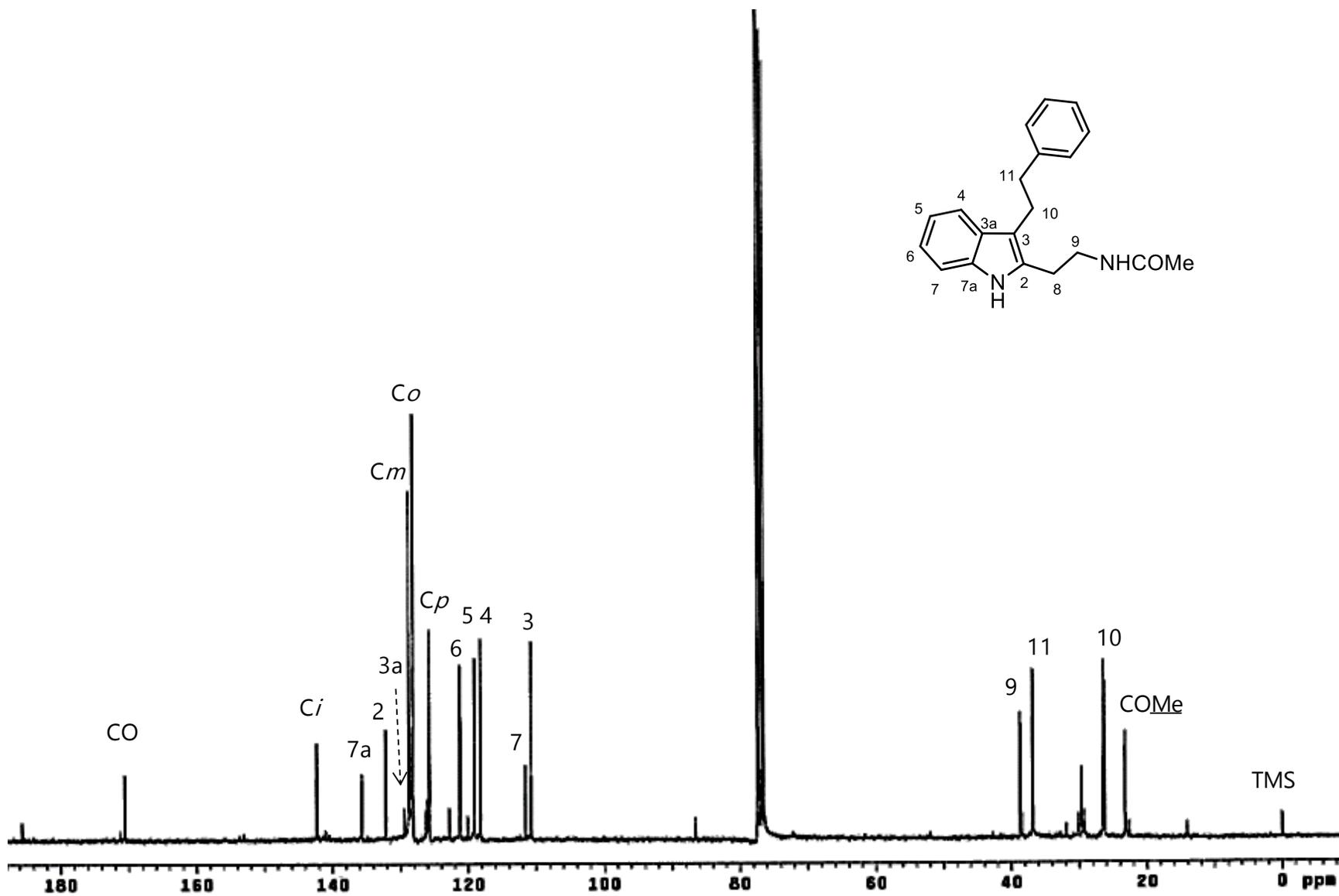


Figura 43b. Espectro de RMN de ^{13}C de **1c** (75 MHz, CDCl_3).

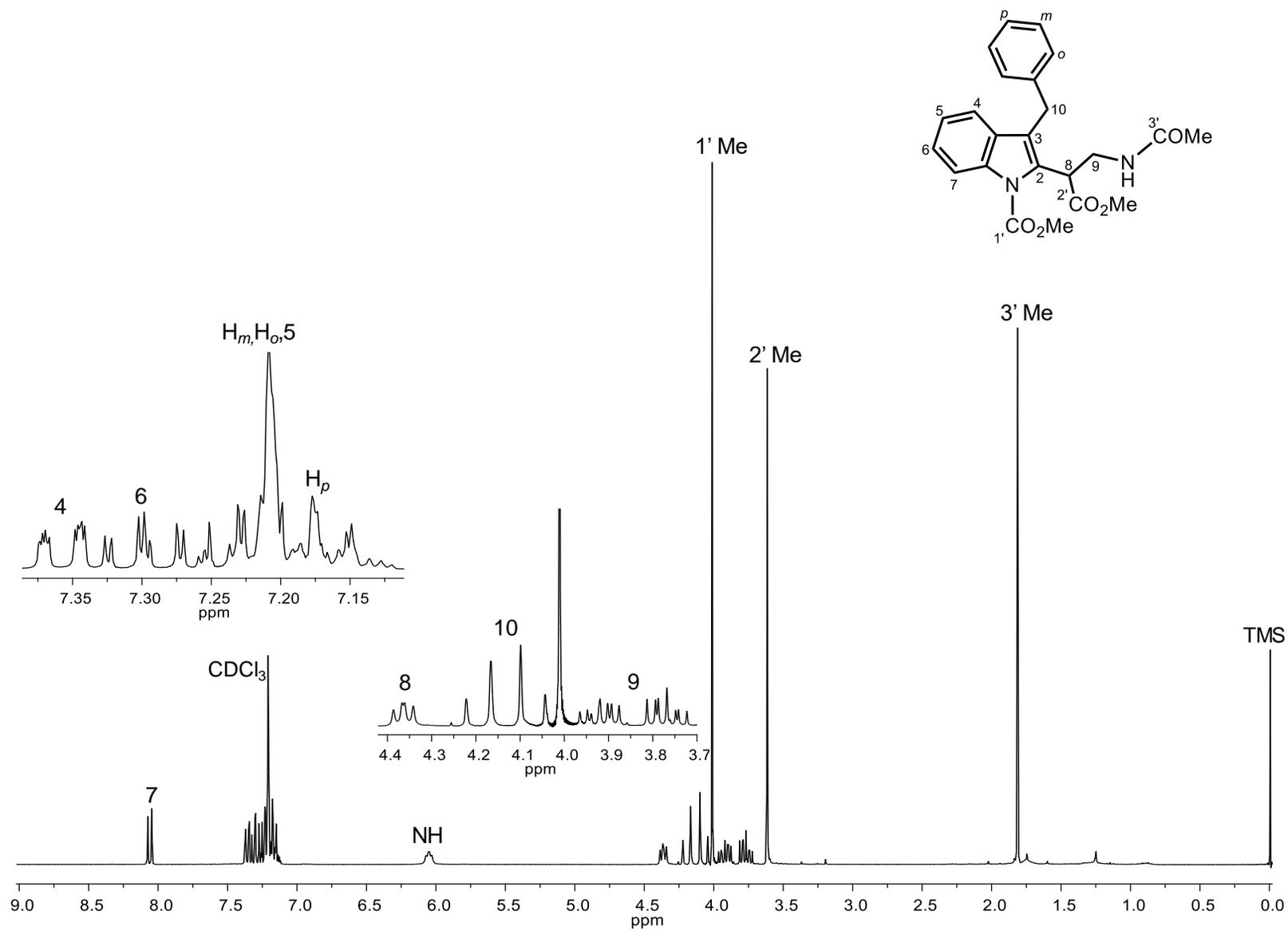


Figura 44a. Espectro de RMN de 1H de **9a** (300 MHz, CDCl_3).

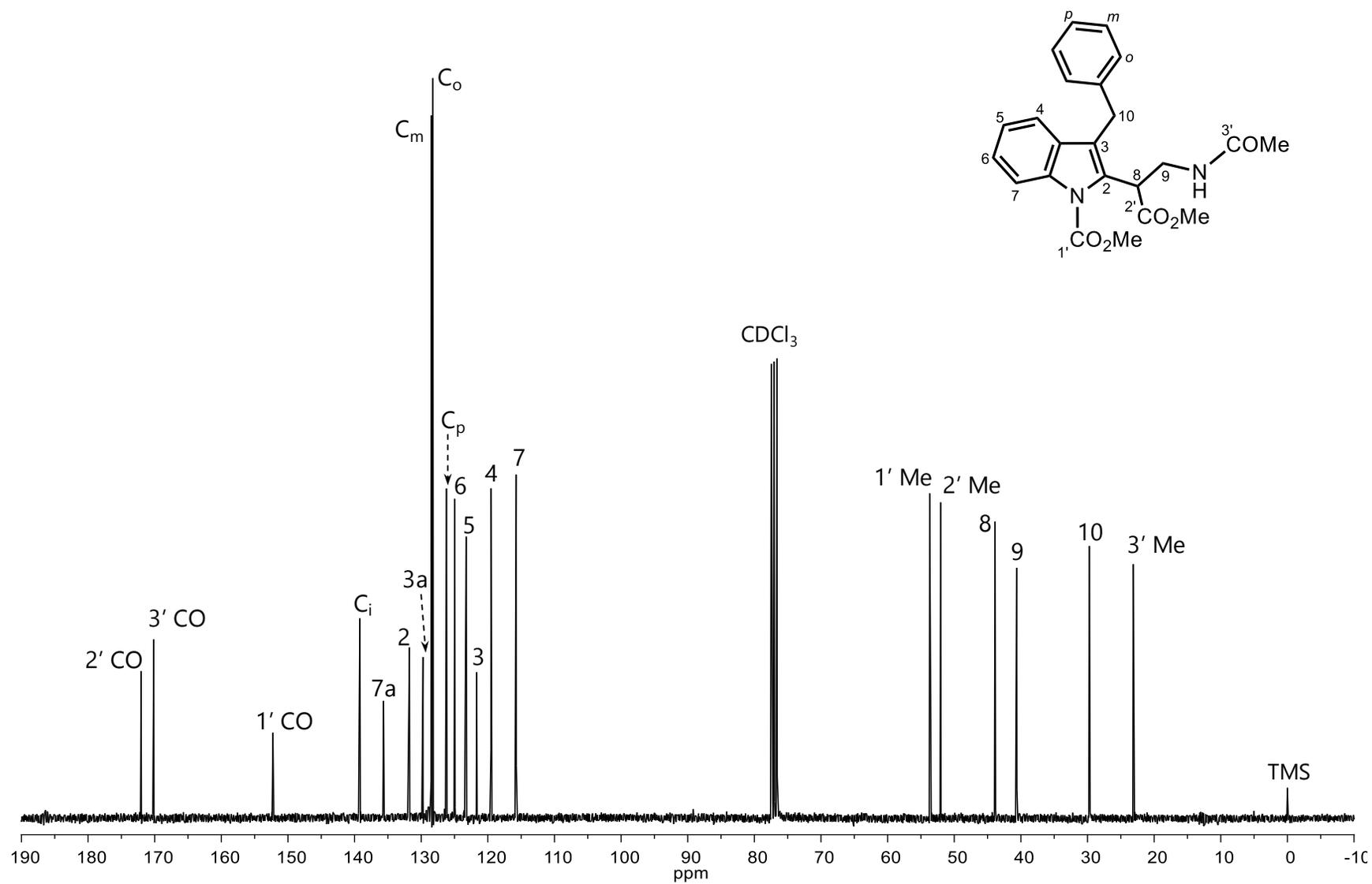


Figura 44b. Espectro de RMN de ^{13}C de **9a** (75 MHz, CDCl_3).

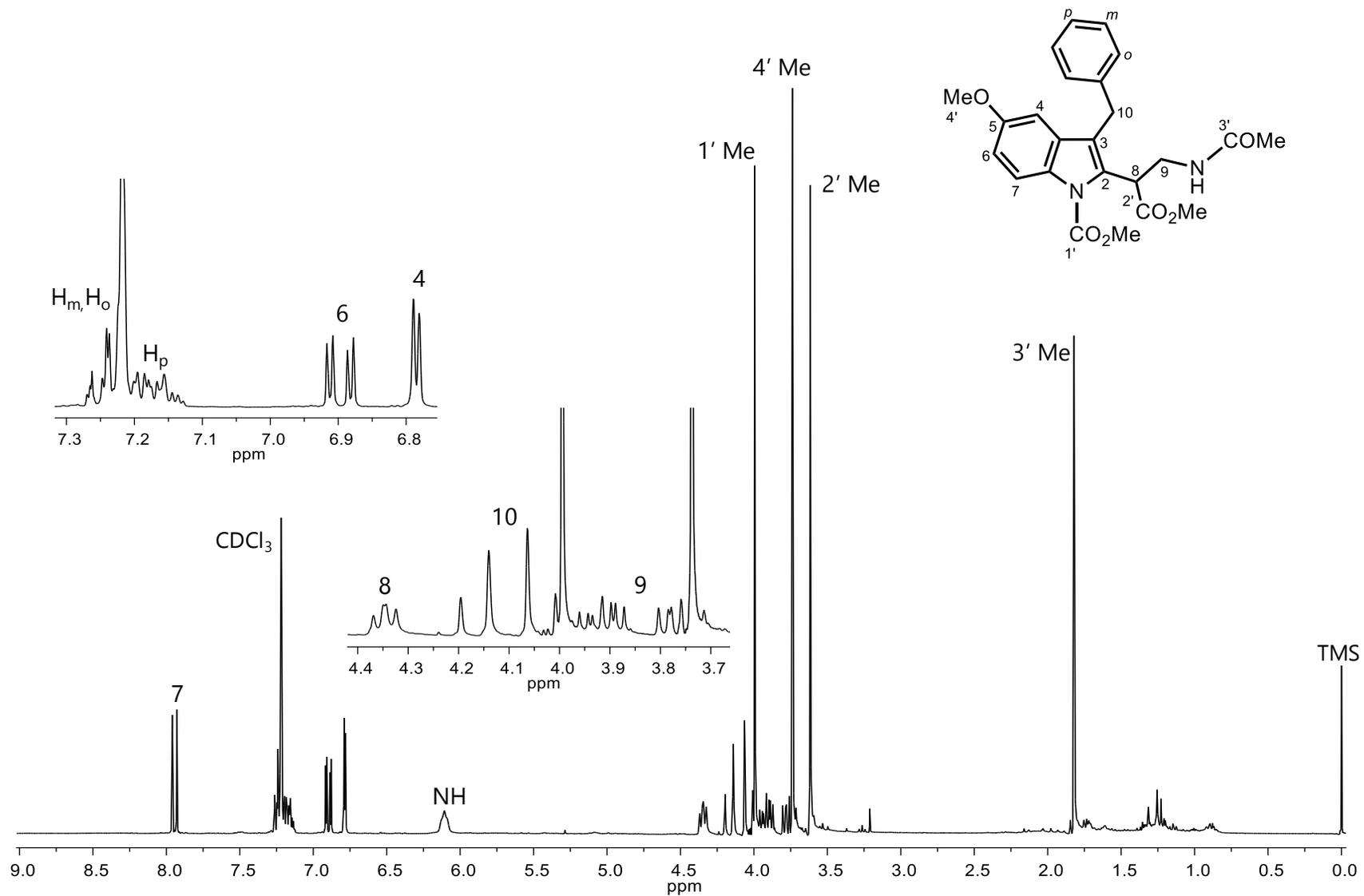


Figura 45a. Espectro de RMN de ^1H de **9c** (300 MHz, CDCl_3).

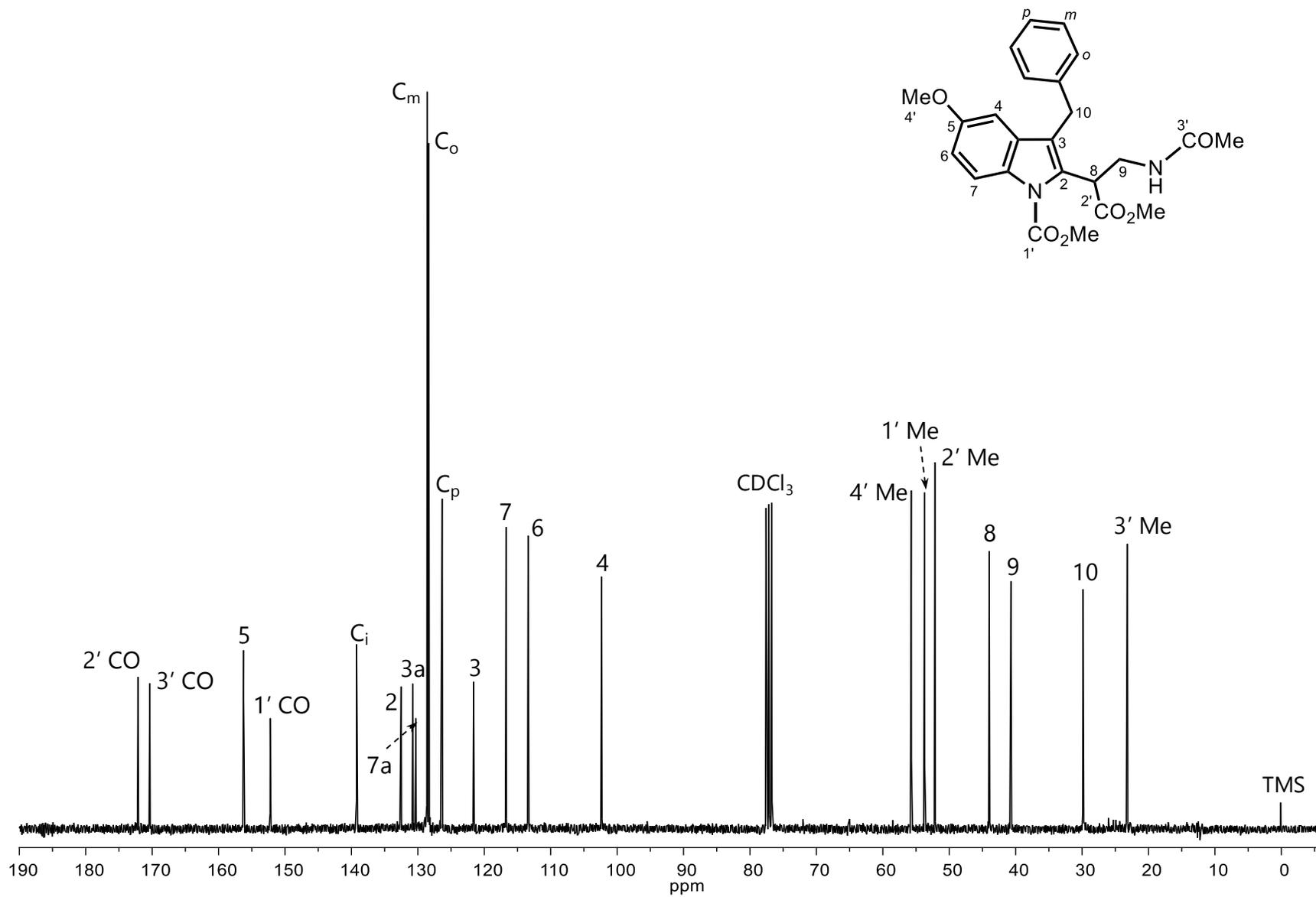


Figura 45b. Espectro de RMN de ^{13}C de **9c** (75 MHz, CDCl_3).

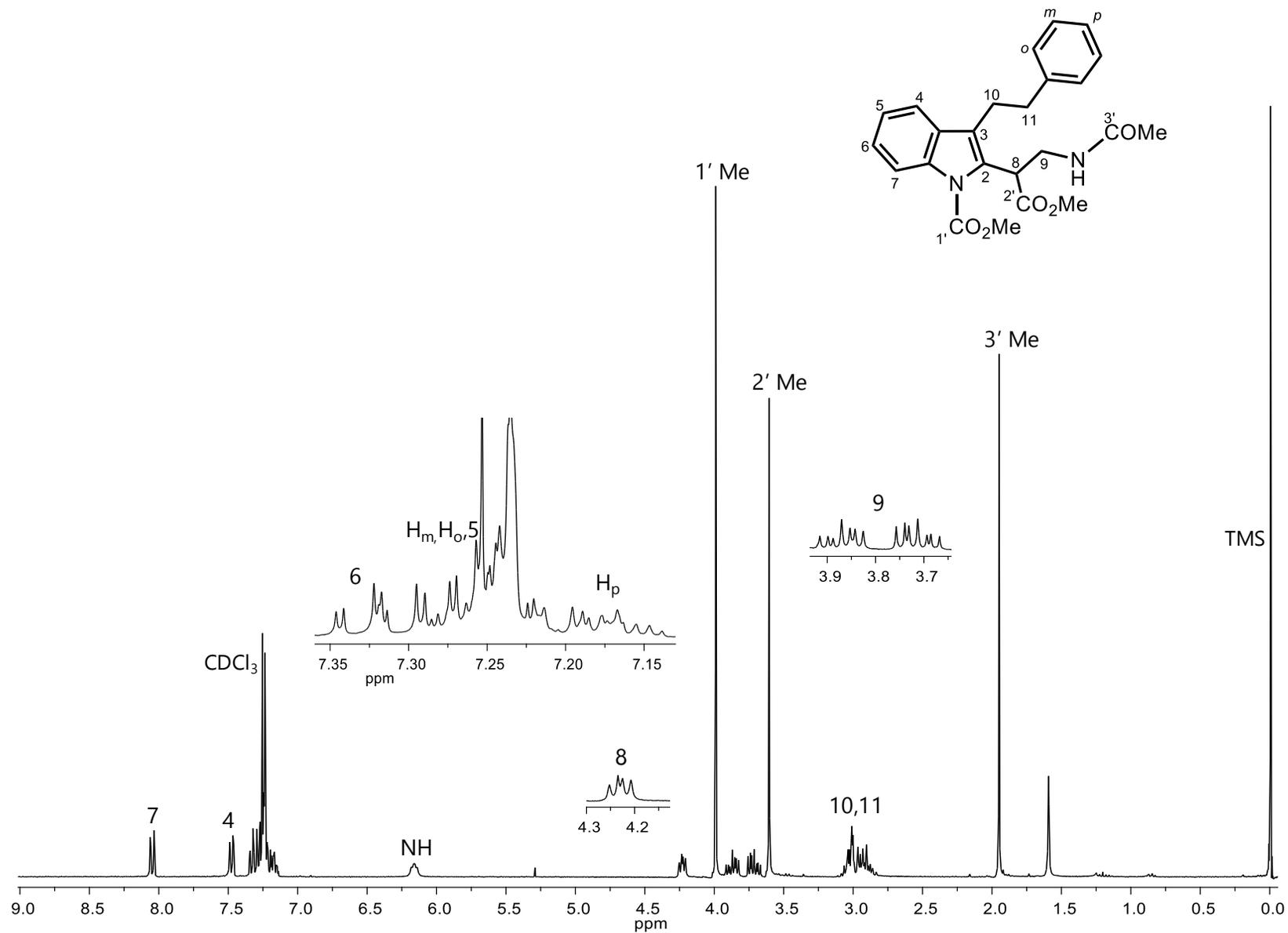


Figura 46a. Espectro de RMN de ^1H de **9d** (300 MHz, CDCl_3).

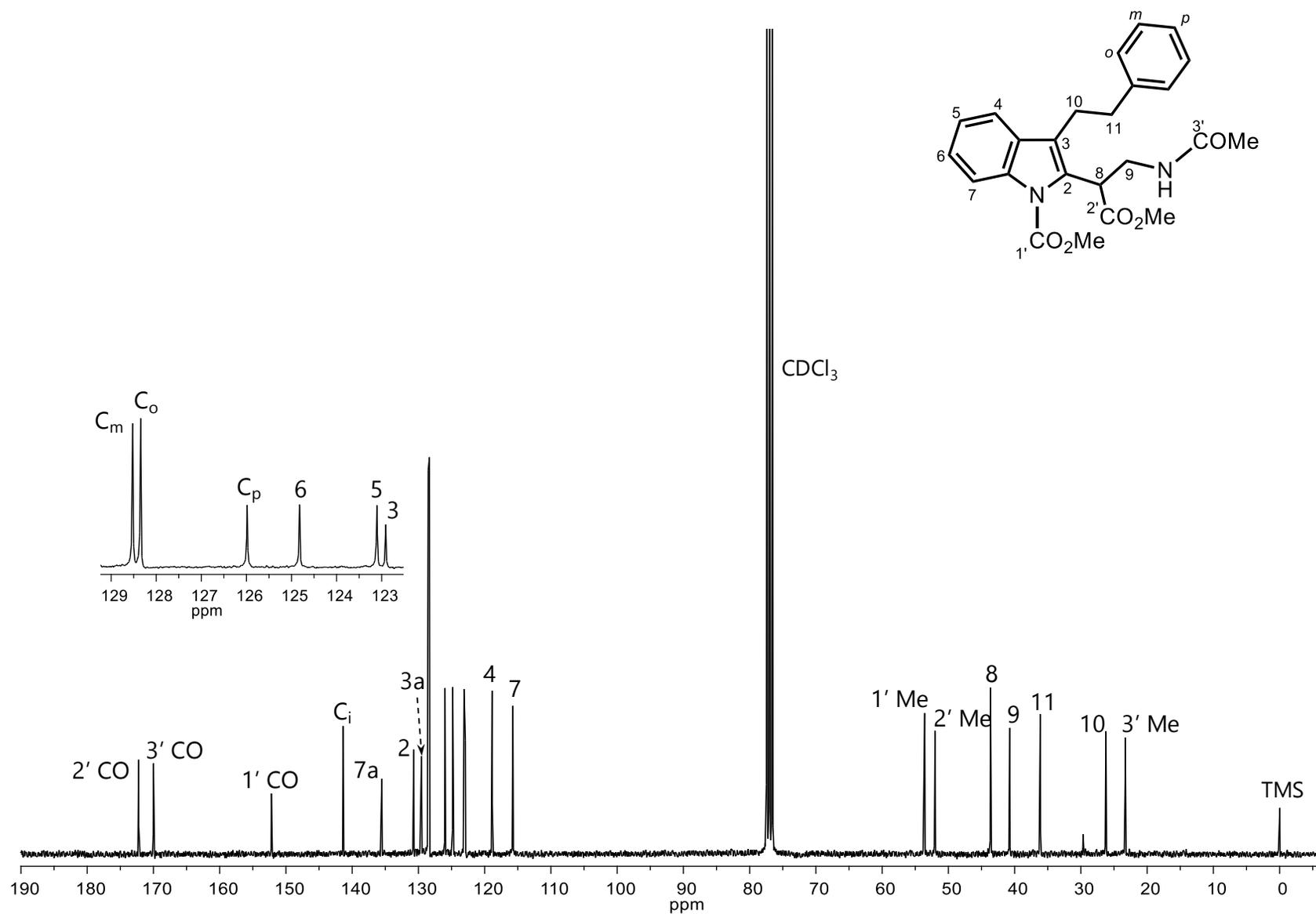


Figura 46b. Espectro de RMN de ^{13}C de **9d** (75 MHz, CDCl_3).

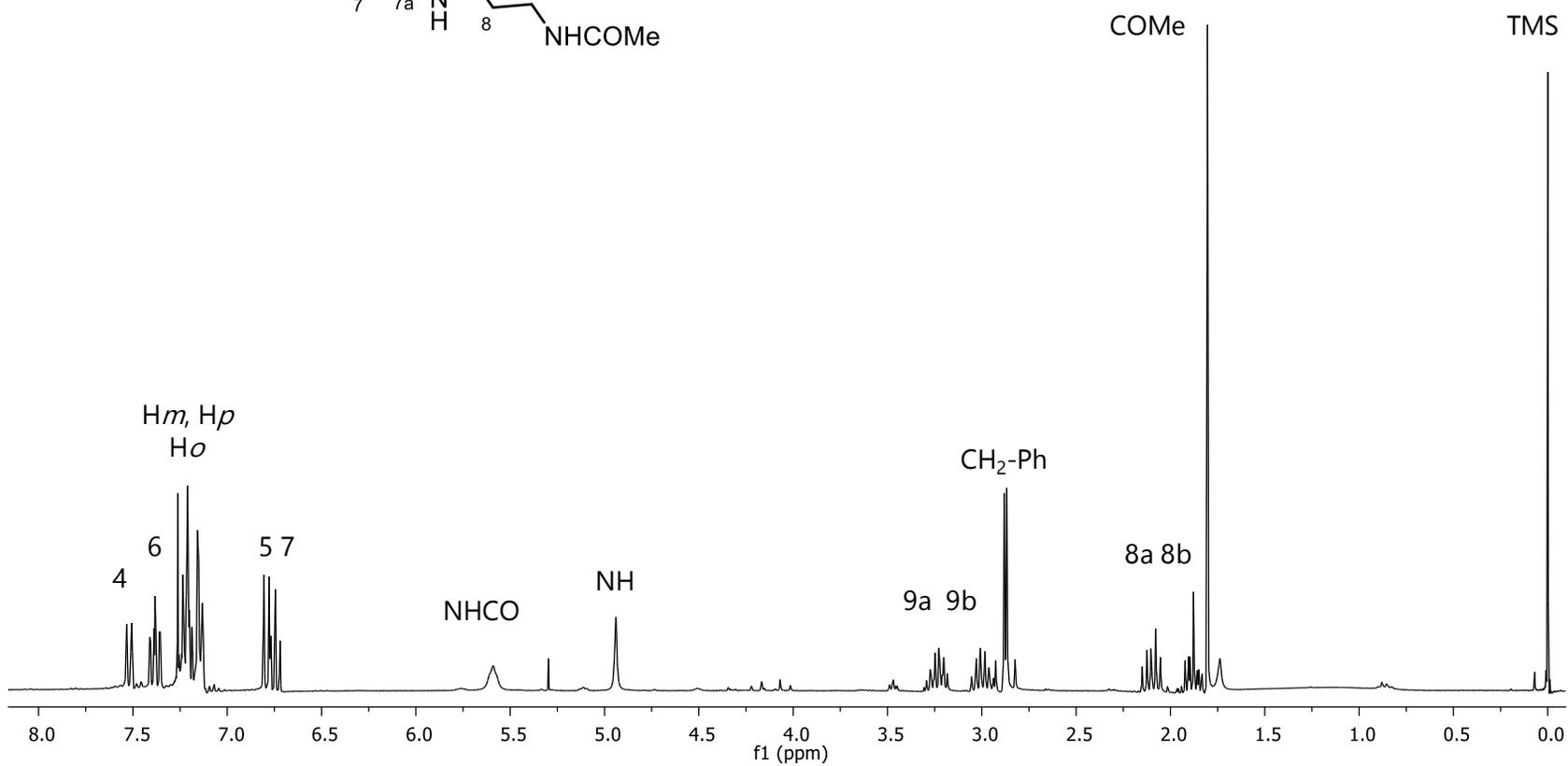
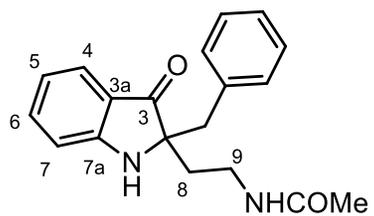


Figura 47a. Espectro de RMN de ^1H de **7a** (300 MHz, CDCl_3).

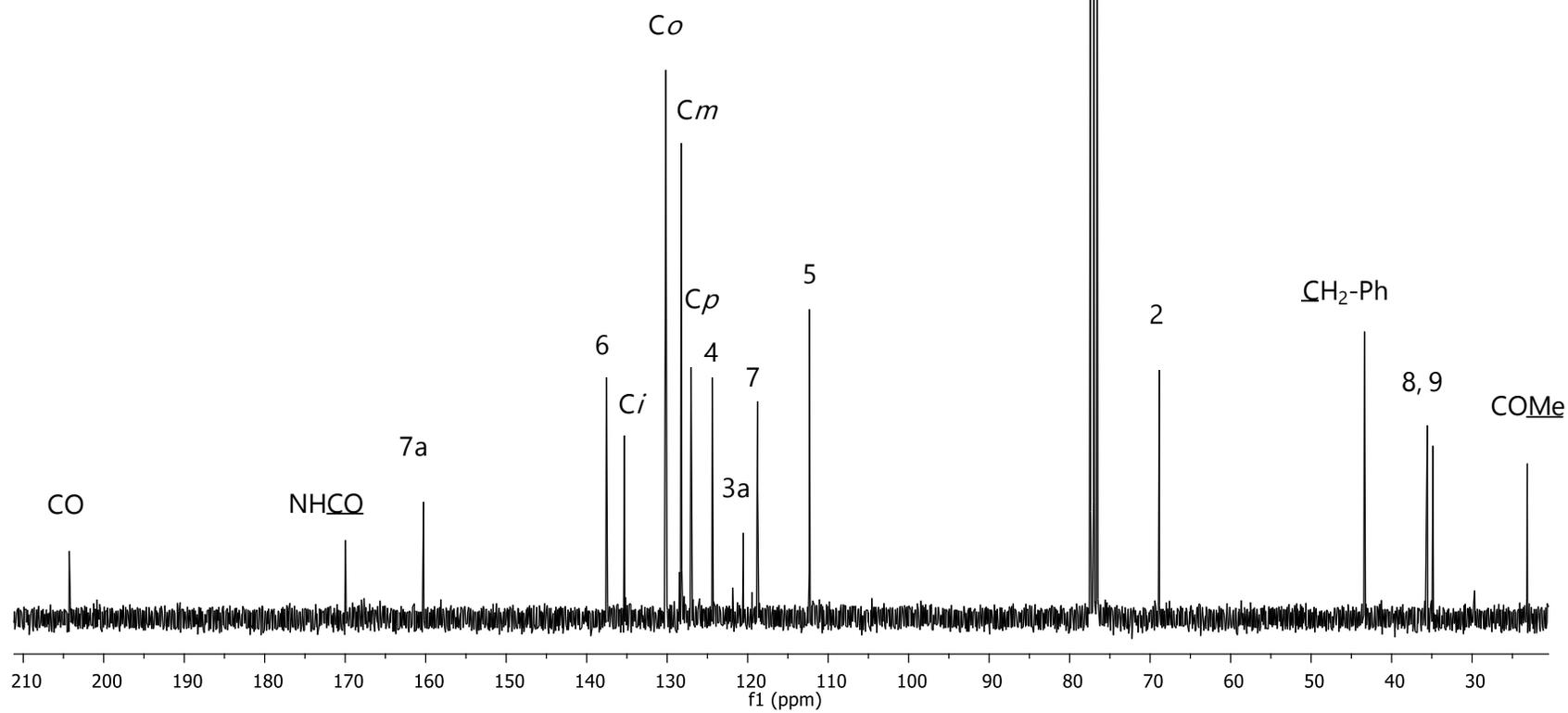
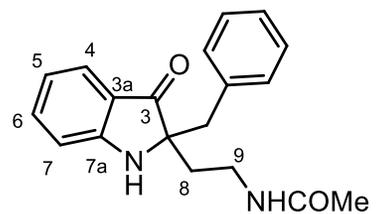


Figura 47b. Espectro de RMN de ^{13}C de **7a** (75 MHz, CDCl_3).

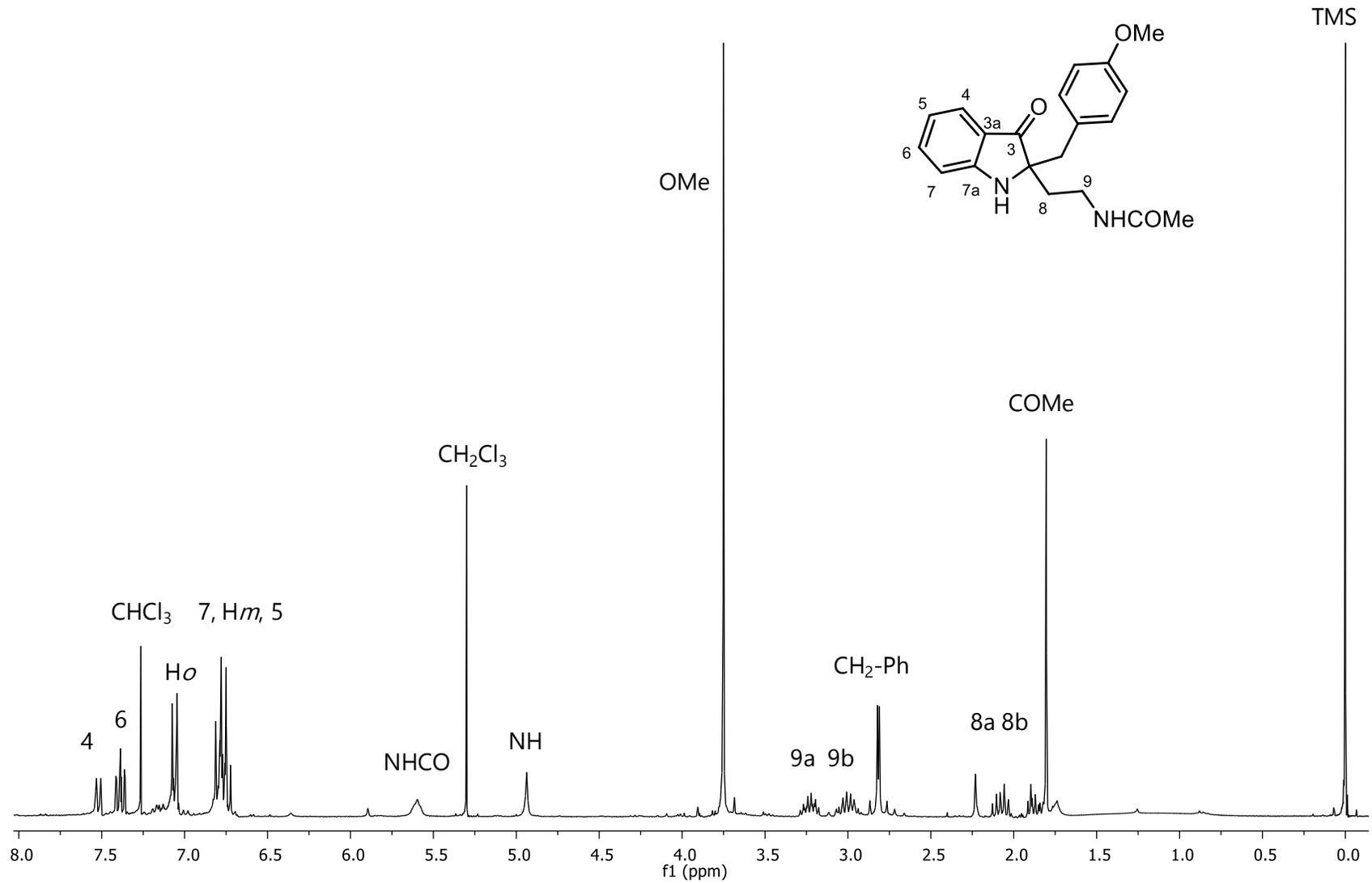


Figura 48a. Espectro de RMN de ^1H de **7b** (300 MHz, CDCl_3).

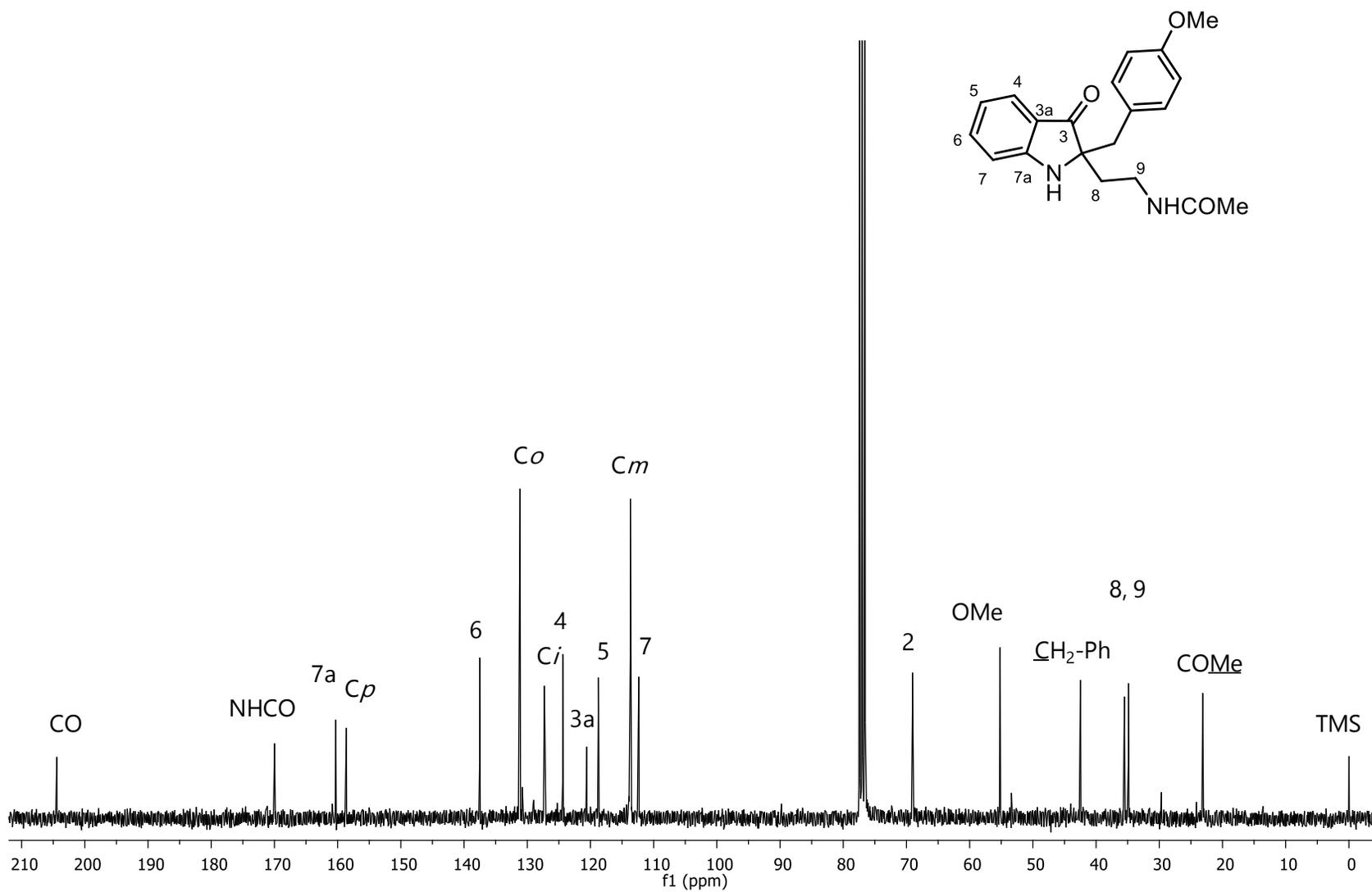


Figura 48b. Espectro de RMN de ^{13}C de **7b** (75 MHz, CDCl_3).

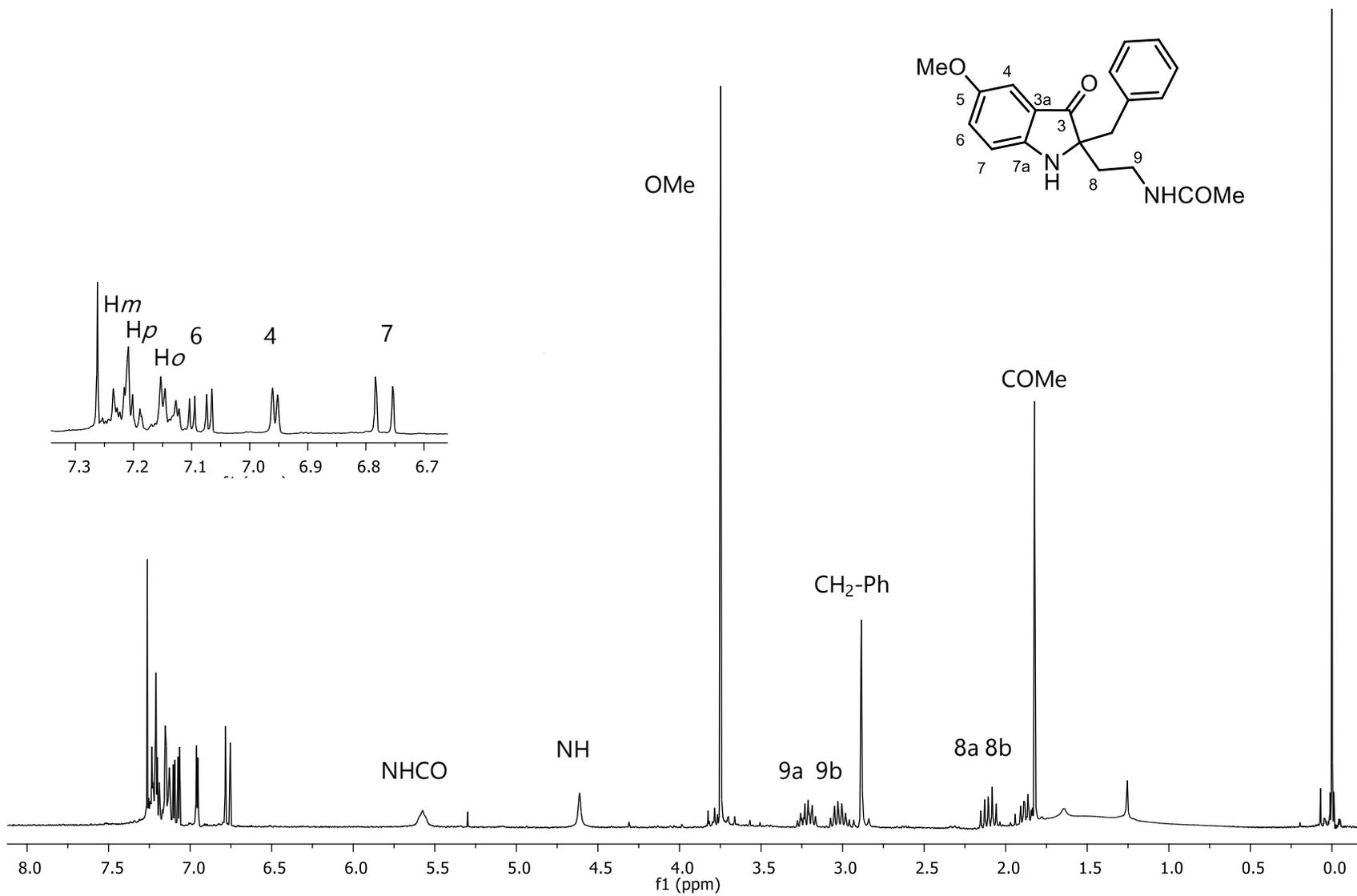


Figura 49a. Espectro de RMN de ^1H de **7c** (300 MHz, CDCl_3).

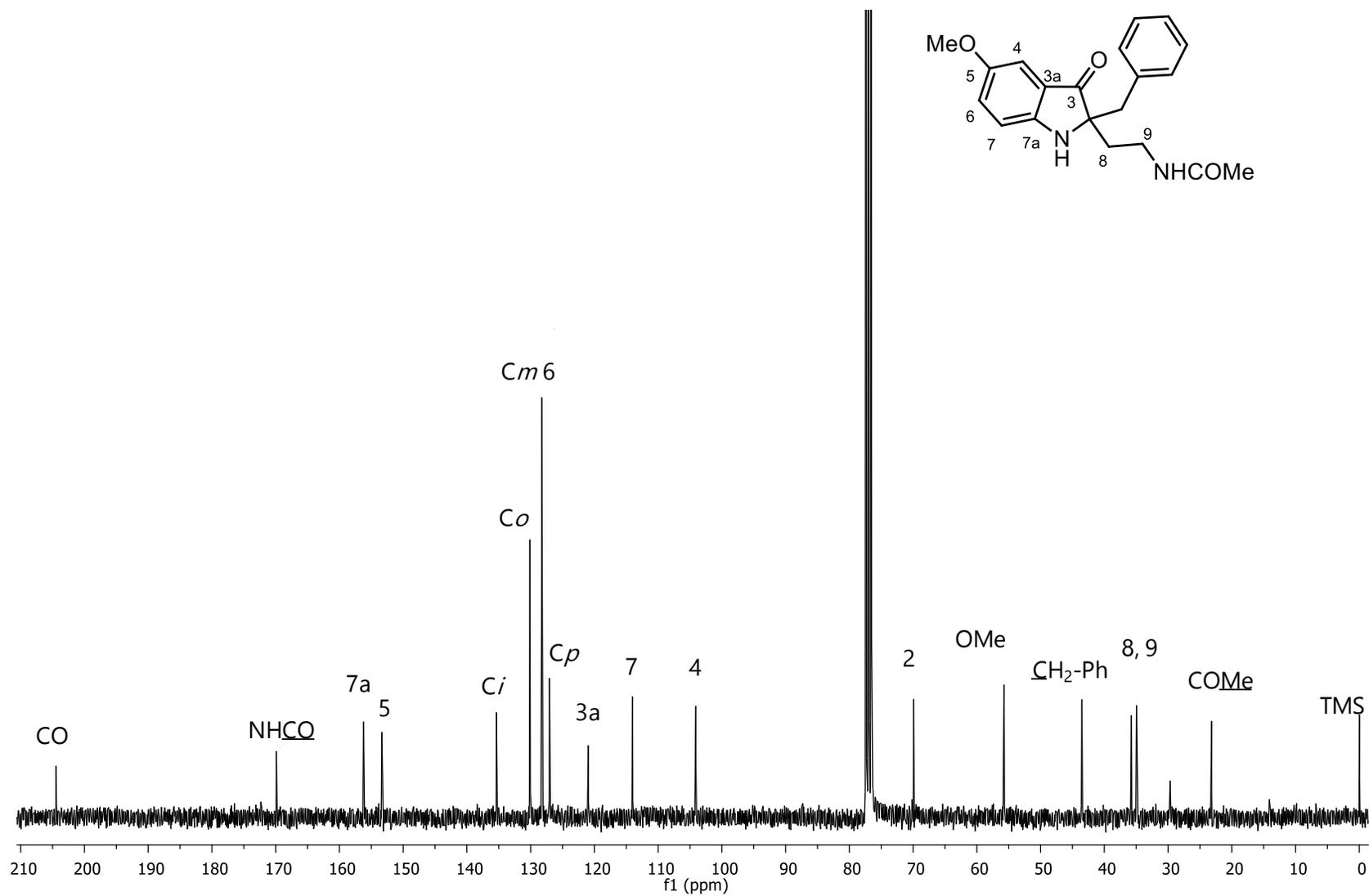


Figura 49b. Espectro de RMN de ^{13}C de **7c** (75 MHz, CDCl_3).

8.3 Predicción de la energía del complejo proteína – ligando (*8R*)-**9a** frente a los receptores MT1 y MT2

A continuación, se muestra la energía de unión, los residuos de aminoácidos y el modo de unión del enantiómero *R* de **9a** frente a los receptores de melatonina MT1 y MT2.

	MT1		MT2	
	$\Delta G_{\text{unión}}$	Residuos de aa	$\Delta G_{\text{unión}}$	Residuos de aa
(8<i>R</i>)-9a	-9.71	Val 111, Ile 112, Ala 158, Leu 168, Thr 178, Phe 179, Gln 181, Tyr 187, Val 191, Val 192, Phe 196, Leu 254, Tyr 281	-8.46	Met 120, Gly 121, Val 124, Asn 175, Tyr 200, Thr 201, Val 204, Val 205, Phe 209, Trp 264, Leu 267, Asn 268, Gly 271, Leu 272, Tyr 294

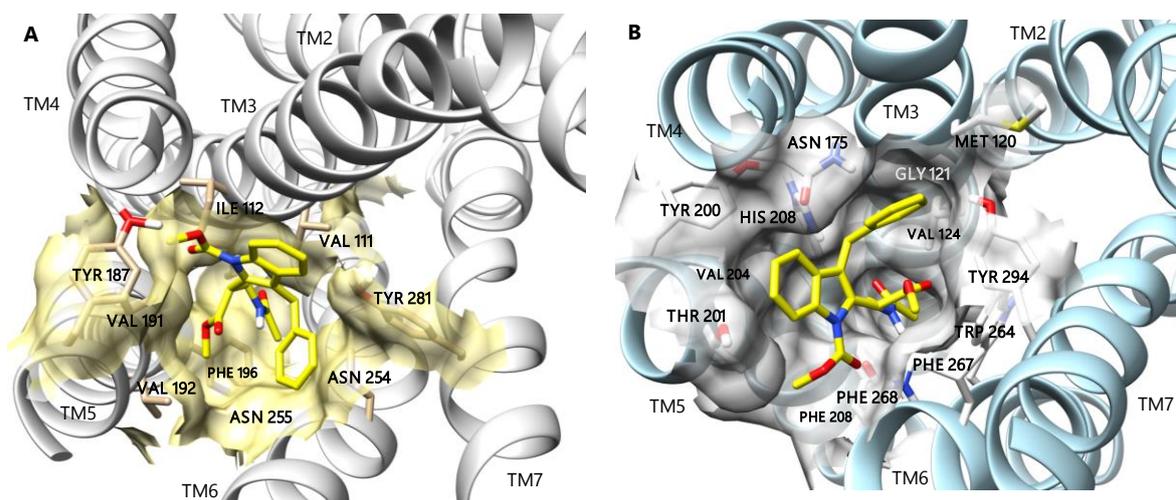


Figura 50. A) Modo de unión de (*8R*)-**9a** en el sitio de reconocimiento del receptor MT1, B) Modo de unión de (*8R*)-**9a** en el sitio de reconocimiento del receptor MT2.

Tabla 14. Datos del cristal y detalles relacionados con la colección y refinamiento de las estructuras obtenidas por difracción de rayos-X de la 3-fenetil-2-hidroxiindolina **3c** y de la α -ciano- γ -lactona **4c**.

	3c	4c
Fórmula	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₅	C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₅
<i>T</i> (K)	293(2)	293(2)
Dimensiones (mm)	0.24x0.22x0.18	0.33x0.32x0.18
Sistema cristalino	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n	C2/c
<i>a</i> (Å)	8.439(2)	23.984(4)
<i>b</i> (Å)	13.201(1)	7.761(2)
<i>c</i> (Å)	18.664(3)	20.872(3)
α (°)	90	90
β (°)	101.21(4)	105.82(2)
γ (°)	90	90
<i>V</i> (Å ³)	2039.7(6)	3737.9(12)
<i>D</i> _{calc} (mg mm ⁻³)	1.284	1.345
<i>Z</i>	4	8
μ (mm ⁻¹)	0.757	0.806
θ _{range} (°)	4.13-59.99	4.40-60.00
Refl. totales	3408	5638
Refl. únicas	2972	2675
<i>R</i> _{int}	0.0001	0.2294
Refl. observadas	1827	1880
Param. refinados	276	259
<i>R</i> (%), <i>R</i> _w (%)	4.9, 11.4	5.6, 19.6
<i>e</i> _{max} (eÅ ⁻³)	-0.148	-0.301