



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**OBTENCIÓN DE ANÁLOGOS DE MELATONINA COMO POSIBLES
AGONISTAS O ANTAGONISTAS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

PRESENTA

M. en C. ALFONSO SEBASTIÁN LIRA ROCHA



TUTOR:DRA. OFELIA ESPEJO GONZÁLEZ AÑO:2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Para Rossy, mi amada esposa

Para Ale, Gaby y Laura

Para Sofía, Lucha y Miguel

Agradecimientos

Mi agradecimiento a la Dra. Ofelia Espejo González por la dirección y apoyo para la realización de esta tesis.

A la Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez por el apoyo brindado en la realización de los estudios biológicos del presente estudio.

Al Dr. Cruz Reyes Vázquez de la Facultad de Medicina de la UNAM, por las facilidades otorgadas para la realización de los estudios de duodeno aislado de rata.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, Dr. Raymundo Cruz Almanza[†] miembros del Comité tutelar y al Dr. Antonio Cogordán Ramírez y Roberto Martínez, miembros del Comité tutelar ampliado, por sus valiosas observaciones.

Al Dr. Germán Chamorro Cevallos, Dr. Rafael Castillo Bocanegra, Dr. Juan Antonio Cogordán Ramírez, Hugo Alejandro Jiménez Vázquez, Dr. Rogelio Pereda Miranda, Dr. Enrique Ángeles Anguiano y Dr. Francisco Hernández Luis, por sus valiosos comentarios y observaciones durante la revisión del presente trabajo.

Agradezco al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por sus comentarios y observaciones desde una óptica diferente.

Al personal académico de la USAI por la realización de los espectros de IR, RMN ¹H y EM.

A Marcela Miranda Morales por su valiosa ayuda y dedicación.

Agradezco a la Dirección General del Personal Académico en particular al proyecto PAPIIT IN 232198; a la Coordinación de Estudios de Posgrado, en particular al Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios Posgrado (PADEP 05326, 05363 y 05386) por el apoyo económico para la adquisición de material y reactivos.

A todos mis compañeros y amigos que de alguna manera me apoyaron, mi mejor reconocimiento.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Germán Chamorro Cevallos
Primer Vocal	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Segundo Vocal	Dr. Juan Antonio Cogordán Ramírez
Tercer Vocal	Dr. Hugo Alejandro Jiménez Vázquez
Secretario	Dr. Rogelio Pereda Miranda
Primer suplente	Dr. Enrique Ángeles Anguiano
Segundo suplente	Dr. Francisco Hernández Luis

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Edificio “E”, laboratorio 121, Facultad de Química, UNAM.

Asesor:

Dra. Ofelia Espejo González

Sustentante:

M. en C. Alfonso Sebastián Lira Rocha

Índice de contenidos

Resumen	vii
Abstract	x
	Página
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Biosíntesis de melatonina	4
2.2. Regulación de la síntesis de melatonina a nivel pineal	5
2.3. Efectos fisiológicos de la MEL	8
2.4. Melatonina y su función en la célula	9
2.5. Receptores de melatonina	9
2.6. Aminoácidos que participan en la activación de los receptores de melatonina	15
2.7. Regulación de los receptores de la melatonina	17
2.8. Importancia de desarrollar herramientas para el estudio de la regulación de los receptores de melatonina	20
2.9. Importancia de desarrollar herramientas para estudiar la función y regulación de los subtipos de receptores de melatonina	20
2.10. Modelos propuestos para el sitio receptor de melatonina	21
3. Planteamiento del problema	43
4. Hipótesis	45
5. Objetivos	46
6. Discusión y resultados	48
6.1. Modelado molecular de los análogos de melatonina	48
6.2. Síntesis y caracterización estructural de análogos de melatonina	52
6.3. Determinación de la constante de afinidad de los análogos de melatonina	62
6.4. Efecto de los análogos de melatonina sobre la actividad contráctil de duodeno de rata	65
6.5. Evaluación del efecto ansiolítico en rata de los análogos de melatonina con el modelo Plus-Maze	70

7. Parte Experimental.....	75
7.1. Síntesis y caracterización estructural de los análogos de melatonina	75
7.1.1. Método general de preparación de los compuestos de la serie “a”	75
7.1.2. Método general de preparación de los compuestos de la serie “b”	78
7.1.3. Método general de preparación de los compuestos de la serie “c”	80
7.2. Modelado molecular de los análogos de melatonina	82
7.3. Determinación de la constante de afinidad de los análogos de melatonina en membranas de cerebro de pollo	84
7.4. Evaluación de la actividad contráctil de los análogos de melatonina (duodeno de rata)	86
7.5. Evaluación del efecto ansiolítico en rata de los análogos de melatonina con el modelo Plus-Maze	88
8. Conclusiones	89
9. Bibliografía	92
10. Espectros	97
11. Artículo publicado	

Lista de Figuras

Figura 1. Melatonina (<i>N</i> -acetil-5-metoxitriptamina)	3
Figura 2. Conducción de la señal luminosa en cerebro de rata	5
Figura 3. Mecanismos propuestos de la transducción de la señal de la MEL a nivel celular.	14
Figura 4. Fundamentos del diseño de ligandos melatoninérgicos cargados.	19
Figura 5. Modelo de interacción melatonina-sitio receptor de acuerdo a Lewis	25
Figura 6. Mapa electrostático de la melatonina según Navajas	28
Figura 7. Mapa estérico de la melatonina según Navajas	29
Figura 8. Interacciones de la melatonina con su sitio receptor según Navajas .	30
Figura 9. Modelo de interacción de la melatonina con su sitio receptor de acuerdo a Grol	32
Figura 10. Puntos farmacofóricos de la melatonina según Sicsic	34

Figura 11.	Puntos farmacofóricos de la melatonina según Spadoni.	36
Figura 12.	Superposición de compuestos con alta afinidad al receptor de melatonina según Spadoni.	37
Figura 13.	Patrón de los subconjuntos de compuestos utilizados por Mor	38
Figura 14.	Modelo de relación espacial de la melatonina según Mor	37
Figura 15.	Esqueletos anulares utilizados en la serie de compuestos analizados por Marot	39
Figura 16.	Estructuras con conformación “anclada” de la cadena lateral.	39
Figura 17.	Puntos considerados para el alineamiento de los compuestos.	40
Figura 18.	Arreglo espacial de la 2-yodomelatonina.....	40
Figura 19.	Resultados gráficos de los campos estérico, electrostático y lipofílico con 2-yodomelatonina.	40
Figura 20.	Definición de caras heterotópicas de la melatonina	41
Figura 21.	Compuestos isoméricos	41
Figura 22.	Orientaciones del grupo metoxilo.	41
Figura 23.	Modelo con anillos de pirano fusionados.....	42
Figura 24.	Representación del confórmero de mínima energía para la melatonina	48
Figura 25.	Representación de los confórmeros de mínima energía de las cabezas de serie (1a , 1b , 1c)	48
Figura 26.	Representación del isovalor para la melatonina.....	49
Figura 27.	Representación del isovalor para los compuestos de la serie “a”	50
Figura 28.	Representación del isovalor para los compuestos de la serie “b”	51
Figura 29.	Representación del isovalor para los compuestos de la serie “c”.....	51
Figura 30.	Espectro NOESY del compuesto 5b . Zona ampliada de la región aromática.....	55
Figura 31.	Espectro NOESY del compuesto 5b . Zonas ampliadas aromática y de la cadena lateral.	56
Figura 32.	Posible conformación del compuesto 5b	56
Figura 33.	Espectro NOESY del compuesto 5c. Zona aromática	57

Figura 34.	Espectro NOESY del compuesto 5c. Zonas ampliadas aromática y de la cadena lateral.	57
Figura 35.	Conformación espacial de la 2-yodomelatonina.....	59
Figura 36.	Valor de isopotencial para 2-yodomelatonina.....	60
Figura 37.	Valor de isopotencial para melatonina.....	60
Figura 38.	Representación del isovalor para los compuestos de la serie “a”	61
Figura 39.	Representación del isovalor para los compuestos de la serie “b”	61
Figura 40.	Representación del isovalor para los compuestos de la serie “c”	61
Figura 41.	Probables formas de interacción de las series con el sitio receptor de melatonina.	64
Figura 42.	Registro de la actividad contráctil de melatonina sobre duodeno aislado de rata a concentraciones crecientes.....	66
Figura 43.	Grafica de % de relajación para melatonina y el compuesto 1a	67
Figura 44.	Grafica de relajación de duodeno de rata para el compuesto 5b	67
Figura 45.	Gráfica de los valores de CI_{50} inhibición de la contracción de duodeno aislado de rata de melatonina y análogos de melatonina.....	68
Figura 46.	Gráfica de % de entradas promedio al brazo abierto	72
Figura 47.	Gráfica de % de tiempo promedio de permanencia en el brazo abierto	72
Figura 48.	Rotámetros de melatonina considerados en el análisis conformacional.....	82
Figura 49.	Definición de los átomos considerados para el análisis conformacional de los análogos de melatonina.....	82
Figura 50.	Equipo Plus-Maze	88

Lista de Tablas

Tabla 1.	Valores de CI_{50} el modelo propuesto por Lewis y col.	23
Tabla 2.	Constantes de afinidad (K_i) en membranas de cerebro de pollo. (Lewis y col.).....	24

Tabla 3.	Estructuras de los compuestos utilizados por Navajas en el método CoMFA y sus afinidades relativas (K_i)	27
Tabla 4.	Compuestos utilizados por Grol y col. para derivar su modelo.....	31
Tabla 5.	Conjunto de compuestos para el estudio CoMFA realizado por Sicsic	33
Tabla 6.	Estructuras de los compuestos utilizados por Spadoni (Afinidades relativas (K_i). Determinación en tecta óptico de codorniz.	35
Tabla 7.	Conformaciones principales de los diferentes modelos estructurales para melatonina.....	42
Tabla 8.	Análogos de melatonina propuestos	47
Tabla 9.	Desplazamientos de las señales comunes de los compuestos obtenidos.....	53
Tabla 10.	Distribución de Boltzmann de los confórmeros de la 2-yodomelatonina, melatonina y análogos de melatonina	60
Tabla 11.	Constantes de afinidad para los compuestos 1a-4a , 1b-5b , 1c-5c	63
Tabla 12.	Valores de inhibición de la contracción de duodeno de rata de melatonina y los análogos de melatonina.....	68
Tabla 13.	Compuestos evaluados en el modelo de Plus-Maze (dosis)	70
Tabla 14.	Resultados de los parámetros evaluados en el modelo de Plus-Maze.....	71
Tabla 15.	Comparación cualitativa de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos	74

Lista de Espectros

IR y EM del compuesto 1a	97
RMN ^1H del compuesto 1a	98
IR y EM del compuesto 2a	99
RMN ^1H del compuesto 2a	100
IR y EM del compuesto 3a	101
RMN ^1H del compuesto 3a	102
IR y EM del compuesto 4a	103

RMN ^1H del compuesto 4a	104
IR y EM del compuesto 1b	105
RMN ^1H del compuesto 1b	106
IR y EM del compuesto 2b	107
RMN ^1H del compuesto 2b	108
IR y EM del compuesto 3b	109
RMN ^1H del compuesto 3b	110
IR y EM del compuesto 4b	111
RMN ^1H del compuesto 4b	112
IR y EM del compuesto 5b	113
RMN ^1H del compuesto 5b	114
IR y EM del compuesto 1c	115
RMN ^1H del compuesto 1c	116
IR y EM del compuesto 2c	117
RMN ^1H del compuesto 2c	118
IR y EM del compuesto 3c	119
RMN ^1H del compuesto 3c	120
IR y EM del compuesto 4c	121
RMN ^1H del compuesto 4c	122
IR y EM del compuesto 5c	123
RMN ^1H del compuesto 5c	124

Resumen

La melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) está presente en varias especies de vertebrados e invertebrados y posee varias actividades biológicas tal como la regulación de ritmos circadianos en mamíferos. Esta sustancia, segregada por la glándula pineal, ejerce sus efectos mediante receptores acoplados a proteínas-G. Sin embargo, su participación en la fisiología y fisiopatología humana no ha sido completamente esclarecida. Sustancias agonistas y antagonistas, capaces de interactuar selectivamente con cada uno de los tres tipos de receptores descritos hasta ahora, podrían ayudar a realizar diversos estudios farmacológicos y sustancias de estructura análoga a la melatonina podrían ayudar a esclarecer su modo de acción. El presente estudio describe el modelado molecular, la síntesis y la evaluación biológica de varios análogos de la melatonina obtenidos por incorporación de sustituyentes en la estructura de la melatonina.

Los análogos obtenidos fueron:

1-Bencilmelatonina	1-Fenilmelatonina,	1-Benzoilmelatonina
1-(<i>p</i> -Metoxibencil)melatonina	1-(<i>p</i> -Metoxifenil)melatonina,	1-(<i>p</i> -Metoxibenzoil)melatonina
1-(<i>p</i> -Fluorobencil)melatonina	1-(<i>p</i> -Fluorofenil)melatonina	1-(<i>p</i> -Fluorobenzoil)melatonina
1-(<i>p</i> -Metilbencil)melatonina	1-(<i>p</i> -Metilfenil)melatonina	1-(<i>p</i> -Metilbenzoil)melatonina
	1-(<i>p</i> -Nitrofenil)melatonina	1-(<i>p</i> -Nitrobenzoil)melatonina.

Los derivados bencílicos y benzoilados se prepararon mediante una *N*-alquilación o *N*-acilación de la melatonina con el correspondiente cloruro de bencilo o cloruro de benzoilo en monoglisma, usando NaH como base. Los derivados con un grupo fenilo se prepararon mediante una reacción tipo Ullman usando el correspondiente derivado yodofenilo, CuI y K₂CO₃, en dimetilformamida anhidra.

Se realizó un estudio teórico de las propiedades electrónicas usando el método semiempírico AM1, tanto de la melatonina, como de los análogos con sustituyentes en la posición 1 del anillo indólico. Los resultados indican que el grupo bencílo afecta poco la densidad electrónica del anillo indólico. Los derivados benzoilados disminuyen la mencionada densidad electrónica, y el efecto de los derivados con un grupo fenilo depende de los sustituyentes que soporte este

anillo. Dado que el anillo indólico es un grupo farmacofórico importante en la interacción melatonina-receptor, cualquier cambio en su densidad electrónica afectará las propiedades biológicas de la melatonina. Por lo tanto, los compuestos con una menor densidad electrónica sobre el núcleo indólico serán menos bioactivos que la melatonina.

Para probar esta hipótesis se determinó la afinidad de los análogos de melatonina en un ensayo con membranas de cerebro de pollo. Los resultados indican que en todos los compuestos la incorporación de un grupo voluminoso en la posición 1 disminuye la afinidad. Pero en cada serie, los compuestos con un grupo electrodonador tuvieron valores de afinidad mayores (derivados bencílicos y benzoilados), con excepción del derivado *p*-nitrobenzoilo que mostró una mayor afinidad en su grupo.

Por otra parte, se realizó la evaluación de la inhibición de la actividad contráctil de duodeno aislado de rata, con el fin de observar una correlación entre la afinidad y la respuesta fisiológica. La melatonina disminuye el tono y la frecuencia en duodeno de rata de una manera dosis-dependiente. Todos los análogos evaluados en este sistema causaron una inhibición de la actividad contráctil similar a la desarrollada por la melatonina. Los compuestos con mayor afinidad también mostraron mayor inhibición de la actividad contráctil, pero el derivado *p*-nitrobenzoilo se comportó como un agonista parcial.

Además, se ha informado que la melatonina ejerce un efecto ansiolítico en rata. De esta manera, los análogos más activos fueron evaluados en el modelo Plus-Maze. Los resultados indicaron que los compuestos con un grupo electrodonador, e. g., 1-(*p*-metoxifenil)melatonina y 1-(*p*-metoxibenzoil)melatonina, tienen un efecto ansiolítico, mientras que el derivado con el sustituyente *p*-nitrobenzoilo fue ligeramente ansiogénico.

Aunque algunos análogos se unieron a las membranas de cerebro de pollo con menor afinidad que la melatonina, algunos fueron más activos en los ensayos funcionales. El comportamiento del compuesto 1-(*p*-nitrobenzoil)melatonina es notable debido a su buena afinidad *in vitro*, pero de baja actividad fisiológica.

La conclusión es que tanto las fuerzas electrostáticas como el factor estérico median la interacción melatonina-receptor, por consiguiente, es importante considerar estos factores en el diseño de nuevos agentes terapéuticos.

Abstract

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is present in several vertebrate and invertebrate species and fulfills several biological roles, such as the regulation of circadian rhythms in mammalian species. This substance, secreted by the pineal gland, exerts its effects through G-protein coupled receptors. However, the melatonin role in human physiology and pathophysiology has not been fully elucidated. Agonist and antagonist substances, able to interact selectively with each one of the three melatonin receptors known to date, may help to perform a number of studies, and melatonin analogues substances may help to get this objective. The present study describes the molecular modeling, synthesis and biological evaluation of several melatonin analogues obtained by the incorporation of substituents in the melatonin structure.

The melatonin analogues synthesized were:

1-Benzylmelatonin	1-Phenylmelatonin	1-Benzoylmelatonin
1-(<i>p</i> -Methoxybenzyl)melatonin	1-(<i>p</i> -Methoxyphenyl)melatonin	1-(<i>p</i> -Methoxybenzoyl)melatonin
1-(<i>p</i> -Fluorbenzyl)melatonin	1-(<i>p</i> -Fluorophenyl)melatonin	1-(<i>p</i> -Fluorbenzoyl)melatonin
1-(<i>p</i> -Methylbenzyl)melatonin	1-(<i>p</i> -Methylphenyl)melatonin	1-(<i>p</i> -Methylbenzoyl)melatonin
	1-(<i>p</i> -Nitrophenyl)melatonin	1-(<i>p</i> -Nitrobenzoyl)melatonin

The benzylic and benzoyl derivatives were prepared by *N*-alkylation or *N*-acylation of melatonin with the corresponding benzyl chloride or benzoyl chloride in dimethoxyethane, using NaH as base. The phenyl derivatives were prepared by an Ullman-type reaction using the corresponding iodophenyl derivative, CuI, and K₂CO₃, in anhydrous DMF.

A theoretical study of the electronic properties of melatonin and several melatonin analogues, with substituents at position 1 of the indole ring, was carried out using the AM1 semiempirical method. The results showed that the benzylic group had little effect on the indolic ring electron density. On the other hand, it was observed that the benzoyl derivatives decreased the indol electronic density. For as the effect of the phenyl derivatives depends on the substituents at the phenyl ring. Considering that the indolic ring is an important pharmacophore group in the melatonin-receptor interaction, any change in its electron density will affect the

melatonin biological properties. Then, compounds with less electronic density on the indol nucleus are expected to be less bioactive than melatonin.

To test this hypothesis, the affinity of the melatonin analogues was determined in competitive binding analysis on chicken brain tissue. For all compounds, the results showed that the incorporation of a bulky group at position 1 decreases the affinity. But for each series, compounds with an electron-releasing group showed higher affinity values (benzyl and phenyl series), with the only exception of the *p*-nitrobenzoyl derivative which showed higher affinity in its group.

The inhibition of contractile activity of rat duodenum assay was carried out in the search for correlations between the binding affinity, and the physiological response. Melatonin decreased tone and frequency of rat duodenum, in a dose-dependent manner. All the melatonin analogues evaluated on this system caused a concentration-dependent inhibition of the contractile activity. Compounds with high affinity showed also high inhibition of the contractile activity, but the *p*-nitrobenzoyl derivative behaved like a partial agonist.

In addition, it is well documented that melatonin exerts an ansiolytic effect on rat. So, the most active analogues were evaluated in the elevated Plus-Maze test. The results indicate that compounds with an electron-releasing group (1-(*p*-methoxy)phenylmelatonin, 1-(*p*-methoxy)benzoylmelatonin) have a clear ansiolytic effect, while the *p*-nitrobenzoyl derivative was mildly anxiogenic.

Though some of the analogues bound to chicken brain membranes with lower affinity than melatonin, some of them were more active in the functional assays. The behavior of 1-(*p*-nitro)benzoylmelatonin is remarkable for its good affinity *in vitro*, and its poor physiological activity.

The conclusion is that both the electrostatic forces and steric factor mediate the melatonin-receptor interaction, so these factors are important to consider in the design of new potential therapeutic agents.

1. Introducción

Una de las áreas de la investigación de los autocoides es la relacionada a la melatonina, *N*-[2-(5-metoxi-1*H*-indol-3-il)etil]acetamida, sustancia segregada, principalmente, por la glándula pineal. Aunque se ha determinado que dicha sustancia presenta diversas actividades biológicas, especialmente en ensayos *in vitro*, aún no se ha podido establecer la funcionalidad de sus diferentes sitios receptores. En la última década se han incrementado los estudios enfocados a determinar la topología del sitio receptor de la melatonina. Los diversos estudios de relación estructura química-actividad biológica han aclarado pocas dudas en comparación con la cantidad de estudios realizados hasta la fecha. Un avance significativo ha sido la determinación de la secuencia de los dominios transmembranales de los sitios receptores de la melatonina, aunque no se ha logrado establecer la disposición tridimensional y el lugar específico de la interacción melatonina-receptor. Otro avance notable ha sido la clonación de dos de los tres tipos de receptores de melatonina caracterizados hasta el presente.

Una de las estrategias que se ha empleado para dilucidar la topología del sitio receptor de la melatonina ha sido la preparación de sustancias análogas a la estructura de la melatonina y su evaluación biológica en sistemas *in vitro*, en especial la determinación de su constante de afinidad hacia los sitios receptores y la correlación entre esta última y la estructura química. Esto ha permitido modular la selectividad de algunas sustancias hacia un tipo de receptor, aunque ésta no ha sido absoluta.

En el presente trabajo se aborda una táctica similar a la anteriormente expuesta. Inicialmente, se revisa la producción y regulación de melatonina en vertebrados, el estudio de sus sitios receptores, la importancia de la obtención de ligandos específicos, así como los diversos modelos que se han postulado en base a estudios SAR y QSAR. Posteriormente se describen los propósitos del presente trabajo, así como el diseño, la síntesis química, caracterización estructural, evaluación biológica en diversos ensayos de los análogos de

melatonina, la discusión de los resultados obtenidos y las conclusiones del presente estudio.

Es importante señalar que el esclarecimiento de las interrogantes que existen alrededor de las diversas actividades biológicas de la melatonina tendría una profunda repercusión en diferentes áreas de la práctica médica, particularmente, en los trastornos originados por alteraciones en procesos regulados de manera circadiana. Por lo anterior, es de gran importancia la obtención de sustancias que coadyuven a controlar estos trastornos y algunos otros en los que está implicada la participación de la melatonina.

2. Antecedentes

Debido a sus notables características anatómicas, un órgano esférico, aparentemente ubicado en el centro del cerebro, se le ha atribuido a la glándula pineal un significado místico. Descartes la describía como la confluencia del soma (cuerpo) y la sique (espíritu), “el asiento del alma”. Es este órgano de los vertebrados, junto con la retina, la fuente principal de los elevados niveles de secreción de la melatonina durante las horas nocturnas. La secreción se produce localmente de manera circadiana en la retina y en el núcleo supraquiasmático y se sincroniza por la luz ambiental.¹

La primera actividad biológica registrada de la melatonina puede ser rastreada hasta 1917, cuando McCord y Allen descubrieron que los extractos de la glándula pineal bovina causaban el aclaramiento de la piel de los renacuajos de *Rana pipiens*.² Posterior a esto se observó que los tumores destructivos en la glándula pineal conducían a la pubertad precoz, lo que condujo a una investigación en la que se demostró que los extractos de glándula pineal inhibían la función ovárica en ratas.³ En 1959, Lerner y colaboradores aislaron la melatonina (MEL), elucidando su estructura como la *N*-acetil-5-metoxitriptamina (Figura 1), además de identificarla como el agente responsable, presente en la glándula pineal, del aclaramiento de la piel de los renacuajos.⁴

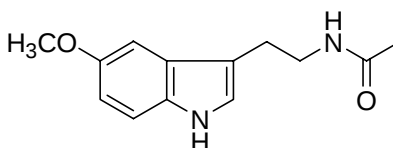


Figura 1. Melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina).

Axelrod y col.⁵ demostraron que la biosíntesis de melatonina comprende la *N*-acetilación de la serotonina catalizada por la *N*-acetiltransferasa (NAT), seguida de la *O*-metilación del grupo hidroxilo en la posición 5 y catalizada por la hidroxiindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT).⁶ También, durante esta época se demostró que la melatonina era el agente responsable de la supresión ovárica en ratas.⁷

Por otra parte, se había observado un cierto ritmo en la producción de serotonina en la glándula pineal, siendo sus niveles 100 veces o mayores en el día que durante la noche.⁸ Se consideró que la HIOMT podría presentar un ritmo de

producción diurna pero este era muy leve. Sin embargo, la producción de NAT si presentaba una ritmicidad muy marcada⁹ con niveles más elevados durante la noche (50-100 veces mayores) que durante el día. Esto condujo a la conclusión que el decremento en los niveles de serotonina durante la noche eran causados por la síntesis de melatonina. La propiedad de la melatonina para agregar los gránulos de pigmentos (melanosomas) de los melanóforos dérmicos de anfibios se utilizó para postular la presencia de los receptores de melatonina y proponer a la *N*-acetiltriptamina como un antagonista a los receptores de melatonina.¹⁰ También, en este estudio se realizó la primera relación estructura-actividad de análogos de melatonina. Más tarde se demostró, en melanóforos de *Xenopus laevis* cultivados, que la activación de los receptores de melatonina inhibe la formación de cAMP a través del acoplamiento a una proteína G sensible a la toxina de pertussis.¹¹ Posteriormente, estudios de clonación condujeron al aislamiento del primer cDNA que codifica para un receptor de melatonina del melanóforo de *Xenopus laevis*.¹² Este suceso facilitó la clonación y la caracterización de los receptores de melatonina de mamíferos.

2.1. Biosíntesis de melatonina

Una función clave de la glándula pineal es transformar la información de la luz ambiental y sincronizar con ella los ritmos biológicos. De aquí que algunos la designen en algunas especies como el “tercer ojo”. En los mamíferos, la información llega a la glándula pineal vía una ruta tortuosa. La información luz/obscuridad detectada por la retina se transmite por la ruta retinohipotalámica al núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo, que se ha determinado como el principal reloj biológico en los mamíferos (Figura 2). Las células del SCN se proyectan al núcleo hipotalámico paraventricular. Las fibras de este núcleo descienden para hacer sinapsis en la columna intermediolateral de la espina dorsal. Las neuronas simpático preganglionares de esta región se proyectan al ganglio cervical superior desde el cual las neuronas postganglionares ascienden a lo largo de la arteria carótida interna para entrar a la pineal. La liberación circadiana de norepinefrina en la noche determina los ritmos de producción de la NAT y por consiguiente de la melatonina en la pineal.¹³

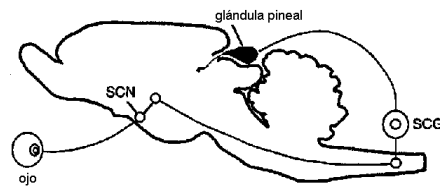


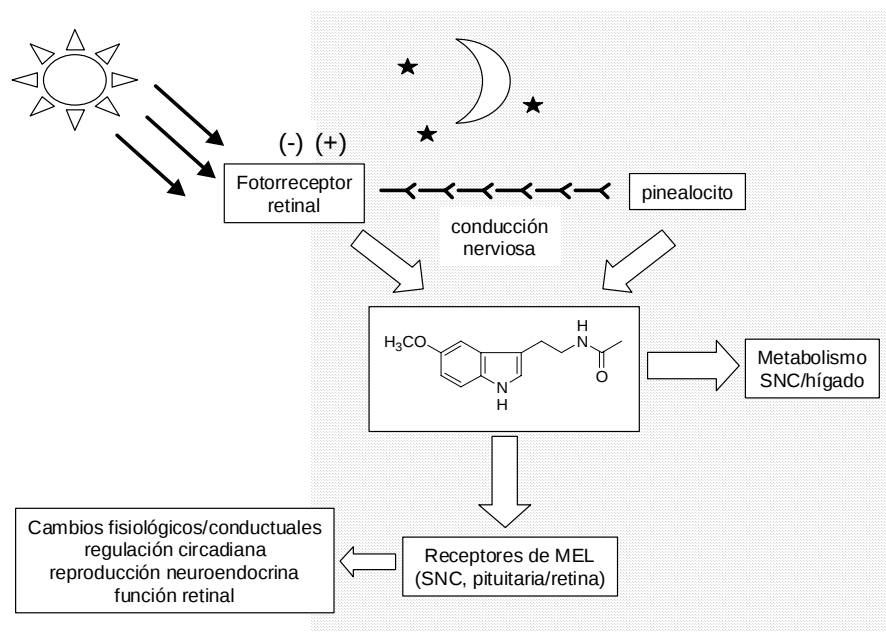
Figura 2. Conducción de la señal luminosa en cerebro de rata.

La glándula pineal y la retina son los sitios primarios de la producción de MEL. Ambos tejidos exhiben muchas similitudes morfológicas y de desarrollo consistentes con la idea que la glándula pineal de los mamíferos evolucionó a partir de un órgano fotorreceptivo.¹⁴ Así que no es sorprendente que el pinealocito y el fotorreceptor retinal al parecer usan la misma ruta biosintética para convertir 5-HT (serotonina) a la MEL.

Las características más notables del sistema de MEL son su variación diurna y su profunda supresión por la luz ambiental. El ritmo diario de síntesis de melatonina exhibido por la glándula pineal es generado por un reloj circadiano endógeno en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y está comunicado a la pineal vía un compleja ruta de multicomponentes. Esta ruta consta de los medios necesarios por los cuales una señal luminosa, percibida por los ojos y transmitida al núcleo supraquiasmático, resulta en la inhibición de la producción de MEL en la glándula pineal (Esquema 1).

2.2. Regulación de la síntesis de melatonina a nivel pineal

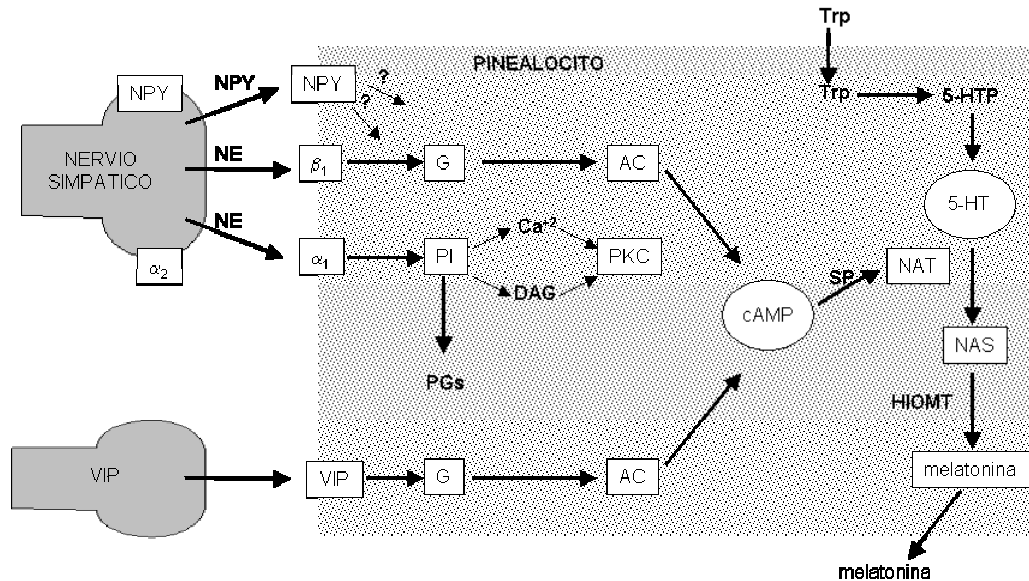
Una manera de manipular el sistema de MEL ha sido la remoción de la glándula pineal, eliminando por lo tanto la fuente primaria de la MEL circulante. De manera alterna, se pueden alterar las entradas neurálgicas a la pineal, v. gr., la ganglionectomía cervical superior o la administración de agentes farmacológicos que afecten los receptores de los pinealocitos controlando la producción de MEL. Esto último es regulado normalmente por una interacción muy compleja de receptores membranales, segundos mensajeros y otros eventos intracelulares que resultan en la inducción y mantenimiento de la *N*-acetil-transferasa activa (NAT), la enzima limitante en la síntesis de MEL.



Esquema 1. Componentes clave en la producción de melatonina

Conducción nerviosa: tracto retinohipotalámico → núcleo supraquiasmático → hipotálamo paraventricular → haz medio cerebroanterior → núcleo medio lateral de la médula espinal torácica superior → ganglio cervical superior → nervios simpáticos.

La síntesis y secreción de la MEL son estimuladas por la oscuridad como se observa en la retina y son inhibidas por la luz. El inicio de la obscuridad estimula directamente a la retina para sintetizar y segregar localmente la MEL y/o enviar señales al núcleo supraquiasmático del hipotálamo.¹⁵ Se ha establecido que el estímulo primario para los incrementos nocturnos en la producción de MEL proviene de la señal simpaticoadrenérgica que recibe la glándula pineal. Los adrenorreceptores β_1 del pinealocito estimulan la producción de cAMP el cual en turno “dispara” la inducción así como la activación de la NAT. La estimulación simultánea por la norepinefrina (NE) del adrenorreceptor α_1 del pinealocito potencia la respuesta del adrenorreceptor β_1 mediante las acciones del sistema de fosfoinositol, particularmente la proteína quinasa C (PKC). Las fibras simpáticas que inervan la pineal contienen el neuropéptido Y (NPY) así como NE y al parecer este péptido también incrementa la producción de MEL (Esquema 2).



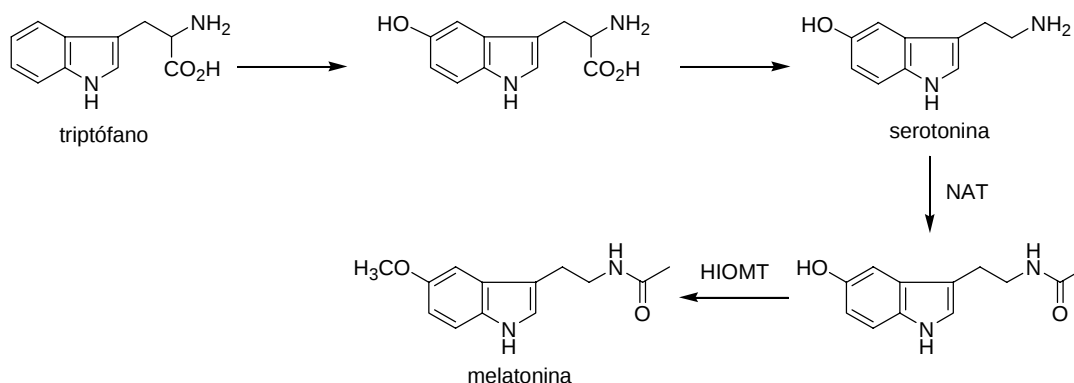
Esquema 2. Regulación de la biosíntesis de melatonina.

Modelo de receptores y segundos mensajeros que describe el control neuronal de la producción de melatonina en el pinealocito de la rata. La inducción y activación de la *N*-acetiltransferasa (NAT), enzima limitante en la síntesis de MEL, resulta del incremento en la producción de cAMP. Los adrenoreceptores β_1 y los receptores del péptido intestinal vasoactivo (VIP) estimulan, independientemente, la producción de cAMP. La estimulación producida por cualquier receptor se potencia por los adrenoreceptores α_1 los cuales están acoplados al sistema de fosofosinolisil (PI). Los adrenoreceptores α_1 parecen potenciar la adenilato ciclasa vía la proteínquinasa C Ca^{+2} -dependiente (PKC), la cual inicialmente se activa por el diacilglicerol y Ca^{+2} . El neuropéptido Y (NPY) al parecer también estimula la actividad de la NAT, pero no es claro si activa la adenilato ciclasa (AC) directamente o vía la potenciación del efecto adrenérgico β_1 . Los adrenoreceptores α_2 y los receptores NPY, ambos localizados presinápticamente, median la inhibición de la salida simpática. [G, proteína G reguladora; HIOMT, enzima hidroxindol-O-metiltransferasa; 5-HTP, 5-hidroxitriptófano; NAS, *N*-acetilserotonina; NE, norepinefrina; PGs, prostaglandinas; TRP, triptófano; SP, Síntesis de proteínas (inducción, activación de mRNA)].

Varios estudios de la síntesis de MEL en la pineal tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que el GABA, la dopamina y el glutamato pueden inhibir la síntesis de MEL, mientras que los opiodes y el péptido delta, inductor del sueño, pueden estimular este proceso.¹⁶ A diferencia de la mayoría de los sistemas transmisores y hormonales no hay mecanismos específicos de almacenamiento o liberación de la MEL. Una vez que se ha sintetizado esta hormona, altamente liposoluble, simplemente se difunde fuera de la célula hacia sus sitios de acción.

La ruta por la cual la melatonina se sintetiza, tanto en la glándula pineal como en la retina, es similar en ambos casos siendo el triptófano el compuesto iniciador. El triptófano, el cual proviene de la dieta, se transforma en serotonina, la cual a su vez se convierte en *N*-acetilserotonina y esta última se transforma a la melatonina

por las enzimas *N*-acetiltransferasa y 5-hidroxiindol-*O*-metiltransferasa, respectivamente (Esquema 3).¹⁷



Esquema 3. Biosíntesis de la melatonina.

2.3. Efectos fisiológicos de la MEL

Liberada en la corriente sanguínea, la MEL puede afectar un número diverso de procesos. Varios estudios han indicado un efecto hipnótico causado por la MEL cuando se administra oralmente, lo que es benéfico para problemas del sueño.¹⁸ Además, la MEL regula ritmos circadianos¹⁹ y, por lo tanto, ayuda a la gente con desórdenes afectivos o con problemas por el cambio de horario (jet-lag).²⁰ La MEL influye en la reproducción y maduración sexual,²¹ tanto central como localmente. Los efectos centrales de la MEL sobre la reproducción han sido ampliamente estudiados;²² la mayoría de los estudios sugiere un efecto inhibitorio de la MEL sobre el pulso generador GnRH.²³ Sin embargo, evidencia más reciente sugiere que la MEL puede tener un efecto inhibitorio a nivel de las gónadas.²⁴

La MEL tiene efectos sobre la vasculatura cardíaca²⁵ y puede regular la función renal.²⁶ Además, la MEL puede jugar un papel protector en el cáncer,²⁷ alargando los tiempos del ciclo celular o decreciendo la transcripción del gen del receptor de estrógeno. La MEL puede también jugar un papel en la función cerebral;²⁸ sin embargo, los mecanismos fundamentales de tales funciones son desconocidos. Actualmente, se sabe que la MEL ejerce una fuerte influencia sobre la morfología celular similar a la de las neuronas,²⁹ lo cual puede tener importantes implicaciones clínicas para el tratamiento de las enfermedades asociadas con el cerebro.

2.4. Melatonina y su función en la célula

La MEL es una sustancia altamente lipofílica y, por lo tanto, puede entrar en fluidos, tejidos y células en todo el cuerpo³⁰ y acumularse en sangre.³¹ También, se ha propuesto que la células pueden tomar activamente y acumular MEL.³² Por lo tanto, es posible que la MEL puede alcanzar niveles farmacológicos a nivel de la célula. Esto tiene importantes implicaciones fisiológicas debido a que concentraciones elevadas de MEL quizá puedan activar rutas de transducción de señal diferentes a las dependientes de cAMP. La MEL puede enlazarse directamente a las proteínas celulares localizadas en el citosol³³ o en el núcleo,³⁴ activando otros componentes de la transducción de señal. La habilidad de la MEL para actuar a través de receptores puede contribuir con su diversidad de acción *in vivo*.

2.5. Receptores de Melatonina

La manipulación directa del sistema de la MEL ha estado limitada a la administración de la misma MEL o en muy pocos casos a un análogo metabólicamente estable como la 6,7-dicloro-2-metilmelatonina. La identidad de los receptores de melatonina, su localización, sus características farmacológicas y funciones celulares eran desconocidas. Los intentos iniciales para identificar los sitios receptores, usando técnicas de radioligandos, fueron confusos por la baja actividad específica e inestabilidad de la [³H]-melatonina disponible como único ligando.³⁵

Sin embargo, se ha demostrado que concentraciones picomolares de MEL activan receptores específicos en la retina de conejo, los cuales median la inhibición presináptica de la liberación de dopamina,³⁶ así como también a los receptores en pars tuberalis de ovino y hámster, y a los receptores de la pituitaria anterior de rata neonata los cuales median la inhibición de la producción de nucleótidos cíclicos. También se han caracterizado sitios específicos de unión, con afinidad picomolar, mediante el uso de la 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina, en zonas discretas del cerebro, retina y pituitaria de mamífero. Los sitios de unión de la 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina difieren de los sitios de unión de la [³H]-melatonina, inicialmente descritos, en que aquellos muestran una mayor afinidad y pueden

estar farmacológicamente correlacionados con las respuestas funcionales apropiadas.

El descubrimiento de que la MEL es un potente inhibidor de la liberación de dopamina en la retina de conejo *in vitro*, condujo a la primera caracterización profunda de un receptor funcional de MEL.³⁶ En este estudio se observó que los análogos de melatonina con mayor actividad agonista poseen un grupo metoxilo en la posición 5 del anillo indólico y un grupo N-acetilo en la misma posición que la MEL.

El análisis de tipo estructura-actividad del receptor presináptico retinal mostró que los análogos sustituidos en la posición 2 con grupos voluminosos son buenos agonistas.³⁷ De hecho, la 2-yodomelatonina es 8 veces más potente que la MEL al inhibir la liberación de la dopamina. La N-acetiltriptamina, que carece de un grupo metoxilo en la posición 5, se comportó como un agonista parcial en la retina de conejo. La incorporación de un grupo bencilo a la posición 2 de la N-acetiltriptamina generó un antagonista competitivo, el luzindol (2-(2-Bencil-1H-indol-3-il)etilamina).

La segunda respuesta funcional mediada por un receptor, que se caracterizó en mamíferos, fue la capacidad de la MEL para inhibir la producción de cAMP estimulada por forskolina en tejido de pars tuberalis, por ejemplo, en cultivos celulares de pituitaria ovina³⁸ o en tejido recién extirpado de hámster³⁹ y rata.⁴⁰

El ligando 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina se desarrolló originalmente para medir melatonina en radioinmunoensayos,⁴¹ pero el compuesto fue reconocido como un potente agonista de melatonina.⁴² Con su alta afinidad y alta actividad específica, se encontró que la 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina era un ligando útil para caracterizar y localizar receptores de MEL con una alta afinidad en homogeneizados tisulares⁴³ o secciones de cerebro analizadas por autorradiografía.⁴³ En cerebro, retina y pituitaria de una amplia variedad de mamíferos, los sitios de unión específicos exhiben características similares. La unión es saturable, reversible y de alta afinidad ($K_d=21-150$ pm). En retina de conejo, las características del receptor presináptico de MEL y el sitio marcado por la 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina son idénticos. Además, los sitios de unión de la 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina en pars

tuberalis/eminencia media y regiones del SNC exhiben un perfil farmacológico y de alta afinidad similar.

La unión específica de la 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina en pars tuberalis y el SNC del ratón puede disminuirse mediante el uso de análogos de GTP, lo que es consistente con los estudios funcionales sobre la inhibición de cAMP. Al parecer los receptores se convierten a un estado que muestra una afinidad diez veces menor hacia la 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina y se piensa que esto representa receptores de MEL que se han desacoplado de las proteínas G.⁴⁴

En contraste a los mamíferos, los sitios de unión de la 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro de vertebrados inferiores como es el caso del pollo. Estos tejidos, ricos en receptores, parecen ser más adecuados para el análisis bioquímico y de biología molecular de receptores puros de MEL. Afortunadamente, las características farmacológicas, incluyendo la afinidad y el acoplamiento a proteínas G, de estos sitios en aves y reptiles parecen ser similares a los receptores de mamíferos.⁴⁵

Las técnicas de autorradiografía han sido útiles para determinar la ubicación los receptores de MEL. Los sitios de unión con alta afinidad de la 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina están restringidos a pocas áreas morfológica y funcionalmente discretas del cerebro, retina y pituitaria de los mamíferos. Esto sugiere que la hormona tiene funciones centrales específicas; en muchos casos los sitios de unión se ubican en regiones consistentes con los efectos fisiológicos y conductuales que se conocen de la MEL.

Los receptores en el núcleo supraquiasmático (NSQ), el sitio del reloj circadiano de los mamíferos, están probablemente involucrados en la capacidad de la MEL para sincronizar los ritmos biológicos. Aunque el mecanismo celular no esta completamente esclarecido, se ha demostrado que la MEL inhibe la actividad eléctrica y metabólica en este núcleo.⁴⁶ Los receptores en el núcleo paraventricular del tálamo (PVN) pueden también regular los ritmos corporales, para esta región se recibe señal del SNC y se cree que transmite la información circadiana a las estructuras límbicas. Las regiones pars tuberalis/eminencia media y pituitaria anterior son las que probablemente median los efectos neuroendocrinos, en

particular las conocidas acciones gonadotrópicas y tirotrópicas de la MEL. En la retina, los receptores estimulados por la MEL, producida localmente, se piensa que provocan las respuestas de adaptación a la oscuridad.

Como ya se mencionó la MEL produce sus efectos vía receptores. A la fecha, tres receptores de MEL (mamíferos) se han clonado, MT₁,⁴⁷ MT₂,⁴⁸ o purificado por afinidad, MT₃.⁴⁹ Dos de estos receptores están acoplados a proteína-G, que se caracterizan por un dominio de siete hélices transmembranales y se denotan como MT₁ y MT₂ mientras que la proteína MT₃ pertenece a la familia de las quinona reductasas.

MT₁

La diversidad de respuestas de la melatonina en el cuerpo humano se puede atribuir al hecho que sus receptores se expresan en una amplia variedad de tejidos.⁵⁰ El receptor de melatonina MT₁ (R-MT₁) que se expresa en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y en los vasos cardíacos participa en la modulación de los ritmos circadianos⁵¹ y en la constricción de los vasos cardíacos.⁵² Además de estas regiones específicas, el R-MT₁ se expresa en otras regiones del cerebro y tejidos periféricos. La elucidación del papel fisiológico de los R-MT₁'s en muchos de estos tejidos se encuentra aún bajo investigación. Además de su vasta distribución tisular, el hecho de que los R-MT₁'s se pueden acoplar a una amplia variedad de proteínas-G puede también explicar la diversidad de su respuesta en el cuerpo. Aún a nivel celular, la melatonina, actuando vía sus R-MT₁'s, puede producir múltiples respuestas celulares. Se ha demostrado que los R-MT₁'s producen inhibición de la señal de la cascada de transducción del cAMP, lo que resulta en un decremento de la actividad de la PKA⁵³ y de la fosforilación del CREB.⁵⁴ Los R-MT₁'s se pueden acoplar a las cascadas de transducción de señal dependiente de fosfolipasa C (PLC) de manera directa o indirecta activando la proteína quinasa C (PKC).⁵⁵ También se pueden acoplar a los canales de potasio activados por calcio (BKCa⁺²).⁵⁶ Estos receptores también pueden modular la formación del ácido araquidónico,⁵⁷ pueden estimular la actividad de quinasa c-Jun N-terminal⁵⁸ y también pueden modular las quinasas de proteína activadas por mitógeno (MAP, mitogen-activated protein).⁵⁹

MT₂

El papel de los receptores de melatonina MT₂ (R-MT₂) en la fisiología de los mamíferos, así como sus propiedades de señalización, se han hecho más claras con el reciente desarrollo de ligandos selectivos a MT₂.⁶⁰ Se sabe que los R-MT₂'s participan en la fisiología de la retina⁶¹ en la modulación de los ritmos circadianos,⁶² en la dilatación de los vasos cardíacos⁵³ y en las respuestas inflamatorias en la microcirculación.⁶³ A diferencia de los R-MT₁'s, los R-MT₂'s están más restringidos en cuanto a su distribución que comprende el cerebelo, SCN del hipotálamo, la retina, el riñón, ovario, vasos cardíacos y varias líneas celulares cancerosas.⁶⁴ También se acoplan a la inhibición de la formación de cAMP y a la estimulación de la hidrólisis de PI.⁶⁵

MT₃

Recientemente, una proteína que muestra un perfil de unión similar al del receptor ML₂,⁶⁶ ahora denominado MT₃, fue purificada por afinidad del riñón de hámster Sirio.⁶⁷ Esta proteína comparte un 95 % de homología con la quinonreductasa humana 2, una enzima que participa en la desintoxicación.⁵⁰ Esta proteína y su actividad, revelada mediante ensayos de unión con radioligandos y de tipo enzimático, muestran que se expresa en el hígado, riñón, cerebro, corazón, tejido adiposo, músculo esquelético, pulmón, intestino, testículos y bazo del hámster, ratón, perro y mono.⁶⁸ De manera funcional, se ha demostrado que la proteína MT₃ puede estar involucrada en la regulación de la presión intraocular del conejo⁶⁹ y en las respuestas inflamatorias de la microvascularización.⁶⁵

Poco se sabe sobre los pasos de la transducción de las señales que participan en la señalización de los receptores de MEL. Los estudios indican que los receptores de la MEL están acoplados a una inhibición de la adenilciclasa⁷⁰ resultando en un decremento de los niveles intracelulares de cAMP vía proteínas-G sensibles a la toxina pertussis⁷¹ y, consecuentemente, una disminución en la fosforilación del CREB⁷² (Figura 3, mecanismo 1).

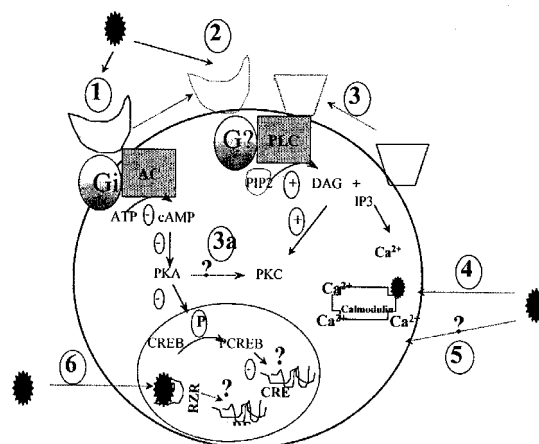


Figura 3. Mecanismos propuestos de la transducción de la señal de la MEL a nivel celular.

La MEL podría lograr su diversidad de acción en el cuerpo utilizando múltiples rutas para transmitir su señal. En el mecanismo 1, se establece que la activación de los receptores para MEL resulta en un decremento de la actividad de la adenilato ciclasa, resultando en un decremento de cAMP. La disminución del cAMP disminuye la actividad de PKA (proteínquinasa A) y consecuentemente la activación o fosforilación de la proteína de unión a los elementos de respuesta (CREB) del cAMP. Las consecuencias de la inactivación de la proteína CREB no han sido establecidas, sin embargo, puede disminuir la transcripción de los genes que contengan elementos de respuestas al cAMP (CREs). Como se muestra en los mecanismos 2, 3 y 3a, la MEL puede también estimular la ruta dependiente de PLC. Sin embargo, no es claro como la MEL activa esta ruta. Como se muestra en el mecanismo 2, el receptor de MEL (mostrado en líneas punteadas de la misma forma como el receptor de MEL) puede acoplarse directamente a la PLC e incrementar la producción de los fosfoinosítidos o también, en otros modelos, la MEL no estimula directamente esta ruta sino solamente aumenta la actividad de esta ruta estimulada por otra clase de receptor (receptor en línea punteada de diferente forma, mecanismo 3). La capacidad de la MEL para entrecruzarse en esta cascada de señal de transducción aún no se conoce pero puede ocurrir a través de quinasas PKA y PKC (mecanismo 3a). Además de actuar a través del receptor la melatonina puede actuar independientemente de los receptores por unión directa a las proteínas citosólicas (Mecanismo 4 ó 5) o a las proteínas nucleares (mecanismo 6).

Además de la cascada dependiente de cAMP, la MEL también estimula la hidrólisis de fosfoinosítido⁷³ (Figura 3, mecanismo 2) y activa las rutas dependientes de PKC⁷⁴ (Figura 3, mecanismo 3). Sin embargo, los mecanismos de estos efectos sobre la PKC no son claros. Recientemente, los reportes han demostrado un efecto de la MEL sobre la síntesis de óxido nítrico,⁷⁵ sin embargo, estos mecanismos aún no se han esclarecido.

Como ya se ha mencionado, varios subtipos de receptores de MEL se han clonado y los estudios están empezando a demostrar su distribución tisular y sus papeles funcionales a través del cuerpo.⁷⁶ Así, se ha hecho más importante desarrollar antagonistas con alta afinidad y selectividad a los diferentes subtipos de receptores de MEL, para determinar si ciertos efectos fisiológicos de la MEL son mediados a través de subtipos de receptores específicos. Actualmente, hay

reportes de antagonistas putativos a receptores MT₂⁷⁷ y su habilidad para antagonizar efectos funcionales en varios tejidos también se ha demostrado.⁷⁸

2.6. Aminoácidos que participan en la activación de los receptores de MEL

Los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ son receptores acoplados a proteína-G y poseen siete dominios transmembranales conectados por asas intra- y extracelulares. La capacidad de la MEL para enlazarse, activar y modular sus receptores depende de su interacción con ciertos aminoácidos y/o dominios.

El análisis de la unión de la MEL a su receptor y los cambios resultantes que inducen activación ha sido ayudado por los modelos recientes de receptores de melatonina que están basados en la estructura cristalina de la rodopsina.⁷⁹ Este modelo propone un sitio de unión para melatonina en el que un residuo de valina y uno de histidina son responsables del reconocimiento del grupo 5-metoxi de la melatonina y unos residuos de serina y alanina son críticos para la unión del grupo funcional *N*-acetilo. Este modelo fue soportado por el análisis de la unión de una serie análogos de melatonina y las alineaciones secuenciales de la melatonina y las aminas biogénicas de los receptores.

Basado en lo anterior, se realizó un estudio de la mutagénesis del R-MT₁ para refutar o apoyar este modelo. La mutagénesis de V208 en el receptor ovino Mel_{1aβ} (MT₁) a un residuo de alanina o valina, resultó en una disminución de 2-5 veces de la unión de 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina en comparación con el receptor original.⁸⁰ Los mutantes son funcionales y sus actividades están en el intervalo de sus afinidades de unión. Estos datos sugieren que estos mutantes afectan únicamente la unión, apoyando la propuesta de que V208 se encuentra en la cavidad de unión del receptor. Sin embargo, los estudios en los que se utilizó *N*-[2-(naftil)etil]acetamida [NEA] o *N*-acetilserotonina no demostraron de manera definitiva la interacción entre V208 y la posición 5 de la melatonina.

En el caso de la histidina, los estudios resultaron muy interesantes. La mutagénesis de H211 en Mel_{1aβ} (MT₁) a fenilalanina o leucina resultó en un decremento en 6-7 veces de la unión de 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina en comparación con el receptor original.⁸⁰ El ensayo de la unión de NEA y *N*-acetilserotonina a los

mutantes H211F y H211L indica que los análogos que carezcan de un grupo metilo del sustituyente 5-metoxi o de un grupo funcional en la posición 5 del núcleo indólico se enlazan igual o mejor a estos mutantes en comparación con el receptor original. Estos estudios soportan claramente la interacción entre H211 y la posición 5 de la melatonina. Un análisis adicional de H211F y H211L indica que estos mutantes no son capaces de inhibir la producción de cAMP.⁸⁰ Estos datos funcionales revelan que el residuo de histidina, además de su papel en la unión al receptor, también participa de manera importante en la activación del receptor.

El papel de la Ser280 y la Ala284 en la unión del grupo N-acetilo no ha sido investigado ampliamente. El único reporte de mutagénesis en estas posiciones se realizó en ensayos con levaduras.⁸¹ Se trató de establecer la funcionalidad de varios mutantes de serina y A284G. El mutante S280A no afectó la función del receptor. El doble mutante S280F y A284G es inactivo, posiblemente debido al gran tamaño del sustituyente fenilalanina. Una limitante sería en este estudio fue la falta del análisis de la unión de ligandos a estos mutantes.

Otros residuos han sido implicados en la unión de la melatonina basándose en los alineamientos de secuencias entre los R-MT₁, los R-MT₂ y proteínas relacionadas. Los aminoácidos de las hélices transmembranales 3, 6 y 7 han sido implicados en la unión de la melatonina. El análisis de las mutaciones S110A y S114A en el receptor humano MT₁ indican que estas mutaciones reducen la unión de 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina por el receptor en 8-9 veces.⁸² Estas mutaciones también disminuyeron la unión de varios agonistas y agonistas parciales a melatonina pero no tuvieron efecto sobre la unión del antagonista luzindol.⁸² Recientemente, se demostró que los residuos de cisteína pueden tener un papel preponderante en la unión de agonistas con alta afinidad a los R-MT₂'s. La mutación de C113 ó C190 a alanina resultó en la pérdida de unión de 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina a R-MT₂'s.⁸³

También se ha determinado la importancia de los dominios de transmembrana 6 (TM6) y 4 (TM4) que promueven la unión de agonistas con alta afinidad. Esto se realizó mediante el estudio de quimeras entre el R-MT₁ y los receptores relacionados con melatonina.⁸⁴ Los resultados de este estudio indican que tanto

TM4 como TM6 de los receptores similares a melatonina necesitan ser reemplazados con los correspondientes dominios del R-MT₁ humano para que ocurra la unión, con alta afinidad, de la 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina.

La investigación en el campo de la mutagénesis revelará los dominios y aminoácidos presentes en los receptores de melatonina que son esenciales para la unión con alta afinidad tanto de agonistas como de antagonistas. Esto facilitará el desarrollo de ligandos selectivos para los receptores de melatonina los cuales pueden ser usados tanto en la investigación como en la clínica.

2.7. Regulación de los receptores de la melatonina

Aun cuando la vida media de la MEL en el cuerpo es relativamente corta (10-40 min), los niveles de MEL alcanzan su máximo y persisten por aproximadamente 8 horas cada noche.⁸⁵ Por lo tanto, cada noche los receptores de MEL están expuestos a la MEL durante periodos prolongados de tiempo. Después de la exposición prolongada a un agonista, puede ocurrir la regulación de los receptores. Esto parece probable para los receptores de MEL, debido a que los estudios han demostrado que estos receptores son regulados y muestran diferentes periodos de “sensibilidad”. Por ejemplo, la densidad y afinidad de los receptores de MEL cambian durante un ciclo de 24 horas después de la exposición a la MEL.⁸⁶ Es crítico para el funcionamiento normal de la MEL en el cuerpo su habilidad para alterar la función de sus propios receptores. Una forma de regulación de receptores, conocida como desensibilización del receptor, es un proceso por el cual un receptor se hace refractario a un agonista con el tiempo. Este “apagamiento” de los receptores puede ser el resultado del desacoplamiento del receptor con la proteína G o la internalización del receptor y/o sub-regulación del receptor (*receptor down-regulation*). Los receptores pueden usar uno, dos o los tres modos de regulación antes mencionados.⁸⁷ En la actualidad, no es claro cuál es el modo de regulación utilizado por los receptores de MEL. Lo anterior debido a la falta de antagonistas reversibles con alta afinidad y selectividad. El uso del agonista 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina ha sido benéfico para elucidar la ubicación del receptor de MEL; sin embargo, debido a su naturaleza agonista, ha sido difícil su aplicación en el estudio de la regulación del receptor de MEL. Los agonistas se

unen a los receptores acoplados a sus respectivas proteínas G. Así, si un receptor se desacopla de su proteína G, entonces un agonista se unirá con baja afinidad a su receptor.⁸⁸ Por ejemplo, una disminución en la unión total de 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina podría ser mal interpretada como una regulación por disminución del receptor cuando, de hecho, la disminución en la unión de 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina se puede deber a una pérdida de afinidad del radioligando por su receptor debido a un desacoplamiento receptor-proteína G. Respecto, al establecimiento de si los receptores de MEL se internalizan después de la exposición al agonista, esta forma de regulación no puede ser estudiada debido a la naturaleza lipofílica de la 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina (Figura 4).

La melatonina se libera de la glándula pineal en una forma circadiana alcanzándose los niveles más altos en la noche lo cuales persisten por aproximadamente 8 horas. Durante el día, los niveles de melatonina disminuyen unas 10 veces y persisten por aproximadamente 16 horas.⁸⁹ Debido a que los receptores de melatonina están expuestos a la melatonina diariamente por tiempos prolongados, se cree que la desensibilización es un componente esencial bajo los efectos funcionales de la melatonina en el cuerpo. La exposición prolongada de los receptores MT₁ a melatonina resulta en la desensibilización de los R-MT₁'s endógenos⁹⁰ y recombinantes.⁹¹ Adicionalmente, la exposición prolongada de los R-MT₂'s recombinantes a melatonina también resulta en su desensibilización.⁹² Se ha demostrado que la desensibilización ocurre en un tiempo ≥ 5 horas, pero no en ≤ 1 hora⁹³ lo que es un buen reflejo de la condición *in vivo*.

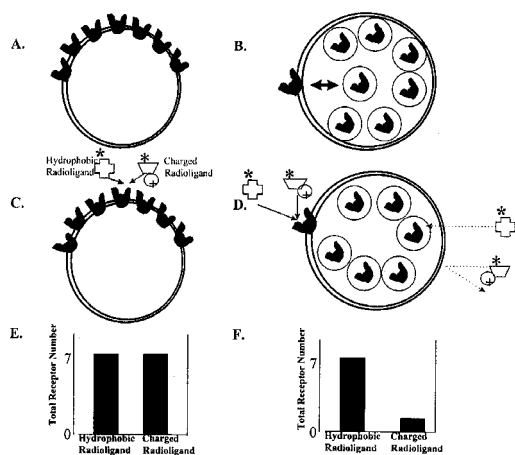


Figura 4. Fundamentos del diseño de ligandos melatoninergicos cargados.

- A. célula con todos sus receptores unidos a la membrana superficial
- B. después de la exposición a la melatonina, ha ocurrido la internalización de los receptores, encontrándose la mayoría de los receptores en vesículas en el interior de la célula. La flecha de doble punta indica que el receptor podría ser "reciclado" a la superficie membranal,

- C. demostrando que el proceso de internalización es un proceso reversible
- D. ambos radioligandos tanto hidrofóbico como con carga pueden unirse a los receptores localizados sobre la superficie
- E. después de la internalización el radioligando cargado no será capaz de unirse a los receptores dentro de la célula debido a que la carga previene que el radioligando penetre las membranas celulares. En contraste, el radioligando hidrofóbico será capaz de unirse a los receptores, tanto en la superficie, como en el interior de la célula
- F. la determinación del número total de receptores en las células presentes en la parte A, usando cualquier radioligando, resultaría en un número total similar de receptores. Sin embargo, si ocurre la internalización, entonces resultaría una disminución en la unión del radioligando cargado sin cambio en la unión del radioligando hidrofóbico.

Un reciente estudio con receptores MT_1 y MT_2 humanos (hR- MT_1 y hR- MT_2) expresados en células CHO determinó que la melatonina puede modular diferencialmente sus receptores. Los hR- MT_1 fueron sometidos a diferentes tiempos de exposición a melatonina a una concentración constante. A 16 horas de haber suspendido la exposición se observó un incremento en la unión específica de la 2-[125 I]-yodomelatonina a los R- MT_1 . El mismo tratamiento no afectó la expresión de los hR- MT_2 . De manera paralela al incremento en la unión específica a los hR- MT_1 , fue el incremento en el mRNA de los hR- MT_1 . El efecto fue un incremento en el número total de receptores h- MT_1 , sin cambiar la afinidad.⁹⁴

Los mecanismos subyacentes a la desensibilización de los receptores de melatonina, los procesos por los cuales los receptores se hacen refractarios a su agonista, son desconocidos. Los receptores de melatonina pueden ser regulados de manera homóloga, o sea por la misma melatonina, o de manera heteróloga, esto es, por otros estímulos tales como el fotoperiodo o el estradiol. En cuanto a la regulación homóloga de los R- MT 's, al parecer el desacoplamiento a proteína-G y la sub-regulación de receptores juegan un papel importante.

2.8. Importancia de desarrollar herramientas para estudiar la regulación de los receptores de melatonina

La internalización es el proceso por el cual los receptores son separados y removidos de la superficie membranal después de la exposición al agonista. Esta forma de desensibilización es utilizada por muchos otros receptores acoplados a proteína G, incluyendo los colinoceptores muscarínicos⁹⁵ y adrenoceptores.⁹⁶ Si los receptores de MEL se internalizan después de la exposición a la MEL, esto no se ha determinado debido a la falta de compuestos rastreadores específicos, esto es, ligandos con carga que sean incapaces de penetrar las membranas y que únicamente se enlacen a los receptores de MEL superficiales (Figura 4). Recientemente se desarrolló un ligando con carga⁹⁷ y radiomarcado.⁹⁸ Aun cuando la afinidad de este ligando por los receptores de MEL es baja, esto es un avance para el desarrollo futuro de ligandos con carga y mayor afinidad.

Junto con el desarrollo de agonistas, es importante la obtención de antagonistas con alta afinidad y mayor selectividad a los diferentes subtipos de receptores con el fin de determinar los métodos de regulación de los receptores de MEL.

2.9. Importancia de desarrollar herramientas para estudiar la función y regulación de los subtipos de receptores de melatonina

La discusión precedente se enfocó en el desarrollo de antagonistas reversibles a receptores de MEL, sin embargo, el desarrollo de ligandos de alta afinidad y de tipo irreversible también juega un papel importante en el estudio de las interacciones ligando-receptor. Además, proveen información cualitativa sobre el receptor (v. gr., tamaño molecular, estructura, estados de glicosidación, etc.).⁹⁹ Estos ligandos irreversibles también podrían ayudar en la determinación de los dominios en el receptor que son importantes para la unión al ligando.

En el campo de los receptores de MEL, aquellos compuestos que permitan sondear los sitios receptores se encuentran todavía en desarrollo. Al presente, se han desarrollado dos ligandos de afinidad: el *N*-bromoacetil-5-metoxi-2-yodotriptamina¹⁰⁰ y la *N*-[2-(2-bromoacetil-7-metoxinaftil)etil]propionamida (BMNEP).¹⁰¹ El último compuesto tiene gran importancia debido a que se alquila en el receptor MT₂ con una alta afinidad.¹⁰¹ También se ha determinado que

BMNEP actúa como agonista en los receptores MT₂ resultando en su permanente activación mientras que tiene una actividad como agonista parcial en receptores MT₁ (Figura 3).

2.10. Modelos propuestos para el sitio receptor de melatonina

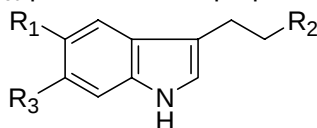
Con la intención de hallar sustancias que permitan determinar la topología de los sitios de los diferentes tipos de receptores a MEL, se han sintetizado y evaluado varios tipos de compuestos con diversas variantes estructurales. A continuación se hace una revisión de los diferentes enfoques y estrategias que se han realizado para tipificar los requerimientos estructurales de los sitios de unión de la MEL, lo anterior en un afán de lograr ligandos con una alta afinidad y mayor selectividad.

La propuesta inicial para un modelo de receptor de melatonina fue realizada por Lewis y col., en 1990.¹⁰² El modelo correlaciona el valor de CI₅₀, inhibición de la liberación de dopamina, con la polarizabilidad molecular y el valor energético del HOMO para una serie de compuestos que se caracterizan por presentar un núcleo indólico como anillo base (Tabla 1). La mejor correlación se obtiene entre el producto de la polarizabilidad molecular y el valor energético del HOMO. Estos parámetros aislados no presentan una buena correlación. También se observa una baja correlación entre la carga atómica del nitrógeno indólico y la actividad biológica. Considerando que reportes previos indican que existe un alta correlación entre la polarizabilidad molecular y log P,¹⁰³ los autores proponen que un componente hidrofóbico y otro electrónico, como lo es la energía del HOMO, son importantes para la interacción ligando-receptor. También realizan cálculos del potencial molecular electrostático (PME) de la serie de compuestos, utilizando una combinación de los métodos Newton-Raphson y Simplex para obtener las conformaciones de menor energía, con las cuales se realizan los cálculos de propiedades electrónicas, empleando el método semiempírico CNDO/2.¹⁰⁴ Aunque se muestra el potencial molecular electrostático para la MEL, no se reporta la conformación obtenida durante la minimización (optimización) energética de la molécula. Este será uno de los puntos importantes a considerar en las investigaciones subsecuentes, como se verá posteriormente. El cálculo del PME

no permite establecer alguna correlación con la actividad biológica, pero permite especular sobre la naturaleza o el arreglo del sitio receptor. Este planteamiento es válido si se considera que en la interacción ligando-sitio receptor participan fuerzas de tipo electrostático las cuales, aunque débiles, son las promotoras iniciales del reconocimiento ligando-sitio receptor. Además, la disposición de los mínimos y máximos energéticos del PME sugiere una posible secuencia de aminoácidos complementaria a aquellos.

Bajo este enfoque y tomando en cuenta la similitud con el receptor 5-HT, los autores proponen una secuencia Ser-Trp-Gly-Ala-Gln para el sitio receptor de MEL, en el cual es probable la interacción tipo van der Waals entre el residuo de triptófano y el anillo indólico, un puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del grupo metoxilo y el residuo de serina y dos puentes de hidrógeno entre el grupo acetamido y el residuo de glutamina. Es necesario señalar que en estudios previos se había observado que la ausencia del grupo 5-metoxilo o del grupo acetamido disminuía la actividad biológica y la afinidad, respectivamente.^{37,38}

Posteriormente a estos estudios, se obtuvo la 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina, radioligando con alta afinidad por los sitios receptores de MEL,⁴¹ que junto con el desarrollo de bioensayos de receptores *in vitro*, de tipo cuantitativo, condujo a la localización de los sitios de acción de la MEL en regiones discretas del cerebro, retina y pituitaria en vertebrados, cuando inicialmente dichos sitios se localizaban mediante técnicas inmunohistológicas¹⁰⁵ además de que hizo posible la caracterización farmacológica de los receptores de MEL.

Tabla 1. Valores de Cl_{50} para el modelo propuesto por Lewis y col.¹⁰²

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
Melatonina	OCH ₃	NHCOCH ₃	H
6-Cloromelatonina	OCH ₃	NHCOCH ₃	Cl
6-Metoximelatonina	OCH ₃	NHCOCH ₃	OCH ₃
6-Hidroximelatonina	OCH ₃	NHCOCH ₃	OH
5-Metoxitriptamina	OCH ₃	NH ₂	H
5-Metoxidimetiltriptamina	OCH ₃	N(CH ₃) ₂	H
5-Metoxitriptofol	OCH ₃	OH	H
N-acetil-5-hidroxitriptamina	OH	NHCOCH ₃	H
N-acetiltriptamina	H	NHCOCH ₃	H
Triptamina	H	NH ₂	H

Compuesto	α_{mol}	E (HOMO)	log Cl_{50} (nM)	$\alpha \cdot \text{HOMO}$
Melatonina	67.9593	-10.3758	1.3979	257.35
6-Cloromelatonina	69.4699	-10.6207	1.3979	269.28
6-Metoximelatonina	75.0777	-10.0112	-0.2041	274.31
6-Hidroximelatonina	69.6541	-9.9867	-0.3010	253.87
5-Metoxitriptamina	57.7739	-10.3894	-1.7993	219.06
5-Metoxidimetiltriptamina	68.0311	-10.2969	-2.3010	255.66
5-Metoxitriptofol	55.8271	-10.4819	-3.6021	213.57
N-acetil-5-hidroxitriptamina	62.3848	-10.3513	-1.7324	235.68
N-acetiltriptamina	60.6346	-10.3921	-0.7324	229.97
Triptamina	50.5628	-10.4653	-4.000	193.13

$$\alpha_{mol} = A^3 \times \beta^{-1}$$

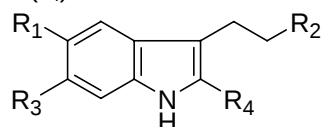
$$E(\text{HOMO}) = \text{eV}$$

log Cl_{50} = log inverso de la concentración requerida para inhibir la liberación, calcio-dependiente, de [³H]-dopamina en retina de conejo.

$\alpha \cdot \text{HOMO}$ (producto de α corregido por la energía de HOMO)

$$\alpha = \alpha_{mol} \times -0.365$$

Mediante el empleo de este radioligando, 2-[¹²⁵I]-yodomelatonina, Lewis y colaboradores¹⁰⁶ determinaron la constante de afinidad para catorce compuestos, con esqueleto básico de triptamina, en membranas de cerebro de pollo (Tabla 2). Dubocovich ya había implementado la metodología en este tipo de células y su posterior utilización se hizo de manera rutinaria.

Tabla 2. Constantes de afinidad (K_i) en membranas de cerebro de pollo (Lewis y col.).¹⁰⁶

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	K _i (nM)	pK _i
2-cloromelatonina	OCH ₃	NHCOCH ₃	H	Cl	0.024	10.62
Melatonina	OCH ₃	NHCOCH ₃	H	H	0.24	9.62
6-Fluoromelatonina	OCH ₃	NHCOCH ₃	F	H	0.36	9.44
6-Cloromelatonina	OCH ₃	NHCOCH ₃	Cl	H	0.58	9.24
6-Hidroximelatonina	OCH ₃	NHCOCH ₃	OH	H	6.3	8.20
5-Metoxi- <i>N</i> -isobutanoiltryptamina	OCH ₃	NHCOPr ⁱ	H	H	6.1	8.21
5-Metoxi- <i>N</i> -valeroiltryptamina	OCH ₃	NHCOBu	H	H	12.6	7.90
6-Metoximelatonina	OCH ₃	NHCOCH ₃	OCH ₃	H	31.7	7.50
<i>N</i> -acetil-5-metiltryptamina	CH ₃	NHCOCH ₃	H	H	146.8	6.83
<i>N</i> -acetil-5-benzoiltryptamina	OCH ₂ φ	NHCOCH ₃	H	H	170.0	6.77
<i>O</i> -acetil-5-metoxitryptamina	OCH ₃	OCOCH ₃	H	H	242.2	6.62
<i>N</i> -acetiltryptamina	H	NHCOCH ₃	H	H	730	6.14
<i>N</i> -acetil-5-hidroxitryptamina	OH	NHCOCH ₃	H	H	488	6.31
5-Metoxitryptamina	OCH ₃	NH ₂	H	H	2528	5.60

De manera similar a su trabajo previo, Lewis realizó los estudios de mecánica molecular y el cálculo de propiedades electrónicas.¹⁰² Además, se determinó la correlación entre la diferencia energética (ΔE) de los orbitales frontera y la actividad biológica. También se consideró como descriptor a Q_{NH} que representa la densidad electrónica en el HOMO del átomo de nitrógeno de la cadena lateral. Así, se obtuvieron las siguientes ecuaciones.

$$pK_i = -841.1 \Delta E^{-1} - 6.26$$

$$n=14, s=1.125, R=0.70 F=11.5$$

Siendo $pK_i = \log 1/K_i$.

La inclusión del término Q_{NH} condujo a la siguiente ecuación:

$$pK_i = 770.7 \Delta E^{-1} + 51.2 Q_{NH} - 58.8$$

$$n=14, s=1.024, R=0.78 F=8.7$$

Pero en esta correlación, el valor de pK_i para melatonina se encuentra muy alejado de la mayoría de los compuestos; la exclusión de su valor de la ecuación mejora de manera significativa la correlación:

$$pK_i = -4.9 \Delta E + 45.3 Q_{NH} + 64.8$$

$$n=13, s=0.699, R=0.90 F=21.6$$

Esto sugiere que, para la melatonina, se necesitan considerar factores adicionales, no representados en este análisis, que puedan explicar su valor de

afinidad. Se desprende de este análisis que el grupo amida de la melatonina puede participar en la formación de un puente de hidrógeno. Esto es indicado por la inclusión del término Q_NH , que corresponde a la carga electrónica del átomo de nitrógeno de la amida de la cadena lateral. Este grupo participaría como un donador de hidrógeno en la formación del puente correspondiente, mediante un interacción de transferencia de carga, de tipo cooperativo, asistida por las características electrónicas de tipo donador–aceptor del núcleo indólico. Además, la inclusión del ΔE en las ecuaciones puede reflejar un apilamiento del núcleo indólico, de los derivados de melatonina, con algún(os) aminoácido(s) del sitio receptor. Este tipo de interacciones entre sistemas anulares deslocalizados es asistido por la participación de orbitales frontera entre los dos anillos (Figura 5).

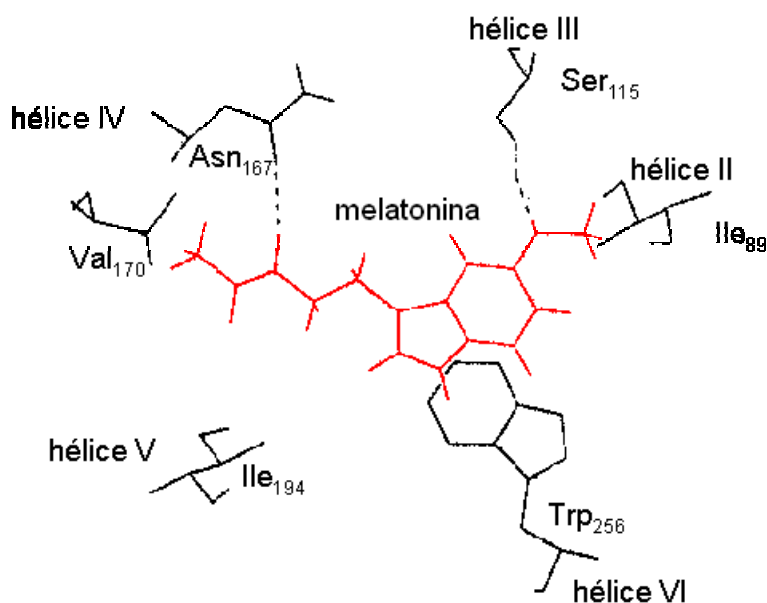


Figura 5. Modelo de interacción melatonina-sitio receptor de acuerdo a Lewis.¹⁰⁶

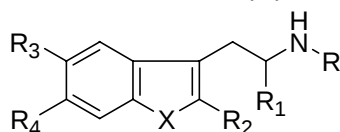
También, en este estudio se propone, con base en el potencial molecular electrostático (PME) de la melatonina y en el modelado de las regiones transmembranales del receptor clonado de melatonina de los melanóforos de *Xenopus*,¹² un modelo en el cual puede ocurrir un puente de hidrógeno entre los grupos 5-metoxi y acetamido de la melatonina con los residuos de aminoácidos Ser₁₁₅ y Asn₁₆₇ en las hélices transmembranales III y IV, respectivamente (Figura 5). También se propone un traslape del residuo Trp₂₅₆ de la hélice VI con el anillo

indólico de la melatonina, permitiendo una transferencia de carga entre el receptor y el ligando como lo sugiere ΔE en las ecuaciones QSAR.

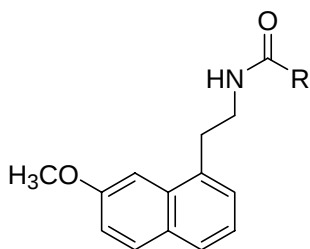
Un estudio, que resultó novedoso en su enfoque, fue el realizado por Navajas y col.⁷⁹ En éste se propuso la interacción ligando-receptor para un conjunto de compuestos con anillo aromático de tipo indólico y naftalénico, usando como modelo de receptor el de la rodopsina propuesto por Baldwin.¹⁰⁷ Este modelo es general para la familia de los receptores acoplados a proteína G, como es el caso de la rodopsina, la cual media la activación, inducida por luz, del 11-cis retinal. Navajas aplicó el análisis 3D-QSAR (Three Dimensional Quantitative Structure Activity Relationship; relación cuantitativa estructura-actividad en tres dimensiones) al utilizar la metodología CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis; Análisis Comparativo del Campo Molecular)¹⁰⁸ para proponer un modelo de las propiedades estructurales necesarias en la unión al sitio receptor de la melatonina.

Este método determina la relación entre la actividad biológica de un conjunto de compuestos, alineados de acuerdo a una estructura base, y sus propiedades estéricas y electrónicas en tres dimensiones (denominados campos moleculares). Los resultados del análisis se visualizan en contornos, con colores codificados, que rodean las moléculas permitiendo la identificación visual de regiones responsables de las interacciones favorables o desfavorables con el supuesto sitio receptor.

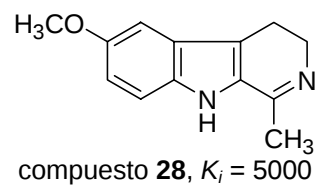
Utilizando compuestos con un núcleo aromático diferente (indólico y naftalénico), Navajas correlacionó su constante de afinidad, determinada en *pars tuberalis* de oveja (Tabla 3), con los parámetros estérico y electrónico. Este fue el primer modelo propuesto para el receptor de melatonina basado en un QSAR en tres dimensiones y considerando la topología del receptor.

Tabla 3. Estructuras de los compuestos utilizados por Navajas en el método CoMFA y sus afinidades relativas (K_i)⁷⁹

Compuesto	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X	K_i
1	COCH ₃	H	Cl	OCH ₃	H	NH	0.06
2	COCH ₃	H	I	OCH ₃	H	NH	0.1
3	COC ₄ H ₉	H	H	OCH ₃	H	NH	0.3
4	COC ₃ H ₇	H	H	OCH ₃	H	NH	0.9
5	COCH ₃	H	H	OCH ₃	H	NH	1
6	COCH ₃	H	H	OCH ₃	Cl	NH	1.3
7	COCH ₃	H	H	OCH ₃	H	S	7
8	COCH ₃	H	H	OCH ₃	OH	NH	8
9	COC ₅ H ₁₁	H	H	OCH ₃	H	NH	40
10	CO(<i>i</i>)C ₄ H ₉	H	H	OCH ₃	H	NH	60
11	COCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	NH	200
12	COC ₄ H ₉	H	H	H	H	NH	200
13	COC ₃ H ₇	H	H	H	H	NH	300
14	COCH ₃	H	H	OH	H	NH	600
15	COCH ₃	H	H	H	H	NH	700
16	CO(<i>i</i>)C ₄ H ₉	H	H	H	H	NH	700
17	H	H	H	OCH ₃	H	NH	4000
18	H	CH ₂ OH	H	OCH ₃	H	NH	6000



Compuest o	R	K_i
19	C ₂ H ₅	0.24
20	CH ₃	1.1
21	(<i>i</i>)C ₃ H ₈	25
22	ciclobutilo	260
23	ciclohexilo	1700
24	C ₅ H ₁₁	3100
25	C ₆ H ₁₃	25000
26	C ₆ H ₅	55000
27	(<i>m</i>) C ₆ H ₃ Cl ₂	120000



De esta manera se propuso la alineación exo del grupo metoxilo de la posición 5 para la molécula de la melatonina; además, con base en los resultados de afinidad, la incorporación de un grupo benciloxi o de un átomo de cloro a dicha posición disminuye de manera sensible la afinidad por el sitio receptor, de lo que se deduce que el grupo 5-metoxilo es importante para el acoplamiento al sitio receptor.

De acuerdo a los resultados obtenidos por el análisis CoMFA, Navajas propone que existen tres regiones en las que la disminución de la densidad negativa incrementa la actividad biológica. Una se localiza alrededor de la posición 6 del núcleo indólico, otra sobre el átomo de nitrógeno exocíclico y otra más cercana al sustituyente del grupo carbonilo de la amida (Figura 6).

También, se observa la existencia de dos regiones en las que el incremento de densidad negativa incrementa la actividad biológica. Una región se localiza cerca del átomo de oxígeno carbonílico en la dirección del enlace C=O, la otra se encuentra cerca del grupo metóxilo en la dirección del enlace O-CH₃ (Figura 6).

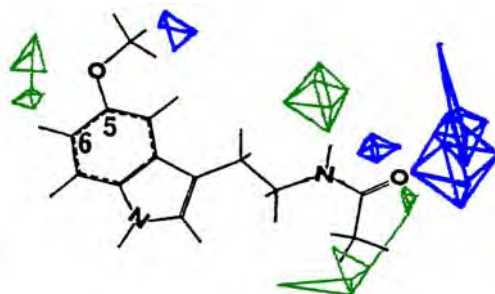


Figura 6. Mapa electrostático de la melatonina según Navajas.⁷⁹ Color verde (20 Kcal /mol) indica una área en la que el decremento en densidad negativa incrementa la afinidad. Color azul (80 Kcal/mol) indica una área en la que un aumento en la densidad negativa incrementa la afinidad.

En cuanto a las propiedades estéricas, se observa una región cercana al grupo 5-metoxilo en la que un incremento en el tamaño del sustituyente incrementa la actividad biológica, algo similar pero con menor intensidad se observa en la posición 2 del anillo indólico (Figura 7).

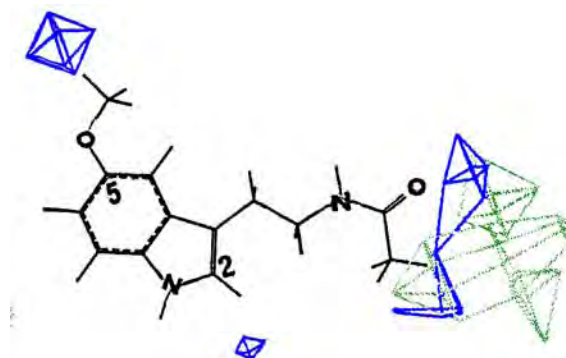


Figura 7. Mapa estérico de la melatonina según Navajas.⁷⁹ Color verde (20 Kcal /mol) indica una área en la que el decremento en tamaño del sustituyente incrementa la afinidad. Color azul (80 Kcal/mol) indica una área en la que un aumento en el tamaño del sustituyente incrementa la afinidad.

También se deduce de estos valores de K_i que:

- el grupo 5-metoxilo es reconocido específicamente y diferenciado del grupo 5-hidroxilo de la *N*-acetilserotonina, la cual muestra una afinidad 600 veces menor que la melatonina (Tabla 3). Además, un grupo voluminoso se tolera en dicha posición.
- El átomo del oxígeno del grupo acetamido es reconocido específicamente y este reconocimiento se espera que se de a una distancia de aprox. 10.8 Å del grupo 5-metoxilo (este es un punto, como se demostrará posteriormente, no del todo válido).
- Una interacción aromática entre el sitio receptor y el anillo indólico que estabiliza el acoplamiento de la melatonina.
- los grupos 5-metoxilo y *N*-acetilo deben estar en un mismo plano (este es un punto, como se demostrará posteriormente, no del todo válido).

La conformación de la melatonina, de acuerdo a Navajas,⁷⁹ estaría en su forma extendida, esto es, el grupo acetamido y el anillo indólico guardan una relación antiperiplanar tomando como eje a los átomos de carbono de la cadena lateral $\text{Ar}-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\text{NHCOCH}_3$ (Figura 8). Esta conformación es la misma que se ha reportado para la melatonina en estado cristalino. Basado en esta conformación Navajas propone las siguientes interacciones de la melatonina con su sitio receptor (Figura 8):

- El átomo de oxígeno del grupo 5-metoxilo forma un puente de hidrógeno con el residuo de histidina (H10) de la TM (transmembrana) V.
- Un residuo de valina (V7) de la TM V, provee el ambiente alifático requerido para el grupo metilo unido al átomo de oxígeno.
- El grupo *N*-acetilo se orienta hacia la hélice VII, donde el residuo de serina (S6), que se orienta hacia la cavidad hidrofóbica, formaría un puente de hidrógeno específico con el oxígeno carbonílico.
- Un residuo de alanina (A10) ubicado hacia abajo del residuo anterior y también con orientación hacia la cavidad hidrofóbica, puede ser una ancla para el grupo metilo unido al grupo carbonilo. Esta cooperación entre S6 y A10 podría ser la explicación a porque grupos alquilo, con más de cuatro átomos de carbono unidos al grupo carbonilo no son tolerados.
- Una interacción aromática que podría ocurrir entre el anillo indólico y la fenilalanina (F9) en la TM VI que está a una distancia apropiada y que se mantiene en todos los receptores de melatonina que se han clonado.

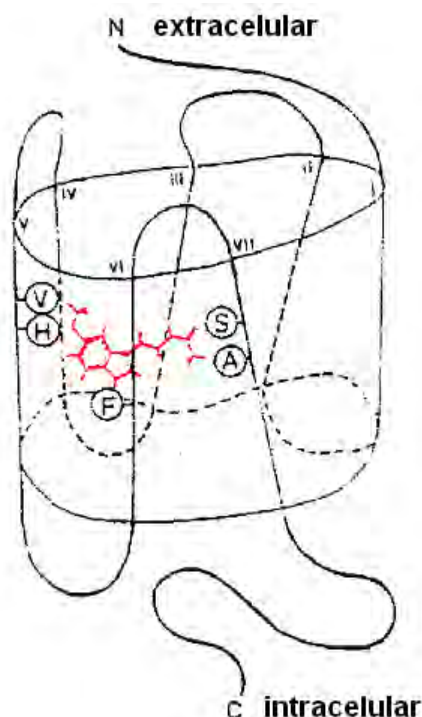
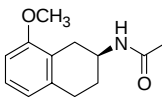
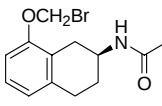
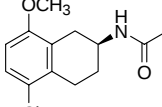
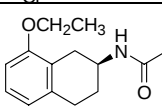
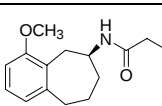
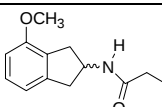


Figura 1. Estructura tridimensional de la melatonina con su sitio receptor de acuerdo a Navajas.

En un trabajo posterior de Grol y col.¹⁰⁹ proponen un modelo basado en una serie de compuestos de los cuales algunos presentan un centro quiral en su estructura (Tabla 4). El análisis conformacional se realizó con MacroModel utilizando MM2* como campo de fuerza y el protocolo de búsqueda Monte Carlo. De manera paralela, fueron obtenidas conformaciones generadas sistemáticamente con el protocolo MULTIC, también implementado en MacroModel. Con los conjuntos de conformaciones, generados por cualquiera de los protocolos citados, se realizó una búsqueda de puntos farmacofóricos teóricos mediante VECADD implementado en el programa APOLLO (Automated

Pharmacophore Location through Ligand Overlap). El objetivo es generar conformaciones en las cuales se formen puentes de hidrógeno con un supuesto sitio receptor. Los puntos posibles de formación de puentes de hidrógeno son: N-H, C=O y el oxígeno del grupo 5-metoxilo. Identificadas las conformaciones, energéticamente favorables para este tipo de interacción, se calcularon las respectivas cargas atómicas con el método semiempírico AM1 (single point, sin optimizar).

Tabla 4. Compuestos utilizados por Grol y col.¹⁰⁹ para derivar su modelo

Retina de pollo				Cerebro de Hámster					
(K _i , nM, absoluta)				(K _i , nM, relativa)		(K _i , nM, absoluta)		(K _i , nM, relativa)	
Melatonina	Comp.	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)		
		0.39	0.39	1	1	73	73	1	1
	1	3881	17.3	9951	44	1776	7070	24	97
	2	143	1.67	367	4	1729	9914	24	136
	3	96.8	50.4	248	129	146	1892	2	26
	4	367	81.5	941	209	1664	15877	23	217
	5b	180	17.4	462	45	21157	4964	290	68
	6b	530	10000	1359	25641	7336	4091	100	56

Estos resultados indican que los compuestos presentan una mayor afinidad hacia los receptores MT₂ (retina de pollo) que hacia los receptores MT₃ (cerebro de hámster). También se puede apreciar que los isómeros levorrotatorios presentan mayor afinidad, en el caso de MT₃, que los dextrorrotatorios, a excepción de **6b**. Por el contrario, son los isómeros dextro los que presentan mayor afinidad hacia el receptor MT₃ que los levo, a excepción de los compuestos **5b** y **6b**. Esto sugiere que la melatonina debe interactuar con diferentes

conformaciones en estos sitios receptores. La configuración en el centro asimétrico de estos compuestos es **S**. Considerando todo lo anterior se construyó un modelo de receptor de melatonina, con la secuencia de aminoácidos ya conocida, pero su esqueleto se diseñó por analogía con el de la bacteriodopsina.

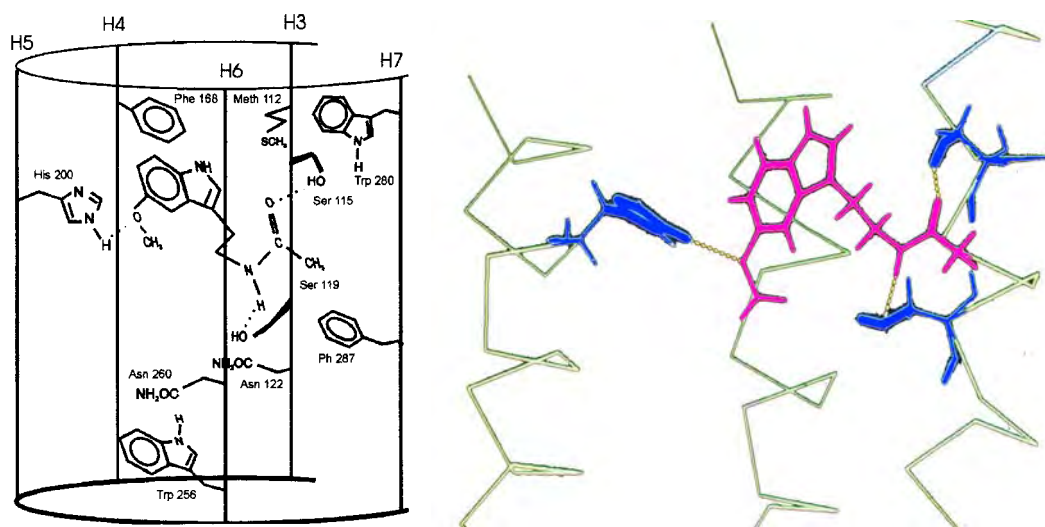


Figura 9. Modelo de interacción de la melatonina con su sitio receptor de acuerdo a Grol y col.¹⁰⁹

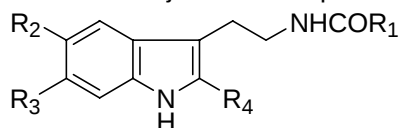
Las posibles interacciones propuestas en este modelo son (Figura 9):

- El grupo amido puede interactuar con los residuos de serina 115 y 119 (TM III), siendo una donador de puentes de hidrógeno y el otro aceptor de puentes de hidrógeno.
- Un residuo de histidina 200 (TM V) podría formar un puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo 5-metoxilo. Esta propuesta es interesante considerando que los compuestos 5-metoxi sustituidos se comportan como agonistas, mientras que los 5-hidroxi sustituidos no presentan este comportamiento, lo que indica que hay una interacción con un residuo que sólo es capaz de formar puentes de hidrógeno pero como donador.
- Una posible interacción de los aminoácidos de fenilalanina 168 y 287 y el triptófano 280 con el anillo aromático de la melatonina.

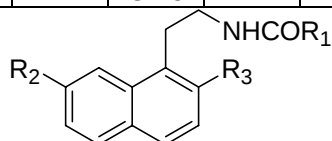
Sicsic y col.¹¹⁰ también realizaron un modelado molecular de los puntos farmacofóricos de la melatonina empleando el método CoMFA con un conjunto de 48 compuestos. Lo destacado de este estudio fue la diversidad de núcleos aromáticos empleados (indol, naftaleno, benceno). Además de los diversos

patrones de sustitución, tanto en la parte aromática, como en la cadena lateral (Tabla 5).

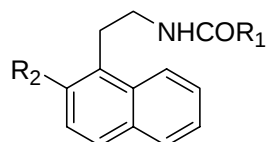
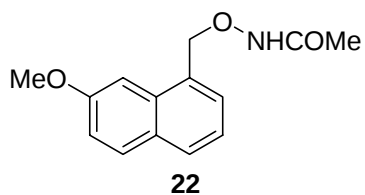
Tabla 5. Conjunto de compuestos para el estudio CoMFA realizado por Sicsic¹¹⁰



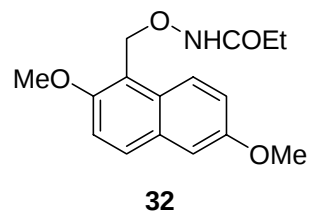
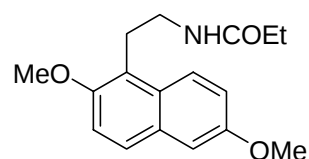
comp...	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	Me	OMe	H	H
2	Me	OMe	H	I
3	Me	H	F	H
4	Me	H	H	H
5	nPr	OMe	F	H
6	cPr	OMe	F	H
7	cPr	OMe	H	H
8	NH-Pr	OMe	H	H
9	NH-Pr	OMe	F	H

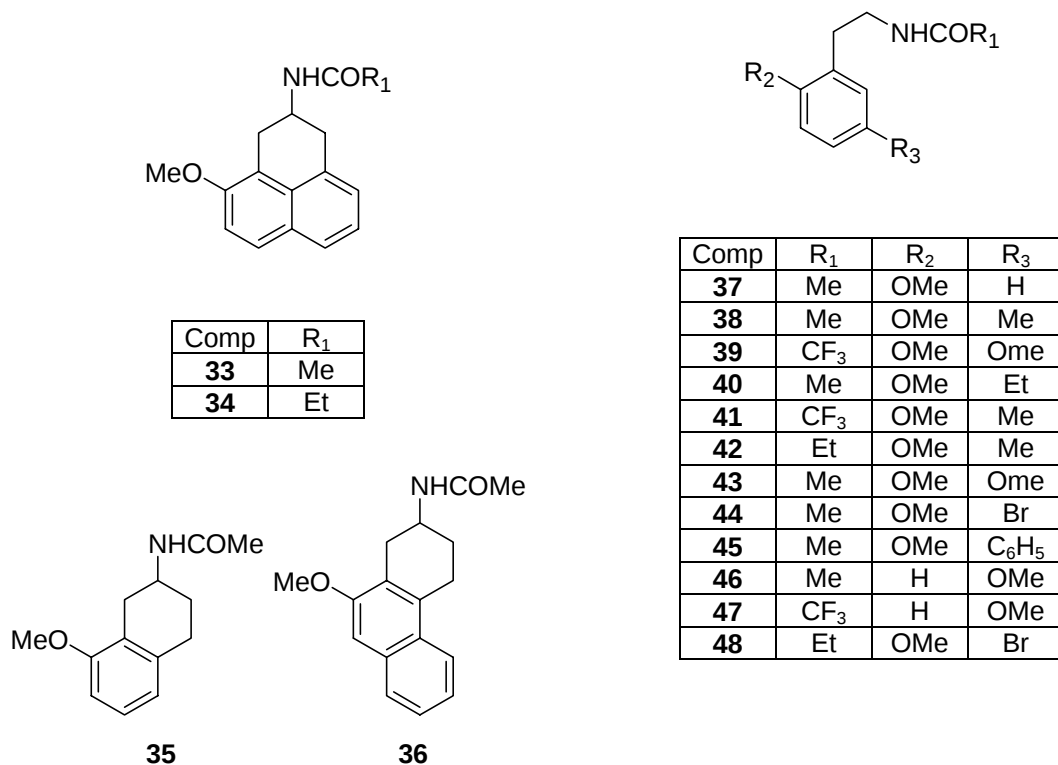


comp.	R ₁	R ₂	R ₃
10	Me	OMe	H
11	Et	OMe	H
12	Pr	OMe	H
13	CH ₂ Br	OMe	H
14	Bu	OMe	H
15	Me	OH	H
16	H	OMe	H
17	Me	H	H
18	Bu	H	H
19	Me	OMe	OMe
20	Et	OMe	OMe
21	CF ₃	OMe	OMe



Comp	R ₁	R ₂
23	Me	OMe
24	Et	OMe
25	Pr	OMe
26	cPr	OMe
27	CF ₃	OMe
28	Me	OMe
29	CF ₃	OEt
30	Et	OEt





En este estudio la molécula patrón fue el compuesto **33** y con base en ésta se alinearon todas las estructuras. El modelo resultante se puede apreciar en la Figura 10.

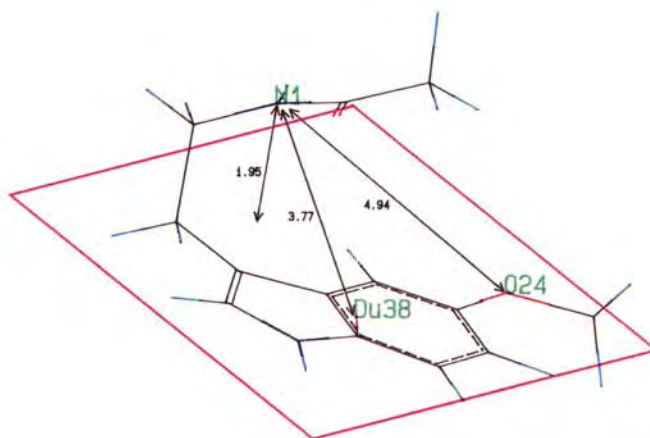
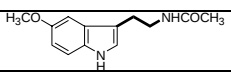
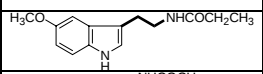
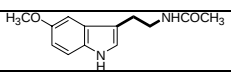
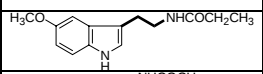
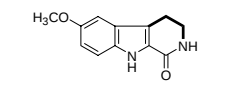
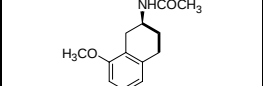
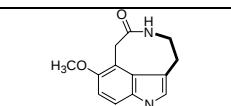
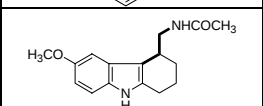
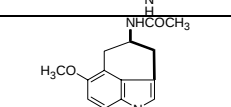
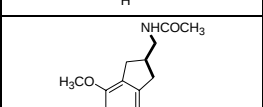
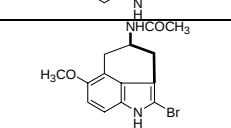
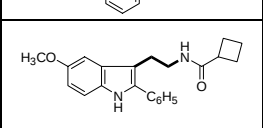
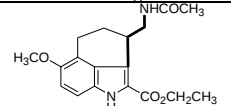
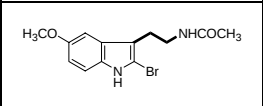
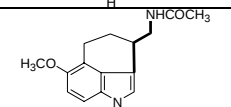
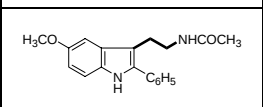
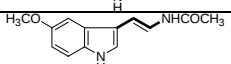
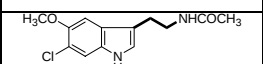
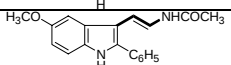
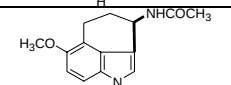
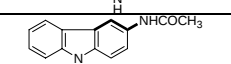
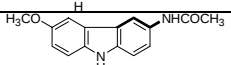
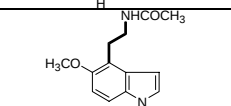
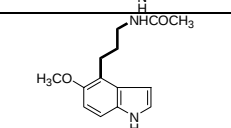
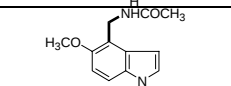


Figura 10. Puntos farmacofóricos de la melatonina según Sicsic.¹¹⁰

La estructura plegada de la cadena lateral se caracteriza por tres distancias: la altura del nitrógeno de la amida sobre el plano del anillo indólico, 1.95 Å; la distancia entre N1 y el centroide del anillo indólico Du38, 3.77 Å; y la distancia entre el N1 y el O24 del grupo 5-metoxilo.

Spadoni¹¹¹ propuso otro modelo pero empleando otro tipo de ligandos en los cuales se mantuvo rígida la cadena lateral (Tabla 6).

Tabla 6. Estructuras de los compuestos utilizados por Spadoni (Afinidades relativas (K_i)).
Determinación en Tecta óptico de codorniz

Comp.		K_i (nM)	afinidad relativa	Comp.		K_i (nM)	afinidad relativa
1 Mel		0.61	1	16		Nt	Nt
2		910 0	15000	(S)-29			81
3		120 0	1950	30			1.64
4		330	550	31			131
5		20	33	32		1900	3230
6		0.48	0.77	2-Br-mel		0.036	0.059
7		2.7	4.5	2-fenilmel		0.017	0.028
8		8.0	13.2	6-Cl-mel		0.99	1.6
9		0.39	0.64				
10		Nt	Nt				
11		820	1360				
12		63	100				
13		360	590				
14		Nt	Nt				
15		Nt	Nt				

Se realizó el modelado molecular de todos los compuestos con Sybyl 6.3, empleando como campo de fuerza Sybyl para la minimización energética correspondiente. Los conformeros resultantes se analizaron mediante DISCO™ (DIStance COmparison) tomando como molécula patrón a la melatonina. Este programa genera múltiples hipótesis de sitios farmacofóricos a partir de un conjunto de compuestos bioactivos. Para este estudio se consideraron como sitios farmacofóricos: el centroide aromático, los tres heteroátomos, y cuatro puntos orientados hacia la posible formación de puentes de hidrógeno (Figura 11). Con estos resultados se propusieron los modelos indicados en la Figura 12.

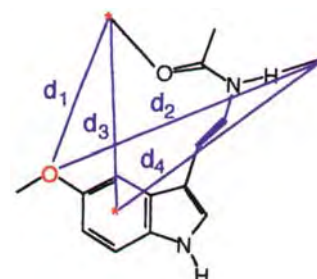


Figura 11. Puntos farmacofóricos.

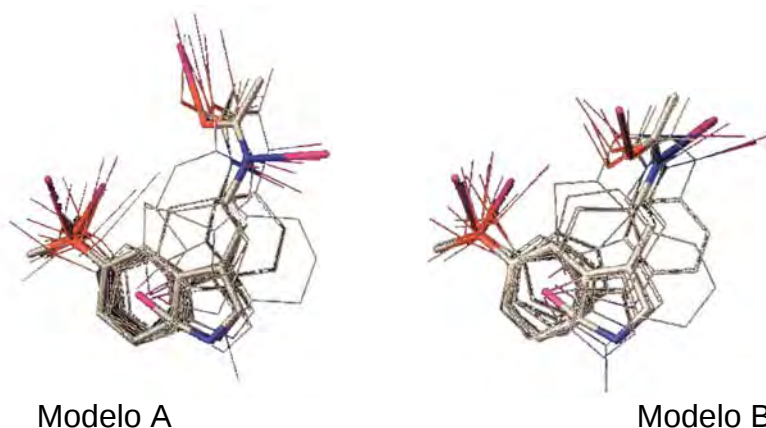
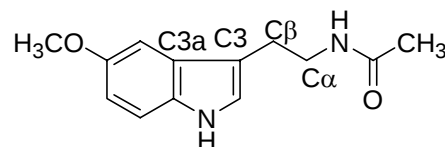


Figura 12. Superposición de compuestos con alta afinidad al receptor de melatonina según Spadoni.¹¹¹ La estructura de la melatonina se representa en líneas gruesas; los pares electrónicos se representan en rojo; las prolongaciones de los pares electrónicos, las prolongaciones de los puentes N-H y el centroide hidrofóbico se representan en morado.

Lo sobresaliente de este trabajo es la orientación de la cadena lateral, ya que este es el primer modelo en el cual se emplea un compuesto con un centro quiral y un núcleo indólico (Tabla 6, compuesto 30). La orientación de la cadena lateral en ambos modelos es la siguiente:

	τ_1	τ_2	τ_3
Modelo A	79.1	178.4	78.3
Modelo B	81.6	-179.8	-174.7

Definición de ángulos de torsión $\tau_1 = \text{C3a-C3-C}\beta\text{-C}\alpha$; $\tau_2 = \text{C3-C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N}$; $\tau_3 = \text{C}\beta\text{-C}\alpha\text{-N-CO}$



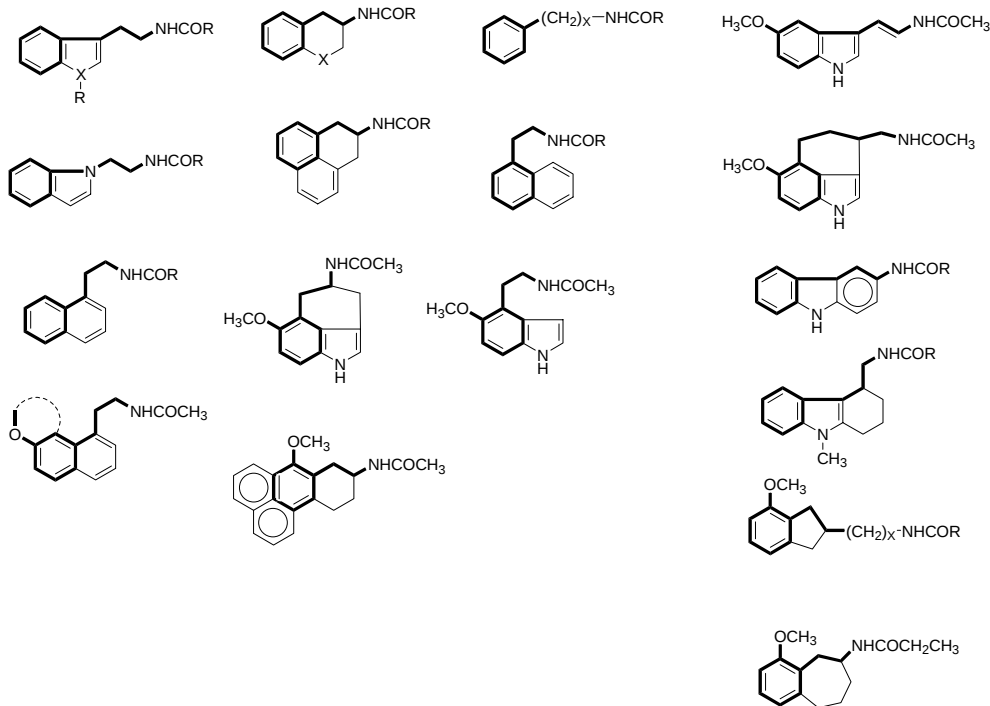


Figura 13. Patrón de los subconjuntos de compuestos utilizados por Mor.¹¹²

región de la posición 2 (verde) mientras que los sustituyentes en la posición 6 y 7 causan una disminución en la afinidad (región roja). También se aprecia una región estérica positiva (región verde) en la cercanía del grupo *N*-acilo.

La cadena lateral está orientada ortogonalmente con respecto al anillo indólico, guardando una relación anti entre dicho anillo y el grupo acetamido ($\approx 180^\circ$). El modelo propuesto se ilustra en la Figura 14.



Figura 14. Modelo de relación espacial de la melatonina según Mor.¹¹² Verde: estérico positivo; rojo: estérico negativo; gris: electrostático positivo; magenta: electrostático negativo.

Es conveniente señalar que algunos datos de afinidad se obtuvieron de la literatura, por lo cual algunos valores son de ensayo en tecta óptico de codorniz y otros de cerebro de pollo, por lo que los valores se expresan como afinidad relativa (RA) en relación al valor de la melatonina.

Casi de manera simultánea el grupo del Dr. Marot¹¹³ publicó sus hallazgos sobre un estudio similar con un conjunto de 142 compuestos, y de igual manera empleó el método CoMFA. A diferencia del estudio realizado por Mor y col.,¹¹² la variable dependiente fue el valor de pCl_{50} de unión, determinado en membranas de *pars tuberalis* de oveja. Los esqueletos anulares se indican en la Figura 15 y la mayoría de ellos constan de la cadena lateral de etilamido y un grupo alcoxi en el anillo.

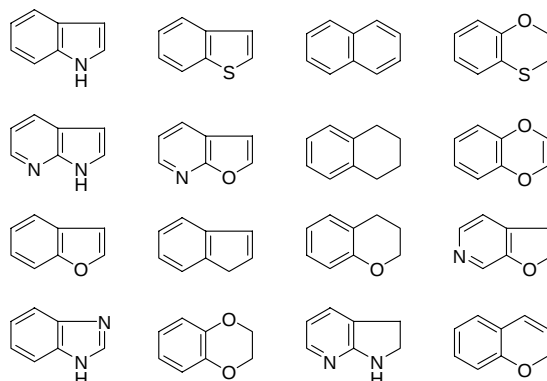


Figura 15. Esqueletos anulares utilizados en la serie de compuestos analizados por Marot y col.¹¹³

También se incluyeron compuestos en los que se restringió la conformación del grupo metoxilo y del grupo etilamido mediante la incorporación de anillos (Figura 16).

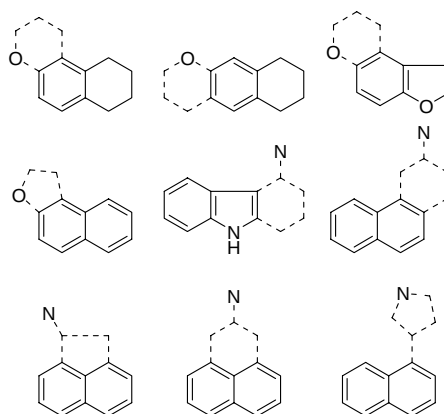


Figura 16. Estructuras con conformación “anclada” de la cadena lateral.

Cabe detallar la realización del análisis conformacional para este estudio, el cual se realizó mediante el proceso de búsqueda al azar. Esta técnica sirve para localizar el mínimo energético de un compuesto y consiste en el cambio de torsión, al azar, de ciertos enlaces seguido de una minimización energética. El ciclo de cambio y minimización se repite varias veces. Después de cada ciclo la nueva conformación se compara con las previamente encontradas para ver si es única. Las conformaciones generadas durante la búsqueda se optimizan mediante el método semiempírico AM1. Una particularidad en este estudio fue utilizar la conformación de la 2-yodomelatonina como matriz para alinear los otros compuestos. Los puntos considerados para realizar el alineamiento se indican en la Figura 17. El arreglo obtenido se muestra en la Figura 18.

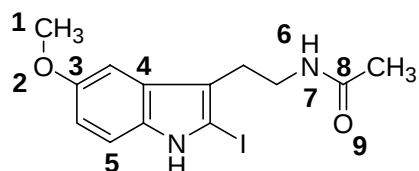


Figura 17. Puntos considerados para el alineamiento de los compuestos.

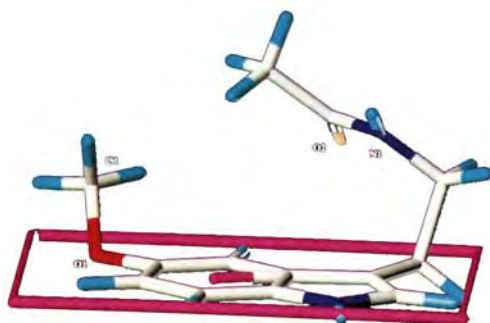


Figura 18. Arreglo espacial de la 2-yodomelatonina.

Los campos moleculares considerados fueron: estérico, electrostático y lipofílico. El último campo se calculó mediante el potencial lipofílico molecular.¹¹⁴ El modelo propuesto se ilustra en la Figura 19.

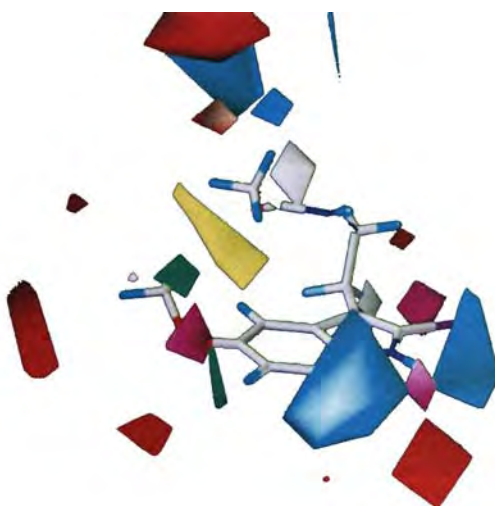


Figura 19. Resultados gráficos de los campos estérico, electrostático y lipofílico con 2-yodomelatonina. (rojo= campo estérico disminuye la afinidad, verde campo estérico incrementa la afinidad; blanco= carga positiva incrementa la afinidad, morado= carga negativa incrementa la afinidad; azul=hidrofobicidad incrementa la afinidad, amarillo= lipofilicidad incrementa la afinidad).

En resumen, todos los modelos coinciden en que los grupos 5-metoxilo y etilamido son puntos farmacofóricos importantes en la interacción melatonina-sitio receptor. Un punto que no se ha destacado es la interacción del anillo indólico. Por otra parte, si consideramos a la melatonina, como se ilustra en la Figura 20, cuando la cadena lateral se orienta sobre el plano del papel diremos que es orientación supra mientras que la orientación contraria sería antara.

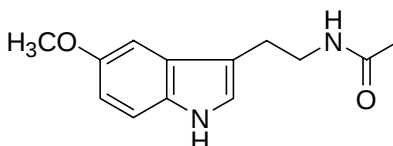


Figura 20. Definición de caras heterotópicas de la melatonina.

Por lo tanto, en todos los modelos, a excepción de los de Lewis y Navajas, la cadena lateral presenta una orientación ortogonal supra con respecto al anillo indólico, pero en el modelo de Sicsic esta orientación es antara. Basándose en el hecho que el compuesto A (Figura 21) presenta una mejor constante de afinidad que su enantiómero, compuesto B, la orientación supra es la que debe prevalecer.¹¹⁵

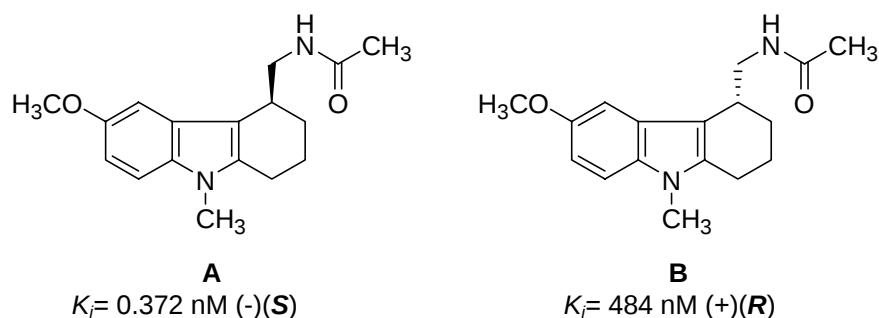


Figura 21. Compuestos isoméricos.

La configuración de éstos y otros compuestos se determinó, de manera indirecta, mediante Difracción de Rayos X y Dicroísmo Circular, lo que condujo a asignar de manera inequívoca la orientación de la cadena lateral como supra.¹¹⁵

También la orientación del grupo metoxilo varía en cada modelo. Mientras que en algunos casos está orientada hacia la cadena lateral (orientación exo) en otros lo está hacia el anillo aromático (orientación endo).

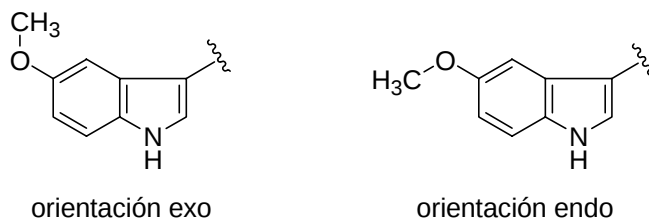


Figura 22. Orientaciones del grupo metoxilo.

El hecho de que la incorporación de un átomo de cloro en la posición 6 del anillo indólico mejora la afinidad, es indicativo de que la orientación exo es la favorecida debido a que el átomo de cloro, por su tamaño, obliga a que el grupo metoxilo adopte esta orientación. Además, cuando se compara la afinidad de compuestos en los cuales se encuentra un anillo de pirano o furano fusionado en

las posiciones 4,5 con sus isómeros estructurales que presentan anillos fusionados en las posiciones 5,6 se observa que los primeros tienen un mejor valor de afinidad que los segundos (Figura 23). Por lo tanto, los modelos que presenten esta orientación serán un reflejo de este comportamiento.

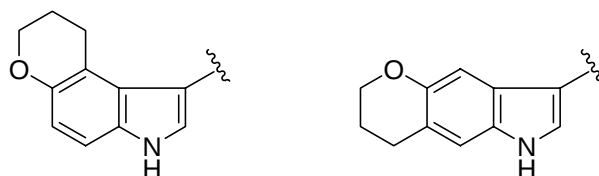


Figura 23. Modelo con anillos de pirano fusionados.

En la tabla 7 se resumen las conformaciones espaciales observadas en los diferentes modelos.

Tabla 7. Conformaciones principales de los diferentes modelos estructurales para melatonina

Modelo	Conformación cadena lateral	Conformación grupo metoxilo
Lewis	Desplegada	Endo
Navajas	Desplegada	Exo
Grol	Ortogonal supra	Exo
Sicsic	Ortogonal antara	Endo
Spadoni (A)	Ortogonal supra	Endo
Spadoni (B)	Ortogonal supra	Endo
Mor	Ortogonal supra	Exo
Marot	Ortogonal supra	Exo

Por todo lo anterior, se puede considerar a los modelos de Mor y Marot como los que mejor representan la conformación de la melatonina en el sitio receptor. La diferencia entre ambos modelos se localiza en el fragmento $-CH_2-NH-CO-CH_3$. Sin embargo, el modelo de Marot emplea como molécula patrón a la 2-yodomelatonina, punto importante si se toma en cuenta que dicha sustancia presenta un valor de afinidad 10 veces mayor que la misma melatonina.

3. Planteamiento del problema

- Las posibilidades de la melatonina como agente terapéutico en la práctica médica son muy amplias, sin embargo, la vida media de esta sustancia es corta (15-30 min).
- Aunque se ha logrado obtener sustancias que presentan una mayor afinidad a los receptores de melatonina que su ligando natural, no existen compuestos que actúen *in vivo* de manera semejante o mejor que la melatonina.
- Hasta el momento se han identificado tres tipos de receptores a melatonina (MT₁, MT₂, MT₃) pero no se cuenta con sustancias que puedan diferenciar estos receptores.
- A pesar de que se conocen con precisión los componentes y la secuencia de transmisión de la señal fotoperiódica desde el medio ambiente hasta la glándula pineal, se desconoce el mecanismo por el cual la melatonina transmite su mensaje de duración del día, siendo este el responsable de las respuestas fotoperiódicas.
- Aunque se ha dilucidado que la melatonina actúa a nivel de receptores, no se ha determinado qué factores influyen en la regulación de su acción sobre dichos receptores.

Por todo lo anterior, sería provechoso contar con compuestos que permitan corregir los inconvenientes que posee la melatonina como herramienta en estudios farmacológicos y como agente terapéutico.

Una táctica en la obtención de compuestos con propiedades biológicas similares a la de una sustancia prototipo es, inicialmente, la identificación de los átomos o conjunto de átomos causantes de la actividad biológica y posterior modificación de algún o algunos de estos átomos con el fin de mejorar las propiedades biológicas (disminución de toxicidad, optimización de selectividad, optimización de biodisponibilidad, etc.).

Los resultados de los diversos estudios realizados sobre la actividad biológica de la melatonina señalan la conveniencia de mantener los grupos 5-metoxilo y acetamido, entonces, la alternativa es modificar el anillo indólico. Los modelos propuestos para la interacción MEL-receptor indican que el anillo indólico

interacciona con residuos de aminoácidos aromáticos, lo que lleva a deducir que existe una interacción de tipo electrónico entre éstos y el anillo indólico. Por lo cual la modificación estructural en esta zona de la melatonina, permitiría, en principio, alterar sus propiedades biológicas, además de obtener información sobre el beneficio de realizar dicha modificación y daría origen a sustancias que potencialmente resolverían los inconvenientes antes mencionados.

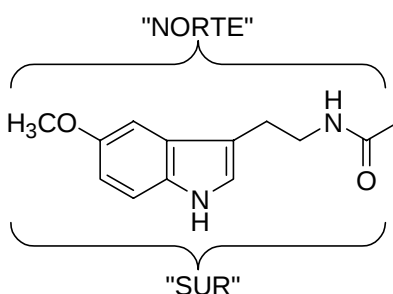
4. Hipótesis

La actividad biológica de la melatonina depende de sus componentes farmacofóricos como son el grupo acetamido, el grupo 5-metoxilo y el anillo aromático de tipo indólico. El reconocimiento melatonina-sitio receptor se presenta, en primera instancia, por las fuerzas electrostáticas tanto del ligando como del sitio receptor, las cuales son el reflejo de sus propiedades electrónicas.

Por lo tanto, manteniendo constantes los grupos 5-metoxilo y acetamido e incorporando sustituyentes al núcleo indólico que modifiquen las propiedades electrónicas de este farmacóforo se alteran las propiedades biológicas de la melatonina. Esta modificación producirá sustancias análogas a la melatonina

Tomando en cuenta los modelos que se han planteado, se proponen las siguientes características estructurales para las sustancias análogas a la melatonina.

Mantener intacta la parte “norte” de la molécula o sea el grupo 5-metoxilo y la cadena de etilamido, modificando la parte “sur “ con sustituyentes en el nitrógeno indólico que promuevan un incremento o un decremento de la densidad electrónica en la parte norte. Se propone la incorporación de sustituyentes bencilo, benzoilo, y fenilo sustituidos.



5. Objetivos

De acuerdo a lo anterior los objetivos del presente trabajo fueron:

- 1.- Realizar modelado molecular (análisis conformacional y cálculo de propiedades electrónicas) de los análogos de melatonina.
- 2.- Sintetizar nuevos análogos 1-*N*-sustituidos de la melatonina que modifiquen las características electrónicas del anillo indólico.
- 3.- Realizar la caracterización estructural de los análogos sintetizados.
- 4.- Determinar la constante de afinidad de los análogos en membranas de cerebro de pollo
- 5.- Evaluar la funcionalidad de los análogos en duodeno aislado de rata.
- 6.- Evaluar el efecto ansiolítico en rata de los análogos.
- 7.- Establecer la correlación entre la estructura química y las actividades biológicas.

Se sabe que el átomo de nitrógeno del núcleo indólico incrementa la densidad electrónica, por efecto resonante, sobre el átomo de carbono de la posición 3 por lo que una manera de modificar esta contribución sería la incorporación de un sustituyente de tipo electroattractor en la posición 1. Se consideró incorporar tres tipos de sustituyentes: un grupo benzoilo que ejerce un efecto de tipo electroattractor, un grupo fenilo que también ejerce el mismo efecto pero que es menos voluminoso que el grupo anterior y un grupo bencilo que también consta de un sistema aromático pero que tiene un átomo de carbono con hibridación sp^3 por lo que el efecto del anillo aromático no se reflejaría en la alteración de la densidad electrónica. También se consideró incorporar sobre estos sustituyentes grupos de tipo electrodonador y electroattractor.

Tabla 8. Análogos de melatonina propuestos

comp.	Serie a	comp.	Serie b	comp.	Serie c
1a		1b		1c	
2a		2b		2c	
3a		3b		3c	
4a		4b		4c	
		5b		5c	

6. Resultados y Discusión

6.1. Modelado molecular de los análogos de melatonina

Con la finalidad de calcular las propiedades electrónicas de la melatonina se realizó inicialmente el análisis conformacional de la cadena lateral mediante el protocolo de Búsqueda Sistemática y empleando el campo de fuerza TRIPOS.

Los resultados indican que la melatonina presenta una orientación antiperiplanar entre el anillo indólico y el grupo acetamido (ángulo de torsión= 177.6°) (Figura 24). Tanto el anillo aromático como el grupo acetamido están perpendiculares a la cadena lateral. El C β (metileno unido al anillo indólico) está 0.29° sobre el plano del anillo indólico. Esta conformación no se ve afectada al introducir sustituyentes en la posición 2.

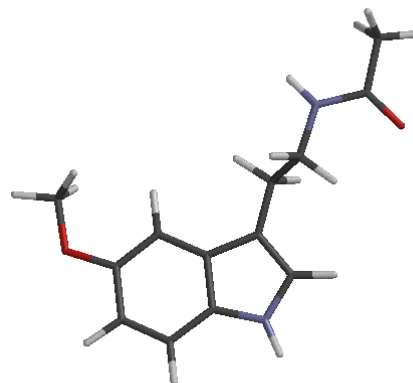


Figura 24. Representación del conformero de mínima energía para la melatonina.

En los compuestos de la serie “a”, el grupo metileno del grupo bencilo, está coplanar al anillo indólico, mientras que el grupo fenilo tiene un ángulo de torsión de aprox. 84° , C $_3$ -N $_1$ -CH $_2$ -C $_1$, por lo que está orientado de manera “antara”.

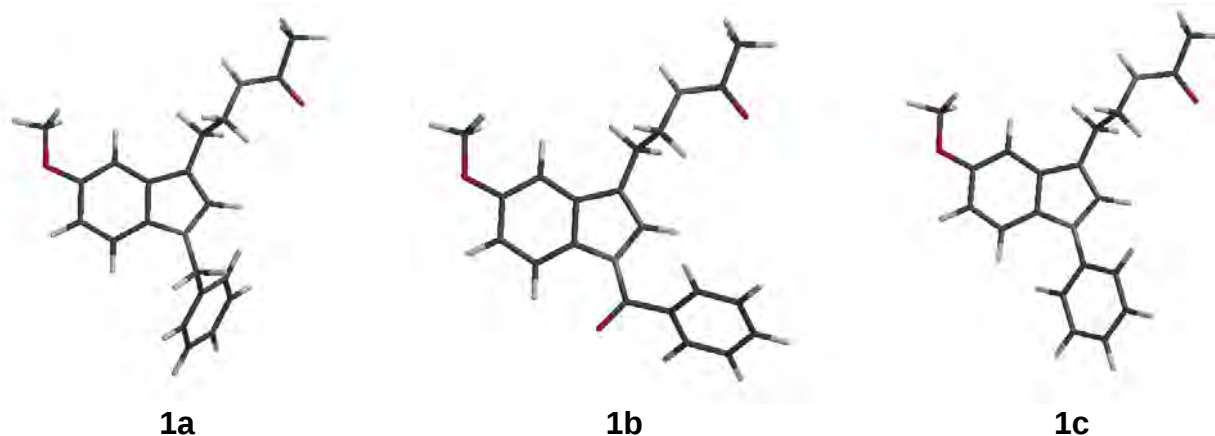


Figura 25. Representación de los conformeros de mínima energía de las cabezas de serie (**1a**, **1b**, **1c**).

El grupo carbonilo de la serie “b” está coplanar al anillo indólico y el anillo de fenilo muestra un ángulo torsional de aprox. 54° (N $_1$ -CO-C $_1$ -C $_2$) respecto al grupo

carbonilo. La orientación del fenilo en la serie “c” muestra un ángulo de torsión de aprox. 38° .

Considerando estos datos se asume que las propiedades electrónicas en la zona “norte” de la molécula de melatonina no se afectan por factores estéricos. Con base en los diferentes modelos propuestos se mantuvo la orientación del grupo 5-metoxilo hacia la cadena lateral (orientación exo). Bajo esta premisa se calcularon las propiedades electrónicas de la melatonina y sus análogos con el fin de establecer la influencia de los sustituyentes sobre estas propiedades y correlacionarlas con su actividad biológica.

Los volúmenes del Potencial Molecular Electroestático (PEM) se calcularon para todos los compuestos. En todos los casos el isovalor que se muestra es de -20.0 (rango de $-20.25/-19.66$ kcal/mol). Este volumen corresponde al potencial electrostático que está en un plano paralelo $1.3 \text{ \AA}$ sobre y debajo del anillo indólico, justo en la región de los electrones π (Figuras 26-29).

El PME de la melatonina (Figura 26) muestra un lóbulo superior (región A) y un lóbulo inferior (región B) de proporciones similares, arriba y abajo del anillo indólico, respectivamente. Estas regiones abarcan los átomos N_1 , C_3 , C_{3a} , C_4 y C_{7a} . Las restantes regiones corresponden al oxígeno del grupo carbonilo, al nitrógeno del grupo acetamido y al oxígeno del grupo metoxilo.

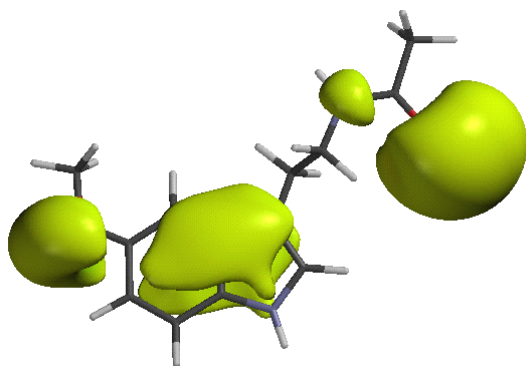


Figura 26. Representación del isovalor para la melatonina

Al comparar las regiones A y B de la melatonina, con las mismas regiones de 1-*N*-bencilmelatonina, 1-*N*-benzoil-melatonina y 1-*N*-fenilmelatonina, se observa una disminución significativa en el caso del grupo benzoilo.

En la comparación de las regiones A y B de la melatonina con las mismas regiones de la serie “a” (Figura 27) se observa que tanto el sustituyente bencilo como el *p*-metoxibencilo incrementan el

volumen de dichas regiones. En general, las regiones A y B no se ven afectadas por la incorporación de los grupos bencilo con diferentes sustituyentes.

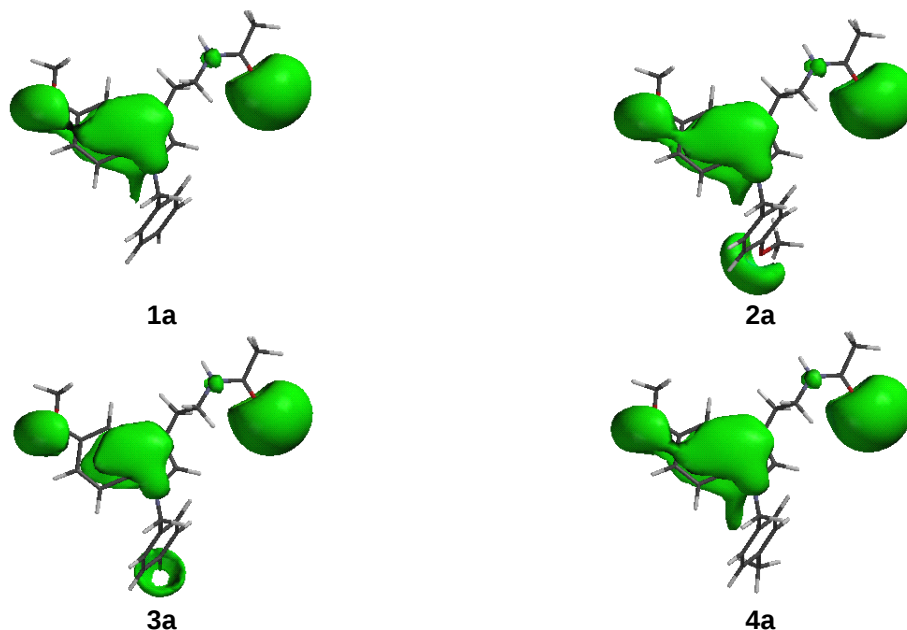


Figura 27. Representación del isovalor para los compuestos de la serie "a".

Para la serie b el grupo carbonilo del grupo benzoilo se encuentra coplanar al núcleo indólico, esto se refleja en la disminución del volumen del PME de los lóbulos A y B (Figura 28). Las restantes zonas no se ven afectadas. Se puede apreciar que esta disminución es afectada a su vez por los sustituyentes del grupo benzoilo, como es el caso del átomo de flúor (Figura 28, **3b**) y del grupo nitro (Figura 28, **5b**). Al comparar el compuesto **1b** con los compuestos **2b** y **4b** (Figura 28), se observa que la presencia de los grupos metoxilo y metilo incrementan ligeramente la densidad de carga en la zona del anillo indólico.

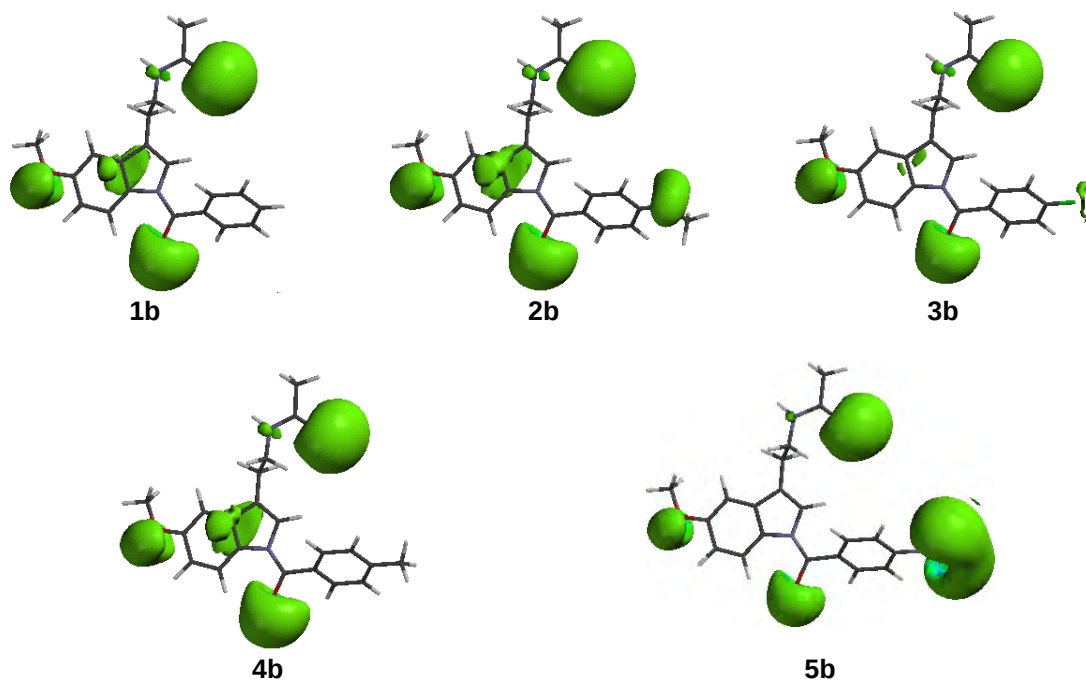


Figura 28. Representación del isovalor para los compuestos de la serie "b".

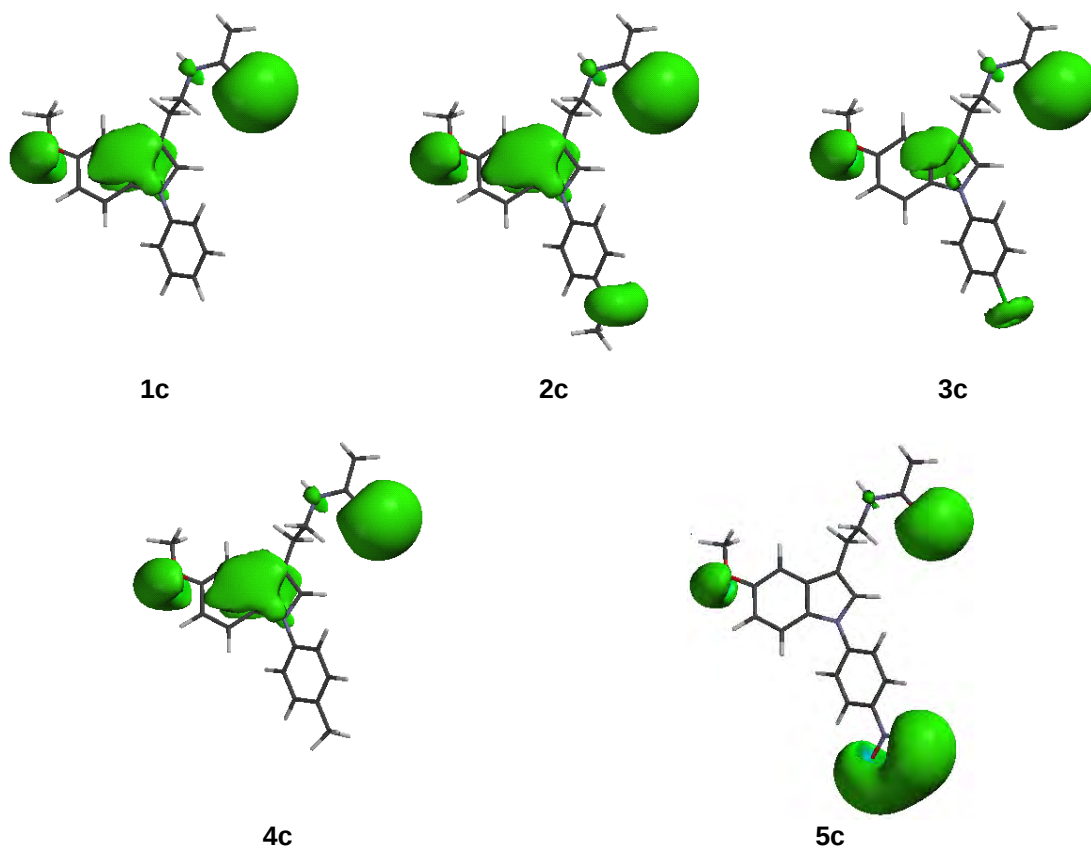


Figura 29. Representación del isovalor para los compuestos de la serie "c".

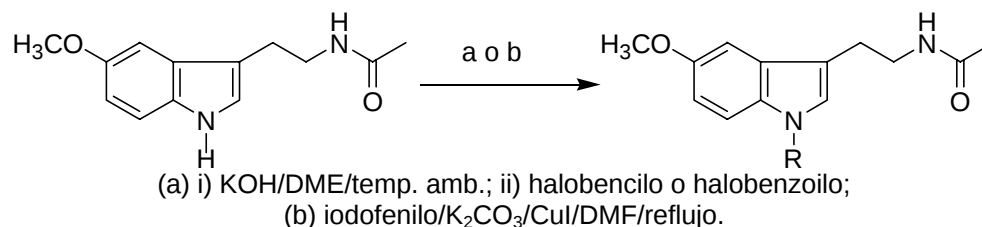
Para los compuestos de la serie “c” el grupo fenilo no disminuye sensiblemente la densidad de carga sobre el anillo indólico (Figura 29). Lo mismo sucede con los compuestos **1c**, **2c** y **4c**, pero igual que en la serie “b”, la presencia de un átomo de flúor o del grupo nitro, **3c** y **5c**, respectivamente, disminuyen la densidad de carga.

La incorporación de los sustituyentes afecta la densidad de carga sobre el anillo indólico. Si consideramos que el núcleo indólico de la melatonina presenta dos lóbulos de densidad de carga, se esperaría que aquellos compuestos que mantengan dichas zonas tendrán una actividad biológica similar a la de la melatonina y aquellos que presenten una disminución de dichas zonas serán menos activas o se unirán con menor afinidad a los sitios receptores que la melatonina.

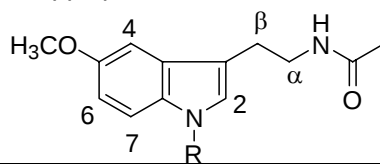
En resumen, considerando los aportes electrónicos, se esperaría, *a priori*, una menor actividad biológica con los derivados benzoilados y los derivados nitrados que con los derivados de bencilo y fenilo. Esta hipótesis sólo puede ser probada por estudios de afinidad y de funcionalidad de los análogos de melatonina.

6.2. Síntesis y caracterización estructural de análogos de melatonina

El esquema de síntesis para los compuestos de las diferentes series se ilustra a continuación:



La caracterización estructural de los compuestos sintetizados se realizó con base en sus datos espectroscópicos. Los desplazamientos en RMN ¹H para cada serie se enlistan a continuación:

Tabla 9. Desplazamientos (CDCl₃, ppm) de las señales comunes de los compuestos obtenidos

COMPUESTO	H-2	H-4	H-6	H-7	alfa	beta	NH	CH ₃ O	CH ₃ CO
I-Melatonina ^a		6.99	6.87	7.21	3.53	2.89	4.68	3.86	1.93
Melatonina	7.365	7.03	6.87	7.27	3.6	2.95	6.01	3.86	1.96
1a	6.94	7.04	6.84	7.15	3.59	2.96	6.50	3.85	1.93
2a					3.54	2.90	5.50	3.83	1.89
3a	6.93		6.84	7.13	3.58	2.94	5.96	3.85	1.95
4a	6.92	7.03	6.84	7.16	3.57	2.95	6.15	3.85	1.97
1b	7.07		6.97	8.27	3.52	2.84	5.5 ca	3.87	1.92
2b	7.16			8.24	3.56	2.88	5.59	3.89	1.94
3b	7.08	7.05	7.00	8.26	3.55	2.88	5.59	3.90	1.94
4b	7.12	7.03	6.99	8.27	3.54	2.87	5.59	3.89	1.94
5b	6.93	7.05	7.00	8.27	3.52	2.84	5.55	3.88	1.92
1c	7.18	7.08	6.89		3.64	3.00	5.88 ca	3.88	1.97
2c	7.09	7.05	6.86		3.61	2.97	5.6 ca	3.86	1.93
3c	7.12	7.08	6.89	7.37	3.67	3.03	5.80	3.92	2.01
4c	7.15	7.07	6.89	7.44	3.63	2.99	5.63	3.88	1.96
5c	7.16	7.02	6.83	7.46	3.50	2.88	6.28 ca	3.79	1.87

^a Ref. 41

En esta Tabla se incluye el desplazamiento de los protones de la melatonina y de la 2-yodomelatonina como punto de comparación. A los protones del grupo metileno vecino al grupo acetamido se denominan como protones α , mientras que a los protones en el metileno vecino al anillo indólico se denominan como protones β . No se incluyen los desplazamientos de los sustituyentes incorporados.

Comparando los desplazamientos de los protones para todas las series, se puede apreciar que no existe una gran diferencia en los desplazamientos del protón H-4, así como en las señales correspondientes a los grupos metoxilo y acetamido, pero en la serie “b” los protones H-6, H-7, H- α y H- β tienen valores significativamente diferentes. En dicha serie los protones H-6 y H-7 se han desplazado a campo bajo con respecto al valor en la melatonina, estando desplazado H-7 por más de una ppm. Lo anterior se puede explicar si

consideramos que el grupo carbonilo del sustituyente benzoilo se encuentra vecino a dicho protón, lo cual se confirma al observar la conformación de dicho sustituyente (Figura 28) obtenida en el estudio conformacional. Este mismo efecto podría explicar el desplazamiento de la señal de H-6. Si la orientación del grupo carbonilo fuese contraria a la indicada en la Figura, entonces el desplazamiento de H-2 sería el afectado, cosa que no ocurre, sino por el contrario este protón está ligeramente protegido con respecto al valor en melatonina. También, este desplazamiento apoya la propuesta de la orientación del grupo carbonilo y por lo tanto de todo el grupo benzoilo, debido a que este último es un grupo voluminoso y tiene menor interacción con el anillo indólico si se orienta de manera ortogonal.

Por otra parte, es muy notoria la diferencia de desplazamiento de los protones H- β , ya que, de su valor en melatonina a 2.95 ppm, en la serie "a" 2.94 ppm y en la serie "c" 2.97, para la serie "b" se encuentra a 2.86 ppm, lo que indica que existe un efecto de protección sobre estos protones. Esto se puede explicar sólo si el grupo benzoílo se orienta hacia la cadena lateral quedando en la zona de protección del anillo aromático dichos protones. Esta protección es muy marcada para H-2 como es el caso del compuesto **5b** (6.93 ppm). Para confirmar esta proposición se realizó el experimento NOESY al compuesto **5b** (Figura 30). Se aprecia en este espectro una interacción entre los protones H-2 y H- β , así como entre H-2 y los protones H-2' y H-6' del grupo benzoilo. Esto confirma la interacción a distancia del grupo benzoilo con la cadena lateral; esto implica restricciones sobre los grados de rotación de dicha cadena.

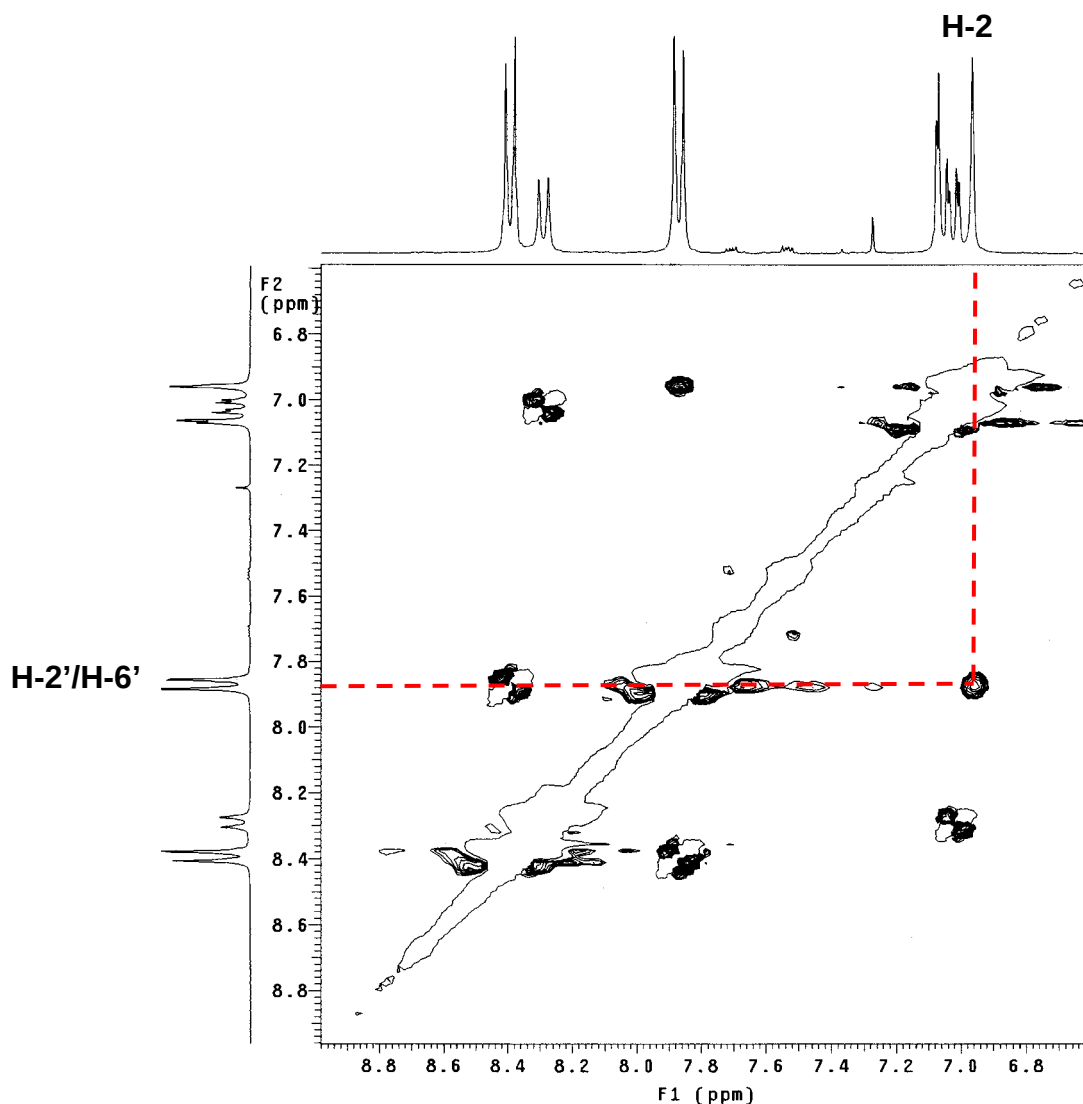


Figura 30. Espectro NOESY del compuesto **5b**. Zona ampliada de la región aromática.

También se observa una interacción entre H-4 y H- β , siendo mayor que la interacción H-4 y H- α , lo que implica que estos últimos protones se encuentran más alejados. H-4 también interacciona con los protones del grupo metoxilo pero estos últimos no lo hacen con el protón H-6, lo que hace suponer que el grupo metoxilo se encuentra orientado hacia la cadena lateral, como ya se ha propuesto en otros estudios.

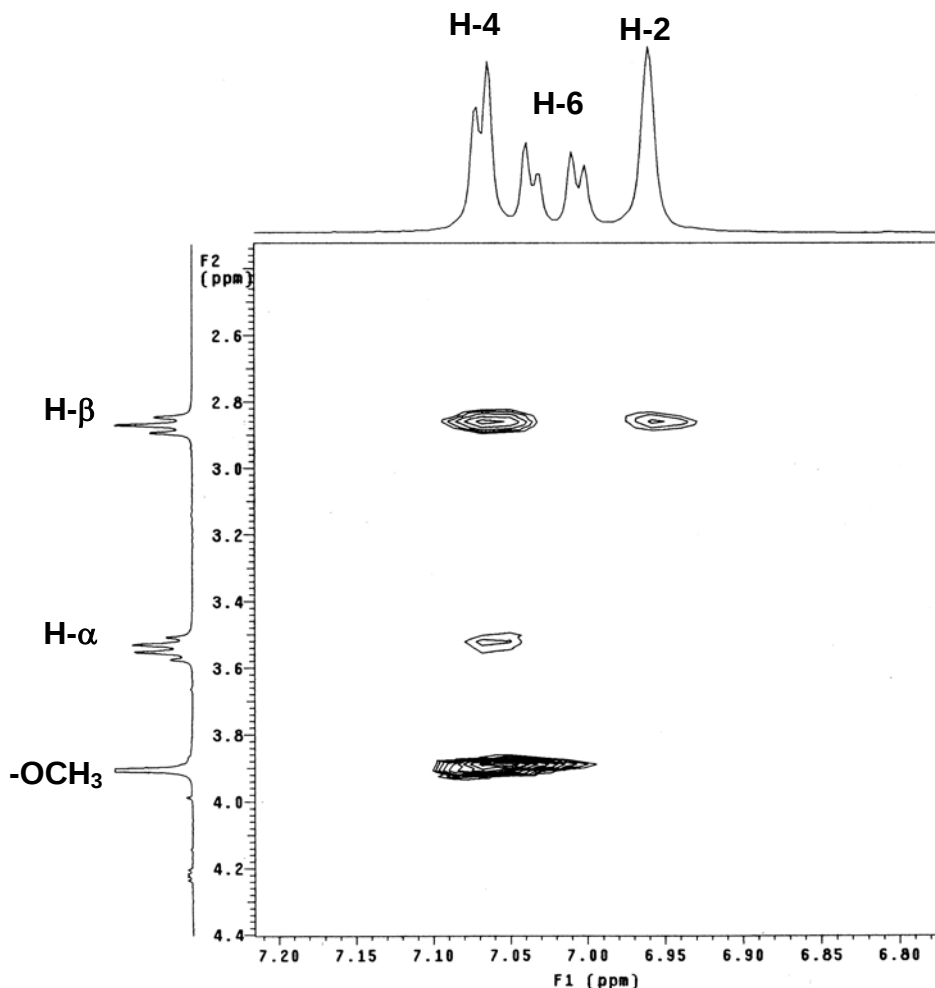


Figura 31. Espectro NOESY del compuesto **5b**. Zonas ampliadas aromática y de la cadena lateral.

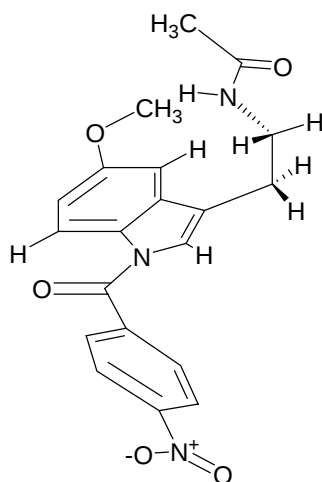


Figura 32. Posible conformación del compuesto **5b**.

También se observa una ligera interacción entre los protones del grupo acetilo con los protones H-β y H-α y en menor grado con los protones del grupo metoxilo. Es de particular atención la falta de interacción entre el protón -NH- y los protones H-β, considerando su cercanía, no así para los protones H-α, para los cuales se observa de manera intensa. En resumen, los protones H-β, H-4, CH₃O- y CH₃CO se ubican en una zona común, la cual se puede generar mediante un arreglo espacial de acuerdo a lo indicado en la Figura 32.

Para corroborar este conjunto de observaciones se

realizó el espectro NOESY del compuesto **5c**. Se observa, de manera similar que en el compuesto **5b**, una interacción entre H-4 con H- β , H- α y CH₃O, pero no existe la interacción de H-2 con los protones del grupo fenilo y por lo tanto tampoco con los protones H- β . También se observa la interacción H-4/CH₃CO (Figuras 33 y 34).

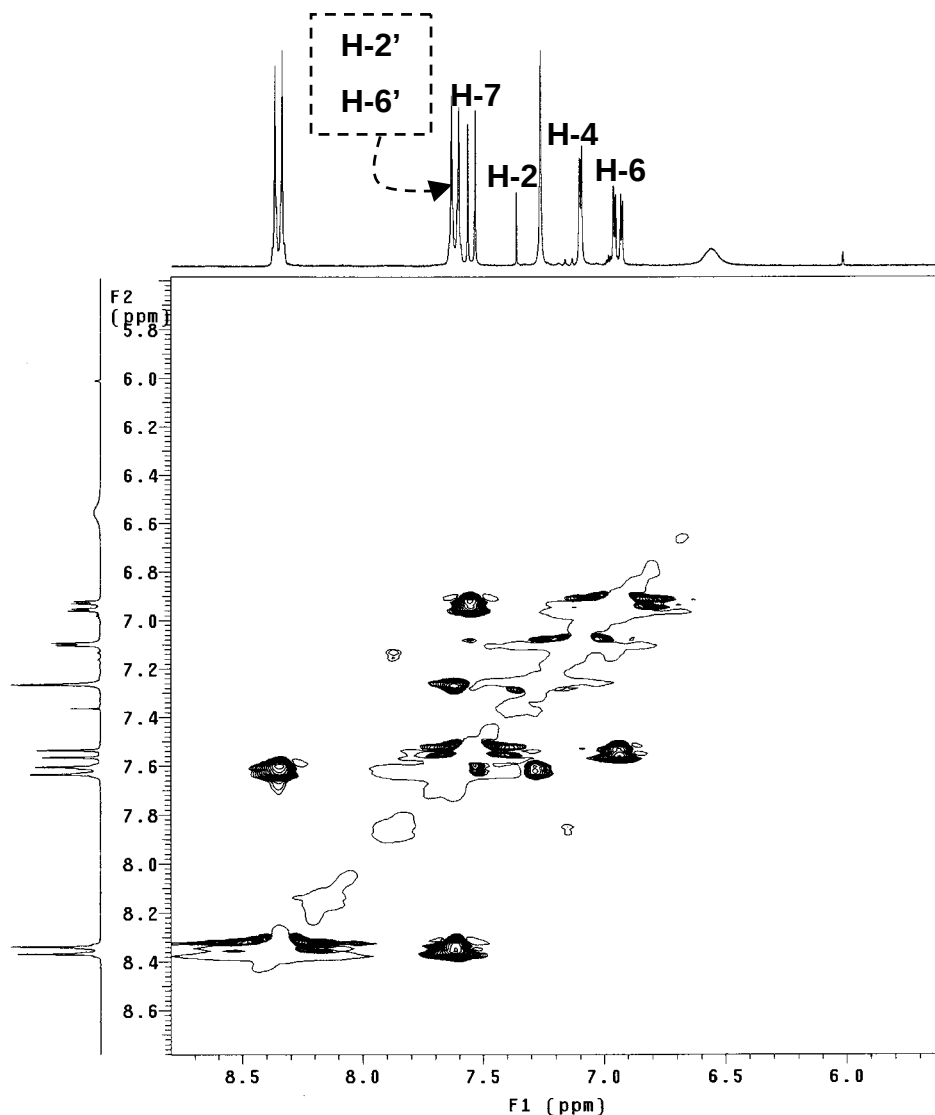


Figura 33. Espectro NOESY del compuesto **5c**. Zona aromática.

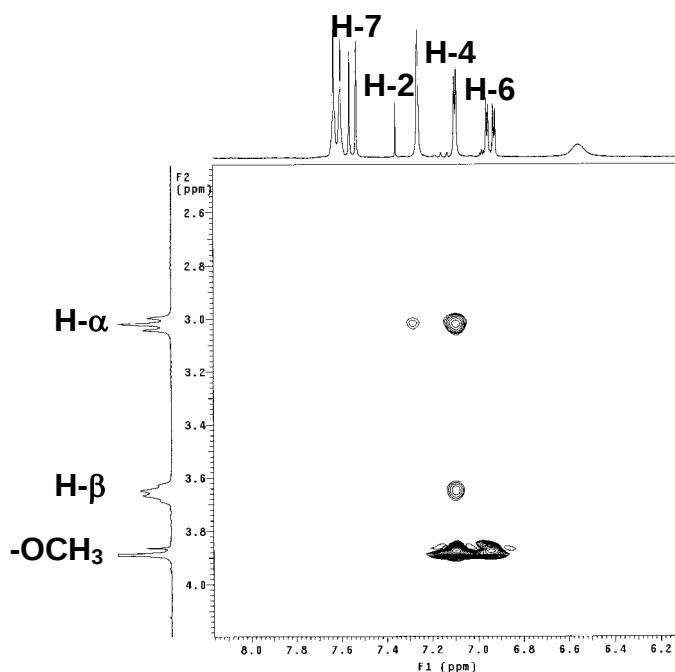
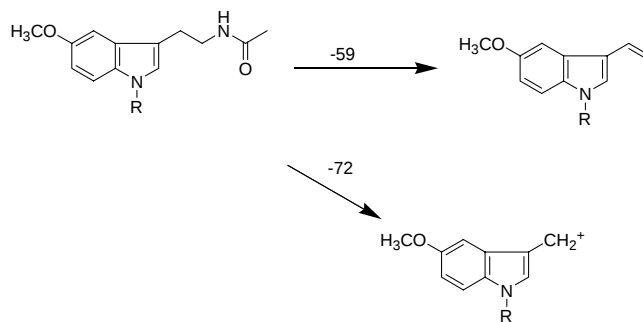
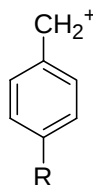


Figura 34. Espectro NOESY del compuesto **5c**. Zonas ampliadas aromática y de la cadena lateral.

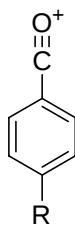
Los principales fragmentos que se observan en los espectros de masas para estas series se ilustran a continuación:



Otro fragmento que se observa en la serie “a” es:



y en la serie “b” un fragmento adicional es:



Bajo esta serie de observaciones (RMN, NOESY) se realizó de nuevo el análisis conformacional de todas las series. Considerando que el compuesto 2-yodomelatonina presenta una mayor afinidad que la melatonina por los sitios receptores, se analizó la conformación de la cadena lateral de la 2-yodomelatonina. El criterio para elegir dicha sustancia, además de su mayor afinidad, es que el átomo de yodo en la posición 2 del núcleo indólico ejerce, aparentemente, un efecto de protección sobre los protones β y debido a su tamaño disminuye los grados de libertad conformacionales de la cadena lateral, situación similar a la del compuesto **5b**.

El confórmero de menor energía para la 2-yodomelatonina se ilustra en la Figura 35. Se observa que la cadena lateral tiene una conformación plegada hacia la cara supra del anillo indólico.

Dicha conformación muestra una distribución de Boltzmann del 80 %, esto es, tiene una gran abundancia relativa. Tomando dicha conformación como patrón se procedió a realizar nuevamente el análisis conformacional de todos los derivados incluyendo a la melatonina. La conformación que tuviera la misma disposición espacial que el confórmero de mínima energía de la 2-yodomelatonina se tomó como punto de comparación. La diferencia se

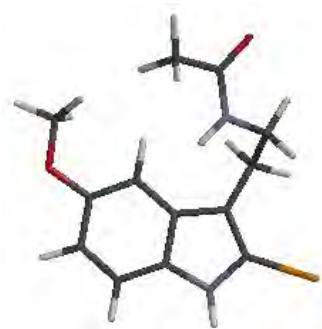


Figura 35. Conformación espacial de la 2-yodomelatonina.

observó en la abundancia relativa de cada confórmero. Estos valores se resumen en la Tabla 10, en la que podemos apreciar que el valor para el confórmero de la 2-yodomelatonina es mayor al valor de los otros compuestos. También se observa que los valores de las series “b” fueron inferiores en relación a los de las series “a” y “c” lo que indica que la incorporación de un grupo voluminoso en esta zona de la molécula afecta sensiblemente la conformación de la cadena lateral.

Tabla 10. Distribución de Boltzmann de los conformeros de la 2-yodomelatonina, melatonina y análogos de melatonina

Compuesto	Distribución de Boltzmann (%)
2-yodomelatonina	84.7
Melatonina	87.7
1a	70.4
2a	48.9
3a	50.0
4a	65.7
1b	18.0
2b	20.2
3b	23.5
4b	12.5
5b	20.7
1c	45.8
2c	40.7
3c	76.4
4c	46.6
5c	48.7

Con el fin de saber si existía alguna diferencia con respecto a la tendencia observada en los valores de potencial inicialmente obtenidos, se calculó el PEM para todas las series, incluyendo la 2-yodomelatonina y la melatonina, con esta nueva conformación empleando los parámetros iniciales. Los valores de isotopotencial se ilustran en las Figuras 36-40. En general, se observa la misma tendencia que en los cálculos iniciales. La única diferencia significativa es que la magnitud del volumen del lóbulo A es menor que la del lóbulo B. Lo anterior conduce a proponer que la cara “antara” del anillo indólico se encuentra más expuesta a interactuar con el sitio receptor.



Figura 36. Valor de isotopotencial para 2-yodomelatonina.



Figura 37. Valor de isotopotencial para melatonina.

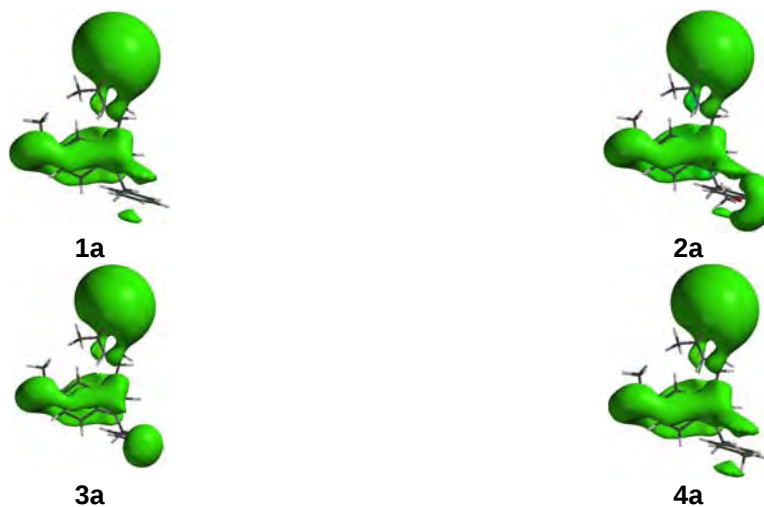


Figura 38. Representación del isovalor para los compuestos de la serie "a".

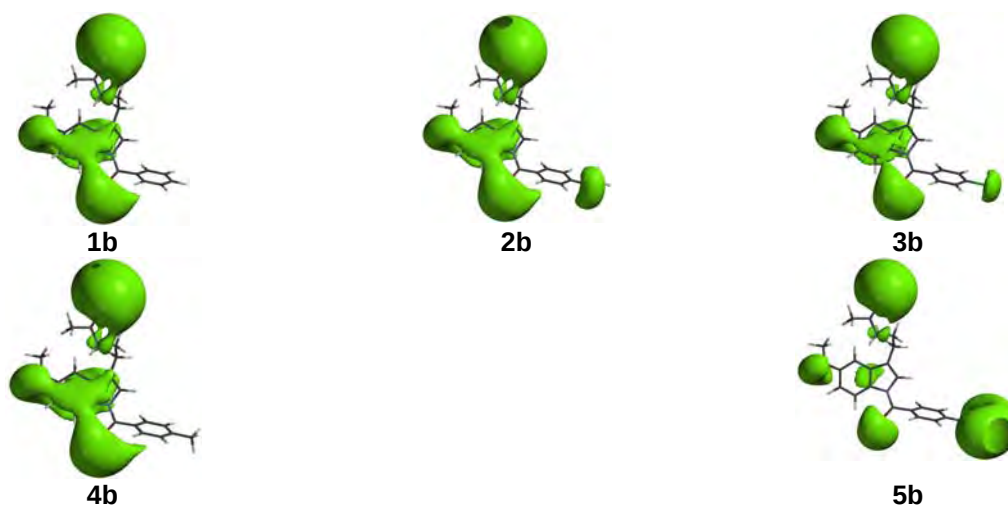


Figura 39. Representación del isovalor para los compuestos de la serie "b".

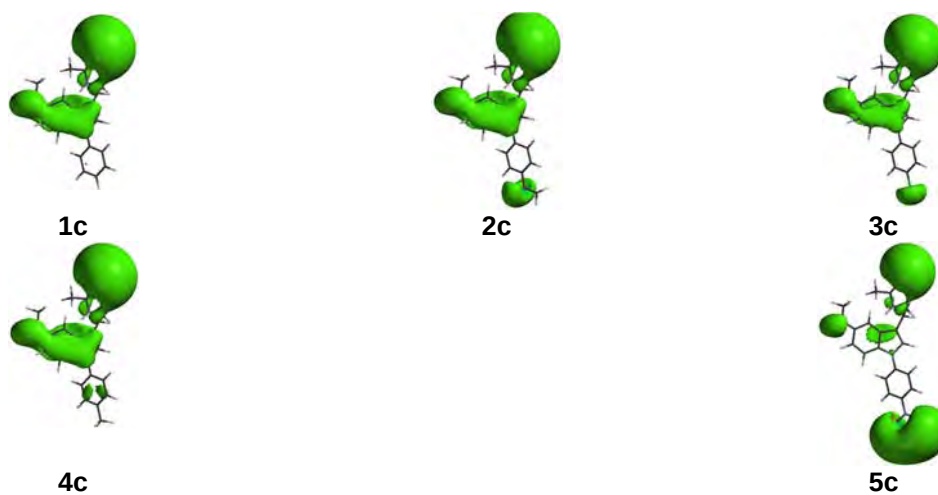


Figura 40. Representación del isovalor para los compuestos de la serie "c".

6.3. Determinación de la constante de afinidad de los análogos de melatonina

Los valores de las constantes de afinidad para los análogos de melatonina se muestran en la Tabla 11. La comparación de los valores de los compuestos cabeza de serie (compuestos **1a**, **1b** y **1c**) con el valor de la melatonina indica que la incorporación de un grupo voluminoso en esta zona de la molécula al parecer no favorece el valor de afinidad. Al comparar entre si los valores de las cabezas de serie se puede apreciar que el compuesto con el grupo fenilo, **1c**, muestra un mejor valor. Una posible explicación es que el grupo bencilo del compuesto **1a** presenta varios grados de libertad en cuanto a sus posibles orientaciones, disminuyendo la población de una posible conformación idónea para fijarse al sitio receptor ya que, con base en los estudios de propiedades electrónicas, no se ve alterada la densidad de carga sobre el anillo indólico. En el caso del compuesto **1b** con un grupo benzoilo, éste ejerce un efecto de disminución de la densidad de carga, a través de su grupo carbonilo, sobre el anillo indólico, por lo que debería tener una menor interacción con el sitio receptor y en consecuencia una menor afinidad por el sitio receptor. El valor de afinidad de este compuesto concuerda con lo pronosticado.

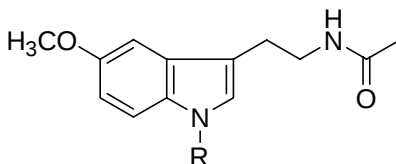
El análisis de los valores de la serie “a” indica que aquellos compuestos con un grupo electrodonador (compuestos **2a** y **4a**) presentan un mejor valor de afinidad, lo que está de acuerdo con lo pronosticado.

En la serie “b” el compuesto **5b** presenta un mejor valor, lo que contradice la propuesta de que los compuestos con un grupo electroatractor tendrían menor afinidad por el sitio receptor. Tomando en cuenta lo observado en el espectro de RMP y el NOESY de este compuesto, podemos afirmar que la interacción a larga distancia entre el grupo *p*-NO₂-benzoilo y la cadena lateral disminuye los grados de libertad de esta última, reflejándose en un incremento de la población del posible confórmero que interactúa con el sitio receptor. Lo mismo es válido al comparar los valores de los compuestos **3a** y **3b** (3290 vs. 423) y **4a** y **4b** (738 vs. 477). Se sabe que la incorporación de un grupo voluminoso en la posición 2 de la molécula de melatonina aumenta la afinidad por su sitio receptor. Lo anterior

sucede cuando se incorpora un átomo de yodo o un grupo fenilo, pero dicho incremento no se presenta si un grupo ciclohexilo es el adicionado.

Aparentemente, la presencia de un grupo voluminoso en esta zona de la molécula mejora la afinidad pero al parecer existe otro factor de tipo electrónico que coadyuva a la interacción ligando-receptor. El átomo de yodo es más electronegativo que el átomo de carbono, a su vez el grupo fenilo ejerce un efecto electroattractor. De lo anterior, se desprende que el factor estérico es importante pero también lo es el efecto electroattractor, ya que, si observamos el valor del compuesto **2b**, éste presenta el menor valor en toda la serie. Entonces, el compuesto **5b** cumple con los dos criterios señalados, posee un grupo voluminoso y fuertemente electroattractor.

Tabla 11. Constantes de afinidad para los compuestos **1a-4a**, **1b-5b**, **1c-5c**



Compuesto	R	Constante de Afinidad (K_i , nM)
MEL	H	0.82
1a	-CH ₂ -C ₆ H ₅	1640
2a	-CH ₂ -C ₆ H ₄ - <i>p</i> -OCH ₃	737
3a	-CH ₂ -C ₆ H ₄ - <i>p</i> -F	3290
4a	-CH ₂ -C ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃	738
1b	-CO-C ₆ H ₅	538
2b	-CO-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -OCH ₃	1090
3b	-CO-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -F	423
4b	-CO-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃	477
5b	-CO-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -NO ₂	82.4
1c	-C ₆ H ₅	60.4
2c	-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -OCH ₃	52.6
3c	-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -F	748
4c	-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -CH ₃	3020
5c	-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -NO ₂	408

Esto lleva a proponer que posiblemente el sitio receptor contenga, en su topología, una zona de densidad de carga positiva, la cual promueve una interacción de tipo electrostático. Cabe señalar que se han preparado diversos tipos de compuestos cíclicos con el fin de “anclar” la conformación de la cadena lateral, pero, en la mayoría de los casos, los resultados han sido infructuosos.

En cuanto a los compuestos de la serie “c”, se puede observar que aquellos que presentan un grupo polar en el fenilo muestran una mejor afinidad (**2c**, **3c** y **5c**). El compuesto **2c** es el que presenta mejor afinidad, lo que concuerda con lo propuesto a partir de sus densidades de carga.

Por todo lo anterior, se puede afirmar que la interacción con el sitio receptor de la melatonina se puede modular al modificar sus propiedades electrónicas mediante la incorporación de un sustituyente en la posición 1, pero también se desprende que la incorporación de grupos voluminosos en esta posición decrece el valor de afinidad. En relación a este último punto, durante la realización de este estudio, Mor y col. obtuvieron hallazgos similares,¹¹² lo que corrobora nuestra propuesta; pero a diferencia de estas investigaciones, nosotros observamos que la incorporación de un grupo electroatractor o electrodonador en el anillo bencénico si permite mejorar la afinidad en este conjunto de análogos, aunque no superan a la de la melatonina.

Estos resultados nos lleva a proponer que la interacción con el sitio receptor no es igual para todas las series, sobre todo si consideramos la orientación de los sustituyentes. Esto se ilustra en la Figura 41 en la cual se muestran las probables interacciones de los análogos de melatonina con su sitio receptor.

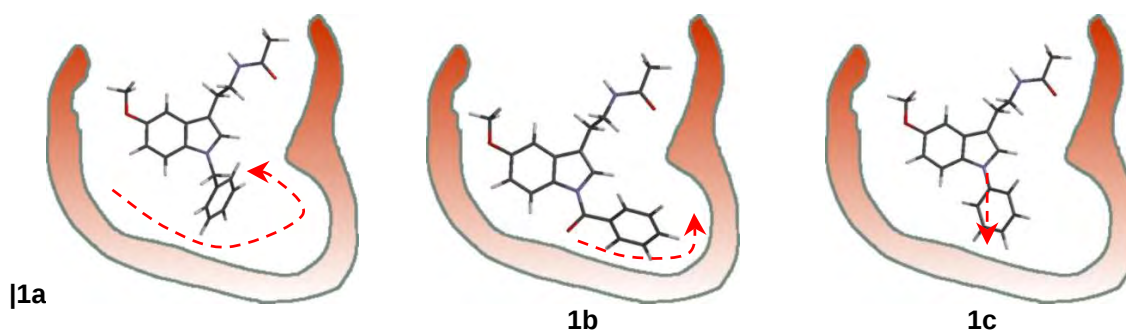


Figura 41. Probables formas de interacción de las series con el sitio receptor de la melatonina. Las flechas indican las probables zonas de interacción de los sustituyentes presentes en la posición 1 con en el sitio receptor.

6.4. Efecto de los análogos de melatonina sobre la actividad contráctil de duodeno de rata.

La presencia de melatonina se ha detectado, mediante estudios de inmunofluorescencia, en los intestinos delgado y grueso de la rata.¹¹⁶ Los niveles más elevados se localizan en las porciones del duodeno y del colon. Un estudio posterior sobre la influencia de la melatonina en la fuerza de la contracción espontánea del intestino de rata demostró que dicha sustancia inhibe la fuerza y la amplitud de la contracción del músculo liso. El segmento más sensible es el duodeno seguido por el colon, íleo y el yeyuno.¹¹⁷ Este mismo fenómeno ha sido observado en otro estudio, pero a diferencia del anterior, la inhibición de la contracción es de tipo dosis-dependiente.¹¹⁸

Debido a que la melatonina disminuye el tono y la frecuencia después de la administración, a diferentes concentraciones, se decidió evaluar la melatonina y los análogos de melatonina a diferentes concentraciones (10, 20, 40, 160, 320 μ M).¹¹⁹ En general, se observó que todos los compuestos inhiben la actividad contráctil de una manera dosis-dependiente. En la Figura 42 se ilustra este comportamiento para el caso de la melatonina.

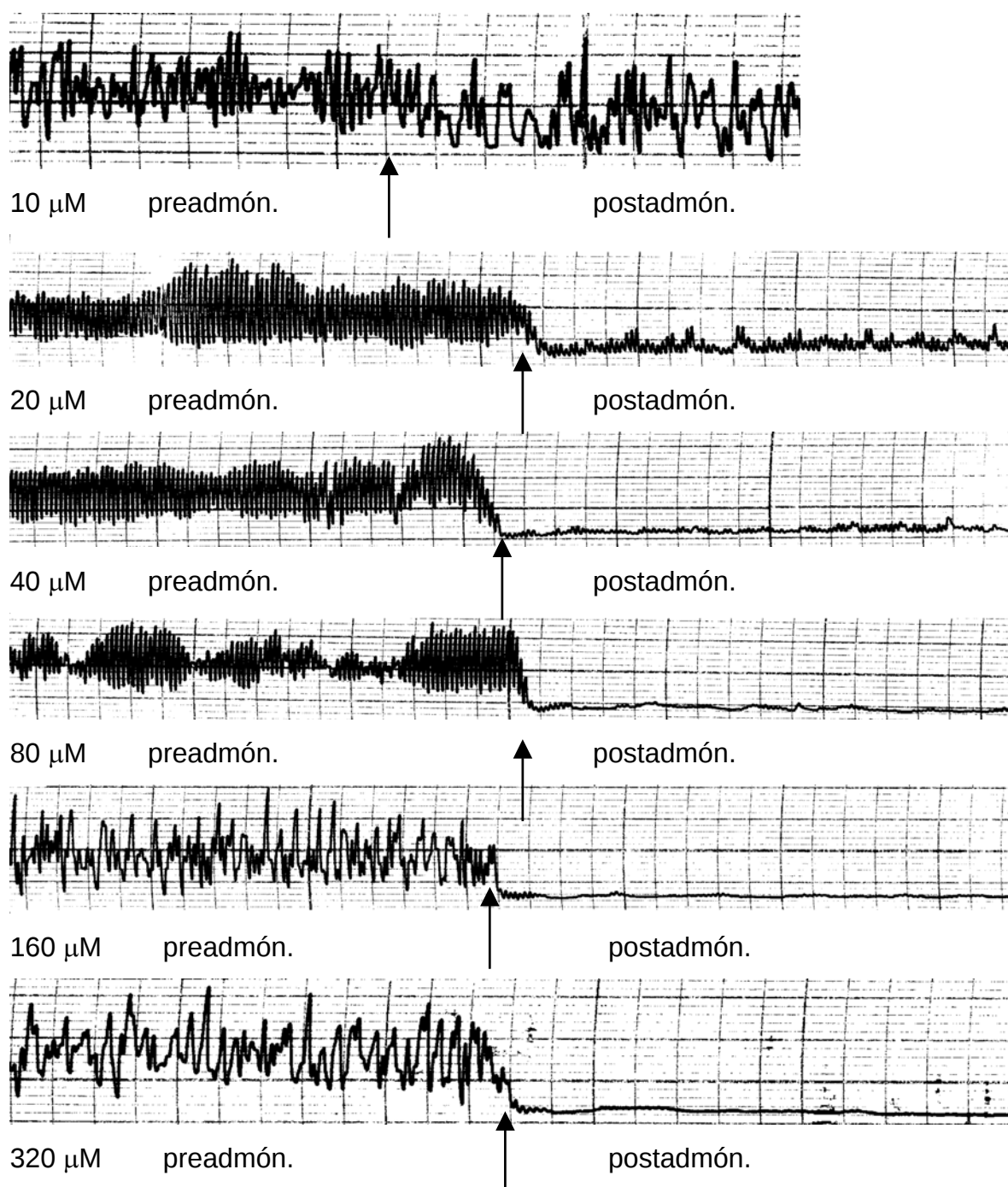


Figura 42. Registro de la actividad contráctil de melatonina sobre duodeno aislado de rata a concentraciones crecientes. Las flechas indican el momento de la adición de melatonina.

A manera de ejemplo, en la Figura 43 se muestra una comparación del comportamiento de la melatonina y del compuesto **1a**.

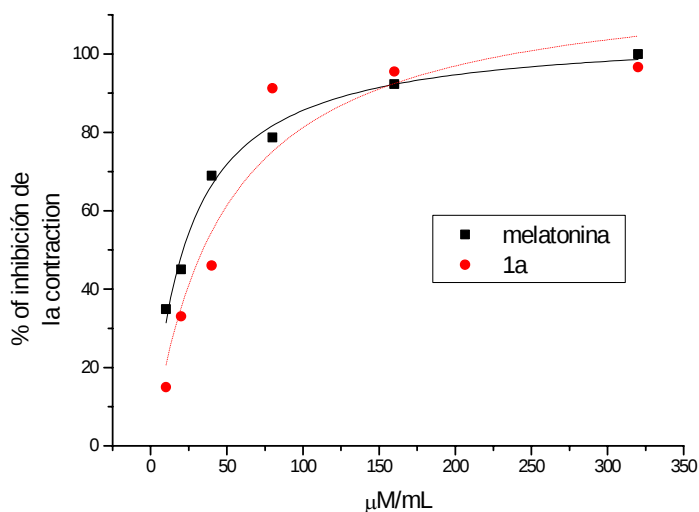


Figura 43. Grafica de % de relajación para melatonina y el compuesto **1a**.

Se determinó, igualmente, la CI_{50} de inhibición de la contracción del duodeno de rata para cada compuesto. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

El compuesto **5b** destaca por su comportamiento, ya que a dosis bajas no provoca relajación del músculo liso, sino por el contrario, incrementa la contracción de dicho tejido. En la gráfica 44 se muestra el comportamiento de este compuesto.

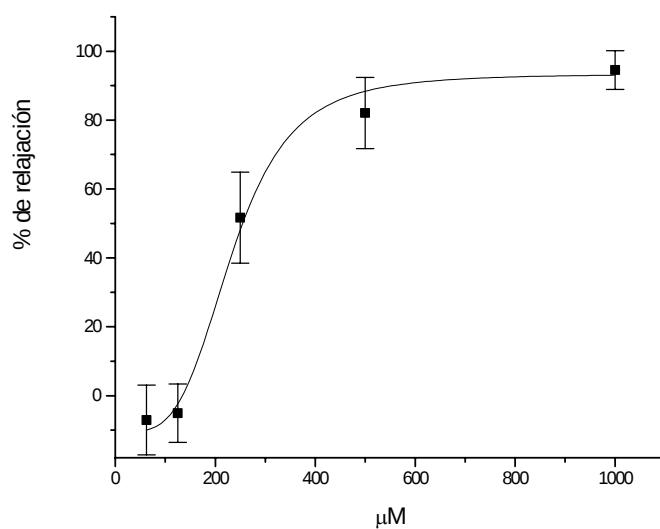
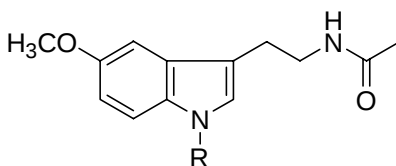
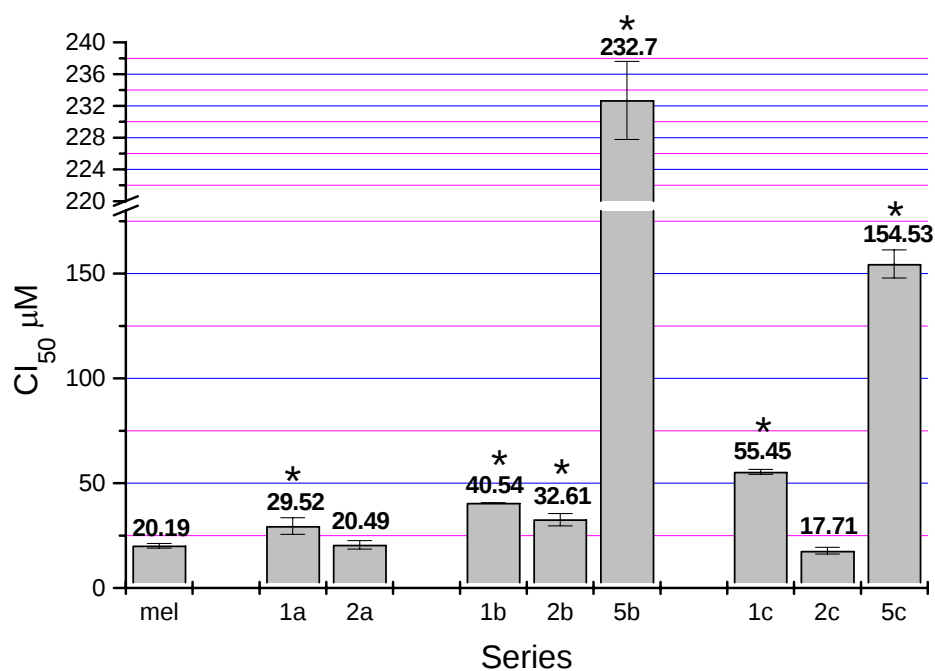


Figura 44. Grafica de relajación de duodeno de rata para el compuesto **5b**.

Tabla 12. Valores de inhibición de la contracción de duodeno de rata de melatonina y los análogos de melatonina

Compuesto	R	Cl ₅₀ , μ M
MEL	H	20.19 ($\pm$ 1.08)
1a	-CH ₂ -C ₆ H ₅	29.52 ($\pm$ 3.94)
2a	-CH ₂ -C ₆ H ₄ - <i>p</i> -OCH ₃	20.49 ($\pm$ 2.01)
1b	-CO-C ₆ H ₅	40.54 ($\pm$ 0.12)
2b	-CO-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -OCH ₃	32.61 ($\pm$ 3.0)
5b	-CO-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -NO ₂	232.7 ($\pm$ 4.9)
1c	-C ₆ H ₅	55.45 ($\pm$ 1.2)
2c	-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -OCH ₃	17.71 ($\pm$ 1.62)
5c	-C ₆ H ₄ - <i>p</i> -NO ₂	154.53 ($\pm$ 6.7)

(Valores promedio de n=8 $\pm$ D.S.)**Figura 45.** Gráfica de los valores de Cl₅₀ de melatonina y análogos de melatonina en la inhibición de la contracción de duodeno aislado de rata.* denota diferencia significativa a p=0.05

En la figura 45 se puede apreciar que el compuesto **1a** mostró una menor actividad comparado con melatonina, pero la incorporación del grupo metoxilo al

grupo bencílico iguala la actividad a la de la melatonina, observándose un comportamiento paralelo con relación a los valores de afinidad.

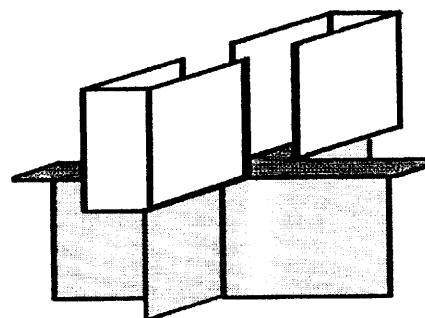
En la serie “b” el compuesto **1b** presentó menor actividad en relación al valor de melatonina, por lo que se deduce que la incorporación del grupo benzoilo no favorece la actividad relajante. Sin embargo, el compuesto **2b** (derivado *p*-metoxibenzoilo) mostró una mejor actividad que el compuesto **1b**. De nuevo, el grupo metoxilo mejoró la actividad en la serie. El compuesto **5b** presentó poca actividad como agente relajante del músculo liso, por el contrario, este compuesto se comportó como agente estimulante del tejido a dosis bajas. Esto llama la atención si se considera que *a priori* dicho compuesto debería ser muy activo ya que muestra el mejor valor de afinidad en la serie.

Para la serie “c”, se observó que la incorporación del grupo fenilo no es favorable, pero, de nuevo, la inclusión del grupo metoxilo mejoró sensiblemente esta actividad, aunque no mejor que la melatonina. El compuesto **5c**, como se esperaba, mostró muy baja actividad. En esta serie se observó un paralelismo entre los valores de afinidad y los valores de inhibición de la contracción.

De estos resultados experimentales se puede concluir que los compuestos sintetizados actúan de forma similar a la melatonina, presumiéndose que dicha acción es mediada por los receptores de melatonina; dicha suposición es válida si se considera que en la Figura 43 se observa un perfil típico de un sistema saturable, como es el caso de la interacción ligando-receptor. Cabe señalar que en este ensayo, después de la adición del compuesto a evaluar, registro y posterior lavado del tejido, se reestableció la respuesta del tejido, lo que indica que los receptores responsables de la respuesta se localizan en la superficie de la membrana.

6.5. Evaluación del efecto ansiolítico de los análogos de melatonina en rata con el modelo Plus-Maze

Se ha informado que la melatonina presenta un efecto ansiolítico en rata.¹²⁰ Bajo esta perspectiva se consideró importante evaluar aquellas sustancias que presentaron un mejor valor de afinidad a los receptores de melatonina. Esta evaluación se hizo con el fin de observar si existía una correlación entre la afinidad y su actividad biológica *in vivo*, para lo cual se eligió el modelo de ansiedad Plus-Maze.¹²¹ En este modelo se evalúa el tiempo de permanencia de la rata en una zona cerrada (brazo cerrado), el tiempo de permanencia en una zona abierta (brazo abierto), así como las entradas a cada zona. En dicho modelo, la rata hace menos entradas a los brazos abiertos que a los brazos cerrados y pasa menos tiempo en los brazos abiertos que en los cerrados si presenta algún estado de ansiedad. También se registra si hay defecación, micción, piloerección, la actividad motora y el número de caídas. Se ilustra el sistema que se emplea para este modelo en la Figura lateral.



Los compuestos elegidos para esta evaluación, incluyendo el compuesto de referencia que fue el diazepam, se indican en la Tabla 13, así como las dosis empleadas.

Tabla 13. Compuestos evaluados (dosis)

Compuesto	Dosis (mg/kg)	clave
melatonina	1	(mel 1)
melatonina	2	(mel 2)
2b	1	(2b 1)
2b	2	(2b 2)
5b	1	(5b 1)
5b	2	(5b 2)
2c	1	(2c 1)
2c	2	(2c 2)
5c	1	(5c 1)
diazepam	2	(diaze)

Los resultados de esta evaluación se muestran en la Tabla 14:

Tabla 14. Resultados de los parámetros evaluados en el modelo de Plus-Maze

Sustancia	Entradas al brazo abierto ($\bar{y}$ y %)	Tiempo en brazo abierto ($\bar{y}$ y % min)	Hece s	Micción	Hiperven- tilación	Mordisque o	Pilo- erección	Caída s
Int*.	37.11 (1.21)	33.20 (1.73)	++	++	+++	++	++++	-
Veh.*	39.09 (1.63)	31.40 (1.56)	+++	+	+++	+	++	-
mel 1	45.29 (0.98)	54.20 (1.33)	++	+	-	-	-	+
mel 2	58.03 (1.79)	62.00 (1.22)	+	-	-	-	-	+
2b 1	48.36 (1.22)	44.60 (1.15)	+	-	-	+	-	-
2b 2	62.76 (2.07)	52.80 (1.54)	+	-	-	-	-	+
5b 1	41.18 (1.79)	39.20 (1.52)	++	-	-	-	-	+
5b 2	36.17 (1.33)	24.20 (0.84)	+++	-	-	-	-	-
2c 1	51.24 (1.38)	39.20 (0.79)	+	-	-	-	-	-
2c 2	63.23 (1.63)	49.60 (1.32)	+	+	-	-	-	-
5c 1	30.55 (0.41)	8.80 (0.55)	-	++	-	-	-	-
Diaze	80 (2.81)	79.80 (0.3)	+	+	-	-	-	+

(Valores promedio de $n=6 \pm D.S.$)

*Íntegras + 25% de los individuos presentaron la respuesta +++ 75% de los individuos presentaron la respuesta

*Vehículo ++ 50% de los individuos presentaron la respuesta ++++ 100% de los individuos presentaron la respuesta

En la Figura 46 se ilustra de manera gráfica el % de las entradas promedio al brazo abierto y en la Figura 47 se ilustra de manera gráfica el % de tiempo promedio de permanencia en el brazo abierto.

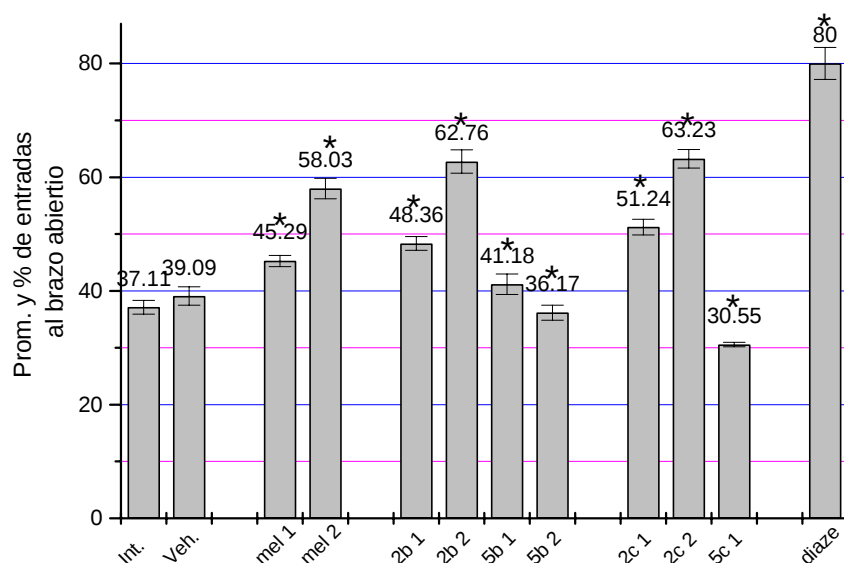


Figura 46. % de entradas promedio al brazo abierto. * denota diferencia significativa a $p=0.05$ utilizando como control positivo diazepam.

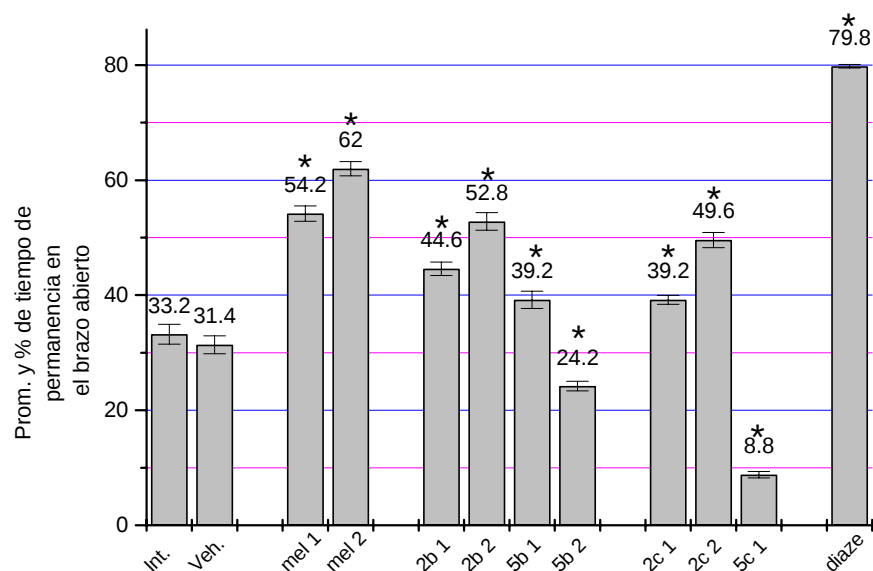


Figura 47. % de tiempo promedio de permanencia en el brazo abierto. * denota diferencia significativa a $p=0.05$ utilizando como control positivo diazepam.

El análisis de los valores de % de entradas al brazo abierto muestra que la melatonina presenta actividad ansiolítica, aunque su mayor valor no se equipara con el del compuesto de referencia (diazepam). Se puede apreciar que el efecto de la melatonina se incrementa con la dosis. También se observa este comportamiento en la gráfica del % de tiempo promedio de permanencia en el brazo abierto.

El compuesto **2b** (*p*-metoxibenzoilo como sustituyente) presenta, en entradas al brazo abierto, un comportamiento similar a melatonina, pero es significativamente más activo que ésta. Por el contrario, el compuesto **5b** (*p*-nitrobenzoilo como sustituyente) no ejerce el efecto ansiolítico e inclusive a una dosis mayor reduce su actividad.

En la serie “c” el compuesto **2c** (*p*-metoxifenilo como sustituyente) también se comporta como la melatonina y también es significativamente más activo que ésta; sucede lo contrario con el compuesto **5c** (*p*-nitrofenilo como sustituyente).

En cuanto al % de tiempo de permanencia en el brazo abierto, se puede apreciar que es la melatonina la que presenta un mayor efecto que los compuestos **2b** y **2c**, aunque ambos actúan de manera dosis dependiente. Destaca el compuesto **5b**, que no sólo es poco activo sino que inclusive a la dosis mayor se comporta como un ansiogénico.

En resumen, en este modelo los compuestos con grupo metoxilo en el sustituyente de la posición 1 son más activos en comparación con los compuestos que presentan un grupo nitro en la misma posición.

Llama la atención que al comparar la actividad ansiolítica con los valores de afinidad no exista una correlación para los compuestos de la serie “b”, debido a que el compuesto de menor afinidad (**2b**, *p*-metoxibenzoilo como sustituyente) es el que muestra mayor efecto ansiolítico mientras que el de mayor afinidad (**5b**, *p*-nitrobenzoilo) no sólo no disminuye la ansiedad sino que la incrementa. Para los compuestos de la serie “c” la situación es diferente ya que si hay correspondencia entre los valores de afinidad y la actividad ansiolítica (compuesto **2c**, *p*-metoxifenilo vs. *p*-nitrofenilo como sustituyentes).

Entonces si se comparan los resultados de los valores de afinidad con los resultados de los ensayos de duodeno aislado de rata y los estudios de ansiedad en rata se visualiza que la serie “b” no muestra ninguna correspondencia, cosa contraria al comportamiento de la serie “c”. Lo anterior se resume en la Tabla 15.

Tabla 15. Comparación cualitativa del comportamiento de los compuestos **2b** vs. **5b** y **2c** vs. **5c** en los diferentes ensayos

Compuesto	Afinidad	Efecto relajante sobre duodeno aislado de rata	Efecto ansiolítico
2b	baja	total	total
5b	alta	parcial	sin efecto
2c	alta	total	total
5c	baja	parcial	sin efecto

Además, se puede observar que el comportamiento de los compuestos en los ensayos de duodeno aislado de rata y de ansiedad son similares en su tendencia.

Todo lo anterior conduce a suponer que el compuesto **5b** podría comportarse como un antagonista a receptores de melatonina debido a que posee una alta afinidad pero una baja actividad biológica en ensayos funcionales.

7. Parte experimental

7.1. Síntesis y caracterización estructural de los análogos de melatonina

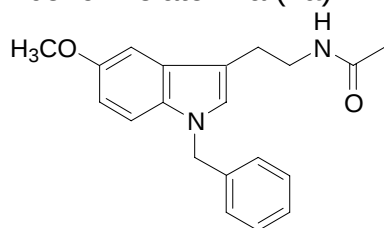
Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro IR de transformadas de Fourier Perkin-Elmer 549B. Las determinaciones se realizaron en película. Los valores de las señales se expresan en cm^{-1} . Los espectros de RMN- ^1H y experimentos de NOESY se determinaron en un aparato Varian VXR-300S (300 MHz) empleando como disolvente CDCl_3 . Los desplazamientos químicos se reportan en ppm δ , empleando como referencia interna tetrametilsilano (TMS). La multiplicidad de las señales se expresa como s=simple, d=doble, t=triple, q=cuadruple, dd=doble de doble, sa=simple ancha y las constantes de acoplamiento en Hz. Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro de masas JEOL Sx102 por introducción directa utilizando la técnica de Impacto Electrónico. El ión molecular se indica como M^+ . Los valores se expresan en m/z (masa-carga) con su respectiva abundancia relativa. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos; los valores encontrados se reportan en $^{\circ}\text{C}$. La pureza de los compuestos y el desarrollo de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina analítica de gel de sílice (Merck 60 F 254, espesor 0.2 mm) y para su visualización se empleó una lámpara de luz U.V. (254/366 nm) o una cámara de yodo. Los disolventes anhidros utilizados fueron adquiridos comercialmente y se emplearon sin mayor purificación. Los siguientes reactivos se prepararon en el laboratorio mediante técnicas reportadas en la literatura: cloruro de *p*-metoxibenzoilo, cloruro de *p*-metilbenzoilo, cloruro de *p*-nitrobenzoilo, *p*-yodoanisol, *p*-yodotolueno, *p*-yodonitrobenzeno; la melatonina y el resto de los demás reactivos fueron adquiridos comercialmente.

7.1.1. Método general de preparación de los compuestos de la serie “a”

En un matraz de bola de 25 mL, acondicionado con agitación magnética, se colocaron en el siguiente orden 232 mg de melatonina (1 mmol), 224 mg de KOH recién molida (4 mmol) y THF (6 mL). Todo el sistema se mantuvo en atmósfera inerte de Ar_2 . Se agitó la mezcla de reacción durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó una solución de cloruro de bencilo (0.12 mL, 1.1 mmol)

en THF (2 mL) mediante una cánula. Se continuó la agitación a temperatura ambiente toda la noche. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo-agua (30 g) y la suspensión se extrajo con acetato de etilo (15 mL X 3). La fase orgánica se lavó con salmuera (10 mL) y se trató con Na₂SO₄ anhidro. Se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida (rotavapor). El análisis por CCF analítica (sistema de elución 95:5 CH₂Cl₂/MeOH) indicó la presencia de un compuesto además de la materia prima (melatonina). La purificación del producto se logró mediante la recristalización de benceno. En algunos casos se realizó la purificación por cromatografía en columna (sistema de elución 98:2 CH₂Cl₂/Me₂CO).

1-bencilmelatonina (**1a**)



N-[2-(1-bencil-5-metoxi-1*H*-indol-3-il)-etil]acetamida

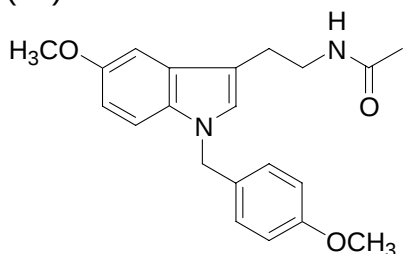
p.f.: 105-107° (benceno)

IR ν : 3310, 3101, 2988, 2915, 2858, 1647, 1563, 1489, 1231

RMN ¹H δ : 7.32-7.22 (m, 5H), 7.15 (d, 1H, J=8.7), 7.04 (d, 1H, J=2.7), 6.94 (s, 1H), 6.84 (dd, 1H, J= 9.2, 2.7), 6.49 (sa, 1H, inter. con D₂O), 5.23 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.59 (q, 2H, J= 6.6), 2.96 (t, 2H, J= 6.9), 1.93 (s, 3H)

EM m/z, 323 (M⁺+1, 7.7), 322 (M⁺, 35.4), 263 (int. rel.): (98.5), 250 (100), 91 (92.3)

1-*p*-metoxibencilmelatonina (**2a**)



N-{2-[5-metoxi-1-(4-metoxibencil)-1*H*-indol-3-il]-etil}acetamida

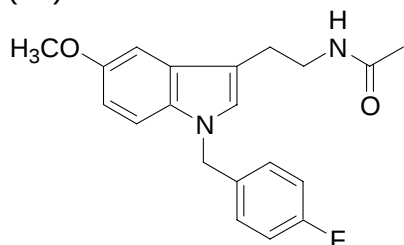
p.f.: 105-106° (benceno)

IR ν : 3290, 3074, 2933, 2834, 1650, 1513, 1487, 1247

RMN ¹H δ : 7.17 (d, 1H, J= 8.7), 7.05 (d, 2H, J= 8.7), 7.03 (d, 1H, J= 3.6), 6.91 (s, 1H), 6.86-6.79 (m, 3H), 6.19 (sa, 1H, inter. con D₂O), 5.16 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.57 (q, 2H, J= 6.9), 2.94 (t, 2H, J= 6.9), 1.97 (s, 3H)

EM m/z, 353 (M⁺+1, 5.2), 352 (M⁺, 20), 293 (int. rel.): (24.8), 280 (16.2), 121 (100)

**1-*p*-fluorobencilmelatonina
(3a)**



N-{2-[1-(4-fluorobencil)-5-metoxi-1*H*-indol-3-il]etil}acetamida

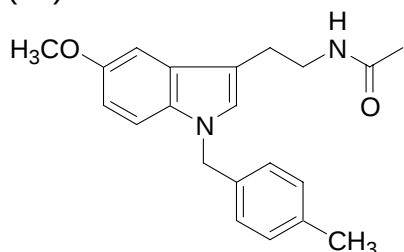
p.f.: 110-113° (benceno)

IR ν : 3308, 3102, 2922, 1649, 1561, 1487, 1227

RMN ^1H δ : 7.13 (d, 1H, $J = 9.0$), 7.09-7.04 (m, 2H), 7.04 (d, 1H, $J = 1.8$), 7.0-6.9 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.84 (dd, 1H, $J = 9.9, 2.4$), 5.96 (sa, 1H, inter. con D_2O), 5.2 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.58 (q, 2H, $J = 6.6$), 2.94 (t, 2H, $J = 6.6$), 1.95 (s, 3H)

EM m/z , 341 ($\text{M}^+ + 1$, 5.7), 340 (M^+ , 20), 281 (int. rel.): (76.2), 268 (58.1), 109 (100)

**1-*p*-metilbencilmelatonina
(4a)**



N-{2-[5-metoxi-1-(4-metilbencil)-1*H*-indol-3-il]etil}acetamida

p.f.: 113-115° (C_6H_6)

IR ν : 3290, 2925, 1650, 1487, 1229

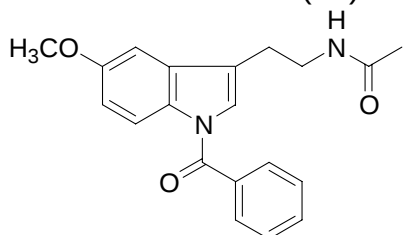
RMN ^1H δ : 7.16 (d, 1H, $J = 8.7$), 7.1 (d, 2H, $J = 7.5$), 7.03 (d, 1H, $J = 2.1$), 7.0 (d, 2H, $J = 8.1$), 6.98 (s, 1H), 6.84 (dd, 1H, $J = 9.0, 2.1$), 6.15 (sa, 1H, inter. con D_2O), 5.19 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.57 (sa, 2H), 2.95 (t, 2H, $J = 6.3$), 2.31 (s, 3H), 1.97 (s, 3H)

EM m/z , 337 ($\text{M}^+ + 1$, 6.7), 336 (M^+ , 29.5), 277 (int. rel.): (62.9), 264 (56.2), 105 (100)

7.1.2. Método general de preparación de los compuestos de la serie "b"

En un matraz de bola de 25 mL, provisto con agitación magnética, se colocaron en el siguiente orden 232 mg de melatonina (1 mmol), 224 mg de KOH recién molido (4 mmol). Se adicionaron DME (6 mL). Se agitó la mezcla de reacción en atmósfera inerte (Ar_2) durante 2 h a temperatura ambiente. Después de este tiempo se adicionó una solución de cloruro de benzoilo (0.11 mL, 1.1 mmol) en DME (2 mL) mediante cánula. Se mantuvo en agitación la suspensión durante 2 h. Se vertió la mezcla de reacción sobre hielo-agua (30 g). Se extrajo la suspensión con acetato de etilo (15 mL X 3). La fase orgánica se lavó con una solución de NaHCO_3 al 10 % (5 mL), con salmuera (10 mL) y agua (5 mL). Se trató la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro y se eliminó el disolvente mediante rotavapor. El análisis mediante CCF analítica indicó la presencia de un producto y de la materia prima (melatonina). Se purificó el producto de reacción por cristalización de etanol o benceno.

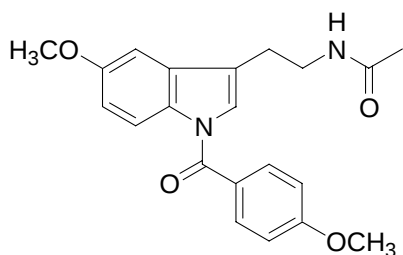
1-benzoilmelatonina (**1b**)



N-[2-(1-benzoil-5-metoxi-1*H*-indol-3-il)etil]acetamida

p.f.: 123-125° (EtOH)
 IR ν : 3294, 3081, 2933, 1671, 1655, 1379
 RMN ^1H δ : 8.27 (d, 1H, $J=8.8$), 7.7-7.5 (m, 5H), 7.02 (d, 1H, $J=2.3$), 6.97 (dd, 1H, $J=8.9, 2.5$), 5.55 (sa, 1H, inter. con D_2O), 3.87 (s, 3H), 3.52 (q, 2H, $J=6.9$), 2.84 (t, 2H, $J=6.9$), 1.91 (s, 3H)
 EM m/z , 337 (M^++1 , 6.7), 336 (M^+ , 28.6), 105 (int. rel.): (100), 77 (33.8)

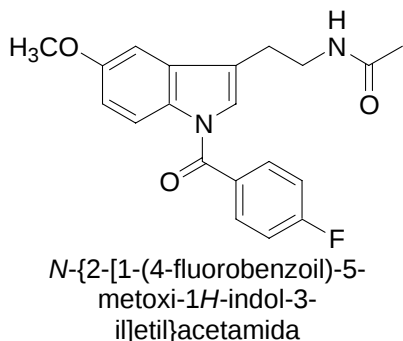
1-*p*-metoxibenzoil-melatonina (**2b**)



N-{2-[5-metoxi-1-(4-metoxibenzoil)-1*H*-indol-3-il]etil}acetamida

p.f.: 119-121° (EtOH)
 IR ν : 3295, 2934, 2836, 1666, 1604, 1375, 1257
 RMN ^1H δ : 8.24 (d, 1H, $J=8.7$), 7.7 (d, 1H, $J=8.7$), 7.16 (s, 1H), 7.03-6.96 (m, 4H), 5.59 (sa, 1H, inter. con D_2O), 3.91 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.55 (q, 2H, $J=6.6$), 2.88 (t, 2H, $J=6.9$), 1.94 (s, 3H)
 EM m/z , 367 (M^++1 , 7.6), 366 (M^+ , 32.3), 308 (int. rel.): (10.5), 307 (50.5), 135 (100)

**1-*p*-fluorobenzoilmelatonina
(3b)**



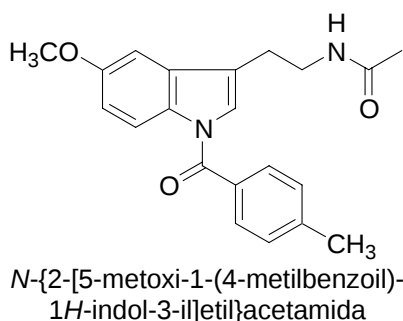
p.f.: 153-154° (C₆H₆)

IR ν : 3295, 3076, 1671, 1601, 1476, 1381, 1268

RMN ¹H δ : 8.26 (d, 1H, J= 8.7), 7.76-7.71 (m, 2H), 7.26-7.19 (m, 2H), 7.08 (s, 1H), 7.00 (dd, 1H, J= 8.9, 2.7), 6.98 (d, 1H, J= 2.4), 5.58 (sa, 1H, inter. con D₂O), 3.89 (s, 3H), 3.55 (q, 2H, J= 6.0), 2.87 (t, 2H, J= 6.3), 1.94 (s, 3H)

EM m/z, 355 (M⁺+1, 3.5), 354 (M⁺, 13.3), 295 (int. rel.): (54.9), 123 (100), 95 (16.8)

**1-*p*-metilbenzoilmelatonina
(4b)**



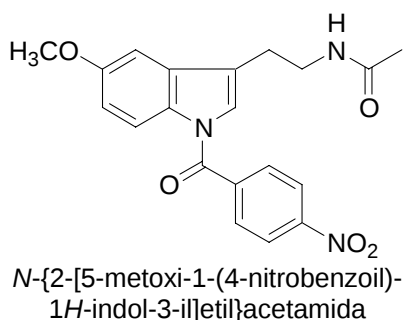
p.f.: 139-141° (C₆H₆)

IR ν : 3299, 2957, 2928, 2858, 1725, 1675, 1377, 1270

RMN ¹H δ : 8.27 (d, 1H, J= 9.0), 7.62-7.59 (m, 2H), 7.32 (d, 2H, J= 7.8), 7.12 (s, 1H), 7.03 (d, 1H, J= 2.1), 7.02 (dd, 1H, J= 9.0, 2.4), 5.59 (sa, 1H, inter. con D₂O), 3.89 (s, 3H), 3.54 (q, 2H, J= 6.3), 2.86 (t, 2H, J= 6.3), 2.46 (s, 3H), 1.93 (s, 3H)

EM m/z, 351 (M⁺+1, 5.9), 350 (M⁺, 25), 291 (int. rel.): (64.7), 119 (100), 91 (29.4)

**1-*p*-nitrobenzoilmelatonina
(5b)**



p.f.: 185-186° (EtOH)

IR ν : 3289, 3079, 2934, 1672, 1632, 1524, 1390

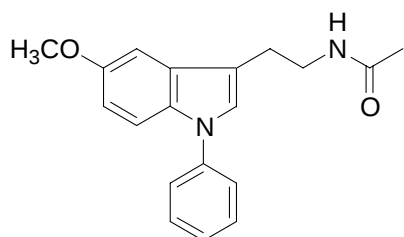
RMN ¹H δ : 8.39- 8.35 (m, 2H), 8.27 (d, 1H, J= 8.8), 7.87-7.82 (m, 2H), 7.04 (d, 1H, J=2.0), 6.99 (dd, 1H, J= 8.8, 2.5), 6.93 (s, 1H), 5.59 (sa, 1H, inter. con D₂O), 3.88 (s, 3H), 3.54 (q, 2H, J= 7.0), 2.86 (t, 2H, J= 6.7), 1.92 (s, 3H)

EM m/z, 382 (M⁺+1, 13.8), 381 (M⁺, 16.2), 323 (int. rel.): (21), 322 (100), 150 (74.3)

7.1.3. Método general de preparación de los compuestos de la serie “c”

En un matraz de bola de 25 mL, acondicionado con agitación magnética, se colocaron 232 mg de melatonina, 47.6 mg de CuI, 175 mg de K₂CO₃, 1.2 mmol del correspondiente *p*-yodofenil derivado y 6 mL de DMF. Se calentó la mezcla a reflujo durante 4 h. Después de este tiempo se vertió la mezcla de reacción sobre agua (40 mL). Se extrajo la suspensión con acetato de etilo (15 mL X 3). La fase orgánica se lavó con salmuera (10 mL) y se trató con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida. El análisis por CCF analítica indicó la presencia de un producto además de la materia prima (melatonina). Se purificó el producto por cristalización.

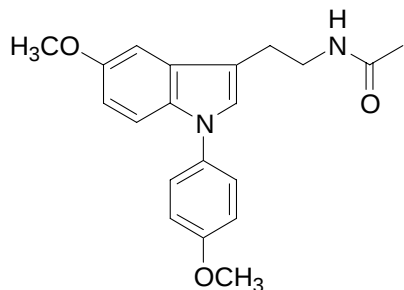
1-fenilmelatonina (**1c**)



N-[2-(5-metoxi-1-fenil-1*H*-indol-3-il)etil]acetamida

p.f.: 114° (C₆H₆)
 IR ν : 3284, 3068, 2933, 1648, 1500, 1485
 RMN ¹H δ : 7.53-7.44 (m, 4H), 7.35-7.29 (m, 2H), 7.18 (s, 1H), 7.08 (d, 1H, J= 2.4), 6.89 (dd, 1H, J= 8.9, 2.4), 5.88 (sa, 1H, inter. con D₂O), 3.88 (s, 3H), 3.64 (q, 2H, J= 6.6), 2.99 (t, 2H, J= 6.9), 1.97 (s, 3H)
 EM m/z, 309 (M⁺+1, 5.7), 308 (M⁺, 24.8), 249 (int. rel.): (74.3), 236 (100), 193 (17.1)

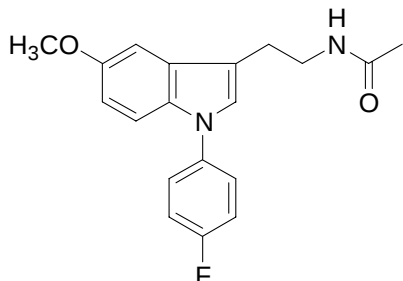
1-*p*-metoxifenilmelatonina (**2c**)



N-{2-[5-metoxi-1-(4-metoxifenil)-1*H*-indol-3-il]etil}acetamida

p.f.: 117-119° (C₆H₆)
 IR ν : 3289, 3078, 2934, 2834, 1649, 1514, 1481, 1246
 RMN ¹H δ : 7.36-7.33 (m, 3H), 7.09 (s, 1H), 7.05 (d, 1H, J= 2.4), 7.01-6.98 (m, 2H), 6.86 (dd, 1H, J= 8.7, 2.4), 5.59 (sa, 1H, inter. con D₂O), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.61 (q, 2H, J= 6.6), 2.97 (t, 2H, J= 6.9), 1.93 (s, 3H)
 EM m/z, 339 (M⁺+1, 6.7), 338 (M⁺, 27.6), 279 (int. rel.): (60.9), 266 (100)

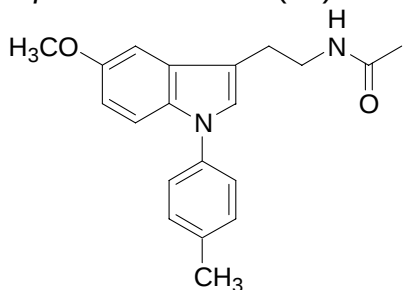
1-*p*-fluorofenilmelatonina (3c)



N-[2-[1-(4-fluorofenil)-5-metoxi-1*H*-indol-3-il]etil]acetamida

p.f.: 134-136° (C₆H₆)
 IR ν : 3251, 3077, 2935, 1639, 1512, 1480, 1221 cm⁻¹
 RMN ¹H δ : 7.44-7.39 (m, 2H), 7.37 (d, 1H, J= 9.0), 7.22-7.16 (m, 2H), 7.12 (s, 1H), 7.08 (d, 1H, J= 2.4), 6.89 (dd, 1H, J= 9.0, 2.7), 5.80 (sa, 1H, inter. con D₂O), 3.92 (s, 3H), 3.67 (q, 2H, J= 6.3), 3.04 (t, 2H, J= 6.9), 2.01 (s, 3H)
 EM m/z, 327 (M⁺+1, 5.7), 326 (M⁺, 25.7), 267 (int. rel.): (83.8), 254 (100), 211 (19.1)

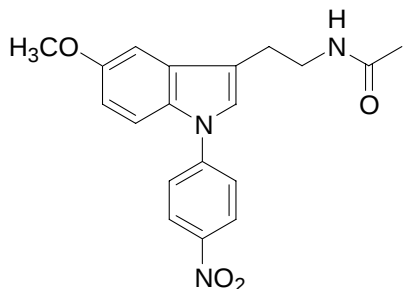
1-*p*-tolilmelatonina (4c)



N-[2-(1-(4-metilfenil)-5-metoxi-1*H*-indol-3-il)etil]acetamida

p.f.: 112-114° (C₆H₆)
 IR ν : 3290, 3082, 2932, 1648, 1517, 1480
 RMN ¹H δ : 7.44 (d, 1H, J=9), 7.37-7.28 (m, 4H), 7.15 (s, 1H), 7.07 (d, 1H, J= 2.4), 6.89 (dd, 1H, J= 9.0, 2.4), 5.63 (sa, 1H, inter. con D₂O), 3.89 (s, 3H), 3.63 (q, 2H, J= 6.6), 2.99 (t, 2H, J= 6.6), 2.42 (s, 3H), 1.96 (s, 3H)
 EM m/z, 323 (M⁺+1, 6.7), 322 (M⁺, 29.5), 263 (int. rel.): (76.2), 250 (100)

1-*p*-nitrofenilmelatonina (5c)



N-[2-[5-metoxi-1-(4-nitrofenil)-1*H*-indol-3-il]etil]acetamida

p.f.: 180-181° (C₆H₆)
 IR ν : 3289, 3085, 2932, 1649, 1593, 1504, 1335
 RMN ¹H δ : 8.27 (d, 2H, J= 9), 7.5 (d, 2H, J= 9.0), 7.46 (d, 1H, J= 9.2), 7.16 (s, 1H), 7.02 (d, 1H, J= 2.4), 6.83 (dd, 1H, J= 9.0, 2.6), 6.28 (sa, 1H, inter. con D₂O), 3.79 (s, 3H), 3.50 (q, 2H, J= 7.0), 2.88 (t, 2H, J= 7.4), 1.87 (s, 3H)
 EM m/z, 354 (M⁺+1, 4.8), 353 (M⁺, 20), 294 (int. rel.): (100), 281 (66.7), 235 (30.5)

7.2. Modelado molecular de los análogos de melatonina

El análisis conformacional, optimización de geometría y cálculos de propiedades electrónicas se realizaron con el programa Spartan 5.0, en una estación de trabajo Indigo 2. El análisis conformacional se realizó con el campo de fuerza TRIPOS y el protocolo empleado fue el de Búsqueda Sistemática. El ángulo de rotación fue de 30°.

La estructura de la melatonina se construyó a partir de fragmentos convencionales y se preoptimizó su geometría. De acuerdo a datos previamente publicados el grupo metoxilo se asignó en conformación “exo” al anillo, o sea orientado hacia la cadena lateral. Se realizó un análisis conformacional de la cadena lateral. La rotámeros se obtuvieron sobre los enlaces τ_1 , τ_2 , τ_3 (Figura 48).

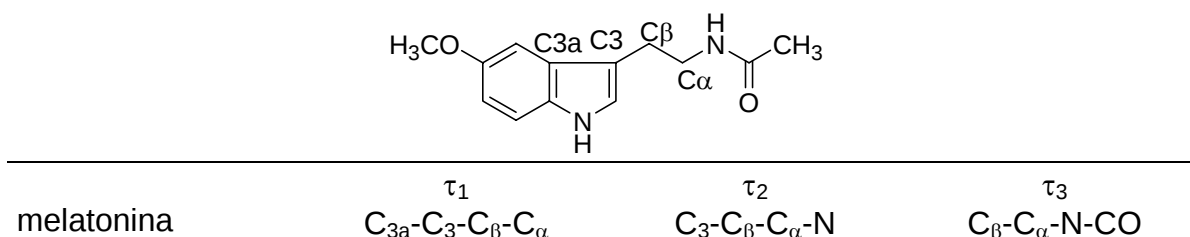


Figura 48. Rotámeros de melatonina considerados en el análisis conformacional.

La geometría del confórmero más estable se optimizó usando el método semiempírico AM1 (opciones estándar, corrección MMK para grupo amida). La estructura resultante se utilizó como patrón para la construcción de los análogos de melatonina. Después de la introducción de los sustituyentes en la molécula patrón se realizó un análisis conformacional para cada análogo. Los enlaces entre el anillo indólico y el anillo bencénico se consideraron para dicho análisis. (Figura 49).

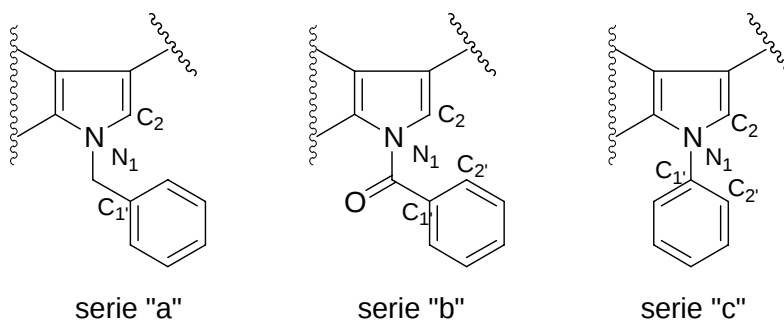


Figura 49. Definición de los átomos considerados para el análisis conformacional de los análogos de melatonina.

Finalmente, la geometría del confórmero más estable se optimizó con el método antes señalado (AM1). Los cálculos de propiedades electrónicas y la distribución electrónica resultante se utilizaron para generar las energías de potencial molecular electrostático (PME). (ver Discusión) Debido a que el paso inicial de la interacción ligando-receptor es un evento de reconocimiento dependiente de las interacciones electrostáticas, una forma de saber *a priori* una posible interacción es mediante el cálculo de los PME's de una o varias moléculas.

7.3. Determinación de la constante de afinidad de los análogos de melatonina en membranas de cerebro de pollo

Las constantes de disociación para los compuestos fueron determinadas por NOVASCREEEN Biosciences Corporation, Hanover, MD, USA.

Se describe de manera breve el procedimiento. En este método se emplearon las membranas de cerebro de pollo como fuente de los sitios receptores. Los cerebros de pollo de 5-6 semanas de edad (*Gallus domesticus*), mantenidos en un régimen de luz controlada (14 h. luz/10 h. oscuridad), fueron disecados, enfriados con hielo y mantenidos a -70°C . Los tejidos descongelados se homogenizaron en buffer Tris-HCl 50 mM, el cual contenía 0.1% de ácido ascórbico (pH= 7.5 a 4°C), con un Polyton Brinkmann a una velocidad de 5 durante 10 seg. El homogenizado se centrifugó a $44\,000 \times g$ durante 10 min a 4°C . La pastilla (pellet) se lavó y resuspendió con buffer Tris-HCl y se centrifugó de nuevo a la misma velocidad durante 10 min. El residuo membranar se suspendió en buffer de Tris-HCl a una concentración del tejido de 20 mg /mL.

La solución metanólica del radioligando, 2-[^{125}I]-yodomelatonina, se evaporó a sequedad y se resuspendió en una solución 50 mM de Tris-HCl (pH= 7.5 a 4°C) conteniendo 0.01 % de albúmina sérica. Los compuestos a evaluar se disolvieron en solución acuosa de DMSO. El ensayo se inició por la adición de alícuotas de 220 μL de membranas suspendidas en buffer Tris-HCl a los tubos que contenían 20 μL de la sustancia a evaluar o el vehículo y 20 μL de 2-[^{125}I]-yodomelatonina (70-90 pM para estudios de competencia y 0.05-2 nM para estudios de saturación). La unión de la 2-[^{125}I]-yodomelatonina se determinó por duplicado después de 2 horas de incubación. Los estudios de unión se terminaron por la adición de 5 mL de buffer Tris-HCl frío e inmediata filtración al vacío (Filtros de fibra de vidrio No. 30), previo enjuague en una solución de polietilenimina al 0.5 %. Cada filtro se lavó dos veces con buffer Tris-HCl frío, se secó y se contó en un contador gamma. La unión no específica se define como la unión en presencia de 3 μM de 6-cloromelatonina. La unión específica de la 2-[^{125}I]-yodomelatonina se calculó por la sustracción de la unión no específica del total de la unión.

Los valores de K_i se calcularon de los valores de CI_{50} por el método de Cheng-Prusoff. Esta técnica es la utilizada por Novascreen pero con la modificación de la temperatura 37 °C durante 60 minutos. Los resultados se muestran en la Tabla 11.¹²²

7.4. Evaluación de la actividad contráctil de los análogos de melatonina (duodeno de rata)

Se utilizaron ratas macho (Wistar) con un peso entre 180 y 230 g que fueron privadas de alimento 18 horas antes del experimento, previa adaptación a ciclos de luz/obscuridad (10/14), con acceso libre al agua. Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y se colocaron en posición supina sobre la mesa. Se les practicó una incisión longitudinal en el abdomen, localizando y extrayendo la porción intestinal que corresponde al duodeno. El tejido se transfirió a una caja Petri con solución Ringer (composición en mM: NaCl 137.9, KCl 2.7, NaHCO₃ 11.9, CaCl₂ 1.82, KH₂PO₄ 0.37 y glucosa 5.56) a 37 ±1 °C de temperatura. Se eliminó el mesenterio adherido y se cortaron cuatro fragmentos de aprox. 1.5–2 cm cada uno, a los que, en un extremo, se les sujetó un hilo de sutura de 5 cm y en el otro extremo uno de 20 cm.

Los fragmentos se colocaron en cámaras para tejido aislado convencionales, sujetándolos por el hilo corto y en el orden siguiente: en el canal uno se colocó la porción proximal al estómago y así sucesivamente, de tal forma que en el canal cuatro se colocó el extremo distal. Se les adicionó a las cámaras 15 mL de solución Ringer, a 37 ±1 °C y, mediante una manguera, se burbujeó el gas carbógeno (5% CO₂ y 95 % O₂). El hilo largo de cada segmento se sujetó al transductor correspondiente a una tensión de 2 g. Los registros se llevaron a cabo usando un polígrafo (marca Grass, Modelo 7D) y los datos se adquirieron y analizaron mediante el programa incluido Poly View. Bajo estas condiciones se dejó estabilizar el tejido de 1.5 a 2 h. Posteriormente, se procedió a la administración de la melatonina y de los análogos de melatonina de acuerdo las siguientes concentraciones: 10, 20, 40, 80, 160 y 320 µM. Se registró la actividad basal durante 5 minutos previos a la administración de la solución del compuesto en cuestión y se continuó el registro hasta completar un total de 10 minutos. Pasado este tiempo se lavó el tejido con solución Ringer (37 ±1°C) y se dejó estabilizar el tejido durante 30 minutos antes de aplicar la siguiente concentración.

Se determinó el área bajo la curva, amplitud y frecuencia de la pre- y de la post administración. Se calculó el promedio de % de relajación para cada

concentración con el fin de determinar de manera gráfica la CI_{50} para cada sustancia.

En todos los casos se observó una disminución de la actividad contráctil del tejido dependiente de la dosis, además, de que el efecto se revertía después de lavar el tejido con una solución Ringer-Krebs. Para observar la existencia de diferencia entre la actividad de los diferentes compuestos, se realizó una ANOVA y posteriormente para determinar si hay diferencia significativa entre las medias se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan con el programa UNISTAT versión 3.0a. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

7.5. Evaluación del efecto ansiolítico de los análogos de melatonina en rata con el modelo Plus-Maze

Para evaluar la ansiedad en ratas se utilizó el equipo Plus-Maze de madera, el cual consiste de dos brazos abiertos 50 X 10 cm y de dos brazos cerrados 50 X10 X40 cm, sin techo, dispuestos en cruz con los brazos semejantes frente a frente y con una elevación de 50 cm. En este modelo el efecto ansiolítico se manifiesta cuando el animal incrementa su tiempo de permanencia en el brazo abierto. Se ilustra este modelo en Figura 44.

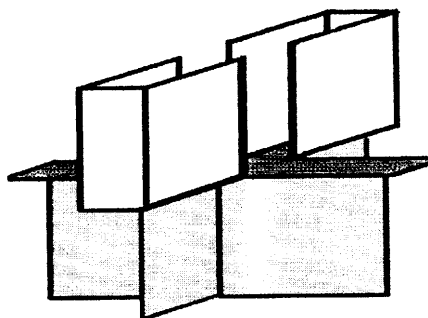


Figura 50. Equipo Plus-Maze

Para esta evaluación se utilizaron 72 ratas macho HsdBrIHan:Wist de peso entre 175-200 g (Harlan, México) distribuidas en 12 grupos de $n=6$. Se realizó un estudio piloto para determinar las dosis a evaluar. Las ratas se mantuvieron en laboratorio durante 5 días con agua y alimento *ad libitum*. Se realizó la administración intraperitoneal de la sustancia a evaluar o el vehículo (propilenglicol 40 %, etanol 20 %, agua destilada 40 %). Se esperó durante 25 min y se colocó al animal en el arenero durante 5 min. Se colocó al animal en el equipo Plus-Maze durante 5 min. Se registró el número de entradas a los brazos abiertos, el número de entradas a los brazos cerrados, el tiempo de permanencia en cada brazo abierto, el tiempo de permanencia en cada brazo cerrado, así como la defecación micción, la actividad motora, la piloerección y las caídas.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de t de Student con $p<0.005$. Los resultados se resumen en la Tabla 14.

8. CONCLUSIONES

Se ha postulado que la melatonina ejerce su actividad biológica mediante la interacción con sus sitios receptores. Dicha interacción está mediada por los grupos metoxilo y acetamido además de que el anillo indólico forma un complejo de transferencia de carga con los aminoácidos aromáticos ubicados en el sitio receptor siendo la densidad de carga la responsable de dicha interacción.

En el presente trabajo se incorporaron diversos sustituyentes a la posición 1 de la estructura de la melatonina con el fin de alterar las propiedades electrónicas sobre el anillo indólico y que esto tuviera alguna repercusión sobre la actividad biológica.

- Inicialmente, se calcularon las propiedades electrónicas de la melatonina, de los análogos de melatonina y de la 2-yodomelatonina. Comparando con melatonina se observó que la incorporación de un grupo bencilo no altera, significativamente, la densidad electrónica sobre el anillo indólico independientemente de los sustituyentes que a su vez tenga el grupo bencilo. Un grupo benzoilo, en la misma posición, causa una disminución de la densidad de carga y dependiendo de los sustituyentes sobre el grupo benzoilo es la magnitud de dicho decremento. La incorporación de un grupo fenilo en la misma posición no causa un decremento significativo, pero dependiendo de los sustituyentes sobre el grupo fenilo se mantiene o disminuye la densidad de carga. Entonces, sí se alteran las propiedades electrónicas sobre el anillo indólico al incorporar algún sustituyente en la posición 1 de dicho núcleo.
- Se realizó la síntesis y caracterización estructural de los siguientes compuestos considerados análogos de melatonina:

1-Bencilmelatonina	1-Benzoilmelatonina	1-Fenilmelatonina
1- <i>p</i> -Metoxibencilmelatonina	1- <i>p</i> -Metoxibenzoilmelatonina	1- <i>p</i> -Metoxifenilmelatonina
1- <i>p</i> -Fluorobencilmelatonina	1- <i>p</i> -Fluorobenzoilmelatonina	1- <i>p</i> -Fluorofenilmelatonina
1- <i>p</i> -Metilbencilmelatonina	1- <i>p</i> -Metilbenzoilmelatonina	1- <i>p</i> -Metilfenilmelatonina
	1- <i>p</i> -Nitrobenzoilmelatonina	1- <i>p</i> -Nitrofenilmelatonina

En la caracterización estructural de este conjunto de compuestos se observó que los derivados con un grupo benzoilo ejercen un efecto estérico sobre la

cadena lateral de la posición 3 del anillo indólico restringiendo los grados de libertad de la misma. Lo anterior concordó con los resultados obtenidos en el análisis conformacional de este conjunto de compuestos.

- Se determinó la constante de afinidad de los análogos de melatonina, observándose que la incorporación de un grupo voluminoso en la posición 1 del anillo indólico disminuye sensiblemente la constante de afinidad, por lo que se debe considerar que no es exclusivo el factor electrónico responsable de la interacción ligando-receptor sino que también está involucrado el factor estérico. Lo anterior se concluye al observar el siguiente orden de afinidad decreciente grupo fenilo>grupo bencilo. Sin embargo, cabe señalar que se observó, en estas dos series, la tendencia a que grupos electrodonadores incrementan la constante de afinidad sucediendo lo contrario con grupos electroattractores, lo que concuerda, de manera parcial, con la hipótesis planteada. Son de particular atención los derivados con un grupo benzoilo debido a que en esta serie el orden de afinidad decreciente fue $\text{NO}_2 > \text{F} > \text{CH}_3 > \text{H} > \text{OCH}_3$, situación contraria a lo observado en las otras series, de lo que se concluye, para esta serie, que tanto el factor estérico como el factor polar del sustituyente influyen en la afinidad.

No se pueden correlacionar entre si todas las series debido a que cada una tiene una tendencia diferente. Una posible explicación sería que, dado que los ensayos de afinidad se realizaron en una membrana en la cual probablemente exista una mezcla de receptores MT_1 y MT_2 , los valores observados reflejen esta situación. Esto conduce a la siguiente interrogante ¿los compuestos de la serie “b” interactúan con el receptor MT_2 y los compuestos de la serie “a” y “c” lo hacen con el receptor MT_1 o viceversa? Esta duda permanecerá mientras no se puedan evaluar estos compuestos con cada tipo de receptor.

- La determinación del efecto de los análogos de melatonina sobre la actividad contráctil de duodeno aislado de rata permitió observar que todos los compuestos presentan un efecto de relajación dosis-respuesta, esto es, se comportan de manera similar a la melatonina, lo que sugiere una gran especificidad en cuanto a la respuesta.

En cuanto a la variación de la respuesta, los compuestos con un grupo metoxilo mostraron mayor actividad en cada serie; esto concuerda con el análisis de potencial electrostático. Caso contrario sucede con los derivados que presentan un grupo electroattractor, concordando también con los resultados del análisis electrónico. Es de especial atención el compuesto benzoilado con un grupo nitro; mientras que en el ensayo de afinidad mostró mayor afinidad en su serie, en el de tejido aislado fue el menos activo, inclusive a dosis bajas se comportó como un estimulante de la contracción. Estos hallazgos conducen a proponer que dicho compuesto podría comportarse como un posible agonista parcial.

- La evaluación del efecto ansiolítico en rata de los análogos melatonina, con mayor valor de afinidad, con el modelo Plus-Maze se realizó con la intención de observar la funcionalidad de los compuestos en un sistema *in vivo*. Sobre la base de los resultados obtenidos se observó que los compuestos con un grupo metoxilo resultaron ser igual o ligeramente más activos que la melatonina, y por el contrario los compuestos con un grupo nitro fueron inactivos como agentes ansiolíticos e inclusive alguno tuvo un comportamiento como ansiogénico.

En consecuencia, la incorporación de algún grupo en la posición 1 del anillo indólico de la melatonina altera sus propiedades electrónicas y esto se refleja en su actividad biológica modulándose de acuerdo a los sustituyentes introducidos en el anillo aromático.

9. Bibliografía

- 1 Krause D. N. y Dubocovich M. L. *Trends Neurosci.* 1990,13,464-470; Reiter R. J. *Endocr. Rev.* 1991,12,151-180
- 2 McCord C. P., Allen F. P. *J. Exp. Zool.* 1917,23,207-224
- 3 Kitay J. I., Altschule, M. D. *Endocrinology* 1954,55,782-784
- 4 Lerner A. B., Case J. D., Takahashi Y., Lee T. H., Mori W. *J. Am. Chem. Soc.* 1958,80,2857; Lerner A. B., Case J. D., Heizelman R. V. *J. Am. Chem. Soc.* 1959,81,6084-6085
- 5 Weissbach H., Redfield B. C., Axelrod J. *Biochim. Biophys.* 1960,43,325-353
- 6 Axelrod J., Weissbach H. *J. Biol. Chem.* 1961,236,211-213
- 7 Wurtman R. J., Axelrod J., Chu E. W. *Science* 1963,141,277-278
- 8 Quay W. B., *Gen comp. Endocrinol.* 1963,3,473-479
- 9 Klein D. C., S  ller J. L. *Science* 1972,177,532-533
- 10 Heward C. B., Hadley M. E. *Life Sci.* 1975,17,1167-1178
- 11 White B. H., Sekura R. D., Rollag M. D. *J. Comp. Physiol.* 1987,157,153-159
- 12 Ebisawa T., Karne S., Lerner M. R., Reppert S. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994,91,6133-6137
- 13 Borjigin J., Li X., Snyder S. H. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999,39,53-65
- 14 Wiechmann, A. F. *Exp. Eye Res.* 1986,42, 507-527
- 15 Li, X., Borjigin, J., Snyder, S. H., *Curr. Opin. Neurobiol.* 1998,8,648-651
- 16 Cardinali, D. P. and Vacas, M. I. *Cell. Molec. Neurobiol.* 1987, 7, 323-337
- 17 Reiter, R. J. *Med.* 1998,30, 103-108; Li, X., Borjigin, J., Snyder, S. H., *Curr. Opin. Neurobiol.* 1998,8,648-651
- 18 Wurtman, R. J., and Zhdanova, I. *Lancet* 1995,346,1491; Shochat, T., Haimov, I., and Lavie, P. *Ann Med.* 1998,30,109-114,
- 19 Cassone, V. M., Warren, W. S., Brooks, D. S., and Lu, J. *J. Biol. Rhythms* 1993,8,S73-S81; Cassone, V. M., and Natesan, A. K. *J. Biol. Rhythms* 1997,12(6),489-497; Benloucif, S., Masana, M.I., and Dubocovich, M.L. *Am. J. Physiol.* 1997,42, R1855-R1860; Sack, R. L., Lewy, A. J., and Hughes, R.J. *Ann Med.* 1998,30,115-121,
- 20 Sack, R. L., Lewy, A. J., and Hughes, R.J. *Ann Med.* 1998,30,115-121; Brzezinski, A. *N. Engl. J. Med.* 1997,336,186-195
- 21 Silman, R. J. *Endocrinol.* 1991,128,7-11; Morgan, P. J., Barrett, P., Howel, H. E., and Helliwell, R. *Neurochem. Int.* 1994,24,101-146; Maywood, E. S., and Hastings, M. H. *Endocrinology (Baltimore)* 1995,136, 144-153; Reiter, R. J. *Med.* 1998,30,103-108; Kripke, D. F., Elliott, J. A., Youngstedt, S. D., and Smith, J. S. *Ann. Med.* 1998,30,81-87,
- 22 Reiter, R. J. *Ann Med.* 1998,30,103-108,
- 23 Silman, R. J. *Endocrinol.* 1991,128,7-11; Messenger, S., Caillol, M., Rossano, B., and Martinet, L. *J. Neuroendocrinol.* 1996,8,801-807; Reiter, R. J. *Ann Med.* 1998,30,103-108; Kripke, D. F., Elliott, J. A., Youngstedt, S. D., and Smith, J. S. *Ann. Med.* 1998,30,81-87,
- 24 Ayre, E. A., Yuan, H., and Pang, S. F. *J. Endocrinol.* 1992,133,5-11; Yie, S.-M., Niles, L. P., and Younglai, E. V. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995,80,1747-1749; Murayama, T., Kawashima, M., Takahashi, T., Yasuoka, T., Kuwayama, T., and Tanaka, K. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997,215,386-392,
- 25 Viswanathan, M., Laitinen, J. T., and Saavedra, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990,87,6200-6203; Capsoni, S., Viswanathan, M., Oliveira, A. M., and Saavedra, J. M. *Endocrinology (Baltimore)* 1994,135,373-378; Krause, D. N., Barrios, V. E., and Duckles, S. P. *Eur. J. Pharmacol.* 1995,276,207-213; Geary, G. G., Krause, D. N., and Duckles, S. P. *Am. J. Physiol.* 1997,273,H1530-H1536; Doolen, S., Krause, D., Dubocovich, M. L., and Duckles, S. P. *Eur. J. Pharmacol.* 1998,345,67-68
- 26 Song, Y., Pang, C. S., Ayre, E. A., Brown, G. M., and Pang, S. F. *Eur. J. Endocrinol.* 1996,135,128-133; Song, Y., Chan, C. W. Y., Brown, G. M., Pang, S. F., and Silverman, M. *FASEB J.* 1997,11,93-100
- 27 Ying, S., Niles, L. P., and Crocker, C. *Eur. J. Pharmacol.* 1993,246,89-96; Molis, T. M., Spriggs, L. L., and Hill, S. M. *Mol. Endocrinol.* 1994,8,1681-1690; Cos, S., and Sanchez-Barcelo, E. J.

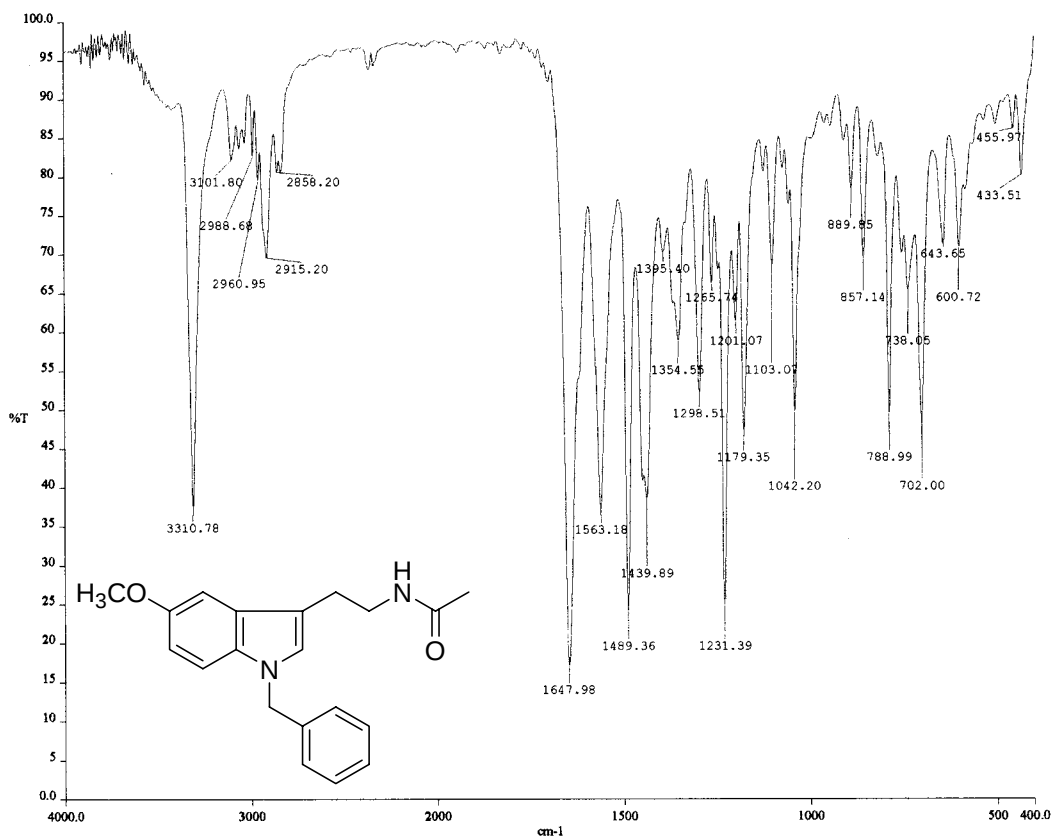
- Cancer Lett.* 93, 207-212,1995; Cos, S., Recio, J., and Sanchez-Barcelo, E. J. *Life Sci.* 1996,58,811-816
- 28 Avery, D., Lenz, M., and Landis, C. *Ann.Med.* 1998,30,122-130,
 - 29 Benitez-King, G., and Anton-Tay, F. *Experientia* 1993,49,635-641,
 - 30 Reiter, R. J. *Endocr. Rev.* 1991,12,151-180; Menendez-Pelaez, A., and Reiter, R. J. *J. Pineal Res.* 1993,15,59-69; Finocchiaro, L. M. E., and Glikén, G. C. *J. Pineal Res.* 1998,24,22-34
 - 31 Benitez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., and Anton-Tay, F. *J. Pineal Res.* 1990,9,209-220; Reiter, R. J. *Endocr. Rev.* 1991,12,151-180,
 - 32 Menendez-Pelaez, A., and Reiter, R. J. *J. Pineal Res.* 1993,15,59-69; Benitez-King, G., and Anton-Tay, F. *Experientia* 1993,49,635-641
 - 33 Starkey, S. *Neurosci. Lett.* 1996,211,199-202; Anton-Tay, F., Martinez, I., Tovar R., and Benitez-King, G. *J. Pineal Res.* 1998,24,35-42; Betthai, I., Guerrero, J. M., Reiter, R. J., and Osuna, C. *J. Pineal Res.* 1998,25,34-40
 - 34 Wiesenberger, I., Missbach, M., Kahlen, J.-P., Schrader, M., and Carlberg, C. *Nucleic Acids Res.* 1995,23,327-333; Missbach, M., Jagher, B., Sigg, I., Nayeri, S., Carlberg, C., and Wiesenberger, I. *J. Biol. Chem.* 1996,271,13515-13522
 - 35 Cardinali, D. P., Vacas, M. I. and Lowenstein, P. R., 1985, in the Pineal Gland, current state of Pineal Research (Mess, B. Ruzsas, C. S., Tinea, L., Devet, P. editors) p 273-290, Elsevier
 - 36 Dubocovich, M. L. *FASEB J.* 1988,2,2765-2773
 - 37 Dubocovich, M. L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988,264, 902-910
 - 38 Morgan, P. J., Lawson, W., Davidson, G. and Howell, H. E., *J. Mol. Endocrinol.* 1989,3, R5-R8
 - 39 Carlson, L. L., Weaver, D. R. and Reppert *Endocrinology* 1989,125,2670-2676
 - 40 Vanecek, J. and Vollrath, L. *Brain Res.* 1989,505, 157-159
 - 41 Vakkuri, O. Leppälüto, J.; Vuolteenaho, O. *Acta Endocrinol.* 1984,106,152-157; b) Vakkuri, O., Lämsä, E., Rahkamaa, E., Ruotsalainen, H., Leppälüto, J., *Anal. Biochem.* 1984,142, 284-289
 - 42 Dubocovich, M. L. and Takahashi, J. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987,84, 3916-3920
 - 43 Vanecek, J. Pavlik, A. and Illnerova, H. *Brain Res.* 1987,435,359-362
 - 44 Morgan, P. J., Lawson, W. Davidso, G. and Howell, H. E. *Neuroendocrinology* 1989,50,359-362
 - 45 Carlson, L. L. and Reppert, S. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988,86,3882-3886; Chung, K. C. and Dubocovich, M. L. *Soc. Neurosci. Abstr.* 1989,15,421
 - 46 Cassone, V. M. *Trends, Neurosci.* 1990,13,457-464
 - 47 Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. *Neuron* 1994,13(5):1177-85
 - 48 Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995,92(19):8734-8
 - 49 Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA. *J. Biol. Chem.* 2000,275 (40):31311-7.
 - 50 Witt-Enderby P. A., Bennett J., Jarzynka M. J., Firestine S., Melanc M. A. *Life Sciences* 2003,72,2183-2198
 - 51 Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benlucif S, Masana MI. *FASEB J.* 1998,12(12):1211-20.; Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM. *Neuron* 1997,19(1):91-102
 - 52 Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, Duckles SP. *European J. Pharmacol* 1998,345(1):67-9
 - 53 Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. *Neurochemistry International* 1994,24(2):101-46; Witt-Enderby PA, Masana MI, Dubocovich ML. *Endocrinology* 1998,139(7):3064-71
 - 54 McNulty S, Ross AW, Barrett P, Hastings MH, Morgan PJ. *Journal of Neuroendocrinology* 1994,6(5):523-32; Witt-Enderby PA, Masana MI, Dubocovich ML. *Endocrinology* 1998,139(7):3064-71
 - 55 Witt-Enderby PA, Jarzynka MJ, Melan MA. *Neuroscience Abstracts* 2001,27:142
 - 56 Geary GG, Krause DN, Duckles SP. *American Journal of Physiology* 1997,273(3 Pt 2):H1530-6; Geary GG, Duckles SP, Krause DN. *British Journal of Pharmacology* 1998,123(8):1533-40
 - 57 Godson C, Reppert SM. *Endocrinology* 1997,138(1):397-404
 - 58 Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH. *Cellular Signalling* 2002,14,249-57

- 59 Hazlerigg DG, Thompson M, Hastings MH, Morgan PJ. *Endocrinology* 1996,137(1):210-8.; Witt-Enderby PA, MacKenzie RS, McKeon RM, Carroll EA, Bordt SL, Melan MA *Cell Motility and the Cytoskeleton* 2000,46,28-42
- 60 Sugden D, Yeh LK, Teh MT. *Reproduction, Nutrition, Development* 1999,39,335-44;Witt-Enderby PA, Chu GH, Gillen ML, Li PK. *J. Med. Chem.* 1997,40,4195-8.
- 61 Dubocovich ML, Masana MI, Iacob S, Sauri DM. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1997,355,365-75
- 62 Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S, Masana MI. *FASEB J.* 1998,12,1211-20
- 63 Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH, Markus RP. *European J. Pharmacol.* 2001,430,351-7.
- 64 Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. *Cell and Tissue Research* 2002,309,151-62
- 65 Ho MK, Yung LY, Chan JS, Chan JH, Wong CS, Wong YH, *British Journal of Pharmacology* 2001,132,1431-40; MacKenzie RS, Melan MA, Passey DK, Witt-Enderby PA. *Biochem. Pharmacology* 2002,63,587-595
- 66 Dubocovich ML. *Trends in Pharmacological Sciences* 1995,16(2):50-6; Molinari EJ, North PC, Dubocovich ML. *European Journal of Pharmacology* 1996,301(1-3):159-68
- 67 an O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrange P, Canet E, Boutin JA. *Journal of Biological Chemistry* 2000,275 (40):31311-7
- 68 Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrange P, Canet E, Boutin JA. *Biochem. Pharmacol* 2001,61(11):1369-79
- 69 Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A. *European Journal of Pharmacology* 2001,416(3):251-4
- 70 Niles, L. P., and Hashemi, F. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1990,10,553-557
- 71 Reppert, S. M., Weaver, D. R., and Ebisawa, T. *Neuron.* 1994,13,1177-1185; Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slangenaupt, S. A., and Gusella, J. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995,92,8734-8738.; Morgan, P. J., Barrett, P., Howel, H. E., and Helliwell, R. *Neurochem. Int.* 1994,24,101-146; Capsoni, S., Viswanathan, M., Oliveira, A. M., and Saavedra, J. M. *Endocrinology (Baltimore)* 1994,135,373-378; Witt-Enderby, P. A., and Dubocovich, M. L. *Mol. Pharmacol.* 1996,50,166-174; Vanecek, J., and Watanabe, K. *Neurosci. Lett.* 1998,252,21-24
- 72 Ginty, D. D., Kornhauser, J. M., Thompson, M. A., Bading, H., Mayo, K. E., Takahashi, J. S., and Greenberg, M. E. *Science* 1993,260,238-241; McNulty, A., Ross, A. W., Shiu K. Y., Morgan, P. J., and Hastings, M. H. *J. Neuroendocrinol.* 1996,8,635-645; McNulty, S., Ross, A. W., Harret, P., Hastings, M. H., and Morgan, P. J. *J. Neuroendocrinol.* 1994,6,523-532; Witt-Enderby, P. A., Masana, M. I., and Dubocovich, M. L. *Endocrinology (Baltimore)* 1998,139,3064-3071; von Gall, C., Duffield, G. E., Hastings, M. H., Kopp, M. D. A., Dehghani, F., Korf, H.-W., and Stehle, J. H. *J. Neurosci.* 1998,18,10389-10397.; Kopp, M. D. A., Schomerus, C., Dehghani, F., Korf, H.-W., and Meissl, H. *J. Neurosci.* 1999,19,206-219
- 73 Eison, A. S., and Mullins, U. L. *Life Sci.* 53,393-398,1993; Popova, J. S., and Dubocovich, M. L. *J. Neurochem.* 1995,64,130-139
- 74 Godson, C., and Reppert, S. M. *Endocrinology (Baltimore)* 1997,138,397-404; McArthur, J., Hunt, A. E., and Gillette, M. U. *Endocrinology (Baltimore)* 1997,138,627-634; Anton-Tay, F., Ramirez, G., Martinez, I., and Benitez-King, G. *Neurochem. Res.* 1998,23(5),601-606.; Betthai, I., Guerrero, J. M., Reiter, R. J., and Osuna, C. *J. Pineal Res.* 1998,25,34-40.; Barrett, P., Davidson, G., Hazlerigg, D. G., Morris, M. A., Ross, A. W., and Morgan, P. J. *Endocrinology (Baltimore)* 1998,139,163-171; Ross, A. W., Webster, C. A., Thompson, M., Barrett, P., and Morgan, P. J. *Endocrinology (Baltimore)* 1998,139,1723-1730
- 75 Starkey, S. *Neurosci. Lett.* 1996,211,199-202; Betthai, I., Guerrero, J. M., Reiter, R. J., and Osuna, C. *J. Pineal Res.* 1998,25,34-40
- 76 Song, Y., Chan, C. W. Y., Brown, G. M., Pang, S. F., and Silverman, M. *FASEB J.* 1997,11,93-100; Dubocovich, M. L., Masana, M. I., Iacob, S., and Sauri, D. M. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1997,355,355-365; Doolen, S., Krause, D., Dubocovich, M. L., and Duckles, S. P. *Eur. J. Pharmacol.* 1998,345,67-68; Dubocovich, M. L., Yun, K., Al-Ghoul, W. M., Benloucif, S., and Masana, M. I. *FASEB J.* 1998,12,1211-120

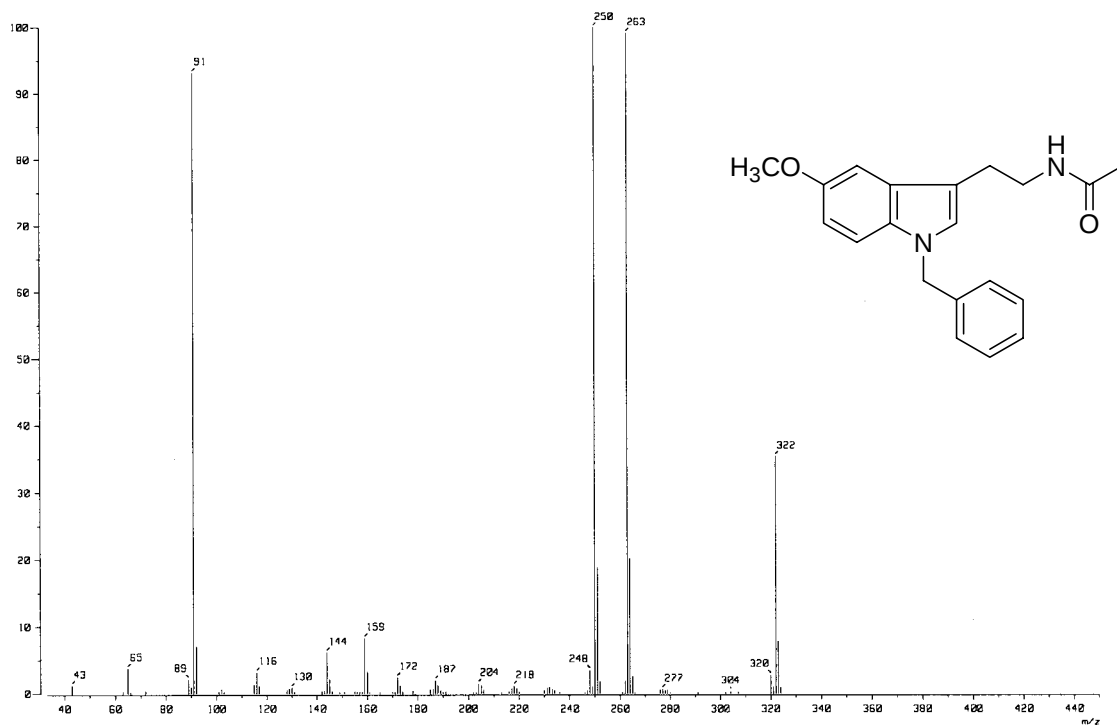
-
- 77 Dubocovich, M. L., Masana, M. I., Iacob, S., and Sauri, D. M. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1997,355,355-365;; Teh, M. T., and Sugden, D. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1998,358,522-528,
- 78 Dubocovich, M. L., Yun, K., Al-Ghoul, W. M., Benloucif, S., and Masana, M. I. *FASEB J.* 1998,12,1211-120; Doolen, S., Krause, D., Dubocovich, M. L., and Duckles, S. P. *Eur. J. Pharmacol.* 1998,345,67-68,
- 79 Navajas C, Kokkola T, Poso A, Honka N, Gynther J, Laitinen JT. *European Journal of Pharmacology* 1996,304,173-83
- 80 Conway S, Canning SJ, Barrett P, Guardiola-Lemaitre B, Delagrang P, Morgan PJ. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997,239(2):418-23
- 81 Kokkola T, Watson MA, White J, Dowell S, Foord SM, Laitinen JT. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998,249(2):531-6
- 82 Conway S, Mowat ES, Drew JE, Barrett P, Delagrang P, Morgan PJ. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001,282(5):1229-36
- 83 Mseeh F, Gerdin M, Dubocovich M. *European Journal of Pharmacology* 2002,449(1-2):29
- 84 Conway S, Drew JE, Mowat ES, Barrett P, Delagrang P, Morgan PJ. *Journal of Biological Chemistry* 2000,275(27):20602-9
- 85 Reiter, R. J. *Endocr. Rev.* 1991,12,151-180,
- 86 Tenn, C., and Niles, L. P. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1993,98,43-48; Gauer, F., Masson-Pevet, M., Stehle, J., and Pevet, P. *Brain Res.* 1994,641,92-98; Morgan, P. J., Barrett, P., Howel, H. E., and Helliwell, R. *Neurochem. Int.* 1994,24,101-146; Song, Y., Pang, C. S., Ayre, E. A., Brown, G. M., and Pang, S. F. *Eur. J. Endocrinol.* 1996,135,128-133
- 87 Kenakin, T. "Human Recombinant Receptor Systems in Pharmacologic Analysis of Drug-receptor Interaction," 3rd ed., pp.57-77. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997
- 88 Carman, C. V., and Benovic, J. L. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1998,8,335-344
- 89 Reiter RJ. *Endocrine Reviews* 1991,12 (2):151-80
- 90 Hazlerigg DG, Gonzalez-Brito A, Lawson W, Hastings MH, Morgan PJ. *Endocrinology* 1993,132(1):285-92
- 91 Witt-Enderby PA, Masana MI, Dubocovich ML. *Endocrinology* 1998,139(7):3064-71
- 92 Jones MP, Melan MA, Witt-Enderby PA. *Cancer Letters* 2000,151(2):133-43; MacKenzie RS, Melan MA, Passey DK, Witt-Enderby PA. *Biochemical Pharmacology* 2002,63(4):587-95
- 93 Ying SW, Rusak B, Mocaer E. *European Journal of Pharmacology* 1998,342(1):29-37
- 94 Masan M. I., Witt-Enderby P. A., Dubocovich M. L. *Biochem Pharmacology* 2003,65,731-739
- 95 Galper, J. B., Dziekan, L. C., O'Hara, D. S., and Smith, T. W. *J. Biol. Chem.* 1982,257,10344-10356
- 96 von Zastrow, M., and Kobilka, E. L. *J. Biol. Chem.* 1994,269,18448-18452
- 97 Li, P. K, Chu, G.-H., Gillen, M. L., Parekh, T., and Witt-Enderby, P. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997,7,2409-2414
- 98 Chu, G.-H., and Li, P.-K. (1998). *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 1998,41, 435-441
- 99 Birdsall, N. J. M., Burgen, A. S. V., and Hulme, E. C. *Br. J. Pharmacol.* 1979,66,337-342; Burgen, A. S. V., Hiley, C. R., and Young, J. M. *Br. J. Pharmacol.* 1974,51,279-285; Curtis, C. A. M., Wheatley, M., Bansal, S., Birdsall, N. J. M., Eveleigh, P., Pedder, E. K., Poyner, D., and Hulme, E.C. *J. Biol. Chem.* 1989,264,489-495; Lohse, M. J., Klotz, K.-N., and Schwabe, U. *Mol. Pharmacol.* 1986,30,403-409
- 100 Laudon, M., and Zisapel, N. *FEBS Lett.* 1991,288,105-108; Nelson, W., Chong, S., Evans, J. E., and Sugden, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993,193,1355-1361
- 101 Witt-Enderby, P. A., Chu, G. H., Gillen, M. L., and Li, P.-K. *J. Med. Chem. Lett.* 1997,40,4195-4198
- 102 Lewis, D. F. V., Arendt, J., English, J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990,252, 370-373
- 103 Hansch, C. and Coats, E.; *J. Pharmacol. Sci.* 1970,59, 731-743
- 104 Pople, J. A.; Santry, D. P. and Segal, G.A.; *J. Chem. Physics* 1965,43 (suppl), 129-135
- 105 Bubenik, G. A., *Hormone Res.* 1980, 12, 313-323; b) Bubenik, G. A. Brown, G. M. Grota, L. J., *Experientia*, 1997,33, 662-663
- 106 Sugden D., Chong N. W. S., Lewis D.F.V. *British Journal of Pharmacology* 1995,114,618-623
- 107 Baldwin J. M. *EMBO J.* 1993,12,1693
- 108 Cramer III R. D., Paterson D. E., Bunce J. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1988,110,5959
-

- 109 Jansen J. M., Copping S., Gruppen G., Molinari E., Dubocovich M. L., Grol C. J. *Bioorganic Med. Chem.* 1996,4,1321-1332; b) Grol C. J., Jansen J. M. *Bioorganic and Med. Chem.* 1996,4,1333-1339
- 110 Sicsic S., Serraz I., Andrieux J., Brémont B., Mathé-Allainmat M., Poncet A., Shen S., Langlois M. *J. Med. Chem.* 1997,40,739-748
- 111 Spadoni G., Balsamini C., Diamantini G., Di Giacomo B., Tarzia G., Mor M., Plazzi P. V., Rivara S., Lucini V., Nonno R., Pannacci M., Fraschini F., Stankov B. M. *J. Med. Chem.* 1997,40,1990-2002
- 112 Mor M., Rivara S., Silva C., Bordi F., Plazzi P. V., Spadoni G., Diamantini G., Balsamini C., Tarzia G., Fraschini F., Lucini V., Nonno R., Stankov B. M. *J. Med. Chem.* 1998,41,3831-3844
- 113 Marot C., Chavatte P., Morin-Allory M., Viaud M. C., Guillaumet G., Renard P., Lesieur D., Michel A. *J. Med. Chem.* 1998,41,4453-4465
- 114 Audry, E., Dubost, J. P., Dallet, P., Langlois, M. H., Colleter, J. C. *Eur. J. Med. Chem.* 1989,24,155-161
- 115 Davies D. J., Garrat P. J., Tocher D. A., Vonhoff S., Davies J., The M., Sugden D. *J. Med. Chem.* 1998,41,451-467
- 116 Bubenik, G. A.; Brown, G. M.; Grota, L. J. *Experientia* 1977,33, 662
- 117 Harlow, H. J.; Weekley, B. L. *J. Pineal Res.* 1986,3, 277-284
- 118 Bubenik G. *J. Pineal Res.* 1986,3, 41-54
- 119 Reyes, C.; Naranjo, E. B.; García, J. A.; Prieto, B. *J. Pineal Res.* 1996,20, 1-8
- 120 Naranjo-Rodríguez E. B., Ortiz O. A., Hernández A. E., Mendoza E. V. A. *Prog. Neuro-Psychopharmacol and Biol.* 2000,24,117-119
- 121 Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., Briley M. *J. Neuroscience Methods* 1985,14,149-167
- 122 Dubocovich, M. L., Shanckar G., Mickel M. *Eur. J. Pharma* 1989,162, 289-299.

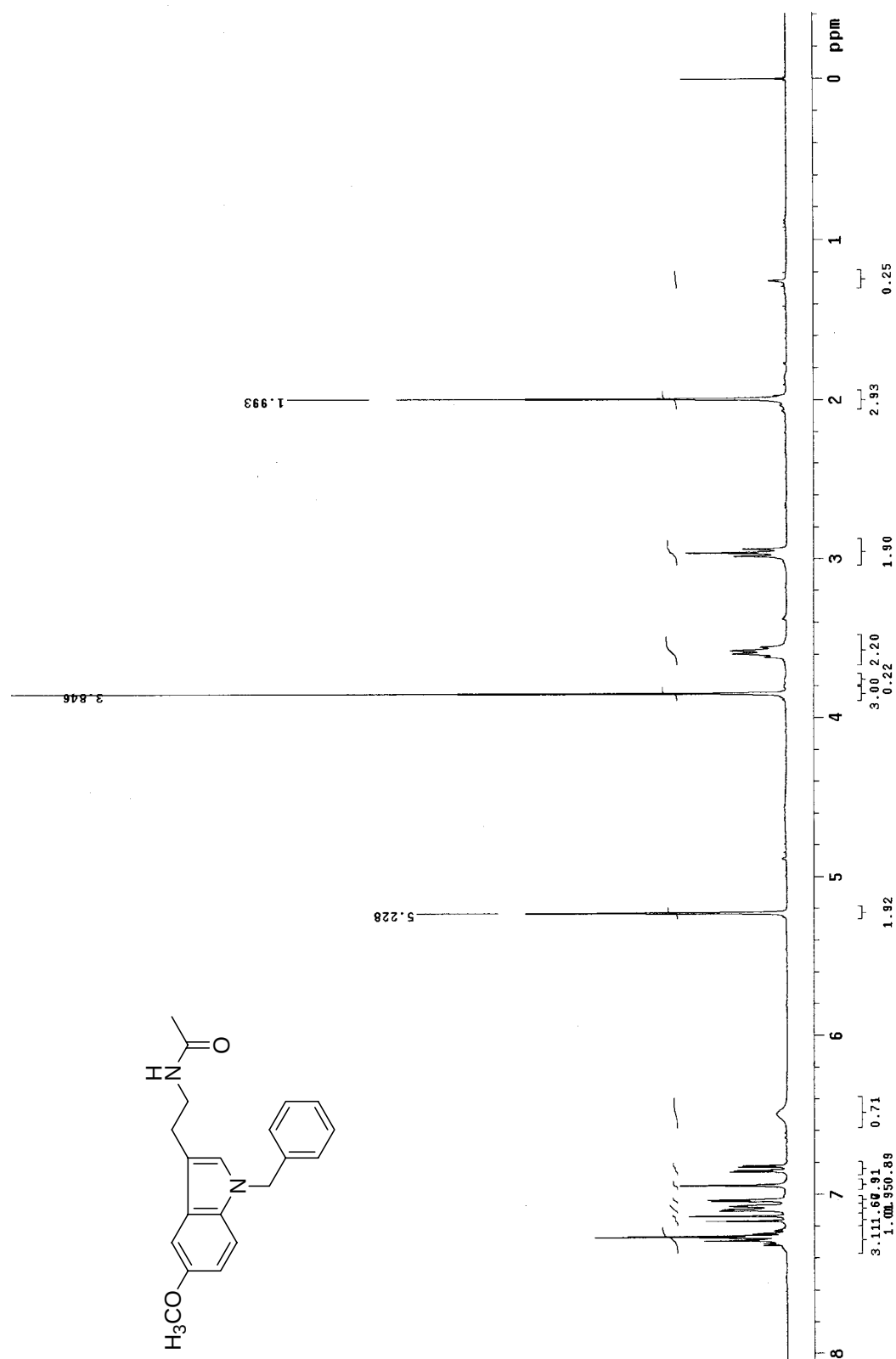
10. Espectros

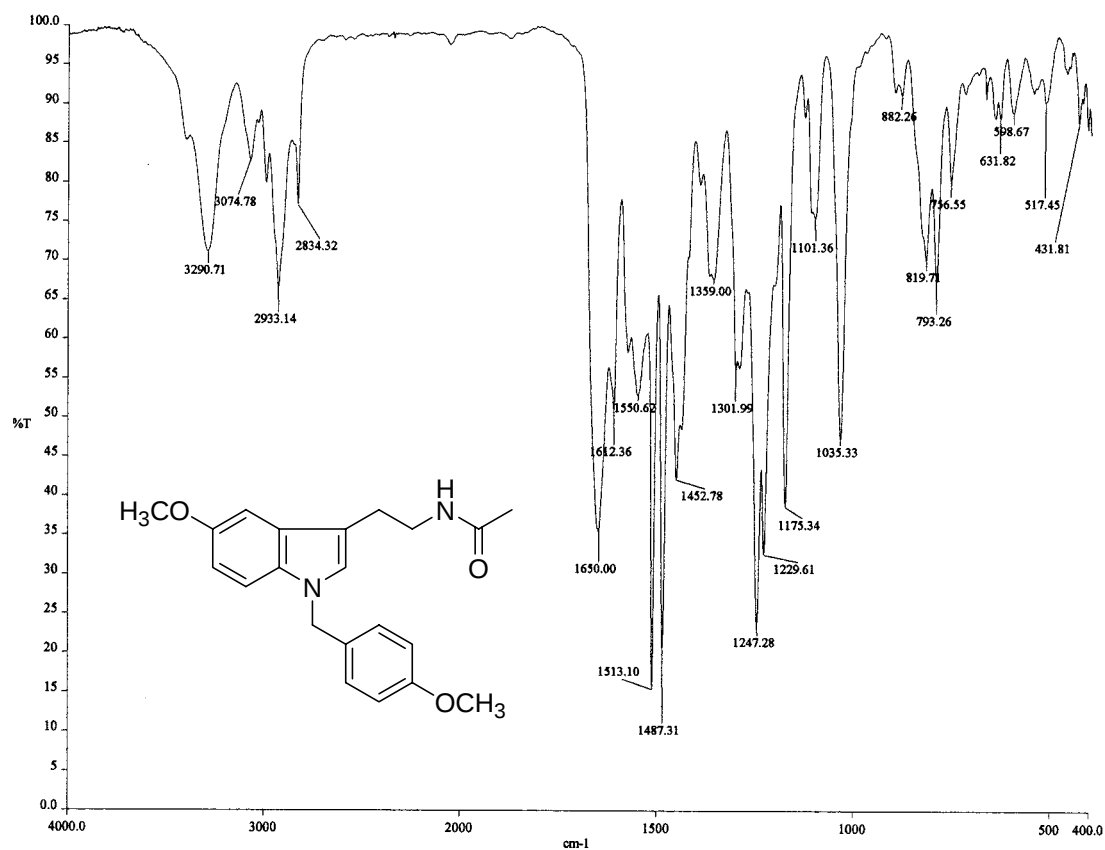


Espectro de IR del compuesto 1a

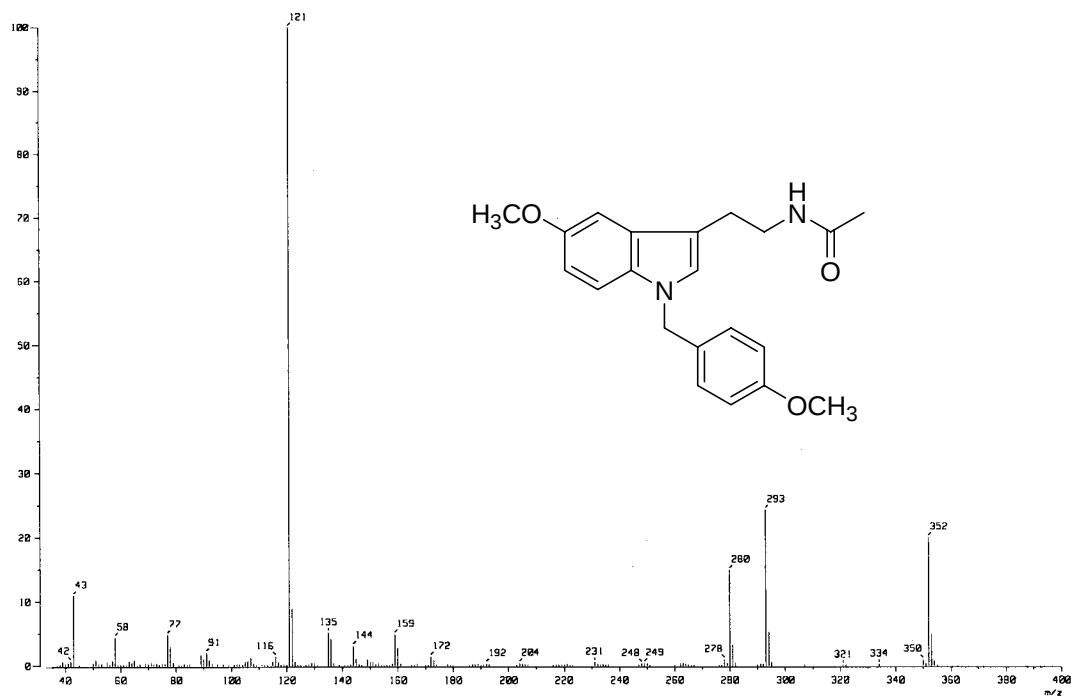


Espectro de masas del compuesto 1a

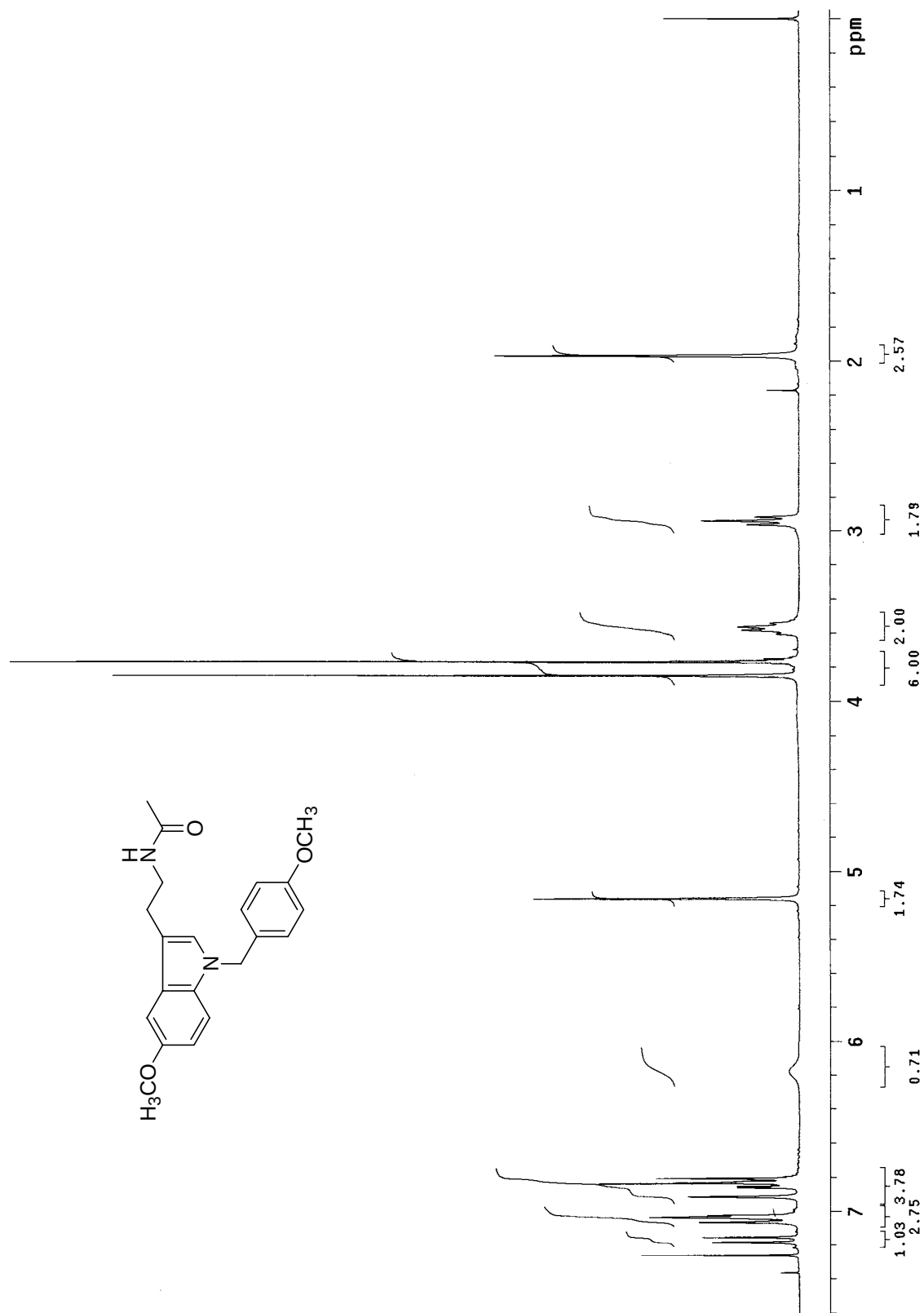
Espectro de RMN-¹H del compuesto 1a

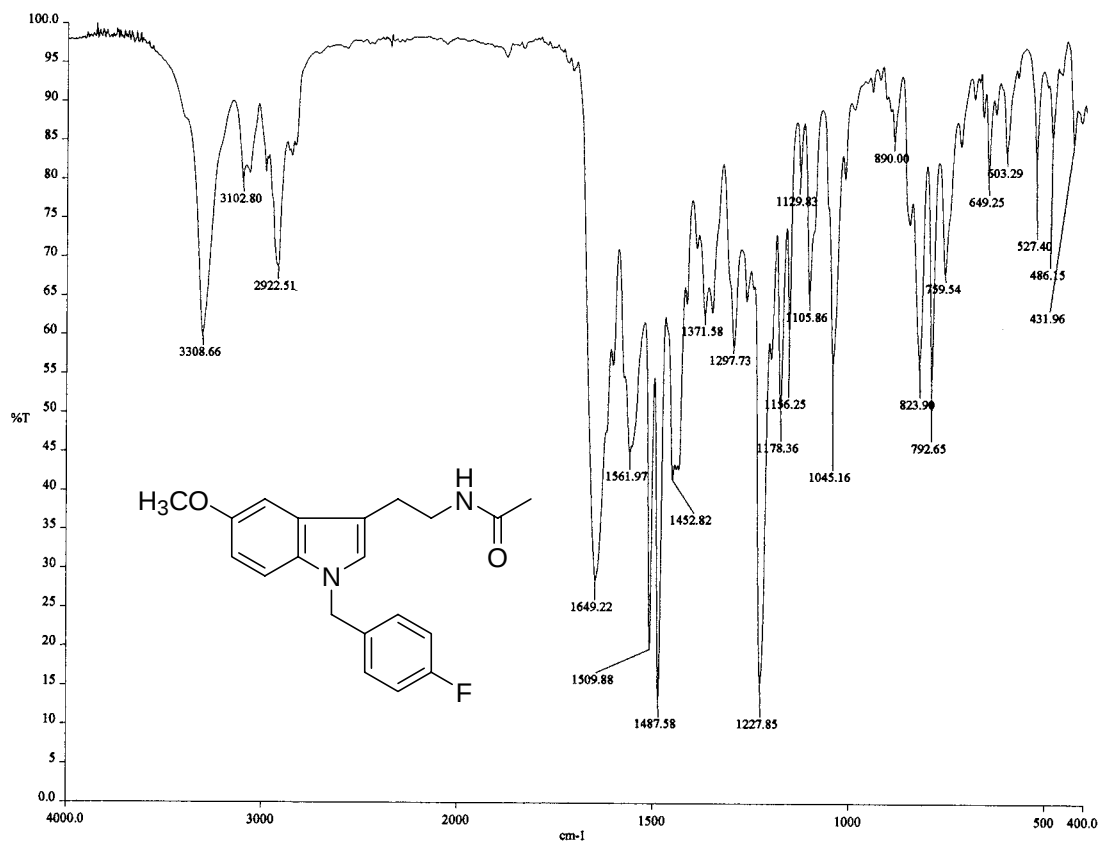


Espectro de IR del compuesto 2a

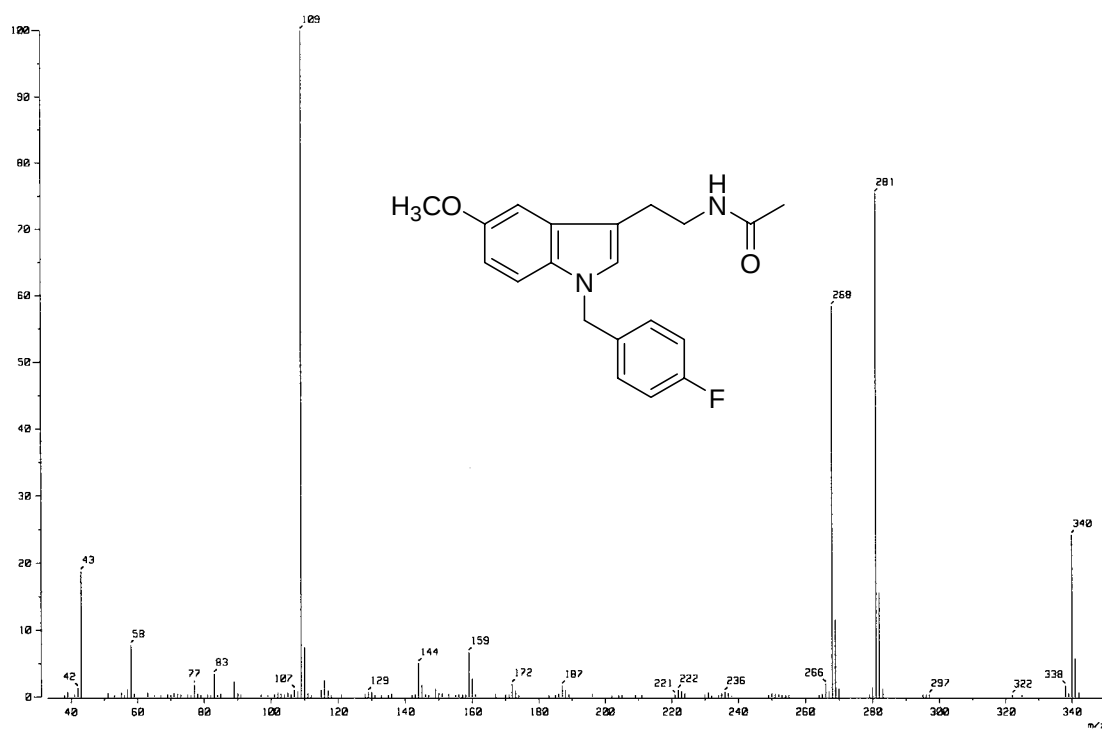


Espectro de masas del compuesto 2a

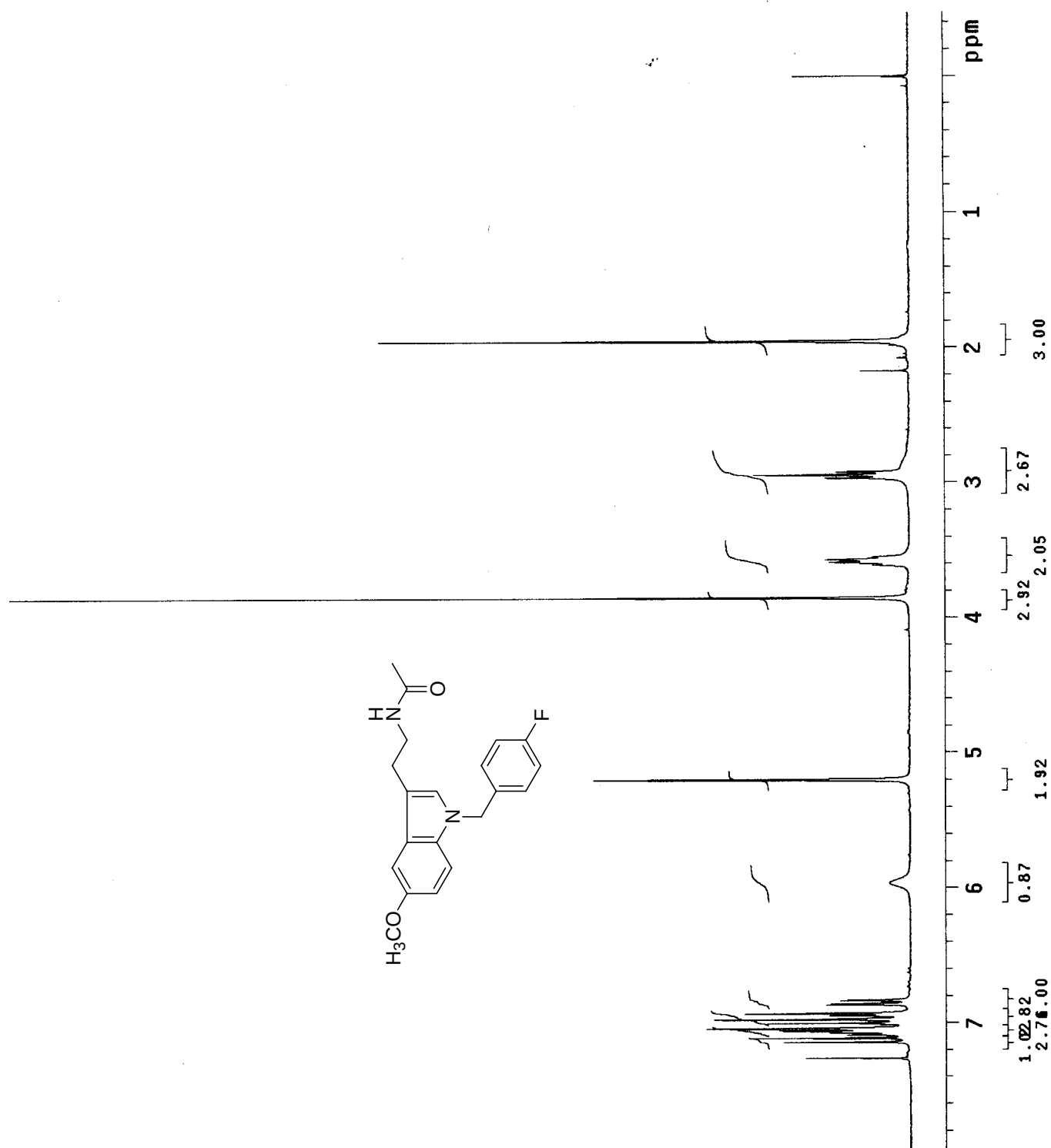
Espectro de RMN-¹H del compuesto 2a

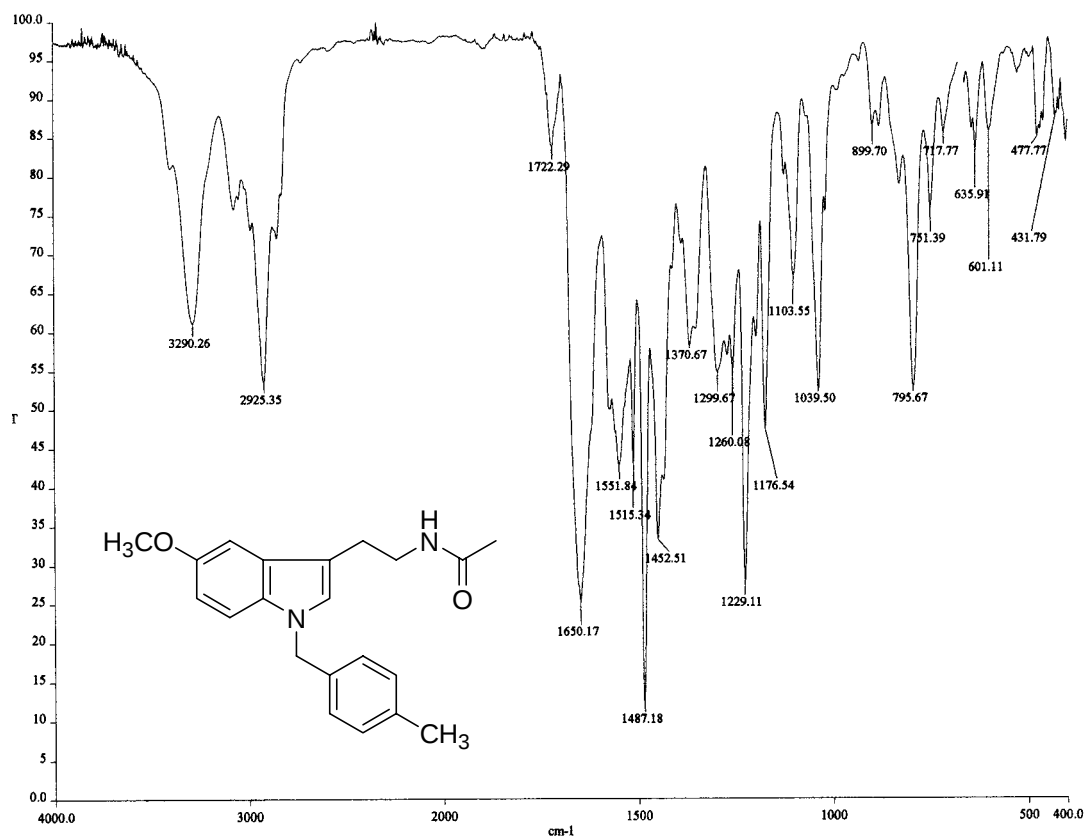


Espectro de IR del compuesto 3a

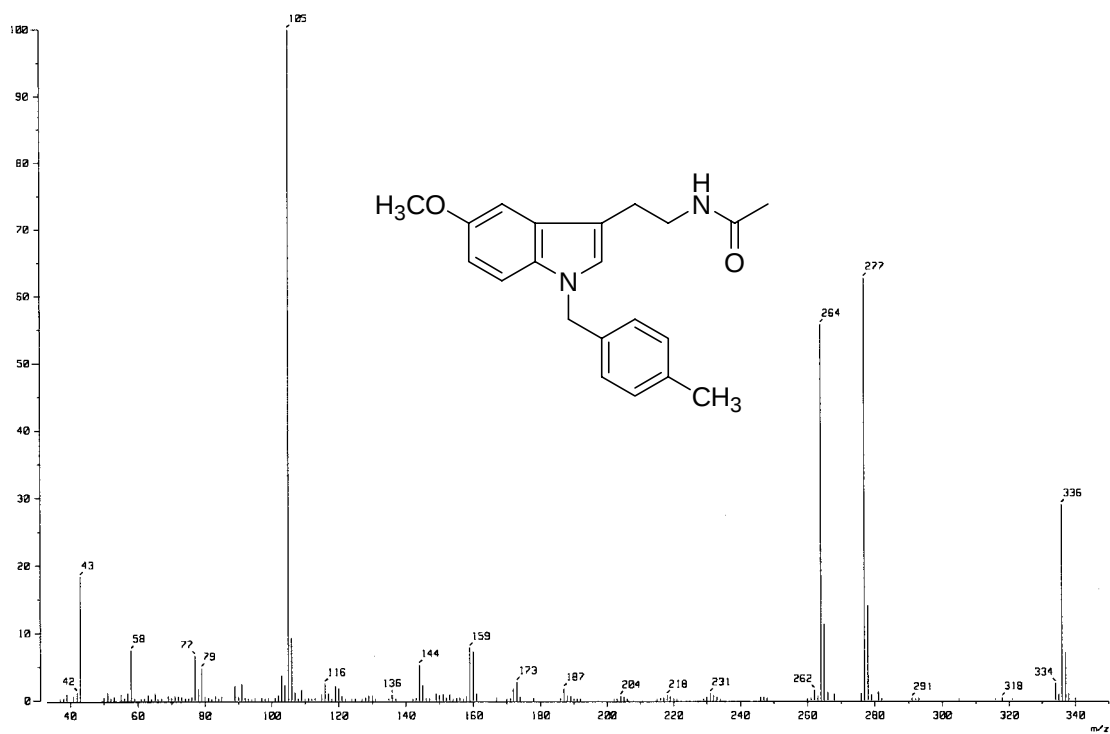


Espectro de masas del compuesto 3a

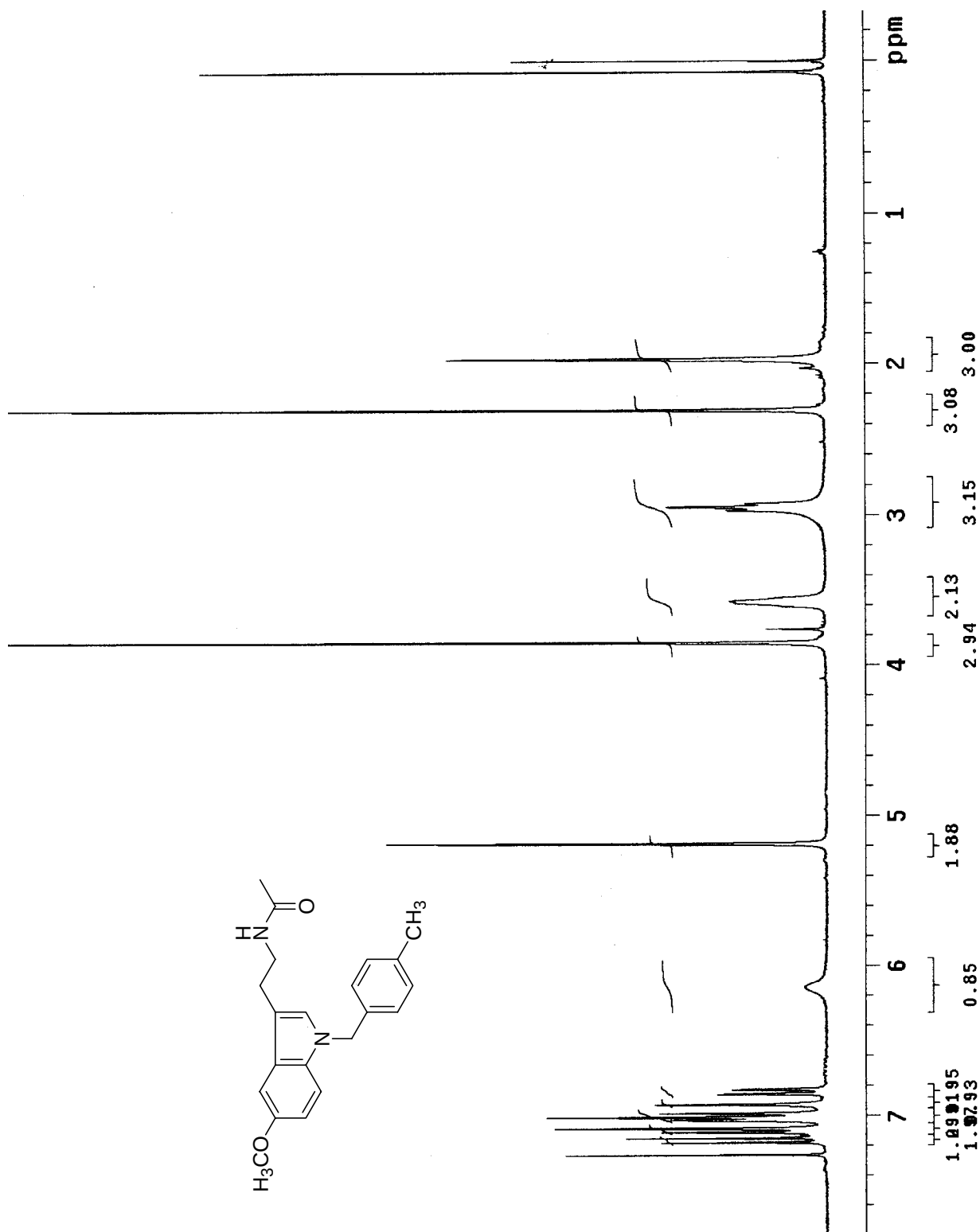
Espectro de RMN-¹H del compuesto 3a

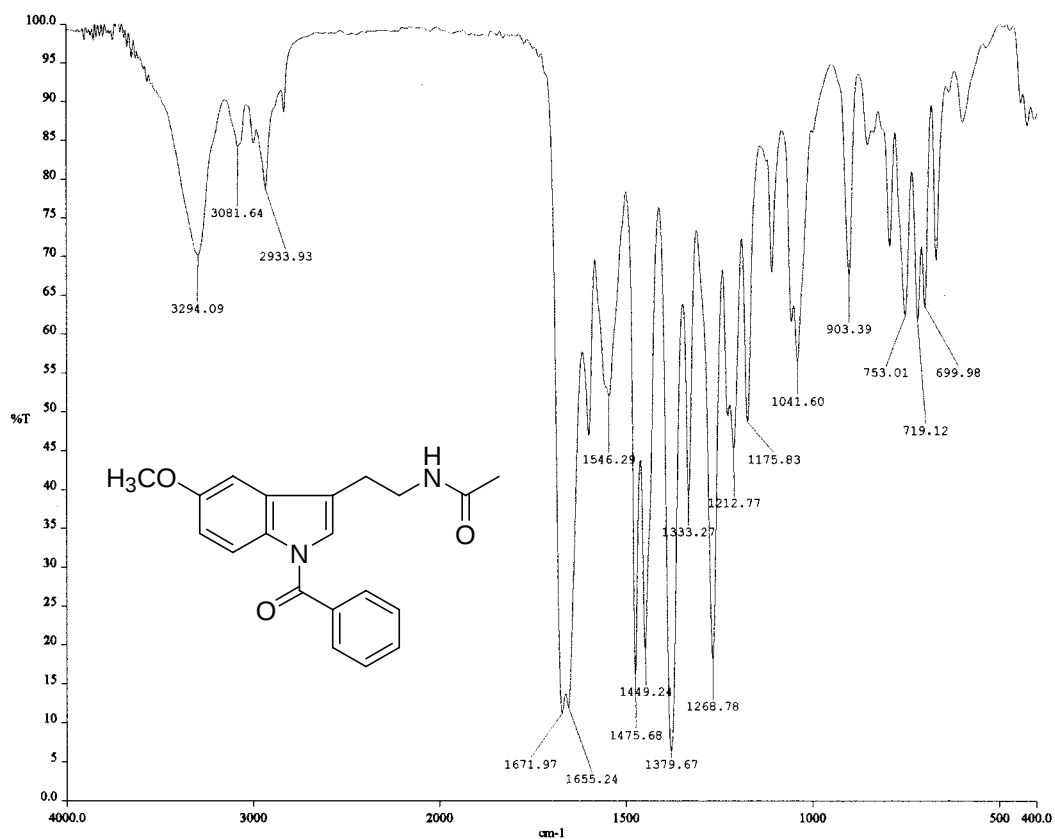


Espectro de IR del compuesto 4a

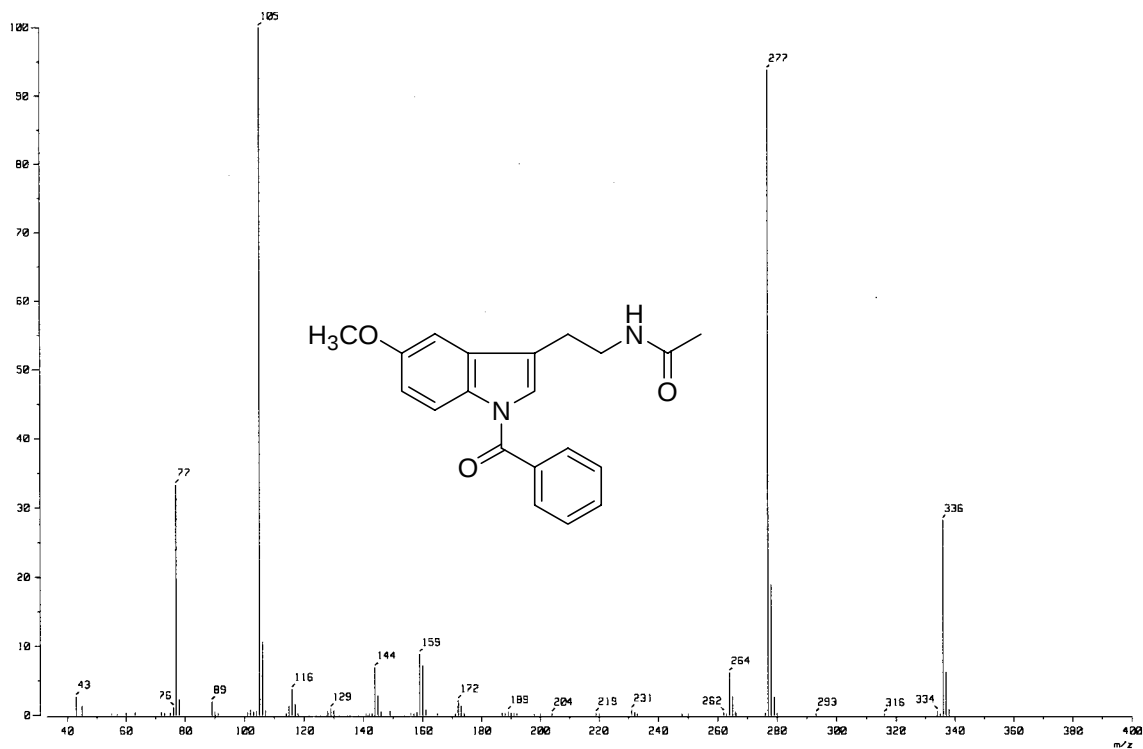


Espectro de masas del compuesto 4a

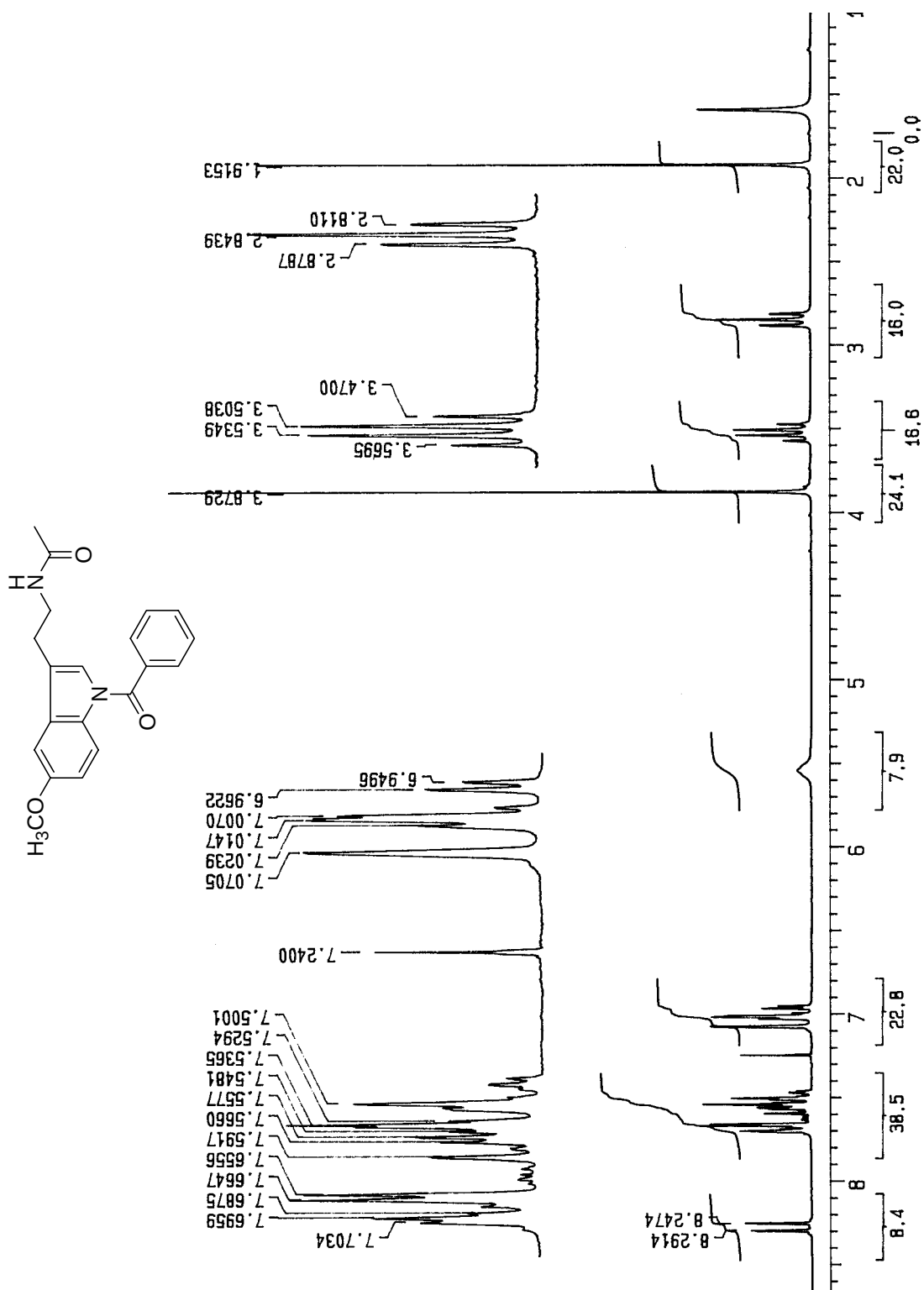
Espectro de RMN-¹H del compuesto 4a

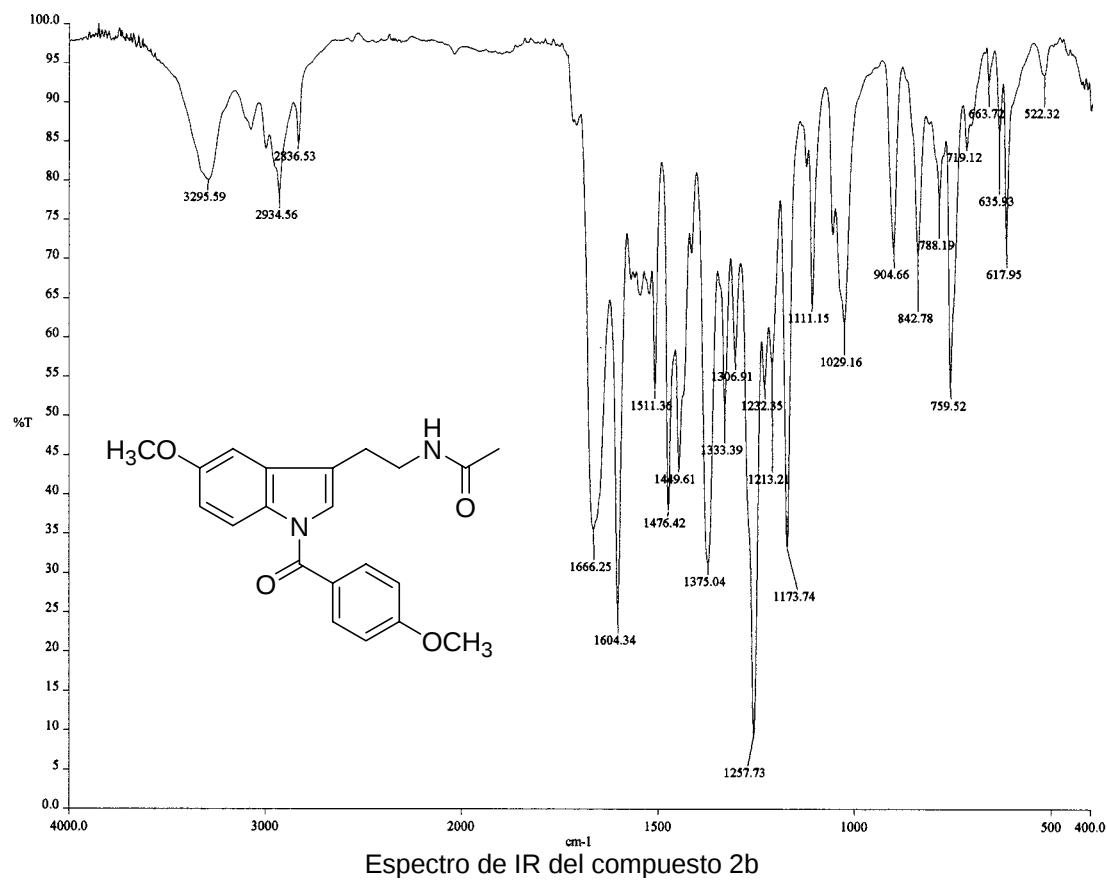


Espectro de IR del compuesto 1b

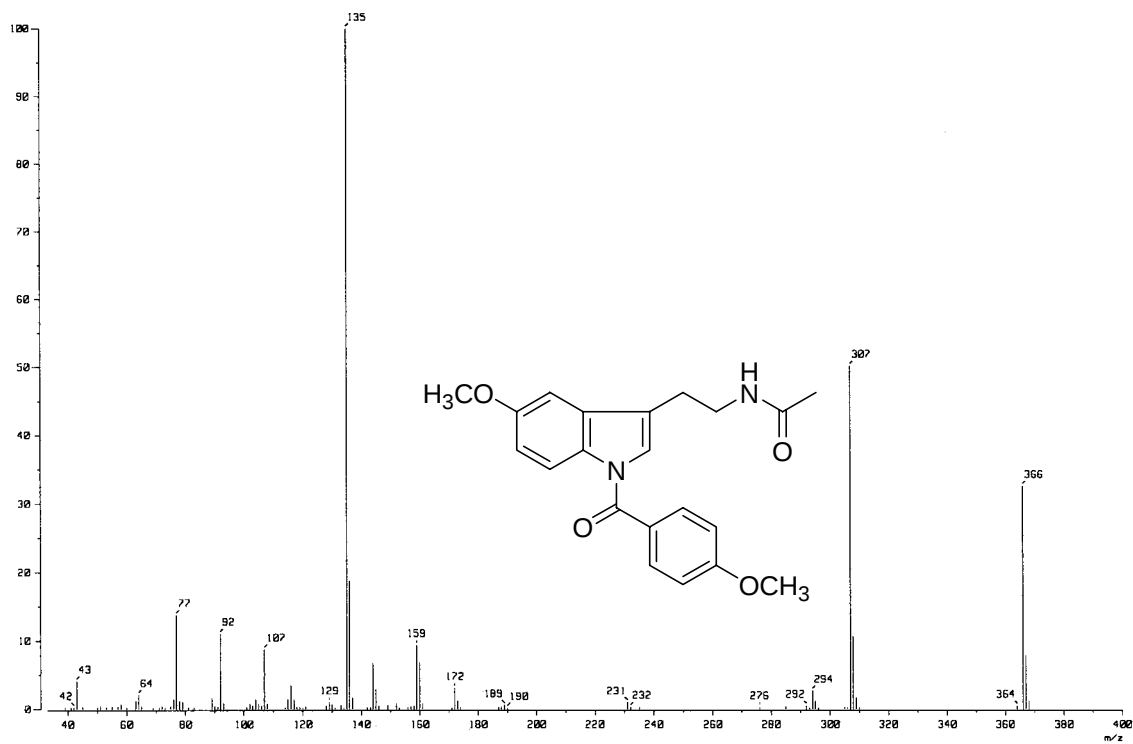


Espectro de masas del compuesto 1b

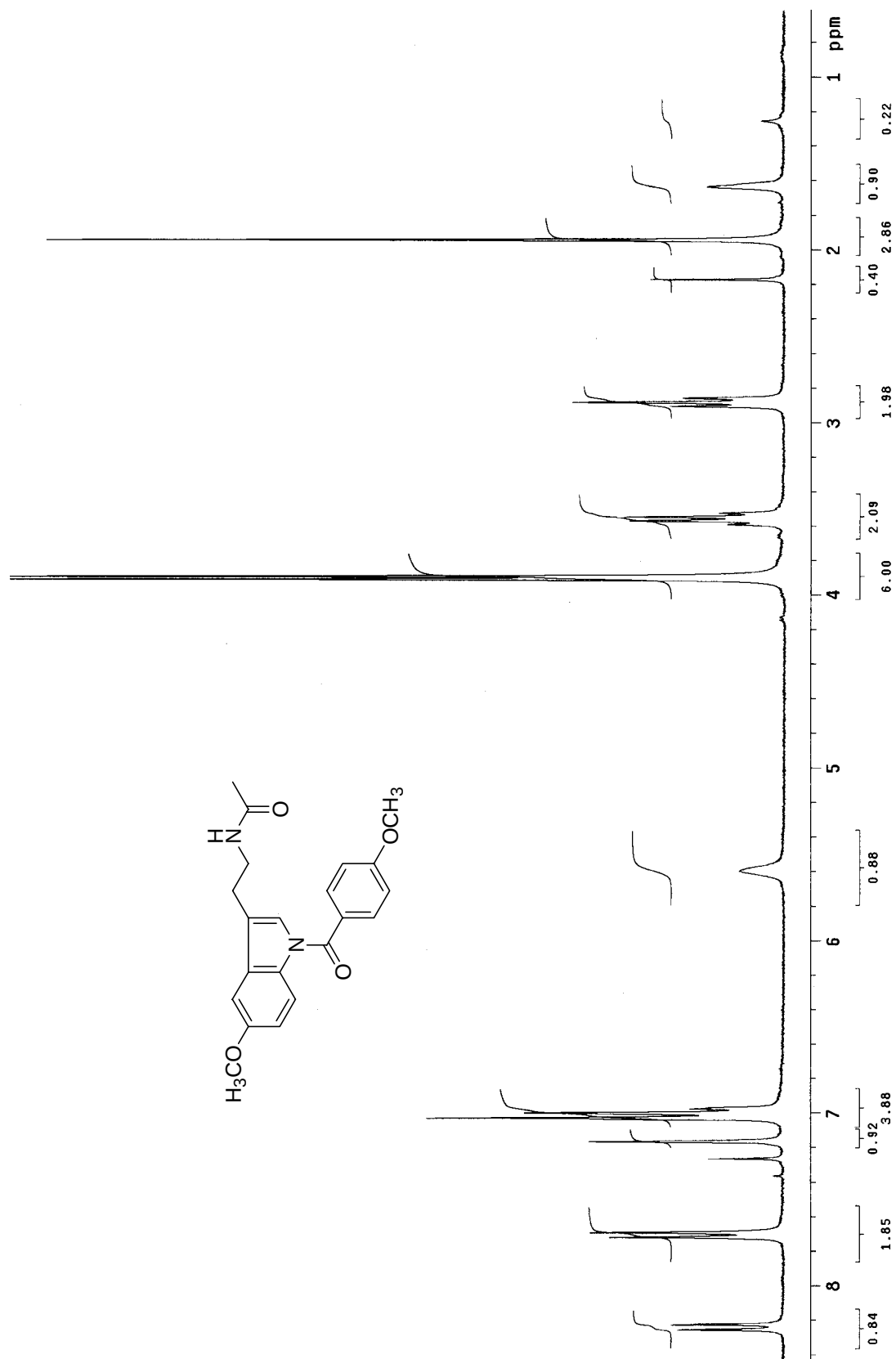
Espectro de RMN-¹H del compuesto 1b

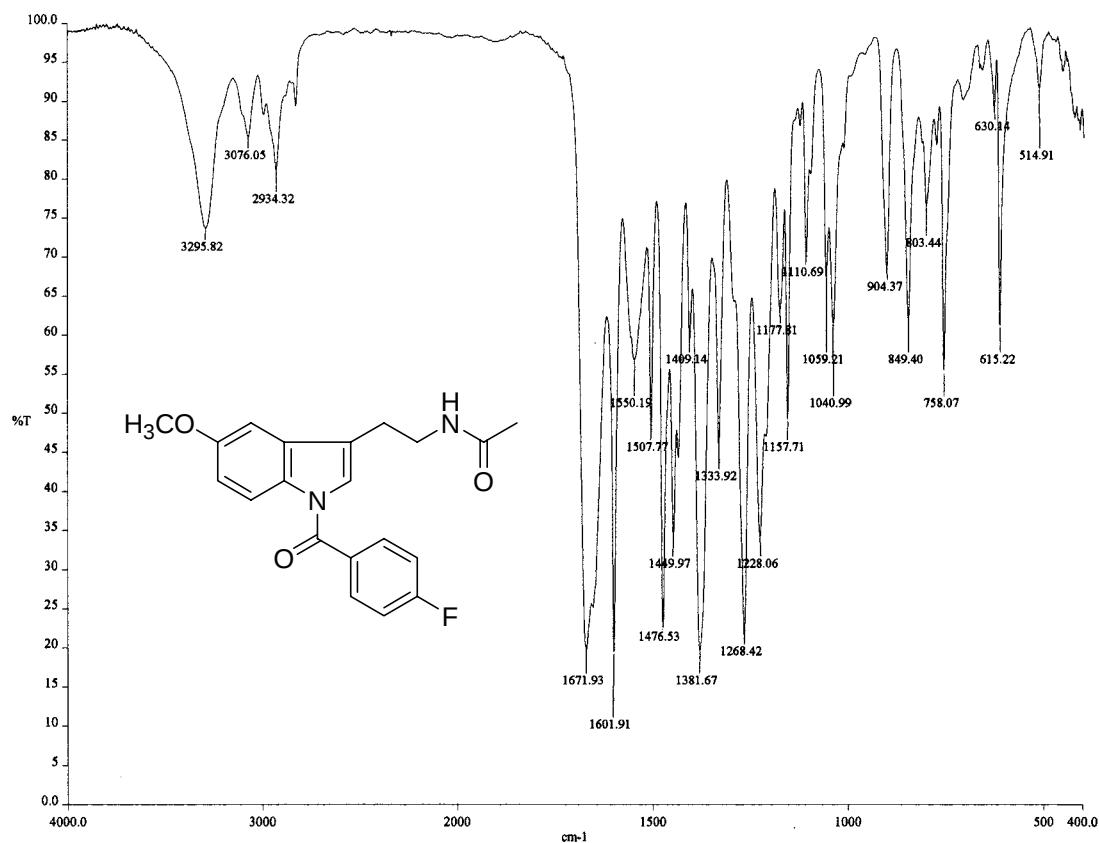


Espectro de IR del compuesto 2b

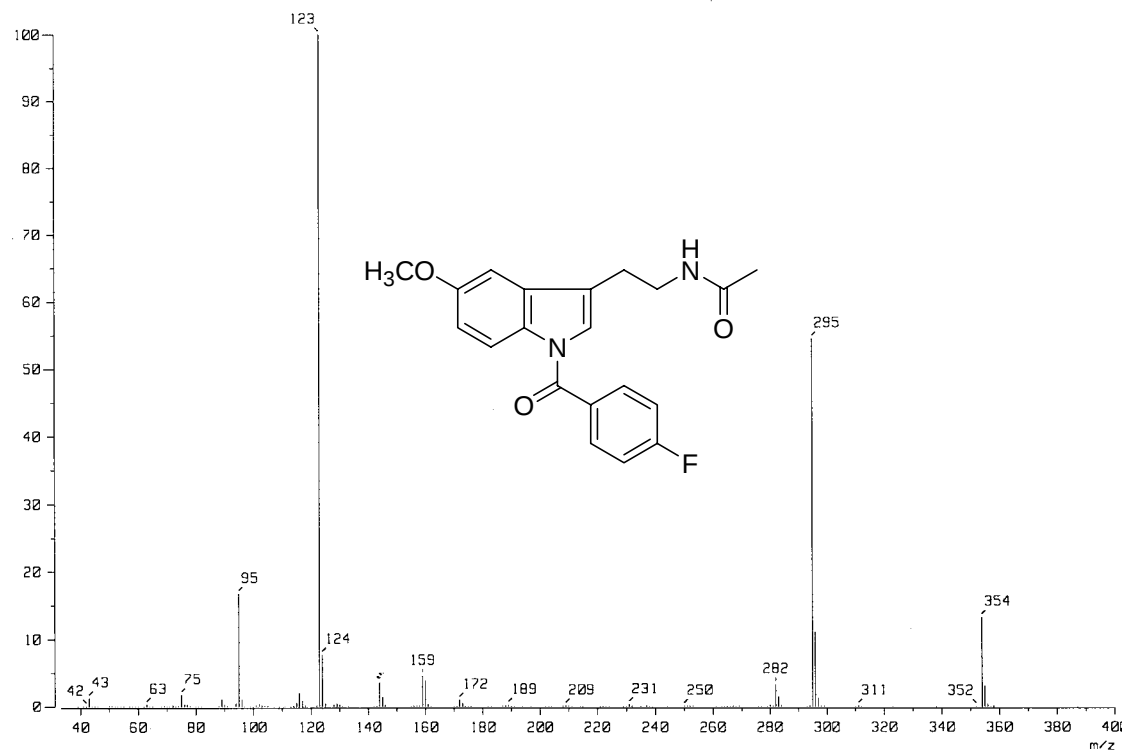


Espectro de masas del compuesto 2b

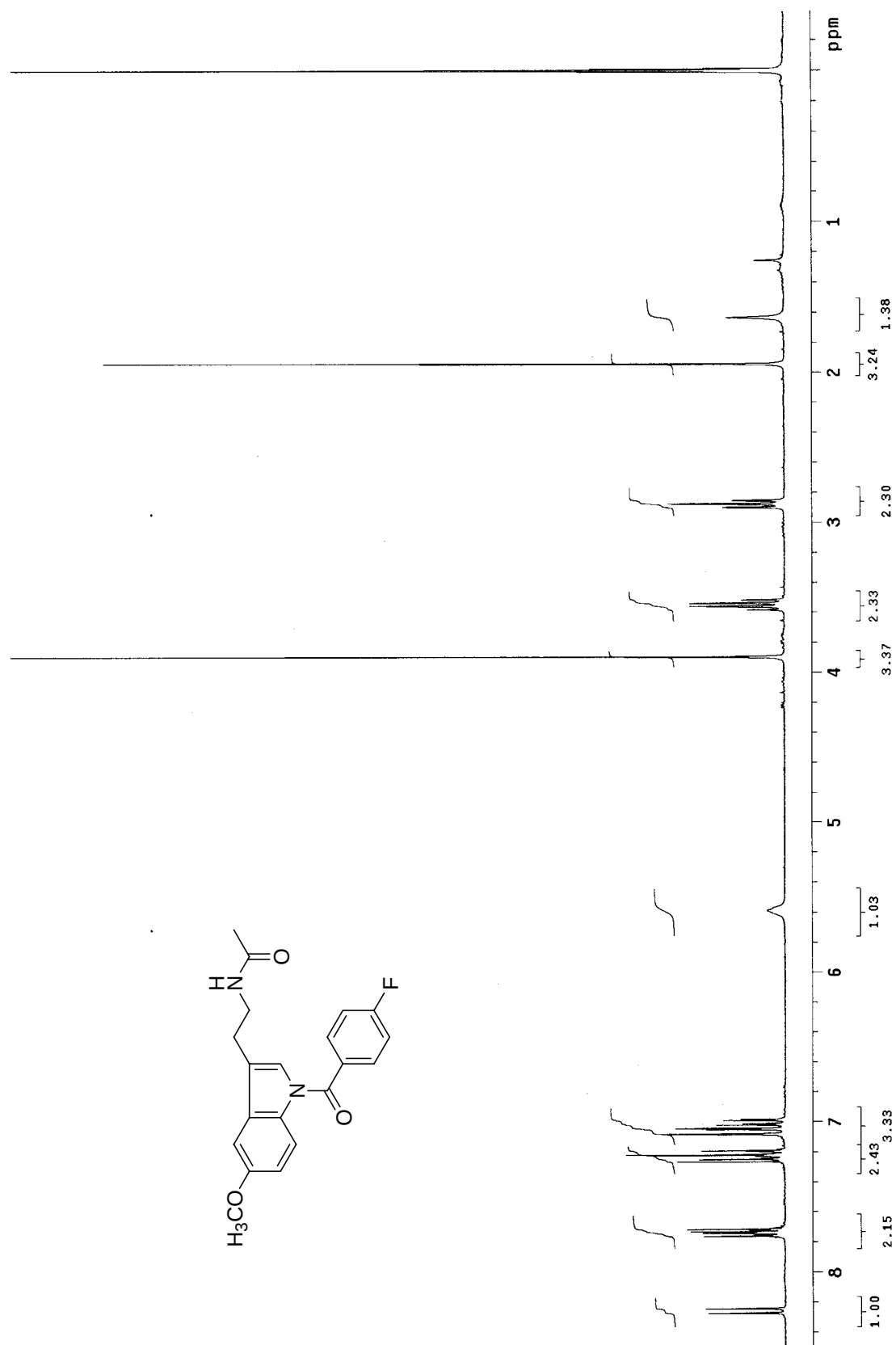
Espectro de RMN-¹H del compuesto 2b

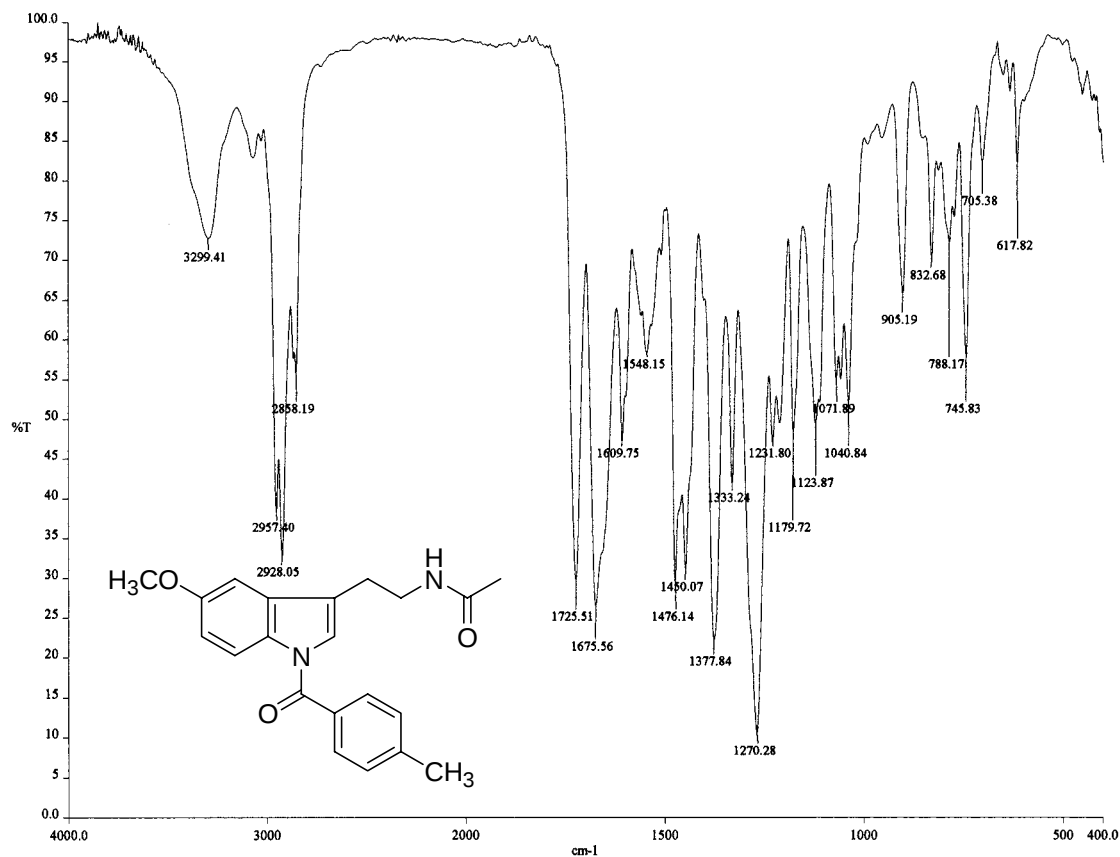


Espectro de IR del compuesto 3b

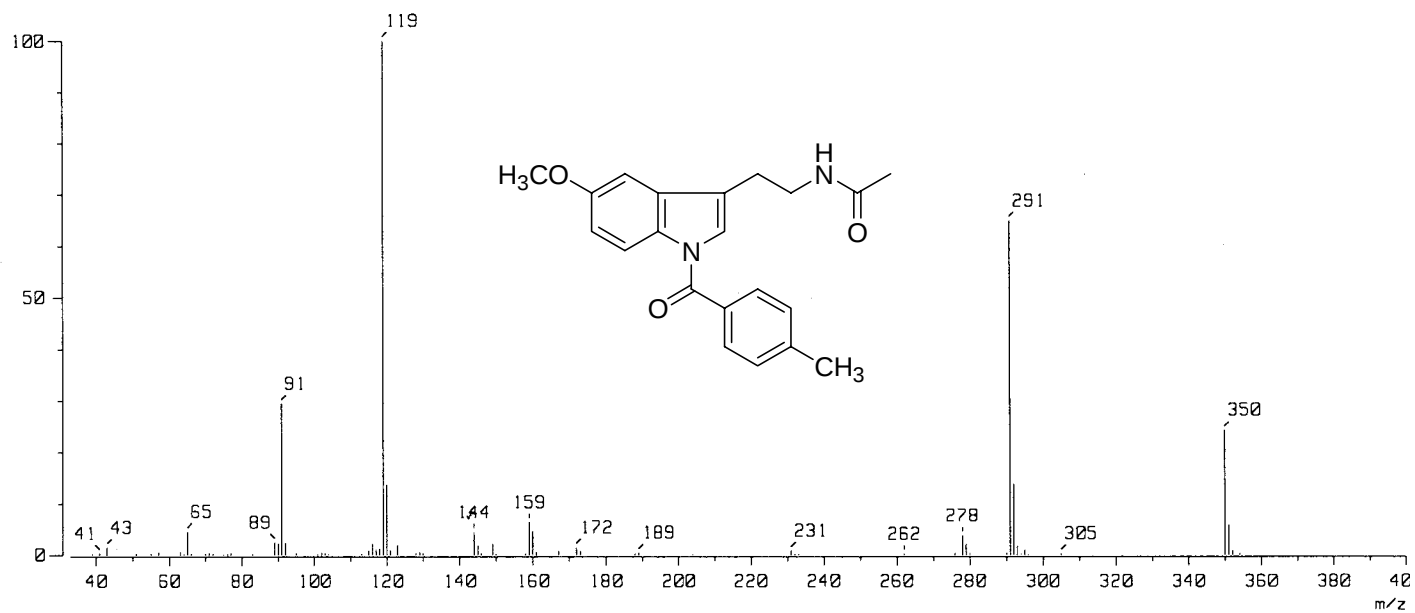


Espectro de masas del compuesto 3b

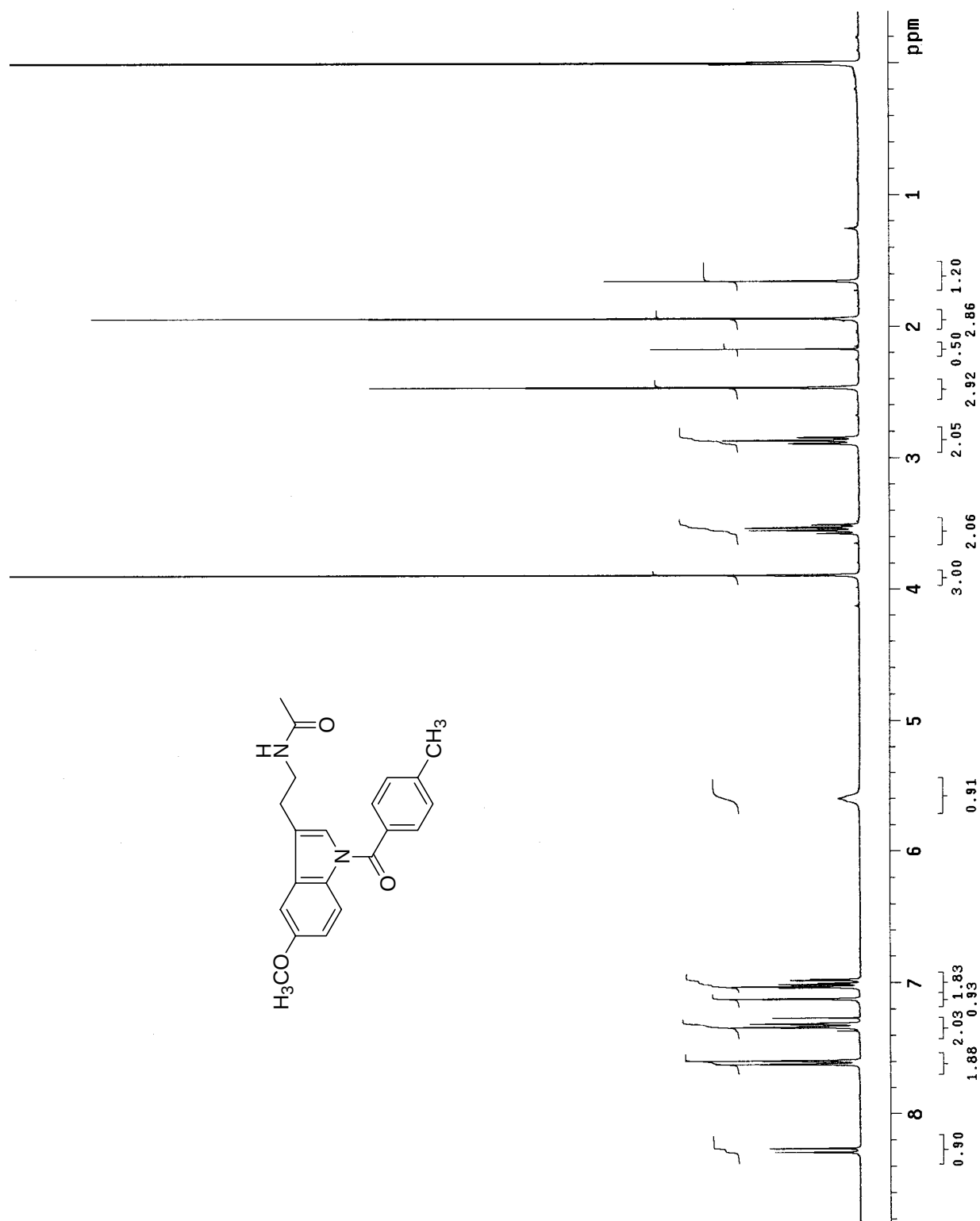
Espectro de RMN-¹H del compuesto 3b

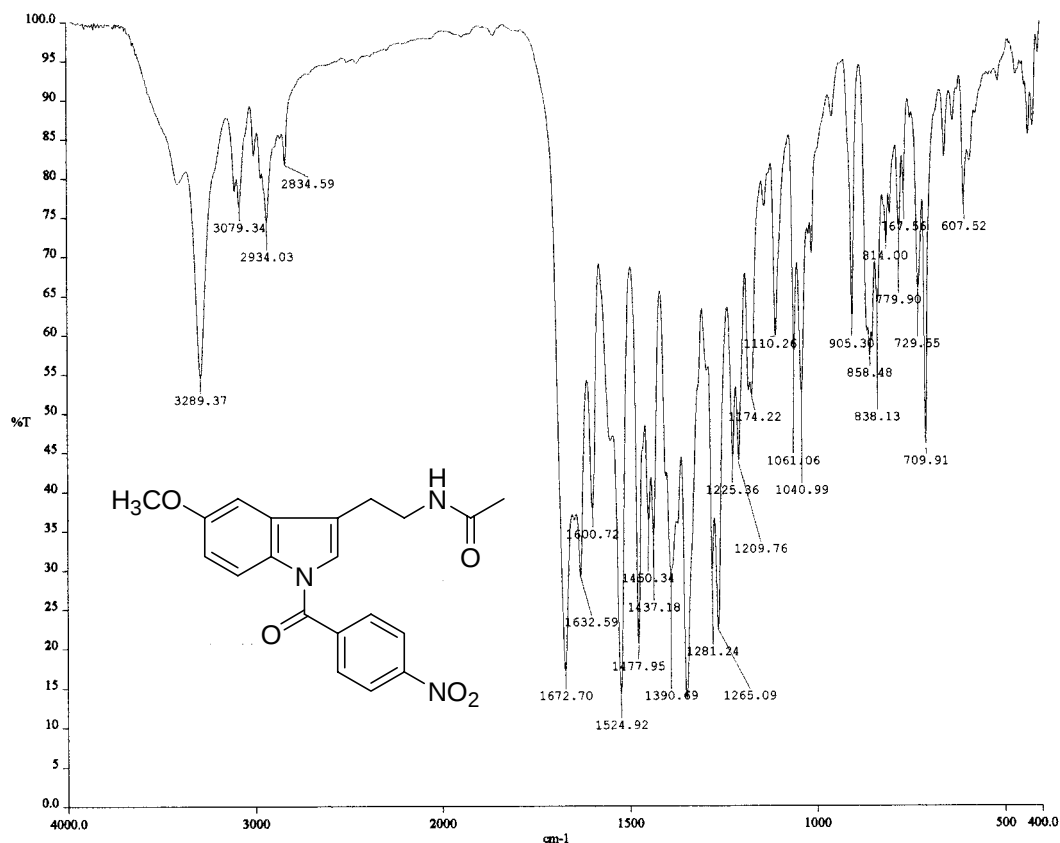


Espectro de IR del compuesto 4b

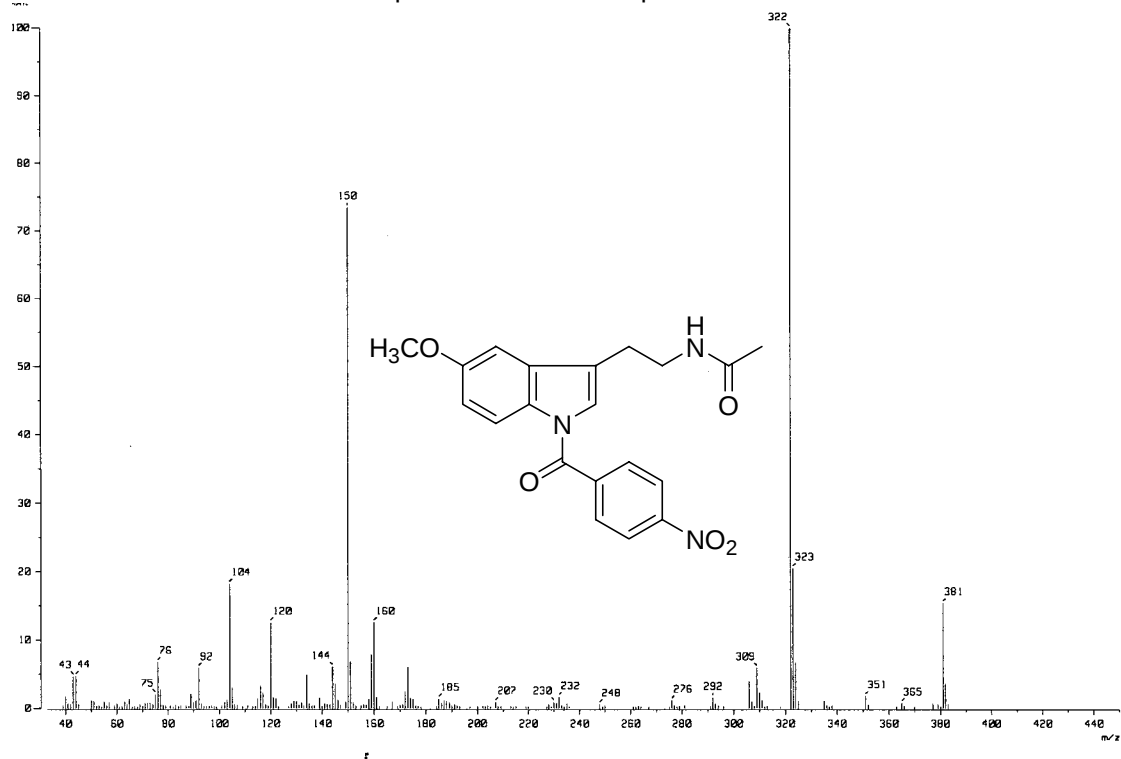


Espectro de masas del compuesto 4b

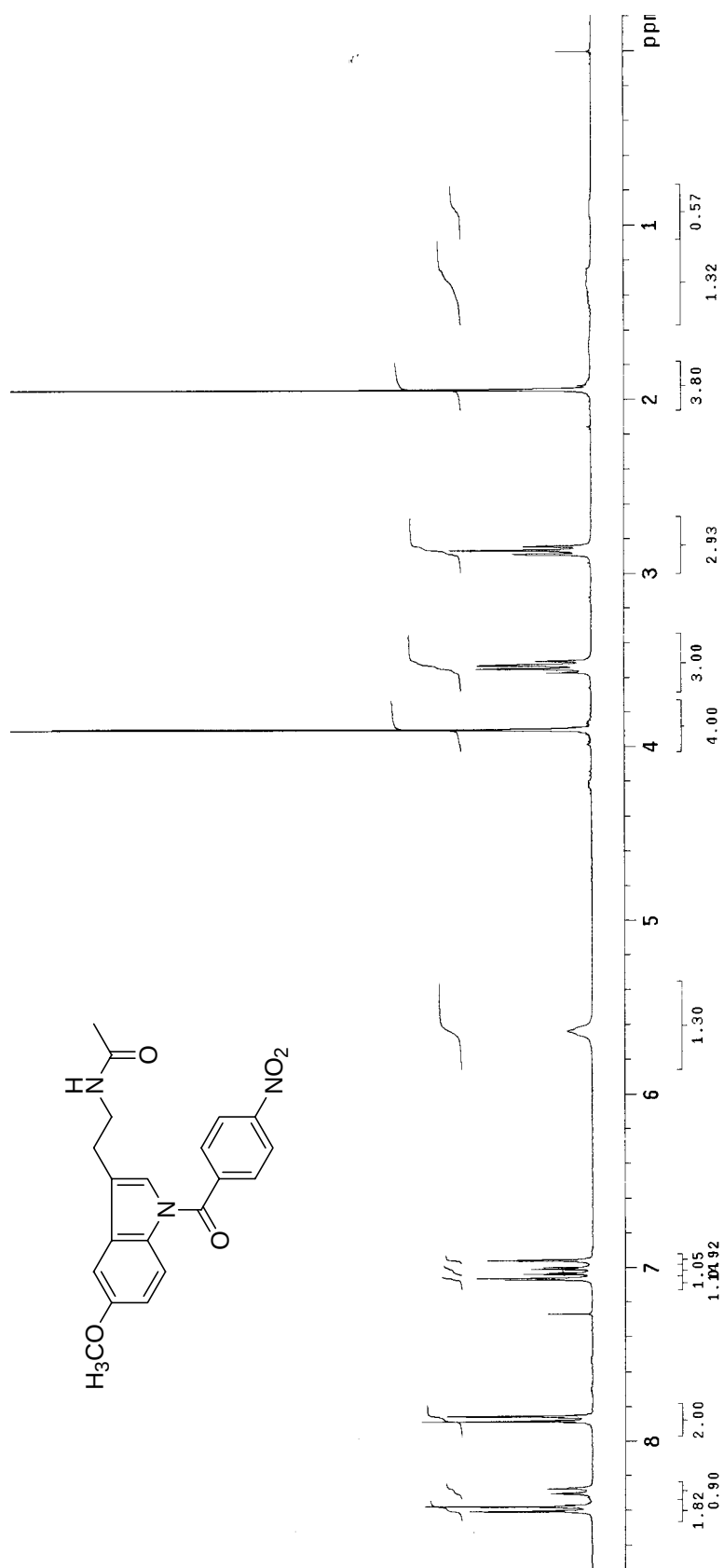
Espectro de RMN-¹H del compuesto 4b

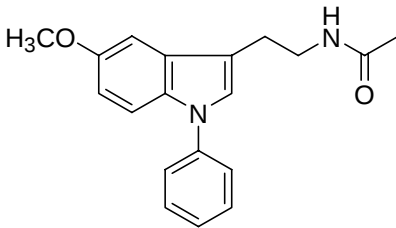


Espectro de IR del compuesto 5b

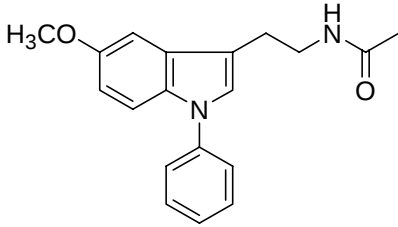


Espectro de masas del compuesto 5b

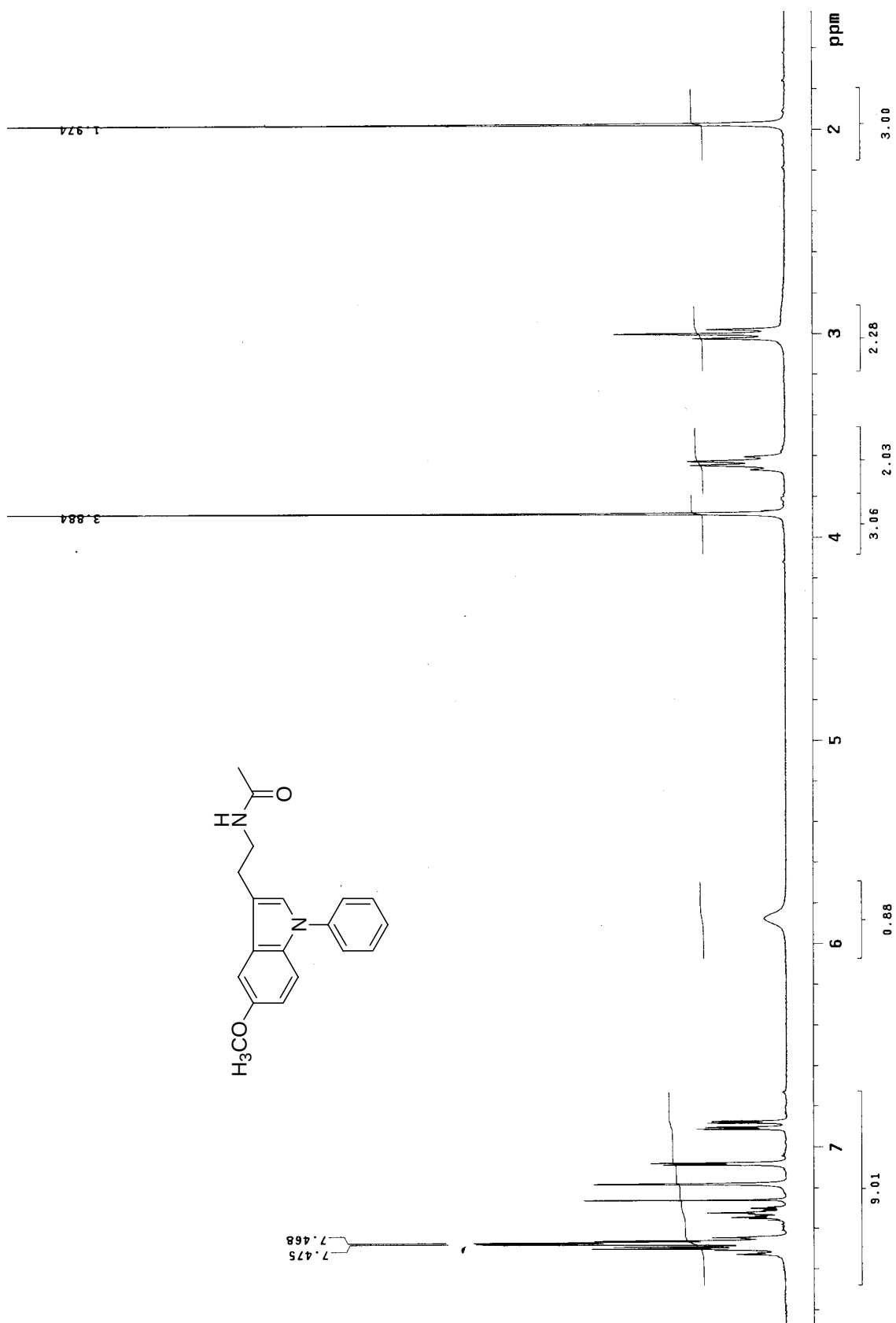
Espectro de RMN-¹H del compuesto 5b

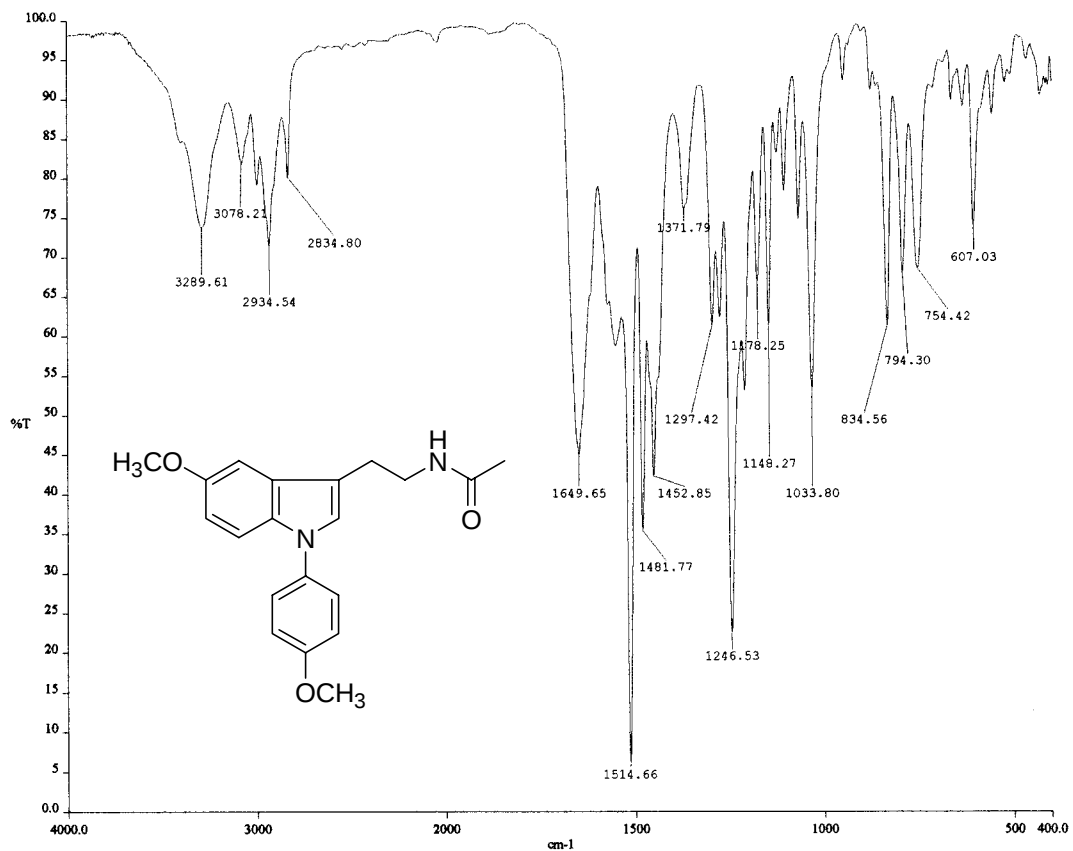


Espectro de IR del compuesto 1c

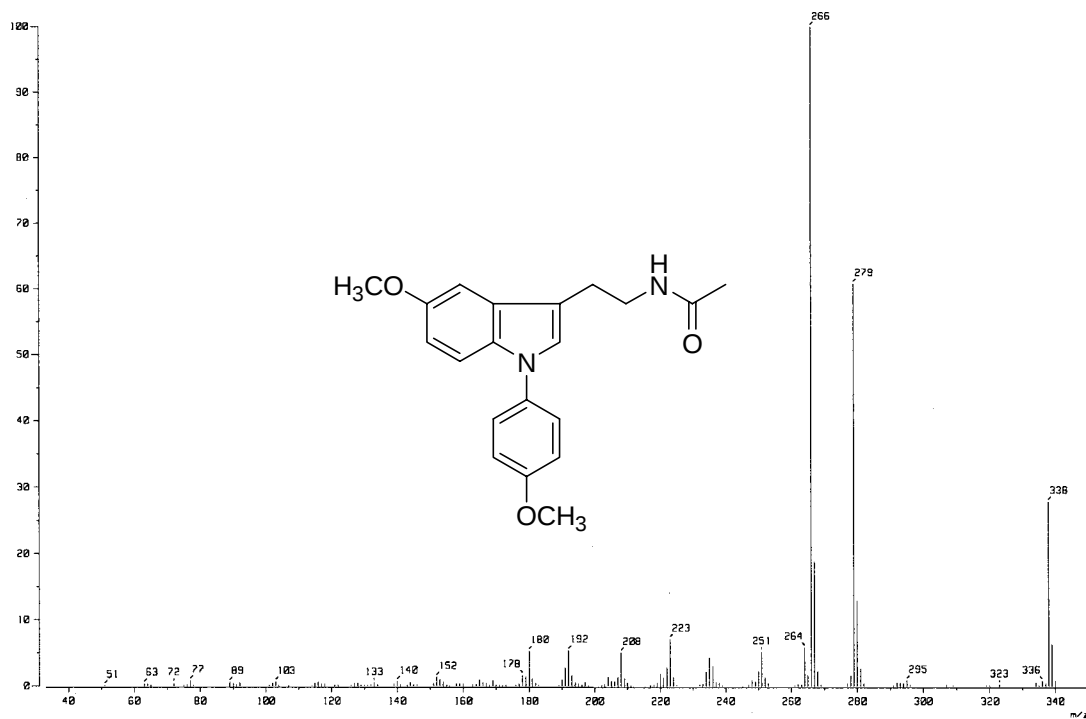


Espectro de RMN-¹H del compuesto 1c

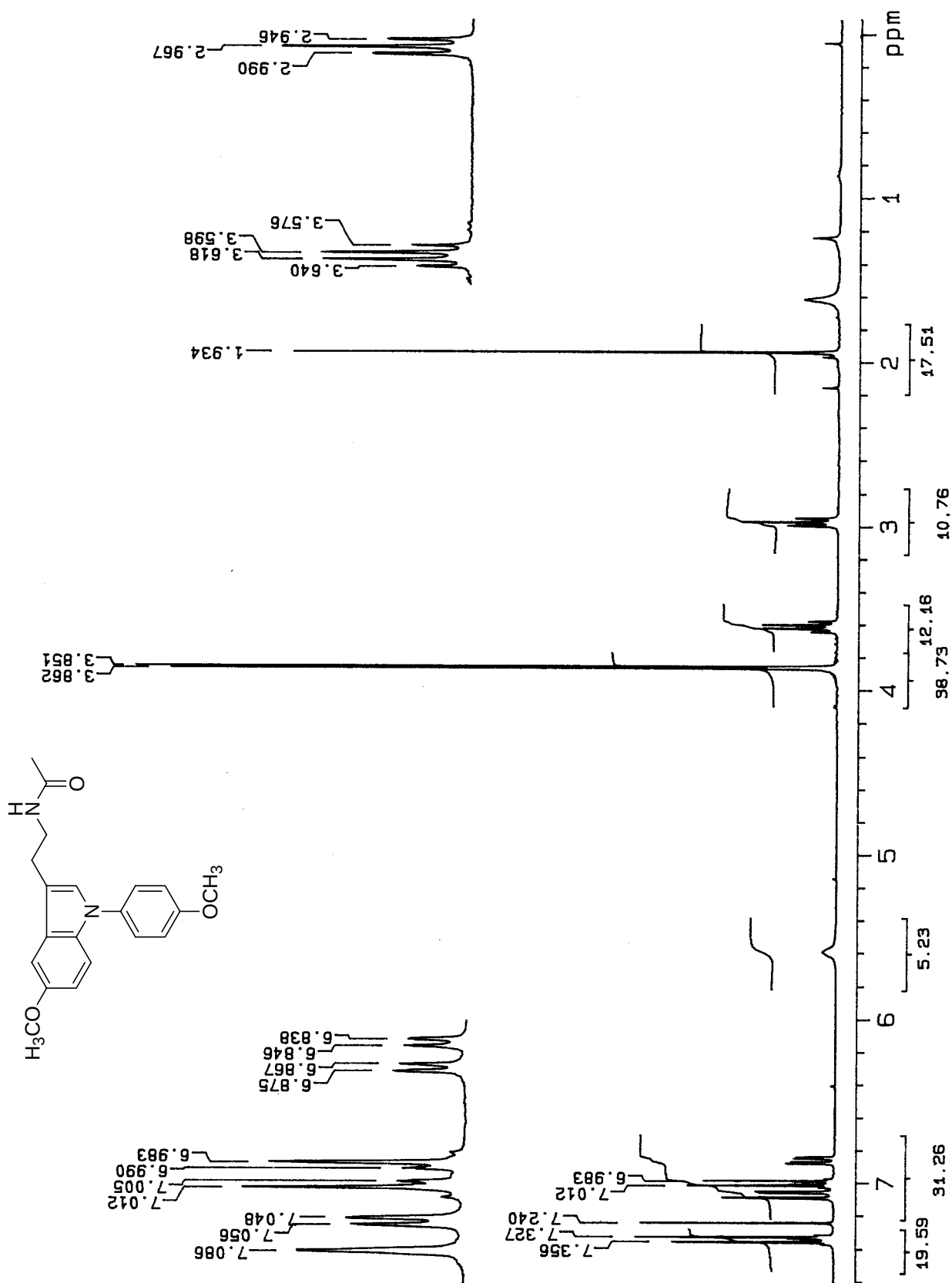
Espectro de RMN-¹H del compuesto 1c

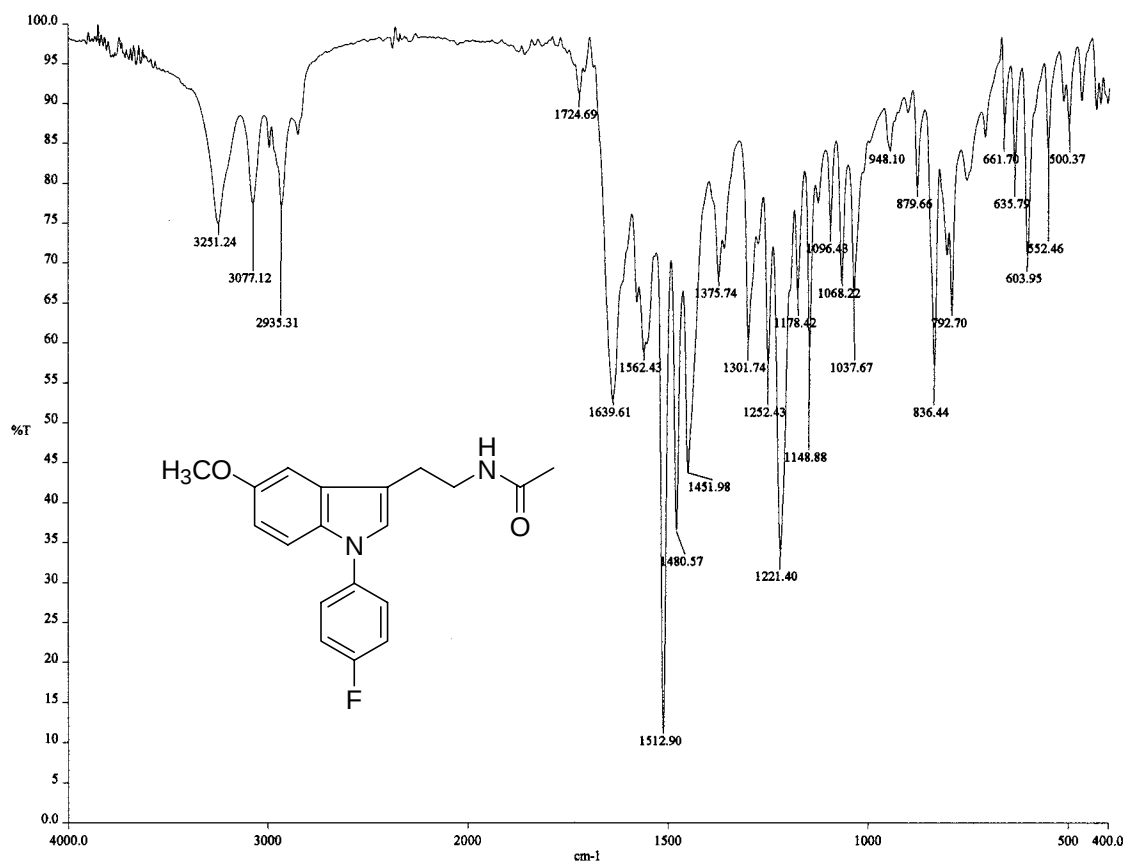


Espectro de IR del compuesto 2c

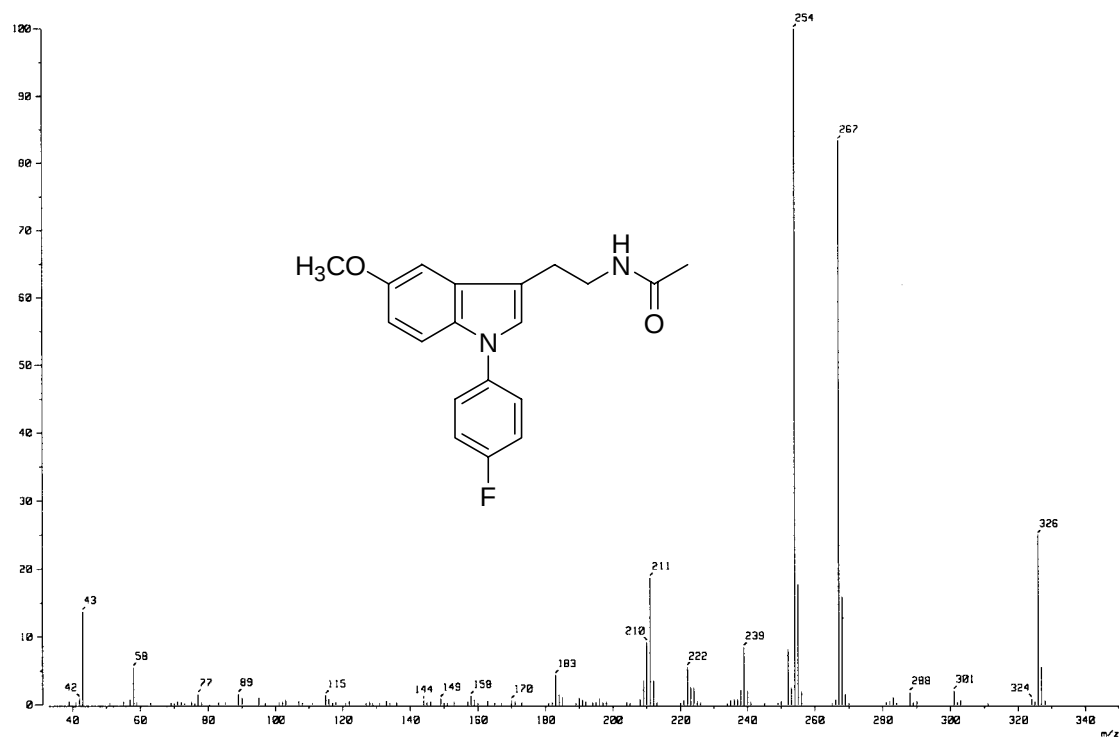


Espectro de masas del compuesto 2c

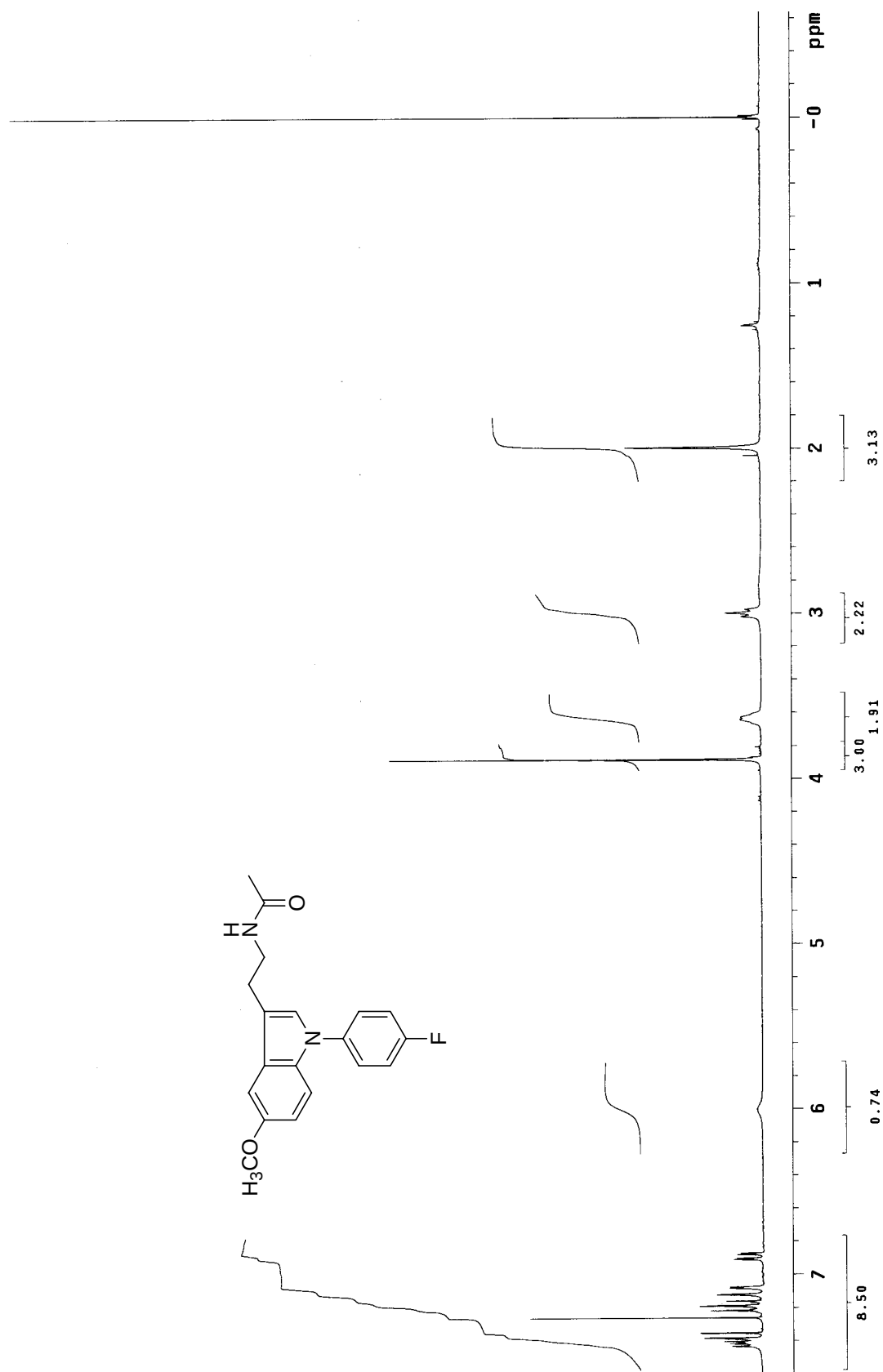
Espectro de RMN-¹H del compuesto 2c

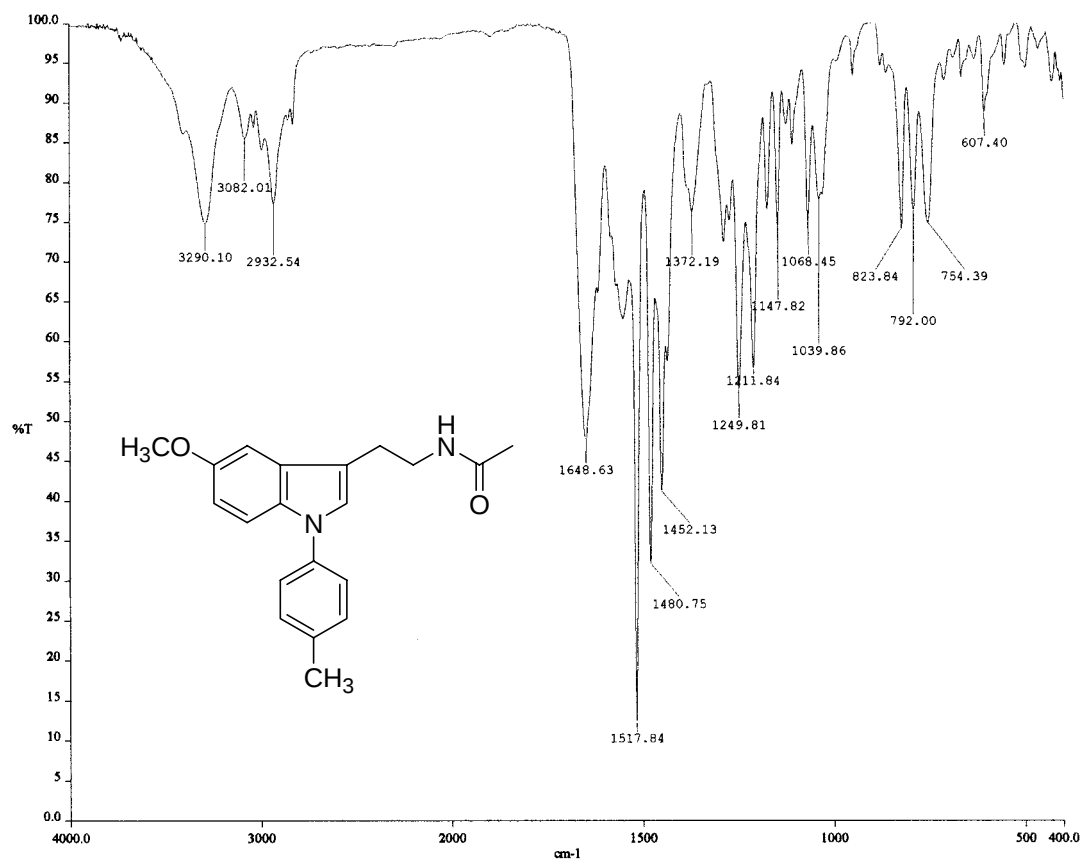


Espectro de IR del compuesto 3c

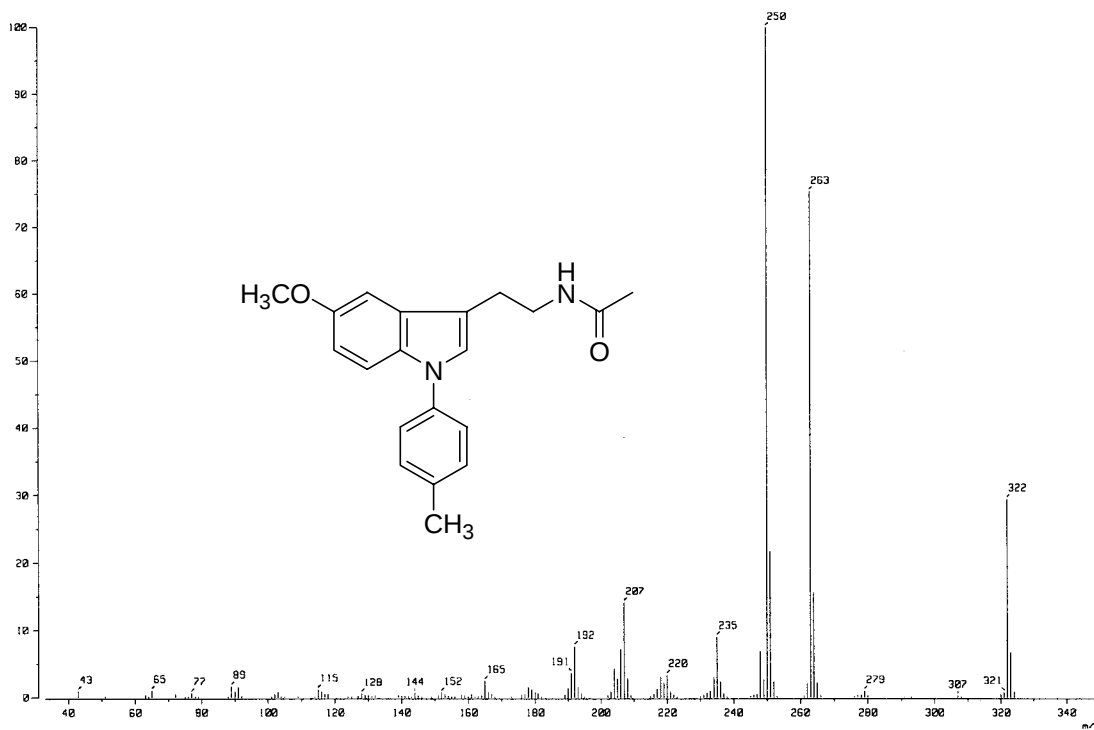


Espectro de masas del compuesto 3c

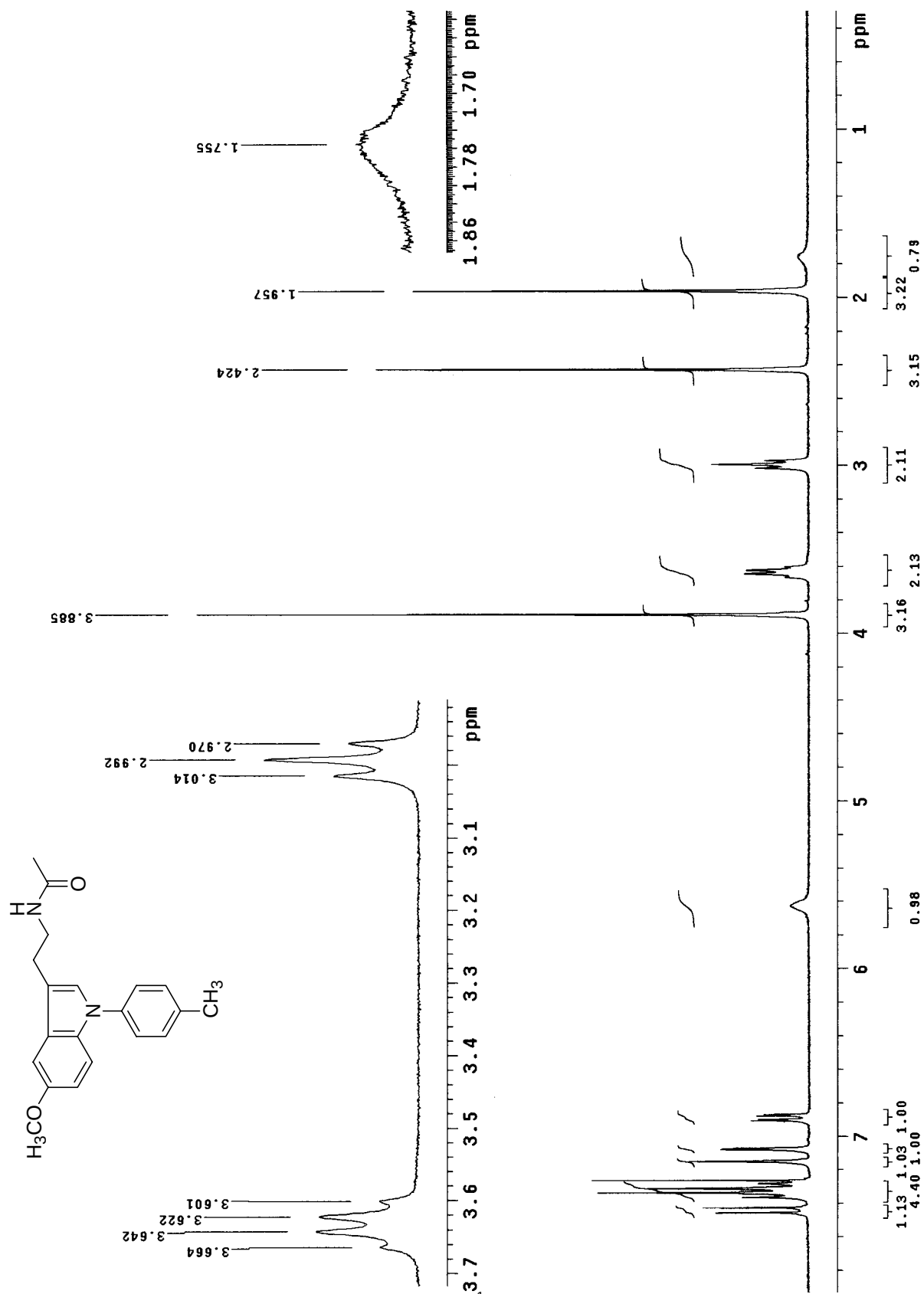
Espectro de RMN-¹H del compuesto 3c

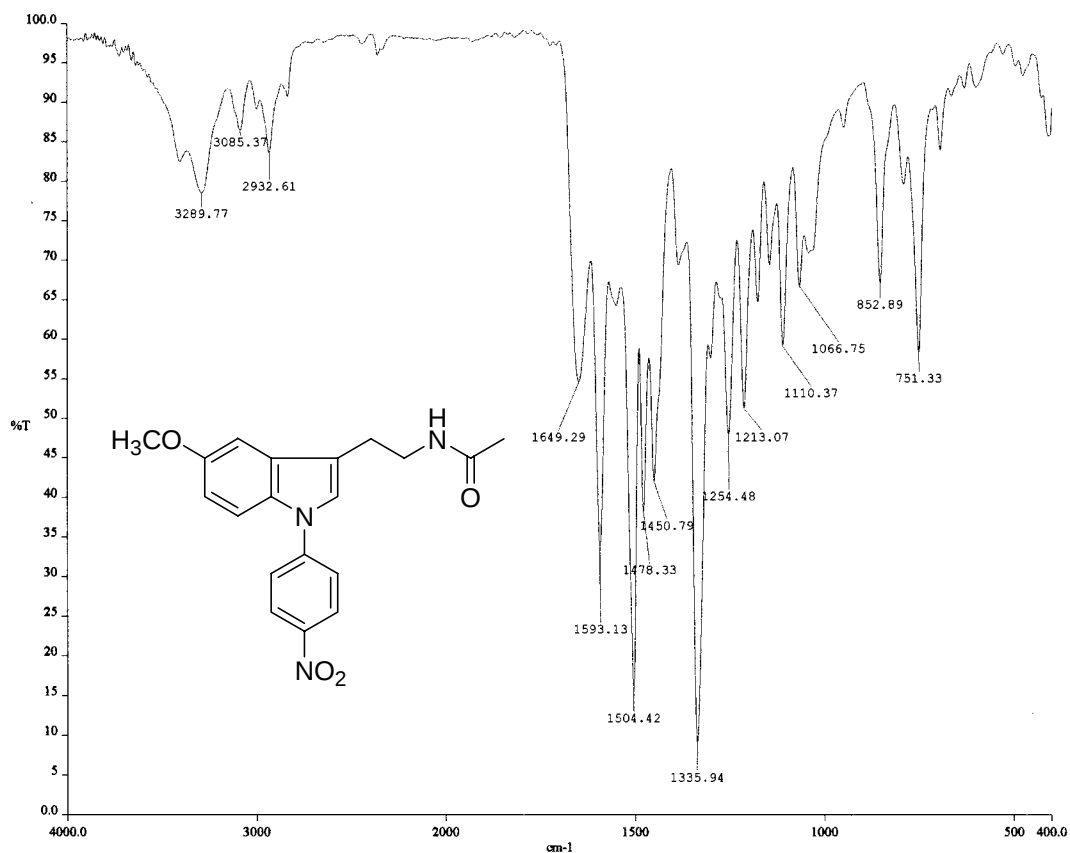


Espectro de IR del compuesto 4c

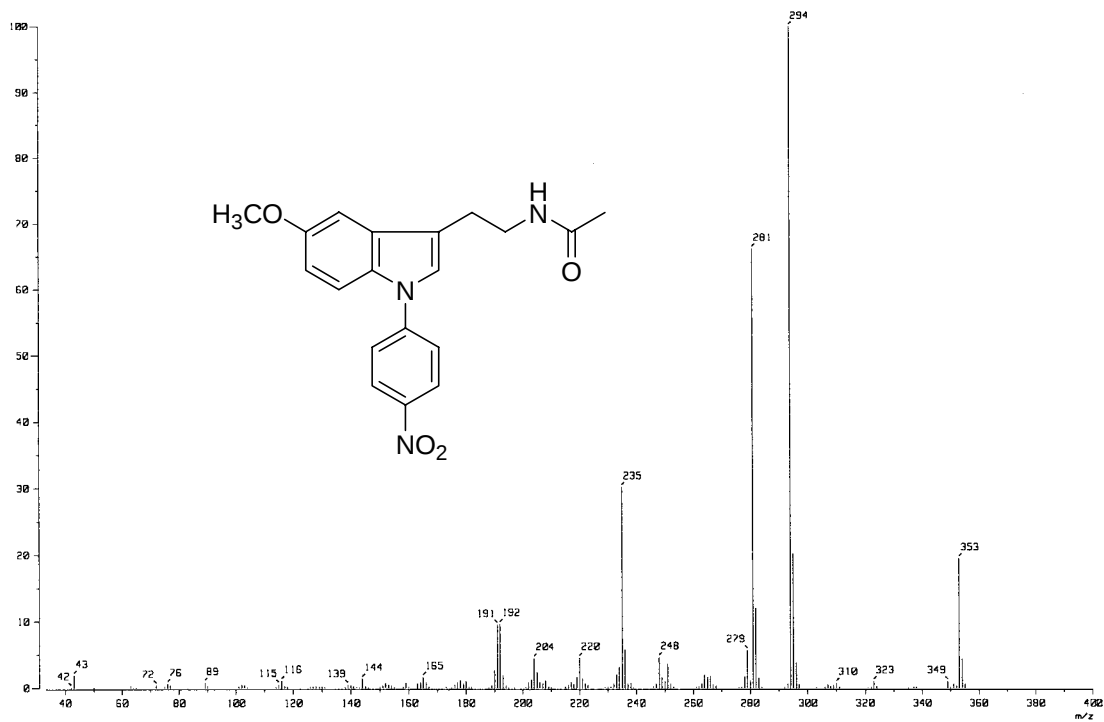


Espectro de masas del compuesto 4c

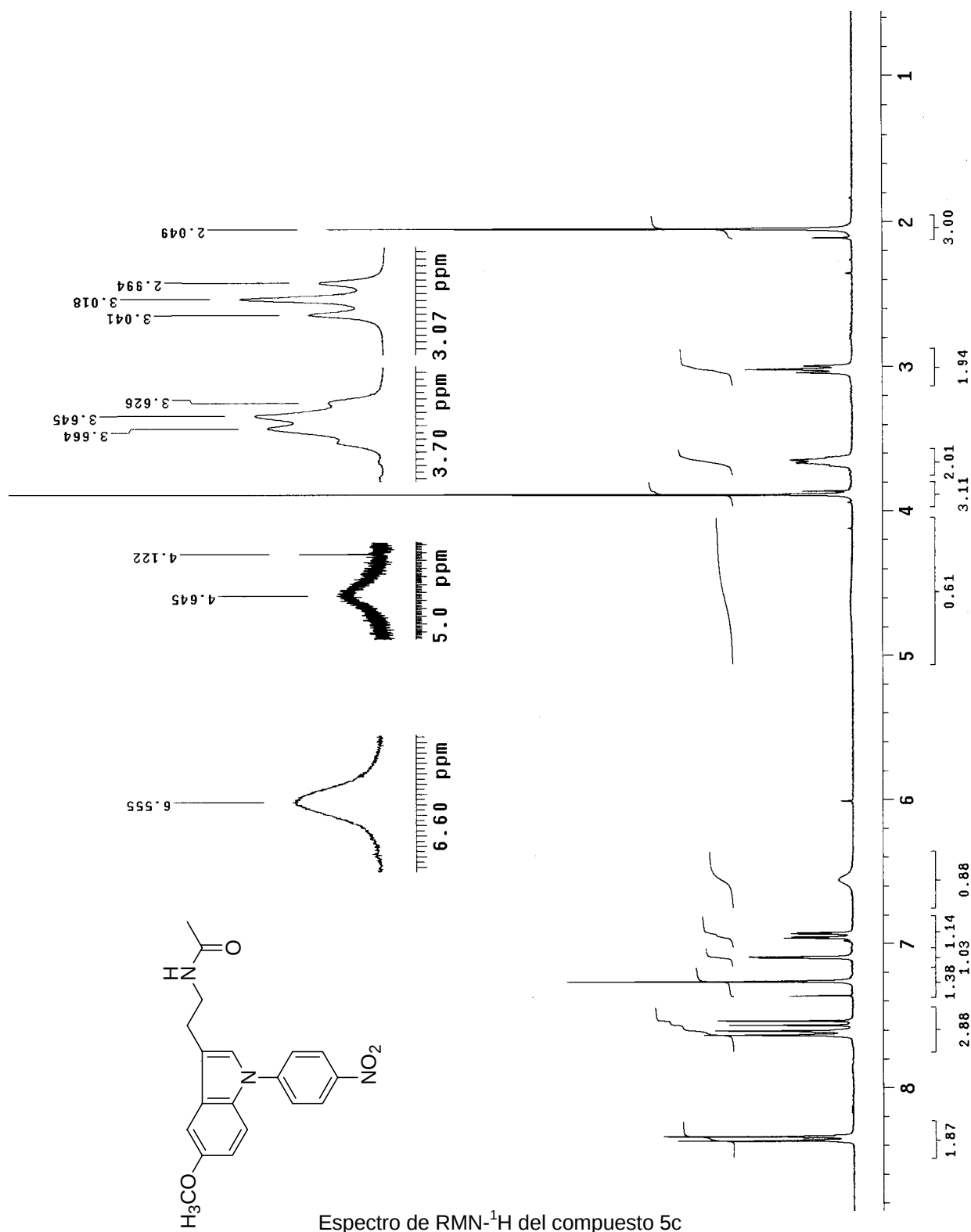
Espectro de RMN-¹H del compuesto 4c



Espectro de IR del compuesto 5c



Espectro de masas del compuesto 5c



Original article

Receptor-binding studies of 1-N-substituted melatonin analogues

Alfonso Lira-Rocha, Ofelia Espejo-González*, Elia B. Naranjo-Rodríguez

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F.

Received 3 March 2002; received in revised form 26 July 2002; accepted 26 July 2002

Abstract

In order to analyse the relevance of the indole electronic region in the binding of melatonin to its receptors, we prepared several analogues with *p*-H, *p*-NO₂, *p*-MeO, *p*-F and *p*-Me of benzyl, benzoyl and phenyl substituents at position 1 of the melatonin skeleton. The electronic properties of the analogues, as calculated with the semiempirical method AM1, were correlated with their affinity for the melatonin receptor from chicken brain membranes. Different trends were observed for each compound series. Compound **5c**, with a *p*-NO₂-benzoyl group, showed the best affinity indicating the importance of a polar bulky group in the receptor interaction.

© 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Melatonin; Binding affinity; Semiempirical method AM1; Melatonin receptor

1. Introduction

Melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine, MT, Fig. 1), one of the many endogenous body environment-sensors, has a number of important actions: it acts as a chemical mediator of photoperiodic information [1,2]; it is a maternal–fetal synchronizer [3]; it modulates endocrinological, neurophysiological and behavioral functions in vertebrates [4–7]; it is an inductor of sleep in humans [4]; it regulates retinal vertebral physiology. In addition, MT can influence the circadian rhythm in reptiles, birds and mammals including human. In the latter context, its exact function is not fully elucidated. The therapeutic relevance of MT, therefore, includes synchronization of disturbed circadian rhythms such as jet-lag [8], sleep-wake cycle [9], seasonal disorders [10] and winter depression [11].

Several MT receptors have been proposed (MT₁, MT₂, MT₃) [12]. However, specific receptors ligands have remained unknown. Neither have specific antagonists that can be used as pharmacological tools been found for MT receptors. To date, three kinds of agonist and/or antagonists have been synthesized, indole-based,

2-amidotetralines and naphthyl derivatives [13] and recently, chroman derivatives [14].

Lewis et al. [15] first proposed an MT receptor binding site based on electrostatic potential energy calculations of MT. The authors proposed that the molecule interacts with the molecular receptor through electrostatic forces, although these results do not provide any parameters that can be correlated with biological activity.

During the last years several molecular models of the binding site have been proposed. Some of them are based on the structure of bacteriorhodopsin [16,17], or on that of rhodopsin [18], and or CoMFA analysis [19–21].

All models agree on the hydrogen bonding of the 5-methoxy group as a donor group, the carbonyl as an acceptor group and the nitrogen atom of acetamido as a donor group [22]. In the case of indole nucleus a π – π stacking interaction between the indole ring and the aromatic amino acid residues has been proposed. The incorporation of a bulky group at position 2 has been considered as an additional pharmacophoric site.

The proposal of an interaction between the indole nucleus and the aromatic amino acid encouraged us to study the electronic properties of the indole ring. We focused our study on the substitution pattern on the nitrogen atom of the indole ring on the basis of the

* Correspondence and reprints

E-mail address: espejog@servidor.unam.mx (O. Espejo-González).

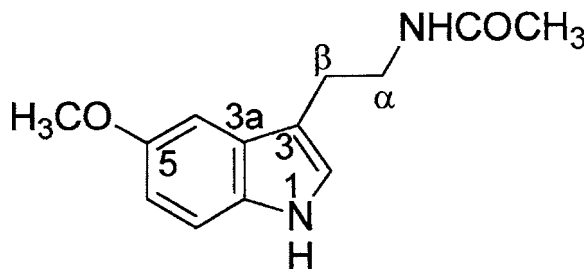


Fig. 1. Melatonin structure.

following arguments. First, this atom is far from the putative interaction zone, so that the possible steric interaction with substituents on this atom is minimized. Second, the nitrogen atom increases the electron density at 3 position of the indole ring, by the delocalization of its electronic pair. Therefore, if one alters this electronic distribution, one can modify the electronic properties of the molecular zone and alter biological activities. However, while this work was in progress, Mor et al. [20] reported that the incorporation of a phenyl or a benzyl group at 1 position of MT, respectively, diminishes the binding affinity for MT receptors. We also observed that this was the case in our preliminary studies. But we also observed that the incorporation of substituents in these rings affected the binding affinity. The present paper deals with these findings.

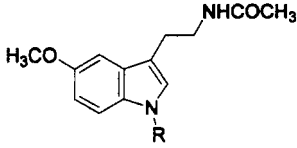
We selected three series of compounds: aralkyl, arylacyl, and aryl moieties with no-substitution or *p*-substituted (electron-releasing or -withdrawing groups). We present the synthesis, an analysis of the electronic properties and affinity binding data of MT and its derivatives.

2. Receptor-binding studies

Affinity constants for the substances were determined by NOVASCREE Biosciences Corporation, Hanover, MD, USA, using a method already described [23]. In this method, chicken brain membrane is used as receptor source, 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin as radioligand at a final concentration of 70 pM, with 2-iodomelatonin as non-specific determinant (1.0 μM). 2-Iodomelatonin is used as reference and positive control. Reactions are carried out in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 37 °C for 60 min. The reaction is terminated by rapid vacuum filtration onto glass fiber filters. Radioactivity trapped onto the filters is determined and compared to control values in order to ascertain any interactions of test compound with the melatonin binding site. The results are shown in Table 1.

Table 1

Receptor binding affinities of 1a–4a, 1b–5b, 1c–5c



Compounds	R	Receptor binding (K _i , nM)
MEL	H	0.82
1a	–CH ₂ –C ₆ H ₅	1640
2a	–CH ₂ –C ₆ H ₄ – <i>p</i> –OCH ₃	737
3a	–CH ₂ –C ₆ H ₄ – <i>p</i> –CH ₃	738
4a	–CH ₂ –C ₆ H ₄ – <i>p</i> –F	3290
1b	–C ₆ H ₅	60.4
2b	–C ₆ H ₅ – <i>p</i> –OCH ₃	52.6
3b	–C ₆ H ₅ – <i>p</i> –CH ₃	3020
4b	–C ₆ H ₅ – <i>p</i> –F	748
5b	–C ₆ H ₅ – <i>p</i> –NO ₂	408
1c	–CO–C ₆ H ₅	538
2c	–CO–C ₆ H ₅ – <i>p</i> –OCH ₃	1090
3c	–CO–C ₆ H ₅ – <i>p</i> –CH ₃	477
4c	–CO–C ₆ H ₅ – <i>p</i> –F	423
5c	–CO–C ₆ H ₅ – <i>p</i> –NO ₂	82.4

3. Conformational analysis and calculation of electronic properties

Conformational analysis, geometry optimization and electronic structure calculations were performed with the Spartan [24] molecular modelling package, using a Silicon Graphics R4600 100 MHz 32 Mb RAM workstation. The conformational analysis was performed within Conformers Search option using Tripos force field and Systematic Method Search protocol.

The MT structure was built from standard fragments and minimized. According to previous published data [25], the methoxy group was oriented to the side chain. The MT side chain was analyzed conformationally. The rotation was performed around τ_1 (C3a–C3–Cβ–Cα), τ_2 (C3–Cβ–Cα–N) and τ_3 (Cβ–Cα–N–CO) (Fig. 1). The most stable conformer was optimized using AM1 method (Default options, MMK correction). The resultant structure was used as template for the construction of the MT analogues. After the introduction of the substituents in the MT template, a conformational analysis for each analogue was carried out.

The bonds between indole and phenyl rings were considered for the analysis, then, the geometry of the most stable conformer was optimized using the method outlined above. Electronic structure calculations and the resulting electronic distribution were used to generate molecular electrostatic potential (MEP) energies.

4. Chemistry

Table 1 shows the substitution pattern for the derivatives. The evaluated compounds were prepared by the general methods outlined in Fig. 2. The *N*-benzyl and *N*-benzoyl derivatives were synthesized by deprotonation of MT with KOH in DME and subsequent addition of chlorobenzyl or chlorobenzoyl reagents [26]. The *N*-phenyl derivatives were synthesized by reacting MT with iodophenyl reagent in the presence of CuI in DMF, Ullman arylation [27]. All compounds were characterized by melting point and spectroscopic data (IR, RMP, MS, elemental analysis).

5. Results

Conformational analysis of MT showed an antiperiplanar orientation between indole ring and acetamide group (Torsion angle = 177.6°) (Fig. 3). Both, the indole ring and acetamide group were oriented perpendicular to the side chain. The C β laid 0.29° above the indole ring plane. This conformation was not affected by the introduction of the substituents in the MT template.

For the analogue 'a' series, the methylene group was coplanar to the indole ring, whereas the phenyl group was oriented below the aromatic ring plane (torsion angle ca. -83.59° , C $_2$ –N $_1$ –CH $_2$ –C $_1$) (Fig. 4, compound 1a). The phenyl ring orientation, in the 'b' series, showed a torsional angle ca. 38.62° (C $_2$ –N $_1$ –C $_1$ –C $_2$) (Fig. 5, compound 1b).

The carbonyl group of the 'c' series was coplanar to the indole ring and the phenyl ring showed a torsional

angle 54.33° (N $_1$ –CO–C $_1$ –C $_2$) with respect to carbonyl group (Fig. 6, compound 1c).

Taking into consideration these data, we assumed that the electronic properties in the 'northern' zone of the MT molecule were not affected by steric factors. In order to assess the influence of the substituents on these properties, we calculated the electronic properties of MT and their analogues. MEP's provide a highly informative means of establishing the electronic structure of molecules, particularly when biological recognition processes are involved.

MEP's volumes were calculated for all compounds (not showed). The isovalue showed (Figs. 7–10) -20.0 (range -20.25 – -19.66), for all compounds. This volume corresponds to electrostatic potential which lays in a parallel plane $1.3 \text{ \AA}$ above the plane of the aromatic ring, just above of π -electron regions.

The isovalue volume of MT (Fig. 7) showed upper (region A) and lower (region B) lobules of similar proportions, above and below of the indole ring, respectively. These regions covered the N1, C3, C3a, C4 and C7a atoms. The remaining regions corresponded to the oxygen carbonyl, the nitrogen amide, and the oxygen methoxy groups.

6. Discussion

A comparison of MT A and B regions with the same regions of the compounds of 'a' series (Fig. 8) showed that the benzyl and *p*-methoxybenzyl substituents increased the volume of these regions.

The phenyl substituents failed to show a significant diminishing of regions A and B with the exception of *p*-nitrophenyl group (Fig. 9).

A significant diminishing of regions A and B by benzoyl group was observed by comparing MT regions (Fig. 10). Regions A and B completely disappeared with the *p*-nitrobenzoyl group.

As a rule, the nitro group always decreased the volume value in regions A–B for all the series.

On the other hand, a significant diminishing of regions A–B by benzoyl group was observed by comparing melatonin, 1-*N*-benzylmelatonin, 1-*N*-benzoylmelatonin and 1-*N*-phenylmelatonin.

In summary, the nitro derivatives decreased the electron density of the indole ring and in consequence one expects a lower binding affinity than MT.

With respect to the binding data, we observed that the incorporation of a bulky group at 1 position of the indole ring decreases the affinity. This is in concordance with data reported by Mor et al. [20]. However, the value of binding affinity in each series showed some differences.

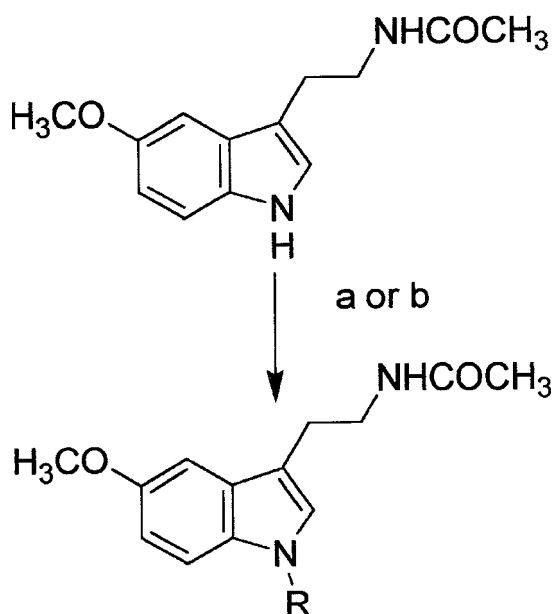


Fig. 2. (a) (i) KOH/DME; (ii) halobenzyl or halobenzoyl reagent; (b) iodophenyl reagent/ K_2CO_3 /CuI/DMF.

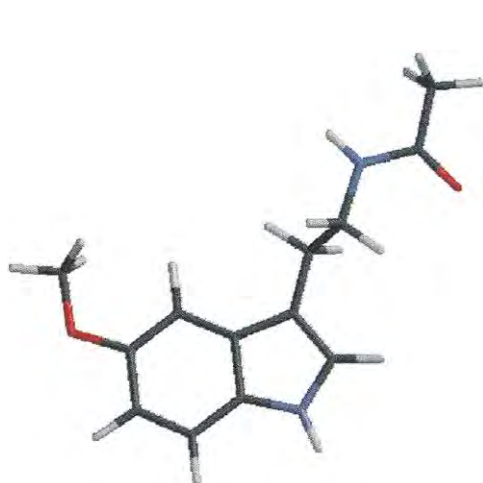


Fig. 3

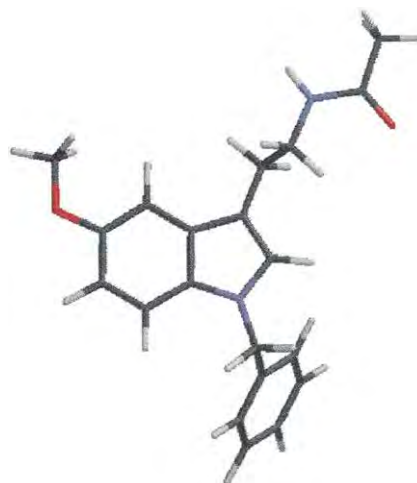


Fig. 4

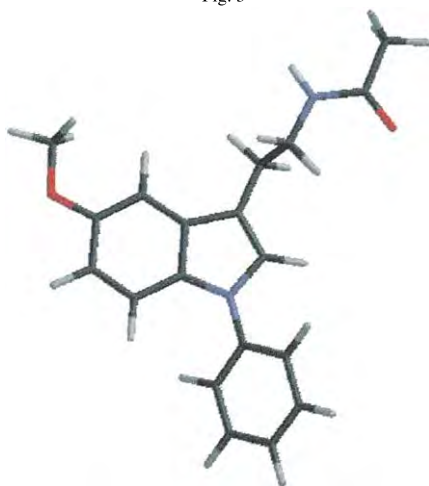


Fig. 5

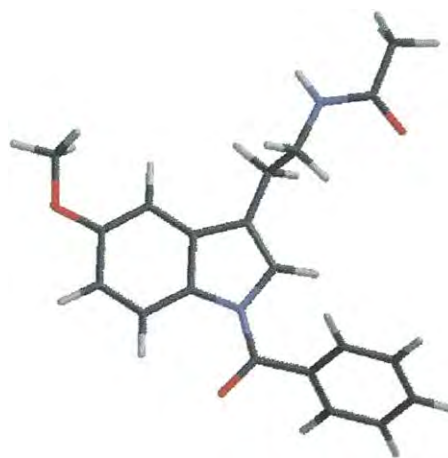


Fig. 6

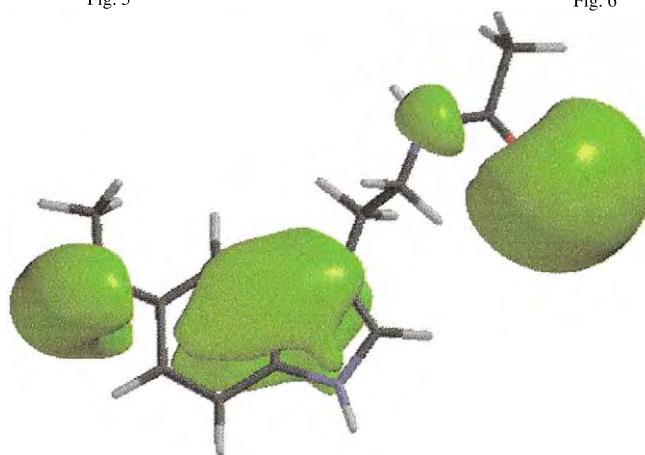


Fig. 7

Fig. 3. Framework view of MT. Fig. 4. Compound **1a**. Fig. 5. Compound **1b**. Fig. 6. Compound **1c**. Fig. 7. Isovalue of MT.

In the case of the series 'a', compounds with the presence of an electron-release group increased the affinity.

For the series 'b', we observed that the presence of a methoxy group showed the best affinity in this series. A comparison of the fluor and nitro derivatives data with that of the methyl derivative revealed that the com-

pounds with polar groups have better affinity. We speculate that an electrostatic interaction occurs between the polar groups and the amino acid residues.

The binding affinity for the 'c' series showed a different trend. In this case the nitro derivative, an electron-withdrawing group, showed the best affinity value while the worst was the methoxy derivative.

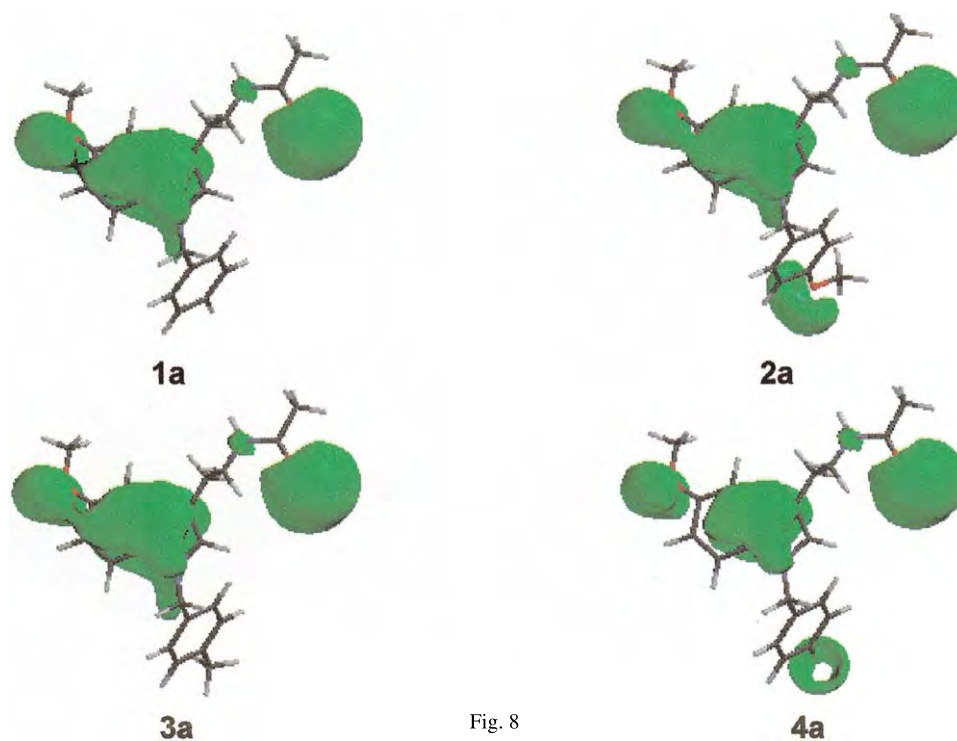


Fig. 8

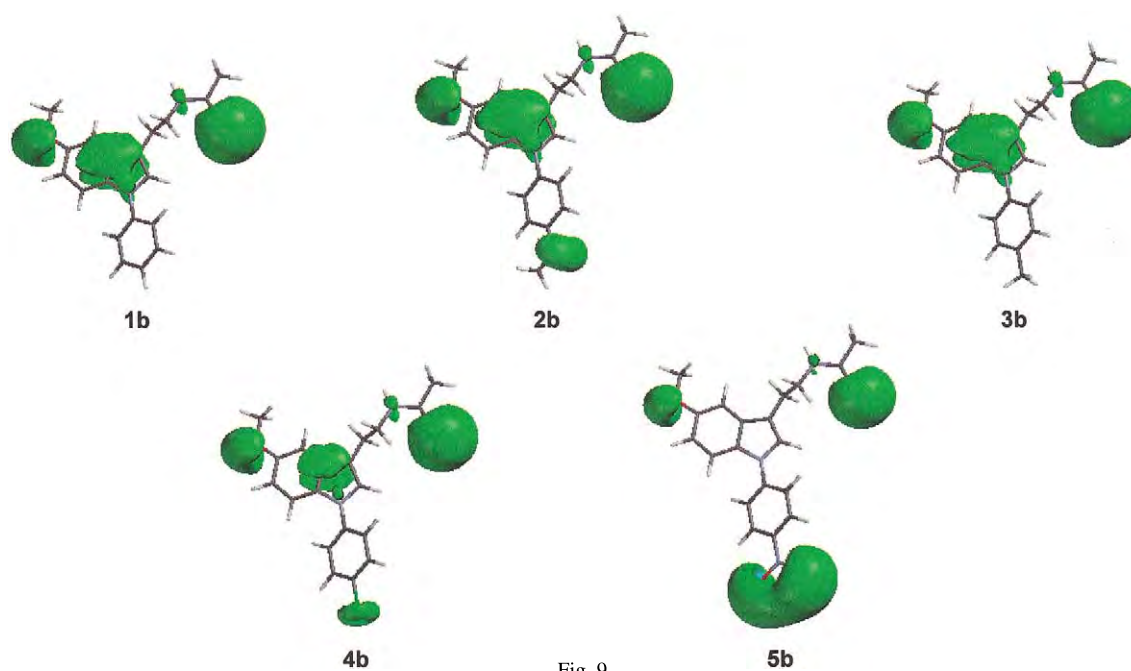


Fig. 9

Fig. 8. Isovalue for series 'a'. Fig. 9. Isovalue for series 'b'.

The analysis of the ^1H -NMR data for these compounds, outlined in Table 2, indicated that there is an interaction between the benzoyl aromatic ring and the β -methylene group. The shift of the last group is in the range of 2.84–2.87 ppm. This means an upperfield shift with respect to melatonin and the other series of compounds for the β -methylene group. The RMP data

(Table 2) for 2-iodomelatonin indicate a similar shift for this group [28]. In the NOESY spectrum of compound 5c, an interaction was observed between H-2 and H's β -methylene group, but not for the H's α -methylene group. Based on these findings, we assumed that a strong interaction occurs between the benzoyl group and the side chain.

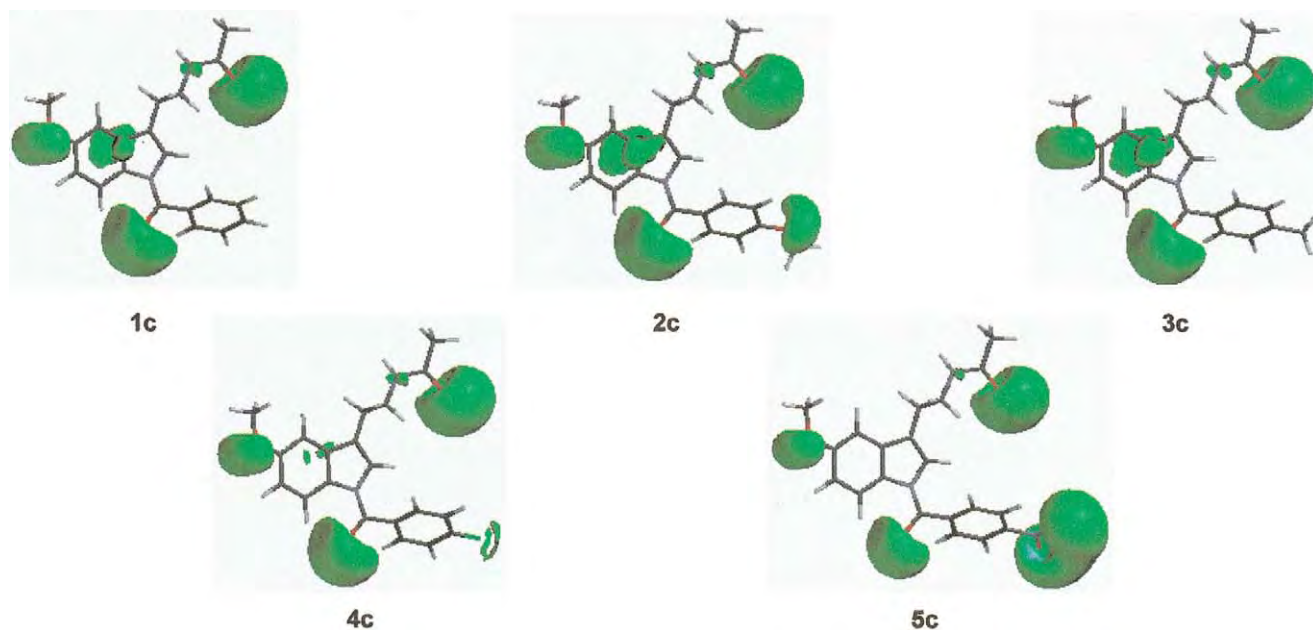


Fig. 10. Isovalue for series 'c'.

Table 2

¹H-NMR data of **1a–4a**, **1b–5b** and **1c–5c** (δ from TMS in CDCl₃, 300 MHz)

Compound	H-2	H-4	H-6	H-7	α H's	β H's	NH	CH ₃ O	CH ₃ CO
2-I-MT ^a	–	6.99	6.87	7.21	3.53	2.89	4.68	3.86	1.93
MT	7.365	7.03	6.87	7.27	3.6	2.95	6.01	3.86	1.96
1a	6.94	7.04	6.84	7.15	3.59	2.96	6.50	3.85	1.93
2a	–	–	–	–	3.54	2.90	5.50	3.83	1.89
3a	6.93	–	6.84	7.13	3.58	2.94	5.96	3.85	1.95
4a	6.92	7.03	6.84	7.16	3.57	2.95	6.15	3.85	1.97
1b	7.18	7.08	6.89	–	3.64	3.00	5.88	3.88	1.97
2b	7.16	7.02	6.83	7.46	3.50	2.88	6.28	3.79	1.87
3b	7.09	7.05	6.86	–	3.61	2.97	5.6	3.86	1.93
4b	7.12	7.08	6.89	7.37	3.67	3.03	5.80	3.92	2.01
5b	7.15	7.07	6.89	7.44	3.63	2.99	5.63	3.88	1.96
1c	7.07	–	6.97	8.27	3.52	2.84	5.5	3.87	1.92
2c	6.93	7.05	7.00	8.27	3.52	2.84	5.55	3.88	1.92
3c	7.16	–	–	8.24	3.56	2.88	5.59	3.89	1.94
4c	7.08	7.05	7.00	8.26	3.55	2.88	5.59	3.90	1.94
5c	7.12	7.03	6.99	8.27	3.54	2.87	5.59	3.89	1.94

^a Ref. [28].

7. Conclusions

In Mor's model [20], the presence of a bulky group at position 2 of indole nucleus increases the affinity binding. Considering our findings, we conclude that the bulky group must have a higher charge density in order to get a good affinity. An iodine atom and a phenyl group are well tolerated in this position but not a cyclohexyl or a benzyl group [29,30]. On the other hand, it is noteworthy that in the series 'b', the methyl derivative showed the lowest binding value. A plausible

explanation is that the presence of a polar group is necessary to yield a binding with high affinity.

Acknowledgements

We thank financial support from DGAPA IN232198 project. We are grateful to Rosa Isela del Villar, Georgina Duarte, Margarita Guzmán and Maricela Gutiérrez for the determination of all spectra.

References

- [1] D.S. Carter, B.D. Goldman, *Endocrinology* 113 (1983) 1261–1267.
- [2] E.L. Bittman, F.J. Karsch, *Biol. Reprod.* 30 (1984) 585–593.
- [3] S.M. Reppert, D.R. Weaver, in: D.C. Kelvin, R.Y. Moore, S.M. Reppert (Eds.), *Suprachiasmatic Nucleus. The Minds' Clock*, Oxford University Press, New York, 1991, pp. 405–418.
- [4] H. Underwood, B.D. Goldman, *J. Biol. Rhythms* 2 (1987) 279–316.
- [5] V.M. Cassone, *Trends Neurosci.* 13 (1990) 457–464.
- [6] D.L. Krause, M.L. Dubocovich, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31 (1991) 549–568.
- [7] B. Stankov, F. Fraschini, R.J. Reiter, *Brain Res. Rev.* 16 (1991) 245–246.
- [8] K. Petrie, J.V. Conagle, L. Thompson, K. Chamberlain, *Br. Med. J.* 298 (1989) 707–710.
- [9] T.A. Wher, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73 (1991) 1276–1280.
- [10] B. Guardiola-Lemaitre, *Adv. Pineal Res.* (1991) 351–353.
- [11] L. Wetterberg, J. Beck-Friis, B.F. Kielmann, *Biological Rhythms, Mood Disorders, Light Therapy and the Pineal Gland*, American Psychiatric, Washington, 1990, p. 69.
- [12] M.L. Dubocovich, D.P. Cardinali, P. Delagrange, D.N. Krause, D. Strosberg, D. Sugden, F.D. Yocca, in: *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification, Melatonin Receptors*, IUPHAR Media, London, 2000, pp. 270–277.
- [13] M.L. Dubocovich, *TiPS* 16 (1995) 50–56.
- [14] D. Sugden, *Eur. J. Pharmacol.* 254 (1994) 271–275.
- [15] D.F. Lewis, J. Arendt, J. English, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252 (1989) 370–373.
- [16] D. Sugden, W.S. Chong, F.V. Lewis, *Br. J. Pharmacol.* 114 (1995) 618–623.
- [17] C.J. Grol, J.M. Jansen, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996) 1333–1339.
- [18] C. Navajas, T. Kokkola, A. Poso, N. Honka, J. Gynther, J.T. Latinen, *Eur. J. Pharmacol.* 304 (1996) 173–183.
- [19] S. Sicsic, I. Serraz, J. Andrieux, B. Brémont, B. Mathé-Allainmat, A. Poncet, S. Shen, M. Langlois, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 739–748.
- [20] M. Mor, S. Rivara, C. Silva, F. Bordini, P.V. Plazzi, G. Spadoni, G. Diamantini, C. Balsamini, G. Tarzia, F. Fraschini, V. Lucini, R. Nonno, B.M. Stankov, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 3831–3844.
- [21] C. Marot, P. Chavatte, L. Morin-Allory, M. Claude Viaud, G. Guillaumont, P. Renard, D. Lesieur, A. Michel, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 4453–4465.
- [22] M.L. Dubocovich, *Nature* 306 (1993) 782–784.
- [23] M.L. Dubocovich, *Eur. J. Pharmacol.* 162 (1989) 189–199.
- [24] Spartan version 5.0., Wavefunction Inc., 18401 Von Karman Avenue, Suite 370, Irvine, CA 92612, USA.
- [25] V. Lecker, P. Depreux, D.H. Caignard, P. Rinard, P. Delagrange, B. Guardiola-Lemaitre, P. Morgan, *Biorg. Med. Chem. Lett.* 6 (1996) 1071–1076.
- [26] (a) Y. Kikugawa, Y. Miyake, *Synthesis* 13 (1981) 461;
(b) Y. Kikugawa, *Synthesis* 13 (1981) 460.
- [27] J. Perregaard, J. Arnt, K.P. Bogeso, J. Hyttel, C. Sánchez, *J. Med. Chem.* 35 (1992) 1092–1101.
- [28] O. Vakkuri, E. Lämsä, E. Rahkamaa, H. Ruotsalainen, J. Leppäluoto, *Anal. Biochem.* 142 (1984) 284–289.
- [29] G. Spadoni, B. Stankov, A. Duranti, G. Biella, V. Lucini, A. Salvatori, F. Fraschini, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 4069–4074.
- [30] M.L. Dubocovich, *Trends Pharmacol. Sci.* 16 (1995) 50–56.