



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“Diseño, síntesis, caracterización y evaluación de
arilaminas como ligandos del receptor beta-3 adrenérgico
con potencial terapéutico en la obesidad”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN
FARMACOLOGÍA**

PRESENTA:

L. EN F. CHRISTIAN FERNANDO HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

DIRECTORES:

D. EN C. JOSÉ GUADALUPE TRUJILLO FERRARA

D. EN C. MARVIN ANTONIO SORIANO URSÚA

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE 2015



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Nacional Politécnico.

Este trabajo fue parte de los proyectos: SIP2015-1650, CB235787, CB168116 y del registrado ante el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. 296775

Productos del trabajo presentado en esta tesis:

1 artículo publicado en revista internacional indexada

2 publicaciones en memorias de congreso internacional indexadas

6 presentaciones en Congresos Nacionales

1 presentación en Congreso Internacional



AGRADECIMIENTOS

A dios por brindarme vida y salud.

A mi familia (padres y hermanos) por todo el apoyo incondicional, la enseñanza generada en el hogar ha creado un maravilloso ser humano. A mis sobrinos que son una parte importante en mi vida que los quiero mucho y siempre me hacen sonreír.

A mi princesa (Marylu) por todo el amor que me ha dado, porque siempre me ha apoyado y por la felicidad generada al haber aceptado formar una pequeña familia.

A mi comité tutorial: Dr. Trujillo, Dr. Marvin, Dr. Valencia, Dr. Arias y Dr. Arrieta por el aporte a este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de bioquímica: Anita, Jimena, Sarai, Chezo, Maribel, Ana Lilia, Roberto, Erik, Jesús, Melvin, Axel, Raúl, Daniel, Julio e Isaías por hacer muy grata la estancia en el laboratorio y además por el aporte de ideas que enriquecieron mi trabajo.



ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | VI |
| ÍNDICE DE TABLAS | VII |
| ÍNDICE DE GRÁFICAS | VIII |
| ABREVIATURAS | IX |
| RESUMEN..... | X |
| SUMMARY | XI |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Epidemiología | 1 |
| 1.2 Receptores adrenérgicos beta y su interacción con ligandos agonistas..... | 2 |
| 1.3 Receptor adrenérgico β_3 (β_3 AR)..... | 4 |
| 2. ANTECEDENTES | 5 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 11 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 11 |
| 5. OBJETIVOS..... | 11 |
| 6. METODOLOGÍA..... | 13 |
| 6.1 Simulaciones <i>in silico</i> de reconocimiento de compuestos propuestos sobre receptores adrenérgicos beta..... | 13 |
| 6.2. Síntesis de los compuestos | 15 |
| 6.3. Toxicidad aguda..... | 17 |
| 6.4. Evaluación en un modelo murino de obesidad..... | 18 |
| 7. RESULTADOS | 19 |
| 7.1. Simulaciones <i>in silico</i> de reconocimiento de compuestos propuestos sobre β_3 AR. 19 | |
| 7.2. Síntesis química de los compuestos propuestos seleccionados | 21 |
| 7.3. Determinación de dosis letal 50 (DL_{50})..... | 25 |
| 7.4. Modelo murino de obesidad..... | 27 |
| 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 35 |
| 9. CONCLUSIONES | 45 |
| 10. REFERENCIAS..... | 46 |
| 11. ANEXO A | 51 |
| 12. ANEXO B | 57 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Vía de señalización de β_3 AR, enfocada al efecto que ejerce en el tejido adiposo. Al ser estimulado el receptor activa la proteína adenilato ciclasa que genera AMPc que a su vez activa a PKA y ésta fosforila a LSH que actúa sobre los triglicéridos..... | 4 |
| Figura 2. Estructura del receptor β_3 adrenérgico. En círculos color azul claro se observan los residuos de aminoácidos conservados entre β_2 AR y β_3 AR. En círculos color verde residuos de aminoácidos que están implicados en la unión con catecolaminas..... | 5 |
| Figura 3. Compuestos sintetizados como agonistas de β_3 ARs..... | 8 |
| Figura 4. Vista extracelular del receptor adrenérgico β_2 en la que se marca el sitio de unión de las ariletanolaminas (en verde) y un par de aminoácidos involucrados en la selectividad de ligandos (en rojo)..... | 9 |
| Figura 5. Reacción general de síntesis para derivados de arilaminas. | 15 |
| Figura 6. Valores de afinidad calculada de los ligandos propuestos. | 19 |
| Figura 7. a) Complejo molecular entre el β_3 AR y Doprotec; b) Residuos de aminoácidos del β_3 AR que interactúan con el ligando Doprotec (amarillo)..... | 20 |

ANEXO A

| | |
|---|----|
| Figura 8. Espectro de infrarrojo del compuesto DOPROTEC. | 51 |
| Figura 9. Espectro de resonancia magnética de ^1H del compuesto DOPROTEC | 51 |
| Figura 10. Espectro de resonancia magnética de ^{13}C del compuesto DOPROTEC | 52 |
| Figura 11. Espectro de infrarrojo del compuesto DOP1..... | 53 |
| Figura 12. Espectro de resonancia magnética de ^1H del compuesto DOP1. | 53 |
| Figura 13. Espectro de resonancia magnética de ^{13}C del compuesto DOP1..... | 54 |
| Figura 14. Espectro de infrarrojo del compuesto ISOFEA..... | 55 |
| Figura 15. Espectro de resonancia magnética de ^1H del compuesto ISOFEA..... | 55 |
| Figura 16. Espectro de resonancia magnética de ^{13}C del compuesto ISOFEA | 56 |



ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Ligandos propuestos para estudiar la afinidad sobre el β_3 AR | 14 |
| Tabla 2. Energía libre (ΔG kcal/mol) de los ligando propuestos sobre el β_3 AR..... | 20 |
| Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas calculadas con los servidores en línea..... | 21 |
| Tabla 4. Datos generales de los compuestos sintetizados. | 22 |
| Tabla 5. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto Doprotec..... | 23 |
| Tabla 6. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto Dop1 | 24 |
| Tabla 7. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto Isofea..... | 24 |
| Tabla 8. Estimación de la DL_{50} para la molécula Doprotec por el método de Lorke. | 25 |
| Tabla 9. Estimación de la DL_{50} para la molécula Dop1 por el método de Lorke. | 25 |
| Tabla 10. Estimación de la DL_{50} para la molécula ISOFEA por el método de Lorke en ratones machos CD1..... | 26 |



ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| Gráfica 1. Efecto de la dieta (normal e hipercalórica) durante 12 semanas en el peso corporal de ratones C57BL6. | 27 |
| Gráfica 2. Efecto de la dieta normal en ratones macho de la cepa C57BL6 sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol total en sangre. | 28 |
| Gráfica 3. Efecto de la dieta hipercalórica en ratones macho de la cepa C57BL6 sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol total en sangre. | 28 |
| Gráfica 4. Comparación de peso al final de diferentes tratamientos. Efecto del tratamiento durante 4 semanas en el peso de ratones C57BL6..... | 29 |
| Gráfica 5. Comparación de la concentración de glucosa en sangre al final de los tratamientos. Efecto del tratamiento durante 4 semanas en la concentración de glucosa en sangre de ratones C57BL6..... | 30 |
| Gráfica 6. Comparación de la concentración de triglicéridos en sangre al final de los tratamientos. Efecto del tratamiento durante 4 semanas en la concentración de triglicéridos en sangre de ratones C57BL6.. | 30 |
| Gráfica 7. Comparación de la concentración de colesterol en sangre al final de los tratamientos. Efecto del tratamiento durante 4 semanas en la concentración de colesterol en sangre de ratones C57BL6. | 31 |
| Gráfica 8. Efecto de la administración de Propranolol + Doprotec en ratones macho C57BL6 sometidos a dieta hipercalórica. a) peso corporal. b) concentración de glucosa en sangre, c) concentración de triglicéridos en sangre, d) concentración de colesterol total en sangre..... | 32 |
| Gráfica 9. Comparación del porcentaje de grasa corporal al final de los tratamientos. Efecto del tratamiento durante 4 semanas en porcentaje de grasa corporal de ratones C57BL6. | 33 |
| Gráfica 10. Comparación del porcentaje de grasa corporal al final de la administración de Propranolol+Doprotec en ratones macho C57BL6 sometidos a dieta hipercalórica..... | 33 |



ABREVIATURAS

| | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| ^{13}C | Carbono trece |
| ^1H | Protón |
| AceOEt | Acetato de etilo |
| AMPc | Adenosin monofosfato cíclico |
| BOC | Diter-butil dicarbonato |
| CDCl₃ | Cloroformo deuterado |
| COMT | Catecol-O-metil transferasa |
| DL₅₀ | Dosis letal 50 |
| DMF | Dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DMSO-d₆ | Dimetilsulfóxido deuterado |
| EC50 | Concentración efectiva 50 |
| HSL | Lipasa sensible a hormonas |
| IR | Infrarrojo |
| K₂CO₃ | Carbonato de potasio |
| MetOH | Metanol |
| MetOH-d₁ | Metanol deuterado |
| OMS | Organización Mundial de Salud |
| PKA | Proteína cinasa A |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| TLC | Cromatografía en capa fina |
| TM | Dominio transmembranal |
| TMS | Tetrametilsilano |
| UCP-1 | Proteína desacoplante-1 |
| β₃AR | Receptor adrenérgico beta 3 |
| βARs | Receptores adrenérgicos beta |



RESUMEN

El exceso de peso corporal (sobrepeso y obesidad) es reconocido como uno de los retos más importantes de la salud pública en el mundo, dada su magnitud, rapidez de crecimiento y el efecto negativo sobre la población que la padece. México tiene el primer lugar en obesidad infantil y en adultos, lo que aumenta significativamente el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles como lo son: diabetes mellitus tipo II, hipertensión arterial, dislipidemias, algunas neoplasias entre otros.

Un blanco terapéutico que está asociado con la obesidad es el receptor adrenérgico beta3 (β_3 AR) que se expresa principalmente en tejido adiposo blanco y marrón, su activación se asocia con lipólisis y termogénesis; por lo que se ha convertido en blanco atractivo para el tratamiento de algunas enfermedades metabólicas. En el presente trabajo se llevó a cabo el diseño de arilaminas capaces de unirse al β_3 AR mediante la técnica de estudio de acoplamiento ligando-proteína (docking). Se analizó la importancia de la presencia de grupos voluminosos unidos al grupo amino y la adición de compuestos con boro. Conforme a lo sugerido por los resultados *in silico*, se sintetizaron 3 compuestos que fueron caracterizados mediante punto de fusión, espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear. Los efectos de los compuestos sintetizados se evaluaron sobre parámetros metabólicos (a través de la medición de los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos, además del peso y grasa corporal) de ratones C57BL/6 sometidos a dietas normal o hipercalóricas. Los compuestos Doprotec e Isofea tienen acción sobre el peso corporal, Doprotec disminuye significativamente las concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol y el porcentaje de grasa corporal, mientras que Dop1 e Isofea solo disminuyen los triglicéridos y colesterol. La acción de Isofea es mediada, al menos en parte, a través de la activación del β_3 AR, mientras que para Doprotec y Dop1 aún no se tiene elucidado el mecanismo de acción; sin embargo se discute sobre algunas posibilidades.



SUMMARY

Overweight and obesity are currently recognized as the most important challenges of public health in the world. That is due to its burden, speed of growth, and the negative effects on the population who suffers them. Mexico takes first place in obesity for both, childhood and adults. That significantly increases the risk of chronic non-communicable diseases such as: diabetes mellitus type II, hypertension, dyslipidemia, some cancers, among others.

A therapeutic target associated with obesity is the beta3 adrenergic receptor (β_3 AR). This receptor is mainly expressed in the white and brown adipocyte tissue; its activation is associated with lipolysis and thermogenesis. Therefore, it has become an attractive target for the treatment of some metabolic diseases. In the present study, we design arylamines able for binding on β_3 AR through technical study of docking protein-ligand. The key role of bulky functional groups attached to the amino group and the addition of boron compounds was analyzed. As suggested by the results *in silico*, three compounds were synthesized and characterized by melting point, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The effects of the synthesized compounds were evaluated on metabolic parameters (through measurement of glucose levels, cholesterol and triglycerides, in addition to weight and body fat) of C57BL/6 mice on normal or hypercaloric diets. Two compounds (Doprotec and Isofea) have action on body weight. Doprotec significantly decreases glucose, triglycerides, cholesterol and body fat percentage while Isofea and dop1 only lower triglycerides and cholesterol. Isofea action is mediated, at least in part, through β_3 AR activation, whereas dop1 and Doprotec act through a not yet elucidated mechanism of action; some possibilities are discussed.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología

La obesidad es un importante problema de salud pública en todo el mundo, lo que contribuye a un aumento de la morbilidad y la mortalidad. A nivel mundial han ocurrido transformaciones socioeconómicas y demográficas que se han acompañado por cambios en el estilo de vida, los hábitos alimenticios y el perfil epidemiológico de las enfermedades prevalentes [Aballay *et. al.*, 2012].

La obesidad y sobrepeso han alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial, y cada año mueren, como mínimo, 2.6 millones de personas a causa de la obesidad o sobrepeso [OMS, 2012]. Estimaciones mundiales recientes se presentan a continuación:

- En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos.
- En general, en 2014 alrededor del 13% de la población adulta mundial (un 11% de los hombres y un 15% de las mujeres) eran obesos.
- En 2014, el 39% de los adultos de 18 o más años (un 38% de los hombres y un 40% de las mujeres) tenían sobrepeso.
- La prevalencia mundial de la obesidad se ha multiplicado por más de dos entre 1980 y 2014.

En 2013, más de 42 millones de niños menores de cinco años de edad tenían sobrepeso. Si bien el sobrepeso y la obesidad tiempo atrás eran considerados un problema propio de los países de ingresos altos, actualmente ambos trastornos están aumentando en los países de ingresos bajos y medianos, en particular en los entornos urbanos. En los países en desarrollo con economías emergentes (clasificados por el Banco Mundial en países de ingresos bajos y medianos) el incremento porcentual del sobrepeso y la obesidad en los niños ha sido un 30% superior al de los países desarrollados [OMS, 2012].



La obesidad junto con el sobrepeso, y patologías relacionadas, son los principales problemas de Salud Pública. Actualmente México es primer lugar en obesidad infantil y en adultos con un 32.8% de mexicanos obesos, siguiéndole E.U.A con un 31.8% de acuerdo con el nuevo informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). En México se gasta 7% del presupuesto destinado a salud para atender la obesidad, solo debajo de Estados Unidos que invierte el 9%. Actualmente, el exceso de peso corporal es reconocido como uno de los retos más importantes de salud pública en el país y todo el mundo, dada la magnitud, rapidez de su incremento y el efecto negativo que ejerce sobre la salud de la población que lo padece [Barrera *et. al.*, 2013].

La mala alimentación, el sedentarismo, la falta de acceso a alimentos nutritivos, son factores determinantes del sobrepeso y la obesidad. El sobrepeso y la obesidad incrementan significativamente el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles, mortalidad prematura y el costo social de la salud, además de que reducen la calidad de vida. Se estima que 90 % de los casos de diabetes mellitus tipo II son atribuibles al sobrepeso y la obesidad. Otras enfermedades relacionadas son: hipertensión arterial, dislipidemias, enfermedades coronarias, apnea del sueño, enfermedad vascular cerebral, osteoartritis y algunos cánceres [Aballay *et. al.*, 2012].

1.2 Receptores adrenérgicos beta y su interacción con ligandos agonistas

La estimulación simpática induce una gran diversidad de efectos fisiológicos, tales como: modulación de la frecuencia cardiaca, tono vascular, broncodilatación, metabolismo lipídico entre otros. Los receptores adrenérgicos beta son objetivo para las catecolaminas endógenas dopamina, adrenalina y noradrenalina [Leineweber *et. al.*, 2004]. Diferentes clases de receptores median los efectos de la adrenalina y noradrenalina. Los conocimientos modernos de los receptores adrenérgicos se basan, hoy en día, en los trabajos originales de Ahlquist, quien en 1948 demostró la existencia de dos clases de receptores adrenérgicos, a los que denominó α y β , en base a la potencia de agentes agonistas [Strosberg, 1993]. En



orden de potencia con que actúan los agonistas sobre ellos, los receptores α , son activados con mayor sensibilidad por la Noradrenalina, luego por la Adrenalina, y finalmente por el Isoproterenol. Los receptores β , por el contrario, son primeramente activados por el Isoproterenol, luego por Adrenalina, y finalmente con menos sensibilidad por la Noradrenalina [Arvydas, 2004].

Los receptores adrenérgicos beta (β ARs) pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G con 7 dominios transmembranales de 22 a 28 aminoácidos cada uno, con tres bucles extracelulares y tres intracelulares [Coman *et. al.*, 2009]. Actualmente se han descrito 3 isoformas de β ARs en mamíferos, β 1, 2, 3 [D. Sanz, 2011]. Las catecolaminas son el estímulo principal de los receptores adrenérgicos beta. Sin embargo, dicha afinidad varía según el tipo de receptor, así, la noradrenalina tiene mayor afinidad por los receptores β_1 y β_3 , mientras que en los receptores β_2 es la adrenalina la que tiene mayor afinidad hacia estos [Arvydas, 2004]. Estas diferencias en la afinidad de ligandos sobre alguna de las isoformas de receptores beta han conducido a la identificación o sugerencia de grupos funcionales específicos que favorezcan la selectividad de ligandos por cada uno de ellos, aumentado así su afinidad y potencia.

Los receptores β_1 se expresan en múltiples tejidos, siendo el corazón el órgano en que la expresión es predominante, la activación de estos receptores se asocia al efecto cronotrópico e ionotrópico positivo, los receptores β_2 de localización en músculo liso, al ser estimulados provocan vasodilatación, dilatación bronquial, y, por último los receptores β_3 principalmente se expresan en tejido adiposo blanco y marrón, aunque también se expresan en otros tejidos (cerebro, corazón, vejiga, músculo esquelético entre otros), su activación se asocia con lipólisis y termogénesis [Leineweber *et. al.*, 2004]. Este tipo de receptores comparten la misma vía de señalización favoreciendo un aumento del AMP cíclico (AMPC) y la consiguiente activación de la proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés). Posteriormente, PKA fosforila múltiples proteínas.

En estudios recientes, se ha demostrado la existencia de rutas alternativas o no clásicas de señalización donde la proteína que se activa es Gi. Así, los receptores

β_3 pueden acoplarse a proteínas Gs y Gi, dependiendo del tejido donde estén presentes van a ejercer efectos diferentes. En los adipocitos a través de las proteínas Gs activa la adenilato ciclasa que genera AMPc, éste activa a PKA y posteriormente fosforila y activa a la lipasa sensible hormonas (HSL, por sus siglas en inglés), que cataliza la hidrólisis de triglicéridos. Además la PKA estimula la expresión de la proteína desacoplante-1 (UCP1), una molécula mitocondrial implicada en la termogénesis (**Figura 1**), [D. Sanz, 2011]. La interacción de estas proteínas fosforiladas en la superficie culmina en la liberación de ácidos grasos libres y glicerol y su exportación a la circulación para ser consumidos como combustible en otros tejidos [Collins, 2012].

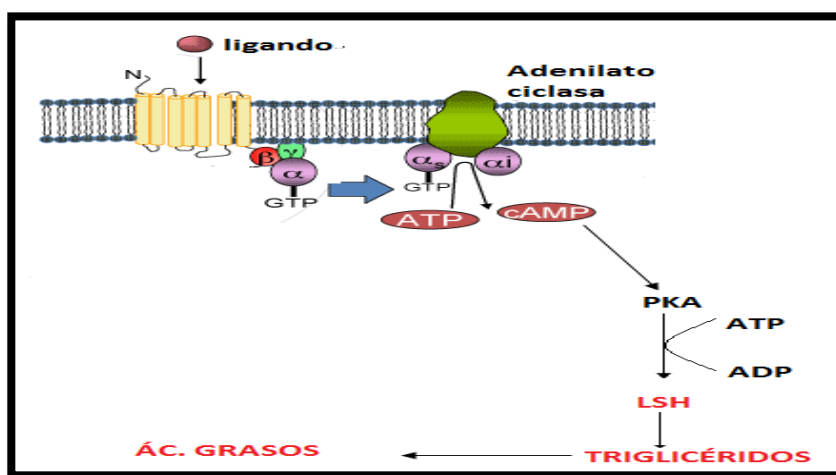


Figura 1. Vía de señalización de β_3 AR, enfocada al efecto que ejerce en el tejido adiposo. Al ser estimulado el receptor activa la proteína adenilato ciclasa que genera AMPc que a su vez activa a PKA y ésta fosforila a LSH que actúa sobre los triglicéridos.

1.3 Receptor adrenérgico β_3 (β_3 AR)

El β_3 AR contiene 396 aminoácidos (**Figura 2**), la porción amino-terminal es extracelular y está glicosilada. La homología estructural que existe entre los receptores β_3 y β_1 es 51%, entre los receptores β_3 y β_2 es 46% y entre los receptores β_1 y β_2 es de 54%. La homología del β_3 AR entre el humano, bovino, hámster, mono, cobayo, rata y ratón es considerablemente más alta (80-90%) que los demás subtipos de receptores beta. El enlace disulfuro entre el segundo y el

tercer bucle extracelular entre Cys110 y Cys189 es esencial para la actividad del receptor y para interactuar con los ligandos [Coman *et. al.*, 2009].

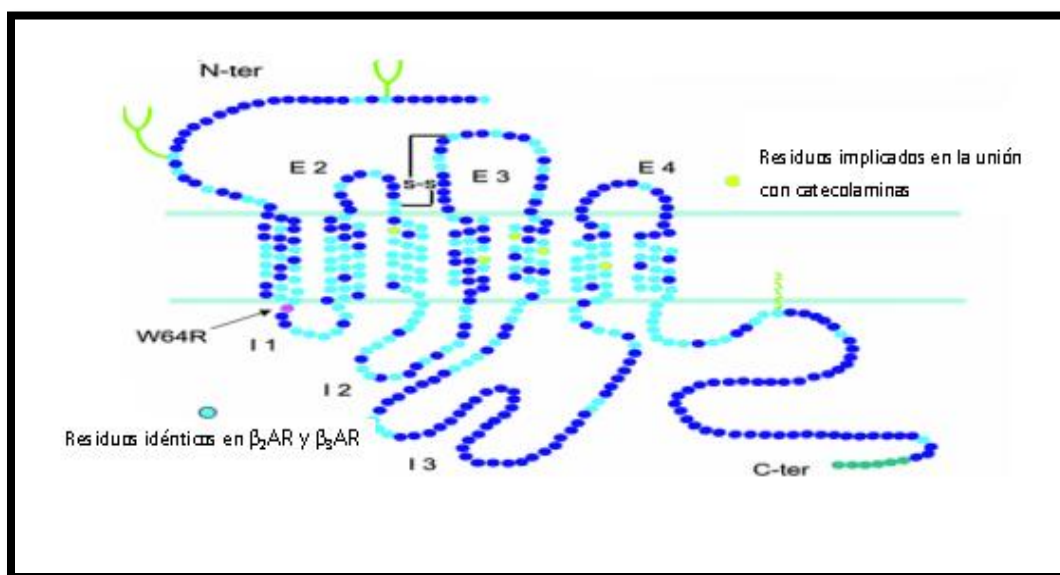


Figura 2. Estructura del receptor β_3 AR humano. En círculos color azul claro se observan los residuos de aminoácidos conservados entre β_2 AR y β_3 AR. En círculos color verde residuos de aminoácidos que están implicados en la unión con catecolaminas Coman *et. al.*, 2009

Además, los dominios transmembranales TM3, TM4, TM5 y TM6 son esenciales para la interacción con el ligando. Los dominios TM2 y TM7 están implicados en la activación de la proteína G y por lo tanto, la iniciación de un efecto. Los aminoácidos implicados fueron identificados por mutagénesis directa o de fotoafinidad. Estos aminoácidos fueron: Asp117 en TM3, Ser169 en TM4, y las posiciones 209 y 212 en TM5 y Phe309 en TM6 [Coman *et. al.*, 2009].

2. ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento del β_3 AR, varios laboratorios han participado en el desarrollo de agonistas adrenérgicos β_3 más potentes y con una mayor selectividad para el tratamiento de diversas enfermedades metabólicas, tales como la obesidad y diabetes mellitus tipo II. Desafortunadamente, los compuestos que se han sintetizado para producir efectos similares en los seres humanos, debido a la falta de selectividad y/o potencia, pobre farmacocinética y a las diferencias estructurales en humanos y modelos murinos con respecto a las



secuencias de aminoácidos de cada receptor [Harada *et. al.*, 2005; Mayurama *et. al.*, 2012]. Además de producir efectos adversos como, cardiovasculares, incluyendo una disminución de la resistencia periférica, un aumento de la frecuencia cardíaca y la vasodilatación periférica [Hom *et al.*, 2001].

En 1992 Cawthorne y colaboradores sintetizaron y evaluaron al compuesto BRL 35135, a través de su metabolito activo desesterificado BRL 37344 como un potente agonista del β_3 AR. Este compuesto produce un aumento dosis-dependiente en el gasto energético y como consecuencia pérdida de peso en ratones normales y en ratones genéticamente obesos. Esta pérdida de peso es del todo debido a la pérdida de grasa, y observaron que la masa muscular se conserva. En estudios en pacientes obesos y diabéticos, la administración del compuesto BRL 35135 a través de su metabolito activo generó en ellos mejoras producidas en la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, los estudios no fueron concluyentes y en algunos estudios se complicaron generando temblores (un efecto β_2) y taquicardia (un efecto β_1) (Cawthorne *et al.*, 1992).

En 2002, Bachman y colaboradores, realizaron experimentos para determinar la señalización de los receptores adrenérgicos beta inducidos por la dieta, utilizaron ratones silvestres como control y ratones knockout que carecían de los receptores β -adrenérgicos, observándose que los ratones modificados genotípicamente desarrollan obesidad leve, mientras que la administración de agonistas del β_3 AR provocan efectos potentes sobre la homeostasis de la energía por la supresión de la ingesta de alimentos, promueven la pérdida de grasa corporal, la oxidación de lípidos, mejoran la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa [Arch y Wilson, 1996; Granneman *et al.*, 2005; Lowell y Spiegelman, 2000; White *et al.*, 2004]. Específicamente, la activación del β_3 AR estimula la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP1), una molécula mitocondrial implicada en la termogénesis inducida por el frío, así como la termogénesis inducida por la dieta, por desacoplamiento de la cadena respiratoria en los adipocitos específicos tanto en



tejido adiposo marrón como en blanco [Himms-Hagen et al., 2000; Klein *et al.*, 2000; Lowell y Spiegelman, 2000].

En 2005 Harada y colaboradores sintetizaron diversos compuestos con estructura de ácido [3-[(2R)-[[2R)-(3-clorofenil)-2-hidroxi]amino]propil]-1H-indol-7-iloxi] acético como posibles fármacos potenciales para el tratamiento de obesidad y diabetes de tipo II. La administración oral repetida de uno de los compuestos sintetizados inhibió la ganancia de peso corporal y disminuyó significativamente la glucosa, la insulina, ácidos grasos libres, y las concentraciones de triglicéridos en plasma en ratones KK-A^y/Ta. Sobre la base de este perfil farmacológico, este compuesto entró en desarrollo clínico como un medicamento para el tratamiento de la diabetes tipo II y la obesidad, sin embargo, no tuvo trascendencia.

La mayoría de los agonistas que se han sintetizado comparten la estructura de ariletanolamina como el de las catecolaminas endógenas (adrenalina, noradrenalina, dopamina). Se ha proporcionado soporte para las interacciones del sitio de unión del β_3 AR con catecolaminas mediante estudios de relación-estructura actividad biológica. Las principales características químico-estructurales que deben de poseer las moléculas para que puedan interactuar con el β_3 AR son las siguientes [Perrone, 2011]:

- El alcohol secundario está involucrado en interacciones estereoespecíficas por puente de hidrogeno. Este sustituyente es importante pero no esencial, porque los compuestos que carecen de este hidroxilo como la dopamina conservan actividad sobre el β_3 AR.
- Los sustituyentes en el anillo aromático son también importantes y los dos hidroxilos del grupo catecol pueden ser reemplazados por otros grupos como halógenos, anillos aromáticos o con heteroátomos.
- El resultado de la adición de un carbono en la cadena de etanolamina que genera una propanolamina reduce la actividad sobre el receptor.
- Sustituyentes N-alquilo tienen un papel muy importante en la selectividad del receptor. La adrenalina tiene la misma potencia tanto para receptores

adrenérgicos α y β adrenérgicos, mientras que la noradrenalina tiene una mayor potencia para los receptores adrenérgicos α . El aumento de tamaño del sustituyente N-alquilo determina la pérdida de potencia por los receptores α y mejorado positivamente la potencia hacia los receptores β . La presencia de un grupo N-alquilo voluminoso aumenta la actividad sobre el β_3 AR.

En la siguiente figura se representan algunas de las estructuras de los agonistas de β_3 AR que se han sintetizados a lo largo del tiempo.

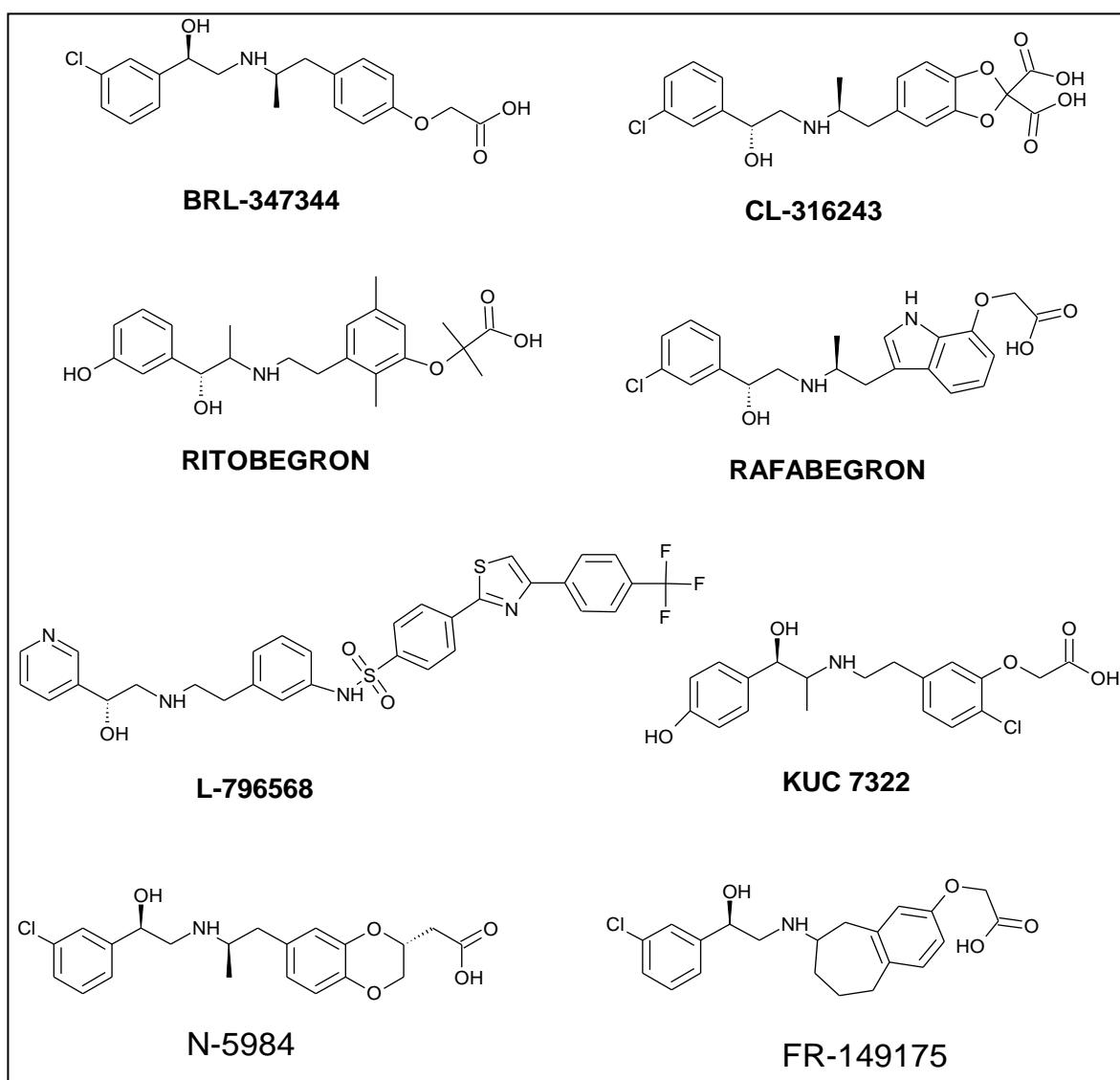


Figura 3. Compuestos sintetizados como agonistas de β_3 ARs

Además de lo antes mencionado, dentro del grupo de trabajo se ha estudiado el proceso de activación de los receptores beta adrenérgicos a partir de simulaciones por computadora basadas en datos estructurales obtenidos recientemente. Se han desarrollado boro-ariletanolaminas [Soriano-Ursúa *et al.*, 2009; 2010a; 2011] que interactúan con receptores a catecolaminas y los activan eficazmente debido a su capacidad de generar interacciones con residuos clave en la activación de receptores de siete dominios transmembranales [Kobilka, 2011; Soriano-Ursúa *et al.*, 2010b] (**Figura 4**).

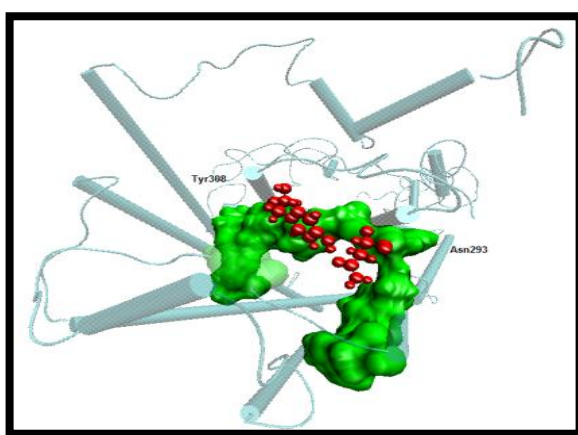


Figura 4. Vista de la porción extracelular del receptor adrenérgico β_2 en la que se marca el sitio de unión de las ariletanolaminas (en verde) y un par de aminoácidos involucrados en la selectividad de ligandos (en rojo). Tomado de: Soriano-Ursúa, *et al.*, 2010b.

Se ha evaluado la capacidad de relajación de músculo liso inducido por estos nuevos compuestos y comparado con sus precursores, mostrando que los boro-derivados presentan mayor potencia y eficacia que estos precursores [Soriano-Ursúa *et al.*, 2009; 2010^a].

También se han realizado estudios *in vitro* de unión y efecto del compuesto derivado de la feniletilamina llamado Isofea sobre el β_3 AR humano, y se ha demostrado que tiene actividad sobre células CHO-K1- β_3 AR en las que se ha confirmado la expresión del adrenoceptor β_3 humano. Los resultados de Isofea indicaron que se comportó como agonista parcial, con valores de E_{max} que correspondieron al $50 \pm 11\%$ del efecto del isoproterenol ($10 \mu\text{M}$, $316 \pm 21\%$ de la basal), [Datos no publicados].



La evaluación de la selectividad de estos compuestos sobre los receptores adrenérgicos y sus efectos en el metabolismo de lípidos y proteínas apoya la idea de su aplicación en trastornos del metabolismo y/o de la función de músculo liso. Su mecanismo de acción sería semejante al de fármacos conocidos que actúan como agonistas en el sistema adrenérgico, el que ha sido ampliamente estudiado. Gracias a ello, se conocen las características estructurales de compuestos con alta selectividad sobre los receptores adrenérgicos β_2 y β_3 [Roy y Saxena, 2011].

Las características farmacodinámicas y farmacocinéticas de estos nuevos compuestos nos permitirían presentarlas como compuestos con ventajas de aplicación a los trastornos de interés antes mencionados (trastornos del metabolismo o de la función del músculo liso). Estas ventajas consisten en: mayor selectividad, afinidad y eficacia sobre sus blancos, vida media de eliminación mayor a las de sus precursores, liberación de metabolitos activos sobre los mismos blancos terapéuticos, menor formación de metabolitos especialmente tóxicos (quinolonas). En otras palabras, el conseguir fármacos con alta afinidad, selectividad y actividad intrínseca sobre receptores β_2 y β_3 adrenérgicos nos permitirá favorecer la lipólisis, la síntesis proteica y relajación de músculo liso que pueden ser aplicadas para el tratamiento de padecimientos como obesidad, trastornos metabólicos y del músculo liso; todos estos efectos inferidos ocurrirán si la actividad intrínseca de estos compuestos es alta (y por tanto, se comportarían como agonistas).



3. JUSTIFICACIÓN

La obesidad, el sobrepeso y patologías relacionadas constituyen el principal problema de Salud Pública en México, lo que contribuye a un aumento de la morbilidad y la mortalidad. Entre los blancos terapéuticos para estas patologías haya el β_3 AR, debido a que es factible que mediante su estimulación se induzcan fenómenos fisiológicos que favorezcan la disminución de peso. Por tanto, la síntesis de nuevos compuestos agonistas del β_3 AR que posean afinidad, selectividad y actividad intrínseca sobre este tipo de receptores que a su vez activen la vía de lipólisis es un objetivo atractivo y que estos nuevos compuestos puedan ser aplicados para el tratamiento de estas enfermedades mediante regulación del peso corporal.

4. HIPÓTESIS

La adición de grupos voluminosos unidos al grupo amino de compuestos con estructura de arilamina les permitirán tener mayor afinidad y eficacia sobre β_3 ARs que compuestos disponibles actualmente. Esto estará relacionado con interacciones específicas de los ligandos sobre el receptor blanco e inducirá modulación del metabolismo lipídico en un modelo murino de obesidad.

5. OBJETIVOS

General

- Generar una serie de arilaminas con características químico-estructurales que les permitan interactuar con el β_3 AR, y evaluar su efecto sobre parámetros metabólicos en un modelo murino de obesidad.

Particulares

- Diseñar racionalmente arilaminas que sean capaces de interactuar con el receptor adrenérgico β_3 , mediante el uso de herramientas computacionales.



- Sintetizar los compuestos que tengan mayor afinidad y selectividad por el β_3 AR en los ensayos computacionales.
- Caracterizar los compuestos sintetizados mediante las técnicas de punto de fusión, cromatografía en capa fina, IR, espectrometría de masas, espectroscopia de RMN de ^{13}C y ^1H .
- Determinar la dosis letal 50 de los compuestos sintetizados por el método de Lorke. Esto con el fin de identificar efectos generales que puedan estar relacionados con una acción adrenérgica.
- Evaluar los efectos de los compuestos sintetizados sobre parámetros metabólicos (a través de la medición de los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos, además del peso total y grasa corporal de animales expuestos a dietas normo o hipercalóricas).



6. METODOLOGÍA

6.1 Simulaciones *in silico* de reconocimiento de compuestos propuestos sobre receptores adrenérgicos beta.

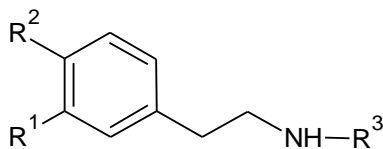
Construcción de ligandos. Los ligandos propuestos (**Tabla 1**) se construyeron mediante el software ChemSketch y convertidos a su forma tridimensional con el programa gráfico GaussView 5.0, en donde se prepararon las condiciones de optimización de geometría para encontrar el confórmero estructural más estable de cada molécula a un nivel de cálculo semiempírico con base AM1. Posteriormente se convirtieron a archivos con extensión *.pdb que son los necesarios para la configuración de los scripts del programa AutoDock Tools 4.2. Los parámetros usados en las simulaciones de docking para el átomo de boro en los compuestos propuestos fueron de acuerdo a lo descrito por Tafi, et al. (2005) y Tiwari et. al. (2009).

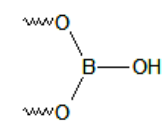
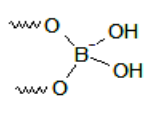
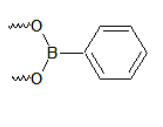
Estudio *in silico* de la interacción ligando- receptor. Una vez optimizados los ligandos propuestos, se llevó a cabo la simulación de interacción con el receptor β_3 AR, con una caja cúbica de GRID con dimensiones de 60 Å por lado centrada al C α del residuo Asp117 y se realizó la simulación de interacción para determinar la formación de los mejores complejos ligando-receptor, de acuerdo a la afinidad estimada en dichos complejo con el programa AutoDock Tools 4.2. Las interacciones ligando-receptor se visualizaron y analizaron en las figuras creadas por los software Autodock Tools 4.2, Discovery Studio 4.0 y PyMOL 1.6.x. Los criterios principales para el cernimiento fueron los valores menores de energía libre a la interacción de los complejos ligando-receptor y disposición espacial en la interacción de las 100 conformaciones con menor energía.

Paralelamente a la minimización de la geometría, se calcularon las propiedades moleculares de todas las estructuras propuestas (logP para el coeficiente de reparto, PSA para el área de superficie polar, nON para número de enlaces aceptores de H, nOHNH donadores de H, nrotb para número de enlaces rotables, por asociación estructural con fármacos reportados, mutagénesis, teratogénesis,

irritabilidad y efectos en la reproducción) en dos servidores en línea, Molinspiration y OSIRIS Property Explorer.

Tabla 1. Ligandos propuestos para estudiar la afinidad sobre el β_3 AR



| Compuesto | Sustituyentes | | |
|-----------|---|-----------------------|--|
| | R1 | R2 | R3 |
| 1 | OH | OH | (COOH)-O-(t-butil) |
| 2 | OH | OH | B(OH)-(C ₆ H ₅) |
| 3 | OH | OH | CHOH-(C ₆ H ₅) |
| 4 | OH | OH | CHOH-(C ₆ H ₄)-Cl |
| 5 | OH | OH | CHOH-(C ₆ H ₄)-Br |
| 6 | OH | OH | CHOH-(C ₆ H ₄)-F |
| 7 | O-B-(OH) ₂ | OH | CHOH-(C ₆ H ₅) |
| 8 | O-B-(OH) ₂ | OH | CHOH-(C ₆ H ₄)-Cl |
| 9 | O-B-(OH) ₂ | OH | CHOH-(C ₆ H ₄)-Br |
| 10 | O-B-(OH) ₂ | OH | CHOH-(C ₆ H ₄)-F |
| 11 | OH | O-B-(OH) ₂ | CHOH-(C ₆ H ₅) |
| 12 | OH | O-B-(OH) ₂ | CHOH-(C ₆ H ₄)-Cl |
| 13 | OH | O-B-(OH) ₂ | CHOH-(C ₆ H ₄)-Br |
| 14 | OH | O-B-(OH) ₂ | CHOH-(C ₆ H ₄)-F |
| 15 |  | | CHOH-(C ₆ H ₄)-H |
| 16 | | | CHOH-(C ₆ H ₄)-Cl |
| 17 | | | CHOH-(C ₆ H ₄)-Br |
| 18 | | | CHOH-(C ₆ H ₄)-F |
| 19 |  | | CHOH-(C ₆ H ₅) |
| 20 | | | CHOH-(C ₆ H ₄)-Cl |
| 21 | | | CHOH-(C ₆ H ₄)-Br |
| 22 | | | CHOH-(C ₆ H ₄)-F |
| 23 |  | | CHOH-(C ₆ H ₅) |
| 24 | | | CHOH-(C ₆ H ₄)-Cl |
| 25 | | | CHOH-(C ₆ H ₄)-Br |
| 26 | | | CHOH-(C ₆ H ₄)-F |
| 27 | H | H | C ₈ H ₆ |

6.2. Síntesis de los compuestos

De acuerdo con los resultados obtenidos del cernimiento realizado utilizando herramientas computacionales, considerando su constante de afinidad y su energía de enlace con el β_3 AR calculados. Se seleccionaron tres compuestos de la serie propuesta: compuesto 1 (Doprotec), compuesto 2 (Dop1) y compuesto 27 (Isofea), los dos primeros se sintetizaron utilizando como materia prima principal dopamina y el tercero con feniletilamina, en la **Figura 5** se representa la reacción general de síntesis de los compuestos propuestos.

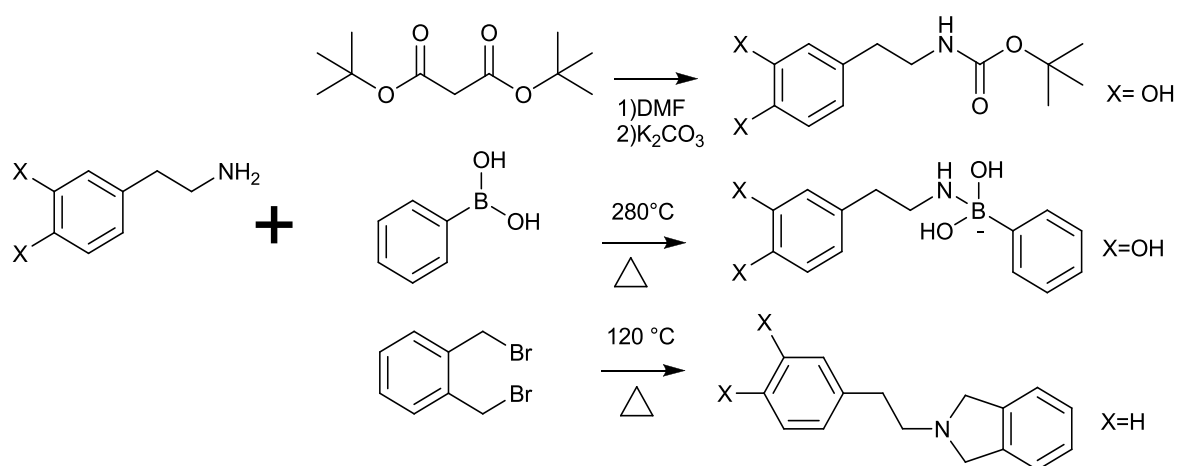


Figura 5. Reacción general de síntesis para derivados de arilaminas.

Síntesis de Ter-butil 3,4-dihidroxi(phenil)carbamato (Doprotec). En un matraz esférico se colocaron 500 mg de dopamina y una cantidad equimolar de carbonato de potasio, se adicionaron 5 mL de dimetilformamida (DMF), esta disolución se mantuvo en agitación durante 30 min en un baño de hielo. Posteriormente se adicionaron gota a gota 1.2 equivalentes de di-ter-butil dicarbonato (BOC), con agitación constante a temperatura ambiente durante 6 h. Transcurrido el tiempo se realizó una extracción con acetato de etilo y se adicionaron 15 mL de cloruro de metileno para precipitar al compuesto.

Síntesis de (3,4-dihidroxi(phenil)etilamino)dihidroxi(phenil)borato (Dop1). En un matraz esférico se colocaron 500 mg de dopamina, la cual se fundió a $280^\circ C$ en



baño de aceite, se mantuvo en agitación constante. Posteriormente se agregó la cantidad equimolar de ácido fenil borónico, esta reacción se mantuvo en el baño de aceite durante 10 s. El sólido obtenido se purificó con 10 mL acetato de etilo.

Síntesis de 2-(1-feniletíl)- 1,3-dihidroisonindolina (Isofea). En un matraz esférico de 50 mL se adicionaron 0.523 g de α,α' -dibromo-o-xileno y una cantidad equimolar de feniletilamina. Posteriormente se agitó durante 30 min a temperatura de 120°C. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC, finalmente se purificó por sonicación con 20 mL de acetato de etilo y acetona.

Caracterización fisicoquímica

Se llevaron a cabo una serie de pruebas para determinar las características fisicoquímicas de los 3 compuestos sintetizados:

Punto de fusión: Se determinó el punto de fusión (por triplicado) en un fusiómetro Electrothermal© modelo 9300.

Prueba de solubilidad: Fue evaluada con los siguientes disolventes: agua, acetona, acetato de etilo, cloroformo, metanol, etanol, hexano, dimetilsulfóxido (DMSO). En 8 tubos de ensayo se colocó en cada uno respectivamente 0.5 mL de los disolventes mencionados arriba y se agregó 2 mg del compuesto sintetizado. Se consideró soluble al producto que tras la agitación constante en un vórtex (50-60 Hz), por 30 s, resulte en una disolución homogénea.

Cromatografía en placa fina: Los compuestos se disolvieron en metanol y se colocó una muestra en placas de sílica gel 60 F254, 0.25 mm cuyas dimensiones fueron de 1 x 5 cm. Estas placas fueron sumergidas en una cámara de cromatografía que contenía la fase móvil correspondiente en cada caso. La visualización de las placas se llevó a cabo utilizando una lámpara UV con longitud de onda de 254 nm.

Infrarrojo: Se evaluaron materias primas (dopamina, ácido fenilborónico, feniletilamina y α,α' -dibromo-o-xileno) y los 3 compuestos sintetizados en el infrarrojo de la marca PerkinElmer modelo FT-IR Spectrometer Frontier.



Resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C : Para los compuestos sintetizados, se determinaron los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C a 300MHz en un espectroscopio JEOL GSX-270, utilizando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) en el caso de Doprotec, metanol deuterado (MetOH- d_1) para Dop1 y cloroformo deuterado (CDCl_3) para Isofea como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia.

6.3. Toxicidad aguda

Se determinó la dosis letal 50 (DL_{50}) de los 3 compuestos por el método de Lorke (1981), en dos fases:

Se utilizaron 3 ratones macho CD1 de 25-30g de peso para cada lote, se mantuvieron en sus jaulas durante al menos 5 días antes de la dosificación para su aclimatación con libre acceso a comida y agua. El alimento se retiró 24 h antes de comenzar el experimento y se suministró 3 h después de las administraciones.

Fase I: Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 lotes experimentales, con 3 animales cada uno:

Lote 1: 10 mg/kg; Lote 2: 100 mg/kg ; Lote 3: 1000 mg/kg

Los compuestos se administraron por vía oral; se mantuvieron en observación durante las primeras 6 h después de la administración. La mortalidad se cuantificó durante 15 días.

Fase II: De acuerdo con los resultados que se obtuvieron de cada compuesto en la primera fase, se propusieron nuevas dosis para la segunda fase. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 lotes, con 1 animal cada uno. Los compuestos se administraron por vía oral; se mantuvieron en observación durante las primeras 6 h después de la administración. La mortalidad se cuantificó durante 15 días. Los resultados obtenidos fueron valorados como DL_{50} estimándose a partir de la media geométrica.



6.4. Evaluación en un modelo murino de obesidad

Evaluación en el control de la obesidad con la administración de los compuestos sintetizados sobre el peso corporal y lipidemia en ratones. Para esto se empleó el protocolo previamente descrito por Xiang et al., 2010, se utilizaron ratones macho de 15-20 g de peso (N=88) de la cepa C57BL/6 los cuales se dividieron en 11 grupos (8 animales cada uno) con regímenes alimentarios y tratamientos:

Dieta normal: 22% proteínas/ 59% carbohidratos/ 4% grasa, 15% otros; 3.43 Kcal/g

Dieta hipercalórica: 20% proteínas/ 50% carbohidratos/ 30% grasa; 4.49 Kcal/g

- 1) Dieta normal y tratado con vehículo
- 2-4) Dieta normal y tratado con cantidad equimolar a BRL37344 de Clobenzorex, Doprotec y Dop1
- 5) Dieta hipercalórica y tratado con vehículo.
- 6) Dieta hipercalórica y tratado con BRL 37344, 10 mg/kg/d
- 7) Dieta hipercalórica y tratado con Clobenzorex, 10 mg/kg/d
- 8-10) Dieta hipercalórica y tratado con cantidad equimolar a BRL 37344 de Doprotec, Dop1, Isofea.
- 11) Dieta hipercalórica y tratado con propranolol más Doprotec(10 mg/kg/d).

El peso de cada ratón fue registrado cada semana y al término del estudio. Las dietas tuvieron una duración de doce semanas. Posterior a esto se administraron por vía oral los compuestos sintetizados (Doprotec, Dop1 e Isofea) y los compuestos de referencia (BRL37344 y Clobenzorex), se mantuvo el régimen alimentario y tratamiento por cuatro semanas.

Semanalmente se extrajo sangre periférica de los ratones, mediante un corte distal de la cola (con previa analgesia de la zona) y se colocaron 2 gotas en el instrumento Accutrend Plus de la marca Roche para medir los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol total. Al final del tratamiento los animales fueron sacrificados y se extrajo la grasa corporal total de cada ratón. El porcentaje de grasa corporal fue calculado por la razón: (grasa corporal total/peso corporal final) x 100.

7. RESULTADOS

7.1. Simulaciones *in silico* de reconocimiento de compuestos propuestos sobre β_3 AR.

Construcción de ligandos. Se representaron tridimensionalmente y optimizaron energéticamente con el programa Gaussian 09 una serie de 26 ligandos propuestos a los que se les agregaron diferentes grupos funcionales como lo son: anillos aromáticos, grupos carbonilo, boro derivados y cadenas alifáticas.

Simulación *in silico* de la interacción ligando- receptor. Los ligandos se optimizaron para obtener la mínima energía, y se llevó a cabo la simulación de interacción con el β_3 AR con el programa AutoDock Tools 4.2. Los resultados de afinidad del acoplamiento ligando-receptor expresados por el PK_D se representan en la **Figura 6**, donde se puede observar que los ligandos etiquetados como 6, 8, 9, 10, 11, Clobenzorex, Isofeea y Doprotec tienen una mayor afinidad por el receptor.

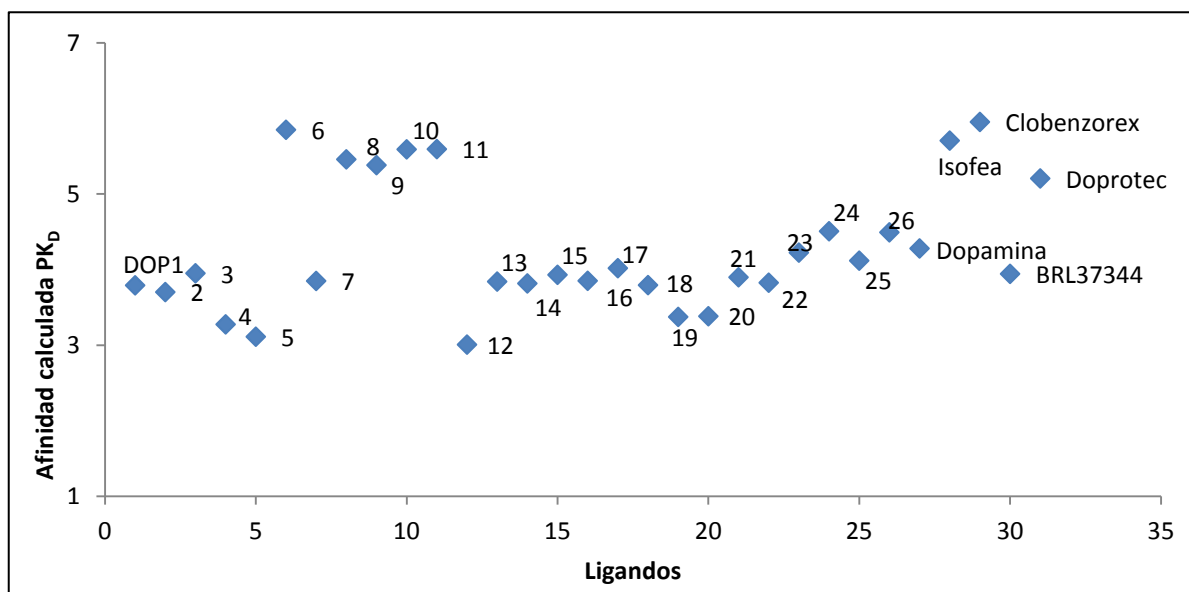


Figura 6. Valores de afinidad calculada de los ligandos propuestos.

La visualización de la interacción ligando-receptor se realizó con los programas Discovery Studio 4.0 y PyMOL 1.6.x. Los residuos de aminoácidos del β_3 AR en común que interaccionan con los ligandos propuestos con más afinidad son:

Val118, Asp117, Phe198, Phe308 y Asn332. Un ejemplo es representado en la **Figura 7**, del ligando Doprotec en el que se pueden observar las interacciones con residuos de aminoácidos del β_3 AR.

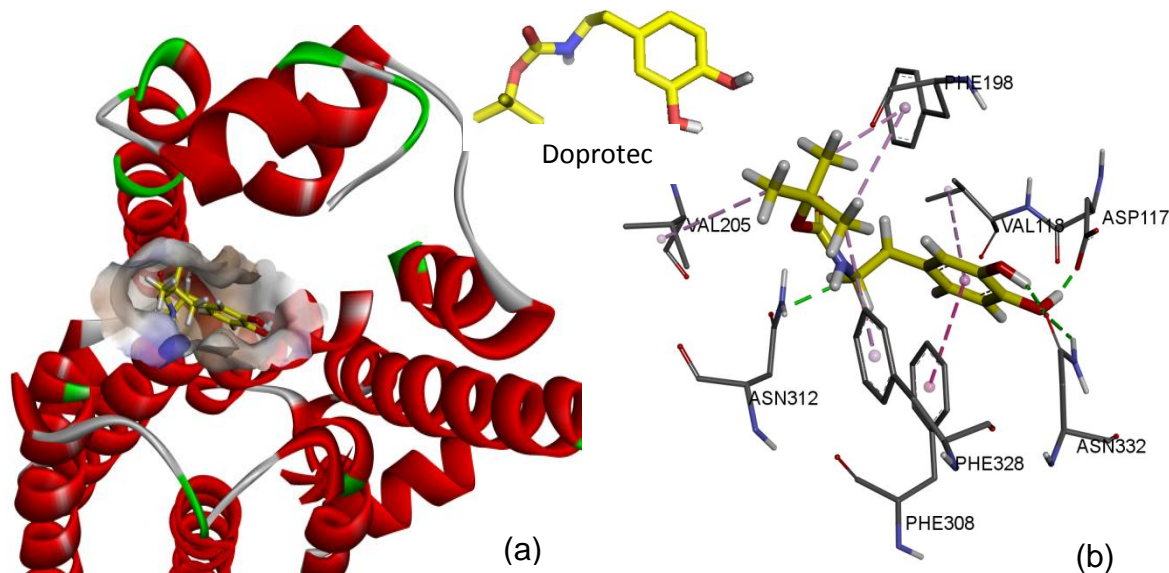


Figura 7. a) Complejo molecular entre el β_3 AR y Doprotec; b) Residuos de aminoácidos del β_3 AR que interactúan con el ligando Doprotec (amarillo).

Los valores de ΔG kcal/mol calculados por el programa Autodock tools 4.2. se muestran en la **Tabla 2**, se eligieron los ligandos que presentaban una menor energía de unión:

Tabla 2. Energía libre (ΔG kcal/mol) de los ligando propuestos sobre el β_3 AR

| Compuesto | Doprotec | Dop1 | 9 | 10 | 11 | Isofea | BRL37344 |
|------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|--------|----------|
| ΔG kcal/mol | -7.1 | -5.17 | -5.38 | -5.59 | -5.60 | -4.75 | -3.94 |

Las propiedades moleculares de las estructuras propuestas se calcularon con dos servidores en línea, Molinspiration y OSIRIS Property Explorer y se presentan en la **Tabla 3**, (logP) para el coeficiente de reparto, (PSA) para el área de superficie polar, (nON) para número de enlaces aceptores de H, (nOHNH) donadores de H, (nrotb) para número de enlaces rotables, por asociación estructural con fármacos reportados, (M) mutagénesis, (T) teratogénesis, (I) irritabilidad y (ER) efectos en la reproducción.



Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas calculadas con los servidores en línea

| Compuesto | logP (<5) | TPSA(<120) | noN (<10) | noHNNH(<5) | nrotb (<10) | M | T | I | ER |
|-----------------|--------------|------------|--------------|------------|----------------|----|----|-------|-------|
| Doprotec | 1.97 | 78.79 | 5 | 3 | 5 | No | No | No | No |
| Dop1 | 1.21 | 92.9 | 5 | 5 | 5 | No | No | Medio | No |
| 9 | 2.17 | 102.173 | 6 | 5 | 7 | No | No | Medio | No |
| 10 | 2.78 | 102.173 | 6 | 5 | 7 | No | No | Medio | No |
| 11 | 0.131 | 102.173 | 6 | 5 | 7 | No | No | Medio | Medio |
| Isofea | 3.13 | 3.24 | 1 | 0 | 3 | No | No | No | No |
| BRL37344 | 2.99 | 78.79 | 5 | 3 | 8 | No | No | No | No |

7.2. Síntesis química de los compuestos propuestos seleccionados

De acuerdo a los resultados obtenidos del estudio teórico del acoplamiento ligando-receptor utilizando herramientas computacionales, fueron seleccionados tres compuestos, el primero (Doprotec) con un grupo voluminoso presente en el grupo amino y el segundo (Dop1) con boro derivado del ácido fenil borónico, estos dos compuestos son derivados de dopamina, y el tercero (Isofea) también presenta un grupo voluminoso formando una isoindolina y es un derivado de feniletilamina el cual no presenta el grupo catecol en su estructura. Se procedió a buscar las condiciones adecuadas que permitieran la síntesis de los compuestos propuestos con un buen rendimiento y alta pureza.

La síntesis de Doprotec se llevó a cabo en medio básico, utilizando como materias primas clorhidrato de dopamina y BOC. Se utilizaron 5 mL de DMF para disolver 500 mg de dopamina, la reacción se realizó a temperatura ambiente durante 6 h con agitación constante. La dopamina protegida disuelta en DMF se extrajo con 20 mL de acetato de etilo y se hicieron 3 lavados de 10 mL cada uno con agua destilada.

La cinética de la reacción se monitoreó por TLC utilizando como fase móvil acetato de etilo/hexano (50:50), observándose un R_f de 1.5. Se obtuvo un polvo blanco



con punto de fusión de 230 °C, soluble en acetato de etilo, acetona, metanol y DMSO, el rendimiento de la reacción fue de 97% (**Tabla 4**).

La síntesis del derivado de boro (Dop1) se realizó sin disolventes, utilizando clorhidrato de dopamina y ácido fenilborónico, a una temperatura de 280°C en baño de aceite. La cinética de reacción se monitorio por TLC utilizando acetona como fase móvil, el Rf de la reacción fue de 0.2. Se obtuvo un polvo blanco con punto de fusión de 344°C, soluble en agua, metanol y DMSO, el rendimiento de la reacción fue de 74%.

Del mismo modo se realizó la síntesis para obtener el compuesto llamado Isofea (libre de solventes), las modificaciones que se realizaron fueron la temperatura a 120°C, y el tiempo de reacción (30 min), el rendimiento fue del 96%, los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Datos generales de los compuestos sintetizados.

| Compuesto | Características Físicas | Soluble | Punto de fusión °C | Rendimiento % |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------|---------------|
| DOPROTEC | Polvo blanco | MetOH,DMSO, Acetona, AceOEt | 230±2 | 97 |
| DOP1 | Polvo blanco | MetOH,DMSO | 344±2 | 74 |
| ISOFEA | Polvo blanco | H ₂ O, MetOH, DMSO | 191±2 | 96 |

Caracterización espectroscópica. En las **tablas 5, 6 y 7** se muestran los resultados obtenidos de las pruebas espectroscópicas que se realizaron a los compuestos sintetizados: infrarrojo, resonancia magnética nuclear de ¹H y resonancia magnética nuclear de ¹³C, los espectros de cada técnica se muestran en el anexo A (Figura 8-16).

La espectroscopia de infrarrojo se obtuvo de manera directa colocando la muestra directamente en el equipo marca PerkinElmer modelo FT-IR Spectrometer Frontier. Las bandas más representativas en los espectros que indican la

formación del producto Doprotec son en 1676.5 cm^{-1} (C=O) y 1609 cm^{-1} (NH) que indican la formación del carbamato (**Anexo A, Figura 8**) y en el caso de Dop1 la banda más representativa es el enlace B-N que aparece en 1435 cm^{-1} , y la banda en 3580 cm^{-1} que nos indica la presencia de hidroxilos del grupo catecol (**Anexo A Figura 11**). El caso de Isofea al ser una amina terciaria no se observan bandas en el intervalo de $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ [Pretsch, 2009], la banda en 2546 cm^{-1} nos indica que se formó el bromhidrato, esto aunado a la banda en 1391 cm^{-1} que pertenece al enlace C-N (**Anexo A, Figura 14**).

En los ensayos de resonancia magnética de ^1H y ^{13}C se utilizó dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) para el compuesto Doprotec, metanol deuterado (MetOH- d_4) para Dop1 y cloroformo deuterado (CDCl_3) para Isofea como disolventes. Las señales obtenidas en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C para los tres compuestos correspondieron a las estructuras propuestas (**Tablas: 3, 4, 5 y Figuras 9, 10, 12, 13, 15 y 16 del anexo A**).

Tabla 5. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto Doprotec.

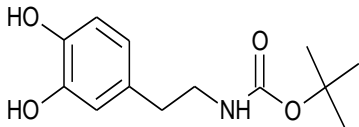
| Doprotec | |
|--|--|
|  | |
| IR | 3488 cm^{-1} (OH); 3377 cm^{-1} (NH); 3123 cm^{-1} (C-H sp ²), 2900 cm^{-1} (C-sp ³), 1676.5 cm^{-1} (C=O), 1609 cm^{-1} (NH). |
| ^1H RMN (DMSO-d_6) | δ (ppm): 1.37 (9H, s), 2.5(2H, m), 3.02 (2H, q), 6.41 (1H, dd), 6.55 (1H, d), 6.62 (1H, d), 6.79 (1H, t), 8.76 (2H, d). |
| ^{13}C RMN (DMSO-d_6) | δ (ppm) 28.74, 35.49, 42.43, 77.69, 115.9, 116.4, 119.6, 130.6, 143.9, 145.4, 155.9. |

Tabla 6. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto Dop1

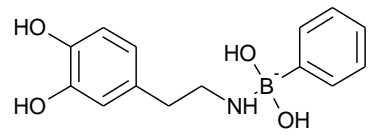
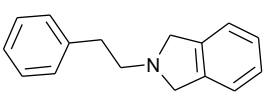
| Dop1 | |
|---|---|
|  | |
| IR | 3580 cm^{-1} (OH); 3012 cm^{-1} (C-H sp ²), 2920 cm^{-1} (C-H sp ³), 2085 cm^{-1} (NH ²⁺); 1632 cm^{-1} (C=C), 1592.7 cm^{-1} (NH ²⁺); 1435 cm^{-1} (B-N). |
| ^1H RMN (MetOH- <i>d</i> ₄) | δ (ppm): 2.73 (2H,t), 2.95(2H, t), 4.93 (4H, s), 6.38 (1H, dd), 6.48 (1H, d), 6.5 (1H, d), 7.1 (1H, m), 7.18 (1H, m), 7.53 (1H, dd). |
| ^{13}C RMN (MetOH- <i>d</i> ₄) | δ (ppm) 33.28, 41.18, 107.68, 108.22, 117.59, 125.26, 125.58, 126.47, 131.31, 151.7, 152.9. |

Tabla 7. Resultados espectroscópicos (infrarrojo, resonancia magnética de ^1H y resonancia magnética de ^{13}C) del compuesto Isofea.

| Isofea | |
|---|--|
|  | |
| IR | 3031 cm^{-1} (C-H,sp ²), 2908 cm^{-1} (C-H, sp ³), 2546 cm^{-1} (NH ⁺), 1600 cm^{-1} (C=C), 1427 cm^{-1} (CH ₂), 1391 cm^{-1} (C-N). |
| ^1H RMN (CDCl ₃) | δ (ppm): δ 2.85 (t, H-11), 3.65 (t, H-10), 4.72 (dd, H-1,3), 7.36 (m, H-4,-7,13-17). |
| ^{13}C RMN (CDCl ₃) | δ (ppm) 58.4, 123.5, 127.4, 137.9, 55.4, 33.5, 134.9, 129.2, 127.5. |



7.3. Determinación de dosis letal 50 (DL₅₀)

Una vez sintetizados los compuestos, purificados y caracterizados fisicoquímicamente se realizó la determinación de la DL₅₀. Se utilizaron 3 ratones machos de la cepa CD1 de 25-30 g de peso para cada lote en la primera fase y un ratón por lote para la segunda fase. Para iniciar la prueba se retiró el alimento 24 h antes de comenzar el experimento. Los resultados se muestran en las **tablas 8, 9 Y 10**.

Tabla 8. Estimación de la DL₅₀ para la molécula Doprotec por el método de Lorke.

| Compuesto | FASE I | | FASE II | |
|---------------------------------------|---------------|------------|---------------|------------|
| | Dosis (mg/kg) | Mortalidad | Dosis (mg/kg) | Mortalidad |
| DOPROTEC | 10 | 0/3 | 10 | 0/3 |
| | 100 | 0/3 | 100 | 0/3 |
| | 1000 | 0/3 | 1000 | 0/3 |
| | | | 1300 | 0/1 |
| | | | 1600 | 0/1 |
| | | | 1900 | 0/1 |
| DL₅₀ >1900 mg/kg | | | | |

Tabla 9. Estimación de la DL₅₀ para la molécula Dop1 por el método de Lorke.

| Compuesto | FASE I | | FASE II | |
|---------------------------------------|---------------|------------|---------------|------------|
| | Dosis (mg/kg) | Mortalidad | Dosis (mg/kg) | Mortalidad |
| DOP1 | 10 | 0/3 | 10 | 0/3 |
| | 100 | 0/3 | 100 | 0/3 |
| | 1000 | 0/3 | 800 | 0/3 |
| | | | 1000 | 0/3 |
| | | | 1200 | 0/1 |
| | | | 1400 | 0/1 |
| DL₅₀ >1400 mg/kg | | | | |



Tabla 10. Estimación de la DL₅₀ para la molécula Isofea por el método de Lorke.

| Compuesto | FASE I | | FASE II | |
|----------------------------------|---------------|------------|---------------|------------|
| | Dosis (mg/kg) | Mortalidad | Dosis (mg/kg) | Mortalidad |
| ISOFEA | 10 | 0/3 | 10 | 0/3 |
| | 100 | 0/3 | 100 | 0/3 |
| | 1000 | 2/3 | 500 | 0/1 |
| | | | 800 | 0/3 |
| | | | 1000 | 2/3 |
| | | | 1200 | 1/1 |
| DL₅₀ 986 mg/kg | | | | |

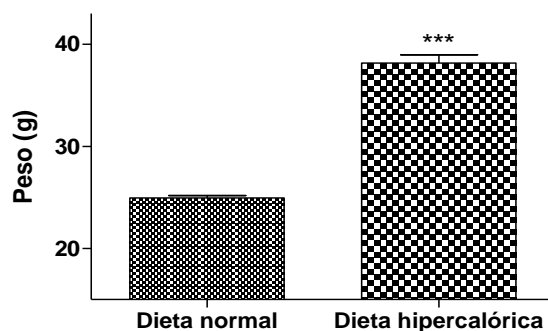
La administración de los compuestos Doprotec y Dop1 no causó muerte en ninguna de las fases del ensayo, mientras que el compuesto Isofea a dosis de 1000 y 1200 mg/kg de peso generó muerte en los ratones.

Para el compuesto Doprotec se estimó una DL₅₀ > 1900 mg/kg, el compuesto Dop1 una DL₅₀ > 1400 mg/kg y para el compuesto Isofea una DL₅₀ en 800 los cuales se clasifican como nocivos según los criterios de clasificación de toxicidad (Globally Harmonized System, GHS), y de acuerdo al trabajo original de Lorke se considera de baja toxicidad. Se llevaron a cabo las observaciones correspondientes a las diferentes dosis administradas. El compuesto Isofea a dosis de 100 y 500 mg/kg los ratones mostraron hiperactividad, piloerección y aumento de agresividad, dichos efectos disminuyeron a las 2 h después de la administración. Para la dosis de 800, 1000 y 1200 mg/kg se presentó la muerte después de 5 min en los cuales los ratones presentaron temblores incontrolables, piloerección y nerviosismo (estimados mediante determinación de la actividad motora espontánea), siendo sólo este último efecto el que pudiera estar relacionado directamente a acción adrenérgica. La observación macroscópica de los órganos de los ratones administrados con los diferentes compuestos mostró que no existe daño macroscópico en el hígado, riñón, corazón ni cerebro en ninguna de las dosis administradas.

7.4. Modelo murino de obesidad

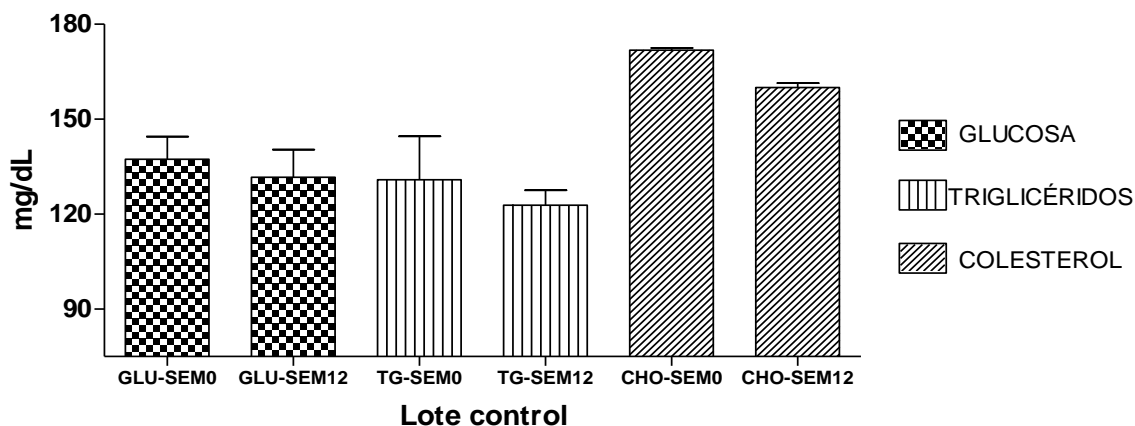
Efecto de la dieta en el peso corporal de ratones macho de la cepa C57BL/6.

Se sometieron a dieta normal o hipercalórica ratones macho (n=90) de la cepa C57BL/6 de 2 a 3 semanas de edad que fueron adquiridos desde Harlan de México, distribuidos en 10 grupos. La dieta tuvo una duración de doce semanas. En la **gráfica 1** se representan a los grupos de ratones expuestos a dieta normal e hipercalórica, los resultados indican una diferencia significativa en el peso corporal de los ratones que fueron sometidos a las distintas dietas durante 12 semanas.



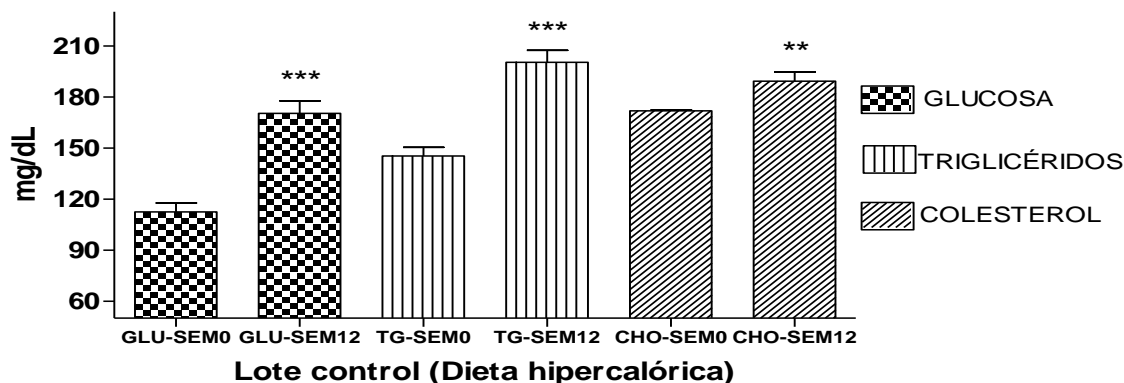
Gráfica 1. Efecto de la dieta (normal e hipercalórica) durante 12 semanas en el peso corporal de ratones C57BL6. T de student, *** P<0.001. Los valores son las medias \pm ESM.

Efecto de la dieta en la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol total en sangre de ratones macho de la cepa C57BL/6. Las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre se midieron en ratones con dieta normal e hipercalórica. En los resultados obtenidos (**Gráfica 2**) se observa que no existe diferencia significativa en las concentraciones de los parámetros metabólicos medidos en ratones con dieta normal durante doce semanas. De acuerdo a estos resultados se establecieron valores de referencia con el grupo control: glucosa 134.5 mg/dL, triglicéridos 121.25 mg/dL y colesterol 160.6 mg/dL.



Gráfica 2. Efecto de la dieta normal en ratones macho de la cepa C57BL6 sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol total en sangre. Los valores son las medias \pm ESM. * $P < 0.05$.

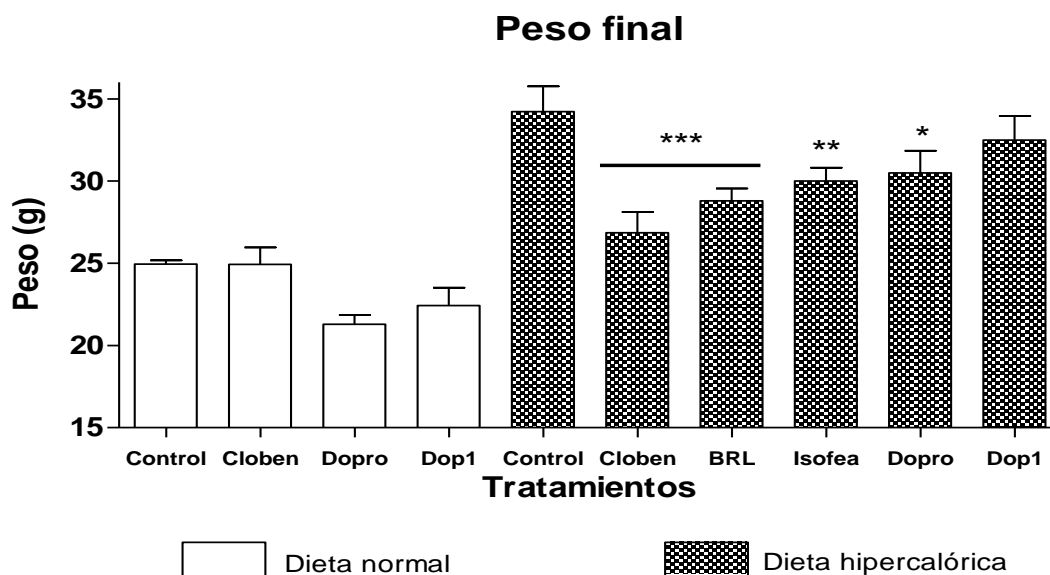
En cambio los ratones que fueron sometidos a una dieta hipercalórica mostraron una diferencia significativa en los parámetros metabólicos medidos (glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre). Ver **gráfica 3**.



Gráfica 3. Efecto de la dieta hipercalórica en ratones macho de la cepa C57BL6 sobre los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol total en sangre. Los valores son las medias \pm ESM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Efecto de la administración de compuestos a ratones expuestos a dietas normal e hipercalórica. Se administraron diferentes tratamientos (Doprotec, Dop1, Isofea, BRL37344 y Clobenzorex) durante 4 semanas a ratones de la cepa C57BL/6 expuestos a dieta normal o hipercalórica y se midió el efecto del tratamiento sobre el peso corporal de los ratones, estos resultados se muestran en

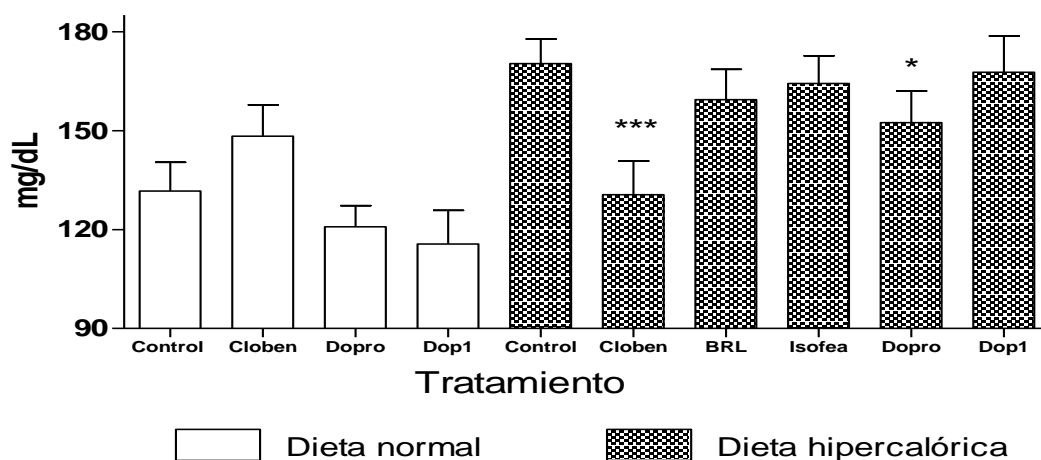
la **Gráfica 4**. Los compuestos BRL347344 e Isofea solo se administraron a ratones expuestos a dieta hipercalórica. En los resultados se observa una disminución significativa del peso corporal en ratones expuestos a dieta hipercalórica y que fueron tratados con Doprotec, Isofea, Clobenzorex y BRL347344 agonista del β_3 AR. Mientras que la administración de Dop1 no generó disminución significativa en el peso corporal. Los ratones con dieta normal, y administrados con los diferentes tratamientos no mostraron diferencia significativa en el peso corporal.



Gráfica 4. Comparación de peso al final de diferentes tratamientos. Efecto del tratamiento durante 4 semanas en el peso de ratones C57BL6. Prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas, Los valores son las medias \pm ESM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.

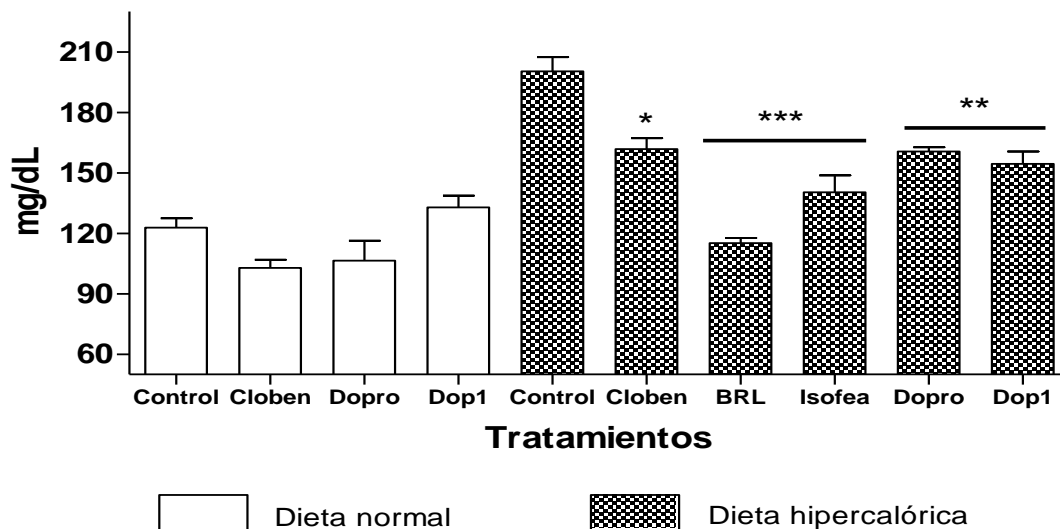
Efecto de la administración de compuestos en la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol total en sangre de ratones macho de la cepa C57BL/6 con dietas normal o hipercalóricas. Las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol se midieron semanalmente utilizando el equipo accutrend Plus de la marca Roche, la sangre que se utilizó se extrajo de la punta de la cola de los ratones con ayuno de 4 h. Los resultados se observan en las **gráficas 5, 6 y 7**. La administración de Doprotec o Clobenzorex disminuyen significativamente los tres parámetros metabólicos medidos en ratones con una dieta hipercalórica.

Glucosa final

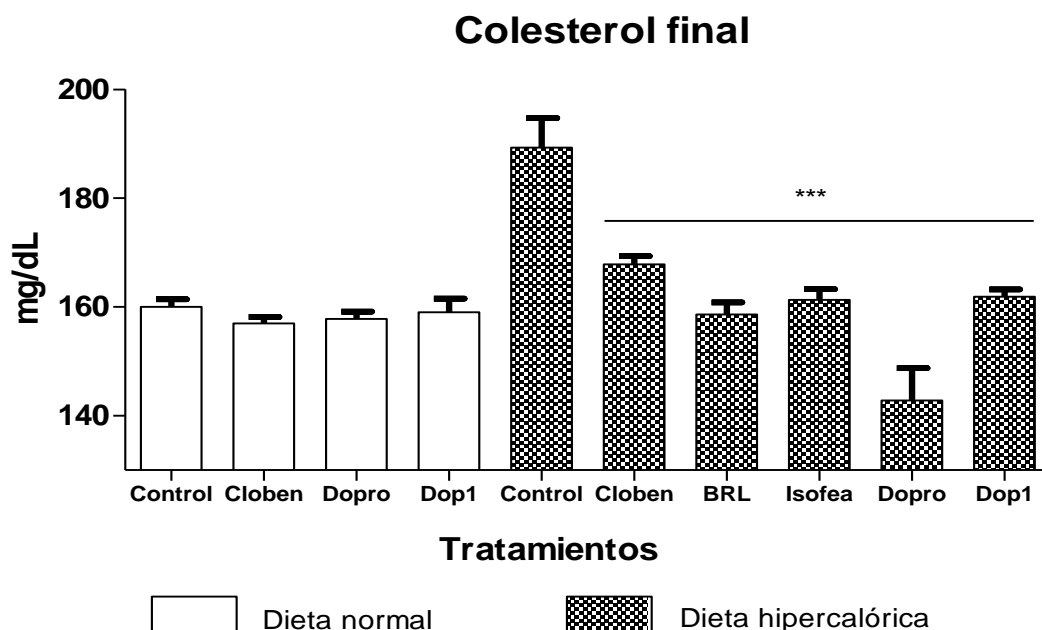


Gráfica 5. Comparación de la concentración de glucosa en sangre al final de los tratamientos. Efecto del tratamiento durante 4 semanas en la concentración de glucosa en sangre de ratones C57BL6. Prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas, Los valores son las medias \pm ESM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.

Triglicéridos final



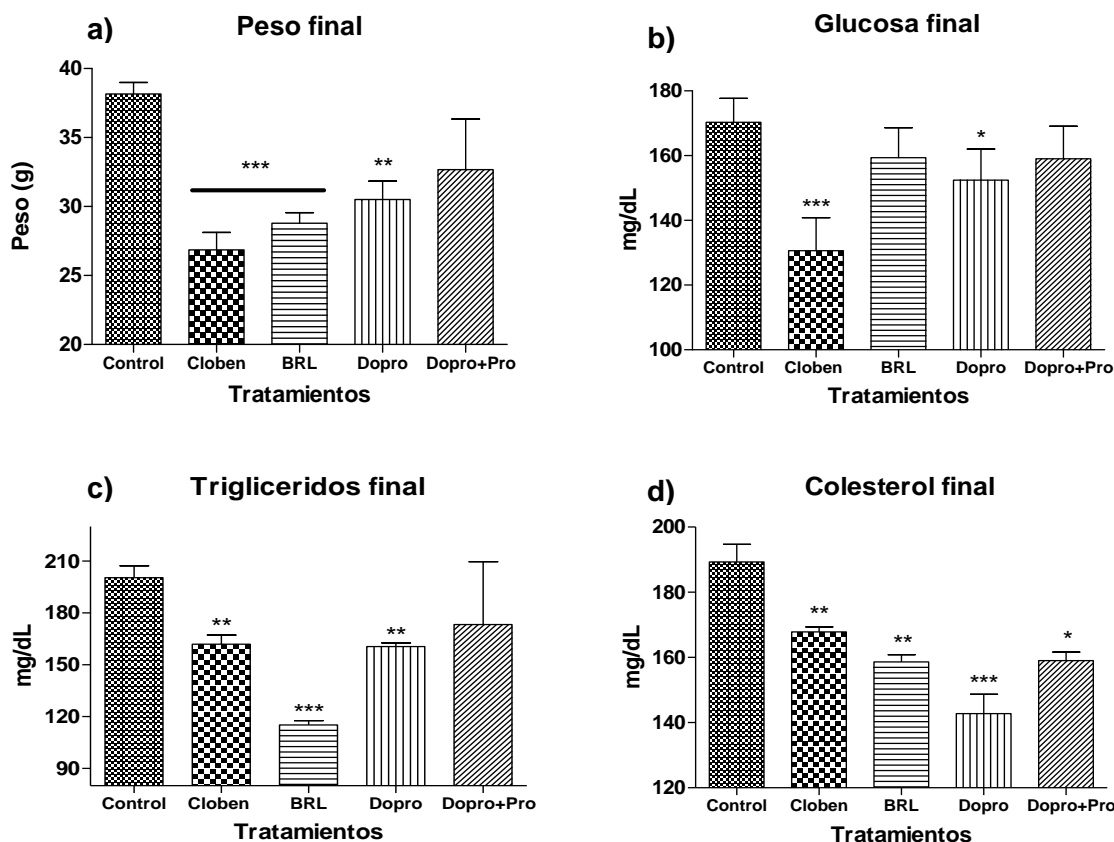
Gráfica 6. Comparación de la concentración de triglicéridos en sangre al final de los tratamientos. Efecto del tratamiento durante 4 semanas en la concentración de triglicéridos en sangre de ratones C57BL6. Prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas, Los valores son las medias \pm ESM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.



Gráfica 7. Comparación de la concentración de colesterol en sangre al final de los tratamientos. Efecto del tratamiento durante 4 semanas en la concentración de colesterol en sangre de ratones C57BL6. Prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas, Los valores son las medias \pm ESM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.

La administración de Dop1, Isofea o BRL37344 solo generan disminución significativa en la concentración de triglicéridos y colesterol en sangre de ratones con dieta hipercalórica. El agonista de β_3 AR genera una disminución mayor en los niveles de triglicéridos con una $P < 0.0001$. No se observó ningún cambio significativo en los tres parámetros metabólicos medidos en los ratones que tienen una dieta normal y que fueron administrados con los diferentes tratamientos.

Efecto de la administración de propranolol y doprotec en el peso corporal y concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol total en sangre de ratones macho de la cepa C57BL/6 con dieta hipercalórica. En este experimento se administró primero propranolol en una dosis de 10mg/kg de peso por vía oral a ratones con dieta hipercalórica, transcurridos 30 min se administró Doprotec por vía oral a una dosis de 10 mg/kg de peso, el tratamiento tuvo una duración de 3 semanas. Cada semana se midió el peso corporal, glucosa, colesterol y triglicéridos. Los resultados se muestran en la **gráfica 8**.

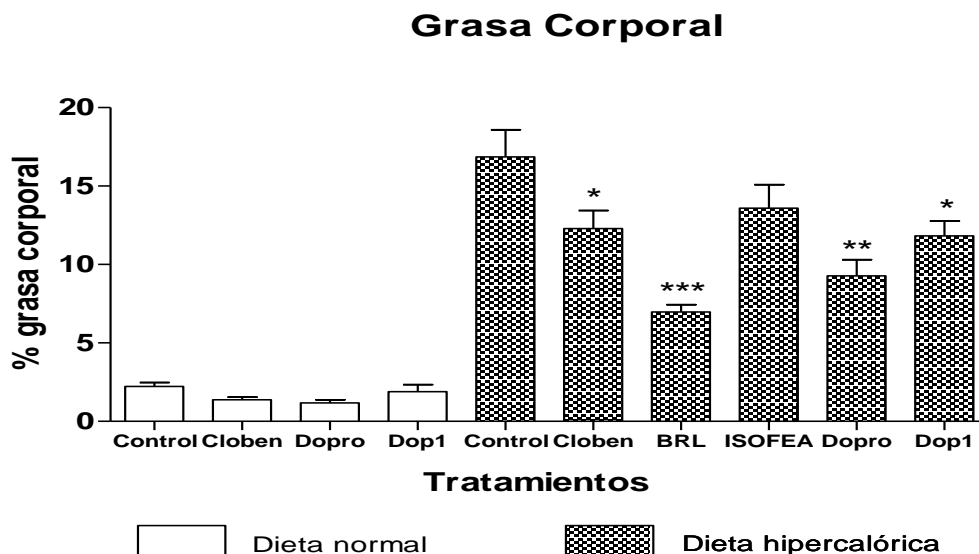


Gráfica 8 . Efecto de la administración de Propranolol + Doprotec en ratones macho C57BL6 sometidos a dieta hipercalórica. a) peso corporal. b) concentración de glucosa en sangre, c) concentración de triglicéridos en sangre, d) concentración de colesterol total en sangre. ANOVA de una vía, Los valores son las medias \pm ESM. * $P < 0.05$.

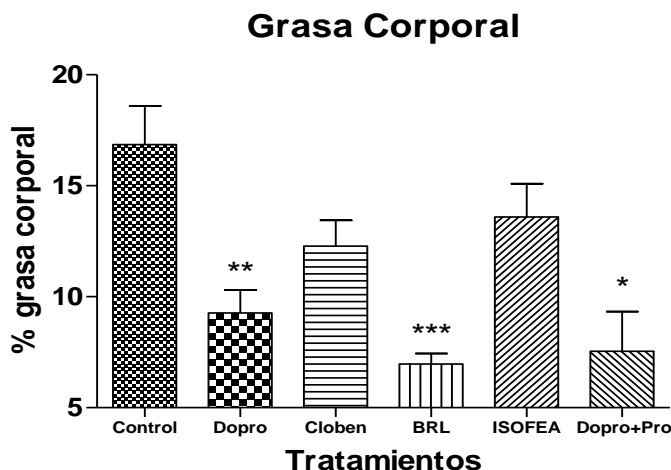
En las gráficas se observa que la administración de propranolol no genera cambios significativos en el peso corporal, glucosa, triglicéridos y colesterol durante las tres semanas de administración, esto en comparación con el grupo control. En cambio Doprotec genera un cambio significativo en los parámetros medidos (Peso corporal, glucosa, triglicéridos, colesterol). No existe una diferencia significativa entre los tratamientos (Doprotec vs Propranolol+ Doprotec).

Efecto de la administración de compuestos en el porcentaje de grasa corporal de ratones macho de la cepa C57BL/6 con dietas normal o hipercalóricas. Al final del estudio los animales se sacrificaron. La observación macroscópica de los órganos de los ratones administrados con los diferentes compuestos mostró que no existe daño macroscópico en el hígado, riñón, corazón ni cerebro en ninguna de las dosis administradas. Por otra parte también se

cuantificó la grasa corporal de ratones C57BL/6 durante 4 semanas de tratamiento y se expresó como porcentaje de grasa corporal como se observa en las **Gráficas 9 y 10**:



Gráfica 9. Comparación del porcentaje de grasa corporal al final de los tratamientos. Efecto del tratamiento durante 4 semanas en porcentaje de grasa corporal de ratones C57BL6. . Prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas, Los valores son las medias \pm ESM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.



Gráfica 10. Comparación del porcentaje de grasa corporal al final de la administración de Propranolol+Doprotec en ratones macho C57BL6 sometidos a dieta hipercalórica. ANOVA de una vía, Los valores son las medias \pm ESM. * $P < 0.05$.

Los resultados muestran que no existe diferencia significativa en el porcentaje de grasa corporal en los ratones expuestos a dieta normal, mientras que los ratones



que tuvieron una dieta hipercalórica y administrados con Doprotec, Dop1, Clobenzorex o BRL347344 tienen una disminución significativa en el porcentaje de grasa corporal comparados con el control sometidos a dieta hipercalórica, los ratones con dieta hipercalórica y administrados con Isofea no mostraron diferencia significativa en el porcentaje corporal comparado con el control con dieta hipercalórica. El compuesto sintetizado Doprotec y el agonista BRL347344 tuvieron una mayor disminución en el porcentaje de grasa corporal con una $P < 0.0001$. El grupo tratado con propranolol+Doprotec mostró una diferencia significativa en la disminución del porcentaje de grasa corporal comparado con el control (**Gráfica 10**).



8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Simulación de interacción ligando-receptor.

En el presente trabajo se utilizaron herramientas computacionales que hoy en día han mostrado ser excelentes modelos de estudio para el diseño de fármacos [Rosales y Correa, 2015]. Este tipo de estudio se utilizó para analizar la viabilidad de las interacciones y afinidad de los compuestos por el β_3 AR, y así mismo evaluar la importancia de la presencia de algunos grupos funcionales para modificar su afinidad hacia el receptor. Se realizó como primer paso el diseño e interacción con el receptor blanco de los compuestos mediante un estudio *in silico* donde se analizó la interacción de los compuestos propuestos con el β_3 AR, y así evaluar la importancia de algunos grupos funcionales presentes en los compuestos, además de saber que residuos de aminoácidos están involucrados en la unión con el receptor blanco. De acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios *in silico* los ligandos propuestos tienen la capacidad de unirse al β_3 AR debido a las siguientes características estructurales:

- Grupos voluminosos como: ter-butilo, anillos aromáticos con sustituyentes halogenados o derivados de ácidos borónicos. Es importante que se encuentren unidos al grupo amino, esta característica estructural genera una mayor selectividad hacia el β_3 AR [Perrone, 2009].
- El grupo amino es uno de los componentes más importantes que debe estar presente en la molécula. Este grupo interactúa con el residuo del aminoácido Asp117 en el TM3 que genera interacciones electrostáticas, este residuo está involucrado con la unión de aminas biogénicas (Perrone, 2011).
- El grupo catecol forma puentes de hidrógeno con Ser 209 y 212 en TM5, sin embargo, la presencia de este grupo genera menos selectividad entre los receptores β_2 y β_3 adrenérgico [Coman, 2009]. Por ello, los resultados sugieren que este grupo debe ser sustituido para favorecer la selectividad de los ligandos.



Cabe mencionar que los ligandos propuestos tienen una estructura similar al de las catecolaminas endógenas (adrenalina, noradrenalina), a diferencia de éstas, carecen del alcohol secundario de la cadena alifática. En estudios realizados con aminas simpaticomiméticas endógenas sobre el β_3 AR se ha demostrado que el alcohol secundario está involucrado con una interacción de unión estereoespecífica que, generalmente los compuestos que tienen una configuración R son los que tienen actividad sobre el β_1 AR y β_2 AR. Sin embargo, para el β_3 AR es importante que los compuestos contengan en su estructura el alcohol pero no esencial, dado que compuestos que carecen del grupo hidroxilo tal es el caso de la dopamina tienen actividad sobre este tipo de receptores [Perrone, 2008]. En conjunto, las características estructurales antes mencionadas permitieron una mayor afinidad de los ligandos sobre el β_3 AR en los estudios *in silico* que se realizaron.

Síntesis y caracterización espectroscópica

El sintetizar una nueva molécula, implica el diseño, el desarrollo o adecuación de un método que permita obtener resultados favorables. Durante la síntesis de un compuesto, no se trata solamente de unir átomos arbitrariamente, sino más bien se tiene que planificar y tener diversas estrategias, teniendo en cuenta la posición de los grupos funcionales que posee y su estereoquímica. Por lo tanto, la planificación de una estrategia de síntesis requiere conocer a profundidad la reactividad y las propiedades fisicoquímicas de los compuestos orgánicos, para poder establecer las condiciones óptimas para que la o las reacciones se lleven a cabo.

Fueron seleccionados los compuestos más promisorios de acuerdo a la afinidad calculada por el programa AutoDock Tools 4.2, energía que presentaba cada molécula, y su interacción con los residuos de aminoácidos del receptor. Los compuestos seleccionados fueron Doprotec, Dop1 e Isofea, la ruta de síntesis es fiable para el caso de los tres compuestos. Lo que se buscó en la síntesis química fue lo siguiente: obtener un alto rendimiento de reacción con producción mínima de subproductos, tiempos cortos de reacción, empleo de reactivos y disolventes



no tóxicos, minimización del número de etapas, condiciones de reacción que no sean severas.

La síntesis de Doprotec se puede llevar a cabo por diferentes métodos; sin embargo, las condiciones suelen ser drásticas para la mayoría de las rutas sugeridas, por ejemplo la utilización de dioxano como solvente genera vapores que pueden formar mezclas explosivas al entrar en contacto con el aire, o la utilización de bases muy fuertes que pueden oxidar con facilidad a la dopamina [Sunay and Asit, 2006]. El utilizar carbonato de potasio nos permite extraer el protón del grupo amino generando una carga parcial negativa en el nitrógeno y así generar una adición nucleofílica en el carbonilo del carbonato (BOC), se obtuvo un buen rendimiento del 97% lo que nos habla de que los subproductos que se generan son en mínima cantidad.

En el caso de Dop1 se realizaron diversos métodos de síntesis. En un principio el ácido borónico se intentó adicionar en el grupo catecol, sin embargo, tras diversos ensayos se observó que el nitrógeno es más nucleofílico que el oxígeno por lo tanto la adición del derivado de boro siempre se daría en el grupo amino de la dopamina. Las variables que se modificaron fueron los solventes (polares y apolares) y catalizadores básicos (K_2CO_3 , trietilamina) y se implementó una nueva técnica donde no se utilizan solventes. La utilización de tolueno como solvente de acuerdo con lo descrito por Kanth en la síntesis de catecol-boranos [Kanth, 2000], y la utilización de DMF más K_2CO_3 o trietilamina [Chen, 2004] genera el derivado de boro sustituido en el grupo amino, con rendimientos superiores al 70%, la utilización de este tipo de métodos de síntesis nos conlleva a tiempos de reacciones largos que van desde las 2 a 24 h de reacción, además de la generación de residuos tóxicos. Es por eso que se implementó una nueva técnica de síntesis dirigida a una química verde, libre de solventes, teniendo en cuenta el punto de fusión de las materias primas. Esta técnica fue aplicada para la síntesis de Dop1 e Isofea, el utilizar este tipo de síntesis en la actualidad tiene gran impacto a nivel ambiental e industrial, además de usar y producir compuestos químicos que generaron menos residuos, la química verde también incluye la



reducción de otros impactos medioambientales, como la reducción de la cantidad de energía usada durante el proceso químico [Crecente, 2009], en cuanto a esto el tiempo de reacción fue de 10 s, y algo muy importante es que se generan en menor cantidad residuos tóxicos. Además de que el rendimiento de las reacciones está por encima del 70%, lo cual son buenos resultados y este tipo de metodología puede ser aplicable para generar nuevas moléculas.

Para corroborar la identidad estructural de los compuestos sintetizados nos apoyamos de una serie de técnicas espectroscópicas (IR, RMN ^1H , ^{13}C), que nos aseguraron la existencia de las moléculas problema, y en otras instancias también nos dieron un indicio de la pureza. Los espectros de IR nos permitieron identificar los grupos funcionales presentes en los compuestos sintetizados.

En el espectro del compuesto Doprotec las bandas más representativas son: una banda en 3488 cm^{-1} que corresponde a los hidroxilos del grupo catecol que están libres no formando puentes de hidrógeno, la banda en 3377 cm^{-1} es asignada para el enlace N-H, y por último se observan dos bandas 1676 cm^{-1} para el grupo carbonilo y en 1609 cm^{-1} una banda más pequeña para el enlace N-H, éstas son bandas características del grupo carbamato que se formó [Pretsch, 2009].

En el espectro de Dop1 se observa una banda en 3580 cm^{-1} que corresponde a los hidroxilos del grupo catecol en su forma libre, la presencia de esta banda nos indicó que la adición del derivado de boro no se llevó a cabo en ese sitio. En 2080 cm^{-1} se observa una banda ancha de pequeña intensidad que pertenece al grupo NH^{2+} , por lo que se propone que existe un enlace iónico con boro. En 1435 cm^{-1} la banda que se observa corresponde al enlace B-N corroborando la formación del compuesto deseado [Pretsch, 2009].

En el caso de Isofea las bandas más representativas son en 2546 cm^{-1} que representan al grupo amino, en 1600 cm^{-1} el doble enlace C=C y por último la banda en 1391 cm^{-1} nos confirma el enlace C-N.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C corroboraron las estructuras finales de los compuestos generados en la síntesis. Las señales más representativas del



espectro de Doprotec son: la señal en 1.37 ppm se encuentra en campo alto e integra para 9 protones, esta señal corresponde al grupo ter-butilo, a campos más bajos entre 6.41 a 6.79 encontramos las señales correspondientes a los protones del anillo aromático del grupo catecol, en 6.79 ppm se observa una señal triple correspondiente al protón del grupo amino que integra para un protón, por último la señal a campo bajo en 8.76 corresponde a los protones del grupo catecol, estos resultados se pueden corroborar con el espectro de RMN ^{13}C en donde se pueden observar las 11 señales que corresponden a los carbonos de la molécula sintetizada, las señales más representativas son una señal intensa en 28.74 ppm que corresponde a los carbonos equivalentes del grupo ter-butilo y la señal en 155.9 ppm pertenece al carbono del grupo carbonilo del catecol que se encuentra desplazado a campos bajos.

En el espectro de RMN ^1H de Dop1 las señales a campos más bajos en 2.73 y 2.95 ppm corresponden a los protones de los metilenos de la cadena alifática, en 4.93 ppm se observa una señal simple que integra para cuatro protones que corresponden a los hidroxilos del grupo catecol y los unidos al boro. La molécula tiene dos anillos aromáticos unidos a grupos funcionales diferentes por lo que los desplazamientos químicos son diferentes para los protones de los anillos, las señales que se encuentran entre 6.30-6.5 ppm corresponden a los protones del anillo aromático del grupo catecol, y las señales que están desplazadas a campos más bajos que comprenden 7.1-7.53 ppm pertenecen a los protones del anillo aromático unido al boro los cuales se encuentran más desprotegidos. En cuanto al espectro de RMN ^{13}C las señales de igual forma que en el espectro de ^1H los carbonos de la cadena alifática aparecen las señales en campos altos (33.28 y 40.9 ppm), los carbonos aromáticos entre 107.61 y 131.19 ppm, y dos señales que aparecen en campos bajos 151.7 y 152.9 ppm corresponde a los carbonos saturados del grupo catecol.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto Isofea se puede observar un sistema solapado correspondiente a los protones de los anillos aromáticos, que no es fácil asignar con precisión a cada uno de los protones por su complejidad, pero se



puede colocar el intervalo del desplazamiento químico en los que las señales aparecen entre 7.20-7.41 ppm, mientras que para los metilenos de la cadena alifática se encuentran en 3.64 ppm y 3.07 ppm, por otra parte las señales características para este compuesto son los protones metilénicos del anillo de isoindolina que se forma y están representados por las señales en 4.65 y 4.79 ppm, se encuentran desplazadas a campos bajos por la influencia del nitrógeno en el anillo. En el espectro de RMN ^{13}C los carbonos están enumerados (**Anexo A, Figura 18**) y se puede observar que la señal característica para los C-2,5 se encuentra en 58.45 ppm, mientras que para el C-10 la señal se localiza en 55.42 ppm y para el C-11 en 33.581 ppm, los C-13,14,16,17 la señal se encuentra entre 129.17-129.43 ppm, C-6,9 en 123.50 ppm, C-7,8 en 127.42 ppm, C-15 en 127.58 ppm, para C-12 la señal se encuentra en 134.93 ppm y para C-3,4 en 137.99 ppm. Con lo cual podemos corroborar que se obtuvo 2-(1-feniletíl)-1,3-dihidroisoindolina.

Existe una correlación entre los espectros de IR y los de RMN de los compuestos sintetizados en cuanto a grupos funcionales importantes y la conectividad de los átomos, por lo tanto, las moléculas propuestas como producto final son las adecuadas estructuralmente, de acuerdo con los resultados espectroscópicos analizados.

Modelo murino de obesidad

El desarrollo de tratamientos farmacológicos eficaces y que puedan ser extrapolados a humanos necesitan de modelos de animales que sean válidos y reproducibles. En la actualidad existen diversos modelos murinos que inducen obesidad, incluyendo modelos monogénicos, poligénicos, quirúrgicos o químicos, entre otros [Lutz y Woods, 2012]. Para generar el modelo de obesidad que se utilizó en este trabajo se utilizó la dieta denominada coloquialmente de cafetería, el utilizar este tipo de dieta nos permitió generar un modelo que está estrechamente relacionado con la dieta que actualmente la mayoría de las personas con sobrepeso u obesidad tienen en su vida diaria. En cuanto a los roedores utilizados se eligieron ratones machos de la cepa C57BL/6 porque son más propensos a



generar obesidad, inducida por la dieta que otras cepas puras [Surwit et al, 1995; Prpic *et al.*, 2002].

Para validar este modelo se midieron: el peso corporal de los ratones, y algunos parámetros metabólicos que se ven afectados en personas con sobrepeso u obesidad; glucosa, triglicéridos y colesterol total en sangre, [Awadalla, 2000; Steinberger, 2003] y generalmente estos cambios poligénicos son capaces de desencadenar una serie de cambios mayores que conllevan a la generación de enfermedades crónicas no transmitibles. De acuerdo con los valores obtenidos de las distintas pruebas, el peso corporal de ratones con dieta normal comparado con los ratones sometidos a una dieta hipercalórica muestra una diferencia de 13.2 g en promedio. Cabe mencionar que dietas altas en grasa que son distribuidas por diferentes compañías también generan buenos resultados en cuanto al aumento de peso, sin embargo, algunos inconvenientes de utilizar este tipo de dieta es que ofrecen una comida relativamente desagradable e invariable tanto en términos de sabor y textura, lo que puede generar una variación en aumento de peso menor en los roedores, en cambio los alimentos de la dieta suministrada en este proyecto eran agradables al paladar de los ratones y altamente densos (con una cantidad alta en grasas y carbohidratos).

En cuanto a la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol total tuvieron un aumento significativo los ratones con dieta hipercalórica propuesta en cambio los ratones con dieta normal no sufrieron ninguna modificación en estos parámetros. La dieta hipercalórica suministrada genera cambios metabólicos y aumento en el peso corporal, por lo tanto el empleo del modelo que se utilizó en este proyecto genera obesidad y puede ser aplicable para estudios posteriores.

Evaluación de los compuestos sintetizados, administración a ratones sometidos a dieta normal o hipercalórica.

Una vez que se obtuvo el modelo de obesidad los compuestos sintetizados fueron administrados en ratones machos de la cepa C57BL/6 durante cuatro semanas. El efecto sobre el peso corporal, glucosa, triglicéridos y colesterol total de ratones



sometidos a dieta normal o hipercalórica se comparó con el compuesto BRL37344 agonista β_3 AR y el fármaco anorexigénico Clobenzorex utilizado en México para disminuir el peso corporal. Los resultados obtenidos de la evaluación en el modelo murino y tratados estadísticamente nos demuestran que Doprotec e Isofea disminuyen significativamente el peso corporal al igual que los compuestos de referencia utilizados, cabe mencionar que este efecto fue menor en los compuestos sintetizados. El mecanismo por el cual los compuestos sintetizados pueden actuar sobre el peso incluiría: 1) efectos directos sobre el tejido adiposo, modificando el metabolismo lipídico, y 2) modificando el mecanismo secretor de otras hormonas que regulan el metabolismo. Es importante resaltar que la dieta se mantuvo durante el tratamiento, el consumo de alimento no fue afectado con la administración de BRL37344, Doprotec, Dop1 e Isofea, mientras que los ratones administrados con Clobenzorex consumían hasta en un 40% menos cantidad de alimento al día en comparación al inicio del experimento. Por lo tanto la disminución del peso corporal en los ratones es debido al efecto anorexigénico y no por un efecto en el metabolismo lipídico [Madden, 2010], ya que los ratones consumían una menor cantidad de alimento al día. Por otra parte los parámetros metabólicos medidos también son relevantes observándose disminución significativa en el caso de Doprotec, y para Dop1 e Isofea solo disminuyeron significativamente triglicéridos y colesterol.

La disminución de glucosa con la administración de Doprotec es un resultado importante y de gran impacto, ésta puede ser atribuida a diferentes mecanismos de acción [Coman, 2009]:

- Estimulación de la secreción de insulina en células beta pancreáticas
- Aumento de la sensibilidad a la insulina de tejidos periféricos como respuesta al aumento de la expresión de transportadores de glucosa o de los receptores de insulina y también el aumento del flujo sanguíneo
- Aumento de la captura de glucosa insulino-no dependiente y su utilización en tejidos tales como el tejido adiposo y el músculo esquelético
- Liberación disminuida de la glucosa desde el hígado



Cabe mencionar que este fenómeno se ha observado en diversos agonistas β_3 AR. El mecanismo que se ha elucidado es el aumento en los transportadores de glucosa, principalmente por estimulación del β_3 AR [Milagro, 1999], estudios *in vitro* han demostrado que la acción de noradrenalina e isoproterenol estimulan la captación de glucosa en tejido adiposo. Por lo tanto, lo que han sugerido diversos autores es que pueden ser utilizados para el control de la glicemia en personas con diabetes mellitus tipo II [Perrone, 2011].

Para la concentración de triglicéridos, se observa en los diferentes tratamientos que la disminución es mucho mayor con la administración de BRL37344 con valores similares con el control de dieta normal, Isofea también generó una mayor disminución con una $P > 0.0001$, esta acción en la disminución de triglicéridos, y también la disminución del porcentaje de grasa corporal con BRL37344 es explicada por la activación del β_3 AR, que en estudios anteriores se ha demostrado que estos dos compuestos son capaces de unirse al β_3 AR y producir AMPc, lo que nos habla de la vía Gs que se activa en este subtipo de receptores generando así lipólisis [D. Sanz, 2011]. El comportamiento similar que tiene Doprotec y BRL347344 sobre los parámetros medidos nos sugiere de una posible acción por la misma vía, sin embargo, los estudios realizados utilizando propranolol antagonista no selectivo de receptores adrenérgicos beta a una dosis de 10mg/kg de peso, nos sugieren que la vía por la cual actúa Doprotec es diferente a la de los receptores beta adrenérgicos. Los resultados de este ensayo nos demostraron que tanto el peso corporal, glucosa, triglicéridos no ejercen un cambio significativo en ratones con dieta hipercalórica a los cuales se les administró propranolol y el compuesto Doprotec, esto comparado con el grupo control de dieta hipocalórica, estos primeros resultados nos podrían indicar una posible activación de receptores beta adrenérgicos, sin embargo, al analizar los demás parámetros como lo son colesterol y porcentaje de grasa corporal los cuales son disminuidos, además al comparar los tratamientos estadísticamente nos demuestra que no existe una diferencia significativa en ninguno de los parámetros medidos con la administración de Doprotec solo y la administración de propranolol más Doprotec,



por lo tanto, los efectos generados tras la administración del compuesto Doprotec es mediado por una vía distinta de los receptores adrenérgicos beta, lo que nos abre camino a estudiar nuevos mecanismos que se relacionen con los efectos causados por el compuesto Doprotec.

El mecanismo al que se asocian los resultados observados tras la administración de Doprotec sugiere regulación en la biosíntesis de la proteína adiponectina y/o acción del compuesto sobre los receptores de adiponectina. Esta proteína es secretada por los adipocitos y es encargada de regular el metabolismo energético, ya que estimula la oxidación de ácidos grasos, reduce los triglicéridos plasmáticos y mejora el metabolismo de la glucosa mediante un aumento en la sensibilidad a la insulina. Se han identificado 2 receptores de adiponectina y se encuentran principalmente en hígado y músculo esquelético [Cheng, 2013; Yamauchi, 2013].

Por otra parte, existe otro factor que explicaría el menor efecto observado de Doprotec en el peso corporal de los ratones o en la concentración de triglicéridos y la nula actividad del compuesto Dop1 sobre el peso corporal comparado con la acción del compuesto BRL37344, y que se explica por medio del proceso de metabolismo a través de la acción de la enzima catecol-o metil transferasa (COMT), que sufren los compuestos una vez administrados por vía oral. Además el grupo catecol sufre una fácil oxidación, este fenómeno se genera más rápido en el compuesto Dop1 aproximadamente en 2 h, mientras que Doprotec en solución se empieza a oxidar después de 48 h. Estas características estructurales de los compuestos pueden generar que exista una menor cantidad de fármaco disponible para absorberse por el proceso de metabolismo antes mencionado, además de que esto provoca que el fármaco sea eliminado más fácilmente.

En resumen, es claro que de acuerdo a los experimentos realizados, los compuestos sintetizados Doprotec e Isofea son capaces de ejercer un efecto en el peso corporal de los ratones sometidos a dieta hipercalórica, por un lado el compuesto Isofea se ha comprobado la acción sobre β 3AR, mientras que el compuesto Doprotec no está del todo claro, lo que conlleva a plantear nuevos estudios encaminados a elucidar su mecanismo de acción.



9. CONCLUSIONES

Los estudios *in silico* de ligandos sobre el β_3 AR muestran que la presencia de boro favorece la afinidad sobre el receptor blanco. Además se sugiere que la adición de sustituyentes voluminosos en el grupo amino favorece la selectividad hacia el β_3 AR.

Otras características estructurales favorecen la interacción con el receptor. Entre ellas, la presencia del grupo amino hace factible la interacción con el residuo de Asp117 clave en la activación del receptor. Y se observó que el hidroxilo secundario en la cadena alifática de los ligandos no es indispensable en la interacción β_3 AR.

Se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron 3 compuestos (Doprotec, Dop1 e Isofea) con potencial acción sobre parámetros metabólicos y grasa corporal. Los métodos de síntesis utilizados son adecuados para generar derivados de boro y arilaminas sustituidas en el grupo amino, con buenos rendimientos y alta pureza.

La administración de Doprotec o Isofea durante 4 semanas a ratones macho de la cepa C57BL/6 sometidos a dieta hipercalórica tienen acción sobre el peso corporal, Doprotec disminuye significativamente las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol total en sangre, mientras que Dop1 e Isofea solo disminuyen los triglicéridos y colesterol. La acción de Isofea es mediada, al menos en parte, a través de la activación del β_3 AR, mientras que para Doprotec y Dop1 aún no se tiene bien elucidado el mecanismo de acción; sin embargo, una vía atractiva que explicaría la mayoría de sus efectos es a través de la regulación de biosíntesis de adiponectina y/o acción sobre los receptores de adiponectina. Estudios en el futuro permitirán apoyar o descartar estas propuestas.



10. REFERENCIAS

- Aballay L.R, Eynard A.R, Díaz M., Navarro A., and Muñoz S.E. Overweight and obesity: their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. *Nutrition Reviews*. 2012; 71(3):168–179
- Arch, J. R. and Wilson, S. Prospects for beta 3-adrenoceptor agonists in the treatment of obesity and diabetes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*1996; 20, 191-9.
- Bachman S., Dhillon H. et.al. β AR Signaling Required for Diet-Induced Thermogenesis and Obesity Resistance. *Science*. 2002; 297; 843
- Barrera C. Rodriguez G. y Molina A. Escenario actual de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2013;51(3):292-99
- Cawthorne A. Sennitt V. et. al. BRL 35135, a potent and selective atypical β -adrenoceptor agonist. *Am J Clin Nutr*. 1992; 55:252S-7S.
- Chakraborti A. K., Rudrawar S. and Kondaskar A. An efficient synthesis of 2-Amino alcohols by silica gel catalysed opening of epoxide rings by amines. *Org. Biomol. Chem*. 2004; 2, 1277–1280.
- Chankeshwara S. V. and Chakraborti A. K. Catalyst-Free Chemoselective N-tert-Butyloxycarbonylation of Amines in Water. *Org. Lett*. 2006; 8(15). 3259-3262
Doi:10.1021/ol0611191
- Chen G. C. Synthesis and Evaluation of Borates Derived from Boric Acid and Diols for The Protection of Wood Against Fungal Decay and Thermal Degradation. *Wood and Fiber Science*. 2008;40(2), 248–257.
- Coman A., Paunescu H. et. al. Beta 3 adrenergic receptors: molecular, histological, functional and pharmacological approaches. *Journal of Morphology and Embryology*.2009: 50(2):169–179.



Crecente C. J. Síntesis orgánica asistida por microondas. Obtención de enol carbamatos, tetrahidroisoquinolinas, benzoazepinas, tiazolinas, sulfuros de fosfoles, isoflavonas, arilcumarinas, cumarinocumarinas y núcleos de dendrímeros: Aplicaciones. 2009. Universidad Santiago de Compostela.

D. Sanz-Rosa D. Los receptores β -adrenérgicos en la enfermedad cardiovascular. Hipertens riesgo vasc. 2011 ;28(2):55—62.

De Souza CJ, Burkey BF. Beta(3)-adrenoceptor agonists as anti-diabetic and anti-obesity drugs in humans. Curr Pharm Des. 2001;7:1433-49

Granneman, J. G., Li, P., Zhu, Z. and Lu, Y. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of beta3-adrenergic receptor activation. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.2005; 289, E608-16. Doi: 10.1152/ajpendo.00009.2005

Harada H. et. al. Discovery of a novel and potent human and rat beta3-adrenergic receptor agonist, [3-[(2R)-[[[(2R)-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]amino]propyl]-1H-indol-7-yloxy]acetic acid. Chem. Pharm. Bull. 2005; 53(2) 184-198.

Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, and Cinti S. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. Am J Physiol Cell Physiol 279: C670–C681, 2000.

Hom G.J. et. al. β_3 -Adrenoceptor Agonist-Induced Increases in Lipolysis, Metabolic Rate, Facial Flushing, and Reflex Tachycardia in Anesthetized Rhesus Monkeys. J Pharmacol Exp Ther. 2001; 297(1):299-307.

Kobilka BK. Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. Trends Pharmacol Sci 2011; 32:213-8.

Leineweber K. et.al. β -Adrenoceptor polymorphisms. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2004; 369 : 1–22

Lorke, D., A new approach to practical acute toxicity testing. Arch. Toxicol., 1983, 53, 275–289.



Lowell B. and Flier S. Brown adipose tissue, β_3 -adrenergic receptors, and obesity. *Rev. Med.* 1992; 48:307–16

Mayurama T., Onda K. et.al. Synthesis and Evaluation of N-Phenyl-(2-aminothiazol-4-yl)acetamides with hexoxypropanolamine Moiety as Selective β_3 -Adrenergic Receptor Agonists. *Chem. Pharm. Bull.* 2012; 60(5) 647–658.

Najmodin Azizi and Saidi R. M. Highly Chemoselective Addition of Amines to Epoxides in Water. *Org. Lett.* 2005; 7(17) 3649-3651. Doi 10.1021/ol051220q

OMS, Sobrepeso y Obesidad, 2012. Consultado en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>.

Perrone MG, Bleve L, Santandrea E, et al. The tertiary amine nitrogen atom of piperazine sulfonamides as a novel determinant of potent and selective beta3-adrenoceptor agonists. *Chem Med Chem.* 2009; 4:2080-97

Perrone MG., and Scilimati. β_3 -Adrenoceptor ligand development history through patent review. *Expert Opin. Ther. Patents.* 2011; 21(4):505-536.

Perrone MG., et.al. Stereospecific synthesis and bio-activity of novel β_3 -adrenoceptor agonists and inverse agonists. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16, 2473–2488. Doi:10.1016/j.bmc.2007.11.060

Pombo A. M. Tratado de endocrinología pediátrica. 1997. Ediciones Díaz de Santos. Madrid.

Pretsch E., Bühlmann P. y Badertscher M. 2009. Structure determination of organic compounds. Institute of Biogeochemistry and Pollutant Dynamics. Alemania. Springer.

Prpic, V., Watson, P.M., Frampton, I.C., Sabol, M.A., Jezek, G.E., and Gettys, T.W. Adaptive changes in adipocyte gene expression differ in AKR/J and SWR/J mice during diet-induced obesity. *J. Nutr.* 2002;132:3325-3332.



Romanos J.. Infrared study of boron–carbon chemical bonds in boron-doped activated carbon. CARBON. 2013; 54, 208–214. Doi:10.1016/j.carbon.2012.11.031

Rosales-Hernández M., Correa-Basurto J. The importance of employing computational resources for the automation of drug discovery. Exp. Opin Drug Discover 2015 10(3):213-219.

Roy KK, Saxena AK. Structural basis for the β -adrenergic receptor subtype selectivity of the representative agonists and antagonists. J Chem Inf Model. 2011 Jun 27;51(6):1405-22.

Sistema Globalmente Armonizado (SGA). A Guide to The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). United Nations 2011. Pp 109.

Smith B. Obesity and Sedentary Lifestyles. Tex Heart Inst J. 2012; 39(2): 224–227.

Soriano-Ursúa MA, Correa-Basurto J, Amezcua-Gutiérrez MA, Valencia-Hernández I, Padilla-Martinez II, Trujillo-Ferrara JG. Design, synthesis and in vitro evaluation of (R)-4-(2-(tert-butylamino)-1-hydroxyethyl)-2-(hydroxymethyl)phenyl hydrogen phenyl-boronate: a novel salbutamol derivative with high intrinsic efficacy on the beta2-adrenoceptor. Bioorg Med Chem Lett. 2010a; 20: 5623–9.

Soriano-Ursúa MA, Trujillo-Ferrara JG, Correa-Basurto J, Kaumann AJ. Homology model and docking studies on porcine β 2 adrenoceptor: description of two binding sites. J Mol Model 2011; Doi: 10.1007/s00894-010-0915-1.

Soriano-Ursúa MA, Trujillo-Ferrara JG, Correa-Basurto J. Scope and difficulty in generating theoretical insights regarding ligand recognition and activation of the beta 2 adrenergic receptor. J Med Chem 2010b; 53:923-32.

Soriano-Ursúa MA, Valencia-Hernández I, Arellano-Mendoza MG, Correa-Basurto J, Trujillo-Ferrara JG. Synthesis, pharmacological and *in silico* evaluation of 1-(4-



di-hydroxy-3,5-dioxa-4-borabicyclo[4.4.0]deca-7,9,11-trien-9-yl)-2-(tert-butyl-amino) etha-nol, a compound designed to act as a β 2 adrenoceptor agonist. *Eur J Med Chem* 2009; 44:2840-6.

Sowers J. R. Endocrine Functions of Adipose Tissue: Focus on Adiponectin. *Clinical Cornerstone*. Abdominal adiposity: an emerging marker. 2008;9(1) 32-40.

Suárez J., Rivera P. et. al. Oleoylethanolamide enhances β -adrenergic-mediated thermogenesis and white-to-brown adipocyte phenotype in epididymal white adipose tissue in rat. 2013 Research Article.

Tiwari R., et. al. Carborane Clusters in Computational Drug Design: A Comparative Docking Evaluation Using Autodock, Flexx, Glide and Surflex#. *J Chem Inf Model*. 2009; 49(6): 1581–1589. doi:10.1021/ci900031y

Xiang H, Zhao W, Xiao H, Qian L, Yao Y, Li XB, Liao QJ. Synthesis and biological evaluation of isoflavone fatty acid esters with potential weight loss and hypolipidemic activities. *Bioorg Med Chem*. 2010 May 1;18(9):3036-42.

Yaping L. et. al. Brain-Specific Delivery of Dopamine Mediated by N,N-Dimethyl Amino Group for the Treatment of Parkinson's Disease. *Mol. Pharmaceutics* 2014; 11, 3174–3185. Doi10.1021/mp500352p.

Zinelaabine C., et. al. N-tert -Butoxycarbonylation of Structurally Diverse Amines and Sulfamides underWater-Mediated Catalyst-Free Conditions. Research Article. *ISRN Org, Chem*. 2012. doi:10.5402/2012/404235

11. ANEXO A

Espectros de IR, ^1H RMN y ^{13}C RMN de los compuestos sintetizados

Resultados espectroscópicos del compuesto Doprotec

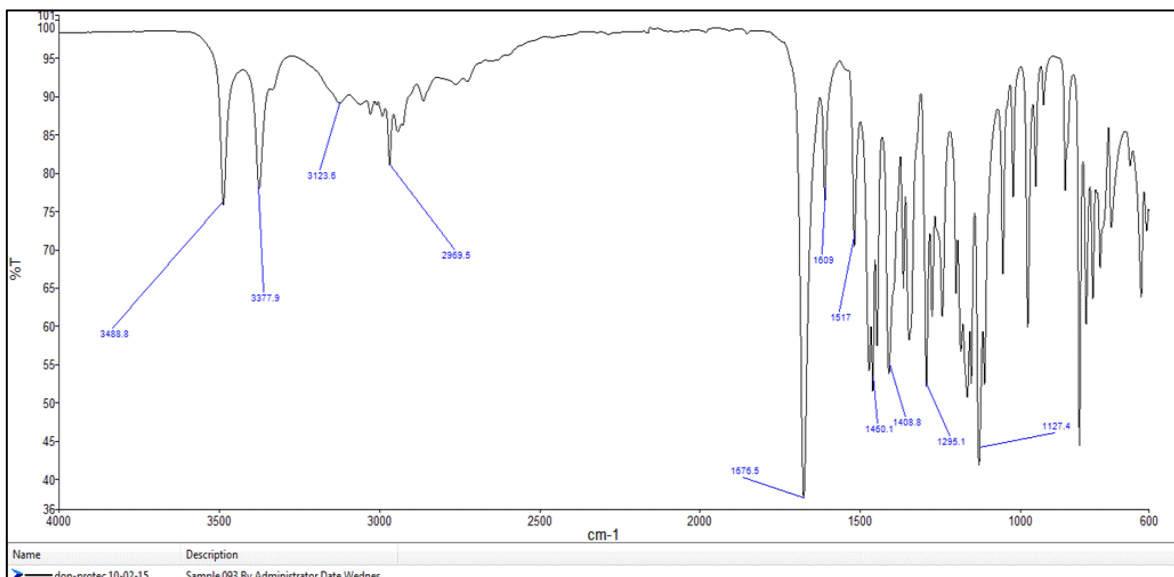


Figura 8. Espectro de infrarrojo del compuesto DOPROTEC.

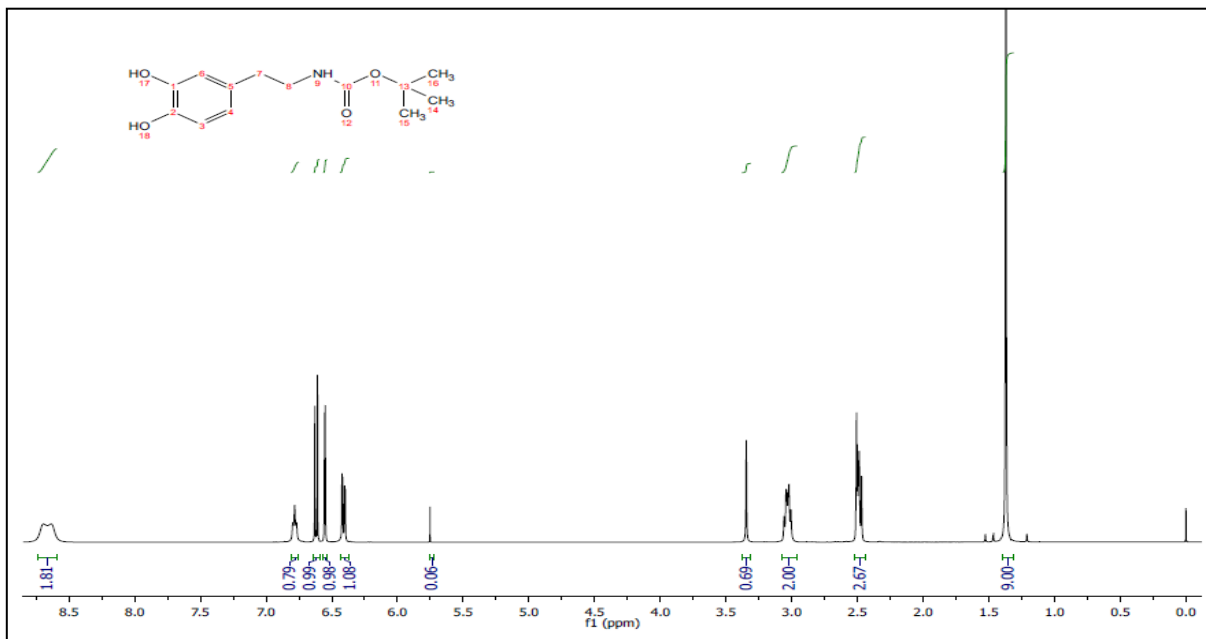


Figura 9. Espectro de resonancia magnética de ^1H del compuesto DOPROTEC

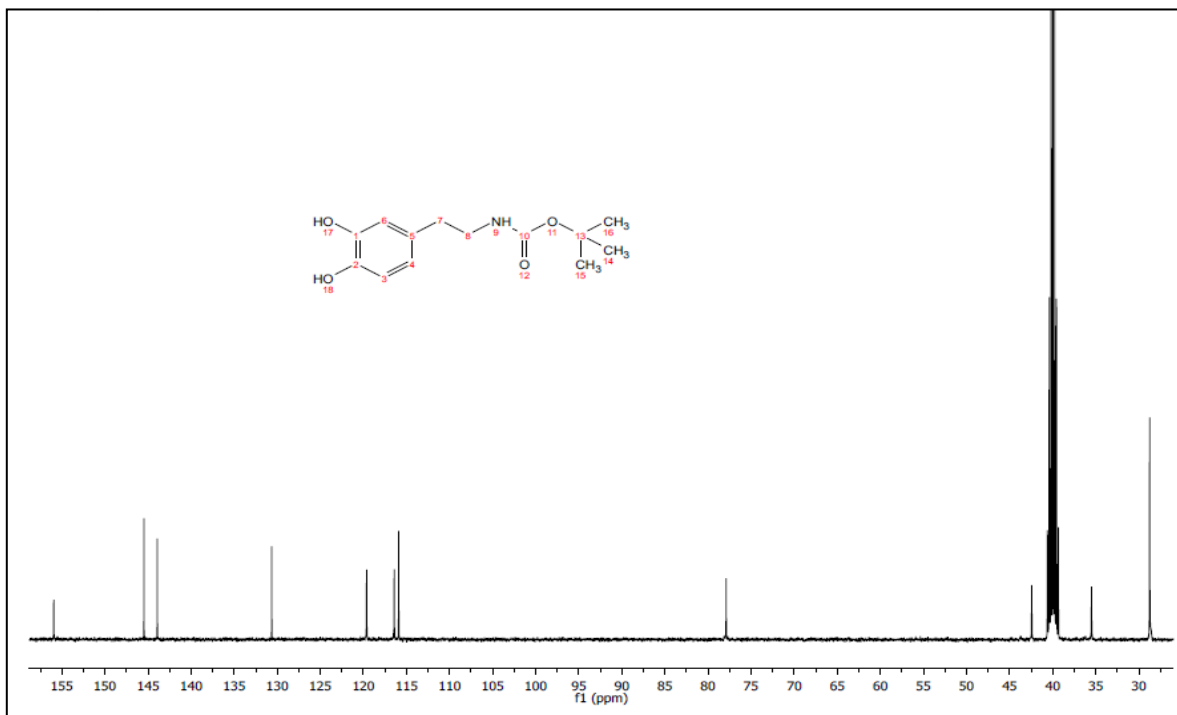


Figura 10. Espectro de resonancia magnética de ¹³C del compuesto DOPROTEC

Resultados espectroscópicos del compuesto Dop1

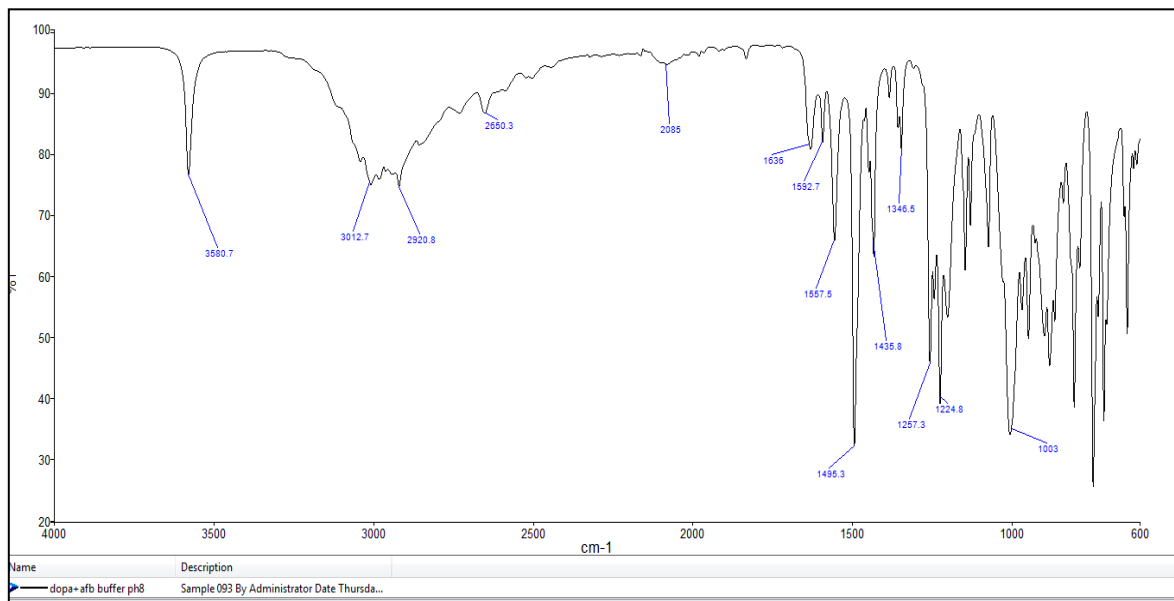


Figura 11. Espectro de infrarrojo del compuesto DOP1.

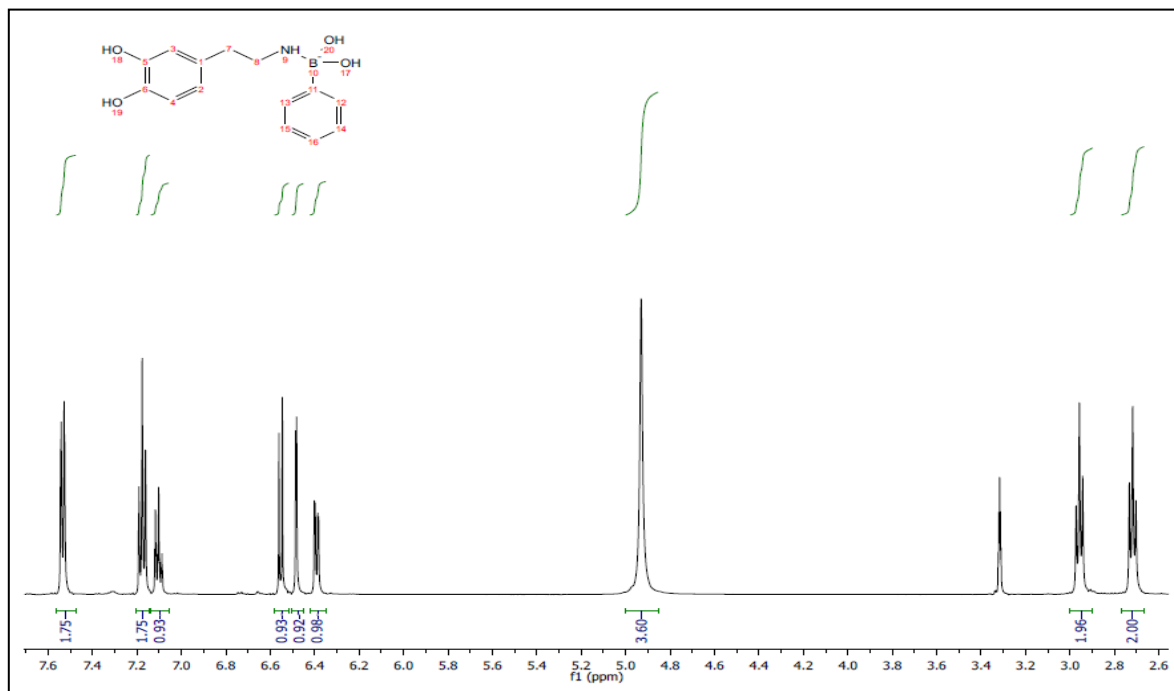


Figura 12. Espectro de resonancia magnética de ¹H del compuesto DOP1.

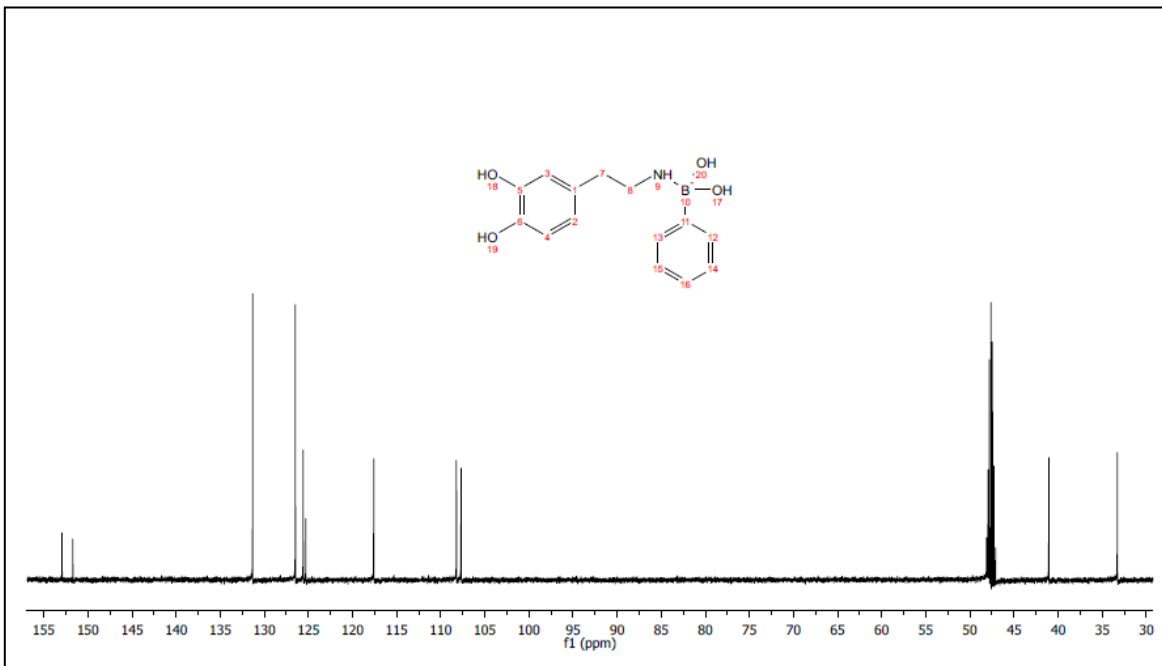


Figura 13. Espectro de resonancia magnética de ¹³C del compuesto DOP1

Resultados espectroscópicos del compuesto Isofea

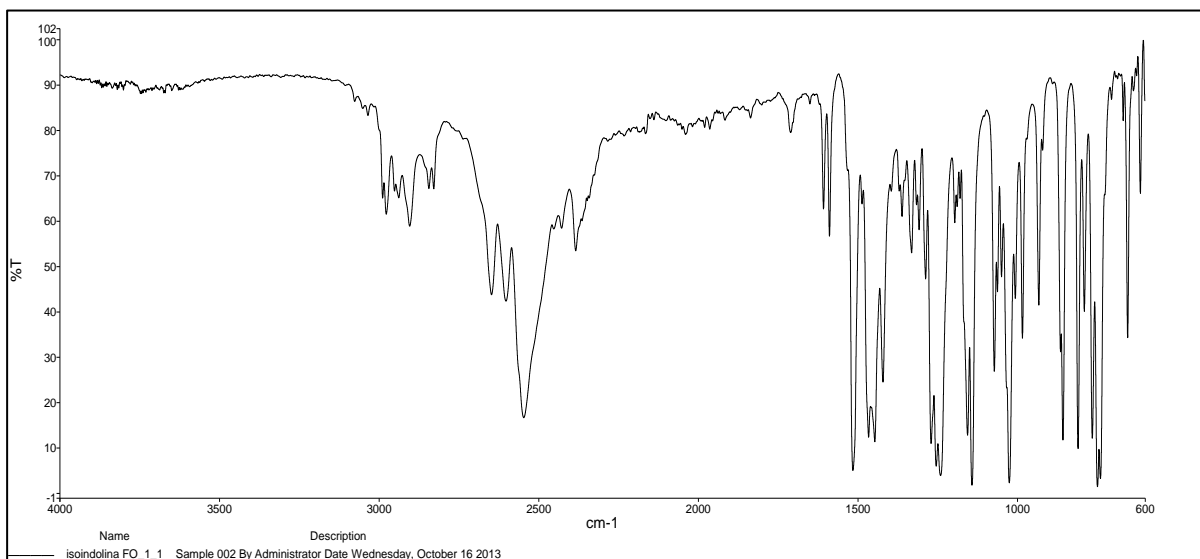


Figura 14. Espectro de infrarrojo del compuesto ISOFEA.

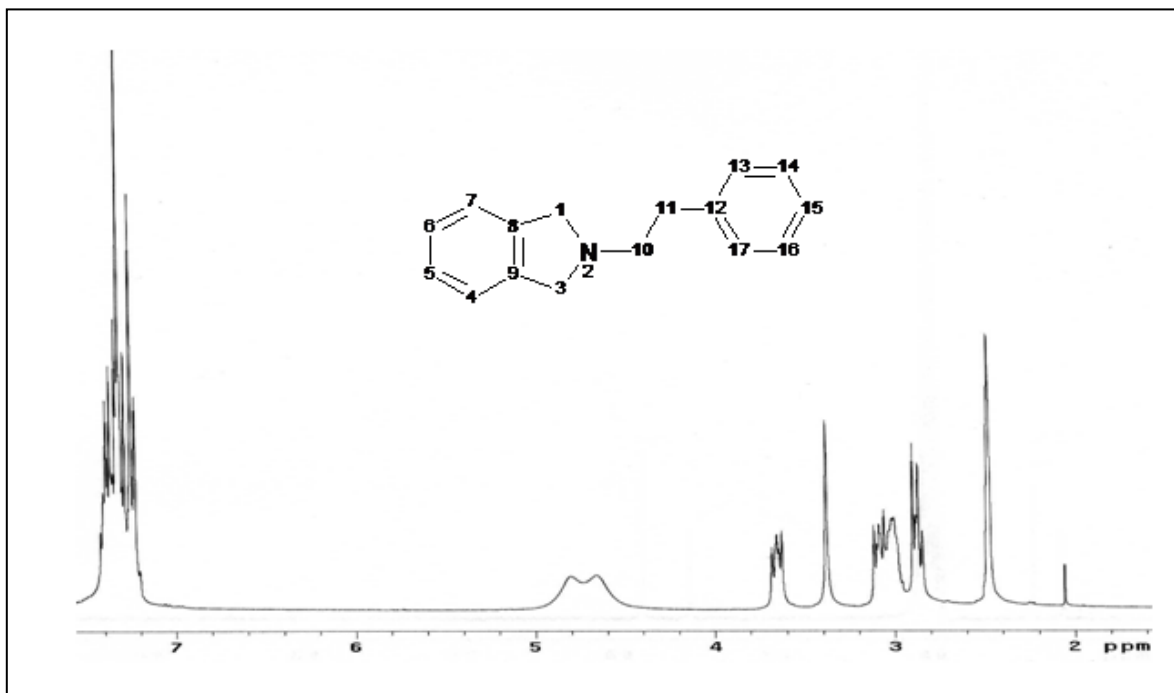


Figura 15. Espectro de resonancia magnética de ¹H del compuesto ISOFEA

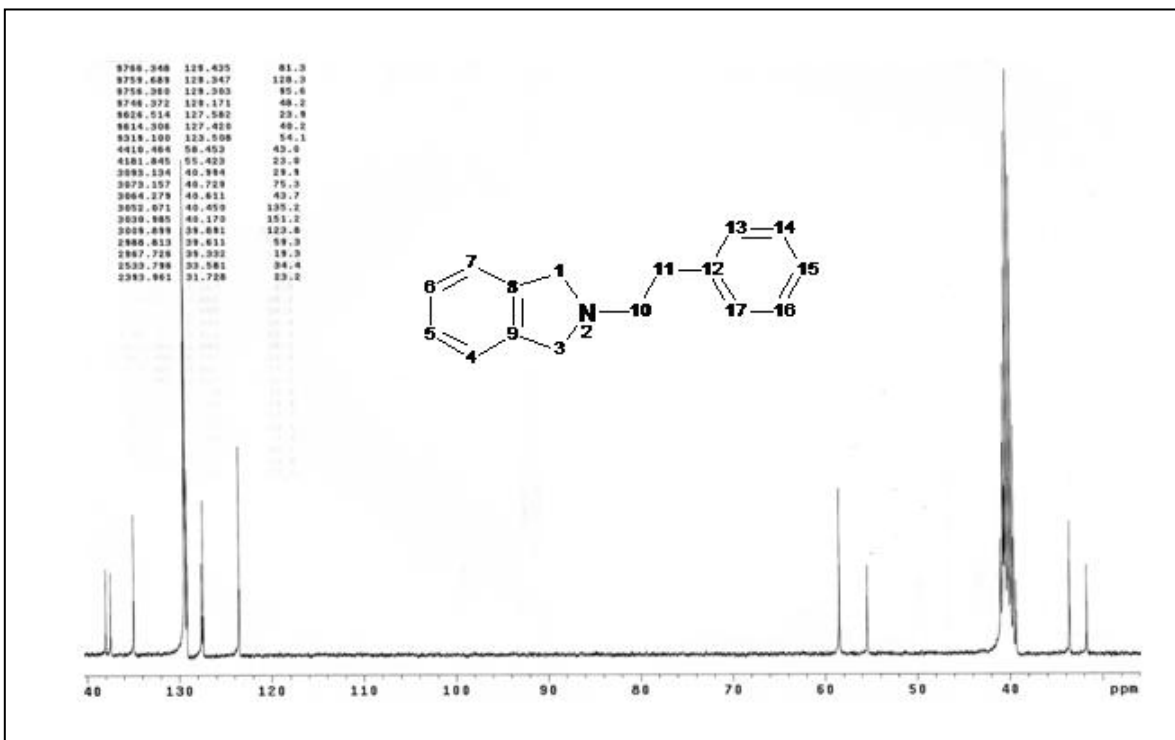


Figura 16. Espectro de resonancia magnética de ^{13}C del compuesto ISOFEA

12. ANEXO B

PRODUCTOS

a) Artículo publicado

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 25 (2015) 820–825



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl



Insights on the role of boron containing moieties in the design of new potent and efficient agonists targeting the β_2 adrenoceptor



Marvin A. Soriano-Ursúa^{a,b,*}, José A. Arias-Montaño^c, José Correa-Basurto^b,
Christian F. Hernández-Martínez^a, Yessica López-Cabrera^a, María C. Castillo-Hernández^b,
Itzia I. Padilla-Martínez^d, José G. Trujillo-Ferrara^a

^aDepartamentos de Fisiología y Bioquímica, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, México, D.F. C.P. 11340, México

^bSección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, 11340, México

^cDepartamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, 07360 México, D.F., México

^dUnidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, Avenida Acapulco s/n, Barrio La Laguna Ticomán, 07340, México

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 October 2014
Revised 20 December 2014
Accepted 23 December 2014
Available online 3 January 2015

Keywords:
Bronchodilator
Boron
Guinea pig
Docking
 β_2 adrenoceptor agonist
GPCRs

ABSTRACT

The development of β_2 adrenoceptor (β_2 AR) agonists is of increasing interest because of their wide-ranging applications in medicine, particularly for the treatment of pulmonary diseases. Regarding the relaxation of smooth muscle that lines airways of mammals, some boron-containing adducts have demonstrated greater potency and efficacy compared to well-known boron-free compounds. We herein report the design and synthesis as well as the chemical and pharmacological characterization of a new boron-containing compound: ((R)-6-((S)-2-(*tert*-butylammonio)-1-hydroxyethyl)-2-hydroxy-2-isobutyl-4H-benzod[e][1,3,2] dioxaborin-2-ylidene). Compared to its precursor (salbutamol), this compound induced relaxation of smooth muscle in guinea pig tracheal rings with greater potency and efficacy ($EC_{50} < 28.02$ nM). Theoretical studies suggest the potential selectivity of this boron containing compound on the orthosteric site of beta adrenoceptors and/or signaling pathways, as well as the importance of the tetracoordinated boron atom in its structure for binding recognition properties.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The development of β_2 adrenoceptor (β_2 AR) agonists is an interesting task because of their wide-ranging applications in medicine. They are particularly useful for treating pulmonary diseases, and are also administered in cases of cardiovascular, central nervous system, immune and muscle disorders.¹

β_2 AR-agonists are among the drugs that have been shown in clinical practice to provide a significant improvement in the clinical manifestations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease,^{1,2} which are common causes of morbidity and disability in the world. Compared to well-known boron-free β_2 AR-agonists, some boron-containing compounds (BCCs) have demonstrated higher potency and efficacy as relaxant agents of smooth muscle in airways of mammals.³

In addition, available drugs present several disadvantages, including their tendency to lose effectiveness after prolonged use. This reduced effect is apparently related to a decrease in the number of β_2 ARs expressed on the cell surface.³ An association has been established between this curtailed expression and biased-signaling in the arrestin pathways that is induced by

compounds in cells expressing β_2 ARs. Nevertheless, the mechanisms linked to this phenomenon are not well understood at the molecular level.⁴

There have been some clues in regard to the molecular details of the interaction between β_2 ARs and their ligands that have implications for the design of new compounds with biased signaling.^{3,5} For instance, it has been suggested that the activation of the arrestin pathway requires the interaction of compounds with residues outside of the orthosteric site of the targeted receptor. On the other hand, some authors point out the difficulty of establishing the active site.⁵ In any case, it is clearly desirable to design selective agonists for β_2 ARs, especially those with the ability to trigger biased signaling.^{4,5}

In the present study we designed several compounds that may reach and activate β_2 ARs, taking into account the observation in various reports that some residues in the fifth transmembrane domain (TM5) are involved in β_2 AR activation.⁶ The decision to develop BCCs owes itself not only to their proven high affinity for β_2 ARs,³ but also to their great ability to interact with key residues in the TM5 of these receptors. That is due to some *in vitro* and *in silico* experiments have suggested that Tyr199 and Ser203 in TM5 probably play a key role in β_2 AR activation.⁶

* Corresponding author. Tel./fax: +52 555 7296000x62747.
E-mail address: msoriano@ipn.mx (M.A. Soriano-Ursúa).

In general, the study of BCCs has been increasing in this century.⁷ We have reported that BCCs which target β_2 ARs share two features: they are derived from the same precursor molecule (salbutamol), and they were formed by linking a tetracoordinated boron atom to this precursor.⁵ It has been suggested that the BCCs with these two features may be more stable in a physiological environment than those containing a tri-coordinated boron.⁷

Salbutamol, a partial agonist with β_2 AR selectivity, has recently been suggested as an agonist for cyclic Adenosine monophosphate (cAMP) production, Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK)1/2 activation, calcium release and receptor endocytosis, with the rank order of potency being ERK > cAMP > calcium > endocytosis.⁸ A spread of more than 4 logarithmic units has been found between the most and least responsive signaling modalities. The aforementioned tetracoordinated boron atom is linked to this precursor by means of a chemical reaction in an alkaline medium with a non-polar solvent (Table 1). We have also analyzed (by means of *in silico* assays) the importance of the moieties linked to amine,

the charges located in the proposed molecules, and the stereoisomeric forms derived from the placement of substituents at the β -carbon to amino.³

In the current contribution we built a 3D representation of several adducts formed by combining salbutamol and some boronic acids, the latter of which were recently tested as potential moieties with a low toxicity profile.⁹ These BCCs could then be analyzed in terms of a diol-condensation between either a tri- or tetracoordinated boron in its structure and the hydroxyl groups of the catechol moiety, and also an interaction between the tricoordinated compounds and the substituent in para or ortho position in the phenyl ring relative to the *tert*-butyl-ethylamine moiety. The structural changes in the *tert*-butyl moiety of salbutamol were avoided because of previous observations (based on theoretical assays carried out by our workgroup) indicating that even minor changes disrupt the binding mode or affinity for ligands.³

By using *in silico* assays the proposed structures were evaluated according to the affinity and binding mode with which they interacted on the recently reported three-dimensional (3-D) model of active guinea pig β_2 AR. This 3-D model is useful for predicting affinity values, judging by the correlation of such values with those reported *in vitro* for well-known ligands.¹⁰ In order to reach a greater approximation between predicted affinity and that found experimentally, we made an adjustment based on the fact that affinity values are underestimated in the β_2 AR model.¹⁰ The ligand-protein docking methodology was also useful for validating the estimating procedure and the proposed ligand-receptor interactions.

The *in silico* assays suggested the importance of certain moieties in the ligands and of interactions with specific residues in β_2 ARs. For example, we observed greater affinity for compounds with a phenyl ring or with more compact moieties as a substituent of boronic acid (see Table 1). The compounds with bulkier substituents showed lower affinity for the β_2 AR but conserved the ability to fit into the orthosteric binding site, which is in agreement with previous reports by our workgroup and others.^{5,8,11} However, scant reports have been published on chemical modifications on this side of the catecholamine core (the substituents of the benzene ring)¹² compared to the extensive information available on the moieties in the amino-linked extreme.

We analyzed the possible adducts between *R*-salbutamol and boronic acid as well as one of nine boronic acids. Among the forty compounds included in the *in silico* study (Fig. 1), we selected adducts between salbutamol and 2-methylpropyl boronic acid for a more detailed analysis due to their calculated high affinity on β_2 ARs. Additionally, 2-methylpropyl boronic acid showed a relatively low toxicological profile.⁹ Among these selected adducts, the best score (highest predicted affinity on β_2 AR) was observed for the compound that has a tetracoordinated boron atom linked with two oxygen

Table 1

Chemical structures of the tested compounds

| Compound | R |
|----------|---|
| 1 | OH |
| 2 | CH ₃ |
| 3 | CH ₂ CH ₂ CH ₃ |
| 4 | CH(CH ₃) ₂ |
| 5 | CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ |
| 6 | CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ |
| 7 | CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ |
| 8 | CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ |
| 9 | CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ |
| 10 | CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ |

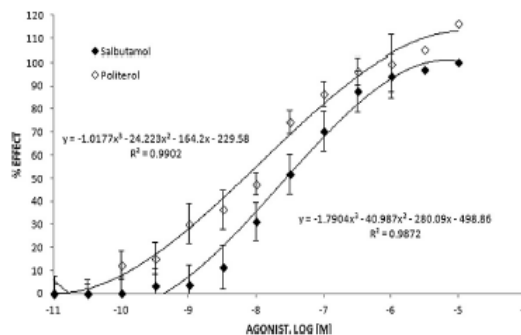


Figure 1. Calculated affinity by docking studies of 40 compounds tested on the 3-D model of a guinea pig β_2 AR structure.

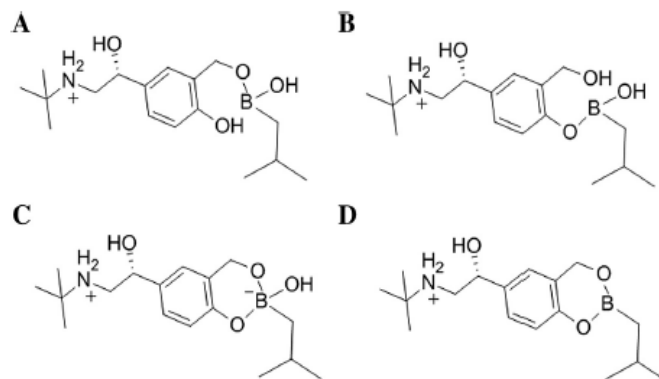


Figure 2. Possible adducts of salbutamol and 2-methylpropyl boronic acid.

atoms of the precursor (Fig. 2), this being ((*R*)-6-((*S*)-2-(*tert*-butylammonio)-1-hydroxyethyl)-2-hydroxy-2-isobutyl-4*H*-benzo[*d*] [1,3,2] dioxaborin-2-uide)), which we denominated 3C or politerol. There was an association between the presence of a tetracoordinated boron atom in this compound, a great number of contacts on the β_2 AR structure, and greater potency and efficacy. Like other potent and efficient β_2 AR agonists, politerol conserves characteristic nucleophilic moieties in its aromatic ring.¹³

The binding mode for this compound on the β_2 AR structure was similar to that found for salbutamol. Furthermore, we observed that key interactions between the receptor and this compound were the same as those reported for other well-known β_2 AR ligands. Accordingly, politerol (Fig. 3) showed interactions with residues constituting the orthosteric binding site (Asp113, Ser203, Ser207, Trp286, Phe289, Asn312),⁵ as well as with a pair of residues (Val114 and Ser165) currently not included as part of the active site (based on observations from crystal structures) but considered important in the recognition of ligands (Fig. 3C).¹⁴

It is noteworthy that the high affinity of politerol is apparently related to its ability to establish hydrogen bonds, electrostatic interactions, and a great number of hydrophobic interactions in the binding pocket. The tetravalent boron seems to be particularly important due to its partial negative charge, its effect on the hydroxyl moieties to which it binds, and its probable interaction with key residues in the TM5 of β_2 AR that induce a conformationally active state, as we previously suggested.³ However, it should be mentioned that other proposed structures without this negative charge also showed high affinity values and a great ability to interact with TM5 in our computational assays.

We chose politerol in order to explore the predicted effect of chemical structural changes on biological activity. It was synthesized under conditions similar to those employed for analogue compounds.³ Briefly, salbutamol and the 2-methylpropylboronic acid were interacted in a non-polar solvent and alkaline media (pH ~12) under constant heating.¹⁵ It should be mentioned that the other adducts were obtained under similar conditions, except for the alkaline media.

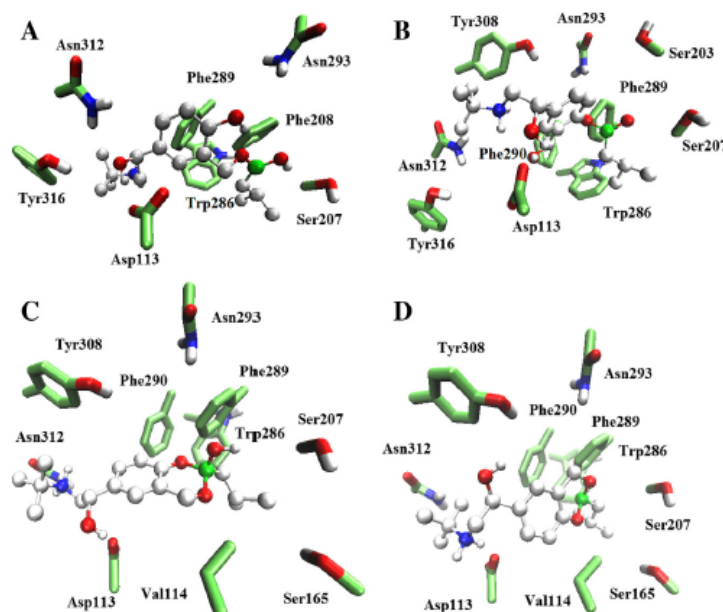


Figure 3. The binding pose of compounds 3A-D on the guinea pig β_2 AR. It should be noted that all four compounds are fitting in the orthosteric binding site, interacting through polar and Van Der Waals interactions and with the boron atom toward the fifth transmembrane domain.

Table 2

Affinity and efficacy values, estimated under *in vitro* assays as well as *in silico* studies, for salbutamol, isoproterenol and the boron-containing compound, politerol, designed in the present study

| Compounds | pK _d | | | Efficacy ^c (%) |
|---|-----------------|---------------|--|---------------------------|
| | In vitro | | In silico ^a | |
| | Basal tone | Precontracted | On GP-β ₂ AR model ^b | |
| Salbutamol | 6.96 | 6.61 | 4.97 (7.37) | 68–82 |
| Politerol | 8.29 | 7.55 | 5.38 (9.37) | 94 ± 2 |
| Isoproterenol | 7.60 | 7.75 | 6.12 (10.73) | 100 |
| Politerol/salbutamol pK _d ratio | 21.37 | 8.71 | 2.57 (100) | — |
| Isoproterenol/politerol pK _d ratio | 0.20 | 1.58 | 5.50 (22.90) | — |

^a Data shown were for R-forms of ligands.

^b In parenthesis are the corrected values in agreement with the theoretical/experimental correction reported.⁶

^c Ranking when taking into account efficacy as a smooth muscle relaxant in guinea pig tracheal rings precontracted with histamine, or from cell-based assays.

The chemical characterization of politerol was in agreement with data reported for compounds with a related structure.¹⁶ The greater affinity, according to the *in silico* assays, of politerol than salbutamol on the β₂AR structure was related to the greater potency found experimentally for the former compound. The pharmacological evaluation was based on the ability of politerol to relax smooth muscle in guinea pig trachea rings at basal tone and precontracted with histamine, using a previously described methodology.¹⁷ The effect of politerol was compared to that induced by salbutamol (a selective β₂AR partial agonist) or isoproterenol (a non-selective β-adrenoceptor full agonist).¹⁸ At basal tone pEC₅₀ values were 8.29 for politerol and 6.96 for salbutamol. When histamine was used as a precontractile agent, the values were 7.55 for politerol and 6.61 for salbutamol (Table 2; Fig. 4).

Hence, compared to salbutamol the experimentally determined EC₅₀ value for politerol was ~21 fold lower on tracheal rings at basal tone (Suppl. Fig. 1), but only ~9 fold lower on rings precontracted with histamine at 10 μM, indicating at least 8.71 times greater potency and a higher efficacy for the test compound for generating a smooth muscle relaxant effect (Table 2). The difference in the slopes of the dose-response curves when using tracheal rings at basal tone or precontracted is in accordance with previous reports.^{3,19}

ICI 118,551 (a selective inverse agonist) behaved as a competitive antagonist of the relaxant effect of politerol, suggesting that the relaxation is mediated by selective interaction with the β₂AR (Fig. 5). However, the pA₂ value for ICI 118,551 on politerol agonism was 9.72 (slope = 0.87), a value slightly higher than that reported on salbutamol agonism (ranking 8.60 to 8.90).²⁰ This

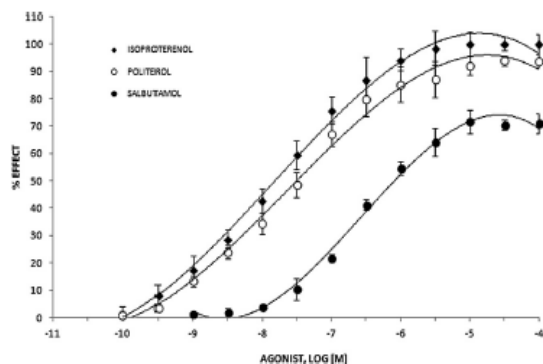


Figure 4. Effect of politerol, salbutamol and isoproterenol on isolated guinea pig tracheal rings precontracted by histamine at 10 mM. The maximum relaxant effect by isoproterenol was considered 100%. Each point represents the mean effect and vertical bars represent the SEM (n = 5). *Statistically significant difference compared with isoproterenol, p < 0.05.

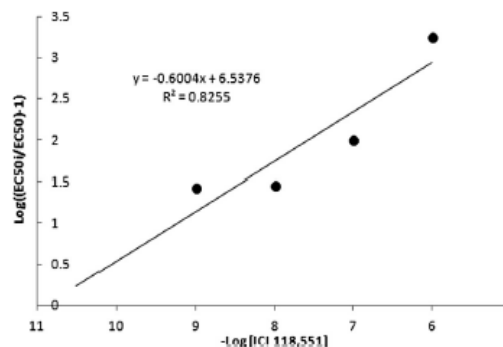


Figure 5. Schild regression applied to the antagonism of ICI 118,551 on the relaxant effect produced by politerol on guinea pig tracheal rings precontracted with histamine (n = 6).

phenomenon suggests that the relaxant effect of politerol could be triggered by additional mechanisms other than its interaction with the β₂AR (see below for a discussion of this topic).

As previously observed,³ the corrected theoretical values have a close relation to those found in the β₂AR experimental model, especially with precontracted guinea pig tracheal rings. Thus, in precontracted tissue the theoretical assays predict a greater potency for isoproterenol than politerol, and for politerol than salbutamol. On the other hand, with rings at basal tone politerol showed greater potency than either isoproterenol or salbutamol.

It is likely that the greater potency and efficacy observed for politerol is related to moieties linked to amine, the charges and stereoisomeric forms of proposed compounds, and the hydrogen bonds formed with hydroxyl groups in lateral chains of residues in TM5 of the β₂ARs.^{3,5} The current analysis highlights the importance of boron containing moieties and suggests that certain structural characteristics lend themselves to greater affinity on the β₂ARs, such as moieties with boron in a tetracoordinated rather than tricoordinated form and with greater hydroxyl exposure. It is also possible that the higher potency of politerol than salbutamol is due in part to the greater hindrance effects of the former ligand as well as its capability to bind to the TM5 domain (which has also been reported for other ligands with great hindrance effects).³ The arrangement of amino acids in TM4 to TM6 induced by these moieties is involved in the activation process, at least by the classic G-protein dependent pathway.⁵

Among researchers two topics are currently of great interest in the development of GPCR ligands—the interactions outside of the orthosteric site and the activation of G-protein independent pathways.²¹ Such pathways, specifically those related to activity of extracellular-regulated kinases and arrestins, have been linked to interactions between ligands and TM2 or TM7.³ However, in the

present study docking simulations showed poor interactions between the ligands and the residues of these two domains. These findings are in agreement with previous reports by our workgroup suggesting that a *tert*-butyl moiety linked to the amino in ligands is related to a decrease in potential activity of the G-protein independent pathways,⁵ and are also in accordance with the relationship established between the activity of some β_2 AR agonists and their functional selectivity.

In this sense, we have proposed a model that relates the possible pathways triggered by these receptors to the subset of residues that are reached by the ligands.⁵ Politerol seems to interact with residues related to the activation of the classic G-protein dependent pathway, but not to the activation of the Arrestin-pathways, evidenced by the poor interaction on the crevice superficial to the orthosteric site that is formed by the transmembrane domains 2, 3, 6 and 7.^{4,5} We propose a weak activation by these ligands of G-protein independent intracellular signaling. On the other hand, based on the distinct signalling pathways described in β_2 AR activation, we propose that action of several G-protein dependent pathways could account for the greater efficacy of politerol than salbutamol on this receptor. To clarify this and other questions raised by the present analysis, there is a need for further biological studies at the molecular level, especially those that explore the selectivity profile and activation of several pathways. Additionally, the pharmacokinetic profile of politerol should be studied in order to determine whether it has a greater half-life than salbutamol, as reported for analogous boron-containing compounds.²²

In conclusion, we found the docking of ligands (including several boron containing salbutamol derivatives) on refined structures of the β_2 AR to be an effective tool for evaluating potency and affinity, as well as for analyzing the importance of boron atom disposition in the ligands. Based on the results, we designed and synthesized a new boron containing compound that acts on the guinea pig β_2 AR with higher potency and efficacy than its precursor ($EC_{50} \leq 280$ nM, 100% compared to isoproterenol). The blocking activity of IC1 118,551 on the relaxant activity of politerol strongly suggests that this effect is mediated by selective β_2 AR activation. Future studies should be carried out in order to study the possible selectivity of politerol on adrenoceptors. Finally, the theoretical assays suggested that the tetra-coordinated boron atom in politerol could be key in the development of future selective, potent and efficient bronchodilators. Additional studies are required in order to establish the pharmacological profile of politerol as well as the pathways involved in the greater relaxant effect of this compound compared to salbutamol.

Acknowledgments

The authors thank the Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas, the Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP1650), and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT-CB 168116, 235785 & 132353), as well as to the Programa Iberoamericano De Ciencia Y Tecnología Para El Desarrollo (CYTED214RT0482), for support and scholarships. We thank Marcos A. Amezcua-Gutiérrez for their assistance in experiments and Bruce Allan Larsen for his review of the use of English in the manuscript.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.077>.

References and notes

1. Amezcua-Gutiérrez, M. A.; Ciprés-Flores, F. J.; Trujillo-Ferrara, J. G.; Soriano-Ursúa, M. A. *Curr. Drug Targets* **2012**, *13*, 1336.

2. (a) Cazzola, M.; Matera, M. G. *Clin. Chest Med.* **2014**, *35*, 191; (b) Hizawa, N. *Allergol. Int.* **2011**, *60*, 239.

3. (a) Soriano-Ursúa, M. A.; McNaught-Flores, D. A.; Nieto-Alamilla, G.; Segura-Cabrera, A.; Correa-Basurto, J.; Arias-Montañón, J. A.; Trujillo-Ferrara, J. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 933; (b) Soriano-Ursúa, M. A.; Correa-Basurto, J.; Valencia-Hernández, I.; Amezcua-Gutiérrez, M. A.; Padilla-Martínez, I. I.; Trujillo-Ferrara, J. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5623; (c) Soriano-Ursúa, M. A.; Valencia-Hernández, I.; Arellano-Mendoza, M. G.; Correa-Basurto, J.; Trujillo-Ferrara, J. G. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2840. Theoretical simulations were carried out as in previous reports.³ In brief, all compounds depicted in Table 1 were docked on the β_2 AR. For each ligand the 3-D structure was built and geometrically optimized at the B3LYP/6-31G* level with Gaussian 03 software. Docking simulations were carried out with tested compounds on the β_2 AR models. These simulations were performed using a commonly-used search algorithm (hybrid Lamarckian Genetic) implemented on AutoDock 4.2.1. To search for all potential binding sites on the β_2 AR, input initializations of the ligand structures and β_2 AR binding site definitions were carried out using a GRID-based procedure. A docking procedure using a box of $70 \times 70 \times 70$ Å point grid with 0.375-Å spacing was used, centered in the midpoint between α -carbon of the conserved amino acids Asp113 and Ser204. The lowest free-energy cluster returned for each compound was used for further analysis using AutoDock Tools 1.5.0. As well as the free energy and K_i values yielded from Autodock program were considered for estimating affinity values. The interactions of the ligands on β_2 AR were visualized and figures were created using AutoDock Tools v1.5.5 and VMD 1.8.6 Software.

4. Moore, R. H.; Millman, E. E.; Godines, V.; Hanania, N. A.; Tran, T. M.; Peng, H.; Dickey, B. F.; Knoll, B. J.; Clark, R. B. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2007**, *36*, 254.

5. (a) Wisler, J. W.; Xiao, K.; Thomsen, A. R.; Lefkowitz, R. J. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2014**, *27*, 18; (b) Soriano-Ursúa, M. A.; Trujillo-Ferrara, J. G.; Correa-Basurto, J.; Vilar, S. J. *Med. Chem.* **2013**, *56*, 8207.

6. (a) Vilar, S.; Karpiak, J.; Berk, B.; Costanzi, S. J. *Mol. Graph. Model.* **2011**, *29*, 809; (b) Ambrosio, C.; Molinari, P.; Cotecchia, S.; Costa, T. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 198.

7. Soriano-Ursúa, M. A.; Das, B. C.; Trujillo-Ferrara, J. G. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24*, 485.

8. (a) van der Westhuizen, E. T.; Breton, B.; Christopoulos, A.; Bouvier, M. *Mol. Pharmacol.* **2014**, *85*, 492; (b) Weiss, D. R.; Ahn, S.; Sassano, M. F.; Kleist, A.; Zhu, X.; Strachan, R.; Roth, B. L.; Lefkowitz, R. J.; Shoichet, B. K. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1018.

9. Soriano-Ursúa, M. A.; Farfán-García, E. D.; López-Cabrera, Y.; Querejeta, E.; Trujillo-Ferrara, J. G. *Neurotoxicology* **2014**, *40*, 8.

10. Segura-Cabrera, A.; García-Pérez, C. A.; Ciprés-Flores, F. J.; Cuevas-Hernández, R. I.; Trujillo-Ferrara, J. G.; Correa-Basurto, J.; Soriano-Ursúa, M. A. *Mol. Simul.* **2014**, *40*, 1244. Theoretical data were corrected by equation: Predicted $pK_a = (\text{Calculated } pK_a + 1.9842)/0.7859$.

11. Procopiou, P. A.; Barrett, V. J.; Biggadike, K.; Butchers, P. R.; Craven, A.; Ford, A. J.; Guntrip, S. B.; Holmes, D. S.; Hughes, S. C.; Jones, A. E.; Looker, B. E.; Mutch, P. J.; Ruston, M.; Needham, D.; Smith, C. E. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 159; Christopher, J. A.; Brown, J.; Doré, A. S.; Errey, J. C.; Koglin, M.; Marshall, F. H.; Myszk, D. G.; Rich, R. L.; Tate, C. G.; Tehan, B.; Warne, T.; Congreve, M. J. *Med. Chem.* **2013**, *56*, 3446.

12. (a) Pooport, C.; Rosemond, E.; Karpiak, J.; Deflorian, F.; Vilar, S.; Costanzi, S.; Weiss, J.; Kirk, K. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7987; (b) Karellas, P.; McNaughton, M.; Baker, S. P.; Scammells, P. J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6128.

13. (a) Mehta, R. C.; Salazar-Bookaman, M. M.; Fertel, R. H.; De Los Angeles, J.; Nikulin, V. I.; Fraundorfer, P. F.; Miller, D. D.; Feller, D. R. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 517; (b) Cazzola, M.; Page, C. P.; Rogliani, P.; Matera, M. G. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *187*, 690; (c) Connolly, S.; Alcaraz, L.; Bailey, A.; Cadogan, E.; Christie, J.; Cook, A. R.; Fisher, A. J.; Hill, S.; Humphries, A.; Ingall, A. H.; Kane, Z.; Paine, S.; Pairedeau, G.; Stocks, M. J.; Young, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4612.

14. (a) Feng, Z.; Hou, T.; Li, Y. J. *Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1005; (b) Ghosh, A.; Sonavane, U.; Joshi, R. *Comput. Biol. Chem.* **2014**, *48*, 29; (c) Katritch, V.; Reynolds, K. A.; Cherezov, V.; Hanson, M. A.; Roth, C. B.; Yeager, M.; Abagyan, R. *J. Mol. Recognit.* **2009**, *22*, 307.

15. General procedure for synthesis. Politerol was obtained by mixing equimolar amounts of *R*-salbutamol in a solution with pH~12 (NaOH) and 2-methyl propyl boronic acid, using 20 ml of toluene (v:v 1:2) for each gram of salbutamol; the mixture was vigorously stirred at 115 ± 5 °C for 4 h, in a reflux system. The reaction was monitored by thin-layer chromatography (TLC, silica gel 60 F_{254} , 0.25 mm), and the product visualized using a 254 nm UV lamp. Then, the solution was submitted to vaporization and the product obtained was precipitated and washed with methanol (3×30 ml). The resulting suspension was filtered and the products dried at 40 °C for 24 h.

16. The reaction was monitored by thin-layer chromatography (TLC, silica gel 60 F_{254} , 0.25 mm), and the product visualization was done using a 254 nm UV lamp. The uncorrected melting point was obtained in open-ended capillary tubes with an Electrothermal 9300 digital apparatus. The molecule obtained was identified by IR spectrum (recorded on a MIDAC M2000 FT-IR instrument, KBr), and by 1H , ^{13}C and ^{11}B NMR spectra (recorded at 270 MHz, 67.5 MHz, and 86.5 MHz, respectively) on a Joel GSX-270 spectrometer, using DMSO- d_6 as solvent and TMS as internal reference. EIMS (70 eV) experiments were determined on a Hewlett Packard 5989A mass spectrometer under the electron-impact ionization mode and by direct insertion. Additionally, the optical activity of our product was measured with an ERMA-1704 Optical Works polarimeter. The physical-spectral data of ((*R*)-6-((*S*)-2-*tert*-



- butylammonio)-1-hydroxyethyl)-2-hydroxy-2-isobutyl-4H-benzo[d][1,3,2]dioxaborinin-2-uide). White or beige powder; yield: 69%; mp: 208 ± 2 °C; $[\alpha]_D^{25}$ –0.47 (C = 0.0075, water); IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$, 3799, 3214, 2955, 1619, 1392, 1313; ^1H NMR (DMSO, 270 MHz) δ/ppm 0.98 (2H, d, H-P); 1.28 (9H, s, H-T); 1.31 (1H, d, H- δ); 1.82 (1H, dd, H-p); 1.92 (1H, s, H-BOH); 2.79 (1H, s, H-OH); 3.38 (2H, broad, H- α); 4.42 (2H, t, J = 5.9 Hz, H- β); 4.59 (1H, s, H- γ); 6.41 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-6); 6.82 (1H, d, H-5); 7.03 (1H, s, NH); 7.26 (1H, dd, 3J = 8.1 Hz, 4J = 2.0 Hz, H-3); ^{13}C NMR (DMSO, 67.5 MHz) δ/ppm 26.4 (C-P); 28.0 (C-T); 36.1 (C- δ); 50.4 (C- α); 52.5 (C-t); 61.9 (C- γ); 71.3 (C- β); 116.5 (C-6); 122.5 (C-3) 124.9 (C-5); 126.41 (C-2); 131.0 (C-4); 157.3 (C-1); ^{11}B NMR (DMSO, 86.5 MHz) δ/ppm 2.0 (B); m/z (EI) 324 [M⁺], 86 (100%).
17. For studying the in vitro politerol- β_2 AR agonist activity, the effects on guinea pig tracheal rings were assessed with a protocol approved by the bioethical committee of our Institution. All procedures with animals were conducted in accordance to the guidelines for Use and Care of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999, Ministry of Agriculture and Livestock, SAGARPA, Mexico), and the protocol was approved by the institutional committee for animal use. For evaluating the relaxation effects on isolated guinea pig tracheal ring; Male Hartley guinea pigs (weighing 325 ± 25 g) were sacrificed by an intraperitoneal overdose of sodium pentobarbital. Immediately, the trachea was dissected and withdrawn, tracheal rings (length ~ 5 mm) were prepared and mounted under a resting tension of 2 g in an organ bath containing 10 ml of Krebs–Henseleit solution: (in mM pH = 7.4): NaCl 189.6, KCl 5.98, CaCl₂ 2.5, MgSO₄·7H₂O 1.2, NaHCO₃ 25.0, KH₂PO₄ 0.16, and glucose 11.1, which was continuously perfused with a gas mixture (O₂ 95%, CO₂ 5%) and maintained at 37 °C. The relaxant effect induced by salbutamol or politerol was determined on basal tone or with precontracted (with histamine, 10 μM) isolated guinea pig tracheal rings. The maximum relaxant effect for isoproterenol was taken as 100% and the cumulative concentration–response curves were established for salbutamol and politerol (from 0.01 nM to 0.1 mM). Additional experiments were carried out by comparing the maximal relaxant effect induced for isoproterenol, salbutamol or politerol on histamine (10 μM) precontracted isolated guinea pig tracheal rings.
- The effects of ICI-118,551 on the politerol response were evaluated in guinea pig tracheal rings precontracted with histamine (10 μM), then incubated with ICI 118,551 (1 nM–1 M). Five minutes later, politerol was added to the organ bath at concentrations from 0.01 nM to 0.1 mM, and the maximum relaxation produced by politerol was taken as 100%. The concentration–response curves of politerol in the absence and presence of ICI 118,551 were established. EC₅₀ and pA₂ values were obtained by WinNonlin™ Ver 2.1 (Pharsight Corporation, CA, USA), and antagonist potency was expressed with pA₂ values obtained from Schild plotting. Histamine phosphate, isoproterenol, ICI 118,551, and (R)-Salbutamol were purchased from Sigma–Aldrich® (St. Louis MO, USA).
18. The biological test results are expressed as mean values ± standard error of the mean (SEM) of at least six experiments. Statistical significance of differences between groups was verified with two-way analysis of variance (ANOVA), with a confidence limit of 95%.
19. (a) Fedan, J. S.; Nutt, M. E.; Frazer, D. G. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, *190*, 337; (b) Jing, Y.; Dowdy, J. A.; Van Scott, M. R.; Fedan, J. S. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *598*, 98.
20. Gan, L. L.; Wang, M. W.; Cheng, M. S.; Pan, L. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 323.
21. (a) Christopoulos, A.; Changeux, J. P.; Catterall, W. A.; Fabbro, D.; Burris, T. P.; Cidlowski, J. A.; Olsen, R. W.; Peters, J. A.; Neubig, R. R.; Pin, J. P.; Sexton, P. M.; Kenakin, T. P.; Ehlert, F. J.; Spedding, M.; Langmead, C. J. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66*, 918; (b) Tautermann, C. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4073.
22. Soriano-Ursúa, M. A.; Correa-Basurto, J.; Romero-Huerta, J.; Elizalde-Solis, O.; Galicia-Luna, L. A.; Trujillo-Ferrara, J. G. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* **2010**, *25*, 340.



b) 2 publicaciones en memorias de congreso

OMICS International
conferenceseries.com

Christian F Hernández-Martínez et al., Med chem 2015, 5:10
<http://dx.doi.org/10.4172/2161-0444.C1.016>

4th International Conference on

Medicinal Chemistry & Computer Aided Drug Designing

November 02-04, 2015 Atlanta, USA

Synthesis, characterization and evaluation of arylamines in a murine model of obesity

Christian F Hernández-Martínez, Marvin A Soriano-Ursúa and José G Trujillo-Ferrara
Instituto Politécnico Nacional, Mexico

The human β_3 adrenergic receptor (β_3 AR) is mainly expressed in white and brown adipocyte tissue, its activation is associated with lipolysis and thermogenesis; therefore it has become an attractive target for the treatment of some metabolic diseases. The aim of this job is to perform rational design of dopamine derivatives with *in silico* study for getting good affinity and efficacy on β_3 AR and then synthesize the most promising compounds for further evaluation in a murine model of obesity. Two compounds were chosen (Doprotec and Dop1) for their synthesis. The compounds were evaluated in a murine model of obesity using male C57BL/6 mice of which underwent low calorie diet or high calorie diet. The *in silico* study results of β_3 AR demonstrate that the presence of boron promote affinity and voluminous substituents on the amino group enhance selectivity. Synthetic methods used are suitable for generating dopamine derivatives substituted at the amino group generating good yields thus, high purity. Doprotec compound has an action on the body weight and significantly lowers glucose levels, triglycerides and cholesterol in plasma, whereas only dop1 decreases triglycerides and cholesterol. The suggested mechanism by which Doprotec acts on body weight include: 1) Direct effects on adipose tissue by modifying the lipid metabolism through activation of β_3 AR inducing lipolysis, and 2) Modifying the secretory pathway of other hormones that regulate metabolism.

Biography

Christian F Hernández-Martínez is a Master's student in Pharmacology Science in the Escuela Superior de Medicina at Instituto Politécnico Nacional. He is a Pharmacist and currently has different research lines that include activating adrenergic receptors, obesity and synthesis of boron-containing compounds.

cri16fhm@gmail.com

Notes:



Evaluation of a series of phenylethylamine derivatives as β 3-adrenoceptor agonist on the treatment of obesity

Ernesto Daniel Guevara Avendaño, Christian Fernando Hernández Martínez, José Bribiesca Carlos, Erik Andrade Jorge, José Guadalupe Trujillo Ferrara.

Instituto Politécnico Nacional, México

Biography

Ernesto Daniel Guevara Avendaño is medical student at Escuela Superior de Medicina at Instituto Politécnico Nacional. He is a young researcher at Biochemistry Department since 2014. He is interested on development of new drugs on different research lines such as obesity, asthma, depression and Parkinson's disease. His actual work is focused on drug design for obesity therapy.

Abstract

Obesity is a chronic disease associated with the increase in morbidity of diabetes, hypertension, metabolic syndrome and cancer. Current drugs used in therapy stimulate the central nervous system and can cause unwanted sympathomimetic effect that may limit the use of these, here is the importance of research for new drugs with better defined target such is the case β 3-adrenoceptor (β 3AR). The purpose of studying β 3AR is its participation in thermogenesis and lipolysis. The aim of the present work was to develop a series of ligands with higher affinity for the β 3AR and characterize their activity in an in vitro and in vivo model. The in silico results suggest that the best molecules were IsF6S-15, IsF8R-15, IsF8S-15 and IsF9-15 satisfying the Lipinski's rules of 5. The molecule IsF1-15 was synthesized and characterized by NMR, IR and Mass spectrometry, then was tested in an in vivo model of obesity with male C57BL/6 mice. In vivo experiments showed that molecule IsF-15 have an significant effect on the decrease in weight ($p < 0.05$), very similar to the reference, clobenzorex, which is currently used in México, other parameter that was modified was the triglycerides levels that had a significant decrease even more than clobenzorex. The glucose levels were not modified compared with the hypercontrol, this suggests that IsF-15 do not have significant effect on glucose and also cholesterol levels were similar to the control group. These results lead us to continue the research for phenylethylamine derivatives and their effect on β 3AR on obesity therapy.