



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SÁN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Químico Farmacobiología

“Síntesis y evaluación *in silico* de derivados de nitrendipina como inhibidores de la enzima aldosa reductasa”

**TESIS**

Para obtener el grado de:

Licenciado en Químico Farmacobiología

Presenta:

p.Q.F.B. OSCAR GERARDO GÁLVEZ COOK

Asesor:

DC. ZURISADDAI HÉRNADEZ GALLEGOS

Morelia, Michoacán

Junio 2020

Este trabajo se realizó en los Laboratorios de Química y Farmacoquímica del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del D.C. Zurisaddai Hernández Gallegos. La realización del trabajo contó con el apoyo financiero de la Coordinación de la Investigación Científica de la U.M.S.N.H (Programa de Investigación 2020. Proyecto 13884) y del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PRODEP. Fortalecimiento de Cuerpos Académicos 2019. Cuerpo Académico de Bioquímica, UMSNH-CA-75)

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	IV
<b>RESUMEN</b> .....	V
<b>ABSTRACT</b> .....	VI
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	- 1 -
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	- 3 -
Vía de los polioles .....	- 3 -
Aldosa reductasa.....	- 5 -
Inhibidores de la enzima AR .....	- 7 -
Compuestos 1,4-dihidropiridina .....	- 9 -
Aspectos químicos de las 1,4-dihidropiridinas .....	- 10 -
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	- 12 -
Objetivo general .....	- 12 -
Objetivos específicos .....	- 12 -
<b>IV. METODOLOGÍA</b> .....	- 13 -
Síntesis Química.....	- 13 -
Docking Molecular .....	- 13 -
Estudio <i>in silico</i> ADME .....	- 13 -
<b>V. MATERIALES</b> .....	- 15 -
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	- 16 -
Síntesis Química.....	- 16 -
Docking Molecular .....	- 22 -
Estudio <i>in silico</i> ADME .....	- 28 -
<b>VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	- 29 -
Resultados químicos. ....	- 29 -
Docking molecular .....	- 33 -
Estudio <i>in silico</i> ADME .....	- 34 -

VIII. CONCLUSIÓN.....	- 35 -
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	- 36 -

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de los polioles (Brownlee, 2006).....	- 4 -
Figura 2. Compuestos propuestos por Dvornick y Varma (1973) como inhibidores de la enzima AR. ....	- 5 -
Figura 3. Estructura de rayos X de la enzima Aldosa Reductasa (Wilson, 2008)-	6 -
Figura 5. Ejemplos de inhibidores derivados de espirohidantoína y ácido carboxílico.	- 8 -
Figura 4. Sitios de unión propuestos para el sitio activo de la AR (Zhu, 2013)-	7 -
Figura 6. Métodos más comunes de la síntesis de Hantzsch para las DHPs...-	11 -
Figura 7. Interacción de la nitrendipina con la enzima AR.....	- 23 -
Figura 8. Interacción de la DHP <b>1</b> con la enzima AR.....	- 23 -
Figura 9. Interacción de la DHP <b>2</b> con la enzima AR.....	- 24 -
Figura 10. Interacción de la DHP <b>3</b> con la enzima AR.....	- 24 -
Figura 11. Interacción de la DHP <b>4</b> con la enzima AR.....	- 25 -
Figura 12. Interacción de la DHP <b>5</b> con la enzima AR.....	- 25 -
Figura 13. Interacción de la DHP <b>6</b> con la enzima AR.....	- 26 -
Figura 14. Interacción de la DHP <b>7</b> con la enzima AR.....	- 26 -
Figura 15. Interacción de la DHP <b>8</b> con la enzima AR.....	- 27 -
Figura 16. Mecanismo de reacción propuesto de la síntesis de las DHPs de la serie.	- 32 -

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura y propiedades físicas de las DHPs sintetizadas.....	16
Tabla 2. Relación de interacciones de DHPs con la enzima AR.....	27
Tabla 3. Resultados obtenidos del estudio <i>in silico</i> A.D.M.E .....	28

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AR: Aldosa reductasa

SDH: Sorbitol deshidrogenasa

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

DHP: 1-4, dihidropiridinas

PM: Peso molecular

kDa: Kilodaltones

Tyr: Tirosina

His: Histidina

Trp: Triptófano

Leu: Leucina

Cys: Cisteína

Phe: Fenilalanina

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

PDB: Protein Data Bank

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

MHz: Megahertz

TMS: Trimetilsilano

CDCl<sub>3</sub>: Cloroformo deuterado

ppm: partes por millón

$\delta$ : desplazamiento químico

## RESUMEN

La enzima aldosa reductasa (AR) ha sido relacionada con las secuelas resultantes de la diabetes. Esta enzima pertenece a la vía de los polioles, que es la encargada principal del metabolismo de glucosa en condiciones de hiperglucemia. La AR convierte la glucosa en sorbitol, que a su vez es oxidado a fructosa por la sorbitol deshidrogenasa (SDH). En la hiperglucemia se incrementa la actividad de la AR, no así de la SDH, acumulándose el sorbitol que aumenta la presión osmótica, originándose daño celular en los riñones, el tejido nervioso, la retina y el cristalino. Hay una gran gama de inhibidores de la AR, pero su toxicidad ha impedido su aplicación clínica. Un estudio previo indica que la nitrendipina y la nifedipina, fármacos antihipertensivos de tipo 1,4-dihidropiridina (DHP), pueden inhibir la AR. Asimismo, modelos de interacción entre DHPs y AR señalan la participación del sustituyente en el anillo 4-fenilo. El presente trabajo reporta la síntesis y el estudio *in silico* de la interacción con la AR con análogos de nitrendipina que difieren en el sustituyente del anillo 4-fenilo. La síntesis fue realizada mediante una variante de la reacción de Hantzsch, mientras que la interacción de las DHPs con la AR fue realizada usando la técnica de anclaje molecular (docking). Se obtuvieron ocho DHPs y se caracterizaron por RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , teniéndose rendimientos del 20.82% al 66.98%. Los estudios de docking indican energías de unión de -6.4 a -6.9 kcal/mol para la interacción con la AR, lo cual, al comparar con la energía de unión de la nitrendipina, de -6.4 Kcal/mol, sugiere que las DHPs sintetizadas pueden inhibir a la enzima AR.

Palabras clave: aldosa reductasa, hiperglucemia, 1,4-dihidropiridinas, docking molecular, estudios *in silico*.

## ABSTRACT

The enzyme aldose reductase (AR) has been linked to the sequelae resulting from diabetes. This enzyme belongs to the polyol pathway, which is the main body responsible for glucose metabolism in hyperglycemic conditions. AR converts glucose to sorbitol, which in turn is oxidized to fructose by sorbitol dehydrogenase (SDH). In hyperglycemia, the activity of AR increases, but not SDH, accumulating sorbitol that increases osmotic pressure, causing cellular damage in the kidneys, nervous tissue, the retina and the lens. There is a wide range of AR inhibitors, but their toxicity has prevented their clinical application. A previous study indicates that nitrendipine and nicardipine, 1,4-dihydropyridine-type antihypertensive drugs (DHP), can inhibit AR. Likewise, models of interaction between DHPs and AR indicate the participation of the substituent on the 4-phenyl ring. The present work reports the synthesis and *in silico* study of the interaction with AR of nitrendipine analogues that differ in the substituent on the 4-phenyl ring. The synthesis was performed using a variant of the Hantzsch reaction, while the interaction of DHPs with AR was performed using the molecular anchoring technique (docking). Eight DHPs were obtained and characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, with yields ranging from 20.82% to 66.98%. Docking studies indicate binding energies of -6.4 to -6.9Kcal/mol for interaction with RA, suggesting that synthesized DHPs may bind and inhibit AR.

Key words: aldose reductase, hyperglycemia, 1,4-dihydropyridine, molecular docking, *in silico* studies.

# I. INTRODUCCIÓN

La *diabetes mellitus* representa uno de los principales problemas de salud pública en México. Es un desorden en el metabolismo de carbohidratos causado por una falta de producción de insulina o incapacidad del organismo para utilizarla de manera adecuada, acumulando así la glucosa en la sangre. A esta condición se le conoce como hiperglucemia y afecta a los órganos no dependientes de insulina, como: riñón, retina, cristalino, corazón y sistema nervioso, en los cuales se presentan las complicaciones crónicas características de esta enfermedad. Mantener niveles altos de glucosa activa vías metabólicas alternativas cuyos productos pueden afectar la función celular de diferentes tejidos. Estudios realizados durante el siglo pasado y el actual indican que la vía de los polioles tiene relación con complicaciones causadas por este estado de salud. Se ha demostrado que en condiciones normaglicémicas esta vía metaboliza sólo el 3% de la glucosa intracelular, pero en condiciones de hiperglicemia su actividad aumenta metabolizando hasta un 30%. En esta vía participan dos enzimas, la Aldosa Reductasa (AR) y Sorbitol Deshidrogenasa (SDH). La AR controla esta vía y es la primera enzima en esta vía metabólica, se activa al estar en contacto con la glucosa y la coenzima NADPH catalizando la reducción de la glucosa en sorbitol. La SDH es la segunda enzima participante en la vía y cataliza la transformación del sorbitol en fructuosa asociada a la formación de NADH. El aumento en el flujo de esta vía conduce a la alteración osmótica de la célula, por la acumulación intracelular de sorbitol, así como a un estrés oxidativo que a la postre se traducen en complicaciones diabéticas. Por esto es de gran importancia la búsqueda de inhibidores de la AR para el control o retardo en las complicaciones generadas por la hiperglucemia crónica. A la fecha se han reportado un gran número de inhibidores de

la enzima AR, pero su toxicidad y efectos colaterales severos han impedido su aplicación clínica. Por esto es importante el diseño y descubrimiento de inhibidores de la enzima AR más seguros, que puedan tener uso terapéutico para la prevención de complicaciones de la diabetes. Recientemente se han reportado que compuestos de tipo 1,4-dihidropiridnas (DHP) tienen efecto inhibitorio sobre la AR. Las DHPs son fármacos utilizados terapéuticamente para el tratamiento de la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares y la experiencia clínica indica que son fármacos seguros con pocos efectos secundarios. Entre las DHPs que presentan efecto inhibitorio de la AR se tiene a la nitrendipina, cuya síntesis es relativamente sencilla, por lo que en el presente trabajo se tuvo como propósito el diseño y síntesis de una serie de DHPs análogas de nitrendipina, así como la evaluación *in silico* de su interacción con la enzima AR.

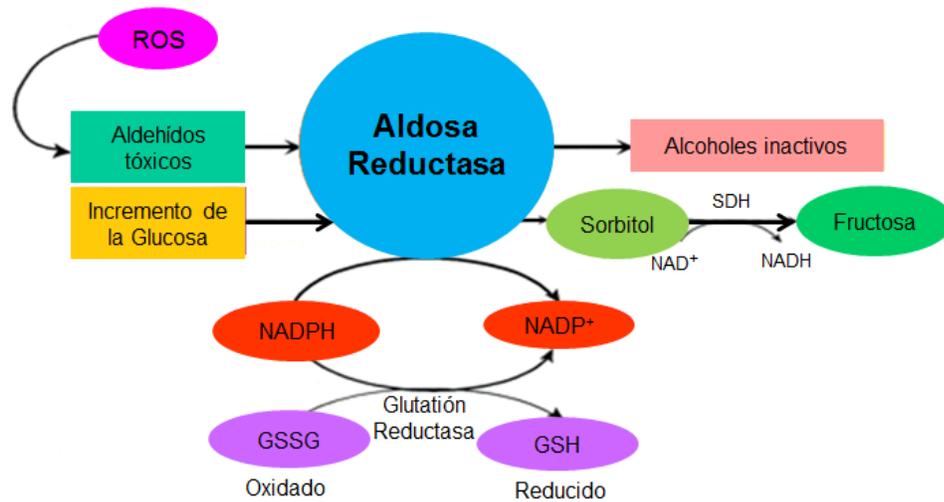
## II. ANTECEDENTES

### Vía de los polioles

La ruta de los polioles es una vía metabólica alternativa en donde la enzima AR cataliza la reducción de la glucosa en sorbitol (Figura 1). Esta vía se ha relacionado con la retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética y complicaciones vasculares, debido a la acumulación intracelular de sorbitol y a las condiciones de estrés oxidativo provocado por la hiperglucemia crónica. Cabe mencionar que la vía de los polioles tiene funciones en diferentes concentraciones de glucosa, en niveles fisiológicos solo metaboliza el 3% de la glucosa a sorbitol y en estas condiciones la AR tiene función de desintoxicación celular (Morrison 1970). Sin embargo, en condiciones de hiperglucemia hasta un 30% de glucosa es reducida a sorbitol, que no puede ser oxidado rápidamente a fructuosa mediante la enzima SDH (González, 1984). Además, en este proceso de reducción de glucosa a sorbitol la AR utiliza la coenzima NADPH que es esencial para la generación intracelular de glutatión reducido y al disminuir la cantidad de glutatión reducido aumenta la susceptibilidad de estrés oxidativo intracelular (Petrash *et al.*, 2004; Brownlee, 2006).

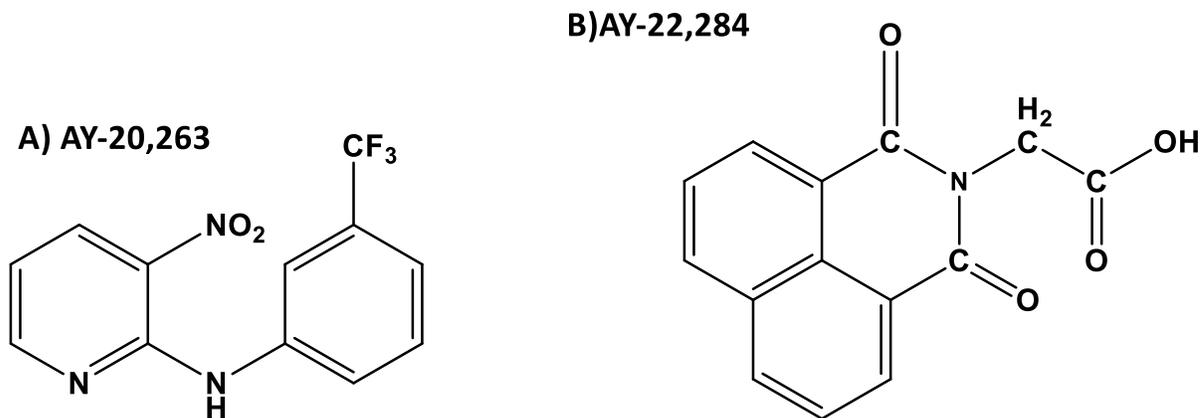
En la década de los 60s, Hers (1960) describió la vía de los polioles en la vesícula seminal y demostró la síntesis de fructuosa y sorbitol a partir de glucosa por medio de esta vía. En 1962 van Heyningen descubrió que se podía inducir catarata en animales elevando el nivel plasmático de un azúcar aldosa (glucosa, xilosa), que sirven de sustrato para la enzima AR. Bajo estas condiciones se demostró la acumulación del polirol correspondiente dentro de la lente ocular, cuya concentración está directamente relacionada con la rapidez con la que se desarrollan las cataratas. En 1963, Kinoshita y su equipo de trabajo encontró que el efecto osmótico de la acumulación de los polioles dentro de las células de la lente conduce la

entrada de agua resultando el edema celular, disfunción metabólica y eventual muerte celular. Con estos y otros argumentos Kinoshita postuló su hipótesis osmótica. Además, en 1968, planteó que la formación de catarata puede prevenirse mediante la adición de inhibidores de la enzima AR.



**Figura 1.** Vía de los polioles (Brownlee, 2006)

La hipótesis de Kinoshita fue comprobada por Dvornick (1973), quien sintetizó uno de los primeros inhibidores de la enzima AR derivado de la toluidina (llamado AY-20,263; Figura 2) y reportó que la hinchazón de la lente fue menor cuando fue sometida a este tratamiento. A su vez, Varma (1973) encontró que la aplicación tópica del fármaco AY-22,284 retrasó la opacidad de las cataratas en el transcurso de una semana.



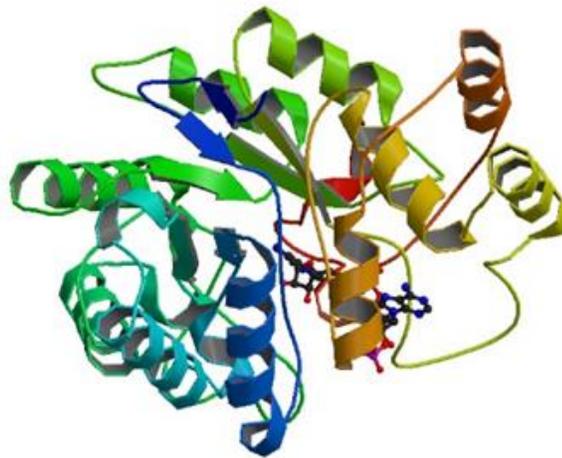
**Figura 2.** Compuestos propuestos por Dvornick y Varma (1973) como inhibidores de la enzima AR.

## Aldosa reductasa

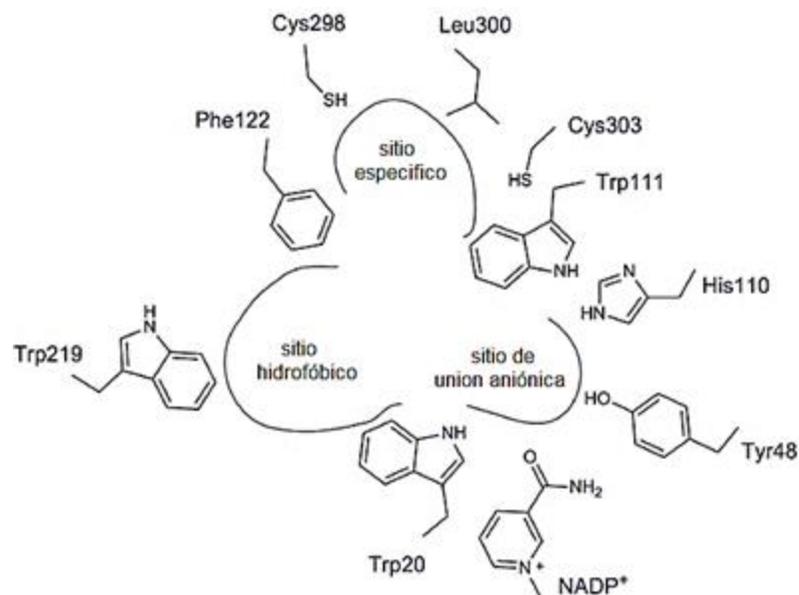
La enzima AR (Figura 3) está conformada por 316 residuos de aminoácidos (PM=36kDa) (Schade *et al.*, 1990; El-Kabbani *et al.*, 2004) y es miembro de la familia de aldo-ceto reductasa (AKR) (Bennet *et al.*, 1997). Esta familia cataliza reacciones redox involucradas en la biosíntesis, metabolismo intermedio y desintoxicación. Además de la glucosa, la AR utiliza otros sustratos como lo son esteroides, productos finales de glicación, productos de peroxidación lipídica y contaminantes ambientales. Debido a su amplia variedad de sustratos la AR tiene un papel importante en la desintoxicación de productos farmacéuticos, drogas y xenobióticos. Esta enzima modula la vía de los polioles reduciendo la glucosa en sorbitol en presencia de NADPH como coenzima. En 1992 se publicaron las primeras dos estructuras de la AR, provenientes de placenta humana y porcina. Estructuralmente, están compuestas por un motivo proteico  $\alpha/\beta$  barril que contiene ocho láminas  $\beta$  paralelas conectadas por ocho hélices  $\alpha$  periféricas. El sitio activo se encuentra en el extremo C-terminal del barril  $\beta$  y el cofactor NADPH se une en una conformación extendida a la parte inferior del sitio activo (Rondeau *et al.*, 1992; Barski *et al.*, 2008). Los estudios

cristalográficos y de modelaje molecular de la enzima AR (Wilson *et al.*, 1992), demuestran que la conformación del sitio puede cambiar dependiendo del ligando unido a la AR, confirmando con ello la flexibilidad del sitio activo.

El sitio activo de la AR está formado a su vez por tres sub-sitios (Figura 4). El primero de ellos es llamado sitio de unión aniónica, que está conformado por las cadenas laterales de Tyr48, His110, Trp20, y Trp111. El segundo es conocido como sitio específico que lleva los residuos de Leu300, Cys298, Cys303, Trp111, Cys303 y Phe122. El sitio específico muestra un elevado grado de flexibilidad molecular y los residuos que conforman este sitio no son conservados. El tercero es un sitio hidrofóbico formado por los residuos Trp20, Trp111, Phe122 y Trp219 (Urzhumtsev *et al.*, 1997; Alexiou, 2009; Zhu, 2013).



**Figura 3.** Estructura de rayos X de la enzima Aldosa Reductasa (Wilson, 2008)



**Figura 4.** Sitios de unión propuestos para el sitio activo de la AR (Zhu, 2013)

## Inhibidores de la enzima AR

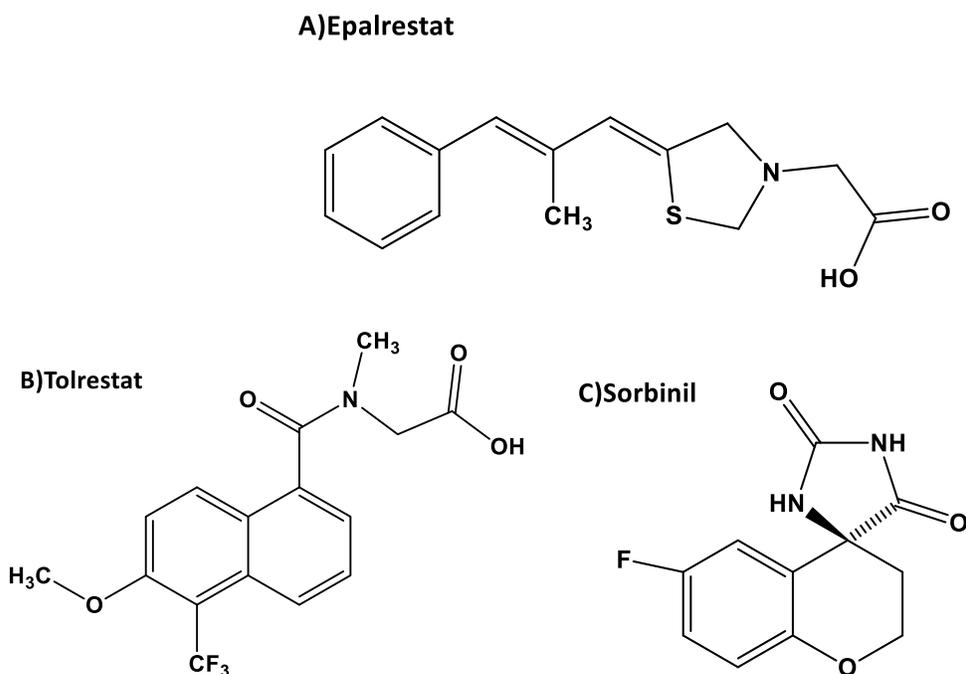
En las últimas décadas se han reportado un gran número de compuestos inhibidores de la enzima AR con base en estudios *in vitro*. Sin embargo, muy pocos compuestos han alcanzado la fase de estudios clínicos debido a que poseen una farmacocinética pobre o efectos colaterales severos. En la actualidad los inhibidores de la enzima AR se dividen en dos grupos (Figura 5).

**Derivados del ácido carboxílico:** a este grupo pertenecen el tolrestat, epalrestat y zopolrestat, siendo epalrestat el único inhibidor disponible en China actualmente utilizado para tratar las complicaciones de la hiperglucemia crónica como la neuropatía y nefropatía diabética (Alexiou *et al.*, 2009; Zhu, 2013).

**Derivados de espirohidantoína:** En este grupo es característico en el anillo hidantoína, el cual interacciona con la enzima AR. El desarrollo de este tipo de inhibidores fue una solución ante el inadecuado perfil farmacocinético de los derivados de ácido carboxílico, pero a pesar

de contar con mejores propiedades sus efectos secundarios como lo son erupción cutánea, hipersensibilidad o toxicidad hepática, han evitado su uso clínico (Jaspan *et al.*, 1985).

Sorbinil es el compuesto más característico de este grupo.



**Figura 5.** Ejemplos de inhibidores derivados de espirohidantoína y ácido carboxílico.

Los inhibidores de la enzima AR tienen como característica común la presencia de uno o más anillos aromáticos que se unen de manera hidrofóbica con la región lipofílica de la enzima (El Kabbani *et al.*, 2004). En 1993, se realizó una comparación de la estructura de una holoenzima con el complejo AR-zopolrestat donde se encontraron cambios conformacionales en los residuos 121-135 y 298-305 que facilitaban la unión de inhibidor (Wilson *et al.*, 1992). En 1997 se observó que en los complejos cristalinos con la enzima AR el tolerestat y el sorbinil se unían también en el sitio activo. Se estableció un bolsillo de especificidad que presenta los residuos de Trp111, Phe122 y Leu300 (Wilson *et al.*, 1993).

La posibilidad de inhibir la enzima AR ha promovido la búsqueda de fármacos con este fin. Dentro de los abordajes para realizar esto, el docking molecular es uno de los métodos *in silico* más utilizados para el diseño de fármacos debido a su capacidad para predecir la unión de ligandos (fármacos) a un sitio de unión en una proteína. La información que proporciona esta técnica incluye la energía de unión, así como la propuesta de modelos interacción del ligando con la enzima (mostrando interacciones de puentes de hidrógeno, interacciones pi-pi, fuerzas de Van der Waals, etc., entre el ligando y la proteína). Esta información sirve para dilucidar si los fármacos estudiados pueden ser prospectos a futuras pruebas *in vitro*. En el caso particular de la enzima AR, ya en 1998 Lee y colaboradores usaron este tipo de metodología para estudiar la unión a esta enzima de seis inhibidores estructuralmente diversos, obteniendo modelos vinculantes de los inhibidores al sitio activo de la enzima. El modelo obtenido estaba de acuerdo con los datos experimentales (de rayos X) que indicaban que los inhibidores estudiados interactuaban con los aminoácidos Trp48, His110 y Trp111, que están en el sub-sitio de unión aniónica del sitio activo de la AR.

## Compuestos 1,4-dihidropiridina

Las DHPs son compuestos conocidos desde 1882 cuando Hantzsch las utilizó como intermediarios para la obtención de piridinas. Estos compuestos fueron de poco interés hasta la década de 1960's, cuando Albrecht Fleckenstein demostró que la nifedipina (el prototipo de las DHPs) abolió la contracción inducida por calcio en músculo papilar de cobayo, efecto que podía ser superado al aumentar las concentraciones de calcio extracelulares; razón por la que se les llamó antagonista de calcio. Poco después se precisó que las DHPs no eran antagonistas (competitivos) de calcio, sino que interactúan con la subunidad  $\alpha_1$  de los

canales activados por voltaje tipo L, provocando que estos canales permanezcan cerrados más tiempo, bloqueándose la entrada de calcio extracelular que conlleva a una relajación de los vasos sanguíneos. Actualmente las DHPs son utilizadas en clínica para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares incluyendo hipertensión. Estudios de investigación básica han mostrado que las DHPs además de sus efectos cardiovasculares, presentan otros efectos farmacológicos como son: efecto analgésico, antiinflamatorio, antituberculoso, actividad tanto bacteriana como antiparasitaria. También tienen una actividad antioxidante con la peroxidación lipídica, produciendo radicales libres en el proceso de oxidación por donación de protones. (Swarnalatha *et al.*, 2011).

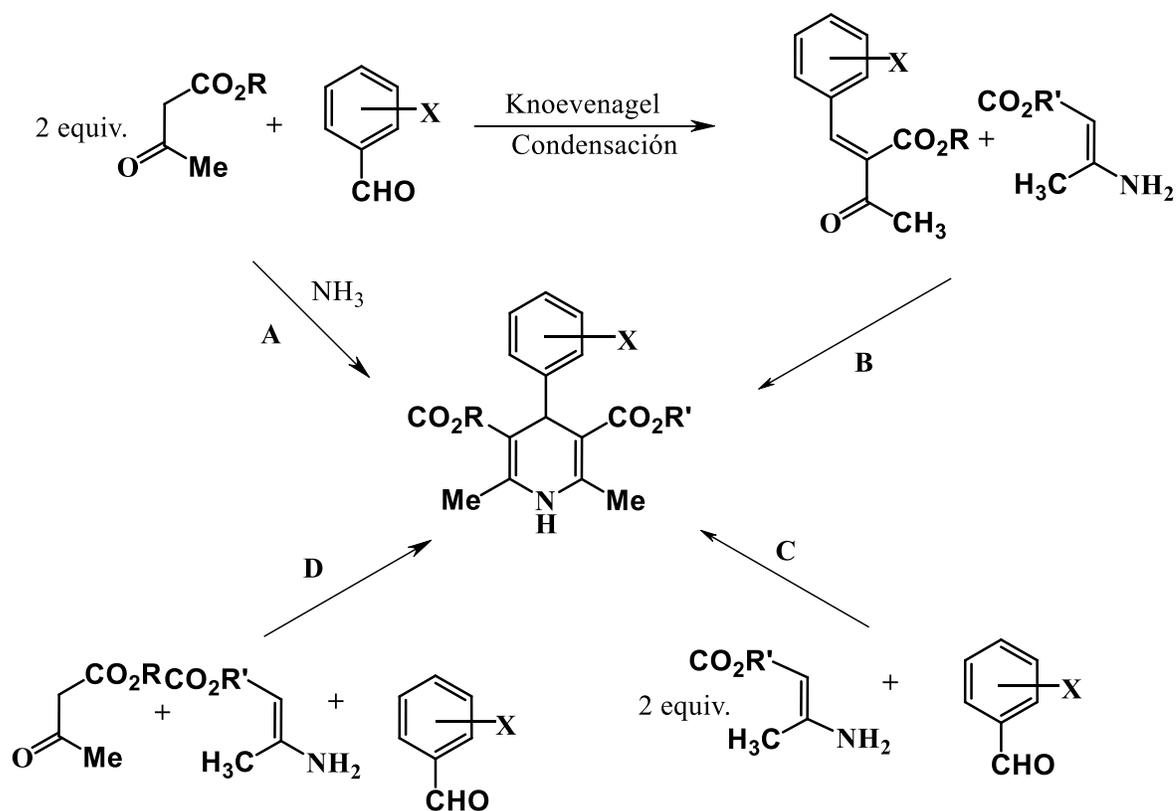
Estudios actuales han señalado que las DHPs también presentan efecto inhibitor de la enzima AR. Actualmente se tiene estudios en donde la nitrendipina tiene buen efecto inhibitorio sobre la enzima AR, reportando que la nitrendipina presenta una inhibición del 70% de la enzima AR (Montes-Vega, 2015). Recientemente se realizó estudios con nitrendipina y nifedipina, entre otros, concluyendo que uso de estos puede ser beneficioso para el tratamiento de las complicaciones de las diabetes. (Türkeş *et al.*, 2019).

## Aspectos químicos de las 1,4-dihidropiridinas

Las DHPs son compuestos sólidos (generalmente cristales) que presentan punto de fusión arriba de 100°C. En el caso de la nicardipina y amlodipina, compuestos de carácter básico, pueden ser obtenidas en forma de sales, principalmente de clorhidratos. Las DHPs son pocos solubles en agua, pero solubles en varios solventes orgánicos, acetona, diclorometano, cloroformo, dimetilsulfóxido, etc., por lo que tiene la característica de ser lipofílicos.

El método más general para la síntesis de DHPs está basado en la reacción de Hantzsch. Esta reacción consiste en hacer reaccionar un compuesto  $\beta$  dicarbonílico, un aldehído

(benzaldehído sustituido) y amoniaco (en proporción 2:1:1) para dar una dihidropiridina sustituida. Además de la síntesis clásica, también se han sido reportadas algunas variantes de la reacción de Hantzsch (figura 6); de estas variantes, los métodos A y C son solamente aplicables para la síntesis de DHPs con sustituyentes iguales en los ésteres ( $R = R'$ ), mientras que los métodos B (síntesis de dos pasos vía el intermediario de Knoevenagel) y D (ciclocondensación de tres componentes) se utilizan generalmente para la síntesis de DHPs que tiene diferentes sustituyentes en los ésteres ( $R \neq R'$ ). Es por esto que utilizamos la variación D, para así poder tener diferentes sustituyentes en los ésteres y así poder tener la serie de DHPs propuesta para este trabajo.



**Figura 6.** Métodos más comunes de la síntesis de Hantzsch para las DHPs.

### III. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Sintetizar una serie de 8 DHPs, análogas a nitrendipina, que presentarán diferentes sustituyentes en el anillo aromático, como posibles inhibidores de la enzima aldosa reductasa.

#### Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones de reacción adecuadas para la síntesis de DHPs mediante la variante de la reacción de Hantzsch.
2. Caracterizar las estructuras de las DHPs sintetizadas mediante resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-<sup>1</sup>H) y de carbono (RMN-<sup>13</sup>C).
3. Modelar mediante docking (anclaje) molecular la interacción de las DHPs sintetizadas con la enzima aldosa reductasa.

## IV. METODOLOGÍA

### Síntesis Química

La preparación de las DHPs se hizo mediante una modificación de la reacción de Hantzsch. El procedimiento general que se utilizó para la síntesis de DHPs fue colocar en un matraz bola de 50mL una solución de benzaldehído sustituido, 3-metilacetoacetato y 3-etilaminocrotonato en isopropanol. La reacción fue mantenida en reflujo con agitación magnética de 18-23 horas. El producto fue filtrado, lavado con metanol frío y posteriormente purificado por recristalización con metanol. Los compuestos sintetizados fueron caracterizados por RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.

### Docking Molecular

El modelaje de la interacción enzima-ligando se llevó a cabo mediante la técnica de docking molecular usando el software Autodock Vina (v.1.1.2.). La preparación de las moléculas para ser sometidas a dicho docking fue hecha usando los programas Maestro (v.9.8; Schrödinger Inc.) y Autodock Tools (v.1.5.6.); el primero fue usado para optimizar la geometría de las moléculas de DHP (método semiempírico AM1) y el segundo para definir el mapa de búsqueda, que consiste en delimitar el espacio en la macromolécula donde interaccionará el ligando. La enzima AR que se utilizó en el estudio fue obtenida de la base de datos Protein Data Bank (PDB: 1ads en formato pdb).

### Estudio *in silico* ADME

El estudio *in silico* de ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) consistió en calcular parámetros relacionados con la farmacocinética de las DHPs sintetizadas. Para el

estudio ADME se hizo uso de los servicios ofrecidos en la página <http://www.swissadme.ch>, en donde se generaron las moléculas de las DHPs en formato SMILES. En esta misma página se corrió el programa SwissADME en línea para obtener los resultados del estudio.

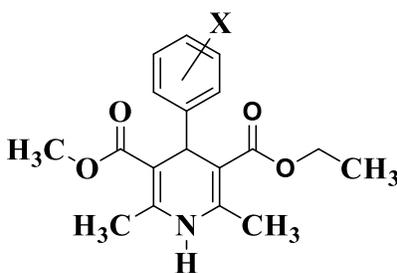
## V. MATERIALES

Todos los reactivos y solventes utilizados en la síntesis de DHPs fueron de grado analítico o HPLC, obtenidos de Baker (Xalostoc, Estado de México, México) o Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.). Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato EVEL modelo 1237. Los espectros de resonancia magnética nuclear hidrógeno y carbono fueron obtenidos en el laboratorio de resonancia del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en un espectrómetro Varian Mercuri plus 400 MHz y un espectrómetro Varian Mercuri plus a 100 MHz, usando como estándar interno TMS y como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

## VI. RESULTADOS

En total se prepararon ocho DHPs análogas de la nitrendipina (Tabla 1). La preparación de las DHPs fue realizada mediante una modificación de la reacción de Hantzsch (Hernández-Gallegos et al., 1995; Noyola y Hernández-Gallegos, 2003). Todas las DHPs fueron obtenidas en forma de racemato.

**Tabla 1.** Estructura y propiedades físicas de las DHPs sintetizadas



DHP	X	Punto de fusión (°C)	Peso molecular	Rendimiento (%)
1	H	128-129	315.14	47.15
2	<i>p</i> -F	106-107	333.14	22.28
3	<i>p</i> -Cl	130-131	349.59	26.11
4	<i>p</i> -Br	118-119	394.04	66.98
5	<i>m</i> -Br	135-136	394.04	33.60
6	<i>m</i> -Cl	125-126	349.59	39.67
7	<i>o</i> -F	108-109	333.14	31.05
8	<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	112-113	329.15	20.82

### Síntesis Química

El primer intento de síntesis consistió en utilizar 8 mmol de benzaldehído sustituido, 8 mmol de 3-metilaminocrotonato y 8 mmol de 3-etilacetoacetato en 5mL de isopropanol,

en reflujo y agitación magnética durante 18 a 21 hrs. El producto obtenido presentó punto de fusión muy bajo en comparación con la literatura y muy bajo rendimiento 5.2%. Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C presentaron las señales esperadas, además de otras señales. Además, en la cromatografía de capa fina presento más de manchas, indicando que el producto presentaba impurezas.

Ante estos resultados no favorables, se propuso cambiar el 3-metilaminocrotonato por 3-etilaminocrotonato y el 3-etilacetoacetato por 3-metilacetoacetato, usando las mismas cantidades que antes (8 mmol). Se pusieron a prueba varios tiempos de reflujo (18-21 horas), hasta encontrar las condiciones óptimas de reacción las cuales varían dependiendo del sustituyente en el anillo 4-fenilo.

Las propiedades físicas de las DHPs sintetizadas se presentan en la Tabla 1. Las DHPs, sintetizadas son asimétricas, que tienen como sustituyente en C-3 un carboxietilo y en C-5 un carboximetilo, presentando diferentes sustituyentes en el anillo aromático. Las DHPs fueron obtenidas con un rendimiento entre 20.8 – 66.8%, siendo la DHP 4 la que presento mayor rendimiento y la DHP 8 la que presento menor rendimiento. Cabe señalar que los rendimientos fueron calculados una vez purificado el compuesto, lo que se logró mediante dos recristalizaciones con metanol.

#### **DHP 1: (±)-2,6-dimetil-3-carboxietil-4-(fenil)-5-carboximetil-1,4-dihidropiridina**

Una solución de benzaldehído, 3-metilacetoacetato y 3-etilaminocrotonato en isopropanol (5mL) fue mantenida en reflujo con agitación magnética durante 18 horas. El producto obtenido fue filtrado, lavado con metanol frío, posteriormente purificado por recristalización con metanol, obteniéndose 1.56g.

RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 1.09-1.13 (t,3H,H17), 2.06 (s,3H,H22), 3.8 (s, 3H,H21), 4.20-4.25 (c,2H,H18), 4.58-4.60 (s,1H,H7),6.0-6.25 (t,3H,NH), 7.20-7.39 (m,5H, H1,H2,H4,H5,H6).

RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm C18-C13 (128.993), C11 (129.169), C9 (133.940), C3 (167.383), C2,4,5,6 (167.876), C12 (128.993), C8 (144.393), C18 (128.188), C21 (103.486), C7 (144.666), C22-23 (77.318), C17(126.263).

**DHP 2: (±)-2,6-dimetil-3-carboxietil-4-(*p*-fluorofenil)-5-carboximetil-1,4-dihidropiridina**

Una solución de 4-fluorobenzaldehído, 3-metilacetoacetato y 3-etilaminocrotonato en isopropanol (5mL) fue mantenida en reflujo con agitación magnética durante 18 horas. El producto obtenido fue filtrado, lavado con metanol frío, posteriormente purificado por recristalización con metanol, obteniéndose 0.66 g.

RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 1.09-1.13 (t,3H,H17), 2.06 (s,3H,H22), 3.8 (s, 3H,H21), 4.20-4.25 (c,2H,H18), 4.58-4.60 (s,1H,H7),6.0-6.25 (t,3H,NH), 7.20-7.39 (m,5H, H1,H2,H4,H5,H6).

RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm C18-C13 (128.993), C11 (129.169), C9 (133.940), C3 (167.383), C2,4,5,6 (167.876), C12 (128.993), C8 (144.393), C18 (128.188), C21 (103.486), C7 (144.666), C22-23 (77.318), C17(126.263).

**DHP 3: (±)-2,6-dimetil-3-carboxietil-4-(*p*-clorobefenil)-5-carboximetil-1,4-dihidropiridina**

Una solución de 4-clorobenzaldehído, 3-metilacetoacetato y 3-etilaminocrotonato en isopropanol (5mL) fue mantenida en reflujo con agitación magnética durante 18 horas. El producto obtenido fue filtrado, lavado con metanol frío, posteriormente purificado por recristalización con metanol, obteniéndose 0.72 g.

RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 1.09-1.13 (t,3H,H17), 2.06 (s,3H,H22), 3.8 (s, 3H,H21), 4.20-4.25 (c,2H,H18), 4.58-4.60 (s,1H,H7),6.0-6.25 (t,3H,NH), 7.20-7.39 (m,5H, H1,H2,H4,H5,H6).

RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm C18-C13 (128.993), C11 (129.169), C9 (133.940), C3 (167.383), C2,4,5,6 (167.876), C12 (128.993), C8 (144.393), C18 (128.188), C21 (103.486), C7 (144.666), C22-23 (77.318), C17(126.263).

**DHP 4: (±)-2,6-dimetil-3-carboxietil-4-(p-bromofenil)-5-carboximetil-1,4-dihidropiridina**

Una solución de 4-bromobenzaldehído, 3-metilacetoacetato y 3-etilaminocrotonato en isopropanol (5mL) fue mantenida en reflujo con agitación magnética durante 18 horas. El producto obtenido fue filtrado, lavado con metanol frío, posteriormente purificado por recristalización con metanol, obteniéndose 1.71 g.

RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 1.09-1.13 (t,3H,H17), 2.06 (s,3H,H22), 3.8 (s, 3H,H21), 4.20-4.25 (c,2H,H18), 4.58-4.60 (s,1H,H7),6.0-6.25 (t,3H,NH), 7.20-7.39 (m,5H, H1,H2,H4,H5,H6).

RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm C18-C13 (128.993), C11 (129.169), C9 (133.940), C3 (167.383), C2,4,5,6 (167.876), C12 (128.993), C8 (144.393), C18 (128.188), C21 (103.486), C7 (144.666), C22-23 (77.318), C17(126.263).

**DHP 5: (±)-2,6-dimetil-3-carboxietil-4-(*m*-bromofenil)-5-carboximetil-1,4-dihidropiridina**

Una solución de 3-bromobenzaldehído, 3-metilacetoacetato y 3-etilaminocrotonato en isopropanol (5mL) fue mantenida en reflujo con agitación magnética durante 18 horas. El producto obtenido fue filtrado, lavado con metanol frío, posteriormente purificado por recristalización con metanol, obteniéndose 0.78 g.

RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 1.09-1.13 (t,3H,H17), 2.06 (s,3H,H22), 3.8 (s, 3H,H21), 4.20-4.25 (c,2H,H18), 4.58-4.60 (s,1H,H7),6.0-6.25 (t,3H,NH), 7.20-7.39 (m,5H, H1,H2,H4,H5,H6).

RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm C18-C13 (128.993), C11 (129.169), C9 (133.940), C3 (167.383), C2,4,5,6 (167.876), C12 (128.993), C8 (144.393), C18 (128.188), C21 (103.486), C7 (144.666), C22-23 (77.318), C17(126.263).

**DHP 6: (±)-2,6-dimetil-3-carboxietil-4-(*m*-clorofenil)-5-carboximetil-1,4-dihidropiridina**

Una solución de 3-bromobenzaldehído, 3-metilacetoacetato y 3-etilaminocrotonato en isopropanol (5mL) fue mantenida en reflujo con agitación magnética durante 18 horas. El producto obtenido fue filtrado, lavado con metanol frío, posteriormente purificado por recristalización con metanol, obteniéndose 1.09 g.

RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 1.09-1.13 (t,3H,H17), 2.06 (s,3H,H22), 3.8 (s, 3H,H21), 4.20-4.25 (c,2H,H18), 4.58-4.60 (s,1H,H7),6.0-6.25 (t,3H,NH), 7.20-7.39 (m,5H, H1,H2,H4,H5,H6).

RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm C18-C13 (128.993), C11 (129.169), C9 (133.940), C3 (167.383), C2,4,5,6 (167.876), C12 (128.993), C8 (144.393), C18 (128.188), C21 (103.486), C7 (144.666), C22-23 (77.318), C17(126.263).

**DHP 7: (±)-2,6-dimetil-3-carboxietil-4-(*o*-fluorofenil)-5-carboximetil-1,4-dihidropiridina**

Una solución de 2-fluorobenzaldehído, 3-metilacetoacetato y 3-etilaminocrotonato en isopropanol (5mL) fue mantenida en reflujo con agitación magnética durante 18 horas. El producto obtenido fue filtrado, lavado con metanol frío, posteriormente purificado por recristalización con metanol, obteniéndose 0.93 g.

RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 1.09-1.13 (t,3H,H17), 2.06 (s,3H,H22), 3.8 (s, 3H,H21), 4.20-4.25 (c,2H,H18), 4.58-4.60 (s,1H,H7),6.0-6.25 (t,3H,NH), 7.20-7.39 (m,5H, H1,H2,H4,H5,H6).

RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm C18-C13 (128.993), C11 (129.169), C9 (133.940), C3 (167.383), C2,4,5,6 (167.876), C12 (128.993), C8 (144.393), C18 (128.188), C21 (103.486), C7 (144.666), C22-23 (77.318), C17(126.263).

**DHP 8: (±)-2,6-dimetil-3-carboxietil-4-(*p*-tolualdehído)-5-carboxietil-1,4-dihidropiridina**

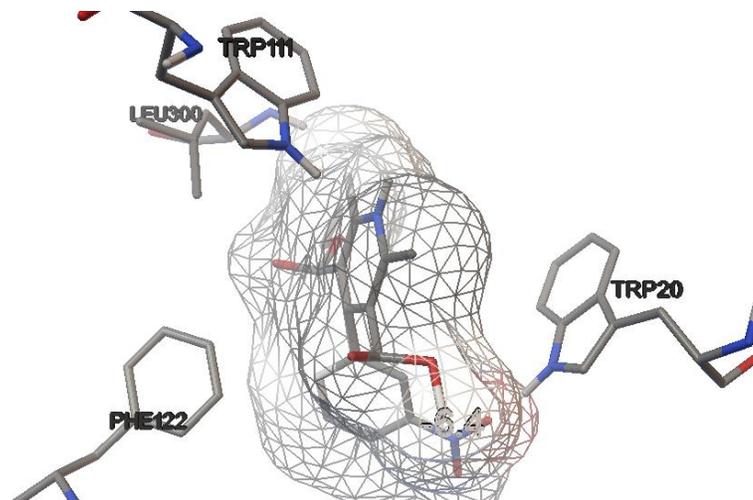
Una solución de 4-tolualdehído, 3-metilacetoacetato y 3-etilaminocrotonato en isopropanol (5mL) fue mantenida en reflujo con agitación magnética durante 18 horas. El producto obtenido fue filtrado, lavado con metanol frío, posteriormente purificado por recristalización con metanol, obteniéndose 0.63 g.

RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 1.09-1.13 (t,3H,H17), 2.06 (s,3H,H22), 3.8 (s, 3H,H21), 4.20-4.25 (c,2H,H18), 4.58-4.60 (s,1H,H7),6.0-6.25 (t,3H,NH), 7.20-7.39 (m,5H, H1,H2,H4,H5,H6).

RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm C18-C13 (128.993), C11 (129.169), C9 (133.940), C3 (167.383), C2,4,5,6 (167.876), C12 (128.993), C8 (144.393), C18 (128.188), C21 (103.486), C7 (144.666), C22-23 (77.318), C17(126.263).

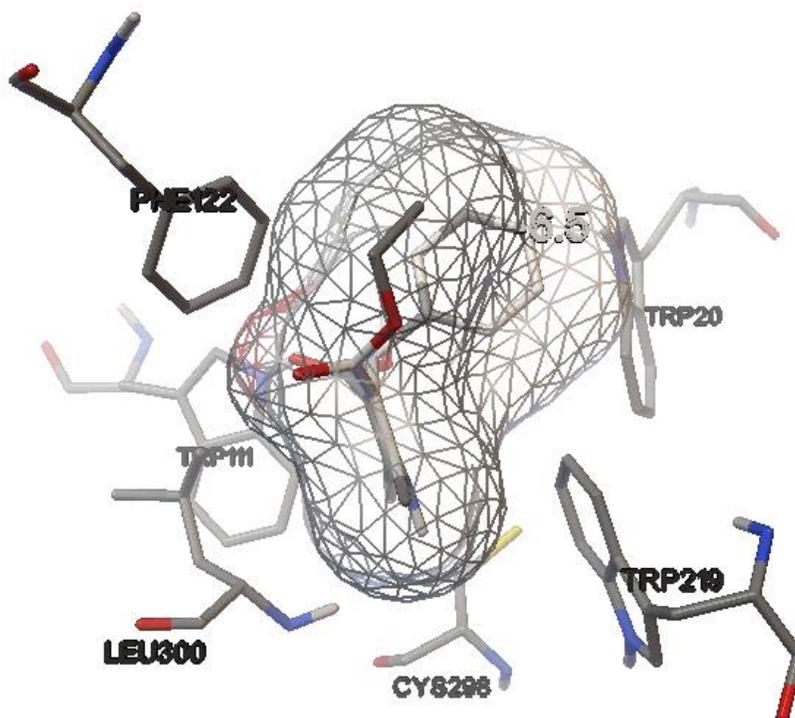
## Docking Molecular

El estudio *in silico* sobre la interacción de la enzima AR con la serie de DHPs sintetizadas (realizado mediante docking molecular) nos proporcionó modelos de la interacción de las DHPs, así como energías de unión (en Kcal/mol) calculadas para cada modelo. Los resultados indican que las energías de unión a la AR de las DHPs sintetizadas están en un rango de -6.1 a -7.2 Kcal/mol. Para compara los modelos interacción, así como los valores de energía de unión de las DHPs sintetizadas, se realizó el docking molecular para la nitrendipina encontrándose que ésta también interacciona en el sitio activo de la enzima AR con una energía de unión de -6.4 Kcal/mol. En las Figuras 7 a 15 se muestran los modelos de interacción obtenidos para la nitrendipina y las DHPs sintetizadas.



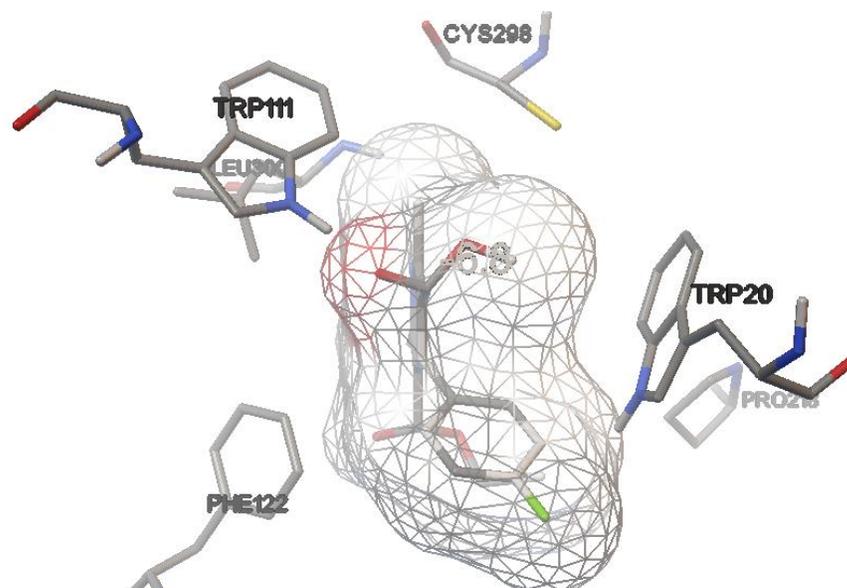
**Figura 7.** Interacción de la nitrendipina con la enzima AR

**DHP 1:** Se reportó una energía de unión de  $-6.5$  Kcal/mol y como aminoácidos cercanos Trp20, Trp111, Phe122, Trp219, Cys298 y Leu 300.



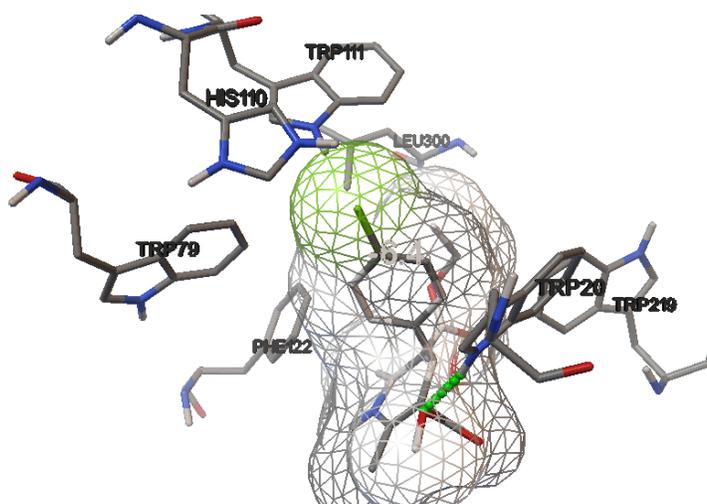
**Figura 8.** Interacción de la DHP 1 con la enzima AR

**DHP 2:** Se reportó una energía de unión de  $-6.8\text{Kcal/mol}$  y como aminoácidos cercanos Trp20, Trp111, Phe122, Pro218, Cys298 y Leu300.



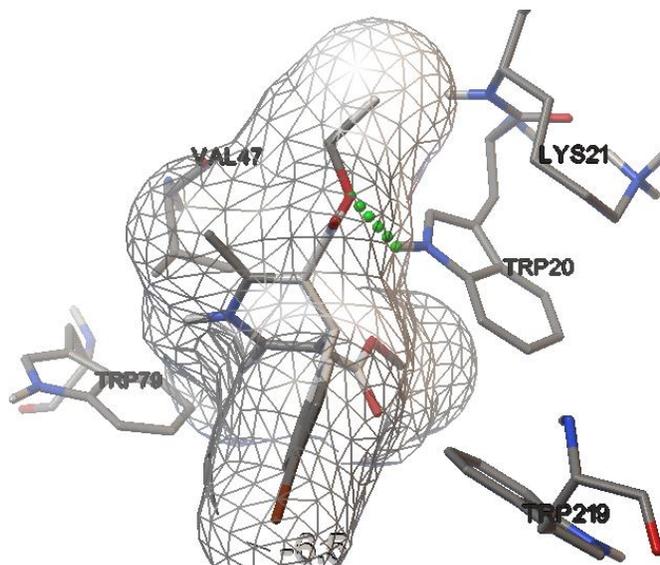
**Figura 9.** Interacción de la DHP 2 con la enzima AR

**DHP 3:** Se reportó una energía de unión de  $-6.4\text{Kcal/mol}$  con interacción de puente de hidrógeno con Trp20 y como aminoácidos cercanos Trp20, Trp79, Trp111, His110, Phe122, Trp219 y Leu300.



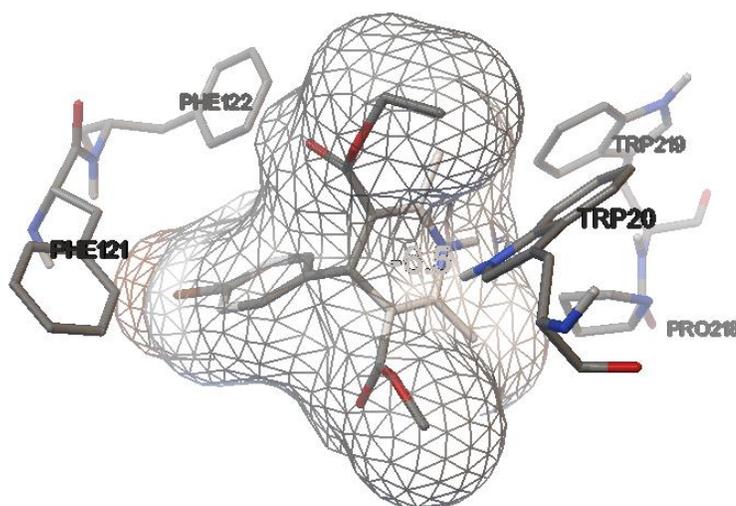
**Figura 10.** Interacción de la DHP 3 con la enzima AR

**DHP 4:** Se reportó una energía de unión de -6.5Kcal/mol con interacción de puente de hidrógeno con Trp20 y como aminoácidos cercanos Trp20, Lys21, Val47, Tyr79 y Trp219.



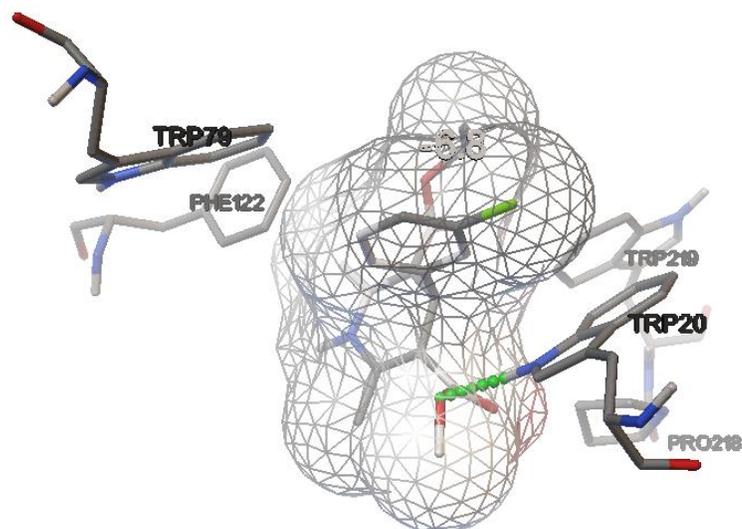
**Figura 11.** Interacción de la DHP 4 con la enzima AR.

**DHP 5:** Se reportó una energía de unión de -6.5Kcal/mol y como aminoácidos cercanos Trp20, Phe121, Phe122, Pro218 y Trp219.



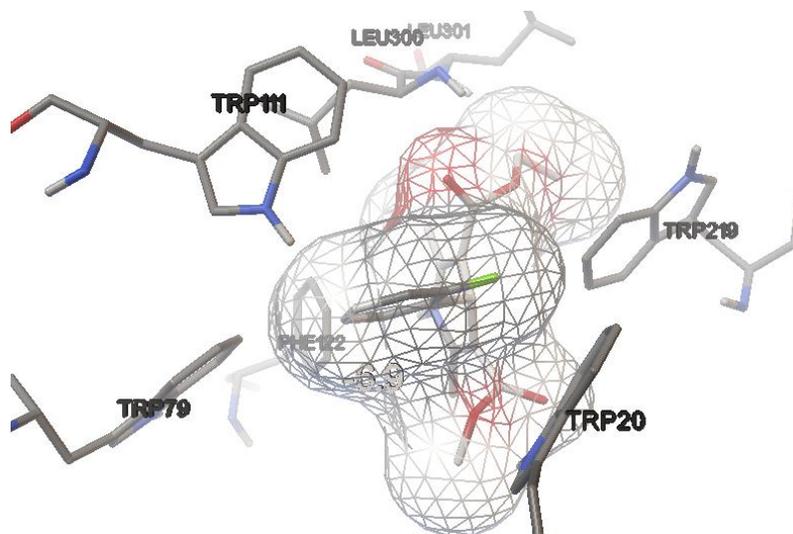
**Figura 12.** Interacción de la DHP 5 con la enzima AR.

**DHP 6:** Se reportó una energía de unión de -6.8 Kcal/mol con una interacción de puente de hidrógeno con Trp20 y como aminoácidos cercanos Trp20, Trp79, Phe122, Pro218 y Trp219.



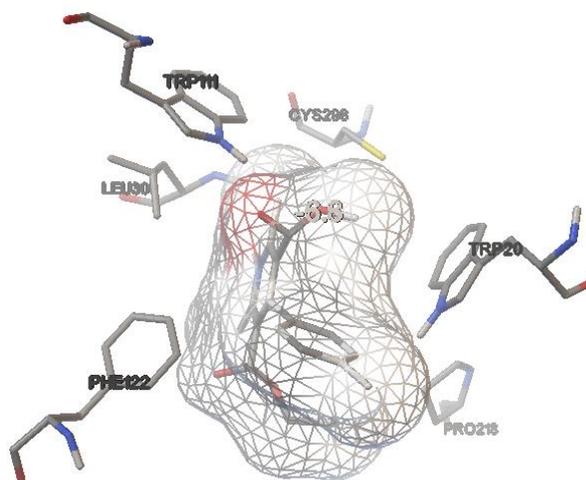
**Figura 13.** Interacción de la DHP 6 con la enzima AR.

**DHP 7:** Se reportó una energía de unión de -6.9Kcal/mol y como aminoácidos cercanos Trp20, Trp79, Trp111, Phe122, Trp219, Leu300 y Leu301.



**Figura 14.** Interacción de la DHP 7 con la enzima AR.

**DHP 8:** Se reportó una energía de unión de  $-6.8\text{Kcal/mol}$  y como aminoácidos cercanos Trp20, Trp111, Phe122, Pro118, Cys298 y Leu300.



**Figura 15.** Interacción de la DHP 8 con la enzima AR.

En la Tabla 2 se da un resumen de las interacciones propuestas por los estudios de dockig en la unión de las DHPs con la enzima AR.

**Tabla 2.** Relación de interacciones de DHPs con la enzima AR.

DHP	Sustituyente en el anillo 4-fenilo	Energía de unión (Kcal/mol)	Aminoácidos cercanos										Interacción puente de hidrógeno				
			TRP20	LYS 21	VAL47	TRP79	HIS110	TRP111	PHE121	PHE122	PRO218	TRP219		CYS298	LEU300	LEU301	
1	H	-6.5	■					■		■				■	■		
2	4-F	-6.8	■					■		■				■	■		
3	4-Cl	-6.4	■				■	■	■					■	■		Trp20
4	4-Br	-6.5	■	■	■												Trp20
5	3-Br	-6.5	■							■							
6	3-Cl	-6.8	■				■										Trp20
7	2-F	-6.9	■				■		■						■	■	
8	4-CH <sub>3</sub>	-6.8	■						■						■	■	
Nitrendipina	3-NO <sub>3</sub>	-6.4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	

## Estudio *in silico* ADME

Los resultados del estudio *in silico* ADME son mostrados en la Tabla 3. Estos resultados incluyen parámetros farmacocinéticos calculados relacionados con la absorción gastrointestinal, coeficiente de partición (Log P), inhibición de Citocromos P450, inhibición de la glicoproteína P y coeficiente de penetración a través de la piel (Log Kp). Este estudio se realizó tanto para las DHPs del estudio, como para la nitrendipina. Esto para contar con un fármaco de comparación cuya farmacocinética es conocida.

**Tabla 3.** Resultados obtenidos del estudio *in silico* ADME

DHP	Propiedades farmacocinéticas									
	Absorción gastrointestinal	BBB permeante	Inhibidor de citocromos					Sustrato P-gp	Log Kp (cm/s)	Log P
			CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4			
Nitrendipina	Alta	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	-6.45	1.99
1	Alta	Si	Si	Si	Si	No	No	No	-6.06	2.7
2	Alta	Si	Si	Si	Si	No	Si	No	-6.1	3
3	Alta	Si	Si	Si	Si	No	Si	No	-5.82	3.2
4	Alta	Si	Si	Si	Si	No	Si	No	-6.05	3.4
5	Alta	Si	Si	Si	Si	No	Si	No	-6.05	3.3
6	Alta	Si	Si	Si	Si	No	Si	No	-5.82	3.2
7	Alta	Si	No	Si	Si	No	Si	No	-6.51	2.8
8	Alta	Si	Si	Si	Si	No	No	No	-5.88	3

## VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la búsqueda de nuevos compuestos con una actividad biológica específica es una estrategia común el hacer compuestos análogos de una molécula que se sabe tiene esa actividad de interés. En este trabajo se siguió esta estrategia con el fin de buscar nuevos inhibidores de la AR, tomando como molécula líder a la nitrendipina. A su vez, la modificación estructural propuesta (cambio del sustituyente del anillo 4-fenilo) permite explorar la influencia que tiene esta parte de la molécula de DHP sobre la inhibición de la enzima AR.

### Resultados químicos.

Se realizó la síntesis de ocho DHPs asimétricas, mono y disustituidas, que presentan como sustituyentes (Cl, Br, F ó CH<sub>3</sub>) en el anillo aromático, con el propósito de contar físicamente con DHPs que de acuerdo a estudios *in silico* pudieran inhibir a la AR, para usarlos en futuros estudios experimentales.

La obtención de subproductos o productos diferentes a los esperados es frecuente en la síntesis de compuestos, debido a que la mayoría de las reacciones químicas no son producto específicas. En el caso de la reacción de Hantzsch existen reportes que confirman la posibilidad de obtener productos diferentes a las DHPs. Un ejemplo es el publicado por Filipan-Litvic *et al.* (2007), en el que se sometió a reflujo o-metoxibenzaldehído y metil-3-aminocrotonato usando como solvente 2-propanol. En una reacción normal de Hantzsch, la DHP se formaría a partir de dos moléculas de metil-3-aminocrotonato y una del o-metoxibenzaldehído. Sin embargo, el producto que ellos obtuvieron fue el resultado de la condensación de dos moléculas del o-

metoxibenzaldehído y una del metil-3-aminocrotonato. Otro ejemplo es el reportado por Angeles *et al.* (2001), en el que al hacer reaccionar 2-nitrobenzaldehído, acetoacetato de etilo e hidróxido de amonio en etanol se obtuvieron además de la DHP esperada, una dihidropiridina isomérica y dos compuestos tríciclicos. En el proyecto algo similar pudo pasar al realizar el primer intento de síntesis de Hantzsch utilizando 3-metilaminocrotonato como portador del nitrógeno que aparece en el anillo DHP, en donde no se obtuvieron compuestos puros sino subproductos, los cuales no fueron identificados. Su rendimiento fue bajo (5.2 %) y presentaba varias señales diferentes a las esperadas.

Ante los resultados negativos obtenidos en la síntesis, se decidió utilizar 2-propanol y 3-etilaminocrotonato como fuente de nitrógeno, ya que en base a la experiencia de nuestro laboratorio y reportes de la literatura respecto a la síntesis de 1,4-DHPs, éste solvente ha demostrado ser mejor que otros alcoholes (como etanol, metanol, etc.) debido a la fácil cristalización del producto obtenido de la reacción (Filipan-Litvic *et al.*, 2007).

En general, los rendimientos en la síntesis de las DHP bajo las nuevas condiciones de reacción estuvieron dentro del rango de datos reportados en la literatura para este tipo de compuestos (20-70%, aproximadamente). Por lo anterior, se logró obtener cantidades más que suficientes para la caracterización química de cada una de las DHPs y para futuros estudios experimentales.

El análisis de los rendimientos obtenidos en este trabajo indica que aquellas DHPs con grupo halógeno como sustituyente en el anillo aromático (DHP 2 a DHP 7) presentan mejores rendimientos (20.82% - 66.98%) en comparación a las demás DHPs sustituidas de la serie sintetizada.

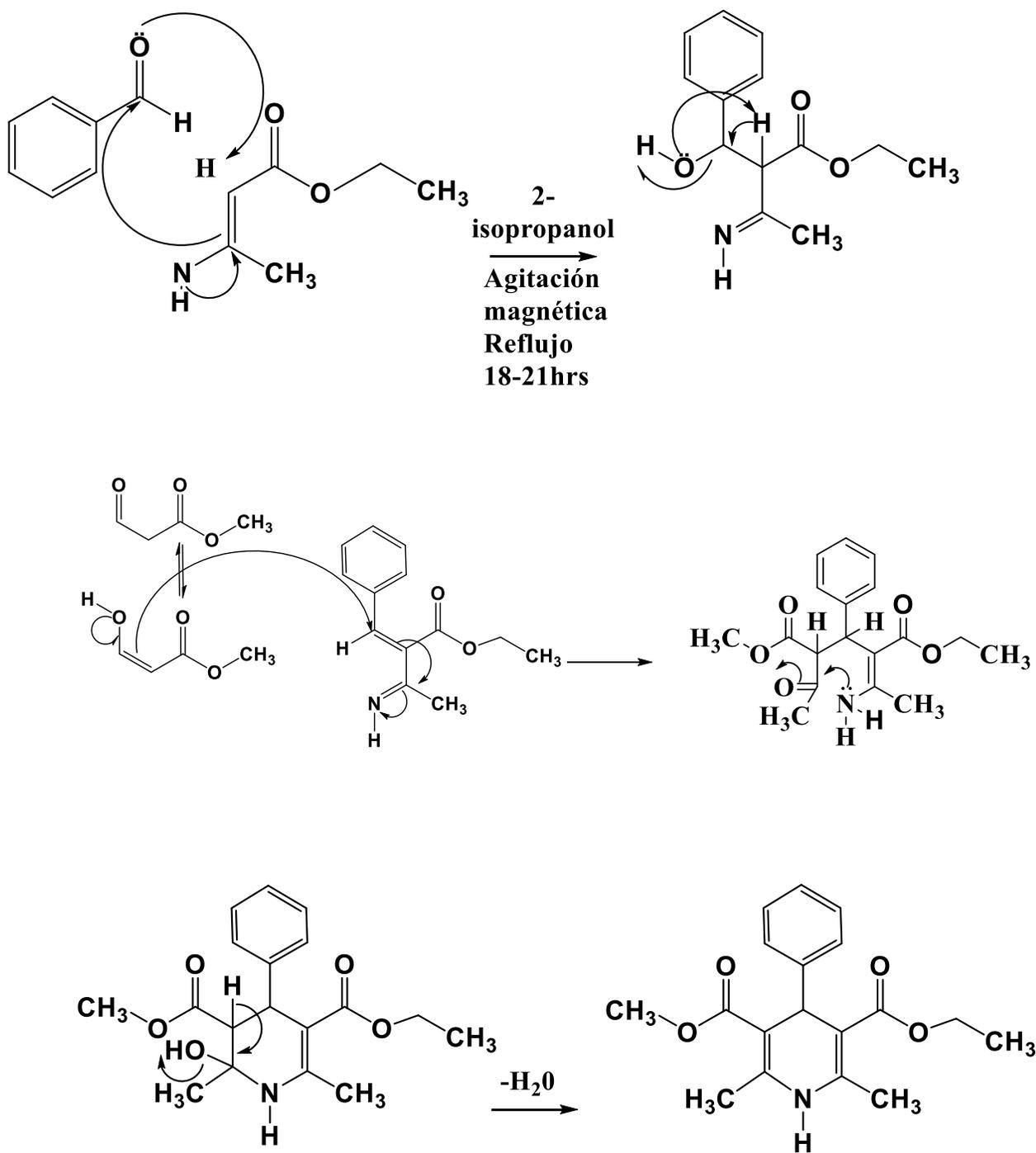
El mecanismo propuesto para la reacción tipo Hantzsch utilizada para la preparación de las DHPs de la serie consta de tres etapas (Figura 16):

1. Condensación de Knoevenagel del aldehído con el 3-etilaminocrotonato: inicia con un ataque nucleofílico del doble enlace al carbonilo del aldehído, posteriormente ocurre la abstracción del hidrógeno del carbono  $\alpha$  del 3-etilaminocrotonato y la deshidratación para la formación del sistema  $\alpha\beta$ -insaturado.

2. Adición de Michael: es el paso crucial de la reacción y consiste en la adición de la molécula de metilacetoacetato sobre el producto de condensación de Knoevenagel, con desplazamiento de un protón para dar como producto una amina.

3. Condensación intramolecular de la amina: consiste en una ciclación intramolecular y la salida de agua, con la consecuente generación del sistema 1,4-dihidropiridina.

La estructura de todas las DHPs fue confirmada por sus espectros de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ . En todos los casos se obtuvieron las señales características (desplazamiento químico, multiplicidad e integración) correspondientes al número y tipo de los diferentes protones y carbonos presentes en la estructura. Las señales de hidrógeno extras que aparecen en los espectros de RMN- $^1\text{H}$  (1.6-1.7 ppm) corresponden a residuos de agua, ya que el solvente que fue utilizado para la obtención de los espectros es el cloroformo, mismo que por estar en contacto con el medio ambiente se hidrata; las señales residuales correspondientes a cloroformo en RMN- $^{13}\text{C}$  aparecen en 76-78 ppm.



**Figura 16.** Mecanismo de reacción propuesto de la síntesis de las DHPs de la serie.

## Docking molecular

El docking molecular es una técnica de predicción *in silico* que utilizamos para poder proponer la forma en que las DHPs de la serie tiene interacción con la enzima AR. Esta técnica calcula interacciones posibles entre una molécula proteica y un ligando, con la finalidad de generar complejos estables. -De los programas existentes para realizar docking molecular, en este trabajo se usó el programa Autodock Vina, que es uno de los más utilizados para realizar este tipo de estudios.

Los resultados obtenidos del modelaje de la interacción de la enzima AR con la nitrendipina indican que los aminoácidos cercanos a este ligando son: Trp20, Trp111, Phe122 y Leu300. Los tres primeros aminoácidos se encuentran en el sub-sitio hidrofóbico, en tanto que el cuarto está en el sub-sitio específico del sitio activo propuesto de la enzima AR. A su vez, los resultados que se obtuvieron de la interacción de las 8 DHPs sintetizadas con la enzima AR indican que la mayoría de las DHPs tienen como aminoácidos cercanos estos mismos cuatro aminoácidos, lo que era de esperar por cuanto las DHPs sintetizadas tienen una estructura similar a la nitrendipina, solo se diferencian en el sustituyente en el anillo aromático. Por otra parte, varios de las DHPs presentaron otros aminoácidos cercanos, pero en todos los casos son aminoácidos que están dentro del sitio activo de la enzima AR. Adicional a ello, los modelos de interacción muestran que, en el caso de las DHP3, DHP4 y DHP6 se establece una interacción por puente de puente de hidrógeno con el aminoácido Trp20, que contribuirían a estabilizar su unión con la enzima AR. Los modelos de interacción sobre las DHPs sintetizadas y la enzima AR concuerdan con las interacciones reportadas en la literatura (Wilson *et al*, 1992). Nuestra molécula tiene la presencia de 1 anillos aromáticos, una característica

común entre los diversos inhibidores de la enzima AR que presentan este tipo de anillos aromáticos. En resumen, podemos decir que, de acuerdo a los estudios de anclaje molecular, las DHPs sintetizadas presentarán una actividad inhibitoria de la enzima AR similar o mayor a la que presenta la nitrendipina.

## Estudios in silico ADME

Los parámetros obtenidos del estudio *in silico* ADME indican que las DHPs del estudio tendrán una farmacocinética adecuada. Comparadas con la nitrendipina, las DHPs sintetizadas presentan parámetros farmacocinéticos similares, lo que indicaría que estas DHPs no estarían impedidas de presentar un efecto sistémico, así como lo presenta la nitrendipina. Los resultados del estudio *in silico* ADME también permiten determinar si las DHPs sintetizadas cumplen con la regla de los cinco de Lipinski, que permite evaluar cuantitativamente si un compuesto puede ser considerado un buen fármaco. En todos los casos las DHPs sintetizadas cumplen con la regla de Lipinski ya que no viola más de uno de los cinco postulados. Todas las DHPs que tienen un peso molecular menor de 500 umas, presentan menos de 10 aceptores de puentes de hidrógeno y menos de 5 donadores de puentes de hidrógeno, así como un coeficiente de partición menor a 5. Estos resultados permiten esperar que las DHPs sintetizadas no estarán impedidas de poder acceder hasta su sitio de acción y poder lograr así su efecto biológico, como inhibidores de la enzima AR.

## VIII. CONCLUSIÓN

Los estudios *in silico* muestran que las energías de unión de las DHPs a la enzima AR son similares (-6.4 a -6.9 kcal/mol) a la que presenta la nitrendipina (-6.4 kcal/mol). Estos resultados indican que las DHPs sintetizadas podrán unirse a la AR y en algunos casos es probable que presenten una mayor inhibición de la enzima AR, por lo que son buenos candidatos para seguir con su estudio.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

Alexiou P., Pegklidou K., Chatzopoulou M., Nicolaou I., Vassilis J. (2009). Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21 century. *Current Medicinal Chemistry*. **16**, 734-752.

Angeles, E., Santillan, H., Menconi, I., Martínez, I., Ramírez, A., Velázquez, A., López-Castañares, R., Martínez, R. (2001). Rearrangement of o-nibenzaldehyde in the Hantzsch reaction. *Molecules*. **6**, 683-693.

Barski O.A., Tipparaju S.M. and Bhatnagar A. (2008). The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews*. **40**, 553-624.

Brownlee M. (2006). The pathobiology of diabetic complications a unifying mechanism. *Diabetes*. **54**, 1615-1625.

Coburn, A.R., Wierzba, M., Suto, J.M., Solo J.A., Triggle M.A., and Triggle J.D. (1987). 1,4-Dihydropyridine antagonist activities at the calcium channel: A quantitative structure-activity relationship approach. *Journal Medical Chemistry*. **31**, 2103-2107.

El-Kabbani O., Darmanin C., Schneider T.R., Hazemann I., Ruiz F., Oka M., Joachimiak A., Schulze-Briese C., Tomizaki T., Mitschler A., Podjarny A. (2004). Ultrahigh resolution drug desing. II. Atomic resolution structures of human aldose reductase holoenzyme complexed with fidarestat and minalrestat: implications for the binding of cyclic imide inhibitors. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. **55**, 805-813.

Filipan-Litvic M., M., Capanec, I., Vinković, V. (2007). Hantzsch synthesis of 2,6-dimethyl-3,5-dimethoxycarbonyl-4-(o-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridine; a novel cyclization

leading to an unusual formation of 1-amino-2-methoxycarbonyl-3,5-bis(o-methoxyphenyl)-4-oxa-cyclohexan-1-ene. *Molecules*, **12**, 2546-2558.

Fleckenstein, A. (1983). History of calcium antagonists. *Circ. Reserch.* 52, (Suppl. I), 3-16.

Fleckenstein, A. (1983). En: Calcium Antagonism in Heart and Smooth Muscle, Wiley, New York. 286-230.

González R, Barnett P, Cheng H, Chylack LJ. (1984). Altered phosphate metabolism in the intact rabbit lens under high glucose conditions and its prevention by an aldose reductase inhibitor. *Exp. Eye Res.* **39**, 553-562.

Hayman S. and Kinoshita J.H. (1965). Isolation and properties of lens aldose reductase. *The Journal of Biological Chemistry.* **240**, 877-882.

Hernández-Gallegos Z., Lehmann, P.A., Hong, E., Posadas, F., Hernández-Gallegos, E. (1995). Novel halogenated 1,4-dihydropyridines: synthesis, bioassay, microsomal oxidation and structure-activity relationships. *European Journa. Medical Chemistry.* **30**, 355-364.

Hers HG. (1956). The Mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochimica et Biophysica.* **22**, 202-203.

Jaspan J. (1986). Pharmacological inhibition of aldose reductase in human diabetic neuropathy. *Drugs*, 32,23-29.

Jez, J. M.; Bennett, M. J.; Schlegel, B. P.; Lewis, M.; Penning, T. M. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemistry Journal.* **326**, 625-636.

Montes-Vega LE. (2015). "Escrutinio de Compuestos Vegetales y de Síntesis Química con Efecto Inhibitorio de la Enzima Aldosa Reductasa (AKR). Tesis de licenciatura. UMSNH.

- Petrash J. M. (2004). All in the family: aldose reductase and closely related aldoketo Reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **61**, 737-749.
- Rondeau J.M., Tête-Favier F., Podjarny A., Reymann J.M., Barth P., Biellmann J.F. and Moras D. (1992). Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature*. **355**, 469-472.
- Triggle, D. J. (2007). Calcium channel antagonists: Clinical uses–past, present, and future. *Biochemical Pharmacology*, **74**, 1–9.
- Travis SF, Morrison AD, Clements RS Jr, Winegrad AI, Oski FA. (1971). Metabolic alterations in the human erythrocyte produced by increases in glucose concentration: the role of the polyol pathway. *Jorunal Clinic Investigation*, **50**, 2104-12.
- Türkeş, C., Demir, Y., Beydemir, S. (2019). Anti-diabetic Properties of Calcium Channel Blockers: Inhibition Effects on Aldose Reductase Enzyme Activity. En: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **189**, 18–329.
- Urzhumtsev A., Tête-Favier F., Mitschler A., Barbanton J., Barth P., Urzhumtseva L., Biellmann J-F., Podjarny A. D., Moras D. (1997). A ‘specificity’ pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure*, **5**, 601-12.
- Van Heyningen R. (1959). Formation of polyols by the lens of the rat with “sugar” cataract. *Nature*. **184**, 194-195.
- Wilson D. K.; Tarle, I.; Petrash, J. M.; Quiocho, F. A. (1993). Refined 1.8 Å structure of human aldose reductase complexed with the potent inhibitor zopolrestat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **90**, 9847-9851.

Zhu C. (2013). Aldose reductase inhibitors as potential therapeutic drug of diabetic complications. *Diabetes Mellitus-Insights and Perspectives*. **23**, 17-46.