



FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN QUÍMICA

**ESTUDIO 3D QSAR COMPARATIVO DE AMINOALQUILINDOLES EN RECEPTORES  
DE CANNABINOIDES CB1 Y CB2**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN II PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN  
CIENCIAS MENCIÓN QUÍMICA

SANTIAGO HERNÁNDEZ P.

DIRECTOR  
Dr. JAIME MELLA R.

VALPARAÍSO, CHILE  
2013

## **Agradecimientos**

Quisiera expresar mi gratitud al Dr. Jaime Mella R. por su paciencia y buena disposición para enseñarme la técnica de 3D QSAR. Por su apoyo y ayuda constantes, sin los cuales no me habría sido posible realizar este trabajo.

Quiero agradecer también a mi esposa por el apoyo incondicional, su preocupación, y el cariño demostrado durante todo este proceso tan importante en mi vida.

Mi gratitud también es para Dios por las numerosas bendiciones que he recibido. Por darme la posibilidad de educarme y perfeccionarme a lo largo de esta vida.

# Contenido

Resumen.....	4
1 Introducción.....	5
1.1 Canales iónicos.....	6
1.2 Receptores con actividad enzimática intrínseca.....	7
1.3 Receptores nucleares.....	8
1.4 Receptores acoplados a proteínas G.....	9
1.5 Los receptores de cannabinoides y sus ligandos .....	11
1.6 Relaciones estructura-actividad cuantitativa (QSAR).....	16
1.6.1 Descriptores fisicoquímicos.....	16
1.6.2 Ecuación de Hansch .....	24
1.6.3 Análisis de Free-Wilson .....	25
1.7 QSAR 3D .....	26
1.7.1 Definiendo el campo estérico y electrostático .....	26
1.7.2 Relacionando forma y distribución electrónica con la actividad biológica.....	29
1.7.3 Potencial hidrofóbico.....	31
1.7.4 Ventajas de QSAR 3D por encima de QSAR tradicional .....	31
1.7.5 Problemas potenciales de QSAR 3D .....	33
2 Hipótesis.....	34
3 Resultados y Discusiones.....	35
4 Conclusiones .....	51
Apéndice .....	52
Referencias.....	62

## **Resumen**

En esta tesis se realizó un estudio 3D-QSAR en una serie de 92 compuestos derivados de aminoalquilindoles con afinidad por los receptores de cannabinoides CB1 y CB2. El objetivo del trabajo fue dilucidar cuáles son los requisitos estructurales de los compuestos que otorgan afinidad y selectividad por estos receptores. Al comparar los resultados arrojados por el estudio, se descubrió que existen marcadas diferencias estéricas y electrostáticas y que la mayor contribución a la actividad biológica viene dada por la contribución estérica de cada molécula. Los resultados de esta tesis proveen la base para el desarrollo de nuevos heterociclos de tipo indol o sus equivalentes isostéricos con promisoría actividad y selectividad por un subtipo de receptor, compuestos que tendrían aplicación en variadas patologías tales como tratamiento del dolor, cáncer, obesidad y desórdenes del sistema inmunitario, entre otras.

## **Abstract**

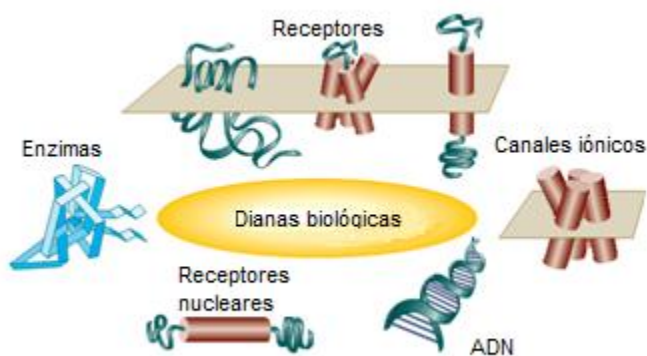
A 3D-QSAR (CoMFA) study was performed on 92 aminoalkylindoles derivatives with affinity for the cannabinoid receptors CB1 and CB2. The aim of the present work was to obtain some insight about the structural features of the compounds in order to explain the affinity and selectivity of the molecules for these receptors. It was found major differences in the steric and electrostatic fields in the CB1 and CB2 CoMFA models. The steric field accounts for the principal contribution to biological activity. These results give the foundation for the future development of new heterocyclic compounds with high affinity and selectivity for the cannabinoid receptors with applications in disparate pathological conditions like pain treatment, cancer, obesity and immune disorders, among others.

# 1 Introducción

La química medicinal es un área aplicada de la ciencia que con un enfoque multidisciplinario aborda el problema del descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos con aplicaciones terapéuticas. Entre las disciplinas que convergen en la química medicinal podemos encontrar la química orgánica, la farmacología y bioinformática. Los compuestos se diseñan para una diana biológica específica, esperando generar o suprimir una respuesta fisiológica clave en la mejora de alguna patología.

Existen cuatro principales grupos de dianas biológicas (Figura 1.1).

- Canales iónicos
- Receptores con actividad enzimática intrínseca
- Receptores nucleares
- Receptores acoplados a proteína G

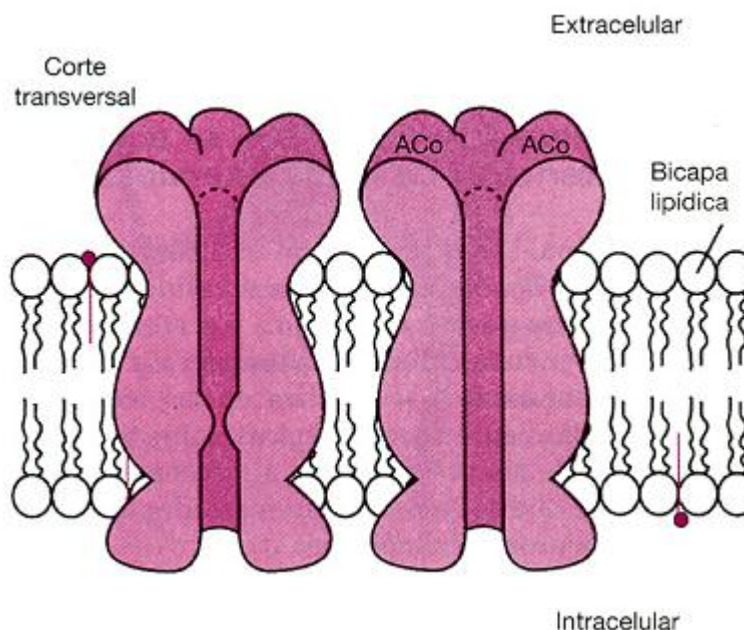


**Figura 1.1** Principales dianas farmacológicas celulares.

## 1.1 Canales iónicos

Comúnmente los canales iónicos se constituyen a partir de proteínas asociadas en cinco subunidades. Cada subunidad está formada por una proteína que contiene cuatro dominios de transmembrana en la cual cada bucle extracelular tiene la misma dimensión. Los dominios con los grupos amino (-NH<sub>2</sub>) y carboxilo terminal (-COOH) se encuentran ambos emplazados extracelularmente [1]. El canal o poro se encuentra cerrado cuando está en estado de reposo, pero se abre al unirse el ligando específico a la zona de reconocimiento molecular. Una vez abierto este canal, permite el paso de iones tales como K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> o Cl<sup>-</sup>, entre otros [2]. El paso de estos iones puede ocurrir a favor de una gradiente de concentración en forma pasiva, o en contra del gradiente mediante transporte activo a través de proteínas de transporte adecuadas para cada ion.

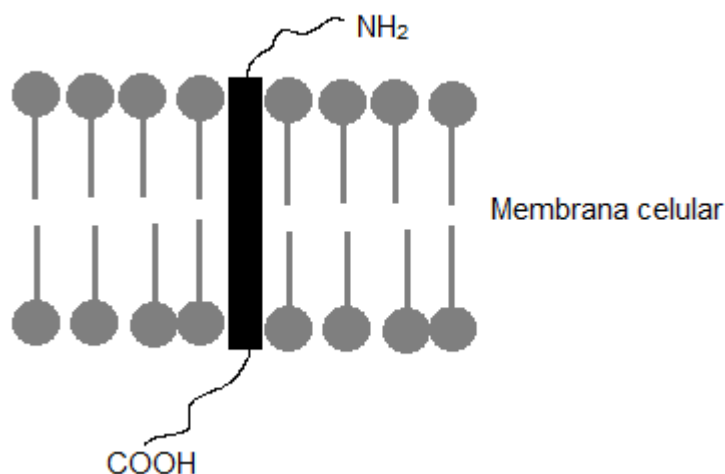
Existen dos tipos de canales iónicos: los dependientes de voltaje cuya apertura está relacionada con los procesos de despolarización [3], y los canales que son dependientes del receptor (receptores ionotrópicos), los que son controlados por la interacción de un ligando endógeno con su receptor, o la interacción de ciertos fármacos con los propios canales iónicos de forma directa o alostéricamente (sitio de unión distinto al sitio activo)[4]. Como ejemplo de receptores ionotrópicos se puede citar el receptor nicotínico para la acetilcolina (Figura 1.2). Este receptor está directamente unido al canal iónico y no utiliza segundos mensajeros. Para que se pueda abrir el canal iónico, se debe unir primero un ligando agonista como la acetilcolina (ligando endógeno) o la nicotina (xenobiótico) al receptor [5].



**Figura 1.2** Estructura del receptor nicotínico para la acetilcolina. El canal iónico de la izquierda está cerrado, mientras que el de la derecha se encuentra abierto producto de la unión de acetilcolina (ACo) al receptor.

## 1.2 Receptores con actividad enzimática intrínseca

Estos receptores están constituidos por una cadena proteica de un solo dominio de transmembrana, en el cual la región amino terminal se encuentra en el exterior de la célula y la región carboxilo terminal se encuentra en el interior de la célula (Figura 1.3). Estos receptores están asociados a diversos factores de crecimiento, que al unirse al receptor producen la fosforilación de un residuo tirosínico al interior de la célula, lo cual permite posteriormente la fosforilación de alguna proteína citosólica con actividad enzimática [6].



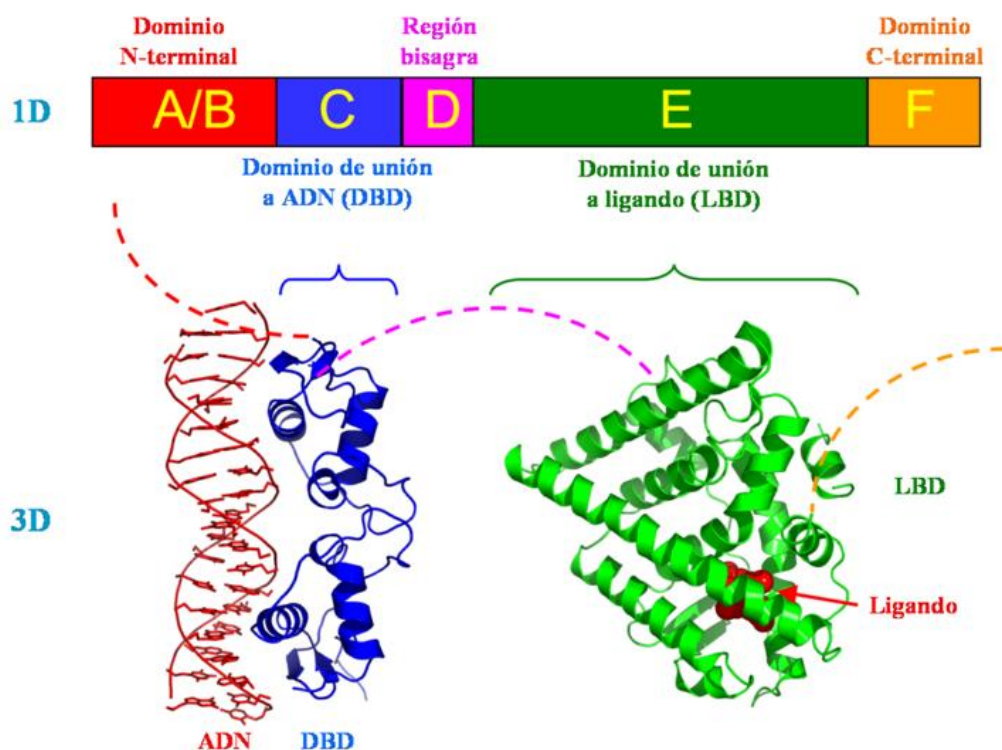
**Figura 1.3** Representación simplificada de la estructura de un receptor con actividad enzimática intrínseca.

### 1.3 Receptores nucleares

Los receptores nucleares son una clase de proteínas ubicadas al interior del núcleo de la célula y se encargan de detectar la presencia de hormonas esteroideas y tiroideas, además de otras moléculas [7]. Estos receptores participan en la regulación de la expresión génica controlando, de este modo, los procesos de desarrollo, de homeostasis y de metabolismo del organismo [8].

Los receptores nucleares pueden interactuar directamente con el ADN (Figura 1.4). La unión de un ligando al receptor genera un cambio conformacional en este quedando así activado para controlar la expresión de los genes adyacentes.

Como regulan la expresión de un gran número de genes, los ligandos que activan estos receptores pueden desencadenar una serie de efectos drásticos en el organismo[9]. Debido a que hay diversas enfermedades asociadas a los genes regulados por receptores nucleares, cerca del 13% de los fármacos aprobados por la FDA (por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*) tienen como diana biológica este tipo de receptores [10].



**Figura 1.4** Esquema que representa la organización estructural (en una y tres dimensiones) de los receptores nucleares.

#### 1.4 Receptores acoplados a proteínas G

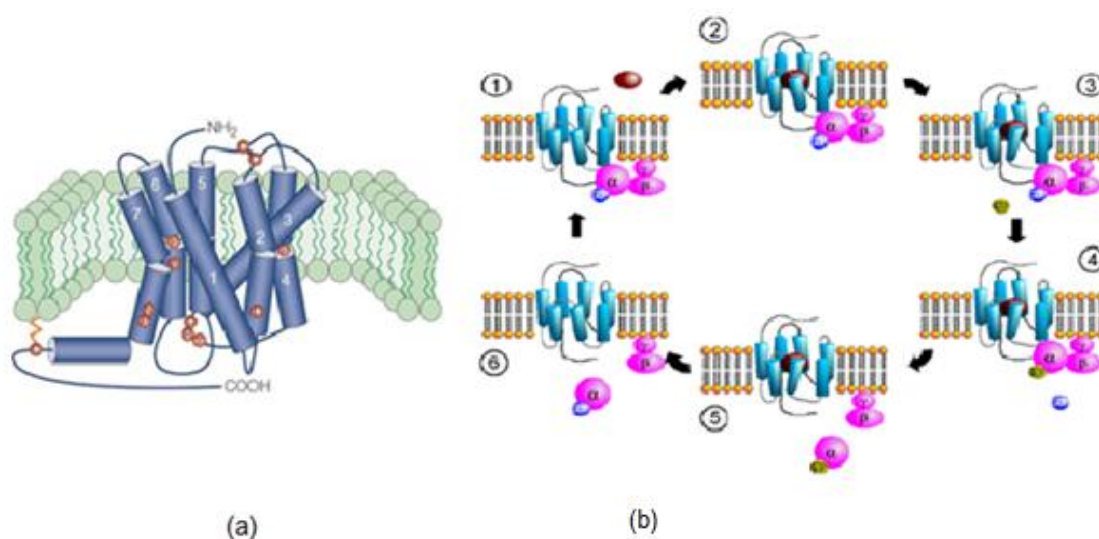
Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés *G protein coupled receptors*) comprenden una familia de proteínas de receptores transmembrana, que son proteínas que se extienden por todo el espesor de la membrana plasmática de la célula, un extremo del receptor se ubica fuera de la célula (dominio extracelular) y el otro extremo del receptor se ubica dentro (dominio intracelular). Los GPCRs se caracterizan principalmente porque la proteína receptora está asociada a una proteína G que a su vez se encuentra ligada a otra proteína con actividad catalítica o forma parte de algún canal iónico. Las proteínas receptoras están constituidas por monómeros de glicoproteínas que forman siete dominios de transmembrana, con el dominio amino situado en la zona extracelular, y el dominio carboxilo en la zona intracelular (Figura 1.5 (a)) [11].

La interacción de un ligando agonista con el receptor conduce a la formación de un segundo mensajero al interior de la célula. Entre los segundos mensajeros podemos citar iones, productos de la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana plasmática, adenosín monofosfato cíclico (AMPc), etc. Cuando un ligando se une a un GPCR se produce un

cambio en la conformación del receptor que le permite actuar como un factor intercambiador de nucleótidos de guanina. Entonces el GPCR puede activar su proteína G asociada intercambiando su unión con guanosín difosfato (GDP) por guanosín trifosfato (GTP). La subunidad  $\alpha$  de la proteína G, junto con la unión a GTP, pueden disociarse de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  para poder afectar proteínas de señalización intracelulares o direccionarse directamente a proteínas funcionales dependiendo del tipo de subunidad  $\alpha$  [12] (Figura 1.5 (b)).

Los GPCR están involucrados en una amplia variedad de procesos fisiológicos, tales como, el sentido de la vista, el olfato, comportamiento y humor, regulación del sistema inmune y respuesta inflamatoria, regulación de la homeostasis, y metástasis y crecimiento de algunos tumores [13].

Aproximadamente el 40% de las drogas modernas van dirigidas a receptores acoplados a proteína G [10].



**Figura 1.5** (a) Representación esquemática de la estructura de un GPCR. Se aprecian los siete dominios transmembrana con los extremos carboxilo intracelular y amino terminal extracelular. (b) Representación esquemática de los procesos que ocurren luego de unirse el ligando al receptor. En la etapa (1) el ligando se une al receptor, para luego producirse un cambio en la conformación del receptor (2). En la etapa (3) y (4) ocurre el intercambio de GDP por GTP. En la etapa (5) la subunidad  $\alpha$  se desprende de la subunidad  $\beta$  y  $\gamma$ . Finalmente (6) la subunidad  $\alpha$  regresa a su sitio original unida a GDP para comenzar el ciclo nuevamente.

Esta tesis se centra principalmente en el estudio y búsqueda de relaciones estructura-actividad cuantitativa de una serie de moléculas análogas de indol con

actividad en los receptores de cannabinoides CB1 y CB2, que son receptores acoplados a proteína G.

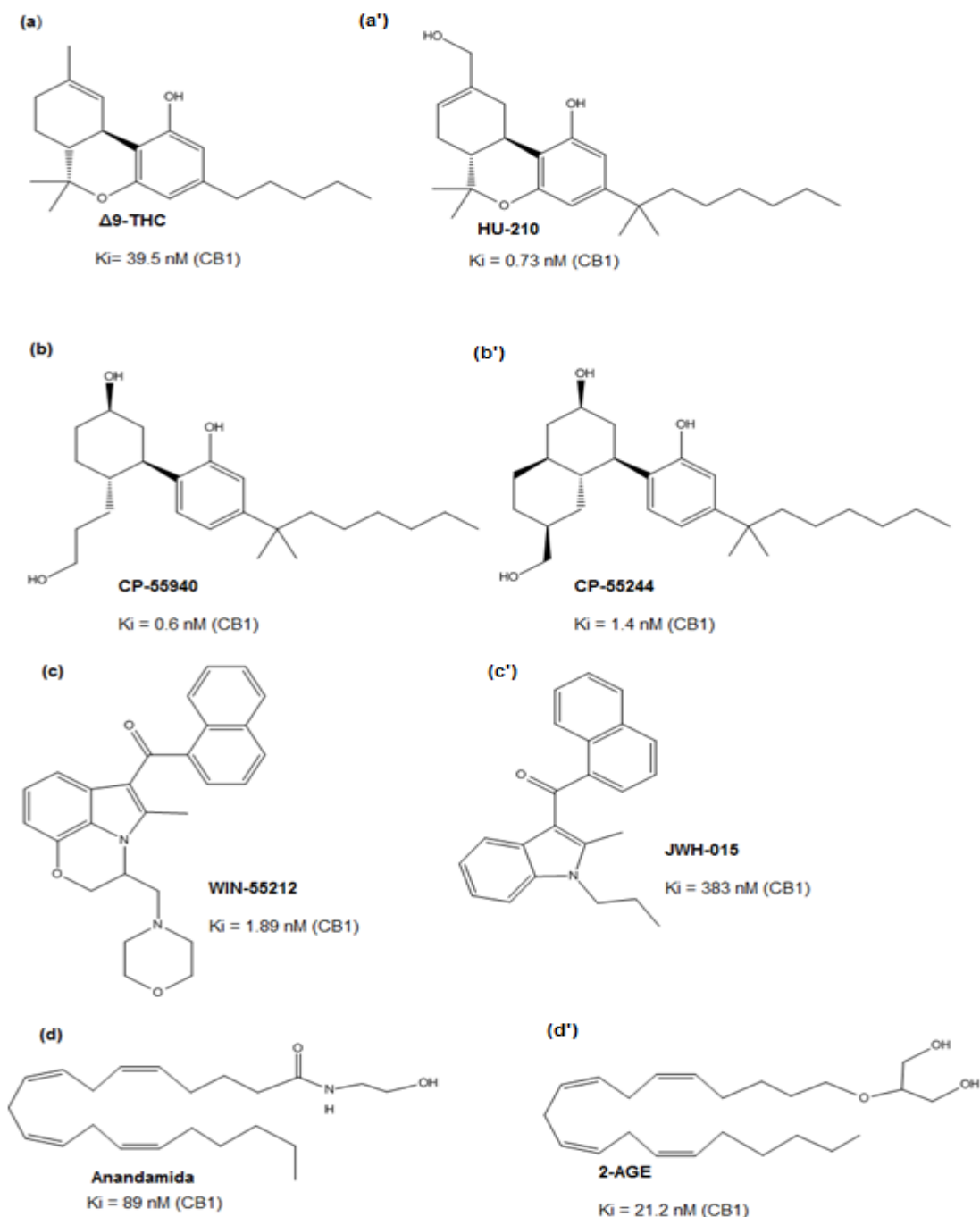
## 1.5 Los receptores de cannabinoides y sus ligandos

### Reseña histórica

Según los registros arqueológicos se han utilizado preparaciones de *Cannabis sativa* con fines terapéuticos y rituales por los hombres desde la antigüedad. La cannabis ha sido empleada por distintas civilizaciones para usos medicinales tales como el alivio del dolor, estimulación del apetito, supresión de las náuseas, fiebres, infecciones, y desordenes ginecológicos. Sir John Russell Reynolds, quien fue médico de la reina Victoria, propuso su uso terapéutico durante el siglo XIX, sin embargo el progreso del conocimiento farmacológico de la cannabis fue lento. En la década de 1940 se aislaron agentes como cannabidiol y cannabinoil y se estudiaron sus propiedades químicas; sin embargo estos compuestos no son los responsables de los efectos psicoactivos de la planta [14]. En el año 1964 se aísla por primera vez el principal componente psicoactivo de la cannabis, el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Figura 1.6 (a)), por Yechiel Gaoni y Raphael Mechoulam del Instituto Weizmann de Ciencias en Rejovot, Israel [15].

La existencia de los receptores de cannabinoides fue confirmada en 1988 con el desarrollo del compuesto CP-55940 (Figura 1.6 (b)) por Pfizer (una corporación farmacéutica multinacional). Dicho compuesto es menos lipofílico que el  $\Delta^9$ -THC y una vez tritiado se utilizó como la primera sonda para los receptores de cannabinoides en radio-ensayos de afinidad competitivos [16]. En 1990 se reporta el primer receptor de cannabinoide derivado de corteza cerebral de rata (CB1) y luego en 1993 se reporta el segundo receptor (CB2) [17]. Como se mencionó anteriormente estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. El receptor CB1 se halla casi en su totalidad en el sistema nervioso central y periférico. El receptor CB2 se encuentra prácticamente restringido al sistema inmune. De manera casi simultánea se descubrieron los ligandos endógenos (endocannabinoides); N-araquidoniletanolamina (anandamida) (Figura 1.6 (d)), y luego 2-araquidonilglicerileter (2-AGE) (Figura 1.6 (d'))

[18-19]. Estos descubrimientos abrieron un campo de exploración para la medicina moderna en la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas [20].



Figura

1.6 Estructura y afinidad por el receptor CB1 de algunos cannabinoides naturales y sintéticos. (a) Agonistas cannabinoides clásicos. (b) Agonistas cannabinoides no clásicos. (c) Derivados de aminoalquilindol. (d) Endocannabinoides.

## Los receptores CB1 y CB2

Los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 han sido detectados en varias especies, tales como humanos, ratas, y ratones. Se ha encontrado ARNm que codifica para el receptor de CB1 en el sistema nervioso central (incluyendo la glándula pituitaria) y en ciertos tejidos periféricos, células inmunes, tejidos reproductivos, tejidos gastrointestinales, ganglios cervicales superiores, corazón, pulmón, vejiga urinaria y en la glándula adrenal. Algunos receptores CB1 se localizan en nervios terminales centrales y periféricos y, cuando son activados, estos receptores parecerían suprimir la liberación neuronal de ciertos neurotransmisores excitadores o inhibidores, entre los que se incluye acetilcolina, noradrenalina, dopamina, 5-hidroxitriptamina, ácido aminobutírico, glutamato y aspartato. El receptor CB2 está presente principalmente en las células del sistema inmune, tales como las células B [21].

## Agonistas de los receptores CB1 y CB2

Los ligandos agonistas son aquellos que gatillan la respuesta fisiológica normal del receptor. La respuesta producida por un agonista aumenta a medida que aumenta la concentración del agonista hasta alcanzar un máximo. Si se aumenta la concentración del agonista luego de haberse alcanzado el máximo no se producirá mayor efecto en la respuesta. Los agonistas por lo general tienen estructuras similares a las del ligando endógeno

Los agonistas de los receptores de cannabinoides se clasifican dentro de cuatro grupos: clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles y eicosanoides. Los cannabinoides clásicos consisten en derivados de dibenzopirano y existen tanto derivados de plantas como análogos sintéticos. Los más investigados de éstos incluyen los derivados psicotrópicos de las plantas,  $\Delta^9$ -tetrahidrocanabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Figura 1.6 (a)) y  $\Delta^8$ -THC, y el cannabinoide sintético, 11-hidroxi- $\Delta^8$ -THC-dimetilheptil (HU-210) (Figura 1.6 (a')). Los cannabinoides no clásicos fueron desarrollados por el equipo de investigación de Pfizer, son similares en estructura respecto a los cannabinoides clásicos, constando de análogos bicíclicos y tricíclicos de  $\Delta^9$ -THC que carecen del anillo de pirano. Ejemplos importantes son los compuestos CP 55940 (Figura 1.6 (b)), CP 55244 (Figura 1.6 (b')) [22]. Por otra parte el grupo de los aminoalquilindoles fue desarrollado por el equipo de investigación de la compañía farmacéutica Sterling Winthrop, siendo el prototipo de este grupo el compuesto WIN 55,212-2 (*R*-(+)-WIN55212) (Figura 1.6 (c)). La estructura de los

compuestos pertenecientes a este grupo es diferente de los cannabinoides clásicos y no clásicos y representan el punto de inicio de una enorme gama de compuestos agonistas, antagonistas y agonistas inversos. Químicamente presentan un centro heterocíclico de indol con diversas ramificaciones laterales de naturaleza lipofílica. Finalmente, dentro del grupo de los eicosanoides el compuesto tipo es el endocannabinoide anandamida (Figura 1.6 (d)), y corresponden a los ligandos endógenos encontrados en el ser humano y la mayoría de los mamíferos.

La mayoría de estos agonistas tiene un centro quiral que le confiere estéreo selectividad en su unión al receptor. Por lo que hay isómeros que presentan mayor actividad. Un ejemplo de esto es la metanandamida, el isómero *R*(+) posee nueve veces más afinidad por el receptor CB1 que el isómero *S*(-).

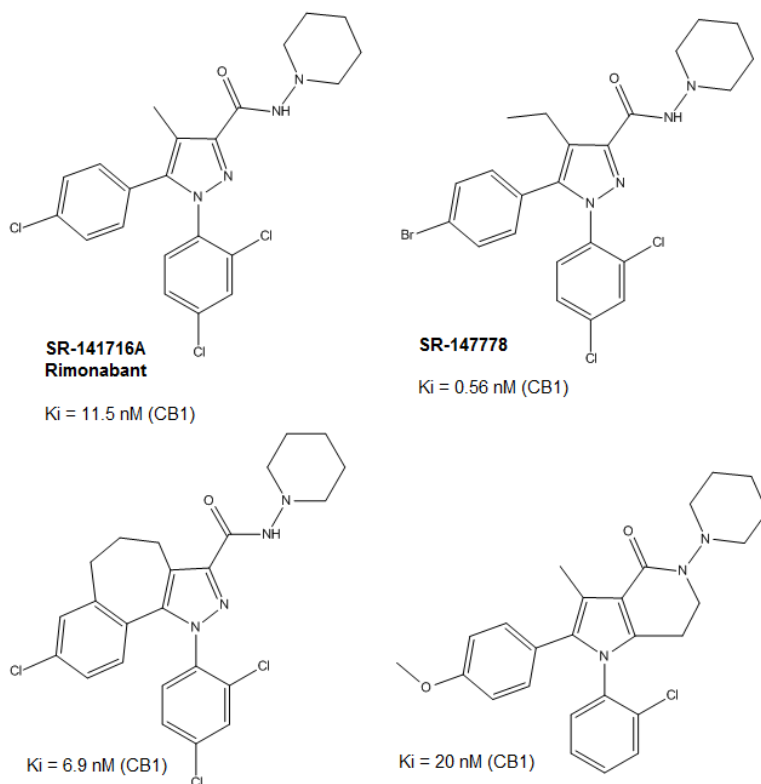
### **Antagonistas y agonistas inversos de los receptores CB1 y CB2**

Los ligandos antagonistas son aquellos que inhiben o contrarrestan total o parcialmente la acción de un agonista. Se clasifican en antagonistas competitivos y no competitivos. Los competitivos se unen al mismo sitio de unión en el receptor que el agonista. A medida que aumenta la concentración del antagonista competitivo disminuye la respuesta producto del agonista. Si se aumenta la concentración del agonista, se podrá revertir el decrecimiento en la respuesta. Los antagonistas no competitivos se unen de manera irreversible por medio de fuertes enlaces, como enlaces covalentes, al sitio activo o a sitios alostéricos (otro sitio distinto del sitio activo) en el receptor. Esto produce un cambio en la conformación del sitio activo del receptor que previene que se unan los agonistas al receptor. El incrementar la concentración del agonista no restablecerá la respuesta en el receptor.

Por su parte los agonistas inversos son ligandos que se unen al sitio activo del receptor en la misma forma que lo haría un ligando agonista, pero producen la respuesta fisiológica opuesta a la de un agonista. Por ejemplo, el diazepam es agonista del receptor GABA<sub>A</sub> que al unirse al receptor produce un efecto sedante, mientras que los agonistas inversos producen ansiedad o incluso efectos convulsivos [23-24]. Funcionalmente esto se debe a la supresión de la actividad constitutiva (si la posee) del receptor en cuestión.

El primero de estos compuestos fue el diarilpirazol, SR141716A, desarrollado por Sanofi (Figura 1.7). Este compuesto es un ligando potente y selectivo del receptor CB1 que fácilmente previene o revierte los efectos mediados por los agonistas de dicho receptor [25]. Además SR141716A puede producir respuestas opuestas a las de los agonistas del receptor CB1, por lo que SR141716A tiene además comportamiento de agonista inverso. En algunos ensayos biológicos en arterias aisladas de rata y conejillo de indias y en tejido de *vas deferens* de ratón, SR141716A ha reportado ser menos potente contra anandamida que contra agonistas no eicosanoides del receptor CB1. Esta discrepancia se deriva de la habilidad de la anandamida para activar tanto receptores de vaniloides como de cannabinoides [26].

Dentro de los antagonistas del receptor CB2, el más notable es SR144528 producido por Sanofi, un diarilpirazol que se une con una remarcada afinidad al receptor CB2. Hay evidencia que indica que SR144528 sería un agonista inverso que puede, por sí mismo, producir efectos cannabimiméticos inversos en el receptor CB2 [27].



**Figura 1.7** Estructura y afinidad de algunos compuestos antagonistas del receptor CB1. Nótese como varía la afinidad por el receptor al cambiar un sustituyente por otro de distinta electronegatividad, o al ciclarse la molécula.

## 1.6 Relaciones estructura-actividad cuantitativa (QSAR)

Los estudios de relaciones estructura-actividad cuantitativa (QSAR, por sus siglas en inglés, *quantitative structure-activity relationships*) buscan identificar y cuantificar las propiedades fisicoquímicas de una molécula y evaluar cuál de estas propiedades tiene efecto en la actividad biológica. De esta manera se podrá establecer una ecuación que correlacione las propiedades fisicoquímicas de las moléculas con la actividad biológica de cada compuesto elucidando así qué propiedades (y en qué grado) juegan un rol importante en la farmacodinámica y/o farmacocinética de los compuestos. Una vez establecida esta ecuación se podrá hacer una predicción de la actividad biológica de un nuevo derivado, análogo a los utilizados para desarrollar el modelo. Esto ofrece una ventaja a la hora de investigar y desarrollar nuevos fármacos debido a que ya no será necesario sintetizar una gran cantidad de moléculas para evaluar ensayos biológicos, sino que permite priorizar la síntesis de aquellos análogos que presenten una alta actividad predicha. De este modo se ahorra tiempo y recursos valiosos [28].

Para establecer una ecuación que relacione la actividad biológica con los parámetros fisicoquímicos de cada molécula se sintetiza una serie de análogos variando una propiedad fisicoquímica específica, como por ejemplo la lipofilia. Luego se grafica la actividad biológica *versus* la propiedad fisicoquímica estudiada para cada análogo y se verifica mediante un análisis de regresión lineal que los datos estén correlacionados. El coeficiente de correlación ( $r$ ) es una medida de cuán bien la ecuación explica la variación en la actividad observada en términos de los parámetros fisicoquímicos presentes en la ecuación. Para un ajuste perfecto el valor del coeficiente de correlación es  $r = 1$ . Esta perfección no es posible con los datos biológicos, por lo que valores de  $r$  mayores a 0.9 son considerados aceptables. El coeficiente de correlación es usualmente expresado como  $r^2$ , donde valores mayores a 0.8 se consideran un buen ajuste [29].

### 1.6.1 Descriptores fisicoquímicos

Los descriptores fisicoquímicos más utilizados en QSAR son la lipofilia, las propiedades electrónicas, y los efectos estéricos. Las propiedades lipofílicas pueden ser fácilmente cuantificadas para la molécula completa como para un sustituyente individual. Mientras que las propiedades electrónicas y estéricas son más difíciles de cuantificar

para una molécula entera, por lo que en estos casos se trabaja habitualmente con sustituyentes individuales.

### Lipofilia

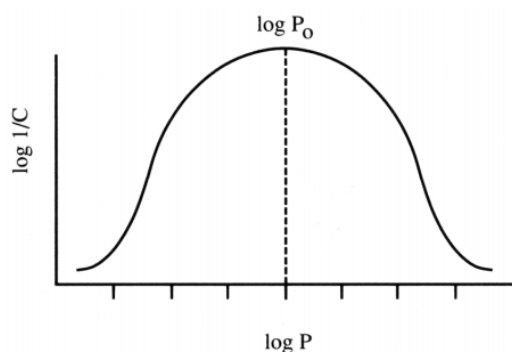
La lipofilia de una molécula es importante cuando la molécula es una droga que debe traspasar una membrana celular y también cuando interacciona con un receptor, por ejemplo un GPCR, en que el sitio ortostérico es habitualmente hidrofóbico [30].

El carácter lipofílico de una droga puede ser medido de forma experimental mediante la distribución relativa en una mezcla de *n*-octanol/agua. Las moléculas hidrófobas se van a disolver en la fracción de *n*-octanol, mientras que las moléculas hidrófilas preferirán la fracción acuosa. Esta distribución relativa se conoce como coeficiente de partición (*P*) y se obtiene de la ecuación siguiente:

$$P = \frac{\text{Concentración de la droga en octanol}}{\text{Concentración de la droga en la fase acuosa}} \quad \text{Ec. 1.1}$$

De la ecuación 1.1 se observa que los compuestos hidrófobos tendrán un valor alto de *P*. Variando los sustituyentes de una molécula se producirán análogos con distinto valor de *P*. Se puede graficar la actividad biológica de estos análogos en función de *P* y así comprobar si existe algún tipo de relación en el carácter lipofílico de la droga y su actividad biológica [31]. La actividad biológica se expresa comúnmente como 1/*C*, donde *C* es la concentración requerida para alcanzar cierto nivel de actividad biológica deseada. Por lo que una droga con un nivel alto de actividad biológica requerirá menor concentración. El gráfico se obtiene graficando log (1/*C*) versus log *P*. Experimentalmente se ha comprobado que la actividad biológica aumenta al incrementar *P* hasta llegar a un valor máximo, luego si se sigue incrementando *P* la actividad biológica comienza a disminuir obteniéndose la gráfica de una parábola (Figura 1.8). En aquellos casos en los que el coeficiente de partición es el único factor que influencia la actividad biológica, la curva parabólica se puede expresar con la siguiente ecuación:

$$\log\left(\frac{1}{C}\right) = -k_1(\log P)^2 + k_2 \log P + k_3 \quad \text{Ec. 1.2}$$



**Figura 1.8** Curva parabólica de  $\log (1/C)$  vs  $\log P$ .

La gráfica con forma de parábola se produce debido a que al incrementar la lipofilia de una molécula esta cruza de forma más fácil la membrana celular hasta llegar a un máximo después del cual incrementar la lipofilia disminuye la actividad biológica debido a que la molécula tiende a quedar retenida en la membrana celular en vez de atravesarla fácilmente, lo que se debe a que las membranas celulares están formadas por una bicapa de fosfolípidos [32].

Los coeficientes de partición pueden ser calculados conociendo la contribución que varios sustituyentes aportan a la lipofilia. Dicha contribución se conoce como la constante de hidrofobia del sustituyente ( $\pi$ ) y es una medida de cuán hidrófobo es un sustituyente en comparación con el hidrógeno. El valor se puede obtener midiendo el coeficiente de partición experimentalmente para un compuesto estándar como el benceno con y sin un sustituyente (X). La constante de hidrofobia para el sustituyente (X) se obtiene utilizando la siguiente ecuación:

$$\pi_X = \log P_X - \log P_H \quad \text{Ec. 1.3}$$

En la **ecuación 1.3**  $P_H$  es el coeficiente de partición para el compuesto de referencia y  $P_X$  es el coeficiente de partición para el compuesto con el sustituyente X. Un valor positivo de  $\pi$  indica que el sustituyente es más hidrófobo que el hidrógeno. Por lo que un valor negativo de  $\pi$  indica que el sustituyente es menos hidrófobo.

El coeficiente de partición  $P$  es una medida de la hidrofobia global de una droga, por lo que es una medida importante de que tan eficientemente una droga es transportada hacia la diana biológica. Por su parte la constante  $\pi$  mide la hidrofobia de una región

específica del esqueleto de la droga y al estar presente en la ecuación QSAR, puede enfatizar cualquier interacción hidrófoba importante que incluya esa región de la molécula con el sitio de unión. En la Tabla 1.1 se muestran valores de  $\pi$  para sustituyentes comunes en compuestos bioactivos.

**Tabla 1.1** Valor de  $\pi$  para diversos sustituyentes en el anillo aromático.

Sustituyente	$\pi$ aromático
H	0,00
Br	0,86
Cl	0,71
F	0,14
NO <sub>2</sub>	-0,28
NH <sub>2</sub>	-1,23
OH	-0,67
OCH <sub>3</sub>	-0,02
CN	-0,57
CF <sub>3</sub>	0,88
CH <sub>3</sub>	0,56
CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,02
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,55

### Efectos electrónicos

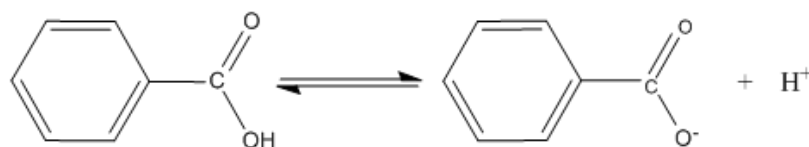
Las propiedades electrónicas de un sustituyente tienen efecto en la polaridad de una molécula o en su ionización. Esto a su vez afecta que tan fácilmente puede atravesar una membrana celular o que tan fuertemente puede la droga unirse a su diana biológica (interacciones dipolares, iónicas o de puentes de hidrógeno).

Para los sustituyentes de un anillo aromático se utiliza una medida denominada *constante de sustituyente de Hammett* ( $\sigma$ ). Esta es una medida de la habilidad de un sustituyente para atraer electrones hacia sí mismo o donarlos, y ha sido determinada midiendo la disociación de una serie de ácidos benzoicos sustituidos comparados con el ácido benzoico sin sustituir [33].

Como el ácido benzoico es un ácido débil, sólo se disocia parcialmente en agua (Figura 1.9). Se alcanza un equilibrio entre las formas ionizadas y no ionizadas del ácido,

donde las proporciones relativas de dichas especies se conocen como la constante de disociación  $K_H$  (el subíndice H significa que no hay sustituyentes en el anillo aromático).

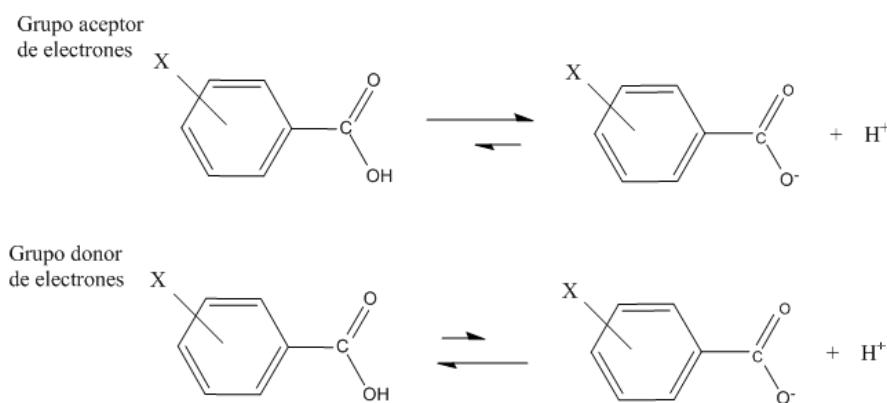
$$K_H = \frac{[PhCO_2^-][H^+]}{[PhCO_2H]} \quad \text{Ec. 1.4}$$



**Figura 1.9** Ionización del ácido benzoico.

Cuando hay un sustituyente presente en el anillo aromático, el equilibrio se ve afectado. Si el sustituyente es un atractor de electrones, como el grupo nitro, da como resultado que el anillo aromático atraiga con más fuerza los electrones y de esa manera se estabiliza el ion carboxilato. Así, el equilibrio se verá desplazado hacia la forma ionizada y el ácido benzoico sustituido será un ácido más fuerte que aquel sin sustituyentes, tendiendo un mayor valor de  $K_X$  (X representa el sustituyente en el anillo aromático) (Figura 1.10).

Si el sustituyente X es un grupo donante de electrones como el grupo alquilo, entonces el anillo aromático es menos capaz de estabilizar el ion carboxilato. El equilibrio se desplaza hacia la izquierda y se obtiene un ácido más débil con un valor más pequeño de  $K_X$ .



**Figura 1.10** Posición de equilibrio dependiendo del sustituyente X

La constante de sustituyente de Hammett ( $\sigma_X$ ) para un sustituyente en particular (X) está definida por la ecuación siguiente:

$$\sigma_X = \log K_X - \log K_H \quad \text{Ec. 1.5}$$

Los ácidos benzoicos con sustituyentes atrayentes de electrones tendrán valores mayores de  $K_X$  que el ácido benzoico no sustituido, por ende el valor de  $\sigma_X$  será positivo. Sustituyentes tales como Cl, CN, o  $\text{CF}_3$  presentan valores positivos de  $\sigma$  (Tabla 1.2).

Por el contrario, los ácidos benzoicos que tengan sustituyentes dadores de carga tendrán valores más pequeños de  $K_X$  que el ácido benzoico sin sustituir. Por lo que el valor de  $\sigma_X$  será negativo para un sustituyente donante electrónico.

Cabe destacar que la constante de Hammett toma en consideración los efectos inductivos y los de resonancia [34]. Por lo que el valor de  $\sigma$  para un sustituyente en particular va a depender si es que está en posición *meta* o *para* [35].

La constante de Hammett no puede ser medida para sustituyentes en posición *orto* debido a que los sustituyentes en esta posición tienen un considerable efecto estérico, además de electrónico.

**Tabla 1.2.** Valor de  $\sigma$  para diversos sustituyentes en el anillo aromático. Se muestran valores para el sustituyente en la posición *meta* ( $\sigma_m$ ) y en la posición *para* ( $\sigma_p$ ).

Sustituyente	$\sigma_m$	$\sigma_p$
H	0,00	0,00
Br	0,39	0,23
Cl	0,37	0,23
F	0,34	0,06
$\text{NO}_2$	0,71	0,78
$\text{NH}_2$	-0,16	-0,66
OH	0,12	-0,37
$\text{OCH}_3$	0,12	-0,27
CN	0,56	0,66
$\text{CF}_3$	0,43	0,54
$\text{CH}_3$	-0,07	-0,17
$\text{CH}_2\text{CH}_3$	-0,07	-0,15
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	-0,07	-0,13

## Factores estéricos

La facilidad con la que una droga se aproxima y une a su respectivo receptor se verá influida por el tamaño y forma de la molécula. Un sustituyente voluminoso puede dificultar la interacción de una droga con su sitio de unión, o por el contrario podría ayudar a orientar debidamente la droga para una unión óptima y así mejorar la actividad biológica. Las propiedades estéricas son más difíciles de cuantificar que las propiedades hidrófobas o electrónicas [36-37].

### Factor estérico de Taft ( $E_S$ )

Se han realizado intentos por cuantificar los efectos estéricos del sustituyente mediante el factor estérico de Taft ( $E_S$ ), cuyo valor puede obtenerse comparando el grado de hidrólisis de un éster alifático sustituido con el grado de hidrólisis de un éster tradicional bajo condiciones ácidas [38].

$$E_S = \log k_X - \log k_0 \quad \text{Ec. 1.6}$$

En la ecuación anterior  $k_X$  es la constante de hidrólisis de un éster alifático con el sustituyente X, mientras que  $k_0$  es la constante de hidrólisis del éster de referencia. Si el sustituyente X es más voluminoso que el átomo de hidrógeno en el éster de referencia, el grado de hidrólisis será menor, por lo que  $E_S$  tendrá valor negativo. Por lo que un valor negativo de  $E_S$  implica que el sustituyente aumenta los efectos estéricos sobre la molécula. Por el contrario un valor positivo de  $E_S$  implica que el sustituyente produce menos efectos estéricos sobre la molécula respecto al éster de referencia.

Los valores de  $E_S$ , sin embargo, al ser una medida de un efecto estérico intramolecular, no dan cuenta de la mejor forma sobre la influencia estérica de las sustituciones o sobre el volumen de una molécula, pues las drogas interactúan con el sitio de unión de forma intermolecular [39]. En la **tabla 1.3** se muestran valores  $E_S$  para sustituyentes comunes en compuestos bioactivos.

**Tabla 1.3** Valores de  $E_s$  para distintos sustituyentes.

Sustituyente	$E_s$
H	0,00
Br	-1,16
Cl	-0,97
F	-0,46
NO <sub>2</sub>	-2,52
NH <sub>2</sub>	-0,61
OH	-0,55
OCH <sub>3</sub>	-0,55
CN	-0,51
CF <sub>3</sub>	-2,40
CH <sub>3</sub>	-1,24
CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-1,31
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-1,60

### Refractividad molar (MR)

Otra medida del factor estérico es proporcionada por un parámetro conocido como refractividad molar (MR). Esta es una medida del volumen ocupado por un átomo o grupo de átomos y su resistencia a la polarización[40]. Se obtiene según la siguiente ecuación:

$$MR = \frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \times \frac{MW}{d} \quad \text{Ec. 1.7}$$

En la **ecuación 1.7**,  $n$  es el índice de refracción,  $MW$  es la masa molar, y  $d$  es la densidad. El término  $MW/d$  define un volumen, y el término  $(n^2-1)/(n^2+2)$  provee un factor de corrección definiendo cuán fácilmente el sustituyente o molécula puede ser polarizado. Esto es significativo si el sustituyente tiene electrones  $\pi$  o pares de electrones sin enlazar.

### 1.6.2 Ecuación de Hansch

Si la actividad biológica de un compuesto está relacionada únicamente con una sola propiedad fisicoquímica, se puede establecer una ecuación simple que relacione la actividad con dicha propiedad fisicoquímica. Sin embargo, la actividad biológica de la mayoría de las drogas depende de una combinación de propiedades fisicoquímicas, por lo que se necesita una ecuación que relacione la actividad biológica con un número de parámetros diferentes. Este tipo de ecuaciones son llamadas *ecuaciones de Hansch* y relacionan la actividad biológica con las propiedades fisicoquímicas vistas anteriormente ( $\log P$  o  $\pi$ ,  $\sigma$ , y factores estéricos) [41]. Cuando el rango de valores para la lipofilia es pequeño la ecuación será lineal (Ecuación 1.8).

$$\log \frac{1}{C} = k_1 \log P + k_2 \sigma + k_3 E_S + k_4 \quad \text{Ec. 1.8}$$

Si por el contrario, se utiliza un rango amplio de  $\log P$ , la ecuación será parabólica (debido a como la lipofilia afecta la actividad biológica) (Ecuación 1.9).

$$\log \frac{1}{C} = -k_1 (\log P)^2 + k_2 \log P + k_3 \sigma + k_4 E_S + k_5 \quad \text{Ec. 1.9}$$

Las constantes  $k_n$  son determinadas mediante regresión lineal múltiple de modo que se obtenga la ecuación con el mejor ajuste.

### 1.6.3 Análisis de Free-Wilson

En el análisis de Free-Wilson, se mide la actividad biológica de un compuesto y luego se compara con la actividad de una serie de análogos sustituidos. Entonces se deriva una ecuación que relaciona la actividad biológica con la presencia de un sustituyente en particular [42].

$$\text{Actividad} = k_1X_1 + k_2X_2 + k_3X_3 + \dots + k_nX_n + Z \quad \text{Ec.1.10}$$

En la **ecuación 1.10**,  $X_n$  está definida como una variable indicadora y toma el valor 1 o 0, dependiendo respectivamente si el sustituyente (n) está presente o no. La contribución a la actividad que realiza cada sustituyente está determinada por el valor de  $k_n$ . La actividad promedio de la estructura en estudio está representada por Z [43].

Debido a que este análisis sólo toma en consideración el efecto global de un sustituyente en la actividad biológica en vez de sus propiedades fisicoquímicas, no se requiere de tablas ni constantes fisicoquímicas, por lo que el método sólo requiere de medidas experimentales de la actividad biológica. Esto resulta ser útil cuando se intenta cuantificar el efecto de sustituyentes inusuales que no se encuentran tabulados.

La desventaja de este análisis es la gran cantidad de análogos que se deben sintetizar y testear para que la ecuación sea significativa.

Otra desventaja es la dificultad para racionalizar los resultados y explicar por qué un sustituyente en una posición particular es bueno o malo para la actividad [44]. Finalmente los efectos de diferentes sustituyentes pueden no ser aditivos. Puede haber interacciones intramoleculares que afecten la actividad.

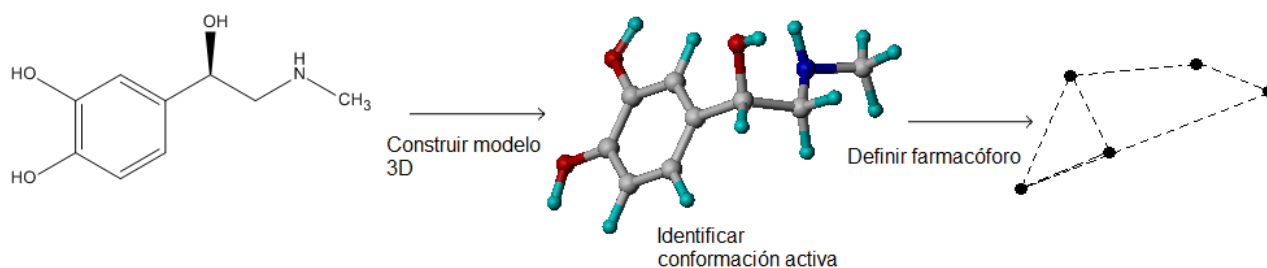
## 1.7 QSAR 3D

En el método de QSAR 3D las propiedades tridimensionales de la molécula son consideradas como un todo en lugar de tomar en cuenta los sustituyentes individuales. En esta técnica se asume que las características más importantes de una molécula son su tamaño, forma y sus propiedades electrónicas (campos electrostáticos).

Existen diversas aproximaciones a la técnica 3D QSAR, pero el método que ha captado mayor interés fue desarrollado por la compañía Tripos y se le conoce como **CoMFA** (*Comparative Molecular Field Analysis*), el cual se basa en el supuesto de que las interacciones entre la droga y el receptor son del tipo no covalentes y que los cambios en la actividad biológica están correlacionados con cambios en los campos estéricos y/o electrostáticos de la droga [45].

### 1.7.1 Definiendo el campo estérico y electrostático

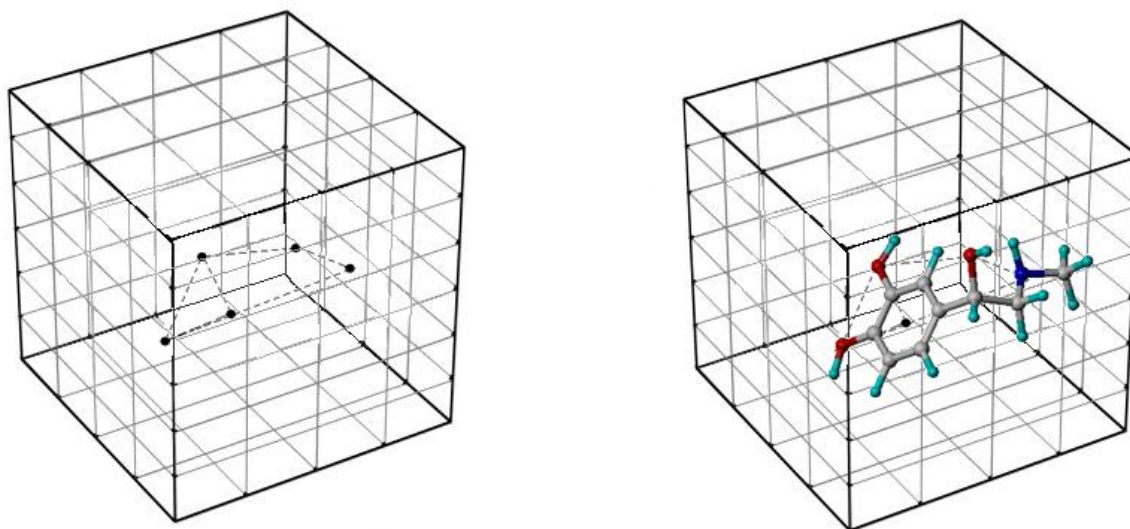
Para poder definir los campos estéricos y electrostáticos, una molécula se construye en un computador utilizando software de modelación molecular. Si se tienen diversas conformaciones estables para una molécula, entonces la conformación activa debe ser identificada y la energía minimizada. Luego se identifica el farmacóforo (Figura 1.11).



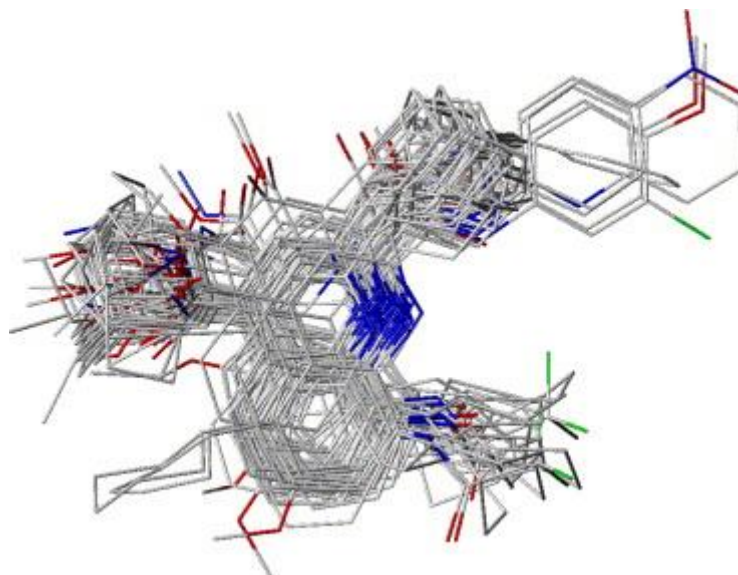
**Figura 1.11** Identificación de la conformación activa y farmacóforo. El farmacóforo en este ejemplo contempla los átomos de oxígeno, el átomo de nitrógeno, y el centro del anillo aromático.

El farmacóforo es el conjunto de rasgos estéricos y electrónicos que son necesarios para asegurar las óptimas interacciones intermoleculares con un blanco biológico específico y para gatillar o bloquear, según sea el caso, la respuesta biológica [46].

El siguiente paso es colocar el farmacóforo en un enrejado virtual (Figura 1.12 (a)). La posición del farmacóforo se mantiene constante y actúa como un punto de referencia cuando se posicionan diferentes moléculas en el enrejado. Por cada molécula que se estudie, su conformación activa y su farmacóforo son identificados y luego la molécula es colocada en el enrejado de tal manera que su farmacóforo calce con el farmacóforo de referencia (Figura 1.12 (b)). Para obtener los mejores resultados, al superponer todas las moléculas en estudio sus farmacóforos respectivos deben calzar lo mejor posible con el de referencia (Figura 1.13).



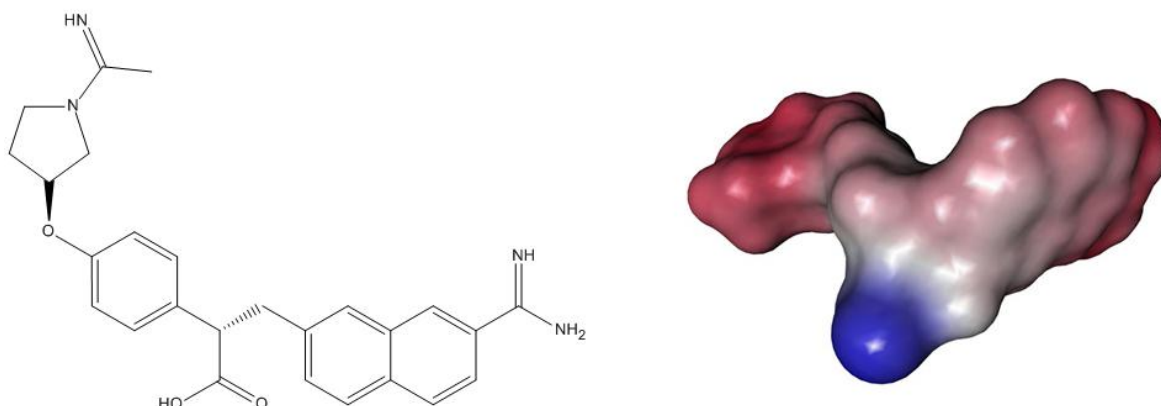
**Figura 1.12** (a) Farmacóforo en el enrejado virtual. (b) Molécula en estudio alineada con el farmacóforo.



**Figura 1.13** Ejemplo de una serie de análogos de moléculas en estudio alineados todos respecto a un farmacóforo de referencia.

Una vez que se ha colocado una molécula en el enrejado, se mide el campo estérico y electrostático alrededor de ellas. Esta medida se realiza posicionando un átomo de prueba como un protón o un carbocatión con hibridación  $sp^3$  en cada uno de los puntos del enrejado virtual. En lo que concierne al campo estérico, este aumentará a medida que el átomo de prueba se acerca a la molécula. Por otra parte, en lo que respecta al campo electrostático, habrá una atracción entre la carga positiva del carbocatión y las regiones ricas en electrones de la molécula, y habrá repulsión entre el carbocatión y las regiones deficientes en electrones de la molécula.

El valor de los campos estéricos y electrostáticos en cada punto del enrejado son tabulados, y esto se repite para cada molécula en estudio. Un valor en particular de la energía estérica se elige para definir la forma de la molécula, y los puntos del enrejado que tengan ese valor de energía se conectan por líneas de contorno para definir el campo estérico. Esto se hace para cada molécula. Para medir el campo electrostático se lleva a cabo un proceso similar. Las regiones ricas y pobres son definidas para cada molécula por líneas de contorno apropiadas (Figura 1.14).



**Figura 1.14** Representación del potencial electrostático de una molécula. En azul aparecen los potenciales negativos (-COOH) y en rojo los positivos.

### 1.7.2 Relacionando forma y distribución electrónica con la actividad biológica

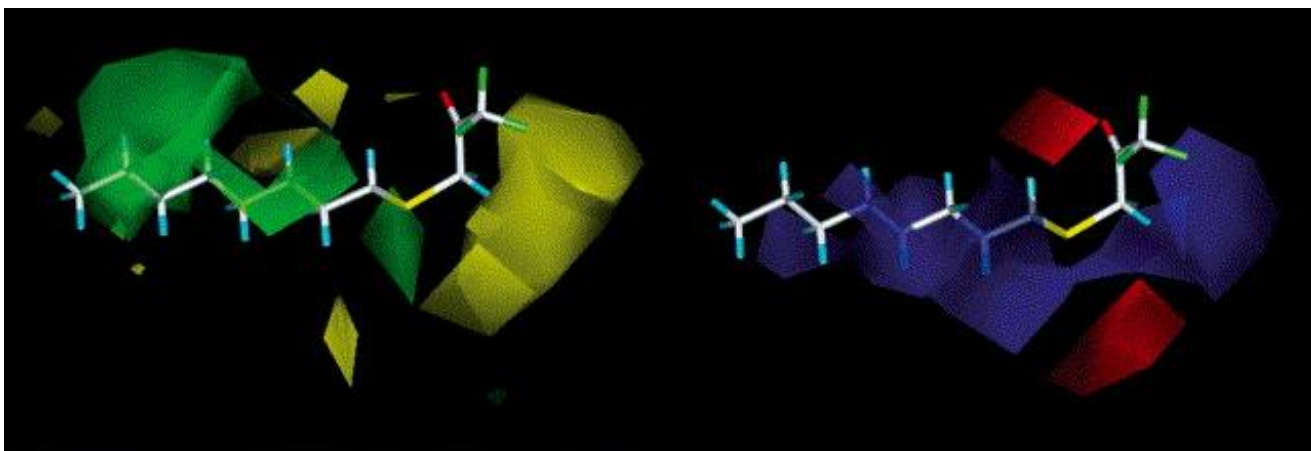
Relacionar el tamaño, forma y distribución electrónica de una serie de moléculas con la actividad biológica de estas difiere significativamente con el QSAR tradicional. En un QSAR tradicional hay unas pocas variables involucradas, por ejemplo, la hidrofobia,  $\pi$ ,  $\sigma$ , y el tamaño. De este modo sólo hay cuatro variables por cada molécula para comparar con la actividad biológica.

En QSAR 3D, las variables para cada molécula son las interacciones estéricas y electrónicas calculadas en miles de puntos del enrejado virtual. Si se tuvieran 100 moléculas en estudio, el número de variables sobrepasa en gran manera el número de estructuras, por lo que no es posible relacionarlas con la actividad biológica por medio del análisis de regresión lineal estándar. Se debe seguir un procedimiento estadístico diferente, que se denomina **mínimos cuadrados parciales** o **PLS** (del inglés *partial least squares*). Es un proceso estadístico computacional el cual es repetido una y otra vez para intentar encontrar la mejor fórmula que relacione la actividad biológica con las diversas variables. Como parte de este proceso el número de variables se reduce a medida que el software filtra aquellas que claramente no están relacionadas con la actividad biológica.

Una característica importante de este análisis es que una estructura es deliberadamente dejada fuera mientras que son el resto de las moléculas se forma algún tipo de relación. Cuando una ecuación ha sido definida, ésta es probada con la estructura

que fue previamente dejada fuera. A esto se le llama **validación cruzada**, y permite evaluar cuán bien la fórmula predice la actividad biológica para la molécula que fue dejada fuera [47]. Los resultados son empleados en una nueva ronda de cálculos, pero esta vez se incluye en los cálculos la estructura que fue dejada fuera y una estructura distinta se deja fuera. Esto conduce a una nueva fórmula mejorada la cual es nuevamente probada con el compuesto dejado fuera. Este proceso continua hasta que la validación cruzada se ha llevado a cabo contra todas las estructuras.

Al término del proceso se obtiene la fórmula final. El poder de predicción de la ecuación final está cuantificado por el **coeficiente de correlación de validación cruzada**  $r^2$ , que usualmente se escribe como  $q^2$ . En contraste con el QSAR normal donde  $r^2$  debe ser mayor que 0.8, los valores de  $q^2$  mayores que 0.3 son considerados significativos. Es más útil mostrar una representación gráfica que muestre cuáles regiones alrededor de la molécula son importantes para la actividad biológica por motivos estéricos o electrónicos. De esta manera, un mapa estérico muestra una serie de contornos coloreados indicando las interacciones estéricas benéficas y perjudiciales alrededor de una molécula representativa del conjunto de moléculas probadas. Un mapa similar de contornos se crea para ilustrar las interacciones electrostáticas benéficas y perjudiciales (Figura 1.15).



**Figura 1.15** Se muestran dos mapas de contornos para una misma molécula donde se señala mediante color verde los sitios donde un sustituyente voluminoso mejoraría la actividad biológica, y en amarillo donde un sustituyente voluminoso perjudica la actividad biológica. El color rojo indica que un sustituyente con potencial electrostático negativo incrementa la actividad biológica, mientras que en las zonas azules un sustituyente con potencial electrostático positivo beneficia la actividad.

### 1.7.3 Potencial hidrofóbico

En lo referente a QSAR tradicional, el factor hidrofóbico es muy importante y la mayoría de las ecuaciones incluyen un valor de  $\log P$ . Sorpresivamente, el cálculo del factor hidrofóbico en un estudio de QSAR 3D no es tan crucial y la mayoría de los estudios exitosos se han basado únicamente en factores estéricos y electrostáticos. Sin embargo, estudios de QSAR 3D pueden llevarse a cabo utilizando el factor hidrofóbico si el átomo sonda es reemplazado por una molécula de agua para así calcular el potencial hidrofóbico en cada punto del enrejado.

### 1.7.4 Ventajas de QSAR 3D por encima de QSAR tradicional

La técnica de QSAR tradicional presenta los siguientes problemas:

- Sólo se pueden estudiar moléculas con estructuras similares
- La validez de los descriptores numéricos está en tela de juicio debido a que estos descriptores se obtienen midiendo velocidades de reacción y constantes de equilibrio en reacciones modelo y luego son tabuladas. Sin embargo, separar una propiedad de otra no es siempre posible en mediciones experimentales. Por ejemplo, la medición del factor estérico de Taft no es puramente una medida del factor estérico porque las velocidades de reacción medidas empleadas para definirlo son también afectadas por factores electrónicos.
- Los descriptores tabulados podrían no incluir datos para sustituyentes inusuales.
- Se requiere sintetizar un rango de moléculas donde se varían los sustituyentes para probar una propiedad en particular.
- Las ecuaciones de QSAR tradicional no sugieren directamente que nuevos compuestos sintetizar.

Los problemas anteriores se evitan realizando estudios de QSAR 3D, que además posee las siguientes ventajas:

- Las interacciones favorables y desfavorables son representadas gráficamente por contornos tridimensionales alrededor de una molécula representativa. Una imagen es mucho más fácil de interpretar que una fórmula matemática.
- En QSAR 3D las propiedades de la molécula de prueba son calculadas individualmente por un programa. No existe dependencia en factores experimentales o tabulados. No hay necesidad de restringir el estudio sólo a moléculas de estructura similar. Mientras uno esté seguro de que todos los compuestos en estudio compartan el mismo farmacóforo e interaccionan del mismo modo con la diana biológica, pueden ser analizados en un estudio de QSAR 3D.
- La representación gráfica de las interacciones benéficas y perjudiciales permiten diseñar nuevas estructuras. Como ejemplo, si un mapa de contorno muestra un efecto estérico favorable en una ubicación particular, esto implica que el sitio de unión de la droga tiene espacio para extender más la molécula en esa ubicación. Esto puede conducir a interacciones más favorables entre la droga y su receptor.
- Tanto el QSAR tradicional como el 3D pueden ser empleados sin la necesidad de conocer la estructura de la diana biológica.

### 1.7.5 Problemas potenciales de QSAR 3D

Hay que tener en cuenta ciertas consideraciones al momento de realizar un QSAR 3D para evitar equivocaciones. Algunas de estas son:

- Se debe procurar que cada molécula esté en su conformación activa cuando se procede al alineamiento.
- Cada molécula debe estar debidamente alineada con respecto a las otras, de manera tal que sus farmacóforos coincidan.

Es posible conocer la conformación activa en estructuras rígidas como los esteroides, pero es más difícil con moléculas flexibles que tienen la capacidad de rotar sus enlaces. Por lo que resulta de utilidad tener un análogo cuya conformación esté restringida y sea biológicamente activo para que actúe como guía para la probable conformación activa. Entonces se pueden construir en el computador moléculas más flexibles con la conformación que calce lo más posible con la del análogo más rígido. Si la estructura del sitio de unión se conoce, esto puede ser útil para decidir la conformación activa probable para las moléculas y como deben ser alineadas previo al estudio QSAR 3D.

Se debe asegurar que todos los compuestos en estudio interactúen con la diana farmacológica de manera similar. Por ejemplo, un estudio de todos los posibles inhibidores de la acetilcolinesterasa está condenado al fracaso. La gran diversidad de estructuras involucradas hace imposible alinearlas para generar un farmacóforo tridimensional. Además, los diferentes inhibidores no interactúan con la enzima del mismo modo. Estudios cristalográficos de rayos X de complejos enzima-inhibidor muestran que los inhibidores tacrina, edrofonio, y decametonio tienen todas diferentes orientaciones al unirse al sitio activo.

## 2 Hipótesis

Considerando lo siguiente:

- Los abundantes reportes sintéticos de compuestos de estructura aminoalquilindol con afinidad tanto CB1 como CB2.
- La similitud estructural de todos estos compuestos, en que se conserva el núcleo común indol.
- Las modificaciones químicas estructurales acotadas a tres regiones de sustitución en el anillo heterocíclico: las posiciones 1, 3, y el anillo de benceno indólico (Figura 2.1)

**Figura 2.1** Tres regiones de modificación posible en el anillo indol.

- La ausencia de trabajos que busquen explicar por qué algunos compuestos presentan más o menos afinidad por un determinado subtipo de receptor a pesar de su aparente similitud molecular.

Postulamos que:

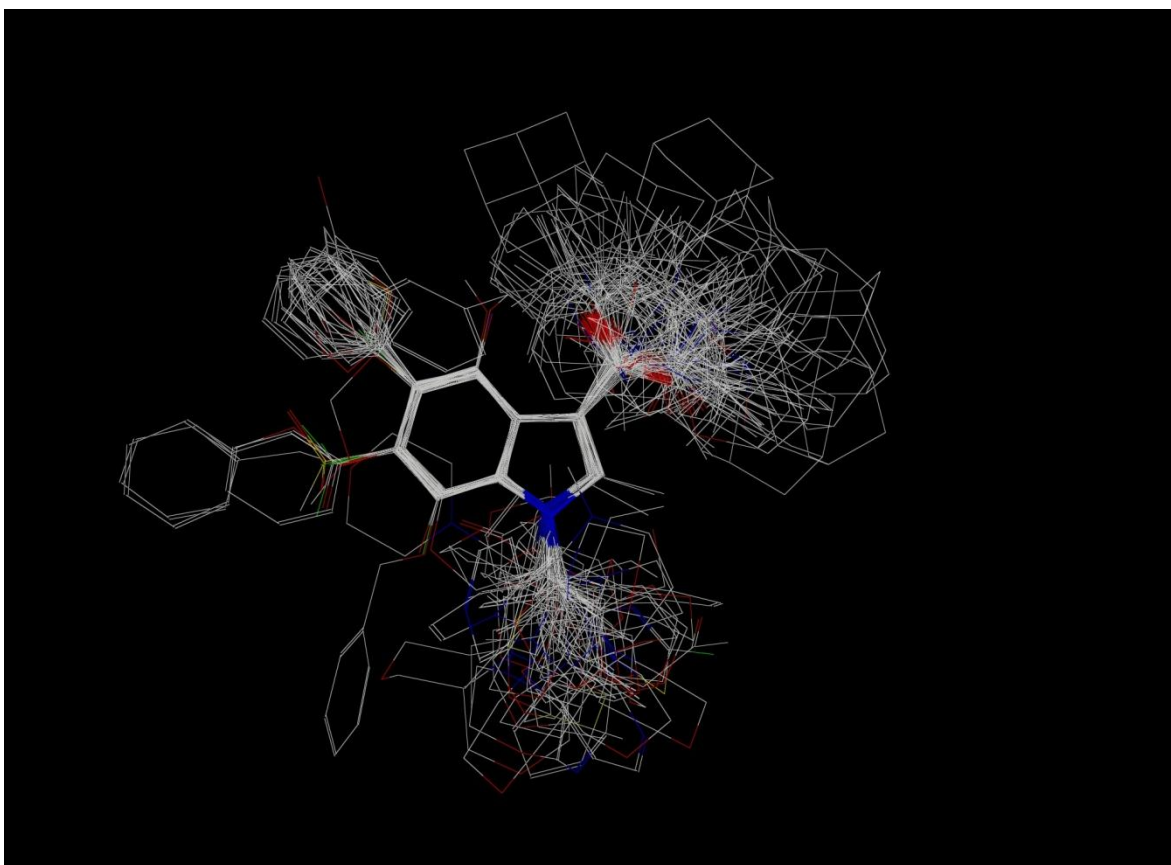
1. Deben haber similitudes en los potenciales electrostáticos y estéricos en la familia aminoalquilindol, lo que debe explicar la afinidad que presentan por ambos subtipos de receptores de cannabinoides.
2. También deben haber diferencias claras en los potenciales electrostáticos y estéricos en la familia aminoalquilindol, lo que explicaría la selectividad que presentan muchos compuestos reportados por un subtipo de receptor en particular.
3. Dada la naturaleza lipofílica de las moléculas afines a estos receptores, así como por el entorno hidrofóbico del sitio de unión cannabinoide, la mayor contribución a la actividad biológica vendría dada por el potencial estérico de los compuestos.

### 3 Resultados y Discusiones

Como se mencionó en el apartado de introducción, una de las familias de compuestos cannabinoides de síntesis que se ha estudiado más intensamente y con mayores proyecciones futuras son los aminoalquilindoles. Con el fin de obtener información valiosa para el diseño y síntesis de nuevos compuestos de esta clase, así como para explicar las diferencias en cuanto su selectividad por un subtipo de receptor (CB1/CB2), se realizó una búsqueda y recopilación bibliográfica en el estado del arte de un total de 92 compuestos [48-50], cuyas estructuras se reportan en el Apéndice. A continuación se procede a presentar los resultados y discusión de los estudios de 3D-QSAR/ CoMFA realizados en esta serie de moléculas.

La conformación activa para los compuestos es una etapa clave de todo análisis CoMFA [51]. Por otra parte uno de los parámetros más sensibles en el análisis CoMFA es el alineamiento de todas las moléculas del estudio [52]. La exactitud predictiva de los modelos CoMFA y la confiabilidad de los contornos depende directamente del algoritmo utilizado en el alineamiento [52]. En nuestro caso el problema se solucionó empleando un alineamiento por núcleo común, o sea todos los compuestos se superpusieron haciendo coincidir el anillo común indol. Por otra parte la minimización energética de las moléculas se realizó por mecánica molecular (campo de fuerza de Tripos) y una subsecuente dinámica molecular de templado simulado. Finalmente se asignaron cargas de Gasteiger-Hückel a cada átomo en las moléculas [53-54].

En la siguiente figura (Figura 3.1) se muestra el alineamiento global de todos los compuestos estudiados



**Figura 3.1** Alineamiento por núcleo común indol de los compuestos estudiados. Se aprecian tres zonas de variabilidad estructural: en el anillo de benceno, en la posición 3 y las alquilaciones del nitrógeno indólico.

La primera etapa en el análisis estadístico es la realización de un estudio de validación cruzada para obtener el número óptimo de componentes (N) y el valor de  $q^2$ . El análisis del número de componentes para ambos modelos se muestra en la siguiente tabla (Tabla 3.1). En ambos casos se escoge el N que genere el mayor valor de  $q^2$  y el menor error posible.

**Tabla 3.1** Análisis de componentes\*

CoMFA CB1															
SEP	0.268	<b>0.263</b>	0.273	0.277	0.284	0.297	0.305	0.311	0.318	0.322	0.329	0.335	0.341	0.348	0.355
q <sup>2</sup>	0.704	<b>0.722</b>	0.709	0.709	0.703	0.685	0.677	0.674	0.671	0.673	0.672	0.673	0.672	0.672	0.672
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CoMFA CB2															
SEP	0.432	0.392	0.388	0.374	0.373	0.369	0.366	0.37	0.374	<b>0.375</b>	0.377	0.38	0.383	0.387	0.391
q <sup>2</sup>	0.440	0.546	0.563	0.600	0.611	0.625	0.638	0.639	0.637	<b>0.643</b>	0.647	0.649	0.650	0.650	0.651
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<b>10</b>	11	12	13	14	15

\*SEP = Error estándar de la predicción. q<sup>2</sup> = Coeficiente de validación cruzada. N = número de componentes.

El coeficiente de validación cruzada q<sup>2</sup> es un indicador de que tan bueno es el modelo para predecir la actividad biológica de los mismos compuestos utilizados en la construcción del modelo (set de entrenamiento). Por otra parte el número óptimo de componentes (N) corresponde a la agrupación de variables independientes (valores de potenciales estéricos y electrostáticos en cada punto del enrejado virtual), y como norma general debe ser menor a un tercio del número de compuestos.

Los parámetros estadísticos de nuestro modelo CoMFA se muestran en la **tabla 3.2**. Para que un modelo sea confiable se requiere que el valor de coeficiente de validación cruzada q<sup>2</sup> sea mayor a 0.5 [55]. El modelo obtenido presenta buenos valores de r<sup>2</sup>, F, y q<sup>2</sup>, así como pequeños valores del error estándar de la estimación (SEE) tanto para CB1 como para CB2, lo que sugiere que nuestro modelo es confiable y predictivo. Las contribuciones estéricas y electrostáticas fueron del orden de 70% y 30% respectivamente en ambos casos.

**Tabla 3.2** Sumario de parámetros estadísticos de los modelos CoMFA\*

N	q <sup>2</sup>	r <sup>2</sup>	CoMFA CB1				%Contribución		
			SEE	F	PRESS	SD	Estérico	Electrostático	
2	0,722	0,845	0,197	100	5,46	15,22	0,641	71,4	28,6
CoMFA CB2									
10	0,643	0,999	0,021	4376	2,56	10,16	0,748	71,2	28,8

\*r<sup>2</sup> = Coeficiente de correlación de Pearson (coeficiente de correlación multilineal). SEE = error estándar de la estimación. F = valor del test de Fischer. PRESS = suma de las desviaciones cuadradas entre la actividad biológica real y predicha para cada molécula en el set de prueba. SD = suma de las desviaciones cuadradas entre la actividad biológica de cada molécula en el set de prueba y la actividad promedio de las moléculas del set de entrenamiento. r<sup>2</sup><sub>pred</sub> = valor predictivo de r<sup>2</sup> basado solamente en las moléculas del set de prueba.

Como se aprecia en la **tabla 3.2** la actividad biológica de los compuestos se debe mayormente a su contribución estérica. Esto no es de extrañar debido a que el sitio activo de los receptores cannabinoides está conformado por residuos aminoacídicos hidrofóbicos. Además los ligandos endógenos para estos receptores son derivados de fosfolípidos de membrana de naturaleza altamente hidrófoba.

El valor de r<sup>2</sup><sub>pred</sub> está basado solamente en las moléculas del set de prueba y se obtuvo de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$r_{pred}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - x_i)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad Ec. 3.1$$

**Ecuación 3.1.** y<sub>i</sub>= valor de la actividad biológica predicha de cada molécula en el set de prueba, x<sub>i</sub>= valor de la actividad biológica real de cada molécula en el set de prueba.  $\bar{x}$ = actividad promedio de las moléculas del set de entrenamiento.

El valor de  $r^2_{\text{pred}}$  es una medida de la capacidad predictiva externa del modelo. O sea es un indicador de que tan fiable es el QSAR en la predicción de actividades biológicas de moléculas que no se consideraron en el análisis (ni como set de entrenamiento ni como set de prueba). En este caso los valores de  $r^2_{\text{pred}}$  fueron de 0.641 para CB1 y 0.748 para CB2. Valores iguales o mayores a 0.6 se consideran buenos.

Los valores de actividad predichos de los compuestos por cada modelo CoMFA se presentan en la **tabla 3.3**. Las estructuras de las moléculas de la tabla se pueden revisar en el apéndice. El gráfico de los valores predichos de  $pK_i$  versus el valor experimental de cada uno se muestra en la **figura 3.2**. La mayoría de los puntos tiene una buena distribución a lo largo de la recta  $y=x$ , lo que sugiere que la calidad del modelo 3D-QSAR es buena.

**Tabla 3.3.** Valores de  $K_i$ ,  $pK_i$  y residuales de los modelos en CB1 y CB2.

<b>CoMFACB1</b>				
<b>Molécula</b>	<b><math>K_i</math> CB1 (nM)</b>	<b><math>pK_i</math>real (M)</b>	<b><math>pK_i</math>predicho (M)</b>	<b>Residuales</b>
<b>Set de entrenamiento</b>				
<b>1</b>	1660.0	5.780	5.664	0.116
<b>2</b>	488.0	6.312	6.223	0.089
<b>3</b>	698.0	6.156	6.325	-0.169
<b>4</b>	530.0	6.276	6.352	-0.076
<b>5</b>	3617.0	5.442	5.462	-0.020
<b>6</b>	2791.0	5.554	5.526	0.028
<b>7</b>	3621.0	5.441	5.531	-0.090
<b>8</b>	1258.9	5.9	5.918	-0.018
<b>9</b>	389.0	6.41	6.353	0.057
<b>10</b>	245.5	6.61	7.022	-0.412
<b>11</b>	1096.5	5.96	5.958	0.002
<b>12</b>	281.8	6.55	6.216	0.334
<b>13</b>	2818.4	5.55	5.665	-0.115
<b>14</b>	776.2	6.11	5.978	0.132
<b>15</b>	851.1	6.07	6.065	0.005
<b>16</b>	1288.2	5.89	5.911	-0.021
<b>17</b>	1698.2	5.77	5.775	-0.005
<b>18</b>	1862.1	5.73	5.808	-0.078

19	229.1	6.64	6.417	0.223
20	363.1	6.44	6.551	-0.111
21	616.6	6.21	6.070	0.140
22	131.8	6.88	6.907	-0.027
23	61.7	7.21	7.036	0.174
24	72.4	7.14	6.948	0.192
25	537.0	6.27	6.176	0.094
26	562.3	6.25	6.130	0.120
27	91.2	7.04	6.859	0.181
28	213.8	6.67	6.695	-0.025
29	281.8	6.55	6.921	-0.371
30	144.5	6.84	6.605	0.235
31	676.1	6.17	6.083	0.087
32	660.7	6.18	6.222	-0.042
33	380.2	6.42	6.723	-0.303
34	213.8	6.67	6.635	0.035
35	691.8	6.16	6.487	-0.327
36	1258.9	5.9	6.120	-0.220
<b>Set de prueba</b>				
37	1828.1	5.738	6.141	-0.40
38	12.3	7.91	6.999	0.91
39	13.2	7.88	6.93	0.95
40	44.7	7.35	6.886	0.46
41	33.1	7.48	6.73	0.75
42	28.2	7.55	6.762	0.79
43	1000.0	6	6.462	-0.46
44	31.6	7.5	6.773	0.73
45	25.1	7.6	6.825	0.77
46	1621.8	5.79	6.218	-0.43
47	354.8	6.45	6.927	-0.48
48	47.9	7.32	6.883	0.44
49	2238.7	5.65	6.124	-0.47
<b>CoMFA CB2</b>				
Molécula	K <sub>i</sub> CB2 (nM)	pK <sub>i</sub> real (M)	pK <sub>i</sub> predicho (M)	Residuales
<b>Set de entrenamiento</b>				
1	110	6.959	6.974	-0.02
2	98.0	7.009	7.028	-0.02
3	67.0	7.174	7.169	0.01

<b>4</b>	50.0	7.301	7.330	-0.03
<b>5</b>	10.3	7.987	7.964	0.02
<b>7</b>	6.4	8.196	8.174	0.02
<b>10</b>	3.2	8.495	8.536	-0.04
<b>11</b>	3.3	8.481	8.478	0.00
<b>12</b>	4.6	8.337	8.348	-0.01
<b>15</b>	4.4	8.357	8.385	-0.03
<b>17</b>	26.0	7.585	7.522	0.06
<b>20</b>	11.0	7.959	7.972	-0.01
<b>21</b>	16.0	7.796	7.811	-0.02
<b>23</b>	2.6	8.585	8.579	0.01
<b>24</b>	2.1	8.678	8.647	0.03
<b>25</b>	5.9	8.229	8.234	-0.01
<b>27</b>	2.8	8.553	8.545	0.01
<b>28</b>	3.3	8.481	8.500	-0.02
<b>30</b>	1.8	8.745	8.730	0.02
<b>34</b>	8.2	8.086	8.079	0.01
<b>35</b>	2.8	8.553	8.542	0.01
<b>37</b>	17.8	7.750	7.743	0.01
<b>41</b>	0.9	9.056	9.060	0.00
<b>43</b>	2.9	8.538	8.521	0.02
<b>45</b>	1.4	8.854	8.847	0.01
<b>49</b>	31.0	7.509	7.489	0.02
<b>50</b>	50.0	7.301	7.299	0.00
<b>51</b>	189	6.724	6.719	0.01
<b>52</b>	12.7	7.896	7.907	-0.01
<b>53</b>	25.4	7.595	7.567	0.03
<b>54</b>	11.2	7.951	7.980	-0.03
<b>55</b>	22.2	7.654	7.651	0.00
<b>56</b>	11.6	7.936	7.964	-0.03
<b>57</b>	2.5	8.606	8.608	0.00
<b>58</b>	2.0	8.693	8.691	0.00
<b>59</b>	70.8	7.150	7.134	0.02
<b>60</b>	5.0	8.301	8.299	0.00
<b>61</b>	1.6	8.796	8.806	-0.01
<b>62</b>	3.0	8.523	8.498	0.03
<b>63</b>	2.5	8.602	8.635	-0.03
<b>64</b>	3.5	8.456	8.452	0.00
<b>65</b>	8.5	8.071	8.082	-0.01

<b>66</b>	0.5	9.292	9.273	0.02
<b>67</b>	9.3	8.032	8.028	0.00
<b>68</b>	3.1	8.509	8.504	0.01
<b>69</b>	9.3	8.032	8.039	-0.01
<b>70</b>	27.0	7.569	7.556	0.01
<b>71</b>	32.0	7.495	7.502	-0.01
<b>72</b>	1.9	8.721	8.743	-0.02
<b>73</b>	5.8	8.237	8.254	-0.02
<b>74</b>	9.2	8.036	8.010	0.03
<b>75</b>	2.0	8.699	8.671	0.03
<b>76</b>	2.1	8.678	8.661	0.02
<b>77</b>	2.2	8.658	8.644	0.01
<b>78</b>	3.1	8.509	8.532	-0.02
<b>79</b>	2.9	8.538	8.554	-0.02
<b>80</b>	20.0	7.699	7.721	-0.02
<b>81</b>	8.3	8.081	8.066	0.02
<b>82</b>	1.3	8.886	8.884	0.00
<b>83</b>	35.0	7.456	7.455	0.00

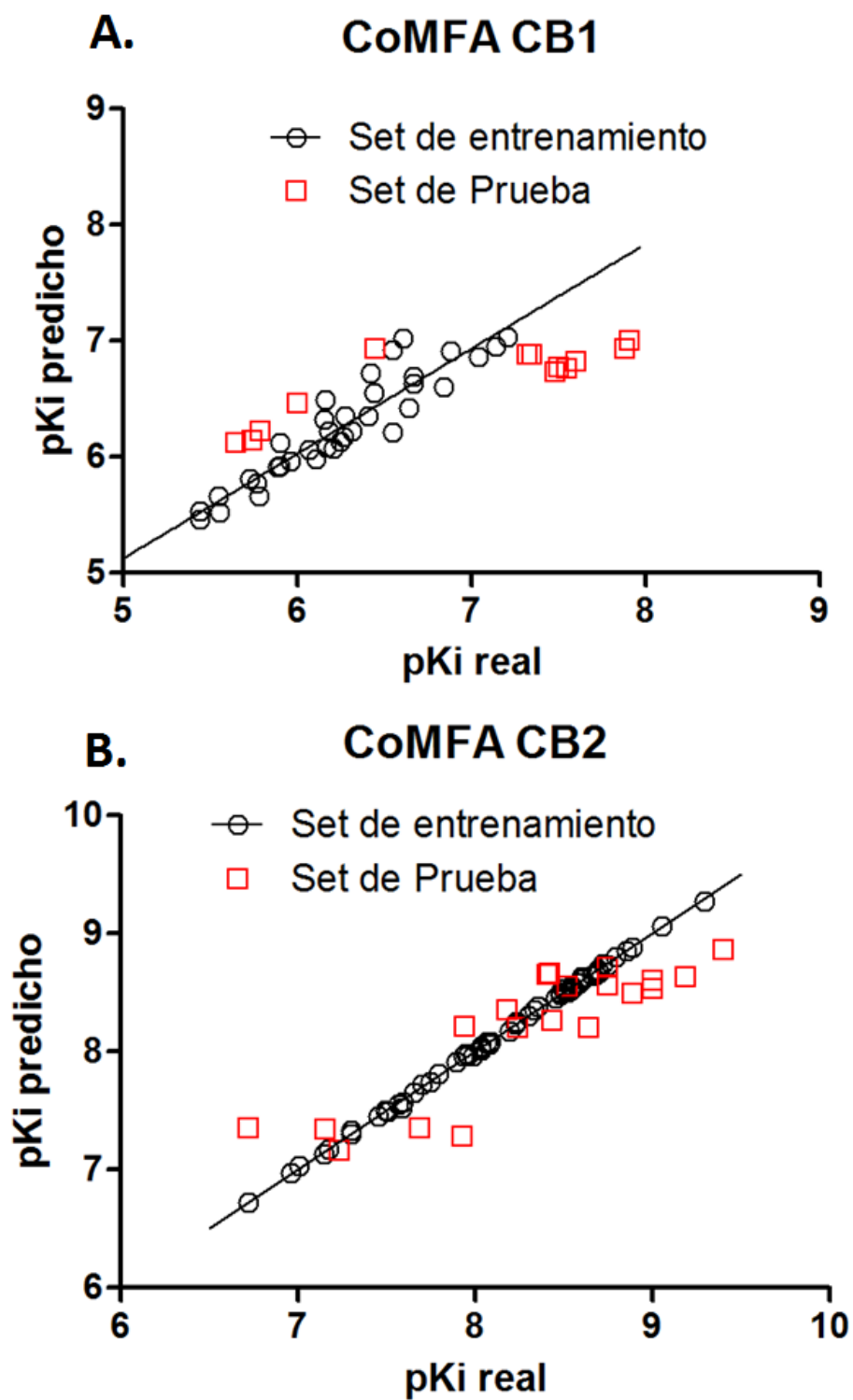
---

**Set de prueba**

---

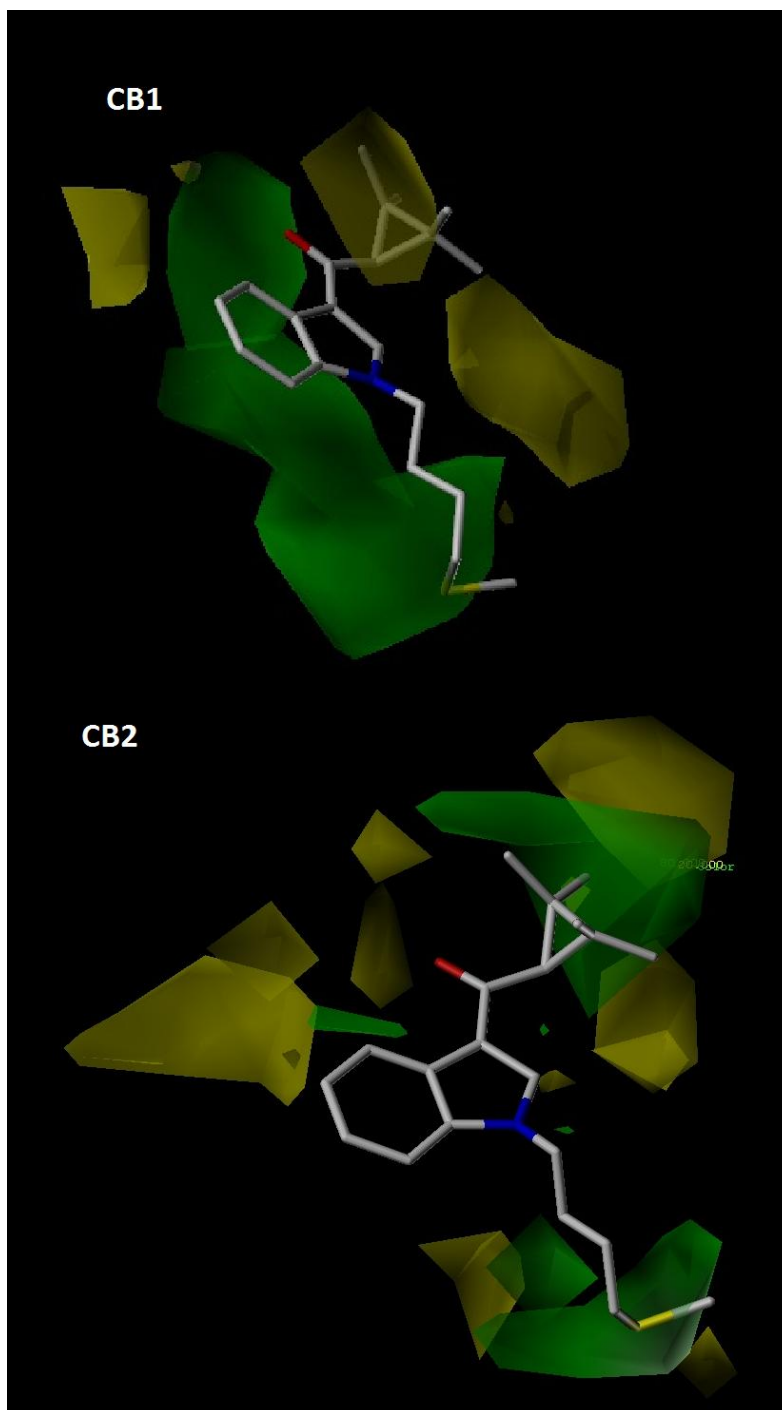
<b>6</b>	5.7	8.242	8.202	0.04
<b>8</b>	3.0	8.523	8.553	-0.03
<b>9</b>	3.9	8.409	8.651	-0.24
<b>18</b>	58.0	7.237	7.164	0.07
<b>26</b>	2.3	8.638	8.205	0.43
<b>32</b>	1.3	8.886	8.494	0.39
<b>33</b>	1.0	9.004	8.606	0.40
<b>36</b>	11.5	7.939	8.209	-0.27
<b>39</b>	0.7	9.187	8.635	0.55
<b>42</b>	1.0	9.000	8.530	0.47
<b>48</b>	3.7	8.432	8.264	0.17
<b>84</b>	11.8	7.928	7.283	0.65
<b>85</b>	20.5	7.688	7.353	0.34
<b>86</b>	70.0	7.155	7.346	-0.19
<b>87</b>	6.6	8.180	8.353	-0.17
<b>88</b>	190	6.721	7.350	-0.63
<b>89</b>	3.8	8.420	8.662	-0.24
<b>90</b>	0.4	9.398	8.863	0.53
<b>91</b>	1.8	8.745	8.715	0.03
<b>92</b>	1.8	8.745	8.557	0.19

---

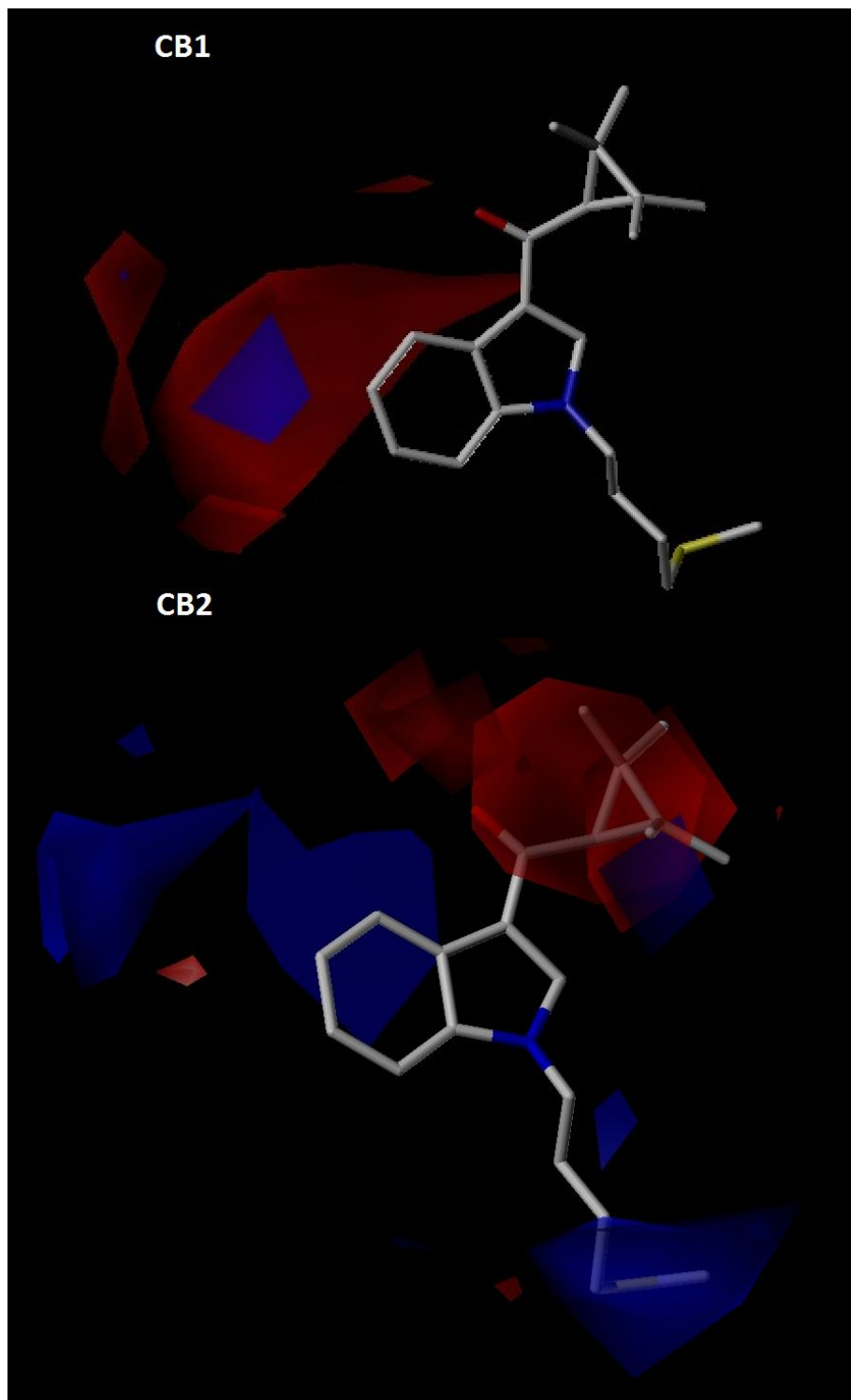


**Figura 3.2.** Actividad experimental versus actividad predicha para cada molécula. **A.** Modelo CoMFA CB1. **B.** Modelo CoMFA CB2.

La siguientes figuras resumen los mapas de potenciales estéricos (Figura 3.3) y electrostáticos (Figura 3.4) para los receptores CB1 y CB2.



**Figura 3.3** Mapas de potenciales estéricos CB1 y CB2 para el compuesto N° 90. Las regiones verdes indican que sustituyentes voluminosos favorecen la actividad viceversa las amarillas.



**Figura 3.4** Mapas de potenciales electrostáticos CB1 y CB2 para el compuesto N° 90. Los contornos azules indican donde la presencia de carga positiva favorece la actividad, mientras que los contornos rojos indican donde carga negativa favorece la actividad.

Para facilitar el análisis dividimos la molécula en tres regiones más un conector como se ilustra a continuación (Figura 3.5).

**Figura 3.5** Estructura del compuesto representativo N° 90. Se muestran las regiones analizadas en el estudio CoMFA.

Para sistematizar nuestro análisis y obtener información útil de las relaciones estructura-actividad en los receptores CB1 y CB2, a continuación focalizamos nuestro análisis en las regiones moleculares definidas en la **figura 3.5**.

## **Análisis para el receptor CB1**

### **Análisis de campo estérico**

#### **Región I:**

Se evidencia un gran poliedro verde en torno a esta región y que además continúa a lo largo de toda la región III. A una mayor distancia del poliedro verde en la región I se aprecia una región amarilla. Esto significa que sustituyentes voluminosos en cualquier posición del benceno del indol aumentan la actividad biológica. Sin embargo como ya mencionamos la región amarilla limita en cierto grado el tamaño de las sustituciones en posición *para* respecto el nitrógeno del indol. En resumen podemos decir que la única limitación para esta región sería más bien el largo de la conexión del sustituyente al benceno en la posición *para*.

#### **Región II:**

La región II se encuentra completamente rodeada por un mapa estérico restrictivo (amarillo). Esto significa que existe una gran limitación al tamaño de las sustituciones después del conector. La actividad se verá favorecida con la presencia de anillos y grupos pequeños.

#### **Región III:**

La cadena está completamente rodeada de una región verde que termina en el átomo de azufre del compuesto (N° 90). Esto se puede aprovechar no aumentando el largo de la cadena sino que el grado de ramificación de esta o sustituyéndola por ciclos más voluminosos de longitud semejante.

#### **Conector:**

No se aprecian restricciones significativas ni grandes concesiones al tamaño de este, por lo que eventualmente la contribución del conector a la actividad biológica viene dada por la disposición angular que permite entre las regiones I y II. Es interesante la investigación del cambio del conector carbonílico por isómeros o bien otro tipo de cadenas.

## **Análisis de campo electrostático**

### **Región I:**

Evidencia una gran área roja contigua a la posición 4 respecto al nitrógeno del indol. Esto significa que podemos conectar sustituyentes electronegativos al benceno o bien reemplazar el anillo por un isómero con propiedades electronegativas como por ejemplo un tiofeno u otro anillo pirrol.

### **Región II y III:**

No se aprecian potenciales electronegativos ni electropositivos, por lo que *a priori* la naturaleza electrónica de las sustituciones no tiene un mayor impacto en la actividad biológica. Esto sin embargo más que ser una limitación al diseño, ofrece la posibilidad de evaluar múltiples opciones electrónicas.

La ausencia de información en particular en la región II se debe a la similitud de los anillos en esa zona y su neutralidad eléctrica: ciclopropil, adamantil, ciclohexil, y fenil.

### **Conector:**

Sólo se aprecia un pequeño poliedro rojo en las cercanías al oxígeno, lo que sugiere que la presencia de este átomo es favorable para la actividad.

## **Análisis para el receptor CB2**

### **Análisis de campo estérico**

#### **Región I:**

Un gran poliedro amarillo cercano a las posiciones meta y para respecto al nitrógeno indólico limita drásticamente la posibilidad de sustituir en esas posiciones. A diferencia del mapa para CB1 hay una ausencia prácticamente total de regiones verdes, por lo que podemos incrementar la selectividad por un subtipo de receptor modulando el tamaño e hidrofobia de los sustituyentes en el anillo benceno.

Aparentemente no hay restricciones pero tampoco sería favorable mayormente la sustitución de las posiciones 6 y 7 del indol.

### **Región II:**

La primera impresión es un poliedro verde que rodea el anillo ciclopropil, aunque sin embargo vemos también dos poliedros amarillos rodeando esta primera región verde. Esto significa que a diferencia del mapa para CB1 aquí si existe una posibilidad acotada para aumentar el tamaño del anillo o el volumen de sus sustituyentes.

Para incrementar la selectividad por el receptor CB2 se debería explorar el cambio completo del anillo ciclopropil por otros como por ejemplo ciclohexil o fenil. De hecho si vemos los valores de  $K_i$  para los compuestos 38 a 42, vemos que presentan esta clase de anillos voluminosos en la región II y como es de esperarse de acuerdo a los resultados presentan una buena afinidad por el receptor CB2 ( $K_i < 20$  nM) y una mala o menor afinidad por el receptor CB1 ( $K_i > 60$  nM en todos los casos).

### **Región III:**

En este caso la situación es similar al mapa para CB1. Un gran poliedro verde rodea al grupo tiometil aunque no transcurre a lo largo de toda la cadena. El reemplazo por tanto de la parte final de esta ramificación por átomos más voluminosos por ejemplo Bromo o Yodo así como por pequeños ciclos, mejorarían la actividad biológica tanto para CB1 como para CB2.

### **Conector:**

El oxígeno carbonílico a diferencia del caso CB1 se proyecta hacia un poliedro amarillo, por lo que el reemplazo de este por un átomo isostérico como azufre no sería favorable. Sería interesante investigar la eliminación del átomo de oxígeno, aunque habría que tener en consideración la variación angular generada.

### **Análisis de campo electrostático**

En este caso hay una drástica diferencia con respecto al mapa de CB1. Vemos la existencia de regiones claras y definidas en cada una de las regiones.

### **Región I:**

Un gran poliedro azul está en contacto con el anillo de benceno aunque se proyecta mayormente hacia las posiciones 4 y 5 del anillo indol. Esto es notable pues es una situación inversa al mapa CB1, en este caso sería favorable la inserción de grupos

electropositivos o el cambio por anillos capaces de protonarse a pH fisiológico como por ejemplo piridina, pirimidina, piperidina y anilinas entre otros. La región I es por lo tanto desde el punto de vista electrónica un área clave para conseguir selectividad.

### **Región II:**

Se encuentra totalmente inmersa en una zona de potencial electronegativo (rojo). Esto hace evidente que para aumentar la afinidad es necesaria la adición de átomos o grupos electronegativos como oxígeno, halógenos, azufre, y nitrógenos no protonables.

### **Región III:**

El grupo tiometil y los dos carbonos anteriores a este se encuentran rodeados por una región de potencial electrostático positivo, lo que sugiere que el reemplazo por átomos o grupos de esta clase sería beneficioso para la afinidad por el receptor CB2.

### **Conector:**

Se encuentra dentro del poliedro rojo de la región II. Aquí hay una similitud con respecto al mapa para CB1. Eventualmente el oxígeno carbonílico juega un rol importante como aceptor de puente de hidrógeno en el sitio de unión, hecho que también ya ha sido sugerido por estudios de *docking* en aminoalquilindoles [56].

## 4 Conclusiones

En síntesis, se ha realizado un estudio QSAR tridimensional, en una extensa serie de 92 compuestos con afinidad CB1 y CB2, con el objeto de entender y racionalizar la afinidad y selectividad de la familia de compuestos de estructura aminoalquilindol en su unión a los receptores de cannabinoides.

Hemos descubierto que hay claras diferencias en los requisitos estéricos y electrónicos para la selectividad por un subtipo de receptor. En la siguiente figura (Figura 4.1) se resumen las relaciones estructura-actividad CB1 y CB2 encontradas para aminoalquilindoles.

**Figura 4.1** Resumen de las relaciones estructura-actividad para cada una de las regiones analizadas.

Este estudio provee información valiosa para el diseño de nuevos compuestos afines y selectivos por un tipo de receptor de cannabinoides, permitiendo economizar tiempo y recursos dirigiendo la síntesis hacia la obtención de las moléculas más promisorias.

## Apéndice

### Estructura y numeración de las moléculas

A continuación se presenta la estructura de cada una de las moléculas según la numeración empleada en la tesis.

1	
2	
3	
4	
5	

6	
7	
8	
9	

<b>10</b>	
<b>11</b>	
<b>12</b>	
<b>13</b>	
<b>14</b>	

<b>15</b>	
<b>16</b>	
<b>17</b>	
<b>18</b>	
<b>19</b>	

20	
21	
22	
23	
24	

25	
26	
27	
28	
29	

<b>30</b>	
<b>31</b>	
<b>32</b>	
<b>33</b>	
<b>34</b>	

<b>35</b>	
<b>36</b>	
<b>37</b>	
<b>38</b>	
<b>39</b>	

<b>40</b>	
<b>41</b>	
<b>42</b>	
<b>43</b>	
<b>44</b>	

<b>45</b>	
<b>46</b>	
<b>47</b>	
<b>48</b>	
<b>49</b>	

<b>50</b>	
<b>51</b>	
<b>52</b>	
<b>53</b>	
<b>54</b>	
<b>55</b>	

<b>56</b>	
<b>57</b>	
<b>58</b>	
<b>59</b>	
<b>60</b>	

<b>61</b>	
<b>62</b>	
<b>63</b>	
<b>64</b>	
<b>65</b>	

<b>66</b>	
<b>67</b>	
<b>68</b>	
<b>69</b>	
<b>70</b>	

71	
72	
73	
74	
75	

76	
77	
78	
79	
80	

<b>81</b>	
<b>82</b>	
<b>83</b>	
<b>84</b>	
<b>85</b>	

<b>86</b>	
<b>87</b>	
<b>88</b>	
<b>89</b>	
<b>90</b>	

<b>91</b>	
<b>92</b>	

## Referencias

1. Unwin, N., *The structure of ion channels in membranes of excitable cells*. Neuron, 1989. **3**(6): p. 665-76.
2. Qu, W., et al., *Ion permeation and selectivity of wild-type recombinant rat CNG (rOCNC1) channels expressed in HEK293 cells*. J Membr Biol, 2000. **178**(2): p. 137-50.
3. Korogod, S.M. and I.B. Kulagina, *[Dynamical electrical states of heterogeneous populations of ion channels in the membranes of excitable cells]*. Fiziol Zh, 2012. **58**(3): p. 50-9.
4. Young, A., et al., *Ion channels and ionotropic receptors in human embryonic stem cell derived neural progenitors*. Neuroscience, 2011. **192**: p. 793-805.
5. Wessler, I., et al., *Effects of nicotine receptor agonists on acetylcholine release from the isolated motor nerve, small intestine and trachea of rats and guinea-pigs*. Clin Investig, 1992. **70**(3-4): p. 182-9.
6. Tiedge, M., U. Krug, and S. Lenzen, *Modulation of human glucokinase intrinsic activity by SH reagents mirrors post-translational regulation of enzyme activity*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1337**(2): p. 175-90.
7. Skrzypczak, M., et al., *Nuclear Estrogen Receptors Co-activation Mechanisms*. Curr Med Chem, 2013.
8. Drozdziak, A., et al., *Expression of nuclear receptors (AhR, PXR, CAR) and transcription factor (Nrf2) in human parotid gland*. Acta Pol Pharm, 2013. **70**(2): p. 215-9.
9. Stergiopoulos, A. and P.K. Politis, *The role of nuclear receptors in controlling the fine balance between proliferation and differentiation of neural stem cells*. Arch Biochem Biophys, 2013. **534**(1-2): p. 27-37.
10. Overington, J.P., B. Al-Lazikani, and A.L. Hopkins, *How many drug targets are there?* Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(12): p. 993-6.
11. Shiroishi, M., *Strategies for the Structural Determination of G Protein-coupled Receptors: From an Example of Histamine H1 Receptor*. Yakugaku Zasshi, 2013. **133**(5): p. 539-47.
12. Mathiesen, J.M., L. Vedel, and H. Brauner-Osborne, *cAMP biosensors applied in molecular pharmacological studies of G protein-coupled receptors*. Methods Enzymol, 2013. **522**: p. 191-207.
13. de Souza, W.R., et al., *Identification of Metabolic Pathways Influenced by the G-Protein Coupled Receptors GprB and GprD in Aspergillus nidulans*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e62088.
14. Hollister, L.E., *Cannabidiol and cannabinol in man*. Experientia, 1973. **29**(7): p. 825-6.
15. Mechoulam, R. and Y. Gaoni, *A Total Synthesis of DI-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish*. J Am Chem Soc, 1965. **87**: p. 3273-5.
16. Herkenham, M., et al., *Cannabinoid receptor localization in brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(5): p. 1932-6.
17. Howlett, A.C., et al., *The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization*. Trends Neurosci, 1990. **13**(10): p. 420-3.
18. Mechoulam, R., L. Hanus, and B.R. Martin, *Search for endogenous ligands of the cannabinoid receptor*. Biochem Pharmacol, 1994. **48**(8): p. 1537-44.
19. Di Marzo, V., et al., *Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action*. Trends Neurosci, 1998. **21**(12): p. 521-8.
20. Waku, K., *[Endogenous cannabinoid receptor ligands--anandamide and 2-arachidonoylglycerol]*. Yakugaku Zasshi, 2006. **126**(2): p. 67-81.

21. Cottone, E., et al., *Cannabinoid receptors are widely expressed in goldfish: molecular cloning of a CB2-like receptor and evaluation of CB1 and CB2 mRNA expression profiles in different organs*. Fish Physiol Biochem, 2013.
22. Jan, C.R., et al., *Novel effect of CP55,940, a CB1/CB2 cannabinoid receptor agonist, on intracellular free Ca<sup>2+</sup> levels in bladder cancer cells*. Chin J Physiol, 2002. **45**(1): p. 33-9.
23. Uusi-Oukari, M. and E.R. Korpi, *Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(1): p. 97-135.
24. Evans, A.K. and C.A. Lowry, *Pharmacology of the beta-carboline FG-7,142, a partial inverse agonist at the benzodiazepine allosteric site of the GABA A receptor: neurochemical, neurophysiological, and behavioral effects*. CNS Drug Rev, 2007. **13**(4): p. 475-501.
25. Pan, X., S.R. Ikeda, and D.L. Lewis, *SR 141716A acts as an inverse agonist to increase neuronal voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents by reversal of tonic CB1 cannabinoid receptor activity*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(6): p. 1064-72.
26. Toth, A., P.M. Blumberg, and J. Boczan, *Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1)*. Vitam Horm, 2009. **81**: p. 389-419.
27. Rinaldi-Carmona, M., et al., *SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **284**(2): p. 644-50.
28. Nantasenamat, C., C. Isarankura-Na-Ayudhya, and V. Prachayasittikul, *Advances in computational methods to predict the biological activity of compounds*. Expert Opin Drug Discov, 2010. **5**(7): p. 633-54.
29. Gramatica, P., *On the development and validation of QSAR models*. Methods Mol Biol, 2013. **930**: p. 499-526.
30. Ghafourian, T. and S. Fooladi, *The effect of structural QSAR parameters on skin penetration*. Int J Pharm, 2001. **217**(1-2): p. 1-11.
31. Betageri, G.V. and J.A. Rogers, *Correlation of partitioning of nitroimidazoles in the n-octanol/saline and liposome systems with pharmacokinetic parameters and quantitative structure-activity relationships (QSAR)*. Pharm Res, 1989. **6**(5): p. 399-403.
32. Chuman, H., *Toward basic understanding of the partition coefficient log P and its application in QSAR*. SAR QSAR Environ Res, 2008. **19**(1-2): p. 71-9.
33. Sullivan, J.J., A.D. Jones, and K.K. Tanji, *QSAR treatment of electronic substituent effects using frontier orbital theory and topological parameters*. J Chem Inf Comput Sci, 2000. **40**(5): p. 1113-27.
34. Fernandez, I. and G. Frenking, *Correlation between Hammett substituent constants and directly calculated pi-conjugation strength*. J Org Chem, 2006. **71**(6): p. 2251-6.
35. Meot-Ner, M. and A.D. Adler, *Interpretation of linear Hammett constant correlations in substituted ms-tetraphenylporphins*. J Am Chem Soc, 1972. **94**(13): p. 4763-4.
36. Daunes, S., et al., *QSAR study on the contribution of log P and E(s) to the in vitro antiprotozoal activity of glutathione derivatives*. J Med Chem, 2001. **44**(18): p. 2976-83.
37. Xi, Z., et al., *Development of a general quantum-chemical descriptor for steric effects: density functional theory based QSAR study of herbicidal sulfonylurea analogues*. J Comput Chem, 2006. **27**(13): p. 1571-6.
38. Korenaga, T., et al., *Reestimation of the Taft's substituent constant of the pentafluorophenyl group*. J Org Chem, 2004. **69**(21): p. 7340-3.
39. Sigman, M.S. and J.J. Miller, *Examination of the role of Taft-type steric parameters in asymmetric catalysis*. J Org Chem, 2009. **74**(20): p. 7633-43.

40. Kaliszan, R., K. Osmialowski, and K. Kobylczyk, *In vitro activity of sulphonamides as a function of their molar refractivity*. *Chemotherapy*, 1979. **25**(1): p. 5-8.
41. Heinzen, V.E., V. Cechinel Filho, and R.A. Yunes, *Correlation of activity of 2-(X-benzyloxy)-4,6-dimethoxyacetophenones with topological indices and with the Hansch equation*. *Farmaco*, 1999. **54**(3): p. 125-9.
42. Wei, D.B., et al., *Joint QSAR analysis using the Free-Wilson approach and quantum chemical parameters*. *SAR QSAR Environ Res*, 2001. **12**(5): p. 471-9.
43. Craig, P.N., *Proceedings: Comparison of Hansch and free-Wilson methods for structure-activity correlation*. *Cancer Chemother Rep* 2, 1974. **4**(4): p. 39.
44. Chen, H., et al., *Beyond the scope of free-Wilson analysis: building interpretable QSAR models with machine learning algorithms*. *J Chem Inf Model*, 2013. **53**(6): p. 1324-36.
45. Cramer, R.D., 3rd, D.E. Patterson, and J.D. Bunce, *Recent advances in comparative molecular field analysis (CoMFA)*. *Prog Clin Biol Res*, 1989. **291**: p. 161-5.
46. Byberg, J.R., F.S. Jorgensen, and P.D. Klemmensen, *Towards an identification of the pyrethroid pharmacophore. A molecular modelling study of some pyrethroid esters*. *J Comput Aided Mol Des*, 1987. **1**(3): p. 181-95.
47. Konovalov, D.A., et al., *Robust cross-validation of linear regression QSAR models*. *J Chem Inf Model*, 2008. **48**(10): p. 2081-94.
48. Frost, J.M., et al., *Indol-3-yl-tetramethylcyclopropyl Ketones: Effects of Indole Ring Substitution on CB2 Cannabinoid Receptor Activity*. *J. Med. Chem*, 2008. **51**: p. 1904–1912.
49. Frost, J.M., et al., *Indol-3-ylcycloalkyl Ketones: Effects of N1 Substituted Indole Side Chain Variations on CB2 Cannabinoid Receptor Activity*. *J. Med. Chem*, 2010. **53**: p. 295–315.
50. Pasquini, S., et al., *Design, Synthesis, and Pharmacological Characterization of Indol-3-ylacetamides, Indol-3-yloxoacetamides, and Indol-3-ylcarboxamides: Potent and Selective CB2 Cannabinoid Receptor Inverse Agonists*. *J. Med. Chem*, 2012. **55**: p. 5391–5402.
51. Liao, S.Y., et al., *A Combined 2D- and 3D-QSAR Study on Analogues of ARC-111 with Antitumor Activity*. *QSAR Comb. Sci.*, 2008. **6**: p. 740–749.
52. Cho, S.J. and A. Tropsha, *Cross-validated R<sup>2</sup>-guided region selection for comparative molecular field analysis: A simple method to achieve consistent results*. *J. Med. Chem*, 1995. **38**: p. 1060–1066.
53. Gasteiger, J. and M. Marsili, *Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity - A. Rapid Access to Atomic Charges*. *Tetrahedron*, 1980. **36**: p. 3219–3228.
54. Gasteiger, J. and M. Marsili, *A New Model for Calculating Atomic Charges in Molecules*. *Tetrahedron*, 1980. **19**: p. 3181–3184.
55. Golbraikh, A. and A. Tropsha, *Beware of q<sup>2</sup>!* *J. Mol. Graph. Model*, 2002. **20**: p. 269–276.
56. Shim, J.Y. and A.C. Howlett, *WIN55212-2 docking to the CB1 cannabinoid receptor and multiple pathways for conformational induction*. *J Chem Inf Model*, 2006. **46**(3): p. 1286-300.