



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**

**TESIS**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y FARMACODINÁMICA DE  
ANTAGONISTAS NO-PEPTÍDICOS DE LOS RECEPTORES V1A Y V2 DE VASOPRESINA**

**PRESENTA**

**MARTHA CITLALLI CONTRERAS ROMO  
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TUTORES**

**DR. ANDRÉS QUINTANAR STEPHANO**

**DR. JOSÉ CORREA BASURTO**

**ASESOR**

**DR. FRANCISCO ANÍBAL POSADAS DEL RÍO**

**Aguascalientes, Ags., a 06 de Diciembre del 2013**





FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

**M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos**  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

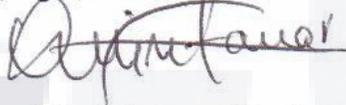
Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **MARTHA CITLALLI CONTRERAS ROMO** con ID 23097 quien realizó la tesis titulada: **SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y FARMACODINAMICA DE ANTAGONISTAS NO PEPTIDICOS DE LOS RECEPTORES V1a Y V2 DE VASOPRESINA**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 19 de Noviembre de 2013.



Dr. Andrés Quintanar Stephano  
Co-Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Fisiología y Farmacología  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico





Instituto Politécnico Nacional



FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

**M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos**  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS

PRESENTE

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **MARTHA CITLALLI CONTRERAS ROMO** con ID 23097 quien realizó la tesis titulada: **SÍNTESIS Y CARACTERIZACION QUIMICA Y FARMACODINAMICA DE ANTAGONISTAS NO PEPTIDICOS DE LOS RECEPTORES V1a Y V2 DE VASOPRESINA**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 19 de Noviembre de 2013

Dr. José Correa Basurto  
Co-Tutor de tesis

- c.c.p.- Interesado
- c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
- c.c.p.- Jefatura del Depto. de Fisiología y Farmacología
- c.c.p.- Consejero Académico
- c.c.p.- Minuta Secretario Técnico





UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

**M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos**  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS

PRESENTE

Por medio del presente como asesor designado del estudiante **MARTHA CITLALLI CONTRERAS ROMO** con ID 23097 quien realizó la tesis titulada: **SÍNTESIS Y CARACTERIZACION QUIMICA Y FARMACODINAMICA DE ANTAGONISTAS NO PEPTIDICOS DE LOS RECEPTORES V1a Y V2 DE VASOPRESINA**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 19 de Noviembre de 2013

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Francisco Posadas'.

Dr. Francisco Aníbal Posadas del Río  
Asesor

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Fisiología y Farmacología  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES



ANIVERSARIO  
UAA

Centro de Ciencias Básicas

**I.B.Q. MARTHA CITLALLI CONTRERAS ROMO  
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E .**

Estimado (a) alumno (a) Contreras:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y FARMACODINÁMICA DE ANTAGONISTAS NO PEPTÍDICOS DE LOS RECEPTORES V1a y V2 DE VASOPRESINA"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E  
Aguascalientes, Ags., 21 DE NOVIEMBRE DE 2013  
**"SE LUMEN PROFERRE"**  
EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Fisiología y Farmacología  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Interesado (a)  
JJRG,mjda



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a *Dios* por regalarme esta experiencia de vida, por su infinita grandeza y sabiduría, por darme a manos llenas todo aquello que necesito y por quitar de mi camino esas cosas que no me dejan crecer.

A *Martha Cristina*, -mon amour- que con su sonrisa llena de alegría mi alma, a *Tognu* por amar a mi princesa tanto como la amo yo! A mi *mamá* por su apoyo incondicional y por quererme así. A mi *hermana y su mariado* por haberme dado los mejores sobrinos del mundo *Abdiel y Habid* los quiero!!! A *Yaya y Paco* que también quiero mucho, a *Toto y Pepo* que siguen aquí conmigo!!! A *Gaby, Vero, Lico, Manuel, Juan, André, Luly y anexos* por estar siempre aquí.

*Juan Carlos*, mil gracias por tu ejemplo de vida, tus enseñanzas, tu dedicación al trabajo, tu entusiasmo y profesionalismo a tu lado he crecido como persona y como profesionalista, eres y siempre serás de mis jefes el # 1, tqm!

Muchas gracias a *Ana, Marichuy, Lety, Milly*, por seguir conmigo a pesar del tiempo y la distancia, a *Rafaaa*, gracias por todo tu apoyo y por haber hecho del lab una estancia agradable! *Juan Vázquez, César Islas, Alex Rojas* y a todos aquellos amig@s que algún día se subieron al tren de mi vida, a los que siguen aquí y a quienes por diferentes razones se han bajado, mil gracias por compartir este viaje.

A mis tutores, el *Dr. Andrés Quintanar Stephano* y el *Dr. José Correa Basurto*, quienes sin conocerme depositaron su confianza en mí y me abrieron las puertas de sus laboratorios, gracias por sus enseñanzas, su entusiasmo y su infinito amor a la ciencia, mil gracias por sus consejos y sus palabras de aliento, por ser mis guías en este camino que apenas comienzo y sobre todo gracias por el tiempo que han dedicado a hacer de éste un mejor trabajo. Ha sido un honor haber compartido innumerables enseñanzas, discusiones, dudas y aprendizajes, de ustedes es mi admiración y respeto, muchas gracias!

A mi asesor de tesis, el *Dr. Francisco Posadas*, muchas gracias por sus consejos, su apoyo y todas esas preguntas extrañas que me incitan a querer investigar cada vez más.

---

Un agradecimiento especial al *Dr. Federico Martínez* por compartir sus conocimientos y experiencia, ¡su apoyo es invaluable!. Al *Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara* muchas gracias por recibirme en su laboratorio, gracias por sus críticas siempre positivas a mi trabajo, que tantos conocimientos me dejaron. A la *Dra. Itzia Padilla* quien siempre estuvo dispuesta a ayudarme. A la *Dra. Magdalena 'Slusarz* y al *Dr. Omar Deeb* por su colaboración. A *Gilberto López* por todo su apoyo, al *Dr. Marvin* porque siempre estuvo dispuesto a compartir sus conocimientos y aclarar mis dudas, muchas gracias!!!. A la *Dra. Marlet*, quien ha enriquecido este trabajo con todas sus aportaciones.

Muchas gracias al *Dr. Berci* y al *Dr. Kovacs* por las observaciones y sugerencias a mi trabajo. A todos mis maestros, infinitas gracias.

A *María Luisa Rodríguez, Arthur, Juan Esparza, Jesús Martínez y Eleazar Luévano* MUCHAS GRACIAS porque sin su apoyo este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

Un agradecimiento especial a la *UAA* y a la *ESM-IPN* por abrirme sus puertas, de manera particular al personal de los laboratorios de Neuroinmunoendocrinología de la *UAA* y de Bioquímica Médica y Modelado Molecular de la *ESM-IPN*, gracias por todo su apoyo.

*Myriam, Marco, Marthita, Elia, Said, Marco, Aracely, Norma, Sharon, Ale, Alfonso* y a todos los chicos de la Maestría en Farmacología, muchas gracias por esas tardes de juegos, las idas al cine, las pláticas interminables y por hacer de mi estancia en el DF una experiencia inolvidable.

*Denisse*, amiga!, por compartir tus conocimientos en histología muchas gracias!!! y a todos mis compañeros de generación, *Mariela, Irene, Christian* y todos los de la maestría, fue un placer haber compartido este tiempo con ustedes!

A la coordinación del Doctorado en Ciencias, *Dra. Consolación Martínez, Dr. Fernando Jaramillo, Karla y Paola*, muchas gracias todo su apoyo. A *Amparito* muchas gracias!

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo del CONACyT y al programa de becas de movilidad Santander. Muchas Gracias!

---



*Crysti, my angel, my all, my very self...  
este trabajo y mi vida entera son por y para ti!*

*χοχοχοχοχοχοχ*



**INDICE GENERAL**

Índice general.....	1
Índice de tablas.....	3
Índice de figuras.....	5
Acrónimos.....	7
Resumen.....	9
Abstract.....	11
Introducción.....	13
1. Justificación.....	55
2. Hipótesis.....	57
3. Objetivos.....	59
3.1. Objetivo general.....	59
3.2. Objetivos específicos.....	59
4. Materiales.....	61
4.1. Equipo.....	61
4.2. Reactivos.....	62
4.2.1. Síntesis química.....	62
4.2.1.1. Derivados de anilinas monosustituídas.....	62
4.2.1.2. Derivados benzoazepínicos.....	62
4.2.2. Pruebas biológicas.....	62
4.3. Material biológico.....	63
5. Metodologías.....	65
5.1. Análisis cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR).....	65
5.2. Acoplamiento molecular (docking).....	66
5.3. Síntesis química.....	68
5.3.1. Derivados de anilinas monosustituídas y disustituídas.....	68

5.3.2. Derivados benzoazepínicos.....	70
5.4. Pruebas biológicas.....	71
5.4.1. Efecto de los compuestos sobre la contractilidad del músculo liso vascular.....	71
5.4.2. Antagonismo <i>in-vivo</i> a AVP exógena en ratas anestesiadas con carga de agua.....	74
5.4.3. Efecto de los compuestos sobre la presión sanguínea.....	76
5.5. Análisis Estadístico.....	78
6. Resultados.....	79
6.1. Análisis cunatitativo de relación estructura-actividad (QSAR).....	79
6.2. Acoplamiento molecular (docking).....	84
6.3. Síntesis química.....	84
6.3.1. Derivados de anilinas monosustituídas y disustituídas.....	84
6.3.2. Derivados benzoazepínicos.....	86
6.4. Pruebas biológicas.....	86
6.4.1. Efecto de los compuestos sobre la contractilidad del músculo liso vascular.....	86
6.4.2. Antagonismo <i>in-vivo</i> a AVP exógena en ratas anestesiadas con carga de agua.....	88
6.4.3. Efecto de los compuestos sobre la presión sanguínea.....	89
7. Metodología Experimental.....	91
8. Discusione de Resultados.....	99
Conclusión.....	105
Glosario.....	107
Bibliografía.....	109
Anexos.....	125

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Familia Vasopresina.....	14
Tabla 2. Derivados de 1,5-Benzodiazepinas 5-Aminoalkil-Substituidas.....	48
Tabla 3. Derivados de Azolobenzoazepinas.....	48
Tabla 4. Derivados de Benzoazepinas y Benzodiazepinas.....	48
Tabla 5. Derivados de 1,5-Benzodiazepinas 5-Carbamoilmetil-Substituidas.....	49
Tabla 6. Derivados de 4,4-Difluorobenzoazepinas.....	49
Tabla 7. Derivados de 4,4-Difluoro-5-metiliden-2,3,4,5-tetrahidro-1H-1-benzazepinas..	50
Tabla 8. Derivados de 1,5-Benzodiazepinas 5-Substituidas.....	50
Tabla 9. Derivados de 2-Etoxibenzanilidas.....	50
Tabla 10. Derivados de Imidazobenzoazepinas 2-Substituidas.....	51
Tabla 11. Derivados de 2-Metilimidazobenzoazepinas.....	51
Tabla 12. Derivados de 4-(N,N-dimetilamino)piperidinas.....	51
Tabla 13. Derivados de 1,5-Benzodiazepinas 5-Piridilmetil-Substituidas .....	52
Tabla 14. Derivados análogos de SR49059.....	52
Tabla 15. Derivados de Tiazolobenzoazepinas 2-Substituidas.....	52
Tabla 16. Derivados de 2,3,4,5-Tetrahidro-1H-1-benzazepinas.....	53
Tabla 17. YM087, OPC-31260, OPC-21268, VPA-985, OPC-41061, SSR-149415, SR-49059, SR-121463 e YM218.....	53
Tabla 18. Grupos of descriptores y número de descriptores de cada grupo selecciona dos por los análisis MLR.....	79
Tabla 19. Tipo descriptores que explican la ecuación de regresión del conjunto de compuestos de preparación.....	81
Tabla 20. Coeficientes de determinación y parámetros de validación cruzada.....	81
Tabla 21. Punto de fusión y rendimiento de cada uno de las arilamidas sintetizadas..	85
Tabla 22. Resultados obtenidos en las pruebas de solubilidad de cada uno de los compuestos.....	85



**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Vincent du Vigneaud.....	13
Figura 2. Estructura química de arginina vasopresina.....	14
Figura 3. Aspectos Anatómicos de la Hipófisis.....	15
Figura 4. Escisión de la pre-prohormona AVP humana.....	16
Figura 5. Regulación de la Homeostasis por AVP.....	18
Figura 6. Distribución de los AVPR en el ser humano.....	21
Figura 7. Vía de señalización del AVPR1A.....	23
Figura 8. Vasopresina y sus receptores en diferentes regiones del cerebro de rata...	24
Figura 9. Vía de señalización del AVPR2.....	25
Figura 10. 1-(4-benzamidobenzoyl)benzazepina.....	29
Figura 11. 1: Mozavaptan, 2: Tolvaptan, 3: Lixivaptan, 4: conivaptan.....	29
Figura 12. Vía de Síntesis de Conivaptan.....	30
Figura 13. Vía de síntesis de Mozavaptan.....	31
Figura 14. Vía de síntesis de Tolvaptan.....	32
Figura 15. Vía de síntesis de Satavaptan.....	33
Figura 16. Vía de Síntesis de Lixivaptan.....	35
Figura 17. POLI-1.....	37
Figura 18. Grupos Benzoazepina y Arilamida.....	37
Figura 19. Modelización Molecular.....	40
Figura 20. Modelado Molecular de la actividad antagonista de los vaptanes.....	45
Figura 21. Familia de los vaptanes.....	47
Figura 22. Vía de síntesis de los compuestos C1, C2, C3, C4 y C5 derivados del ácido o-aminobenzoico.....	68
Figura 23. Vía de síntesis de los compuestos C11, C12, C13, C14 y C15 derivados de 2-amino-4-metilfenol.....	69
Figura 24. Vía de síntesis de los compuestos C21, C22, C23, C24 y C25 derivados de 2-amino-4-nitrophenol.....	69
Figura 25. Vía de síntesis de 1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro -1H-1-benzazepine-4-carbonitrile, C9.....	70

Figura 26. Obtención y acondicionamiento de los anillos de aorta.....	72
Figura 27. Protocolo experimental del ensayo en anillos de aorta.....	73
Figura 28. Protocolo experimental del ensayo de antagonismo in-vivo a AVP exógena, en ratas con sobrecarga de agua.....	75
Figura 29. Canulación de la arteria carótida.....	77
Figura 30. Canulación de la vena femoral.....	78
Figura 31. Gráfico de primeros y segundos componentes principales.....	80
Figura 32. Valores de pKi predichos versus observados.....	82
Figura 33. Residuos versus valores de pKi observados.....	82
Figura 34. Valores de pKi predichos versus observados después de remover los datos atípicos.....	83
Figura 35. Residuos versus valores de pKi observados después de remover los datos atípicos.....	83
Figura 36. Efecto del endotelio vascular sobre la contracción de anillos de aorta inducida por AVP.....	87
Figura 37. Efecto de las amidas en la contracción del VSM inducida por AVP.....	87
Figura 38. Efecto bloqueador del compuesto C9 en la contracción del VSM inducida por AVP.....	88
Figura 39. Efecto del compuesto C9 sobre el flujo urinario en ratas con carga de agua y anestesiadas.....	89
Figura 40. Papel de las arilamidias en la presión sanguínea en rata.....	89

## ACRÓNIMOS

$\gamma$ -IFN	Interferón $\gamma$
AC	Adenilato ciclasa
ACTH	Hormona Adenocorticotrófica
ADH	Hormona Antidiurética
AM1	Austin Model 1
AMPc	Adenosina 3'5'-monofosfato cíclico
AQP	Aquaporina
AVP	Arginina Vasopresina
AVPR	Receptor de Vasopresina
AVPR1A	Receptor V1A de Vasopresina
AVPR1B	Receptor V1B de Vasopresina
AVPR2	Receptor V2 de Vasopresina
cDNA	DNA complementario
DAG	Diacilglicerol
DDAVP	desmopresina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAE	Encefalitis Experimental Autoinmune
EMEA	Agencia Europea de Medicamentos
ESM	Escuela Superior de Medicina
FDA	Food and Drug Administration
GDP	Guanidín Difosfato
GPCR	Receptores Acoplados a Proteínas G
GTP	Guanidín Trifosfato
IV	Intravenosa
IP	Intraperitoneal
$i[Ca^{2+}]$	Concentración de Calcio Intracelular
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trifosfato
IPN	Instituto Politécnico Nacional
IR	Infrarrojo

---

LGA	Algoritmo Genético Lamarkiano
LVP	Lisipresina
MLR	Regresión Linear Múltiple
NE	Norepinefrina
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
ON	Óxido Nítrico
OT	Oxitocina
OTR	Receptor de Oxitocina
p.c.	Peso Corporal
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PCA	Análisis de Componentes Principales
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKA	Proteína Cinasa A
PKC	Proteín cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PVN	Núcleo Paraventricular
RNA	Ácido Ribonucléico
SIADH	Síndrome de Secreción Inapropiada de la Hormona Antidiurética
SNC	Sistema Nervioso Central
SON	Núcleo Supraóptico
SS	Solución Salina
SSH	Solución Salina Heparinizada
TLC	Cromatografía en Capa Fina
VAPTAN	Antagonista a Vasopresina

## RESUMEN

Estudios de docking y un análisis cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR) fueron llevados a cabo en un conjunto de 134 antagonistas de los receptores de vasopresina (AVPR). Las estructuras químicas de los ligandos fueron sometidas al algoritmo Polak-Rebiere, seguido del programa Dragón para encontrar los diferentes tipos de descriptores moleculares. Un análisis de regresión múltiple (MLR) se llevó a cabo en cada grupo de descriptores. Aquellos descriptores seleccionados por el MLR fueron reunidos para realizar un análisis de componentes principales (PCA). La ecuación final fue desarrollada por elección de una combinación óptima de descriptores después de eliminar los valores atípicos. Por otro lado, aquí se describe la síntesis de un supuesto nuevo antagonista a los AVPR (1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepine-4-carbonitrile, C9). La identificación química de C9 fue confirmada por resonancia magnética nuclear (NMR) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Los efectos biológicos de C9 fueron evaluados en un modelo de contractilidad de músculo liso vascular (VSM) y aquaresis. Anillos de aorta de rata fueron usados para probar el efecto inhibitorio de C9 (0.0, 5.9, 59 and 590  $\mu\text{M}$ ) sobre la contracción de VSM inducido por AVP (10  $\mu\text{M}$ ). El efecto aquarético de C9 (100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) fue determinado inhibiendo el efecto antidiurético de AVP (50  $\mu\text{U}/\text{Kg}$ ) en rata. Los resultados muestran que C9 inhibe la contracción de anillos de aorta, de forma concentración-dependiente, además de producir un efecto aquarético. Los estudios de docking mostraron que C9 interactúa con aminoácidos clave en el bolsillo de unión de los receptores V1a y V2 de AVP (AVPR1A y AVPR2). Los resultados indican que C9 trabaja como un antagonista de los AVPR1A y AVPR2.



## ABSTRACT

Docking studies as well as a quantitative structure-activity relationship (QSAR) were performed upon a set of 134 vasopressin receptor antagonists previously reported. The chemical structures of the ligands were subjected to the Polak-Rebiere algorithm followed by Dragon software in order to find different types of molecular descriptors. Multiple linear regression (MLR) analysis was carried out on each individual group of descriptors alone. The descriptors selected from the MLR analysis were gathered in one group to perform principal component analysis (PCA). The final equation was developed by choosing optimal combination of descriptors after removing the outliers. On the other hand, the synthesis of a new putative antagonist of vasopressin receptors (1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepine-4-carbonitrile, C9) and its biological effects are described. The chemical identification of the compound C9 was confirmed using  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR). The biological effects of C9 on vascular smooth muscle (VSM) contractility and aquaresis were also tested. Rat aortic rings were used to test the inhibitory effect of C9 (0.0, 5.9, 59 and 590  $\mu\text{M}$ ) on AVP-induced VSM contraction (10  $\mu\text{M}$ ). The antidiuretic-blocking effect of vasopressin (50  $\mu\text{U}/\text{Kg}$ ) by C9 (100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) was determined using a water load test in rats. The results showed that C9 inhibits aortic rings contraction in a concentration-dependent manner, whereas C9 exhibited an aquaretic effect on urine flow. Docking studies showed that C9 interacts with key amino acids into the binding site via the V1a and V2 receptors (AVPR1A and AVPR2), which explains the similarity in their biological effects with the vaptans. The results indicate that C9 functions as an antagonist on both AVPR1A and AVPR2.



## INTRODUCCION

### Arginina vasopresina.

Las hormonas neurohipofisiales arginina vasopresina (AVP) y oxitocina (OT), descritas por primera vez por Oliver y Schäfer en 1895 como ‘*extractos de pituitaria*’ llamaron la atención debido a su “notable y elevado efecto sobre la presión sanguínea”. Décadas más tarde, estos ‘*extractos de pituitaria*’ mostrarían otros efectos fisiológicos, de los que sobresalen: la contractibilidad del músculo liso uterino (Dale HH, 1906), la eyección de leche (Ott I and Scott JC, 1910) y el efecto antidiurético (Farini F, 1913). No fue sino hasta 1952, cuando du Vigneaud et al., (Fig. 1) lograron aislar los dos péptidos dilucidando así sus estructuras y secuencias de aminoácidos (Tuppy H, 1953; du Vigneaud V et al., 1953b; Archer R, du Vigneaud V, 1953a; du Vigneaud V, et al., 1953a). Para 1954, reporta su síntesis (du Vigneaud V, et al., 1954a; du Vigneauacd V, et al, 1954b), logro que en 1955 le valió el premio Nobel de Química.



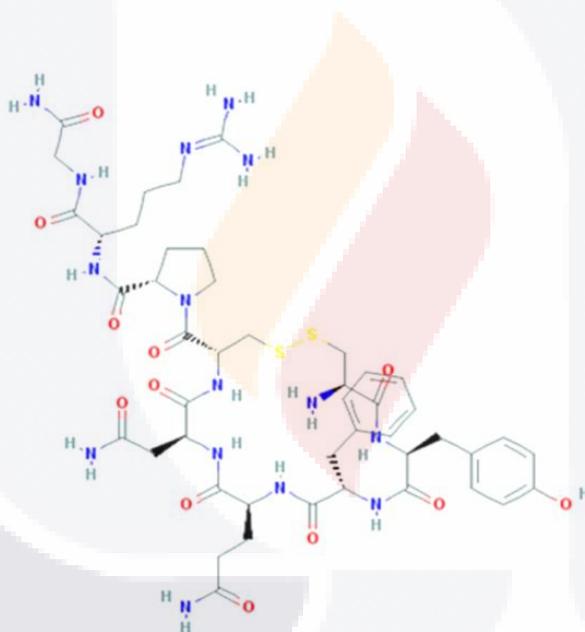
**Figura 1. Vincent du Vigneaud.** Premio Nobel de Química 1955 otorgado "*por su trabajo sobre compuestos de azufre con importancia bioquímica, especialmente por la primer síntesis de una hormona polipéptida*" (de: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1955/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1955/) 18 Sep 2012).

Tanto AVP como OT son antiguos neuropéptidos, miembros de una familia de péptidos filogenéticamente muy conservada (tabla 1) que surgen de la duplicación del gen ancestral de la vasotocina (Acher R, Chauvet J. 1995; Acher R, et al., 1995). En los vertebrados, la vasotocina es el progenitor evolucionado de todas las hormonas neurohipofisiales.

**Tabla 1. Familia Vasopresina.** Las diferencias estructurales con AVP se señalan en negritas (de: Ferguson JW et al., 2003).

Secuencia de aminoácidos	Nombre	Especie
Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH <sub>2</sub>	Arginina Vasopresina (AVP)	Mayoría de los mamíferos
Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro- <b>Lys</b> -Gly-NH <sub>2</sub>	Lisipresina (LVP)	Cerdos y especies relacionadas
Cys- <b>Phe</b> -Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH <sub>2</sub>	Fenipresina	Algunos marsupiales
Cys- <b>Tyr-Ile</b> -Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH <sub>2</sub>	Vasotocina	No-mamíferos

Arginina vasopresina, también conocida como hormona antidiurética (ADH), es una hormona de 9 amino ácidos, con una arginina en la posición 8: CYFQNCPRG (Fig. 2). Los dos residuos de cisteína en las posiciones 1 y 6 forman un puente disulfuro que da lugar a la formación de un anillo en su estructura (Barberis C., et al., 1998).



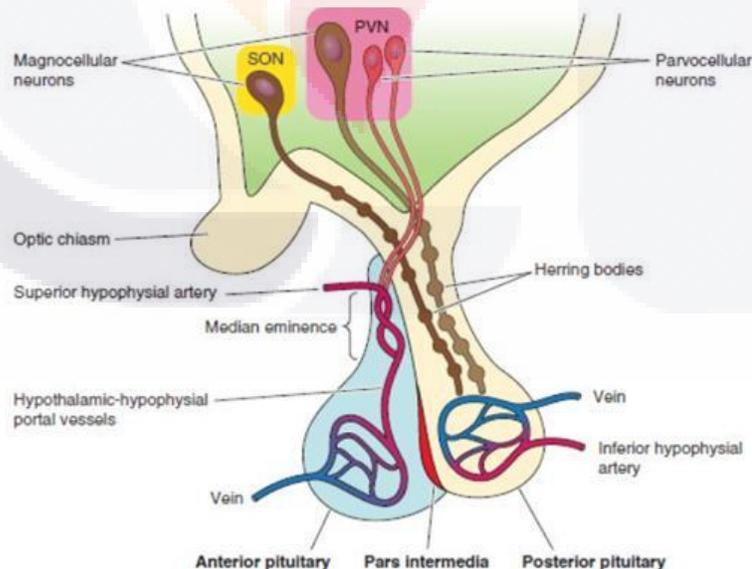
**Figura 2. Estructura química de arginina vasopresina.** CYFQNCPRG, el puente disulfuro se muestra en amarillo (de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/> (Compound ID: 644077) 19 Sep 2012).

Con fórmula molecular C<sub>46</sub>H<sub>65</sub>N<sub>15</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>, AVP tiene orbitales electrónicos incompletos, por lo que es capaz de participar en enlaces del tipo puente de hidrógeno (Vincent JL, Su F, 2008; Sherwood L, 2009) y al ser una molécula hidrofílica, puede viajar libremente en la sangre (Barberis C., et al., 1998). AVP puede existir de forma desprotonada, con una carga neta de -1, o protonada y tener una carga neta de +2.

### Síntesis, almacenamiento y liberación de AVP

La AVP se produce en el hipotálamo y es transportada, almacenada y eventualmente secretada en la neurohipófisis hacia la circulación sanguínea (Vincent JL, Su F, 2008; Sherwood L, 2009).

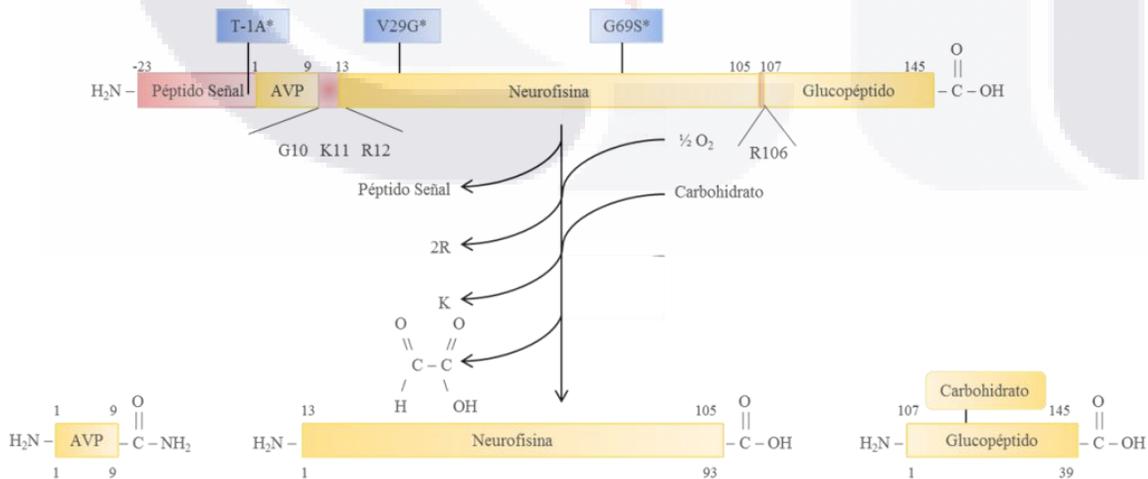
Las neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico (SON) y paraventricular (PVN) del hipotálamo son células neurosecretoras que almacenan DNA codificante en sus núcleos para la producción de AVP (Vincent JL, Su F, 2008; Sherwood L, 2009), luego, el DNA es traducido a RNA para finalmente ser transcrito en 9 aminoácidos que se pliegan en la estructura terciaria de la hormona peptídica (Barberis C., et al., 1998). Después de la síntesis, neurofisinas transportan la molécula de AVP de los cuerpos neuronales en el hipotálamo hasta la neurohipófisis para su almacenamiento (Vincent JL, Su F, 2008; Sherwood L, 2009) (figura 3). Conforme la molécula de AVP se mueve por los axones durante su transporte, madura al llegar a la terminación de éstos en la hipófisis posterior. (Vincent JL, Su F, 2008; Sherwood L, 2009). La producción de AVP está controlada por mecanismos de retroalimentación en el hipotálamo (Vincent JL, Su F, 2008; Sherwood L, 2009), los cuales se abordarán mas adelante.



**Figura 3. Aspectos Anatómicos de la Hipófisis.** También conocida como *pars nervosa* o glándula pituitaria, está constituida por los lóbulos anterior (o adenohipófisis), medio y posterior (o neurohipófisis) y es en este último en el cual se almacena y libera AVP (de: Koshimizu T, et al., 2012).

El gen que codifica para la síntesis de AVP está constituido por tres exones y en el humano se localiza en el cromosoma 20 (Ridell DC, et al., 1985).

En el ser humano, una pre-prohormona de 168 aminoácidos (Fig. 4) es sintetizada y un péptido señal (residuos -23 al -1) garantiza la incorporación del péptido naciente en los ribosomas. Durante la síntesis, el péptido señal es removido para formar la prohormona vasopresina y translocaciones mediadas por vesículas, maniobran la prohormona a través del retículo endoplásmico rugoso y a los compartimentos *cis*-, *medial*- y *trans*-Golgi, de modo que la prohormona emerge incorporada en grandes gránulos (0.1 a 0.3 micrones) confinados en membranas. La prohormona consiste en tres dominios: vasopresina (residuos 1 a 9), neurofisisina (residuos 13 a 105) y glucopéptido (residuos 107 a 145). El dominio vasopresina está unido al dominio neurofisisina a través de una señal de procesamiento GKR; y el dominio neurofisisina está unido al dominio glucopéptido por una señal de procesamiento R. En los gránulos secretores, endopeptidasas, exopeptidasas, monooxigenasas y liasas actúan de forma secuencial sobre la prohormona a fin de producir vasopresina, neurofisisina (neurofisisina II) y un glucopéptido (copeptina). La síntesis y transporte de vasopresina depende de la conformación de la pre-prohormona. De manera particular, la unión de neurofisisina a vasopresina es crítica para el correcto procesamiento, transporte y almacenaje de vasopresina (Breslow, 1993) (Fig. 4).



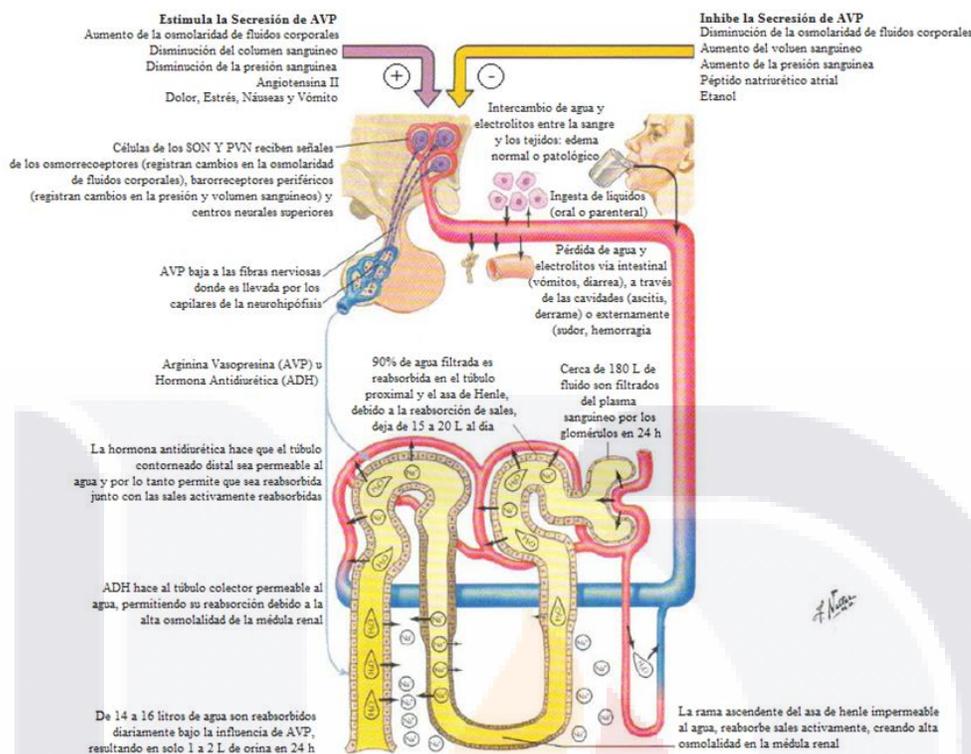
**Figura 4. Escisión de la pre-prohormona AVP humana.** Procesamiento de los 168 aminoácidos de la pre-prohormona 8-AVP humana a: vasopresina, neurofisisina y glucopéptido (de: Jackson EK, 2006).

Mutaciones genéticas tanto en el péptido señal como en el fragmento de la neurofisisina dan lugar a diabetes insípida (Raymond, 1994) (Fig. 4). Los axones involucrados en el transporte de los gránulos tienen dos destinos, llevan a vasopresina no solo a los clásicos sitios de almacenamiento en la neurohipófisis, sino también a la zona externa de la eminencia media, donde entra a la circulación portal adenohipofisiaria y desempeña un importante papel como factor de liberación de corticotrofina.

La máxima liberación de vasopresina ocurre cuando la frecuencia de impulso es de aproximadamente 12 spikes por segundo, por 20 segundos. Alta frecuencia o largos periodos de estimulación conducen a una disminución en la liberación de la hormona (por fatiga). Apropiadamente, la liberación de vasopresina muestra un patrón atípico de actividad, pico caracterizado por rápidas ráfagas fásicas (5 a 12 spikes por segundo durante 15 a 60 segundos), separadas por periodos de reposo (15 a 60 segundos) de duración. Este modelo es orquestado por la activación e inactivación de canales iónicos en las neuronas magnocelulares y proporciona la liberación óptima de vasopresina (Leng et al., 1992).

Arginina vasopresina también se sintetiza en el corazón (Hupf et al., 1999) y la glándula adrenal (Guillon et al., 1998). En el corazón, un elevado estrés en las paredes incrementa la síntesis de vasopresina varias veces. La síntesis de AVP por el corazón es predominantemente vascular y perivascular y pudiera contribuir al deterioro de la relajación ventricular y la vasoconstricción coronaria. La síntesis de AVP en la médula adrenal estimula la secreción de catecolaminas de las células cromafines y puede promover un crecimiento cortical adrenal, además de que estimula la síntesis de aldosterona.

Un incremento en la osmolaridad del plasma es el principal estímulo fisiológico para la secreción de AVP, la hipotensión/hipovolemia severa también son estímulos poderosos para la liberación de AVP (Fig. 5). Además, el dolor, las náuseas y la hipoxia estimulan la secreción de vasopresina. Diversas hormonas endógenas así como agentes farmacológicos pueden también modificar la liberación de vasopresina (Sklar AH and Schrier R., 1983; Bourque CW, et al., 1994; Schrier RW, et al., 1979; Robertson GL, et al., 1976).



**Figura 5. Regulación de la Homeostasis por AVP.** Cambios en la osmolaridad del plasma, volumen y presión sanguínea, son lo reguladores fisiológicos primarios de AVP (de: Hansen JT, Koeppen BM, 1997).

### Regulación osmótica

La hiperosmolaridad es uno de los estímulos más potentes para la liberación de AVP. Es controlada por la activación de osmorreceptores periféricos y centrales. Los osmorreceptores periféricos se encuentran localizados en la vena porta y responden de manera rápida a los cambios osmolares inducidos por los alimentos y líquidos ingeridos.

Los osmorreceptores centrales se localizan en regiones cerebrales excluidas de la barrera hematoencefálica y detectan cambios de osmolaridad en márgenes muy estrechos. La activación de receptores por cambios osmolares induce despolarización de las neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico y paraventricular iniciando el proceso de transporte y liberación de AVP. La secreción de AVP es estimulada cuando la osmolaridad supera los valores normales (300 mosm/L en humanos) (Campbell, Neil A, 1996).

### **Regulación hipovolémica**

La depleción de volumen intravascular y la hipotensión, estimulan la liberación de AVP a través de la activación de receptores de estiramiento que se encuentran localizados en aurícula izquierda, ventrículos, arco aórtico y seno carotídeo. Los dos primeros registran los cambios de volumen y los segundos registran los de presión. La activación de estos receptores además de la liberación de AVP, inicia los mecanismos adrenérgicos, liberación de renina y modulación del péptido natriurético auricular con la finalidad de mantener estabilidad hemodinámica (Thrasher TN, 1994; Wang BC, et al., 1988; Reid IA, 1994).

### **Regulación hormonal**

Hay una serie de hormonas y mediadores que se liberan en el estado de choque y que estimulan o inhiben directamente la liberación de AVP. Los factores liberadores son: acetilcolina (vía receptores nicotínicos), histamina, nicotina, dopamina, prostaglandinas y angiotensina II. La hipoxemia y la hipercapnia a través de la estimulación de quimiorreceptores localizados en el cuerpo carotídeo son potentes liberadores de AVP.

Los inhibidores descritos hasta el momento son: opioides, ácido gamma-aminobutírico, péptido natriurético auricular. El óxido nítrico (ON) es mediador de vasodilatación e hipotensión en choque séptico, además tiene la capacidad de inhibir la liberación de AVP vía AMPc (Reid IA, 1994). La norepinefrina (NE) tiene acción bifásica porque a través de receptores  $\alpha_1$  o  $\alpha_2$ , inhibe o estimula la secreción de AVP (Day TA, et al., 1985; Randle JC, et al., 1986).

### **Regulación no osmótica**

Dentro de ésta se incluyen al dolor, la náusea, la acidosis y el estrés emocional. La náusea puede incrementar los niveles de AVP, de 20 a 500 veces, y contribuye a la elevación de ésta durante reacciones vasovagales, vértigo de movimiento, hiperémesis del embarazo, quimioterapia y cetoacidosis (Kovacs L, Robertson GL, 1992).

## **Metabolismo, Receptores y Vías de Señalización**

### **Metabolismo**

Los niveles séricos normales de AVP en estado de hidratación adecuada son  $< 4$  pg/mL, mientras que la privación de agua y el incremento de la osmolaridad plasmática se asocian a niveles de 10 pg/mL. La concentración máxima de orina se logra con niveles de AVP de 20 pg/mL. Su vida media es de 10 a 35 minutos y es metabolizada por vasopresinasas en hígado y riñón (Share L, et al., 1985). Los efectos fisiológicos de AVP se evidencian al interactuar con sus receptores específicos.

### **Receptores de Vasopresina (AVPR)**

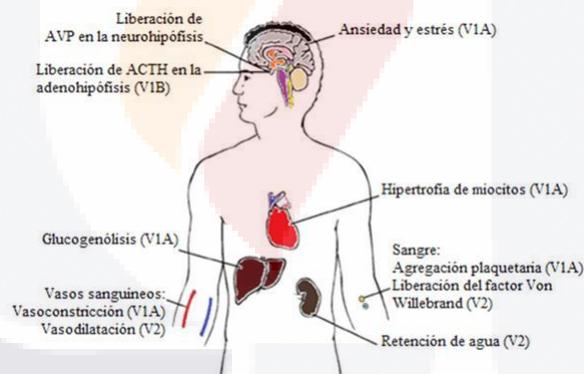
En un inicio, los AVPR fueron clasificados sólo como V1 y V2, esta clasificación, hecha originalmente por Michell, et al. en 1979, estuvo basada en su vía de señalización: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC)-independiente (AVPR1A) y AMPC-dependiente (AVPR2). El subtipo V1, se localiza en células del músculo liso vascular, cardiomiocitos, hepatocitos y plaquetas (Thibonnier M, Roberts JM, 1985; Phillips, et al., 1990; Howl, et al., 1991; Serradeil-Le Gal, et al., 1995), siendo la vasoconstricción su función más importante. Los receptores V2 (AVPR2) se encuentran en el riñón (Guillon, et al., 1982; Jans, et al., 1989), y son responsables de la reabsorción de agua en los túbulos renales.

Más tarde, se descubrió un tercer subtipo de AVPR, el V3, mejor conocido como receptor V1B (AVPR1B); se localiza en los corticotrofos de la adenohipófisis, la medula adrenal y en las células- $\beta$  pancreáticas (Jard, et al., 1986; Lee, et al., 1995; Grazzini, et al., 1996) donde estimula la secreción de hormonas y mediadores tal como ACTH, insulina y  $\beta$ -endorfina.

Existe evidencia de que no solo vasopresina es capaz de interactuar sobre sus receptores. Oxitocina indujo contracciones tónicas en tejido eréctil (cuerpo esponjoso y cavernoso) y eyaculatorio (conducto prostático, uretra, vejiga y cuello eyaculatorio), el efecto contráctil de oxitocina en tejido eréctil y eyaculatorio de rata y conejo es mediado vía AVPR1A (Gupta J, et al., 2008).

En 2012, Ocampo DD, y colaboradores reportan un árbol filogenético el cual identifica cinco diferentes subtipos de receptores gnathostome ancestrales en la familia de receptores OT/AVP: AVPR1A, AVPR1B, AVPR2A, AVPR2B y OTR. La existencia de distintos subtipos del AVPR2 no había sido previamente reconocida, sin embargo, ellos encontraron estos subtipos en genomas de teleosteos, así como en rana y lagarto y concluyen que el subtipo AVPR2A es del tipo de receptores AVPR2 *ortólogos* de mamíferos, mientras que el subtipo AVPR2B es del tipo de receptores AVPR2 *ortólogos* de aves. Adicional a lo anterior, reportan un máximo de ocho miembros del mismo receptor en algunos peces teleosteros que han adquirido genes duplicados, por lo que abren interesantes vías de investigación con respecto a funciones como la regulación del balance hídrico, la reproducción y el comportamiento en reptiles, anfibios, peces teleosteros y peces cartilagosos (Ocampo DD et al., 2012).

En la Fig. 6 se encuentra la distribución de los AVPR que han sido caracterizados en el ser humano.



**Figura 6. Distribución de los AVPR en el ser humano.** (de: Ferguson JW et al., 2003).

AVPR está también presente en la superficie de células del sistema inmune, aparentemente del subtipo V1, similares a los encontrados en hepatocitos ya que medían la movilización de calcio intracelular. (Fishman JB, et al., 1987). El ácido presinótico (estructura de 6 amino ácidos que forma el anillo de AVP) parece ser crítico para que se manifieste la señal cooperadora de AVP; mientras que las clásicas funciones antidiuréticas y vasopresoras de AVP requieren los 3 amino ácidos C-terminales además del anillo de ácido presinótico (Manning M, et al., 1984), esto sugiere un nuevo tipo de AVPR en los linfocitos.

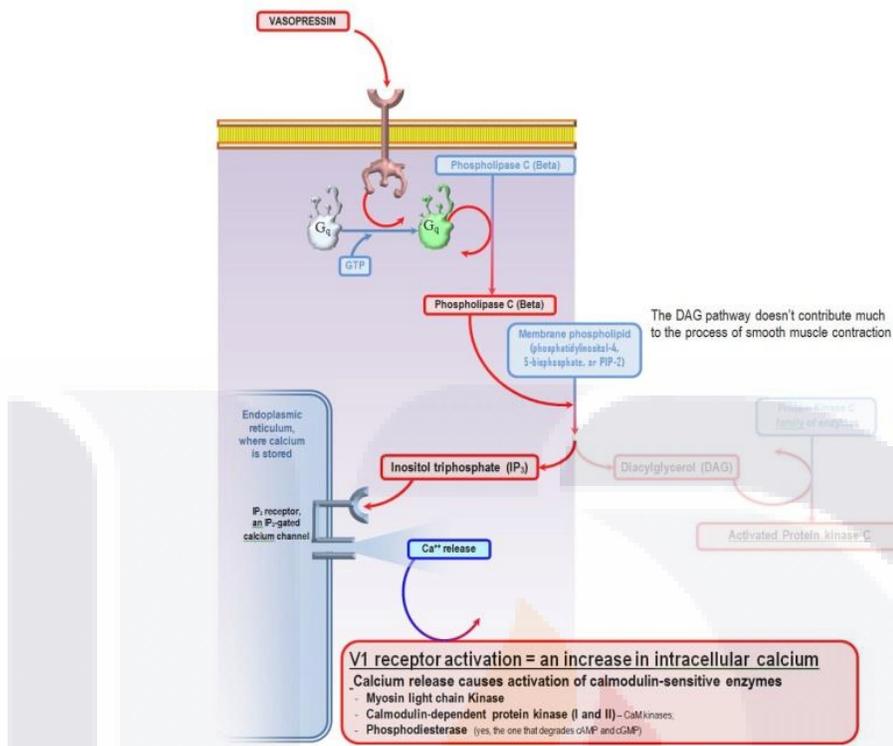
Fisiológicamente, AVP ( $10^{-9}$  -  $10^{-10}$  M) ha mostrado facilitar la producción de interferón  $\gamma$  ( $\gamma$ -IFN) remplazando la interleucina-2 (IL-2) como señal colaboradora en esplenocitos murinos (Johnson HM and Torres BA; 1988); respuesta que puede ser bloqueada por el antagonista V1: [d(CH<sub>2</sub>)<sub>1/5</sub> Tyr-(Me)]AVP pero no por otros antagonistas V1 como [d(CH<sub>2</sub>)<sub>1/5</sub>D Tyr(Et<sup>2</sup>Val<sup>4</sup>)]AVP ni por antagonistas V2 (Johnson HM and Torres BA; 1988) hecho que sugiere un nuevo tipo de AVPR1 en los inmunocitos. Otros dos estudios independientes han reportado la presencia de AVPR en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Elands J, et al., 1990; Bell J, et al., 1993). Por otro lado, la presencia de AVP y péptidos relacionados en el timo ha permitido especular a cerca de su papel en la educación y diferenciación de las células-T (Robert F and Geenen V, 1992).

### **Receptor de arginina vasopresina 1A (AVPR1A)**

El cDNA para el AVPR1A humano está formado por 1472 bp que codifican para una proteína de 418 amino ácidos, con una homología de 36 % con el AVPR2 y 45 % con el OTR.

El AVPR1A es del tipo de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) con 7 dominios transmembrana acoplado a proteínas de unión Gq. Al activarse, Guanidin trifosfato (GTP) es hidrolizado a guanidin difosfato (GDP), entonces la proteína Gq se disocia en sus subunidades G<sub>q $\alpha$</sub>  y  $\beta\gamma$ . La subunidad G<sub>q $\alpha$</sub>  estimula la actividad de la fosfolipasa C (PLC) que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) en diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) (Fig. 7). DAG se asocia a la membrana plasmática mientras que el IP<sub>3</sub> estimula a sus receptores localizados en la membrana del retículo endoplásmico y mediante un mecanismo de retroalimentación positiva estimulan la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular (i[Ca<sup>2+</sup>]) (Birnbaumer, M, 2000).

Estos segundos mensajeros facilitan las interacciones actina-miosina mediante el aumento en la i[Ca<sup>2+</sup>] y a través de diversos mecanismos que incluyen: Canales de Ca<sup>2+</sup> operados por receptores, canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje y a través de la proteína cinasa C (PKC) (Gupte J, et al., 2004; Bichet DG, 1996; Holmes CL, et al., 2003; Bankir L, 2001).



**Figura 7. Vía de señalización del AVPR1A.** (<http://www.unpopularmedicine.com/Physiology/Fluids%20and%20electrolytes/Fluids/V1%20vasopressin%20receptor%20intracellular%20signalling%20pathway.html> 18 Sept 2012).

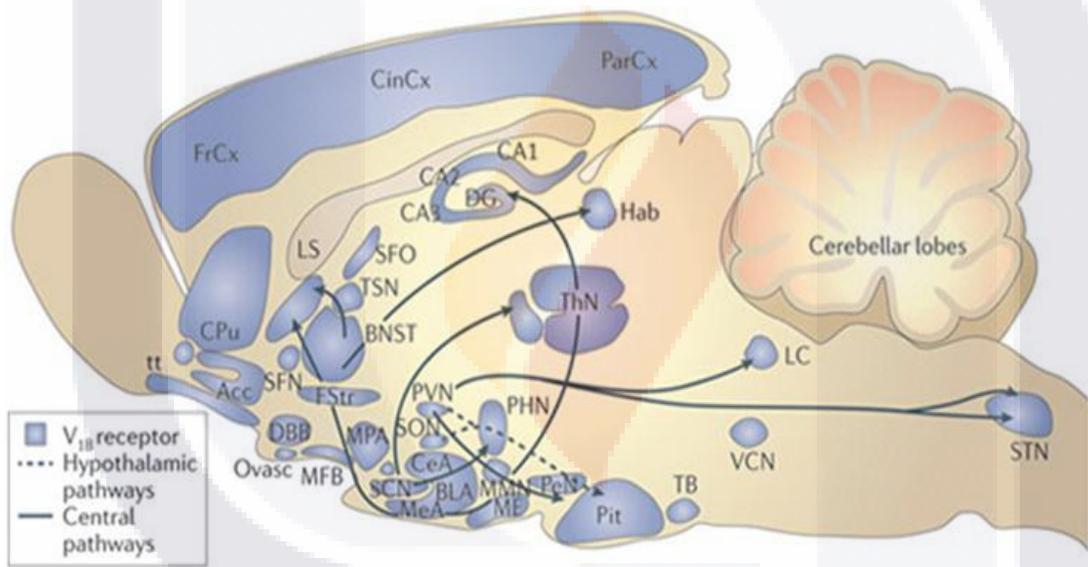
Tampoco es sorprendente el hecho de que AVP sea capaz de reducir la respuesta de los AVPR. La desensibilización de los receptores ha sido observada en células transfectadas mediante el estudio de la disponibilidad de los genes que codifican para los receptores.

La desensibilización del AVPR1A es muy rápida e involucra el secuestro de los receptores dentro de la célula. La desensibilización se dispara por un agonista llamado angiotensina II. Por su acción vasopresora, angiotensina II aumenta la presión arterial y disminuye la pérdida de fluidos mediante la restricción del flujo sanguíneo, esto promueve la fosforilación del AVPR1A catalizada por proteínas G acopladas a PKC, así, después de ser expuestos a AVP, los fosfatos son removidos rápidamente y el receptor ya no está presente en la superficie de la célula, dejando al receptor desensibilizado. El ligando es removido y el AVPR1A regresa a la superficie listo para recibir otra señal (Birnbauer M, 2000).

**Receptor de arginina vasopresina 1B (AVPR1B)**

El AVPR1B corresponde a una proteína de 424 amino ácidos, y al igual que el AVPR1A, se encuentra acoplado a una proteína Gq la cual activa a la PLC y a la vía de señalización del PIP<sub>2</sub> que tiene al i[Ca<sup>2+</sup>] como segundo mensajero (Bichet DG, 1996; Bankir L, 2001).

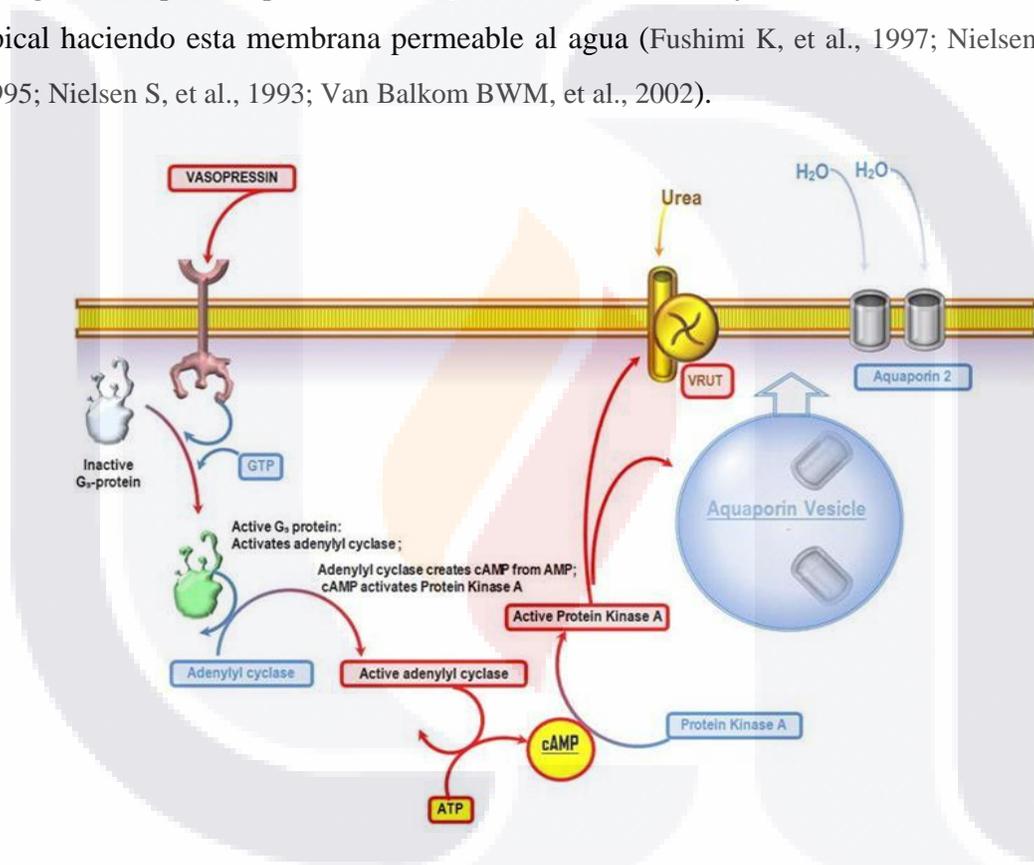
La Fig. 8 muestra que tanto AVP como AVPR1B se encuentran ampliamente distribuidos en áreas que procesan emoción (núcleos de la amígdala), la respuesta al estrés (núcleos hipotalámicos) y áreas cognitivas (núcleos del hipocampo y áreas corticales) (Griebel G and Holsboer F, 2012).



**Figura 8. Vasopresina y sus receptores en diferentes regiones del cerebro de rata.** La figura muestra que vasopresina y su receptor (receptor V1B) se encuentran ampliamente distribuidos en áreas que procesan emoción (núcleos de la amígdala), la respuesta al estrés (núcleos hipotalámicos) y/o áreas cognitivas (núcleos del hipocampo y áreas corticales). CinCx, corteza cingulada, PVN, núcleo paraventricular del hipotálamo; ParCx, corteza parietal; FrCx, corteza frontal, CA1, campo CA1 del hipocampo, LS, septum lateral, DG, giro dentado; Hab, medial habenula; THN, núcleo talámico; SFO, órgano subfornical, TSN, núcleo septal triangular; BNST, cama núcleo de la stria terminalis, CPU, putamen caudado, tt, taenia tecta, Acc, núcleo accumbens; SFN, núcleo septofimbrial, DBB, banda diagonal de Broca; Ovasc, organum vasculosum lámina terminalis; FSTR, fondo striati; MFB, haz medial del cerebro anterior; SON, núcleo supraóptico del hipotálamo; Cea, amígdala central, SCN, núcleo supraquiasmático, MEA, amígdala mediana, PHN, núcleo hipotalámico posterior; MMN, núcleo medial mamilar, ME, eminencia mediana, PVN, núcleo paraventricular del hipotálamo; Pit, hipófisis anterior, TB, cuerpo trapezoide; VCN, núcleo coclear ventral; STN, núcleo del tracto solitario, LC, locus coeruleus. (Griebel G and Holsboer F, 2012).

**Receptor de arginina vasopresina 2 (AVPR2)**

El AVPR2 es una proteína de 41 kDa de 371 residuos con 7 dominios transmembrana. AVP se une al AVPR2 en la membrana basolateral de las células principales del túbulo colector del riñón. La transducción de señales da inicio con la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC) vía estimulación de proteínas Gs, incremento de los niveles de AMPc y la activación de la proteína cinasa A (PKA) (Fig. 9). Subsecuentemente, canales de agua del tipo acuaporinas 2 (AQP2) son fosforiladas y translocadas en la membrana apical haciendo esta membrana permeable al agua (Fushimi K, et al., 1997; Nielsen S, et al., 1995; Nielsen S, et al., 1993; Van Balkom BWM, et al., 2002).



**Figura 9. Vía de señalización del AVPR2.** (de: [http://www.unpopularmedicine.com/html/Physiology/ Fluids 20and%20electrolytes/Fluids/images/v2%20receptor%20intracellular%20signalling%20pathway.JPG](http://www.unpopularmedicine.com/html/Physiology/Fluids%20and%20electrolytes/Fluids/images/v2%20receptor%20intracellular%20signalling%20pathway.JPG) 18 Sept 2012).

Debido al incremento en la permeabilidad, el agua es capaz de pasar la membrana apical de forma pasiva, a través de las AQP2 y por gradiente osmótico de NaCl y urea pasa a través de las AQP3 y AQP4 que se expresan de manera constitutiva en el lado basolateral de las células. Cuando se establece la isotonicidad, la reducción de los niveles sanguíneos de AVP resulta en la internalización de las AQP2, dejando la membrana apical nuevamente impermeable (Nielsen S, et al., 1995; Nielsen S, et al., 1993).

## Agonistas de AVP

Con la llegada de nuevas técnicas de síntesis en fase-sólida, muchos análogos a vasopresina fueron sintetizados con el objetivo de incrementar el tiempo de acción y/o la selectividad de los AVPR, entre ellos: [Phe<sup>2</sup>, Ile<sup>3</sup>, Orn<sup>8</sup>]AVP: agonista selectivo de los AVPR1A; Deamino[D-3-(3'-pyridyl)-Ala<sup>2</sup>]AVP: agonista selectivo de los AVPR1B; Desmopresina (DDAVP), [deamino[Val<sup>4</sup>, D-Arg<sup>8</sup>]AVP y deamino-Cys<sup>1</sup>, D-Arg<sup>8</sup>]-Vasopressin: agonistas selectivos de los AVPR2.

En 1967, Zaoral y colaboradores reportaron la síntesis de desmopresina (1-deamino-8-D-arginina vasopresina, DDAVP). La desaminación en la posición 1 incrementa su tiempo de vida media además de su actividad antidiurética, sin afectar su efecto vasopresor. La sustitución de D-arginina por L-arginina reduce ampliamente el efecto vasopresor sin reducir la actividad antidiurética. Así, la relación efecto antidiurético-vasopresor para desmopresina es de aproximadamente 3000 veces mas grande que para AVP, razón por la cual desmopresina es el fármaco de elección para el tratamiento de diabetes insípida central (Robinson, 1976).

Sustituyendo valina por glutamina en la posición 4, se incrementa además la selectividad por el efecto antidiurético, entonces la relación efecto antidiurético-vasopresor para desamino[Val<sup>4</sup>,D-Arg<sup>8</sup>]AVP es de aproximadamente 11,000 veces mayor que para AVP.

El incrementar la selectividad por los AVPR1A ha sido mucho mas difícil que incrementarla para los AVPR2 (Thibonnier, 1990).

## **Antagonistas de AVP**

La determinación rutinaria en el laboratorio clínico del sodio en suero se remonta a la década de los cincuenta. Poco después, se sugirió que la mayor parte de los casos de hiponatremia eran producidos a consecuencia del aumento de AVP en plasma (Gross P, et al., 1987).

Dado el presumible papel patogenético de la AVP rápidamente se pensó en la posibilidad de desarrollar fármacos que antagonizaran tanto el efecto presor como el antidiurético de esta hormona (Zerbe R, et al., 1980).

Los antagonistas estudiados en aquel momento fueron análogos peptídicos derivados de agonistas selectivos V2, como la desmopresina (DDAVP). Sin embargo, las características peptídicas de estos compuestos con una corta vida media biológica, daban lugar a una biodisponibilidad oral reducida y una mala penetración en el sistema nervioso central (SNC), lo que obligaba a la administración parenteral, además de observarse un débil efecto agonístico intrínseco sobre los AVPR2 (Manning M and Sawyer WH, 1985; Manning M and Sawyer WH. 1991).

Debido a todo ello, el uso de estos fármacos se abandonó y no fue hasta inicios de la década de los noventa en que se dio inicio a la investigación de sustancias no peptídicas. OPC-31260 fue el primer antagonista no peptídico, caracterizado a principios de la década de los noventa (Yamamura Y, et al., 1992; Ohnishi A, et al., 1993). Estos fármacos, ahora conocidos con el nombre genérico de vaptanes (del inglés: vasopressin antagonists), poseen una mayor disponibilidad y una vida media más prolongada. Ejemplo de ellos son: mozavaptan, lixivaptan, satavaptan, tolvaptan y conivaptan (Verbalis JG, et al., 2007), todos derivados benzoazepínicos o derivados oxindoles (Serradeil-Le Gal G, et al., 1993; Serradeil-LeGal C, et al., 1996; Matsuhisa A, et al., 1997; Tahara A, et al., 1997; Serradeil-Le Gal C, et al., 2002).

La diferencia más importante entre ellos reside en la afinidad heterogénea por los diferentes subtipos de AVPR (Bolognani D, et al., 2007).

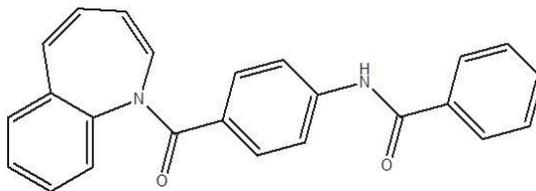
### **Antagonistas Peptídicos de AVP**

Después de la síntesis de AVP a finales de los 50's, por du Vigneaud y colaboradores, numerosos antagonistas a los AVPR han sido sintetizados (Lázló FA, et al., 1991; Manning M, et al., 1993), incluyendo péptidos tanto cíclicos como lineares. [1-( $\beta$ -mercapto- $\beta$ , $\beta$ -cyclopentamethylenepropionic acid),2-O-methyltyrosine] Arginine Vasopressin, conocido como d(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>[Tyr(Me)<sub>2</sub>]AVP, posee mayor afinidad por los AVPR1A (Manning and Sawyer, 1989). Ningún antagonista peptídico a los AVPR1B ha sido reportado, porque aunque [1-deaminopenicillamine,2-O-methyltyrosine]arginine vasopressin (conocido como dP[Tyr(Me)<sub>2</sub>]AVP) es un potente antagonista a los AVPR1B y ha mostrado tener una ligera afinidad por los AVPR2 además de bloquear también a los AVPR1A.

Los antagonistas peptídicos de los AVPR hasta ahora conocidos, poseen disponibilidad oral limitada y la potencia de los antagonistas peptídicos de los AVPR2 es dependiente de la especie. Además, una infusión prolongada de antagonistas peptídicos a los AVPR2 parece expresar un significativo efecto agonista (Kinter, et al., 1993).

### **Antagonistas No-Peptídicos de AVP (Vaptanes).**

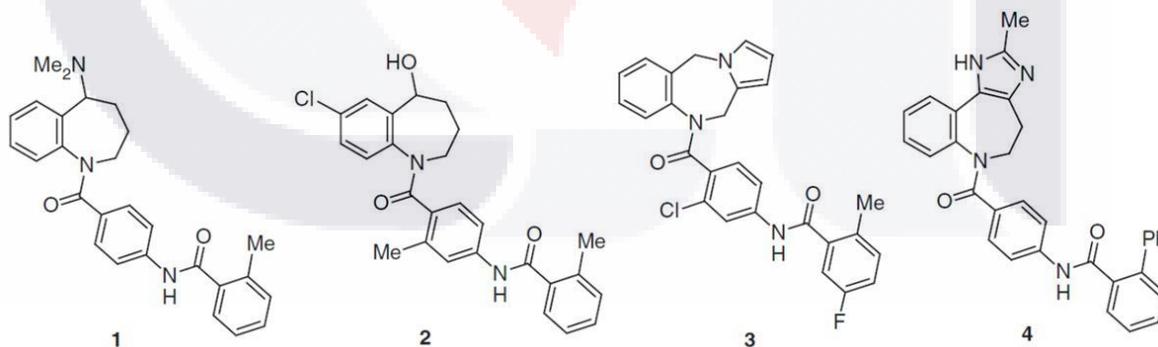
Un gran avance en el desarrollo de antagonistas a los AVPR se hizo con el descubrimiento de los primeros antagonistas no-peptídicos de AVP, OPC-21268 (AVPR1A-selectivo) (Yamamura Y, et al., 1991; Ogawa H, et al., 1993) y OPC-31260 (AVPR2-selectivo) (Yamamura Y, et al., 1992; Ogawa H, et al., 1996). OPC-31260 (mozavaptan) es activo vía oral. Numerosos estudios de estructura-actividad han sido llevados a cabo a partir de estas estructura, trabajos que establecieron un motivo clave o farmacóforo para los antagonistas no-peptídicos de los AVPR, el 1-(4-benzamidobenzoyl)benzoazepina (Kondo K, et al., 1999) (Fig. 10). Las diferencias en selectividad a los diferentes AVPR, potencia, eficacia y efectos adversos, entre otros, se debe básicamente a los grupos funcionales de cada uno de ellos. Pasos adicionales fueron hechos a finales de 1990 por investigadores de Lederle/Wyeth (Albright JD, et al., 1998; Aranapakam V, et al., 1999; Aranapakam V, et al., 1999; Albright JD, et al., 2000; Ashwell MA, et al., 2000) y Yamanouchi (Norman P, et al., 2000; Matsuhisa A, et al., 2000; Shimada Y, et al., 2000; Matsuhisa A, et al., 1999).



**Figura 10. 1-(4-benzamidobenzoyl)benzazepina.** Numerosos estudios de estructura-actividad han sido llevados a cabo a partir de esta estructura, trabajos que establecieron un motivo clave o farmacóforo para los antagonistas no-peptídicos de los AVPR.

En este momento, varias series tipo-benzoazepina han sido descritos en la literatura científica, incluyendo algunos de Johnson & Johnson. Algunos compuestos de especial interés son los antagonistas selectivos a los AVPR2, tolvaptan (OPC-41061) y lixivaptan (VPA-985), además del antagonista a los AVPR 1A/2 conivaptan (YM-087) (Fig. 11), de los cuales, sus investigaciones han avanzado a fase II o III de ensayos clínicos.

Otras contribuciones importantes han sido hechas por investigadores de Sanofi-Synthelabo, quienes han reportado antagonistas a los AVPR 1A, 1B y 2, de interés clínico y con motivos estructurales muy diferentes: indolina prolinamidas como el SR-49059 (relcovaptan, AVPR1A-selectivo), SSR-149415 (AVPR1B-selectivo) y espiroindolinonas, tal como SR-121463A (AVPR2-selectivo).



**Figura 11. 1: Mozavaptan, 2: Tolvaptan, 3: Lixivaptan, 4: conivaptan.** Todos ellos con 1-(4-benzamidobenzoyl)benzazepina en su estructura.

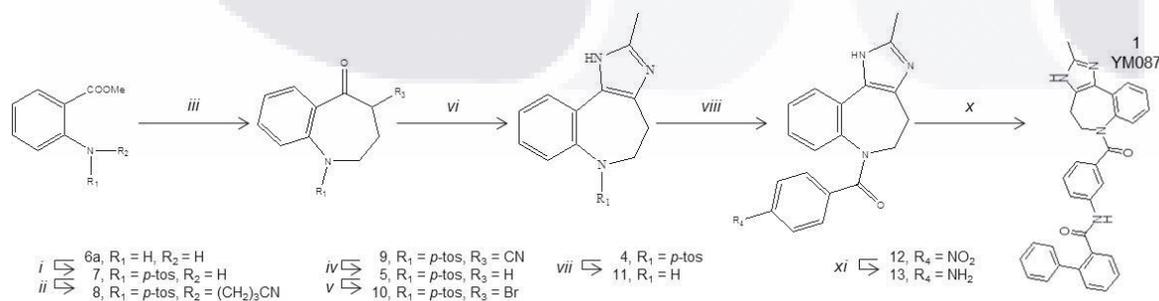
De todos los antagonistas no-peptídicos de AVP, son pocos los que a la fecha han sido aprobados por la FDA para ensayos clínicos y aún son menos aquellos que ya han salido a la venta. A continuación se enlistan algunos:

## Conivaptan

Comercializado por Astellas Pharma Inc. Bajo el nombre de Vaprisol<sup>®</sup>, Conivaptan (YM087) inhibe 2 de los 3 subtipos de AVPR, el AVPR1A y el AVPR2. Conivaptan fue aprobado por la FDA en 2004 para el tratamiento de la hiponatremia causada por el síndrome de secreción inapropiada de la hormona antidiurética (SIADH), aunque existe evidencia de que puede ser efectivo en casos de insuficiencia cardíaca congestiva (Udelson JE, et al., 2001).

Dentro de sus principales desventajas, se encuentran los efectos adversos que ya han sido reportados (Annane D, et al., 2009) y de los que sobresalen: infecciones del tracto urinario, anemia, pirexia, falla cardíaca, hipocalcemia, dolor de cabeza, náusea, constipación, e hipotensión. Una desventaja más, es que su administración es únicamente intravenosa (i.v.) e intrahospitalaria, hecho que incrementa el costo y cumplimiento de un tratamiento con Conivaptan.

En el año 2000, Matsuhisa y colaboradores reportaron la síntesis original de Conivaptan con un rendimiento general del 5 % lo cual resultaba en elevados costos de producción (Matsuhisa A, et al., 2000). En 2004, Tsunoda T y colaboradores analizan la retro-síntesis y proponen que una imidazobenzoazepina *N*-sustituida sea el intermediario clave en la síntesis del compuesto (Tsunoda T, et al., 2004) (Fig. 12). La nueva vía de síntesis incrementa el rendimiento en más del 150 % respecto al rendimiento de la vía de síntesis original.



**Figura 12. Vía de Síntesis de Conivaptan.** Reactivos: i, *p*-TosCl, piridina; ii, 4-clorobutanonitrilo,  $K_2CO_3$ , KI, 2-butanona; iii, *t*-BuOK, DMF; iv, AcOH, HCl; v, piridinium hidrobromuro perbromuro,  $CHCl_3$ ; vi, etanimidamida monohidrocloreto,  $K_2CO_3$ ,  $CHCl_3$ ; vii,  $H_2SO_4$ , AcOH; viii, 4-nitrobenzoyl cloruro, DMF, piridina monohidrocloreto; ix,  $H_2$ , Raney níquel, MeOH; x, bifenil-2-carboxílico ácido, oxalilo cloruro, DMF,  $CH_2Cl_2$ , MeCN, piridina, HCl-AcOEt, (de: Tsunoda T, et al., 2004).

## Mozavaptan

Agonista selectivo de los AVPR2, Mozavaptan fue desarrollado por los laboratorios Otsuka y es comercializado bajo el nombre de Physuline<sup>®</sup>. Mozavaptan (OPC-31260) fue aprobado por la FDA en Octubre del 2006 para el tratamiento de hiponatremia causada por SIADH (Ectopic ADH Syndrome Therapeutic Research Group, et al., 2011).

En 1996, Ogawa H y colaboradores publican una vía de síntesis para Mozavaptan (Fig. 13), la cual consiste en una reductocondensación de 1-tosyl-2,3,4,5-tetrahydro-1-benzoazepin-5-one (I) con metilamina y NaBH<sub>4</sub> para formar *N*-(1-tosyl-2,3,4,5-tetrahydro-1-benzoazepin-5-yl)-*N*-metilamina (II), el cual se metila con formaldehído y sodio cianoborohídrico para formar *N*-(1-tosyl-2,3,4,5-tetrahydro-1-benzoazepin-5-yl)-*N,N*-dimetilamina (III). La hidrólisis de (III) con ácido polifosfórico, formando: *N*-(2,3,4,5-tetrahydro-1-benzazepin-5-yl)-*N,N*-dimethylamine (IV) es acetilado con cloruro de 4-nitrobenzoilo para formar el derivado benzoyl (V). La reducción del grupo nitro de (V) con H<sub>2</sub> y Pd/C provee el derivado 4-aminobenzoyl (VI), el cual, finalmente es acilado con cloruro de 2-methylbenzoyl por medio de trietilamina en diclorometano (Ogawa H, et al., 1996).

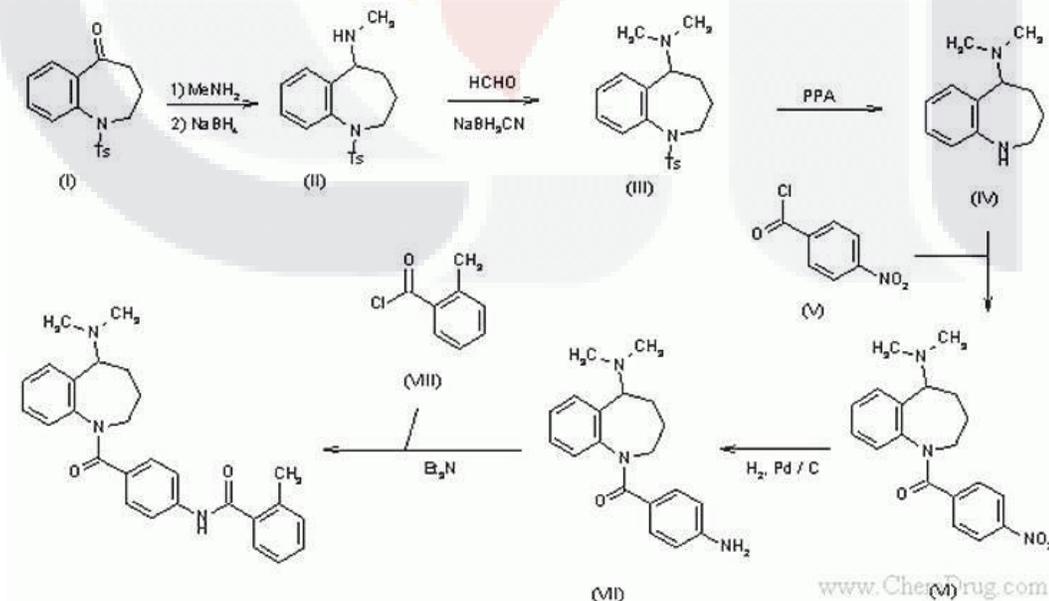


Figura 13. Vía de síntesis de Mozavaptan. (de: Ogawa H, et al., 1996).

### Tolvaptan

Inicialmente nombrado OPC-41061, Tolvaptan es un antagonista competitivo de los AVPR2 utilizado para el tratamiento de hiponatremia asociada con insuficiencia cardíaca, cirrosis y SIADH. Tolvaptan fue aprobado por la EMEA y la FDA en Mayo del 2009. Es comercializado por Otsuka Pharmaceutical Co. Bajo el nombre de Samsca®, y en India por MSN laboratorios LTD bajo el nombre Tolvat & Tolsama®. (Shoaf S, et al., 2005).

La figura 14 muestra a vía de síntesis de Tolvaptán propuesta en 1999 por Kondo y colaboradores (Kondo K, et al., 1999).

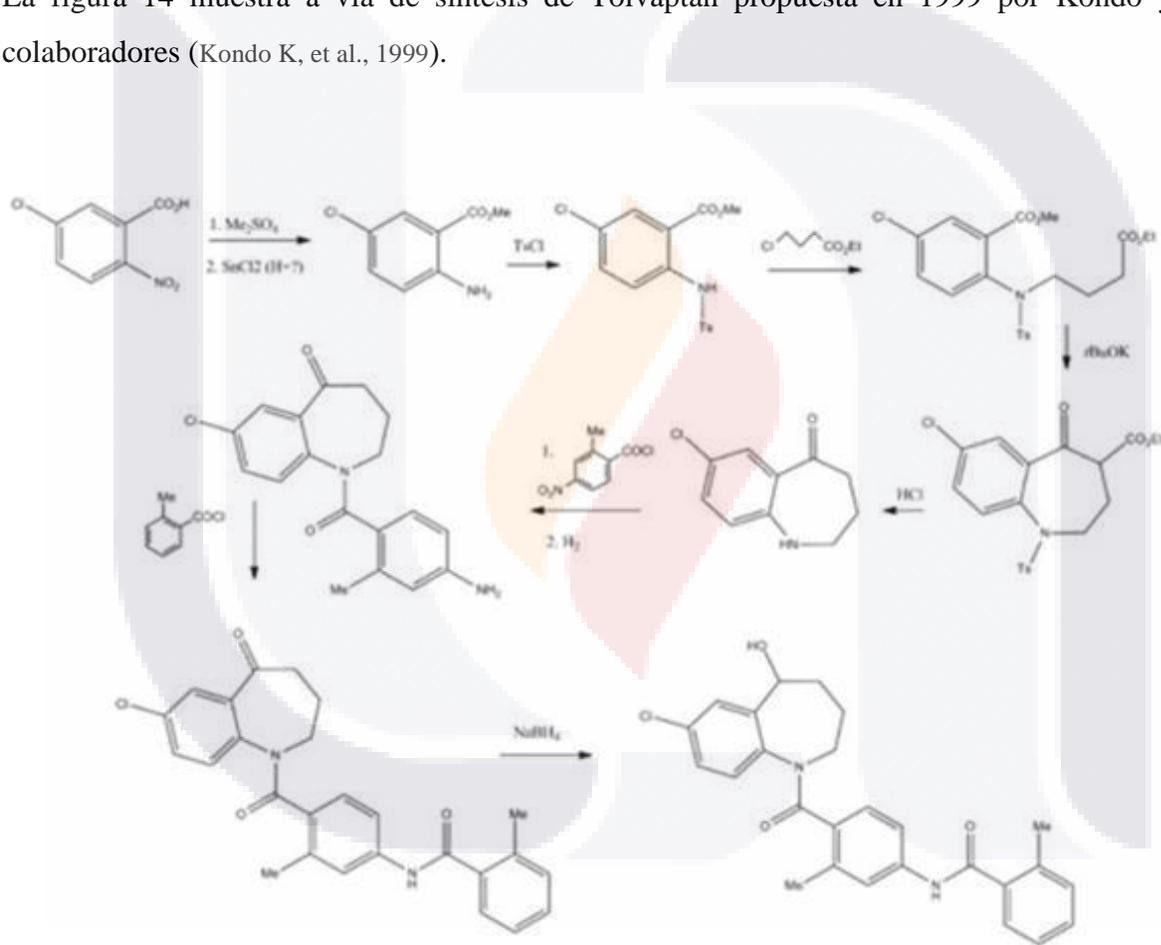


Figura 14. Vía de síntesis de Tolvaptan. (de: Kondo K, et al., 1999).

### Satavaptan

Desarrollado por Sanofi-Aventis, su aprobación para su uso en el tratamiento de la hiponatremia y ascitis bajo el nombre tentativo de Aquilda<sup>®</sup>, se encuentra bajo revisión en la Unión Europea. Satavaptan (SR121463) es un antagonista selectivo de los AVPR2. (Soupart A, et al., 2006; Ginès P, et al., 2008).

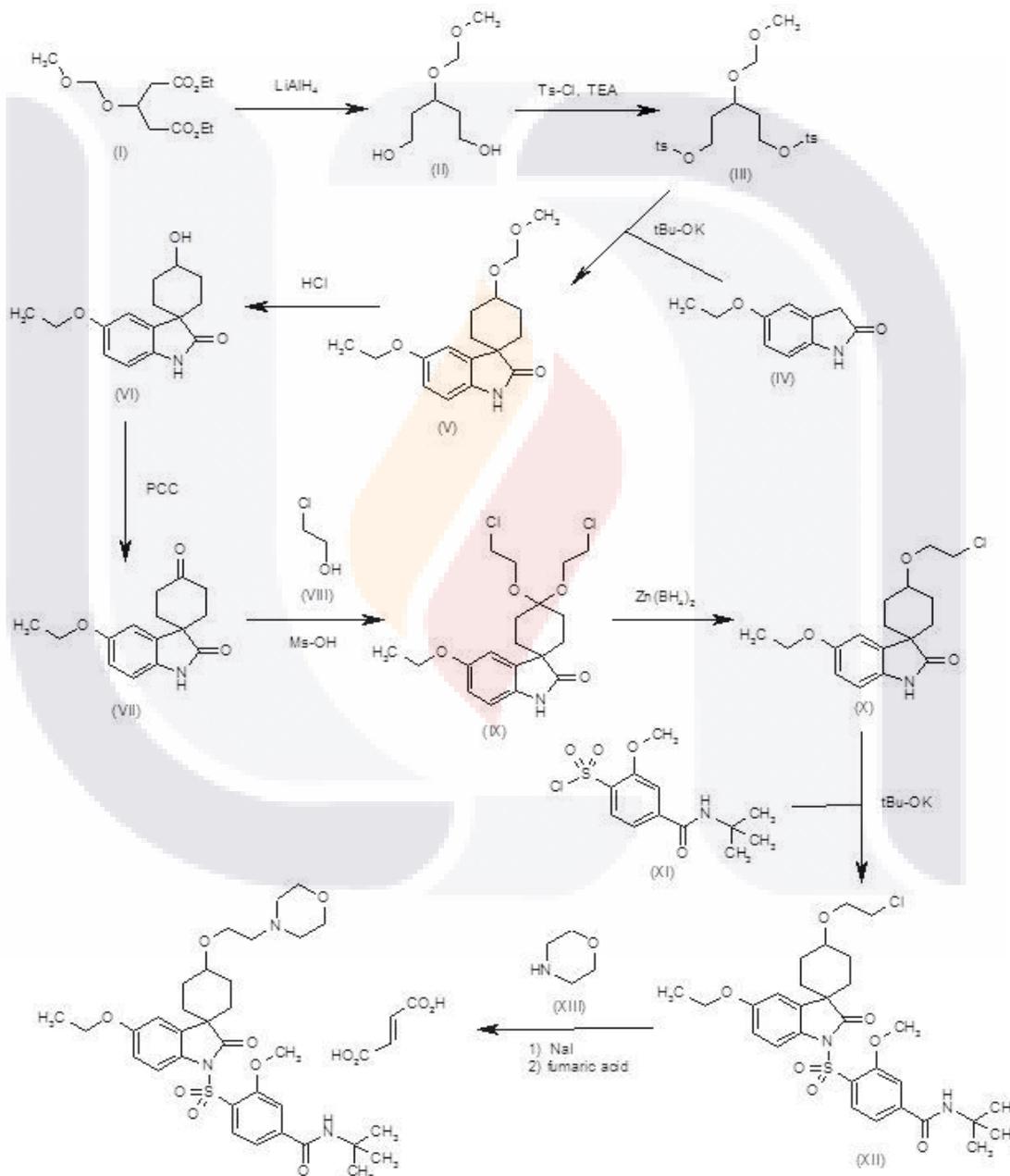


Figura 15. Vía de síntesis de Satavaptan. (de: Di Malta A, et al., 1998).

La reducción de dietil 3-(metoxymetoxi)glutarato (I) con  $\text{LiAlH}_4$  en THF da 3-(metoxymetoxi)pentano-1,5-diol (II), el cual es tratado con Ts-OH y TEA en THF para producir el disulfonato (III). La condensación de (III) con 5-etoxyindolina-2-ona (IV) con tBu-OK en THF produce el compuesto spiro (V), el cual se desprotege con HCl en metanol y así producir alcohol spiranico (VI). La oxidación de (VI) con clorocromato de piridinium (PCC) y  $\text{Al}_2\text{O}_3$  provee el spiranico cyclohexanona (VII), el cual es tratado con 2-chloroetanol (VIII) y Ms-OH en tolueno para dar el ketal (IX). La reacción de (IX) con zinc borohidrico y cloruro de trimetilsilyl en etil eter/diclorometano forma el derivado 2-cloroetoxy (X), el cual es condensado con cloruro de 4-(N-tert-butylcarbamoil)-2-methoxybenzenesulfonylo (XI) con tBu-OK en THF y así formar el aducto (XII). Finalmente, el compuesto es obtenido por condensación de (XII) con morfolina (XIII) por medio de NaI en DMF, seguido de un tratamiento con ácido fumárico (Di Malta A, et al., 1998) (Fig. 15).

### Lixivaptan

Desarrollado por Cardiokine, Inc, Lixivaptan (VPA-985) es un antagonista selectivo de los AVPR2. Actualmente se encuentra en fase III de investigación clínica para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, incluyendo hiponatremia e hiponatremia concomitante con insuficiencia cardíaca (Albright JD, et al., 1998).

La acilación del ácido 4-amino-2-clorobenzóico metil éster (VII) con cloruro de 5-fluoro-2-metilbenzoylo (VI) forma una amida (VIII), la cual es hidrolizada a éster formando su ácido correspondiente (IX). La reacción de (IX) con  $\text{SOCl}_2$  forma el cloruro de acilo (X), el cual es finalmente condensado con la pyrrolobenzodiazepina (II) (obtenida de la reducto-ciclación de 1-(2-nitrobenzyl)pyrrol-2-carbaldehído (I)) y así formar el lixivaptan (Albright JD, et al., 1998) (Fig. 16).

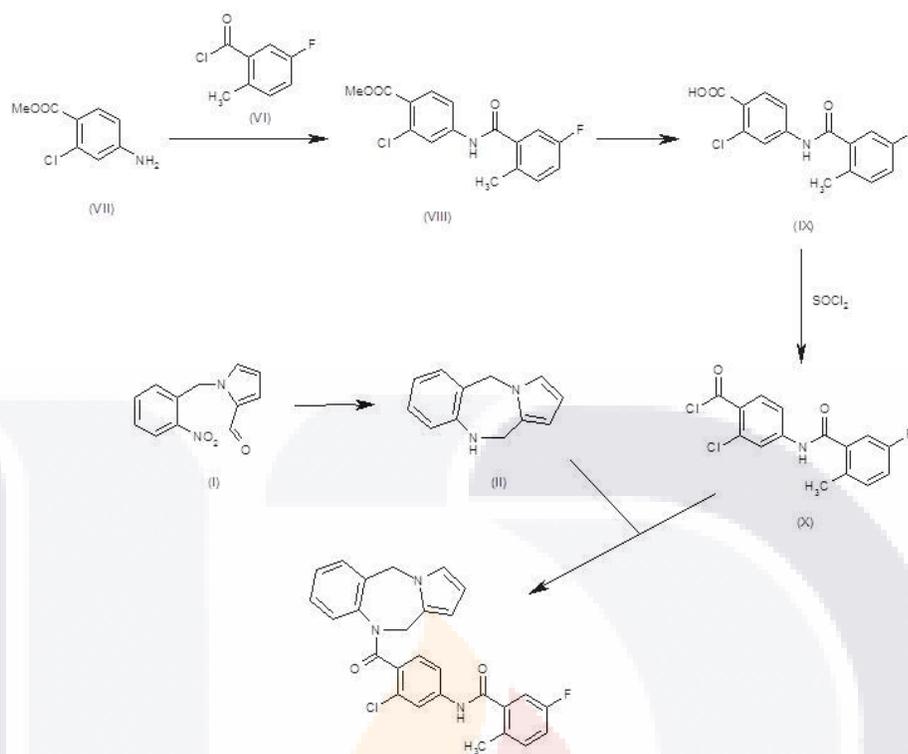


Figura 16. Vía de Síntesis de Lixivaptan. (de: Albright JD, et al., 1998).

## **Investigación y Desarrollo de Antagonistas de los AVPR en México.**

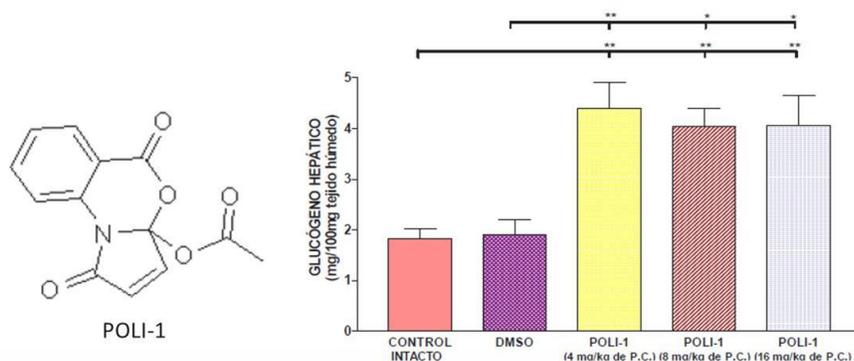
Una fuerte línea de investigación en nuestro laboratorio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, México, es el papel de AVP en la incidencia y severidad de la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE). Resultados previos indican que AVP tiene un papel clave en el desarrollo e incidencia de la enfermedad (Quintanar-Stephano A, et al., 2004; Quintanar-Stephano A, et al., 2005; Campos-Rodríguez R, et al., 2006; Berczi I, et al., 2009; Quintanar-Stephano A, et al., 2010; Quintanar JL, et al., 2011; Quintanar-Stephano A, et al., 2012); por lo que se hace indispensable el uso de antagonistas a AVP.

Al inicio de mi trabajo de tesis, se tenían resultados de antagonistas peptídicos de AVP en la EAE, sin embargo, como se mencionó antes, una infusión prolongada de antagonistas peptídicos a los AVPR parece expresar un significativo efecto agonista (Kinter, et al., 1993). Por otro lado, en esa época y hasta la fecha ninguno de los vaptanes está en el mercado Mexicano y nos ha sido prácticamente imposible adquirirlos en sus países de origen, además de que por ser un medicamento nuevo, el costo de ellos es elevado.

Por otro lado, se ha trabajado en colaboración con estudiantes e investigadores de la Escuela Superior de Medicina (ESM) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) dirigidos por el Dr. José Correa Basurto, donde se han sintetizado ya varios compuestos químicos que guardan semejanzas estructurales a la familia de los vaptanes. El primero en ser evaluado fue un compuesto nombrado: POLI-1 (3<sup>a</sup>-Acetoxi-5*H*-pirrolo(1,2-*a*)(3,1)benzoxazin-1,5-(3*aH*)-diona (Fig. 17). POLI-1 es un derivado del ácido antranílico cuya síntesis ha sido previamente reportada (Corea-Basurto J, et al., 2006).

POLI-1 inhibió de manera significativa la glucogenólisis, sugiriendo con esto el bloqueo de los AVPR1A (Reyes MC, 2009).

Mas tarde, otro derivado del ácido antranílico: 4-(2'-carboxifenilamino)-4-oxo(*Z*)-2-ácido butenóico bloqueó en un 20% la respuesta vasopresora (Rosendo-Villalobos A, 2009).



**Figura 17. POLI-1.** Efectos de la exposición aguda al DMSO (100  $\mu$ l/rata) y diferentes dosis de POLI-I (4, 8 y 16 mg/kg de p.c.) sobre la concentración de glucógeno hepático (mg de glucógeno/100 mg de tejido húmedo). Cada valor representa la media + EEM, n=6 ratas/grupo. Para fines de comparación, un grupo CONTROL INTACTO fue incluido en el estudio; (Reyes, 2009).

Tanto POLI-1 como C1 tienen en su estructura un grupo aril-amida, grupo característico de los vaptanes. En este trabajo se pretende explorar el grupo benzoazepina, otro de los grupos funcionales característicos de los vaptanes (Fig. 18).



**Figura 18. Grupos Benzoazepina y Arilamida.**

Estudios teóricos como el acoplamiento molecular (molecular docking) y el modelado molecular son herramientas muy útiles para darnos una idea del modo de unión de un ligando a su receptor (Soriano-Ursúa MA, et al., 2010), por lo cual, pueden ser aplicadas al diseño de nuevos fármacos. Adicionalmente, el empleo conjunto de un análisis cuantitativo de relación estructura-actividad (QSAR por sus siglas en inglés) y un estudio de docking han probado ser de mayor utilidad en el estudio del modo de unión de ligandos estructuralmente relacionados, que conservan un grupo farmacóforo en común (Ramírez-Galicia G, et al., 2012), permitiendo así explicar a detalle el proceso de reconocimiento del ligando.

---

## **Patologías Relacionadas a AVP**

Enfermedades directamente relacionadas a vasopresina son poco comunes, sin embargo, desde un punto de vista endócrino, pueden ser divididas en condiciones debidas a un aumento o una disminución en la secreción de AVP (Reichlin S, 1984):

### **Diabetes Insípida**

La diabetes insípida se debe a una deficiencia de vasopresina y clínicamente se caracteriza por poliuria y polidipsia (Lester MC and Nelson PB, 1981). La diabetes insípida se puede desarrollar en pacientes con lesiones orgánicas del hipotálamo, tallo hipofisial o neurohipófisis que interfieren con la síntesis, transporte y/o liberación de AVP. La destrucción del lóbulo posterior de la pituitaria, resulta en poliuria y polidipsia solo ligera o moderadamente temporal (Green JR, et al., 1967).

### **Síndrome de Secreción Inapropiada de ADH (SIADH)**

También conocido como síndrome Schwartz-Bartter, el SIADH se caracteriza por importantes pérdidas renales de sodio e hiponatremia debidas a una secreción excesiva de AVP en la neurohipófisis o a una producción ectópica de neoplasmas extrahipofisiales (De Troyer A and Demanet JC, 1976).

La síntesis ectópica de AVP, aparentemente está asociada con algunos tumores malignos, principalmente carcinoma broncogénico. Sin embargo, algunos pacientes que cursan con SIADH no desarrollan tumores, apoyando la hipótesis de que AVP es liberada en exceso desde la neurohipófisis. Otras enfermedades pueden estar acompañadas con una liberación excesiva de AVP, tal como meningitis, mixedema o lesiones cerebrales. Alteraciones morfológicas en el hipotálamo, tallo hipotalámico y neurohipófisis de pacientes con SIADH y no-neoplasma deben aún ser dilucidados (Reichlin S, 1984).

Sin embargo, la hiponatremia hipervolémica, cirrosis hepática, ascitis, insuficiencia cardíaca, e incluso esclerosis múltiple, son trastornos relacionados a un desbalance electrolítico y/o a un aumento excesivo en la retención de líquidos corporales y en los cuales, agentes acuaréticos son parte indispensable en su tratamiento.

### **Herramientas Utilizadas en el Diseño Racional de Fármacos**

En años pasados, el descubrimiento de un nuevo fármaco era dirigido por el azar; en la actualidad, los avances en el campo de la biología molecular junto con el desarrollo de técnicas computacionales enfocadas al análisis de estructuras químicas, permiten el diseño racional de nuevas sustancias terapéuticas.

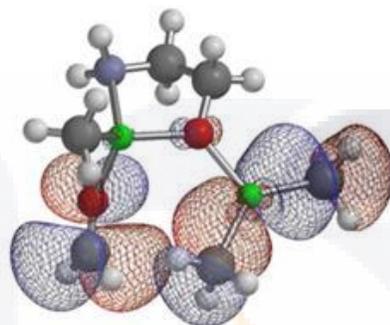
Hace unos cien años, Emil Fischer (1852-1919) y Paul Ehrlich (1854-1915), químico aquél y médico éste, propusieron, sin previo acuerdo mutuo, mecanismos moleculares para explicar las interacciones entre determinadas sustancias y las estructuras biológicas del organismo. Fischer utilizó el símil de "la llave y la cerradura", en tanto que Ehrlich sugería la idea de "la bala mágica" como modelo para la moderna investigación farmacológica. Esta bala llevaría el medicamento hasta el foco de la enfermedad, sin dañar los tejidos sanos. El principio de la toxicidad selectiva implica, por su parte, un reconocimiento específico como el propuesto por Fischer (Folkers G y Kubibyi H, 1997).

El diseño racional de fármacos, es un proceso inventivo para encontrar nuevos medicamentos basándose en el conocimiento del objetivo biológico. Estos fármacos, generalmente son pequeñas moléculas orgánicas que van a activar o inhibir la función de biomoléculas (tal como proteínas) y esto da como resultado un beneficio terapéutico para el paciente. En el sentido más básico, el diseño de fármacos involucra la construcción de una estructura química que será complementaria en carga y forma al blanco biomolecular de tal forma que se pueda unir (Escalona AJC y cols., 2008).

En la actualidad existen numerosos métodos experimentales para determinar la estructura molecular de una sustancia; no obstante, el desarrollo alcanzado por la computación y la química computacional ha propiciado la generación de sistemas que permiten calcular su geometría y su energía molecular. Estos sistemas son capaces de generar datos con una amplia aplicación en la investigación experimental, tanto para la interpretación de los resultados obtenidos y la planificación de nuevos, así como para deducir información no asequible experimentalmente.

### Modelado Molecular (métodos de cálculo).

En principio, se pueden considerar 3 tipos de métodos teóricos de cálculo para la obtención de la geometría de una molécula: los métodos ab initio, los semi-empíricos y los de mecánica molecular. La elección de uno u otro depende fundamentalmente del tamaño de la molécula, la naturaleza del problema planteado y del tiempo de cálculo requerido (Morris GM, et al., 1998).



**Figura 19. Modelización Molecular.** Se refiere al cálculo de propiedades físicas (energía, momento dipolar, etc.) y químicas (reactividad) de los compuestos químicos mediante la utilización de diferentes métodos teóricos (Mecánica Molecular, métodos semiempíricos, cálculos ab initio, métodos del funcional de densidad) (de: [www.unizar.es/icma/depart/images/amc\\_2.png](http://www.unizar.es/icma/depart/images/amc_2.png) Mayo 2010).

En el caso de la mecánica molecular, aunque es el menos exacto de todos, requiere de menos tiempo de cálculo con respecto a los semiempíricos y ab initio, y reproducen con buena precisión los valores experimentales referentes a geometrías y energías. Este método se basa en los formulismos de la espectroscopía vibracional, representando la molécula como un modelo mecánico de masas (núcleos) unidas por fuerzas armónicas o elásticas (enlaces), las cuales se considera que poseen valores de longitud y ángulo ideales o naturales que condicionan la geometría (Fig. 19). Entonces la energía  $E$  de la molécula se define como la desviación de los parámetros ideales y es minimizada siguiendo un algoritmo de optimización:

$$E = E_r + E_\theta + E_\omega + E_{VDW} + E_D + E_H$$

donde:  $E_r$  define las deformaciones de la longitud de enlace (acortamiento-alargamiento),  $E_\theta$  se relaciona con las distorsiones del ángulo de enlace,  $E_\omega$  es la energía de torsión del ángulo diedro por rotación de los enlaces y  $E_{VDW}$ ,  $E_D$  y  $E_H$  consideran las contribuciones de las interacciones de Van der Waals, las repulsiones electrostáticas y las asociaciones por puentes de hidrógeno, respectivamente.

Dado que la mecánica molecular supone una interpolación de los datos experimentales existentes, generalmente predice correctamente las geometrías moleculares de los compuestos bajo estudio. Estas geometrías optimizadas se pueden utilizar como datos de entrada para los cálculos mecánico-cuánticos con el objetivo de comenzar la optimización total con una estructura previamente refinada. Además su uso principal en la actualidad es en el campo de las macromoléculas, en las cuales los métodos de cálculos mecánico-cuánticos se tornan prohibitivos en cuanto a costo computacional.

Por otra parte, el tratamiento cuántico de la materia está basado en el principio de incertidumbre de Heisenberg, según el cual no es posible conocer simultáneamente la posición y el momento de una partícula. Por esto es necesario abordar el problema desde el punto de vista estadístico, dada la necesidad de poder encontrar una partícula en un lugar determinado y en un momento dado.

Otro concepto fundamental de la mecánica cuántica es que todas las cantidades dinámicas asociadas a cada partícula están cuantificadas. La energía de una partícula tiene un valor discreto, el cual es múltiplo de una energía básica y la constante de Plank. La ecuación fundamental es la de Schrödinger, que para el átomo de hidrógeno viene dada por la ecuación:

$$\nabla^2 \Psi - (8\pi^2 m / h^2) (E + Z e^2 / r) \Psi = 0$$

donde,  $\nabla^2$  es el operador diferencial,  $\Psi$  es la función de onda,  $h$  es la constante de Plank, y  $r$  la distancia entre el electrón y el núcleo. Para los átomos multielectrónicos, la ecuación de Schrödinger, no puede ser resuelta, pues no es posible la separación de las variables. Para ello es preciso acudir a la expresión de Hartree, que considera cada electrón independientemente, moviéndose en el campo del resto de los electrones y de los núcleos.

Teniendo en cuenta el principio de exclusión de Pauli, según el cual no pueden existir más de dos electrones en una misma órbita, con dos espines diferentes, se obtiene la expresión de Hartree-Fock; la cual expresada en forma analítica, no matricial, origina la ecuación de Roothaan.

En párrafos anteriores se hizo mención de que existen dos métodos principales de cálculos mecánico-cuánticos, en dependencia de las aproximaciones que se realizan:

1. Los métodos ab initio
2. Los métodos semiempíricos

Los métodos ab initio con el modelo hamiltoniano nos brindan una representación completa de todas las interacciones no relativísticas entre el núcleo y los electrones de la molécula, soluciones no disponibles en la ecuación de Schrödinger. La utilización de este algoritmo de cálculo hace que los métodos ab initio necesiten un elevado tiempo de cómputo, que va a ser proporcional al número de electrones de la molécula, dependiendo por lo tanto de la naturaleza de los átomos y del tamaño de la misma. Sirva como ejemplo la molécula de metano, para la cual es necesario resolver un total de 1080 integrales, 1035 de ellas dielectrónicas.

La gran mayoría de los cálculos ab initio utilizan la aproximación del orbital, definida en el método de Hartree-Fock. Ellos incluyen interacciones configuracionales (CI), campos autoconsistentes multiconfiguracionales (MC SCF), la teoría de correlación por pares de electrones (CPMET), y la teoría de las perturbaciones.

Una alternativa de cálculo mecánico-cuántico lo ofrecen los métodos semiempíricos. Estos métodos han sido desarrollados dentro de la teoría de los orbitales moleculares (SCF MO), pero sobre la base de simplificaciones y aproximaciones introducidas al algoritmo de cálculo, que hacen que los tiempos de cálculo en computadoras normales (incluso microcomputadoras), se vea drásticamente reducido con respecto a los métodos ab initio, permitiendo una mayor utilización de los mismos.

Hoy día, es práctica común la realización de cálculos de optimización de geometría en moléculas de mediano tamaño, con más de 200 orbitales de base, en computadoras personales.

En tal sentido un método semiempírico debe cumplir los siguientes requisitos:

1. Que sea lo suficientemente simple para poder calcular moléculas relativamente grandes.
2. Que mantenga las principales interacciones intermoleculares: atracción por los núcleos y repulsión entre los electrones.
3. Que los resultados del cálculo puedan ser interpretados, permitiendo la construcción de métodos cualitativos adecuados.
4. Que compensen por parametrización las insuficiencias del método Hartree-Fock.

La principal aproximación que realizan los métodos semiempíricos es que ellos desprecian las integrales de solapamiento, teniendo solamente en cuenta los electrones de valencia de cada uno de los átomos integrantes de la molécula, considerando los electrones internos como parte del núcleo no polarizable. Así, mientras el método semiempírico NDDO calcula un total de 741 integrales para el propano, un método ab initio deberá resolver un gran total de 38,226 integrales para la misma molécula. Esto en tiempo de cálculo se traduciría en que, para realizarlos en una computadora con capacidad de un millón de operaciones por minuto, el cálculo semiempírico duraría no más de 5 minutos contra un total de 5 horas para el ab initio en la propia molécula de propano.

En la actualidad se cuenta con computadoras de mayor potencia y velocidad, con lo que es posible la realización de cálculos ab initio en un tiempo mucho menor que el expresado anteriormente.

En principio, cualquier método semiempírico puede ser utilizado para el cálculo de la geometría optimizada de una molécula. El primer método aplicado fue el de Hückel en 1931, luego le siguió el PPP en 1935. A partir de este momento se han ido creando nuevos métodos de cálculos, cada uno de los cuales se va haciendo más complejo por el desarrollo lógico que va experimentando la computación, permitiendo realizar cada vez más, operaciones complejas en un menor intervalo de tiempo.

## **Acoplamiento Molecular (molecular docking)**

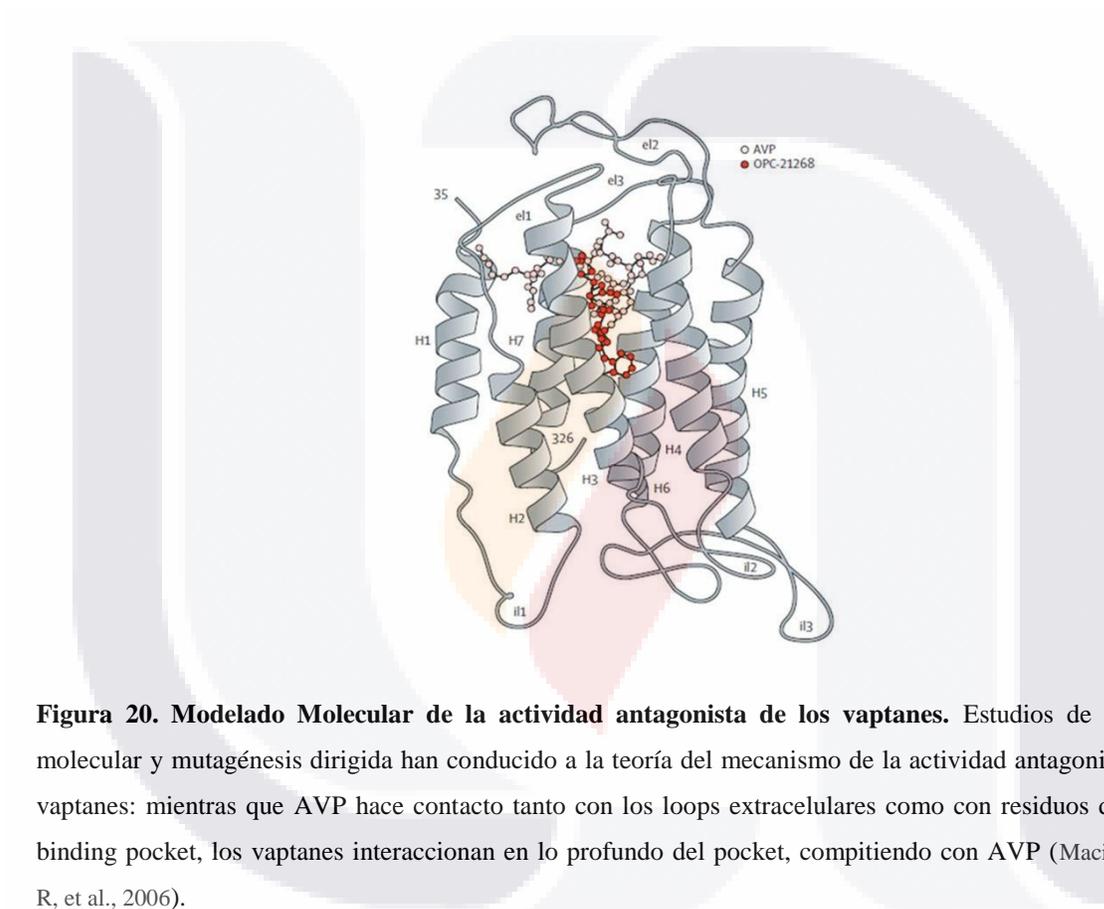
En el campo del modelado molecular, el acoplamiento molecular es un método que nos permite predecir la orientación preferida de una molécula cuando está unida a otra, con el fin de formar un complejo estable (Lengauer T, 1996).

La asociación de moléculas con relevancia biológica, tal como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos juega un papel muy importante en el proceso de transducción de señales; por lo tanto, la orientación del complejo puede afectar el tipo de señal producida (agonismo, antagonismo). En este sentido, el acoplamiento molecular es de gran importancia al predecir la fuerza y tipo de señal producida. Al predecir la orientación de enlace de moléculas pequeñas, tal como nuevos fármacos, con su proteína blanco, se podrá entonces, predecir su afinidad y actividad. En esto radica la importancia del método en el diseño racional de fármacos.

Varios estudios de acoplamiento molecular se han realizado con el fin de predecir la orientación y el sitio de interacción de los Vaptanes, esto es, identificar los residuos de aminoácidos de los AVPR involucrados en el reconocimiento de los antagonistas no-peptídicos. No hace mucho, varios grupos de investigación reportaron los residuos clave de los AVPR para el reconocimiento de los vaptanes. R214, V217, Q311, F307, I330 (Gieldón A, et al., 2001); D112, V132, Y186, S213 (Macion-Dazard R, et al., 2006); M220, F225, Y300, T333, A334, W204, A205 y F207 (Tahtaoui C, et al., 2003) del AVPR1A; mientras que Q291, F307, R203, V206 (Gieldón A, et al., 2001); K100, M120, L175, R202 (Macion-Dazard R, et al., 2006); I209, F214, L310 y M311 (Tahtaoui C, et al., 2003) del AVPR2.

Por otro lado, S´luzarz M y colaboradores en 2006 y Rodrigo J y colaboradores en 2007 reportaron los residuos de aminoácidos clave del AVPR1A en el reconocimiento de AVP: D112, K128, E54, V100, Q104, Q96, V127, Q131, V132, M135, F136, Q185, Y186, M220, I224, F225, W304, F307, I310, Q311, I330, T333, A334, L335, S338, N340, I192, N196, T198, K199, R201, D202, C203, W204 (S´luzarz M, et al., 2006; Rodrigo J, et al., 2007) además de los residuos clave del AVPR2 en el reconocimiento a AVP: V88, Q92, Q108, Q119, M120, M123, Y124, S127, Q174, Q180, R202, I209, F214, W284, F287, Q291, F307, M311, N337, R181, T190, D191, E198 (S´luzarz M, et al., 2006).

Estos estudios de docking revelaron que la cavidad del binding pocket esta formado principalmente por residuos hidrofóbicos, sobresaliendo interacciones del tipo  $\pi$ - $\pi$  con los residuos F207 y W211,  $\pi$ -catión con R214, puentes de hidrógeno con V217 y Q311. En el segmento N-terminal yuxtamembrana del AVPR1A, los residuos E54 y R46 son críticos para la unión con AVP y con antagonistas a AVP; E54 parece interactuar directamente con AVP, mientras que R56 contribuye a un cambio conformacional (Hawtin SR, et al., 2005).



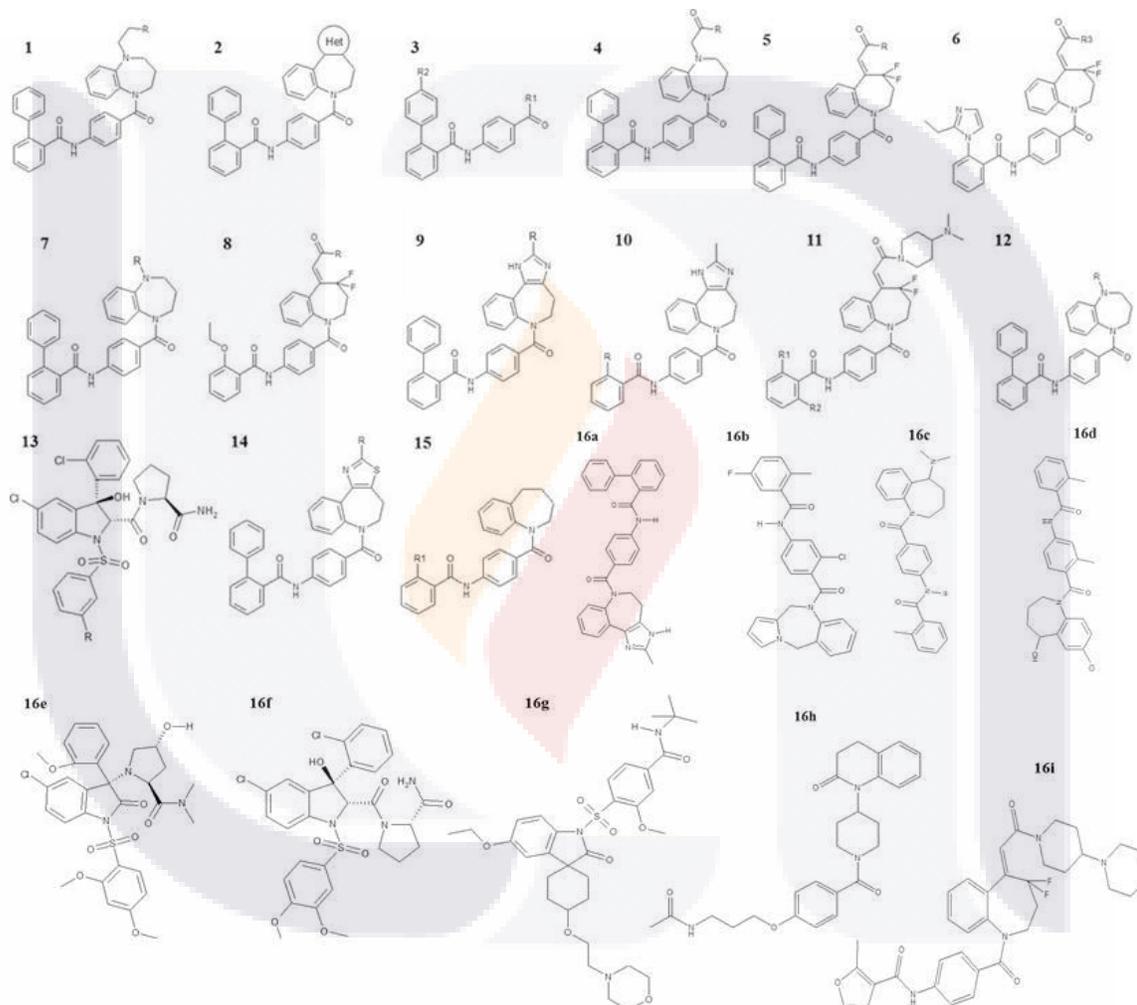
**Figura 20. Modelado Molecular de la actividad antagonista de los vaptanes.** Estudios de modelado molecular y mutagénesis dirigida han conducido a la teoría del mecanismo de la actividad antagonista de los vaptanes: mientras que AVP hace contacto tanto con los loops extracelulares como con residuos dentro del binding pocket, los vaptanes interaccionan en lo profundo del pocket, compitiendo con AVP (Macion-Dazard R, et al., 2006).

## **Análisis Cuantitativo de Relación Estructura- Actividad (QSAR)**

El descubrimiento de compuestos biológicamente activos y su desarrollo como fármacos es un proceso complejo que involucra muchas disciplinas científicas: biología celular y molecular, microbiología, bioquímica, química orgánica, inorgánica y sintética, medicina, biofísica, toxicología, farmacología, matemáticas, informática y tecnologías de la información, entre muchas otras. (Spilker B, 1989). Así pues, un fármaco biológicamente activo, evaluado clínicamente y desarrollado a partir de una molécula bioactiva, requiere condiciones específicas puesto que no todos los compuestos biológicamente activos son aptos para ser usados como fármacos debido a su toxicidad, efectos secundarios desfavorables, incluso su farmacocinética. Así, después de la síntesis y al margen de las propiedades terapéuticas deseables, el ensayo y aprobación de una sustancia requiere de muchas pruebas rigurosas para determinar si el compuesto es digno de convertirse en fármaco. Por lo tanto, no sólo hay una técnica de química computacional que juega un papel preponderante en el descubrimiento de fármacos, sino más bien un enfoque integrado de la ciencia experimental, con técnicas computacionales.

Tanto el modelado molecular como los métodos estadísticos cuantitativos, pueden ser utilizados para dilucidar información estructural de compuestos activo, ya que rara vez un efecto biológico depende de sólo una o dos propiedades químicas. El problema multidimensional contempla un gran número de factores, racionalizados para cubrir un amplio espacio de parámetros. Con el fin de poder tratar con conjuntos de datos complejos, que consiste en más de una actividad biológica y múltiples descriptores, herramientas avanzadas de estadística e informática han sido desarrolladas en el campo de la quimiométrica. El término quimiométrica, acuñado en los años de 1970, es la disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos con el fin de seleccionar y optimizar procedimientos para el análisis e interpretación de datos. Estas técnicas permiten una rápida predicción de propiedades moleculares y biológicas por medio de métodos multivariantes y técnicas de inteligencia artificial (Topliss JG., 1983; Tute MS., 1990). QSAR intenta correlacionar propiedades moleculares estructurales (descriptores) con funciones (es decir, propiedades fisicoquímicas, actividad biológica, toxicidad, etc.) para un conjunto de compuestos similares por medio de métodos estadísticos.

Las técnicas QSAR incluyen desde mediciones químicas y ensayos biológicos, hasta las técnicas estadísticas y la interpretación de resultados. De 1998 a la fecha, varios grupos de investigación se han dedicado al diseño, síntesis y evaluación biológica de compuestos de origen no-peptídicos. Las tablas 2 – 17 muestran una recopilación de las moléculas reportadas como antagonistas no-peptídicos a los AVPR1A.



**Figura 21. Familia de los vaptanes.** Incluyen derivados de: 1) 5-Aminoalkyl-Substituted 1,5-Benzodiazepine; 2) Azolobenzoazepine; 3) Benzoazepine and Benzodiazepine; 4) 5-Carbamoylmethyl-Substituted 1,5-Benzodiazepine; 5) 4,4-Difluorobenzoazepine; 6) 4,4-Difluoro-5-methylidene-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepine; 7) 5-Substituted 1,5-Benzodiazepine; 8) 5-Pyridylmethyl-Substituted 1,5-Benzodiazepine; 9) 2-Ethoxybenzanilide; 10) 2-Substituted Imidazobenzoazepine; 11) 2-Methylimidazobenzoazepine; 12) 4-(*N,N*-dimethylamino)piperidine; 13) 5-Pyridylmethyl-Substituted 1,5-Benzodiazepine; 14) 2-Substituted Thiazolobenzoazepine; 15) 2,3,4,5-Tetrahydro-1H-1-benzazepine; 16a) Conivaptan; 16b) Lixivaptan; 16c) Mozavaptan; 16d) Tolvaptan; 16e) Nelivaptan; 16f) Relcovaptan; 16g) Satavaptan; 16h) OPC-21268; 16i) YM218. (Para detalles y sustituyentes ver tablas: 2-17).

**Tabla 2. Derivados de 1,5-Benzodiazepinas 5-Aminoalkil-Substituidas** (Matsuhisa A, et. al., 1998). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent	Binding Affinity
			pKi <sup>a</sup>
1	1a	Dimethylamine	8.00
2	1b	Diethylamine	8.27
3	1c	Diisopropylamine	8.62
4	1d	Pyrrolidine	8.58
5	1e	Piperidine	8.53
6	1f	1-Methyl-piperidine	8.58
7	1g	1-Methyl-piperazine	8.78
8	1h	1-Methyl-[1,4]diazepane	8.44
9	1i	Dimethyl-piperidin-4-yl-amine	8.84

**Tabla 3. Azolobenzoazepine Derivatives** (Matsuhisa A, et. al., 2000). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent	Binding Affinity
			pKi <sup>a</sup>
10	2a	2-Methyl-1H-imidazole	9.05
11	2b	2-Methyl-oxazole	8.37

**Tabla 4. Derivados de Benzoazepinas y Benzodiazepinas** (Matsuhisa A, et. al., 1998). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent (R1)	Substituent(R2)	Binding Affinity
				pKi <sup>a</sup>
12	3a	Decahydro-benzo[b]azepine	H	7.85
13	3b	Decahydro-benzo[b]azepine	Methyl	8.07
14	3c	2,3,4,5-Tetrahydro-1H-benzo[e][1,4]diazepine	H	5.70
15	3d	2,3,4,5-Tetrahydro-1H-benzo[e][1,4]diazepine	H	6.97
16	3e	2,3,4,5-Tetrahydro-1H-benzo[b][1,4]diazepine	H	8.84
17	3f	2,3,4,5-Tetrahydro-1H-benzo[b][1,4]diazepine	Methyl	8.35

**Tabla 5. Derivados de 1,5-Benzodiazepinas 5-Carbamoilmetil-Substituidas** (Matsuhisa A, et. al., 1998). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent	Binding Affinity
			pKi <sup>a</sup>
18	4a	Amine	8.91
19	4b	Methylamine	8.37
20	4c	Dimethylamine	8.39
21	4d	Pirrolidine	8.72
22	4e	Piperidine	8.34
23	4f	<i>N,N</i> -Dimethyl-ethane-1,2-diamine	8.64
24	4g	<i>N,N,N'</i> -Trimethyl-ethane-1,2-diamine	9.01
25	4h	1-Methyl-piperazine	8.30
26	4i	1-Methyl-[1,4]diazepane	8.59
27	4j	Dimethyl-piperidin-4-yl-amine	8.69

**Tabla 6. Derivados de 4,4-Difluorobenzodiazepinas** (Shimada Y, et. al., 2000). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent	Binding Affinity
			pKi <sup>a</sup>
28	5a	Methanol anion	8.74
29	5b	Hidroxy	7.82
30	5c	1-Methyl-piperazine	8.89
31	5d	Amine	9.60
32	5e	Methylamine	9.45
33	5f	Ethylamine	9.72
34	5g	Propylamine	9.23
35	5h	Isopropylamine	9.44
36	5i	Buthylamine	8.63
37	5j	2-Methoxy-ethylamine	9.67
38	5k	<i>N,N</i> -Dimethyl-ethane-1,2-diamine	9.97
39	5l	Pyrrolidine	9.14
40	5m	Piperidine	8.85
41	5n	Morpholine	9.57
42	5o	3-Ethylamine-dimethylamine	9.80
43	5p	<i>N,N,N'</i> -Trimethyl-propane-1,3-diamine	9.79
44	5q	Piperazine	9.66
45	5r	1-Ethyl-piperazine	8.89
46	5s	1-Butyl-piperazine	7.97
47	5t	Methyl-piperidin-4-yl-amine	10.10
48	5u	[1,4]Diazepane	10.08
49	5v	1-Methyl-[1,4]diazepane	10.50

**Tabla 7. Derivados de 4,4-Difluoro-5-metiliden-2,3,4,5-tetrahidro-1H-1-benzazepinas** (Shimada Y, et. al., 2005). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) ver fig. 21.

No.	Compound*	Substituent	Binding Affinity
			pKi <sup>a</sup>
50	6a	Amine	8.70
51	6b	Methylamine	9.01
52	6c	Ethylamine	9.01
53	6d	Propylamine	8.72
54	6e	Isopropylamine	8.85
55	6f	Aziridine	9.47
56	6g	Dimethylamine	8.84
57	6h	Diethylamine	8.86
58	6i	Piperidine	8.79
59	6j	2-Methoxy-ethylamine	8.92
60	6k	Morpholine	9.27

**Tabla 8. Derivados de 1,5-Benzodiazepinas 5-Substituidas** (Matsuhisa A, et. al., 1998). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent	Binding Affinity
			pKi <sup>a</sup>
61	7a	Methyl	7.00
62	7b	Phenyl	7.04
63	7c	Acetyl	8.33
64	7d	Benzoyl	5.21
65	7e	Benzyl	8.12

**Tabla 9. Derivados de 2-Etoxibenzanilidas** (Shimada Y, et. al., 2003). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent	Binding Affinity
			pKi <sup>a</sup>
66	8 <sup>a</sup>	Amine	8.81
67	8b	Methylamine	9.26
68	8c	Ethylamine	9.04
69	8d	Propylamine	8.95
70	8e	Isopropylamine	9.20
71	8f	Aziridine	9.39
72	8g	Dimethylamine	8.95
73	8h	Diethylamine	8.59
74	8i	Morpholine	9.80
75	8j	Thiomorpholine	8.75

**Tabla 10. Derivados de Imidazobenzozepinas 2-Substituidas** (Matsuhisa A, et. al., 2000). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent	Binding Affinity
			pKi <sup>a</sup>
76	9a	Ethyl	9.18
77	9b	Propyl	8.74
78	9c	Cyclopropyl	8.91
79	9d	Toluene	8.11
80	9e	Ethylamine	9.47
81	9f	Propylamine	9.39
82	9g	Butylamine	9.29

**Tabla 11. Derivados de 2-Metilimidazobenzozepinas** (Matsuhisa A, et. al., 2000). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent	Binding Affinity
			pKi <sup>a</sup>
83	10a	Methyl	7.77
84	10b	Isopropyl	7.85
85	10c	Methanol anion	7.98
86	10d	Ethanol anion	7.93
87	10e	<i>o</i> -Isopropyl	8.21
88	10f	Fluoride	7.71
89	10g	4-Methylphenol	8.60

**Tabla 12. Derivados de 4-(N,N-dimetilamino)piperidinas** (Shimada Y, et. al., 2003). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent R1	Substituent R2	Binding Affinity
				pKi <sup>a</sup>
90	11a	Phenyl	H	10.1
91	11b	Methyl	H	8.76
92	11c	Methanol anion	H	8.89
93	11d	Ethanol anion	H	9.22
94	11e	Isopropylate	H	9.19
95	11f	Chloride	H	8.99
96	11g	Nitro	H	8.78
97	11h	Methanol anion	Methanol anion	8.08

**Tabla 13. Derivados de 1,5-Benzodiazepinas 5-Piridilmetil-Substituidas** (Matsuhisa A, et. al., 1998). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent	Binding Affinity
			pKi <sup>a</sup>
98	12a	2-Methyl-pyridine	8.01
99	12b	3-Methyl-pyridine	8.22
100	12c	4-Methyl-pyridine	8.45

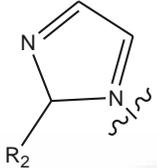
**Tabla 14. Derivados análogos de SR49059** (Tahtaoui C, et. al., 2003). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de células CHO. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent	Binding Affinity
			pKi <sup>a</sup>
101	13a	Nitro	6.24
102	13b	Amine	7.01
103	13c	1-Trifluoromethyl-vinylamine	7.82
104	13d	Thiocyanate	8.20
105	13e	1-Chloromethyl-vinylamine	7.79

**Tabla 15. Derivados de Tiazolobenzoazepinas 2-Substituidas** (Matsuhisa A, et. al., 2000). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent	Binding Affinity
			pKi <sup>a</sup>
106	14a	Methyl	7.87
107	14b	Amine	8.33
108	14c	Dimethyl-propyl-amine	8.52
109	14d	4-Propyl-morpholine	7.92
110	14e	<i>N,N</i> -Dimethyl-ethane-1,2-diamine	8.76
111	14f	2-Methyl-pyridine	7.29
112	14g	3-Methyl-pyridine	7.74
113	14h	4-Methyl-1 <i>H</i> -imidazole	7.64
114	14i	2,4-Dimethyl-1 <i>H</i> -imidazole	7.95
115	14j	Methylamine	8.00
116	14k	Ethylamine	8.91
117	14l	Propylamine	8.40

**Tabla 16. Derivados de 2,3,4,5-Tetrahidro-1H-1-benzazepinas** (Shimada Y, et. al., 2005). (a) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Substituent R1	Substituent R2	Binding Affinity
				pKi <sup>a</sup>
118	15a	Phenyl	-	7.85
119	15b		Hydrogen	7.33
120	15c		Methyl	8.20
121	15d		Ethyl	8.58
122	15e		<i>n</i> Propyl	7.40
123	15f		Phenyl	6.31
124	15g		1 <i>H</i> -[1,2,4]Triazole	-
125	15h	1 <i>H</i> -Tetrazole	-	6.63

**Tabla 17. YM087, OPC-31260, OPC-21268** (Tahara A, et. al., 1997); **VPA-985** (Mukund S Chorghade, 2007); **OPC-41061** (Yamamura Y, et. al., 1998); **SSR-149415** (Serradeil-Le Gal C, et. al., 2007); **SR-49059, SR-121463** (Tsukada J, et. al., 2002); e **YM218** (Tsukada J, et. al., 2005). (a, b, c, e, f) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de rata. (d) pKi de [<sup>3</sup>H]vasopresina unida a membranas de hígado de ratón. (\*) (Fig. 21).

No.	Compound*	Name	Binding Affinity
			pKi
126	16a	Conivaptan (YM087)	9.32 <sup>a</sup>
127	16b	Lixivaptan (VPA-985)	7.36 <sup>b</sup>
128	16c	Mozavaptan (OPC-31260)	6.71 <sup>a</sup>
129	16d	Tolvaptan (OPC-41061)	6.49 <sup>c</sup>
130	16e	Nelivaptan (SSR-149415)	6.92 <sup>d</sup>
131	16f	Relcovaptan (SR-49059)	8.84 <sup>e</sup>
132	16g	Satavaptan (SR-121463)	5.26 <sup>e</sup>
133	16h	(OPC-21268)	7.63 <sup>a</sup>
134	16i	(YM218)	9.30 <sup>f</sup>

Con este conjunto de compuestos estructuralmente relacionados, se pretende realizar un estudio QSAR para evaluar la relación entre su estructura química y su actividad biológica (afinidad de unión o pKi).



## JUSTIFICACIÓN

Considerando:

- 1) La necesidad de disponer de compuestos con propiedades antagonistas a los receptores de vasopresina para ser usados en nuestros experimentos.
- 2) Que los receptores de AVP son ricos en aminoácidos aromáticos, situación que facilita la generación en forma dirigida de fármacos con acciones antagónicas de los receptores de AVP.
- 3) Que estudios preliminares sugieren que la familia de los vaptanes pudieran actuar como antagonista de los receptores de AVP.

Aquí proponemos la síntesis de compuestos de naturaleza no-peptídica y el estudio de sus efectos como antagonistas de los receptores de AVP.



## 2. HIPÓTESIS

A partir de fármacos ya conocidos, es posible generar nuevos compuestos que posean actividad antagonista a los receptores V1a y V2 de vasopresina.





### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Sintetizar compuestos con propiedades antagonistas a los receptores de vasopresina.

#### 3.2 Objetivos Específicos

1. Sintetizar e identificar químicamente compuestos estructuralmente relacionados a los vaptanes.
2. Optimizar la geometría de los ligandos y determinar computacionalmente el modo de unión de los compuestos sintetizados con los receptores V1a y V2 de vasopresina.
3. Estudiar el efecto bloqueador de los AVPR1A vasculares de los compuestos sintetizados utilizando el modelo de contractilidad de músculo liso vascular.
4. Estudiar el efecto bloqueador de los AVPR2 de los compuestos utilizando un modelo de antagonismo *in-vivo* a AVP exógena en ratas anestesiadas con carga de agua.
5. Evaluar el efecto bloqueador de los AVPR1A de los compuestos sintetizados sobre la presión arterial media.



## 4. MATERIALES

### 4.1. Equipo.

Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un equipo Electrothermal 9300 Digital (no corregidos).

Los espectros de infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro Midac M2000 FT-IR en pastilla de KBr.

La determinación de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se efectuaron en un espectrómetro Jeol GSX-300 para  $^1\text{H}$  y 75.4 MHz para  $^{13}\text{C}$ , en la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del IPN por la Dra. Itzia I. Padilla Martínez.

Para los cálculos de optimización de geometría de los ligandos, se utilizaron computadoras Dell Pentium IV con sistema operativo Linux y Windows®, además del software Hyperchem® 6 (HyperChem, Molecular Modelling System; Hypercube Inc.) y Gaussian® 98 (Gaussian 98,1998) y 2003 (Gaussian 03, 2003).

Para la valoración de afinidad fármaco-receptor se utilizó el programa AutoDock® (Frisch MJ y cols., 1998) y los complejos se visualizaron utilizando los programas Molekel® y VMD® (Humphrey W y cols., 1996).

Los AVPR1A y AVPR2 sobre los cuales se realizan las simulaciones de docking fueron modelados y prestados con fines de colaboración por la Dra. Magdalena Słusarz de la Facultad de Química de la Universidad de Gdansk, Polonia (Słusarz MJ y cols., 2006).

La presión arterial, el flujo urinario y la tensión en anillos de aorta, fueron registrados en un sistema de registro MP150 de BIOPAC®; con transductores de presión TSD120, transductores de fuerza TSD125C y un amplificador diferencial DA100C de Biosystems®. La señal del cuentagotas pasa al sistema de adquisición de datos del Biopac® a través de un amplificador y un acoplador del transductor de un fisiógrafo Narcobiosystems®. El software utilizado fue Acqknowledge 3.9.1.

Además se utilizó instrumental de microcirugía, mesa de cirugía, cánulas traqueales, respirador artificial, cánulas para arteria y vena y cánulas vesicales.

## 4.2 Reactivos.

### 4.2.1 Síntesis Química.

#### 4.2.1.1 Derivados de anilinas mono-sustituidas y di-sustituidas.

Ácido o-aminobenzoico, 2-hidroxi-5-metilnilina, 2-hidroxi-5-nitroanilina, anhídridos: succínico, glutárico y propiónico de la casa Aldrich; anhídrido acético de Productos Químicos Monterrey y anhídrido maléico de Sigma Chemical Co.; todos grado reactivo. El resto de reactivos y disolventes empleados fueron grado reactivo.

#### 4.2.1.2 Derivados benzacepínicos

Todos de la casa Sigma-Aldrich: 2-butanona (34861), 4-clorobutanonitrilo (C3000), cloruro de 4-metilbencensulfonilo(240877), cloruro de 4-nitrobenzoilo (73120), ácido acético (A6283), acetonitrilo (271004), ácido bifenil-2-carboxílico (B34702), cloroformo (650471), diclorometano (270997), dimetilformamida (227056), monoclorhidrato de etanimidamida (00180), etanol (459836), ácido clorhídrico (320331), metanol (M3641), metil-2-aminobenzoato (236454), cloruro de oxalilo (221015), tert-butóxido de potasio (659878), piridina (270970), monoclorhidrato de piridina (243086), hidrobromuro-perbromuro de piridinium (289906), raney nickel (510041), ácido sulfúrico (320501).El resto de reactivos y disolventes empleados fueron grado reactivo.

#### 4.2.2. Pruebas Biológicas.

Uretano al 20 % (Sigma U-2500), solución salina al 0.9 % (Solución CS, PiSA® Farmacéutica Mexicana), heparina (Inhepar®, solución inyectable 1000 UI/mL PiSA® Farmacéutica Mexicana) vasopresina ([Arg8]-Vasopressin Grade V: synthetic, 100 IU, Sigma V-5501), adrenalina (Pinadrina 1 mg/mL PiSA® Farmacéutica Mexicana). Furosemida (Lasix®, Aventis ® Pharmaceutica). [deamino-Pen1, O-Me-Tyr<sup>2</sup>, Arg<sup>8</sup>]-Vasopressin (Sigma V1880).

### 4.3 Material Biológico.

Se utilizaron Ratas Wistar macho de  $350 \pm 100$  g de peso corporal (p.c.) proporcionadas por el bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). Se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ( $22 - 24$  °C) y con ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas (luz de 0700 – 1900 h). Se les proporcionó agua y comida *ad libitum*. Los animales fueron tratados de acuerdo con la Normativa Institucional de Normas de Bienestar de la UAA, compatible con el Institute for laboratory animal research (ILAR) guidelines de estados unidos de Norteamérica (USA), 1996.





## 5. METODOLOGÍAS

La síntesis de los compuestos, la optimización de los ligandos y el estudio de docking, se realizaron en los laboratorios de Modelado Molecular y Bioquímica Médica de la ESM-IPN, bajo la asesoría del Dr. José Correa-Basurto y el apoyo del Dr. Federico Martínez-Ramos del Departamento de Química Inorgánica de la ENCB-IPN; con la colaboración de la Dra. Itzia Padilla-Martínez de la UPIBI-IPN en la realización de los análisis de NMR. El estudio QSAR se realizó en colaboración con el Dr. Omar Deeb de la Facultad de Química de la Universidad Al-Quds de Jerusalén, Palestina. Las pruebas biológicas fueron realizadas en el laboratorio de Neuroinmunoendocrinología de la UAA, bajo la asesoría del Dr. Andrés Quintanar Stephano.

### 5.1 Análisis Cuantitativo de Relación Estructura-Actividad (QSAR).

A la fecha al menos 134 compuestos bloqueadores de los AVPR1A han sido reportados. De este conjunto de fármacos antagonistas a AVP se realizó un estudio QSAR.

La afinidad de unión ( $pK_i$ ) experimental así como la estructura de los ligandos fueron obtenidas de trabajos previamente reportados (Tablas 2-17). Las estructuras químicas de los compuestos se construyeron con el programa HyperChem® y fueron optimizadas con un método semi-empírico AM1; a la optimización le siguió el algoritmo Polak-Rebiere hasta alcanzar un gradiente rms de 0.01.

En este estudio, se calculó un conjunto de 1481 descriptores moleculares usando el software Dragon, incluyendo descriptores constitucionales, topológicos, geométricos, GETWAY, 3D-MoRSE, cargas topológicas de Galvez, BCUT, autocorrelaciones 2D, WHIM, RDF, de carga, molecular walk counts, índice de aromaticidad, perfil molecular Randico, grupos funcionales y descriptores centrados en átomos. Otros 15 descriptores químico-cuánticos se calcularon con el programa HyperChem.

Los descriptores calculados se clasificaron en 17 grupos diferentes, de estos, primero se analizaron para la existencia de variables constantes o casi constantes, aquellos detectados

con esta característica, fueron removidos. Otros descriptores fueron removidos por que tenían valores de cero.

Se evaluó la correlación entre descriptores, y aquellos que resultaron co-lineares (i.e.  $r > 0.95$ ) se eliminaron, dejando solo aquel que presentaba la correlación mas alta con la actividad biológica.

Los descriptores para realizar el QSAR se calcularon para 17 grupos de descriptores clasificados de acuerdo al tipo, luego, se llevaron a cabo los análisis de MLR de forma individual para cada grupo de descriptores siguiendo la metodología propuesta previamente por Deeb (Deeb, 2010).

Una vez seleccionados los descriptores, fueron reunidos en un solo grupo para llevar a cabo un análisis de componentes principales (PCA) para dividir los datos en los conjuntos de preparación y prueba. Finalmente, y después de remover los aberrantes, se realizó un análisis de MLR en el conjunto de preparación.

## **5.2 Acoplamiento Molecular (docking)**

El estudio de docking se realizó utilizando el software AutoDock 4.0.1 en plataforma Linux. Como primer paso, se prepararon los archivos de entrada para AutoGrid 4 y AutoDock 4, esto incluye: la estructura del receptor o macromolécula y la estructura optimizada de los ligandos. Los receptores utilizados para la simulación fueron previamente modelados y facilitados con fines de colaboración por la Dra Magdalena Słusarz, (2006).

Las estructuras de los ligandos fueron construidas utilizando el programa Isis/Draw, luego se pre-optimizaron geométricamente con un método de mecánica molecular (+MM) con HyperChem. Para optimizar la geometría de cada uno de los compuestos se utilizó el método semi-empírico AM1 en el programa Gaussian® 98, para finalmente convertirlos a formato pdb con el programa Molekel ® 4.3 (Goodford P. y cols., 1985).

Ya optimizadas las estructuras de los ligandos, se añadieron las cargas parciales de Gasteiger y se definieron los átomos de hidrógeno polares en el programa AutoDock Tools para finalmente definir las porciones rígidas de las moléculas y especificar los enlaces que presentaban libre rotación.

Se utilizaron receptores inactivos y se calcularon las cargas parciales de Kollman; además se agregaron los átomos de hidrógeno polares (átomos electronegativos que pudieran participar en interacciones por puentes de hidrógeno). Los hidrógenos no polares se trataron de manera implícita y fueron eliminados de la estructura, su efecto fue sumado a la contribución de los átomos a los que están unidos. Finalmente, se fijaron los parámetros de solvatación a la proteína.

Los mapas de afinidad atómica se generaron con el programa AutoGrid 4. Se delimitó el espacio de interacción entre la proteína y los ligandos, fijándolo en 36 X 20 X 20 Å para el AVPR1A y en 40 X 40 X 40 Å para el AVPR2; y se centró en las coordenadas x, y, z, para el AVPR1A (-2.833, -0.222, -2.056) y para el AVPR2 (0.104, -0.110, -0.072). El espaciado de los puntos grid fue de 0.375 Å.

La ejecución del programa Autodock requiere de la estructura de la proteína (archivo pdbqs) con sus respectivos mapas de afinidad atómica (archivos gpf), las estructuras de los compuestos en formato pdbq y un archivo de parámetros dpf que se genera en el programa AutoDock Tools.

Se utilizó un algoritmo genético-Lamarckiano (LGA) implementado en AutoDock con los siguientes parámetros: 100 corridas, 100 individuos en la población,  $1 \times 10^{-7}$  evaluaciones de energía y 27000 generaciones para cada ligando, el resto de los parámetros fueron tomados como los valores iniciales propuestos por el programa.

El archivo de salida de AutoDock (dlg) contiene la información de las diferentes conformaciones y energías libres de unión para cada una de las corridas. El complejo tridimensional ligando-receptor se visualizó y analizó con el programa VMD (Humphrey W y cols., 1996).

### 5.3 Síntesis Química.

Como se mencionó anteriormente, la síntesis química se realizó en el laboratorio de bioquímica médica de la ESM-IPN. Para todos los compuestos, el avance y fin de la reacción se determinó mediante cromatografía en capa fina (TLC). Se calculó el rendimiento, punto de fusión y solubilidad de cada uno de los compuestos sintetizados. Se identificaron por espectrofotometría IR y NMR de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$

#### 5.3.1 Síntesis de Compuestos Derivados de Anilinas mono-Sustituidas y di-Sustituidas.

Para la obtención de las amidas, se empleó ácido *o*-aminobenzóico, 2-amino-4-metilfenol y 2-amino-4-nitrophenol como precursores, los cuales se hicieron reaccionar con los anhídridos acético, maléico, succínico, glutárico y propiónico en una proporción mol-mol en THF y bajo condiciones controladas de temperatura según se describe en la sección de metodología experimental. Las vías de síntesis se muestran en las Fig. 22-24.

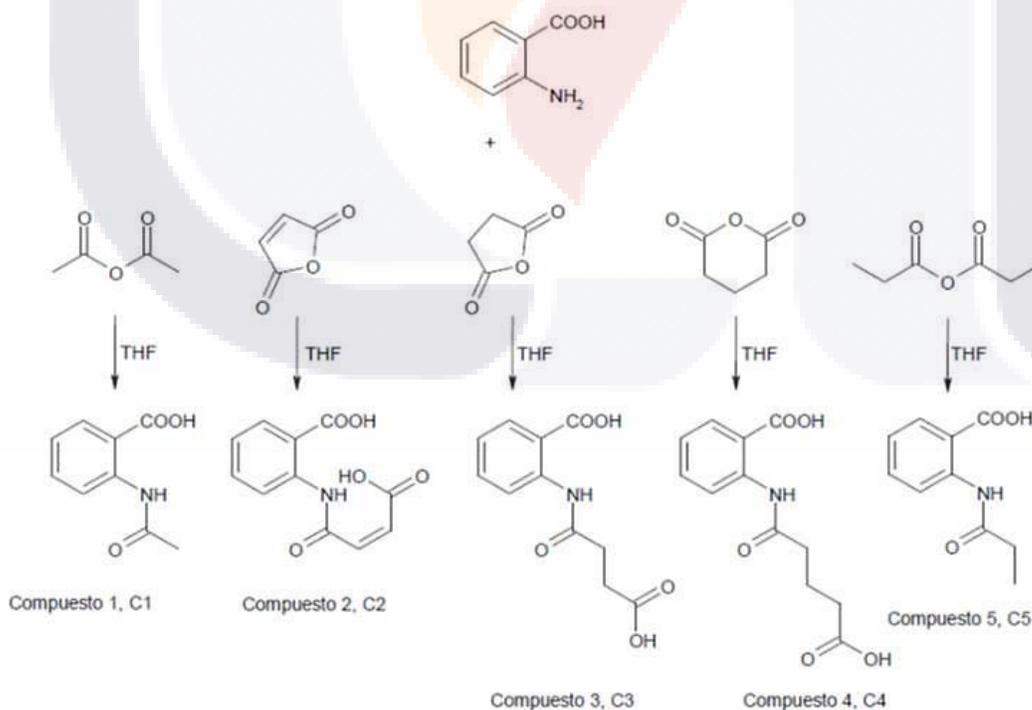


Figura 22. Vía de síntesis de los compuestos C1, C2, C3, C4 y C5 derivados del ácido *o*-aminobenzóico.

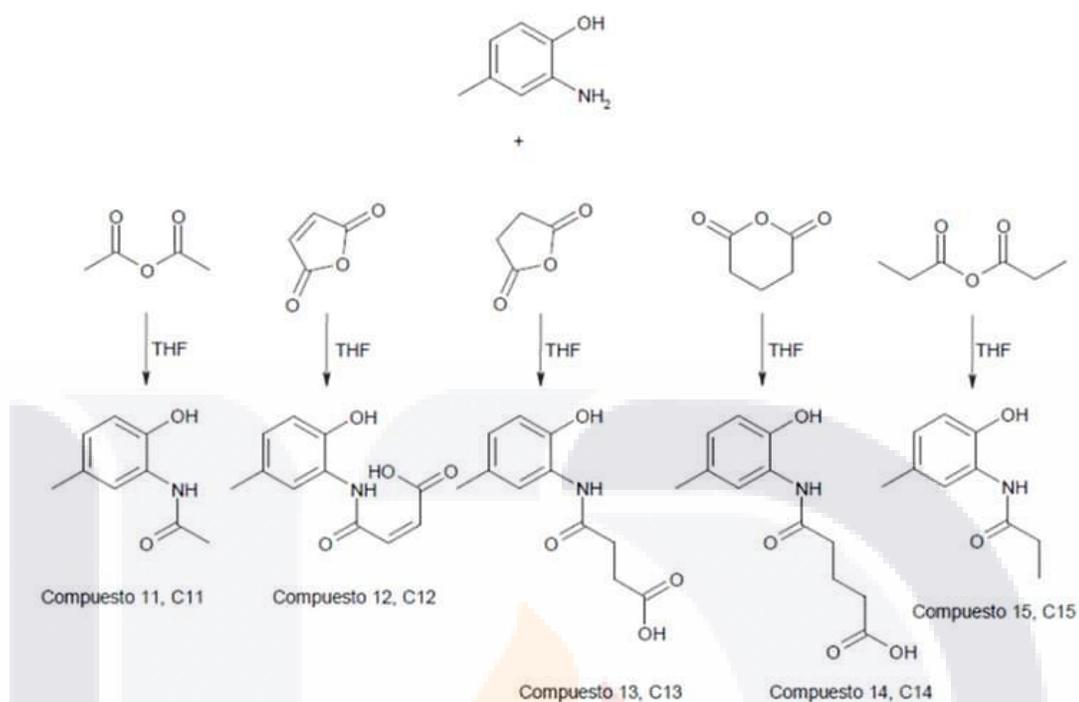


Figura 23. Vía de síntesis de los compuestos C11, C12, C13, C14 y C15 derivados de 2-amino-4-metilfenol.

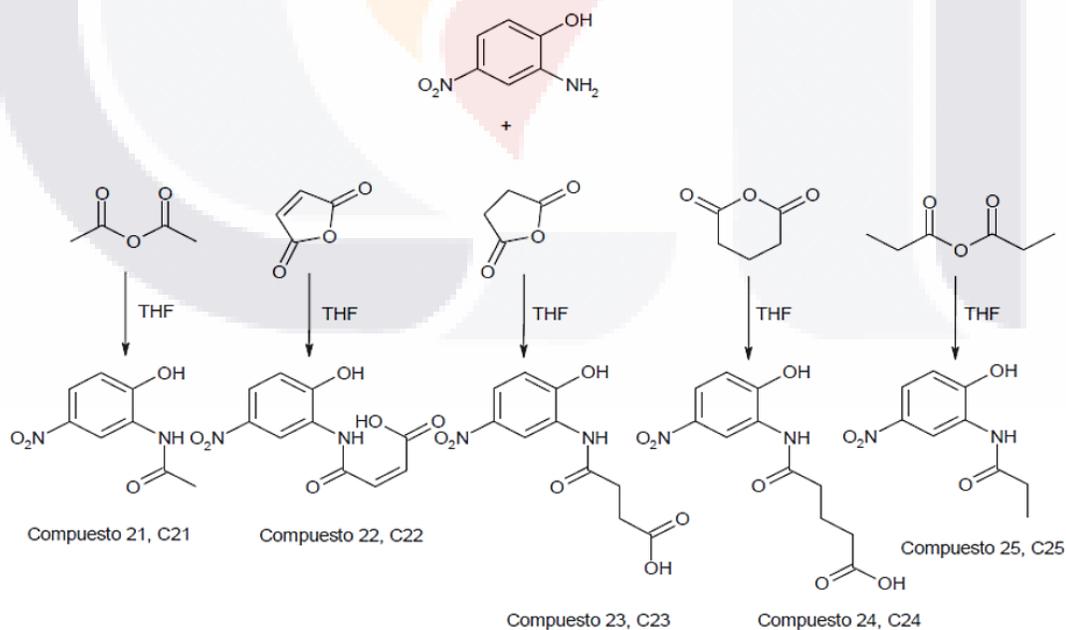


Figura 24. Vía de síntesis de los compuestos C21, C22, C23, C24 y C25 derivados de 2-amino-4-nitrofenol.

### 5.3.2 Síntesis de derivados benzoazepínicos.

La vía de síntesis se muestra en la Fig. 25: methyl 2-aminobenzoate fue tosilado siguiendo el método propuesto por Proctor y Thomson (1957); la mezcla de reacción fue diluida con agua para obtener el compuesto methyl 2-[[4-methyl-phenyl)sulfonyl]amino]benzoate (2) con un rendimiento arriba del 90 %. La introducción del butanonitrilo a la estructura permitió la obtención de: methyl 2-[(3-cyanopropyl)[(4-methylphenyl)sulfonyl]amino]benzoate (3). Finalmente, el uso de *t*-butóxido de potasio nos permitió la ciclación de 3 para obtener: 1-[4-methyl phenyl)sulfonyl]-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepine-4-carbonitrile, C9. (Para detalles, ir a la sección de metodología experimental).

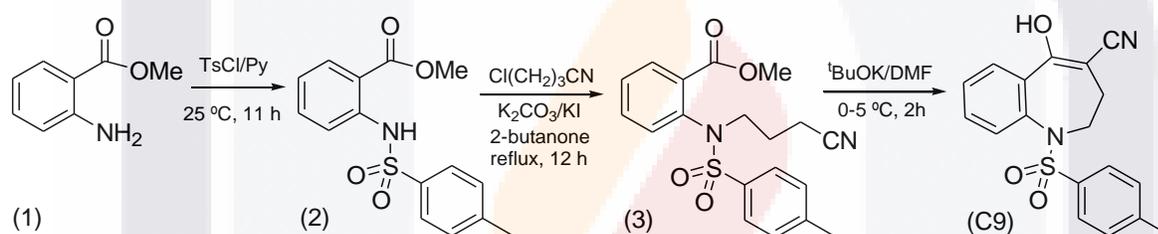


Figura 25. Vía de síntesis de 1-[(4-methyl phenyl)sulfonyl]-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepine-4-carbonitrile, C9.

## 5.4 Pruebas Biológicas

Para la prueba de contractilidad de músculo liso vascular, contamos con la colaboración de los Srs. Esparza-Valenzuela Juan, Martínez-Hernández Jesús y Luévano-Delgadillo Eleazar del Departamento de Mantenimiento de Óptica y Electromecánica de la UAA quienes construyeron el aparato que utilizamos para llevarla a cabo. Para la prueba de antagonismo *in-vivo* de AVP exógena en ratas con carga de agua contamos con la colaboración de LCN María Luisa Rodríguez-Vázquez del Laboratorio de Toxicología y Farmacología de la UAA para la determinación de Sodio en orina.

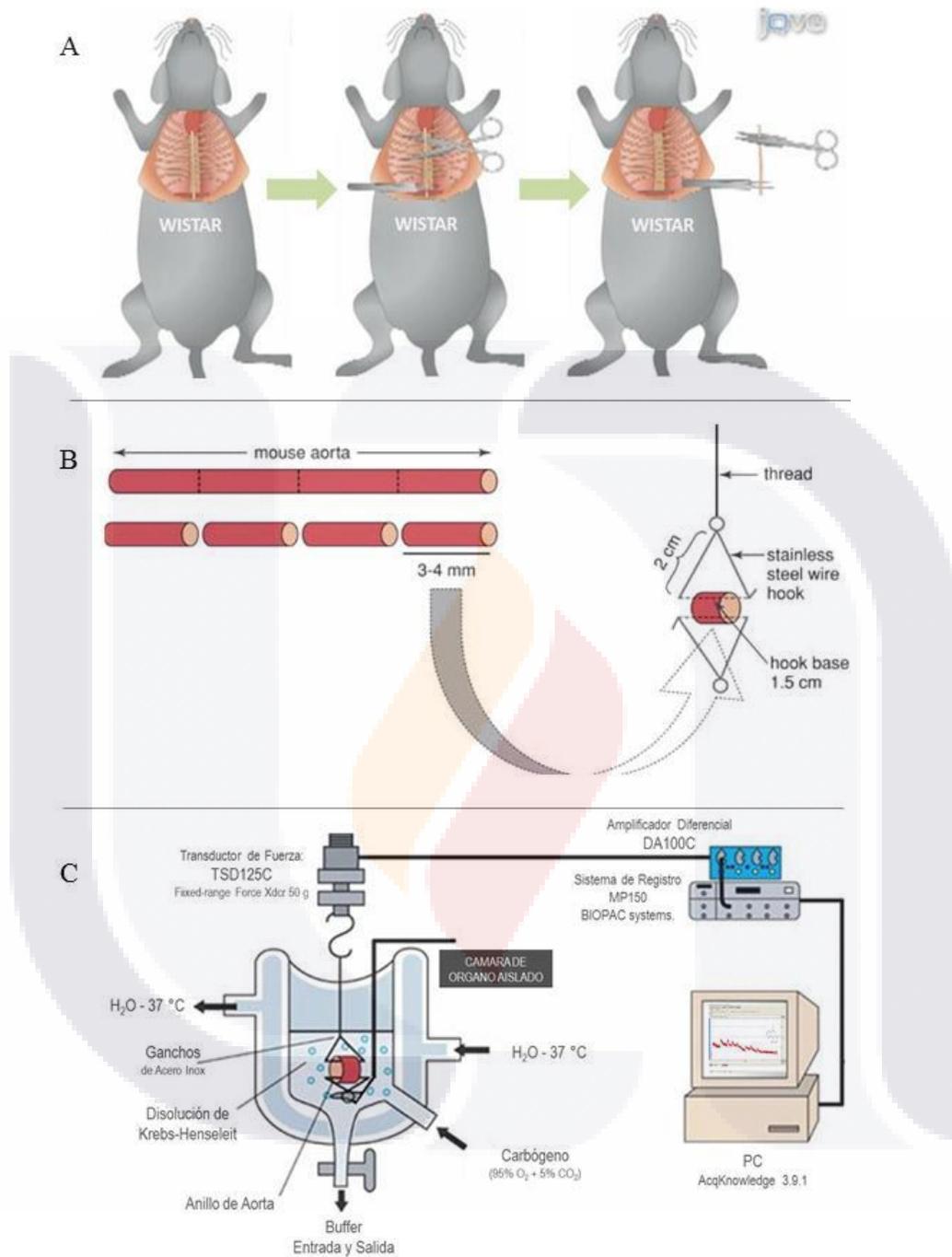
### 5.4.1. Efecto de los Compuestos sobre la Contractilidad del Músculo Liso Vascular (VSM) de rata.

#### *Obtención y acondicionamiento de los anillos de aorta*

Ratas Wistar macho de  $350 \pm 50$  g de p.c. fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/Kg p.c.), para luego ser sometidas a una toracolaparotomía. Luego, la aorta torácica descendente fue removida y colocada en una caja de Petri conteniendo solución de Krebs-Henseleit (KHS: NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, dextrosa 11.7 mM y EDTA 0.026 mM) (Fig. 26A).

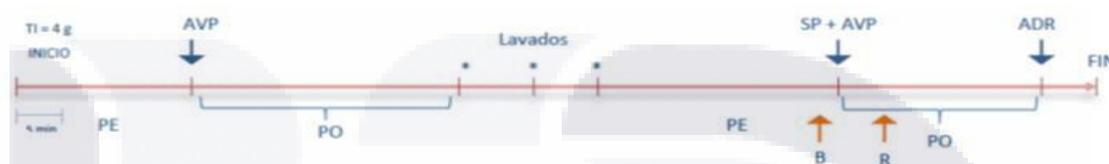
El tejido conectivo, además de la grasa perivascular adherida fueron removidas cuidadosamente y con la ayuda de un bisturí, se cortaron segmentos de 3-4 mm de longitud. El endotelio se removió mecánicamente insertando una varilla rugosa dentro de la luz de los anillos. A fin de medir los cambios de tensión, dos varillas de acero en forma de triángulo fueron cuidadosamente insertadas en la luz del anillo (Fig. 26B), una de ellas se fijó a la base del aparato mientras que la otra fue conectada a un transductor de tensión TSD125C acoplado a un amplificador diferencial DA100C que, a su vez, estaba conectado a un sistema de adquisición de datos, todos de BIOPAC Systems y controlados mediante el programa Acqknowledge 3.8.1.

Los anillos de aorta se colocaron en una cámara de órgano aislado conteniendo 10 mL de KHS a 37 °C y burbujeadada con 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$  (Fig. 26C).



**Figura 26. Obtención y acondicionamiento de los anillos de aorta.** A) Por medio de una toracolaparatomía se obtiene un segmento de aorta torácica descendente (modificada de: 6. <http://www.jove.com/video/1564/aortic-ring-assay> 25 Nov 2011). B) La aorta torácica es cortada en segmentos de 3-4 mm de longitud y luego cuidadosamente insertados en varillas de acero en forma de triángulo (modificada de: <http://media.wiley.com/CurrentProtocols/PH/ph0407/ph0407-fig-0001-1-full.jpg> 25 Nov 2011). C) Los anillos son colocados dentro de una cámara de órgano aislado conteniendo KHS a 37 °C y burbujeada continuamente con una mezcla de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5 %)(modificada de: 8. <http://media.wiley.com/CurrentProtocols/PH/ph0407/ph0407-fig-0001-1-full.jpg> 25 Nov 2011).

Se fijó una tensión inicial de 4 g y se permitió un periodo de estabilización de por lo menos 30 min. Después del periodo de estabilización, los anillos de aorta fueron contraídos con AVP (0.10  $\mu\text{M}$ ) como prueba de viabilidad del tejido. Después de un periodo de observación de 20 min, los anillos fueron lavados 3 veces con KHS, entonces, se dejó transcurrir un nuevo periodo de estabilización antes de probar los compuestos (Fig. 27).



**Figura 27. Protocolo experimental del ensayo en anillos de aorta.** PE: Periodo de Estabilización; PO: Periodo de Observación; TI: Tensión Inicial; B: Registro Basal; R: Registro de Respuesta; AVP: Arginina Vasopresina [0.10  $\mu\text{M}$ ]; SP: Sustancia de prueba (C9 [0.0, 5.9, 59, 590  $\mu\text{M}$ ]; ADR: Adrenalina (10  $\mu\text{M}$ ); V1880: Antagonista Peptídico de los AVPR's (10  $\mu\text{M}$ ).

#### *Influencia del endotelio vascular en la máxima contracción inducida por AVP*

Para evaluar la influencia del endotelio vascular sobre la máxima contracción inducida por AVP, se formaron dos grupos: 1) anillos de aorta con endotelio y 2) anillos de aorta sin endotelio. A fin de discriminar el efecto de AVP sobre los AVPR1A vasculares de los AVPR2 endoteliales, usamos un antagonista peptídico de los AVPR1A: [deamino-Pen<sup>1</sup>, O-Me-Tyr<sup>2</sup>, Arg<sup>8</sup>]-Vasopressin (Sigma, V1880). Después de la prueba de viabilidad y una vez que los anillos fueron lavados, el antagonista fue vertido dentro del baño (10  $\mu\text{M}$ ), seguido de un pulso de AVP (0.10  $\mu\text{M}$ ) y se midió la contracción inducida por AVP. Finalmente, se agregó ADR (0.10  $\mu\text{M}$ ) para verificar la viabilidad del anillo. Aquellos anillos que no respondieron al pulso inicial de AVP o al pulso final de ADR, fueron considerados como no-viables y fueron excluidos del estudio.

Una vez establecido que el endotelio no afecta de manera significativa la contracción inducida por AVP de los anillos de aorta, el efecto biológico de los compuestos fue evaluado (*vide infra*).

*Efecto de las amidas en la contractilidad del VSM*

Doce grupos experimentales fueron formados: 1) KHS (10  $\mu$ L), 2) DMSO, 3-12) grupos C1, C2, C3, C4, C5, C11, C12, C14, C21 y C25 (1 mM). DMSO fue utilizado como vehículo alcanzando una concentración final del 2 % dentro de la cámara). Como se mencionó arriba, después de la prueba de viabilidad del anillo y una vez lavados los anillos, se agregó a la cámara la sustancia de prueba (KHS, DMSO o los Compuestos), seguida de un pulso de AVP (0.10  $\mu$ M), luego se midió la máxima contracción alcanzada. Finalmente se agregó ADR (0.10  $\mu$ M) a la cámara de órgano aislado como prueba de viabilidad. Aquellos anillos que no respondieron al pulso de ADR se consideraron como anillos no viables y fueron descartados del estudio.

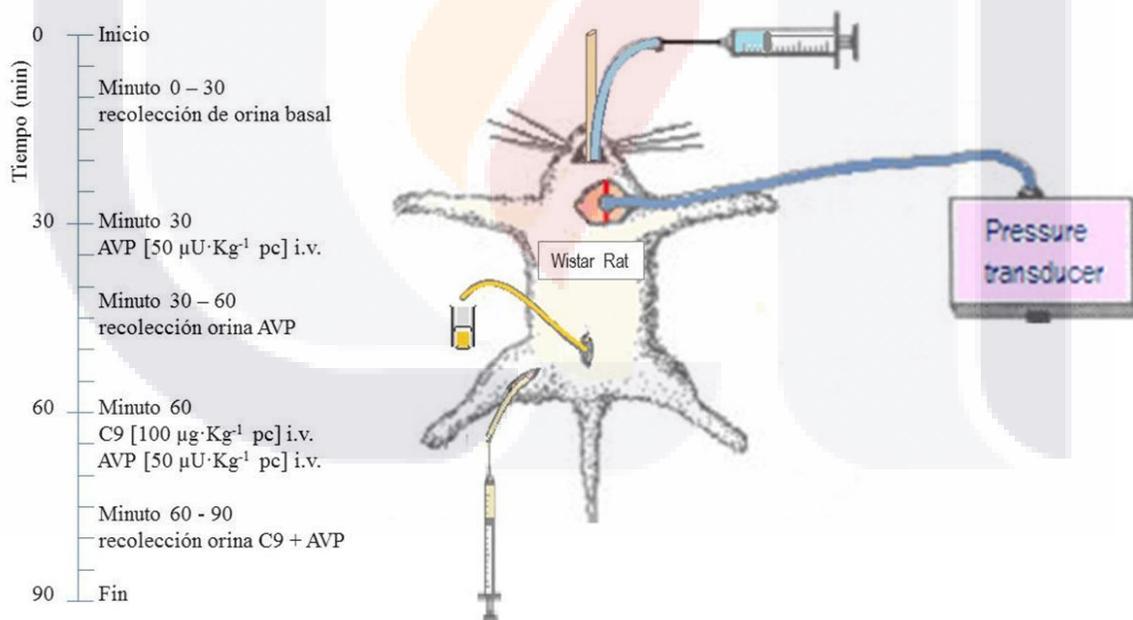
*Efecto del compuesto C9 en la contractilidad del VSM*

Para realizar este estudio, se formaron 5 grupos experimentales: 1) KHS (10  $\mu$ L), 2-5) C9 en concentraciones: 0.0, 5.9, 59 y 590  $\mu$ M, respectivamente, con DMSO como vehículo. Una vez evaluada la viabilidad de los anillos de aorta y ya lavados y estabilizados, se agregó la sustancia de prueba (KHS o C9) seguida de un pulso de AVP (0.10  $\mu$ M). Se midió la máxima contracción alcanzada. Finalmente se agregó ADR (0.10  $\mu$ M) a la cámara de órgano aislado como prueba de viabilidad. Aquellos anillos que no respondieron al pulso de ADR se consideraron como anillos no viables y fueron descartados del estudio.

**5.4.2. Antagonismo in-vivo a AVP exógena, en ratas anestesiadas con una sobrecarga de agua.**

Este método fue originalmente diseñado en 1953 por Dicker y modificado en 1962 por Bisset y Lewis, en 1967 por Clark y Rocha e Silva y en 1992 por Yamamura et al. Con cambios menores, nuestro protocolo fue como sigue: Ratas Wistar de 350 – 400 g de p.c. fueron privadas de alimento 18 h antes de dar inicio al experimento pero con libre acceso al agua. Una hora antes de iniciar la cirugía, los animales fueron sometidos a una carga de

agua (solución salina (SS) hipotónica: 1.67 % glucosa w/v y 0.3 % NaCl w/v; 3 % p.c.) con ayuda de un tubo intra-gástrico. Luego, los animales fueron anestesiados con uretano 20 % (0.7 mL / 100 g p.c.). Una vez anestesiados, se canuló la tráquea para asistir en la respiración del animal, y se insertó un catéter intra-gástrico para la administración constante de SS hipotónica (5 mL/30 min) hasta terminar el experimento. Posteriormente, se canuló la arteria carótida, vena femoral y vejiga para monitorear la presión sanguínea durante el experimento, la administración i.v. del compuesto y la recolección de muestras de orina, respectivamente. Una vez estabilizado el flujo de orina, se inicia la toma de muestras basales durante 30 min, luego se administró AVP ( $50 \mu\text{U kg}^{-1}$ ) y se recolectó la orina de otros 30 minutos, pasado este tiempo, se administró C9 ( $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) vía i.v., seguido de AVP ( $50 \mu\text{U kg}^{-1}$ ) y se recolectaron muestras de orina por 30 min mas (Fig 28). A cada muestra se le tomó su densidad con el método de tiras reactivas; relacionando peso y densidad se obtuvo el volumen. Finalmente se determinó concentración de Sodio en cada muestra con un fotómetro de flama (Corning 410).



**Figura 28. Protocolo experimental del ensayo de antagonismo *in-vivo* a AVP exógena, en ratas con sobrecarga de agua.** Una vez estable el flujo de orina, se dio inicio a la toma de muestras (tiempo 0 min). Las muestras se tomaron cada 5 min hasta terminar el experimento.

### **5.4.3. Efecto de los compuestos sobre la presión sanguínea.**

Para llevar a cabo esta prueba, se utilizaron ratas Wistar macho de  $300 \pm 50$  g de p.c. Después de anestesiarse los animales (ureano 20 %; 0.7 mL/100 g pc / IP), se canuló la tráquea para ventilación y se cateterizó el tercio distal de la arteria carótida y la vena femoral para el registro de la presión sanguínea y la administración I.V. de los compuestos.

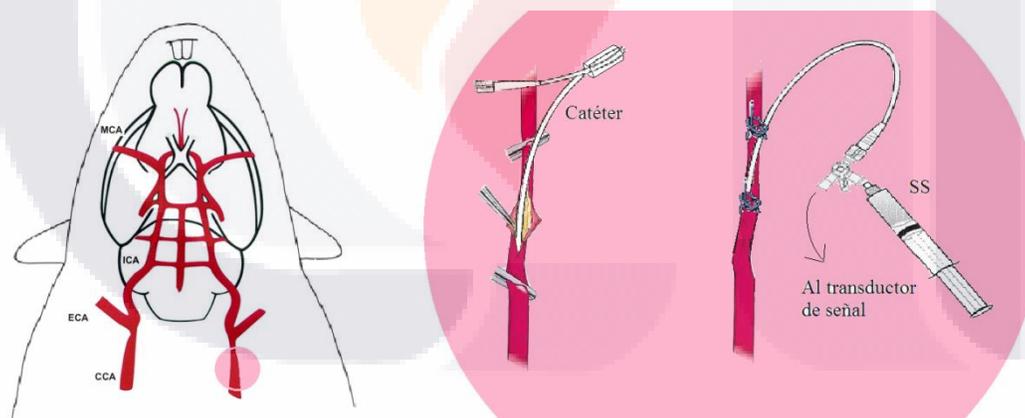
#### ***Canulación de la arteria carótida***

Una vez anestesiados los animales, se les rasuró la cara ventral del cuello y la cara interna de ambos muslos. Se colocaron las ligaduras en las patas y se pasaron los incisivos superiores por debajo de la horquilla para fijar al animal en decúbito dorsal sobre la mesa de operaciones. Se canuló la tráquea a través del hocico, se hizo una incisión en la línea media de la piel del cuello de aprox. 3 cm hasta el manubrio del esternón. Se cortó por el centro y longitudinalmente el tejido conectivo que une a las glándulas salivales submandibulares para dejar al descubierto los músculos pretraqueales, los cuales también se separaron longitudinalmente para dejar al descubierto la tráquea.

*(Las siguientes maniobras se realizaron bajo un microscopio estereoscópico)*

Con dos separadores de liga, se rechazaron hacia la izquierda del animal la piel y los músculos pretraqueales. En el fondo, por el latido se identificó a la arteria carótida primitiva. Con dos disectores de vidrio, se separó al nervio vago de la carótida en una longitud de 1.5-2 cm. Con una pinza fina curva, se pasó un hilo (3 cm) por debajo de la arteria el cual fue deslizado hacia la parte superior de la arteria y se anudó. Con una pinza hemostática, se tomaron los cabos del hilo y una parte de la piel y se cerró la pinza, la cual se dejó sobre el costado de la herida; el objetivo de esta maniobra es mantener un poco de tracción sobre la arteria ocluida y aislarla de los tejidos. Se pasó otro hilo por debajo de la arteria y se preparó medio nudo sin apretar, se desplazó el hilo hacia el nacimiento de la arteria. Con otra pinza hemostática se pinzaron los cabos del hilo y la piel y se dejaron sobre el borde de la herida para hacer un poco de tracción sobre la arteria. Con esta maniobra el flujo sanguíneo quedó suprimido entre ambos nudos. Se pasó otro hilo por debajo de la arteria y se hizo otro medio nudo sin apretar que se deslizó hacia el nacimiento de la arteria.

Antes de hacer la incisión de la carótida, se preparó el catéter arterial, asegurándonos que estuviera purgado con solución salina heparinizada (SSH) y se cerró con el candado. Se localizó el tercio distal de la carótida y con las tijeras vannas, se hizo una pequeña incisión en la pared de la arteria. Con la mano izquierda se introdujo el disector de vidrio en dirección del corazón, y con cuidado se dilató la arteria. Con la pinza curva fina en la mano derecha, se tomó el catéter a unos 4-5 mm de la punta y ayudándonos con el disector de vidrio, se introdujo en la arteria. Para evitar el daño al endotelio y perforar la arteria, se tuvo cuidado de no llegar hasta el nudo inferior donde se encontraba el hilo que hizo tracción sobre la arteria. Con la pinza fina recta en la mano izquierda, se sujetó la arteria con el catéter adentro, con la mano derecha se soltó la pinza de la ligadura inferior y se procedió a introducir el catéter unos 2 -2.5 cm. Se tomaron los cabos del medio nudo y se apretaron para completar el nudo y así fijar el catéter a la arteria. Se tomaron los cabos del otro medio nudo y completó el nudo, de esta manera, el catéter quedó fijo en la arteria lo cual evitará la expulsión del catéter por empuje de la presión arterial. Se soltó la pinza que sostenía el tercio distal de la arteria y se cortó el hilo sobrante de los cabos de hilo de las ligaduras (Fig. 29)

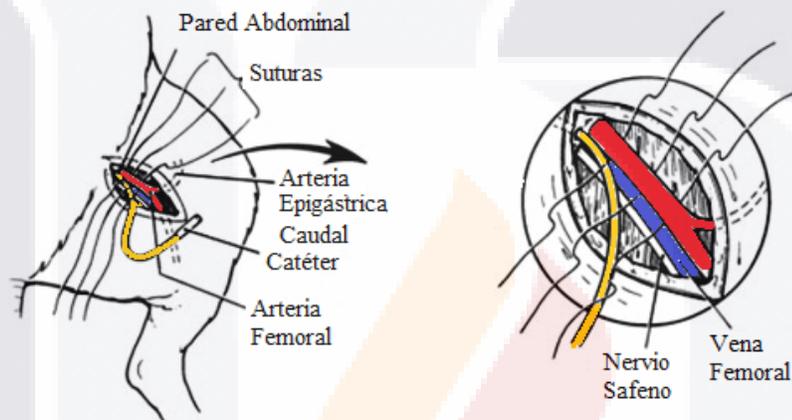


**Figura 29. Canulación de la arteria carótida.** Representación esquemática de un catéter colocado dentro de la arteria carótida. ECA: arteria carótida externa, ICA: Arteria carótida interna, CCA: arteria carótida común, MCA: arteria cerebral media, SS: solución salina.

Para evitar la tracción accidental del catéter, con la aguja de sutura se hizo una ligadura subcutánea en la parte superior de la piel de la herida, se anudó y fije el catéter con otro nudo. Finalmente la herida fue suturada.

### ***Canulación de la vena circunfleja (femoral)***

Con el bisturí se hizo una incisión longitudinal sobre la piel de la cara interna del muslo siguiendo la trayectoria del borde posterior del bazo interno del músculo cuádriceps, de esta forma se pudo observar la trayectoria de la vena circunfleja por debajo de la aponeurosis que recubre a los músculos. Sin tocar la vena, se cortó la aponeurosis que la recubre y se insertó un *punzocat* del número 25 en dirección del corazón. Se purgó con SSH, se fijó con una ligadura sobre la piel y se cerró la herida (Fig. 30)



**Figura 30. Canulación de la vena femoral.** Representación esquemática de un catéter colocado dentro de la vena femoral.

Finalmente, se conectó el catéter arterial al transductor de presión del sistema Biopac para el registro de la presión arterial.

Se evaluó el efecto de 0.1 IU de AVP seguida de 100  $\mu\text{g}$  / kg de p.c. de cada compuesto, con  $n = 8$  ratas..

### **5.5 Análisis Estadístico**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM. Los análisis de varianza (ANOVA) se realizaron con el programa INSTAT 2. Valores  $p < 0.05$  se consideraron como significativas. Las gráficas se realizaron con el programa PRISM 5.0

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Análisis Cuantitativo de Relación Estructura-Actividad (QSAR).

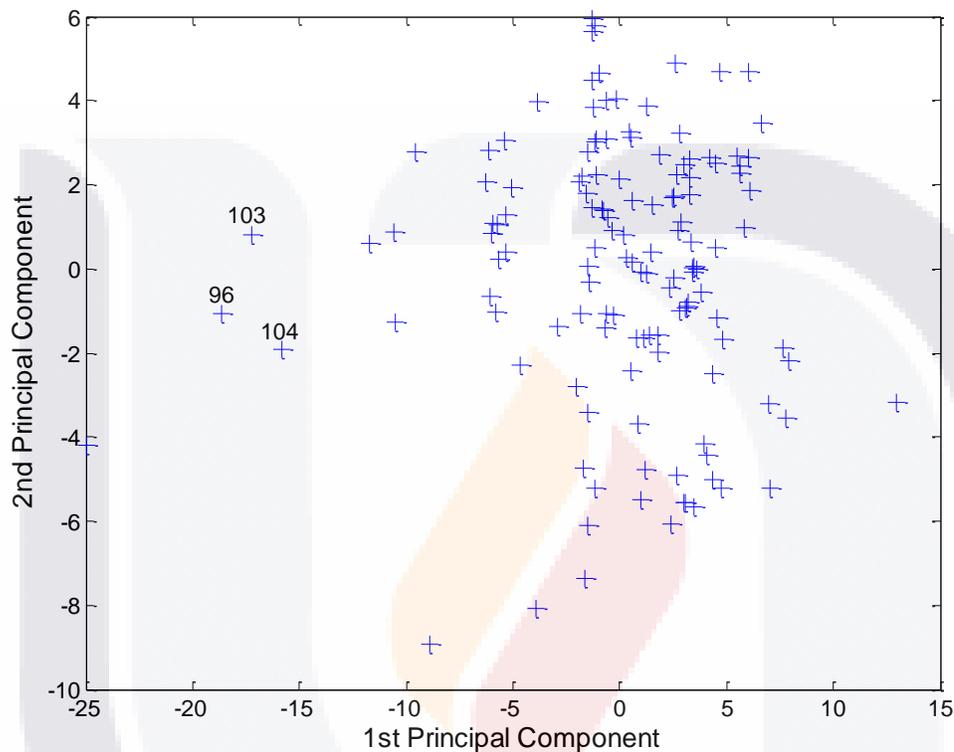
Como se mencionó en la sección anterior, un total de 1481 descriptores moleculares además de otros 15 descriptores químico-cuánticos fueron calculados. Estos descriptores fueron clasificados en 17 grupos diferentes (G1-G17), de acuerdo a su tipo (Tabla 18), finalmente, se llevó a cabo un análisis MLR de forma individual en cada uno de los grupos.

**Tabla 18. Grupos of descriptores y número de descriptores de cada grupo seleccionados por los análisis MLR.**

Grupo	Tipo de descriptor	Número de descriptores calculados por Dragón	Número de descriptores seleccionados por MLR
G1	Constitutional	31	3
G2	Topological	92	7
G3	Molecular walk counts	7	4
G4	BCUT	43	6
G5	Galvez topological	13	5
G6	2D autocorrelations	69	6
G7	Charge	5	1
G8	Aromaticity indices	2	1
G9	Randic molecular profiles	3	2
G10	Geometrical	27	3
G11	RDF	81	4
G12	3D-MoRSE	95	7
G13	WHIM	44	7
G14	GETAWAY	115	7
G15	Functional groups	29	6
G16	Atom-centred	40	9
G17	Quantum and Chemical	15	5

Los descriptores seleccionados de estos 17 análisis MLR fueron reunidos en un solo grupo a fin de realizar un análisis de componentes principales (PCA) para dividir los datos en los conjuntos de preparación (80 %) y prueba (20 %).

La Fig. 31 muestra el gráfico de los primeros y segundos componentes principales (PC) para la matriz de descriptores seleccionados (de los 17 análisis MLR) y de los 134 compuestos. En la gráfica se puede ver que a los compuestos 96, 103 y 104 como aberrantes por lo que fueron excluidos de los siguientes análisis.



**Figura 31. Gráfico de primeros y segundos componentes principales.**

En consecuencia, los 131 compuestos restantes fueron divididos en dos conjuntos: de preparación (104) y prueba externa (27); así, el siguiente análisis MLR se llevó a cabo en el conjunto de compuestos de preparación, y como resultado de éste, tres diferentes modelos fueron sugeridos. La ecuación de regresión para el mejor modelo se muestra a continuación (para explicación de los descriptores ver tabla 19):

$$\begin{aligned}
 \text{pKi} = & -39.285 (\pm 12.588) - 5.936 (\pm 1.471) \text{MATS7e} + 0.476 (\pm 0.093) \text{RDF010e} \\
 & + 51.400 (\pm 16.890) \text{G2e} + 0.829 (\pm 0.209) \text{n=CHR} + 1.096 (\pm 0.356) \text{Mor32u} \\
 & + 9.066 (\pm 3.252) \text{BEHp2} - 0.050 (\pm 0.018) \text{electroph} + 39.363 (\pm 7.753) \text{R6p+} \\
 & - 4.322 (\pm 1.533) \text{MWC08} + 0.114 (\pm 0.094) \text{RGyr} + 3.817 (\pm 1.471) \text{Rtu+} \\
 & + 0.162 (\pm 0.112) \text{MMWC05}
 \end{aligned}$$

**Tabla 19. Tipo descriptores que explican la ecuación de regresión del conjunto de compuestos de preparación.**

Descriptor	Explicación	Tipo/Grupo
MWC08	molecular walk count of order 08	molecular walk counts
MMWC05	molecular walk count of order 05	molecular walk counts
RGyr	radius of gyration (mass weighted)	Geometrical descriptors
Rtu+	R maximal index / unweighted	GETAWAY descriptrs
MATS7e	Moran autocorrelation – lag 7 / weighted by atomic Sanderson electronegativities	2D autocorrelations
electroph	Electrophilicity	quantum and chemical descriptors
BEHp2	highets eigenvalue n.2 of Burden matrix / weighted by atomic polarizabilities	BCUT descriptors
G2e	2st component symmetry directional WHIM index / weighted by atomic Sanderson electronegativities	WHIM descriptors
n=CHR	number of secondary C(sp2)	Functional groups
Mor32u	3D-MoRSE - signal 32 / unweighted	3D-MoRSE descriptors
RDF010e	Radial Distribution Function -1.0 / weighted by atomic Sanderson electronegativities	RDF descriptors

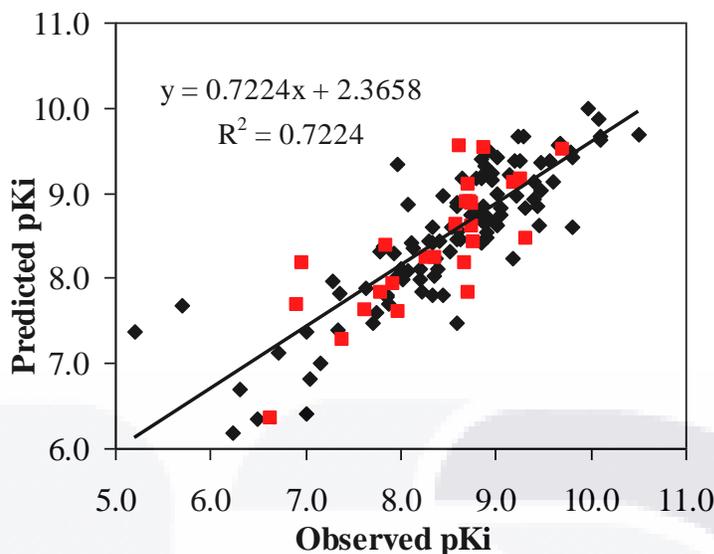
Los coeficientes de determinación y parámetros de validación cruzada se muestran en la tabla 20:

**Tabla 20. Coeficientes de determinación y parámetros de validación cruzada.**

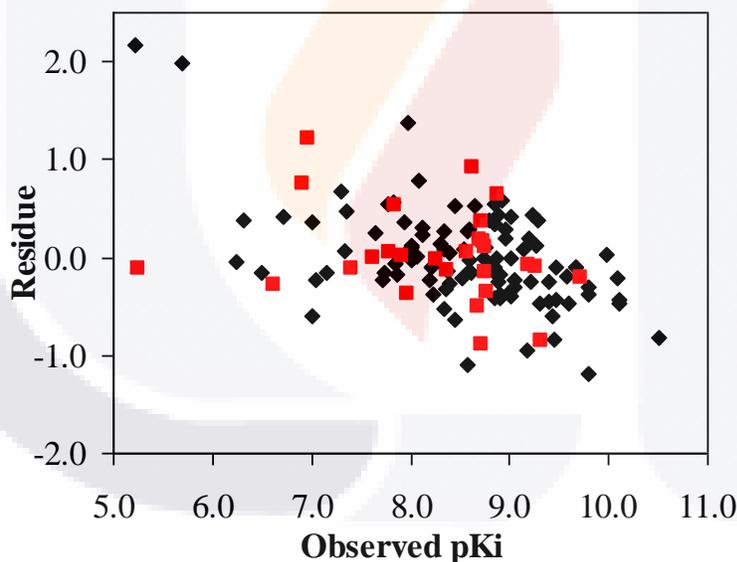
Model	R <sup>2</sup> <sup>C</sup>	R <sup>2</sup> <sup>P</sup>	PRESS <sup>C</sup>	R <sup>2</sup> <sub>CV</sub> <sup>C</sup>	RMSE <sup>C</sup>	PRESS <sup>P</sup>	RMSE <sup>P</sup>
No outliers removed	0.722	0.770	25.761	0.616	0.498	6.022	0.472
Outliers removed	0.773	– <sup>b</sup>	17.104	0.737	0.410	– <sup>b</sup>	– <sup>b</sup>

<sup>C</sup> y <sup>P</sup> indican los conjuntos de calibración (preparación) y prueba (predicción), respectivamente.

<sup>b</sup> sin cambio respect del conjunto de parámetros de prueba.



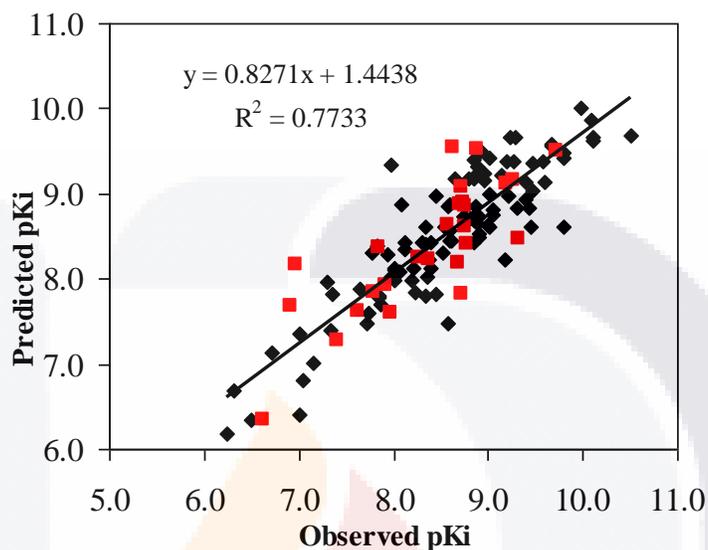
**Figura 32. Valores de pKi predichos versus observados.** Los diamantes negros y los círculos rojos indican la clasificación de compuestos con conjuntos de preparación y prueba respectivamente.



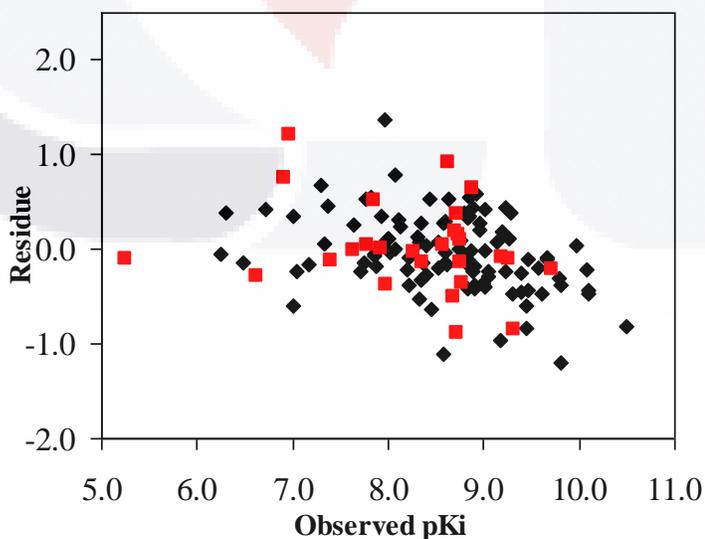
**Figura 33. Residuos versus valores de pKi observados.** Los diamantes negros y los círculos rojos indican la clasificación de los conjuntos de preparación y prueba respectivamente.

En la Fig. 33 se observan dos compuestos con valores atípicos, cuyos residuos resultaron 2 veces más grandes que la desviación estándar de los datos observados. Eliminando los valores atípicos se mejoran los parámetros de validación cruzada para el conjunto de preparación al incrementar los coeficientes de determinación de calibración y validación cruzada ( $R^{2C} = 0.773$  y  $R^{2_{CV}C} = 0.737$ ) y al reducir la  $RMSE^C$  a 0.410.

Las Figs. 34 y 35 muestran los valores de pKi predichos versus los observados y sus residuos, después de eliminar los valores atípicos.



**Figura 34. Valores de pKi predichos versus observados después de remover los datos atípicos.** Los diamantes negros y los círculos rojos indican la clasificación de los compuestos con conjuntos de preparación y prueba, respectivamente.



**Figura 35. Residuos versus valores de pKi observados después de remover los datos atípicos.** Los diamantes negros y los círculos rojos indican la clasificación de los compuestos como conjuntos de preparación y prueba, respectivamente.

## 6.2 Acoplamiento Molecular (docking)

El estudio de docking se llevó a cabo con el conjunto de 134 moléculas previamente reportadas y los receptores a vasopresina V1a y V2 proporcionados con fines de colaboración por la Dra. Magdalena Sluzars. Este estudio nos permitió determinar la energía libre de unión de todos los compuestos, lamentablemente éstos valores resultaron muy por encima de lo esperado, en la sección de discusión se abordan posibles causas.

Sin embargo, nos fue posible identificar los aminoácidos clave en los AVPRs que interaccionan con este grupo de compuestos.

Para el AVPR1A: F207, R214, V217 y W211; para el AVPR2: Q180, I209, Y124, M123 y F287, interacciones del tipo  $\pi$ - $\pi$ ,  $\pi$ -catión y puentes de hidrógeno, principalmente.

## 6.3 Síntesis Química.

El avance y fin de la reacción se determinó mediante cromatografía en capa fina (TLC). Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Electrothermal 9300 y no están corregidos. Una vez obtenidos los compuestos, se realizaron pruebas de identificación por NMR e IR para cada uno de ellos. Para la identificación por NMR se utilizó  $\text{DMSO}_{\delta-6}$  como solvente, la asignación de las señales, constante de acoplamiento (J) y desplazamiento ( $\delta$ ) fueron calculadas.

### 6.3.1 Síntesis de Compuestos Derivados de Anilinas mono-Sustituidas y di-Sustituidas.

La vía de síntesis empleada contempla una sola etapa en el desarrollo de la reacción, tal y como se detalla en la sección anterior. La obtención de los compuestos fue producto de la reacción entre una arilamina (ácido o-aminobenzóico, 2-amino-4-metilfenol y 2-amino-4-nitrofenol) y un anhídrido (acético, maléico, succínico, glutárico o propiónico) de manera equimolar. Ver detalles en la sección “Metodología Experimental”.

La tabla 21 muestra los puntos de fusión (pf) experimentales *versus* reportados y el rendimiento general de la reacción:

**Tabla 21. Punto de fusión y rendimiento de cada uno de las arilamidas sintetizadas.**

COMPUESTO	pf <sub>experimental</sub> (°C)	pf <sub>reportado</sub> (°C)	RENDIMIENTO (%)
Acido <i>o</i> -aminobenzóico	-	144-146	-
2-amino-4-metilfenol	-	135-137	-
2-amino-4-nitrofenol	-	143	-
COMPUESTO 1	172-176	170-175 <sup>a</sup>	80.4
COMPUESTO 2	193-197	205 <sup>b</sup>	90.2
COMPUESTO 3	185-189	184 <sup>c</sup>	90.1
COMPUESTO 4	140-144	130 <sup>d</sup>	90.9
COMPUESTO 5	108-112	103.5-104 <sup>e</sup>	83.4
COMPUESTO 11	154-157	156-157 <sup>f</sup>	69.3
COMPUESTO 12	184-188	-	96.5
COMPUESTO 13	171-173	-	94.8
COMPUESTO 14	145-149	-	92.1
COMPUESTO 15	83-86	-	94.2
COMPUESTO 21	285-289	282.4-284.1 <sup>g</sup>	88.4
COMPUESTO 25	245-248	-	86.3

pf: Punto de fusión.

(a) Magidson, O. Yu.; Zhurnal Obshechi Khimii 1937, V7, P842-52; (b) Grammaticakis, Panos; Compt. rend. 1961, V252, P556-8; (c) Ludwig, Alexandru; Bul. Chim. Soc. Romane Chim.1938, V39, P41-63; (d) Moehrle, Hans; Archiv der Pharmazie (Weinheim, Germany) 1981, V 314(6), P524-31; (e) Maitte, P.Colloq. intern. Centre natl. recherche sci. (Paris) 1955, V 64, P197-204. (f) Li, Ke-Lai; Journal of Organic Chemistry 2009, V74(9), P3286-3292. (g) Li, Ke-Lai; Journal of Organic Chemistry 2009, V74(9), P3286-3292. (-) No disponible.

La tabla 22 muestra las propiedades solubles de cada uno de los compuestos sintetizados.

**Tabla 22. Resultados obtenidos en las pruebas de solubilidad de cada uno de los compuestos, donde (-) representa un carácter insoluble y (+) soluble.**

DISOLVENTE	C1	C2	C3	C4	C5	C11	C12	C13	C14	C15	C21	C25
Agua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcohol Etílico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcohol n-Butílico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcohol Isopropílico	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dimetil Sulfoxido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetona	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido Fórmico	+	+	-	+	+	ND						
Acetato de Etilo	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Acetonitrilo	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Cloroformo	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Diclorometano	-	-	-	-	+	ND						
Hexano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benceno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tolueno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(ND): No determinado.

### 6.3.2 Derivados benzoacepínicos

Para la obtención del compuesto C9, se siguió la vía de síntesis previamente reportada por Tsunoda y cols. (2004) con cambios menores, como sigue: se disolvió metil 2-aminobenzoato en cloruro de *p*-toluensulfonilo (TsCl) en piridina. La mezcla de disolución se mantuvo en agitación constante a 25 °C por 11 h; para detener la reacción, se agregó agua a 5 °C y se agitó por 1 h más. Finalmente, la mezcla de reacción se mantuvo a 5 °C para promover la formación de cristales de methyl 2-[(4-metilfenil)sulfonylamino]benzoato. Luego de separar los cristales por filtración y una vez secos, se mezclaron con carbonato de potasio y yoduro de potasio en 2-butanona. La reacción se mantuvo a reflujo por 12 h. Para detener la reacción, se agregó agua a 5 °C para favorecer la formación de cristales de metil 2-[(3-cianopropil)[(4-metilfenil)sulfonylamino]benzoato. Luego, estos cristales fueron disueltos en DMF y *t*-BuOK para promover la formación del anillo benzoacepínico. Se agregaron gotas de HCl para favorecer la precipitación de C9 crudo, el cual se lavó en metanol para finalmente obtener 1-[(4-metilfenil)sulfonyl]-5-oxo-2,3,4,5-tetrahidro-1*H*-1-benzazepina-4-carbonitrilo (C9), como un polvo blanco.

Tanto el compuesto C9 como los intermediarios fueron identificados por punto de fusión, espectro IR y NMR de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C con tetrametilsilano como referencia interna.

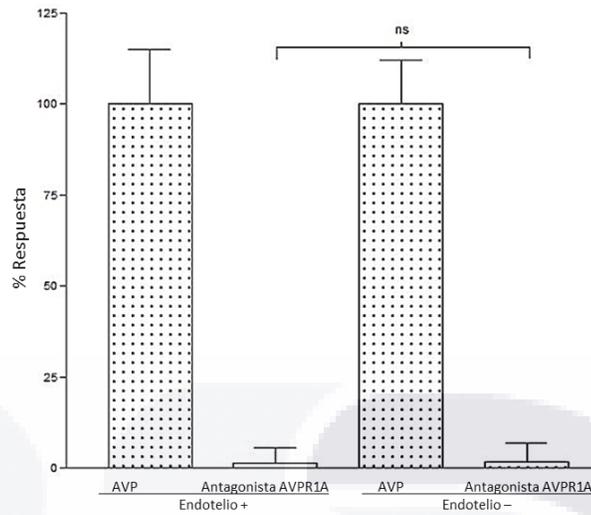
Luego de haber obtenido los compuestos, se evaluaron sus propiedades bloqueadoras a AVP mediante algunos ensayos biológicos (*vide infra*).

## 6.4 Pruebas Biológicas

### 6.4.1. Efecto de los Compuestos sobre la Contractilidad del VSM de rata.

#### *Influencia del endotelio vascular sobre la máxima contracción inducida por AVP*

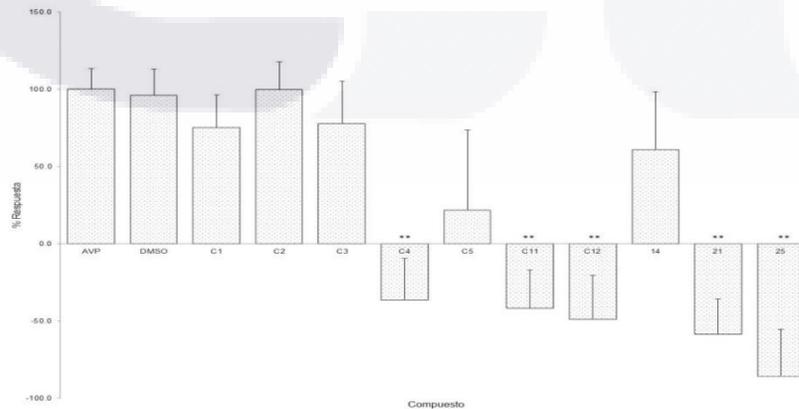
La contracción de anillos de aorta – con y sin endotelio – inducida por AVP (0.1 μM) fue bloqueada completamente por el antagonista a los AVPR1A [deamino-Pen1, O-Me-Tyr2, Arg8]-Vasopressin, sugiriendo que el endotelio vascular no afecta el efecto vasopresor de AVP (Fig. 36).



**Figura 36. Efecto del endotelio vascular sobre la contracción de anillos de aorta inducida por AVP.** Las diferencias no significativas (ns,  $p > 0.05$ ) ocurrieron al comparar los grupos con endotelio *versus* los grupos sin endotelio. Los valores están dados como la media  $\pm$  SEM de 6 experimentos independientes.

*Efecto de las amidas sobre la contractilidad del VSM*

Vasopresina (0.1  $\mu$ M) indujo la contracción de los anillos de aorta, efecto que no fue afectado por el DMSO (disolvente). Los compuestos C1, C3, C5 y C14 mostraron una ligera inhibición del efecto vasopresor, que estadísticamente, resultó no significativa; por su parte, los compuestos C4, C11, C12, C21 y C25 provocaron una distensión en los anillos al momento de ser agregado el compuesto a la cámara de órgano aislado, efecto que no fue contrarrestado por la vasopresina (Fig. 37).

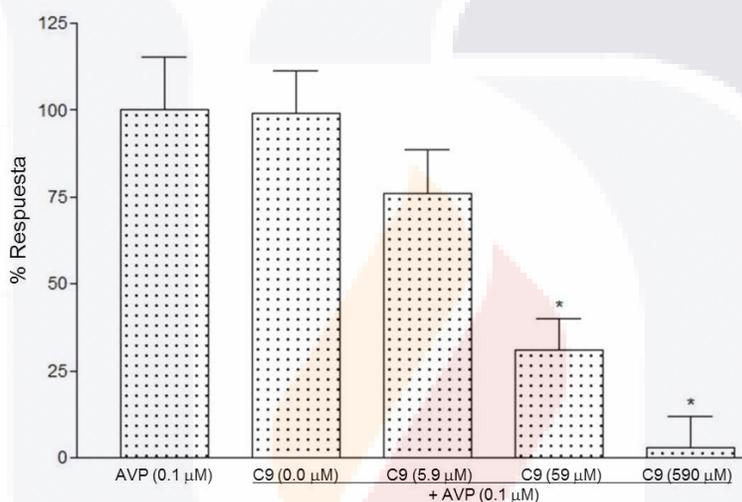


**Figura 37. Efecto de las amidas en la contracción del VSM inducida por AVP.** AVP: 0.1  $\mu$ M (disolvente: agua dest), compuestos: 1 mM (disolvente: DMSO).  $p < 0.01$  en los grupos C4, C11, C12, C21 y C25.

*Efecto del compuesto C9 en la contractilidad del VSM*

Vasopresina (0.1  $\mu\text{M}$ ) indujo la contracción de los anillos de aorta, este efecto fue inhibido por el compuesto C9 en una forma dosis-dependiente. Una dosis de 590  $\mu\text{M}$  de C9 inhibió al 100 % la actividad vasopresora de AVP, mientras que la dosis de 59  $\mu\text{M}$  la inhibió solo al 70 %. La dosis de 5.9  $\mu\text{M}$  bloqueó el efecto vasopresor en un 25% (no significativo *versus* AVP). Finalmente, el DMSO (vehículo), no mostró ningún efecto sobre la contracción del VSM inducido por AVP (Fig. 38).

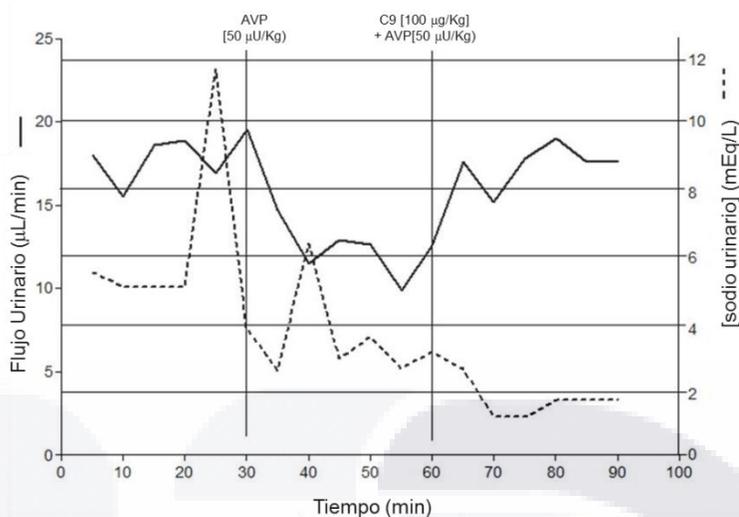
RESULTADOS



**Figura 38. Efecto bloqueador del compuesto C9 en la contracción del VSM inducida por AVP.** Note el antagonismo del tipo dosis-dependiente.  $p < 0.01$  en los grupos: 59  $\mu\text{M}$  y 590  $\mu\text{M}$  *versus* grupo AVP; (disolvente para C9: DMSO, disolvente para AVP: agua destilada).

**6.4.2. Antagonismo in-vivo a AVP exógena, en ratas con una sobrecarga de agua.**

La administración IV de AVP (50  $\mu\text{U}/\text{kg}$ ) en ratas con una carga de agua y anestesiadas, indujo una disminución en el flujo urinario. Después de la administración IV de C9 (100  $\mu\text{U}/\text{kg}$ ), la actividad antidiurética de AVP exógena fue inhibida (Fig. 39).

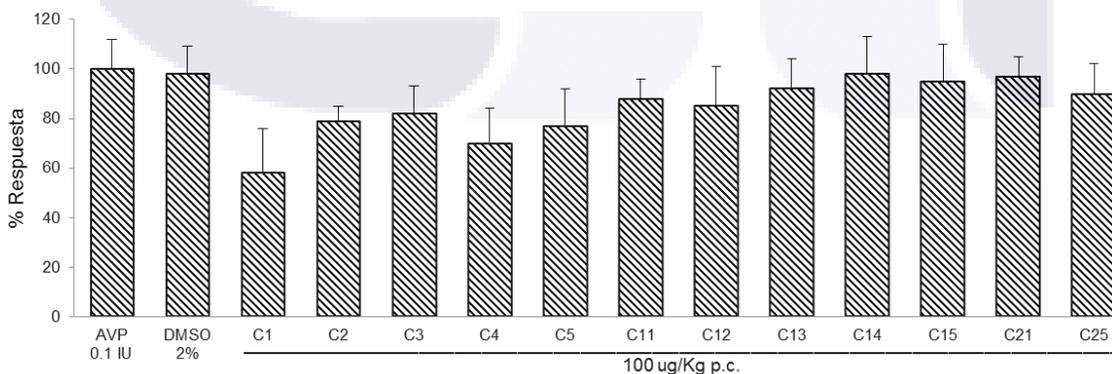


**Figura 39. Efecto del compuesto C9 sobre el flujo urinario en ratas con carga de agua y anestesiadas.** AVP ( $50 \mu\text{Ukg}^{-1}$ ) y C9 ( $100 \mu\text{gKg}^{-1}$ ) fueron administrados vía IV. Un trazo típico de 6 experimentos se muestra (vehículo AVP: agua destilada, vehículo amidas).

#### 6.4.3. Efecto de los compuestos sobre la presión sanguínea.

Los compuestos sintetizados fueron evaluados en un modelo *in vivo* de presión arterial en rata. De los compuestos evaluados, aunque algunos muestran una tendencia a bloquear el efecto presor de AVP, ninguno fue estadísticamente significativo.

El compuesto C9 no fue posible evaluarlo; por su naturaleza altamente lipofílica nos fue imposible solubilizarlo en un medio acuoso. El DMSO 100% disolvió el catéter por el cual se pretendía administrar el compuesto.



**Figura 40. Papel de las arilamidas en la presión sanguínea en rata.** Note que aunque algunos compuestos tienden a bloquear el efecto vasopresor de AVP, ninguno de ellos resulta estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ).



## 7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### *Ácido 2-acetilamino-benzóico, (C1).*

El ácido antranílico (2 g, 15 mmol) se hizo reaccionar con anhídrido acético (1.49 g, 15 mmol) en THF (20 mL) durante 2 h, a temperatura ambiente y agitación constante. El compuesto obtenido se purificó en etanol y carbón activado; se eliminó el solvente y se secó al vacío para obtener C1 (rendimiento 80.4 %) como un sólido amorfo de color beige, pf:  $174 \pm 2$  °C. NMR de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz);  $\delta$ /ppm 2.11 (3H, s, H-2), 7.10 (1H, t,  $J = 7.63$  Hz, H-5'), 7.54 (1H, t,  $J = 7.92$  Hz, H-4'), 7.95 (1H, d,  $J = 7.63$  Hz, H-6'), 8.45 (1H, d,  $J = 8.22$  Hz, H-3'), 11.14 (1H, s, -NH) (Fig. 38); NMR de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.4 MHz)  $\delta$ /ppm 25.67 (C-2), 117.27 (C-2'), 120.49 (C-3'), 123.14 (C-5'), 131.73 (C-6'), 134.54 (C-4'), 141.56 (C-1'), 169.12 (C-1), 170.236 (-COOH) (Anexo 1).

### *Ácido 2-(3-carboxi-acriloilamino)-benzóico, (C2).*

Ácido antranílico (2 g, 15 mmol) se hizo reaccionar con anhídrido maléico (1.43 g, 15 mmol) en THF (20 mL) durante 2 h, a temperatura ambiente y agitación constante. El compuesto obtenido se purificó en etanol y carbón activado; se eliminó el solvente y se secó al vacío para obtener C2 (rendimiento 90.2 %) como un sólido amorfo de color beige, pf:  $195 \pm 2$  °C. NMR de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz);  $\delta$ /ppm 6.29 (1H, d,  $J = 12.05$  Hz, H-3), 6.58 (1H, d,  $J = 11.90$  Hz, H-2), 7.17 (1H, t,  $J = 7.55$  Hz, H-5'), 7.59 (1H, t,  $J = 7.85$  Hz, H-4'), 7.98 (1H, d,  $J = 7.78$  Hz, H-6'), 8.46 (1H, d,  $J = 8.24$  Hz, H-3'), 11.31 (1H, s, -NH), 13.32 (2H, br, -COOH) (Fig. 41); NMR de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.4 MHz)  $\delta$ /ppm 117.55 (C-2'), 120.95 (C-3'), 123.95 (C-5'), 129.98 (C-3), 131.83 (C-6'), 134.01 (C-2), 134.80 (C-4'), 140.88 (C-1'), 164.31 (C-1), 167.22 (C-4), 170.08 (-COOH) (Anexo 1)

**Ácido 2-(3-carboxi-propionilamino)-benzóico, (C3).**

Ácido antranílico (2 g, 15 mmol) se hizo reaccionar con anhídrido succínico (1.46 g, 15 mmol) en THF (20 mL) durante 2 h, a temperatura ambiente y agitación constante. El compuesto obtenido se purificó en etanol y carbón activado; se eliminó el solvente y se secó al vacío para obtener C3 (rendimiento 90.1 %) como un sólido amorfo de color café-amarillo, pf:  $187 \pm 2$  °C. NMR de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz);  $\delta$ /ppm 2.55 (2H, t, H-2), 2.60 (2H, t, H-3), 7.10 (1H, s, H-5'), 7.55 (1H, s, H-4'), 7.96 (1H, d,  $J = 6.25$  Hz, H-6'), 8.47 (1H, d,  $J = 7.02$  Hz, H-3'), 11.18 (1H, s, -NH), 12.77 (2H, br, -COOH) (Fig. 44); NMR de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.4 MHz)  $\delta$ /ppm 29.32 (C-2), 32.79 (C-3), 116.74 (C-2'), 120.40 (C-3'), 123.14 (C-5'), 131.79 (C-6'), 134.79 (C-4'), 141.60 (C-1'), 170.30 (C-1), 170.93 (-COOH), 174.36 (C-4) (Anexo 1).

**Ácido 2-(4-carboxi-butirilamino)-benzóico, (C4).**

Ácido antranílico (2 g, 15 mmol) se hizo reaccionar con anhídrido glutárico (1.66 g, 15 mmol) en THF (20 mL) durante 48 h, a temperatura ambiente y agitación constante. El compuesto se purificó en etanol y carbón activado; se eliminó el solvente y se secó al vacío para obtener C4 (rendimiento 90.9 %) como un sólido amorfo de color beige-blanco, pf:  $142 \pm 2$  °C. NMR de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz);  $\delta$ /ppm 1.81 (2H, t,  $J = 6.63$  Hz, H-3), 2.28 (2H, t,  $J = 6.56$  Hz, H-2), 2.40 (2H, d,  $J = 6.86$  Hz, H-4), 7.11 (1H, t,  $J = 7.17$  Hz, H-5'), 7.55 (1H, t,  $J = 7.32$  Hz, H-4'), 7.95 (1H, d,  $J = 7.47$  Hz, H-6'), 8.46 (1H, d,  $J = 7.93$  Hz, H-3'), 11.10 (1H, s, -NH) (Fig. 47); NMR de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.4 MHz)  $\delta$ /ppm 20.89 (C-3), 33.42 (C-2), 37.13 (C-4), 117.08 (C-2'), 120.64 (C-3'), 123.21 (C-5'), 131.73 (C-6'), 134.70 (C-4'), 141.48 (C-1'), 170.24 (C-1), 171.49 (C-5), 174.81 (-COOH) (Anexo 1).

**Ácido 2-propionilamino-benzóico, (C5).**

Ácido antranílico (2 g, 15 mmol) se hizo reaccionar con anhídrido propiónico (1.90 g, 15 mmol) en THF (20 mL) durante 48 h, a temperatura ambiente y agitación constante. El compuesto obtenido se purificó en etanol y carbón activado; se eliminó el solvente y se secó al vacío, finalmente se recristalizó en etanol a temperatura ambiente para obtener C5 (rendimiento 83.4 %) como cristales con un pf:  $110 \pm 2$  °C. NMR de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz);  $\delta$ /ppm 1.10 (3H, m,  $J = 1.62$  Hz, H-3) 2.39 (2H, m,  $J = 7.60$  Hz, H-2), 7.10 (1H, t,  $J = 7.60$  Hz, H-5'), 7.55 (1H, t,  $J = 7.84$  Hz, H-4'), 7.96 (1H, t,  $J = 7.92$  Hz, H-6'), 8.50 (1H, d,  $J = 8.57$  Hz, H-3'), 11.15 (1H, s, -NH) (Fig. 50); NMR de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.4 MHz)  $\delta$ /ppm 10.02 (C-3), 31.32 (C-2), 116.87 (C-2'), 120.43 (C-3'), 123.07 (C-5'), 131.77 (C-6'), 134.72 (C-4'), 141.70 (C-1'), 170.31 (C-1), 172.65 (-COOH) (Anexo 1).

**N-(2-Hidroxi-5-metil-fenil)-acetamida, (C11).**

2-amino-4-methyl-phenol (2 g, 15 mmol) se hizo reaccionar con anhídrido acético (1.66 g, 15 mmol) en THF (20 mL) durante 4 h, a temperatura ambiente y agitación constante. El compuesto obtenido se purificó en etanol y carbón activado; se eliminó el solvente y se secó al vacío para obtener C11 (rendimiento 69.3 %) como polvo amorfo con pf =  $155.5 \pm 2$  °C. NMR de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz);  $\delta$ /ppm 2.08 (3H, s, H-1), 2.17 (s, H-7'), 3.37 (1H, s, -OH), 6.73 (1H, s, H-6'), 7.47 (1H, s, H-5'), 9.27 (1H, s, H-3'), 9.48 (1H, s, -NH) (Fig. 53); NMR de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.4 MHz)  $\delta$ /ppm 21.05 (C-1), 24.26 (C-7'), 116.39 (C-6'), 123.42 (C-3'), 125.67 (C-5'), 126.73 (C-2'), 128.13 (C-7'), 146.20 (C-1'), 169.60 (C-2) (Anexo 1).

**Ácido 3-(2-Hidroxi-5-metil-fenilcarbamoil)-acrílico, (C12).**

2-amino-4-methyl-phenol (2 g, 15 mmol) se hizo reaccionar con anhídrido maléico (1.60 g, 15 mmol) en THF (20 mL) durante 4 h, a temperatura ambiente y agitación constante. El compuesto obtenido se purificó en etanol y carbón activado; se eliminó el solvente y se secó al vacío para obtener C12 (rendimiento 96.5 %) como polvo amorfo con pf =  $186 \pm 2$

°C. NMR de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz);  $\delta/\text{ppm}$  2.20 (3H, s, H-7'), 6.34 ( $J = 12.33$  Hz, d, H-2), 6.68 (1H, s, H-3), 6.79 (1H, s, H-6'), 6.80 (1H, s, H-5'), 7.62 (1H, s, H-3'), 9.64 (1H, s, -NH), 9.89 (1H, s, -COOH) (Fig. 56); NMR de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.4 MHz)  $\delta/\text{ppm}$  21.04 (C-7'), 116.07 (C-6'), 123.86 (C-3'), 125.54 (C-2'), 126.61 (C-5'), 128.20 (C-4'), 131.47 (C-2), 132.56 (C-3), 146.75 (C-1'), 164.02 (C-4), 167.67 (C-1) (Anexo 1).

#### ***Ácido N-(2-Hidroxi-5-metil-fenil)-succinámico, (C13).***

2-amino-4-methyl-phenol (2 g, 15 mmol) se hizo reaccionar con anhídrido succínico (1.62 g, 15 mmol) en THF (20 mL) durante 4 h, a temperatura ambiente y agitación constante. El compuesto obtenido se purificó en etanol y carbón activado; se eliminó el solvente y se secó al vacío para obtener C13 (rendimiento 94.8 %) como polvo amorfo con  $\text{pf} = 172 \pm 1$  °C. NMR de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz);  $\delta/\text{ppm}$  -0.005 (3H, s, H-7'), 2.50 ( $J = 2.93$  Hz, t, H-3), 2.62 (1H, t,  $J = 6.46$ , H-2), 3.36 (1H, s, -OH), 6.73 (2H, s, H-5' y 6'), 7.53 (1H, s, H-3'), 9.24 (1H, s, -NH) (Fig. 59); NMR de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.4 MHz)  $\delta/\text{ppm}$  21.05 (C-7'), 29.64 (C-3), 31.39 (C-2), 116.24 (C-6'), 123.20 (C-3'), 125.48 (C-5'), 126.71 (C-2'), 128.13 (C-4'), 146.00 (C-1'), 171.27 (C-4), 174.55 (C-1) (Anexo 1).

#### ***Ácido 4-(2-Hidroxi-5-metil-fenilcarbamoil)-butírico, (C14).***

2-amino-4-methyl-phenol (2 g, 15 mmol) se hizo reaccionar con anhídrido glutárico (1.85 g, 15 mmol) en THF (20 mL) durante 6 h, a temperatura ambiente y agitación constante. El compuesto obtenido se purificó en etanol y carbón activado; se eliminó el solvente y se secó al vacío para obtener C14 (rendimiento 92.1 %) como polvo amorfo con  $\text{pf} = 147 \pm 2$  °C. NMR de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz);  $\delta/\text{ppm}$  1.79 (3H, m,  $J = 7.34$ , H-3), 2.27 (1H,  $J = 7.48$  Hz, t, H-2), 2.40 (1H, t,  $J = 4.34$ , H-2), 3.37 (1H, s, -OH), 6.73 (2H, s, H-5' y 6'), 7.48 (1H, s, H-3'), 9.21 (1H, s, -NH) (Fig. 62); NMR de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.4 MHz)  $\delta/\text{ppm}$  21.02 (C-7'), 21.34 (C-3), 33.63 (C-4), 35.66 (C-2), 116.39 (C-6'), 123.57 (C-3'), 125.71 (C-5'), 126.63 (C-2'), 128.16 (C-4'), 146.30 (C-1'), 171.99 (C-5), 174.87 (C-1) (Anexo 1).

***Ácido N-(2-Hidroxi-5-metil-fenil)-propionamida, (C15).***

2-amino-4-methyl-phenol (2 g, 15 mmol) se hizo reaccionar con anhídrido glutárico (2.11 g, 15 mmol) en THF (20 mL) durante 4 h, a temperatura ambiente y agitación constante. El compuesto obtenido se purificó en etanol y carbón activado; se eliminó el solvente y se secó al vacío para obtener C15 (rendimiento 94.2 %) como polvo amorfo con  $pf = 84.5 \pm 2$  °C. NMR de  $^1H$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz);  $\delta/ppm$  1.07 (3H, t,  $J = 7.48$ , H-3), 2.17 (1H, s, H-7'), 2.42 (1H, m,  $J = 7.34$ , H-2), 3.36 (1H, s, -OH), 6.73 (2H, s, H-5' y 6'), 6.74 (1H, s, H-5'), 7.50 (1H, s, H-3'), 9.18 (1H, s, -NH) (Fig. 65); NMR de  $^{13}C$  (DMSO- $d_6$ , 75.4 MHz)  $\delta/ppm$  10.50 (C-3), 21.04 (C-7'), 29.76 (C-2), 116.42 (C-6'), 123.35 (C-3'), 125.56 (C-5'), 126.76 (C-2'), 128.17 (C-4'), 146.18 (C-1'), 173.26 (C-1) (Anexo 1).

***N-(2-Hidroxi-5-nitro-fenil)-acetamida, (C21).***

2-amino-4-methyl-phenol (2 g, 15 mmol) se hizo reaccionar con anhídrido acético (1.66 g, 15 mmol) en THF (20 mL) durante 4 h, a temperatura ambiente y agitación constante. El compuesto obtenido se purificó en etanol y carbón activado; se eliminó el solvente y se secó al vacío para obtener C21 (rendimiento 88.4 %) como polvo amorfo con  $pf = 287 \pm 2$  °C. NMR de  $^1H$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz);  $\delta/ppm$  2.14 (3H, s, H-2), 3.37 (s, -OH), 7.03 (1H, d, H-6'), 7.90 (1H, d, H-5'), 8.94 (1H, s, -NH), 9.47 (1H, s, H-3') (Fig. 68); NMR de  $^{13}C$  (DMSO- $d_6$ , 75.4 MHz)  $\delta/ppm$  24.54 (C-2), 115.30 (C-6'), 117.14 (C-3'), 121.08 (C-5'), 127.54 (C-2'), 139.78 (C-4'), 154.38 (C-1'), 170.05 (C-1) (Anexo 1).

***N-(2-Hidroxi-5-nitro-fenil)-propionamida, (C25).***

2-amino-4-methyl-phenol (2 g, 15 mmol) se hizo reaccionar con anhídrido maléico (1.69 g, 15 mmol) en THF (20 mL) durante 4 h, a temperatura ambiente y agitación constante. El compuesto obtenido se purificó en etanol y carbón activado; se eliminó el solvente y se secó al vacío para obtener C25 (rendimiento 86.3 %) como polvo amorfo con  $pf = 246.5 \pm 2$  °C. NMR de  $^1H$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz);  $\delta/ppm$  1.07 (3H, t,  $J = 7.48$  Hz, H-3), 2.47 (2H,  $J$

= 7.92 Hz, m, H-2), 3.37 (1H, s, -OH), 7.02 (1H, d,  $J = 9.10$  Hz, H-6'), 7.90 (1H, d,  $J = 2.64$ , H-5'), 8.96 (1H, s, -NH), 9.37 (1H, s, H-3') (Fig. 71); NMR de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.4 MHz)  $\delta$ /ppm 10.24 (C-3), 29.85 (C-2), 115.29 (C-6'), 117.11 (C-3'), 121.01 (C-5'), 127.57 (C-2'), 139.81 (C-4'), 154.38 (C-1'), 173.68 (C-1) (Anexo 1).

### ***Metil 2-[(4-metilfenil)sulfonil]amino}benzoato, (2)***

Cloruro de 4-metilbenzensulfonilo (3.77 g, 19.8 mmol) fue añadido a una solución de metil 2-aminobenzoato (1) (2.60 g, 17.2 mmol) en piridina (5.20 g) a una temperatura interna de 0 °C. La mezcla de reacción se calentó suavemente a 25 °C y se agitó por 11 h. Se agregó agua a 5 °C y se se agitó por 1 h mas; luego se mantuvo en refrigeración (5 -10 °C) por 12 h. Los cristales resultantes se aislaron por filtración y se secaron para obtener **2** como un polvo amarillo pálido. pf: 111 °C, rendimiento: 82.2 %.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.28 (3H, s), 3.64 (H, s), 7.12-7.82 (8H, m), 10.43 (1H, br s).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  21.59, 53.33, 118.13, 120.3, 124.49, 127.64, 130.55, 131.70, 135.17, 136.30, 139.44, 144.79, 168.32. IR (KBr): 3445, 3134, 2361, 1690  $\text{cm}^{-1}$ .

### ***Metil 2-[(3-cianopropil)](4-metilfenil)sulfonil]amino}benzoato, (3)***

Una mezcla del *N*-tosilbenzoato (2) (2.04 g, 6.68 mmol), 4-clorobutanonitrilo (0.815 g, 7.87 mmol), carbonato de potasio (1.83 g, 13.2 mmol) y yoduro de potasio (0.326 g, 1.96 mmol) en 2-butanona (3.06 g) se agitó a reflujo por 12 h. Luego, se agregó agua a 0-5 °C a la mezcla y se agitó por 1 h. Los cristales resultantes se aislaron por filtración y se secaron para obtener **3** como un polvo blanco. pf: 112 °C, rendimiento: 80.1 %.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.71 (2H, t), 2.36 (3H, s), 2.63 (2H, t), 3.48 (2H, s), 3.76 (H, s), 6.90 - 7.76 (8H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  14.23, 21.67, 24.86, 50.04, 52.81, 120.99, 127.88, 129.04, 129.19, 130.47, 131.27, 133.14, 133.36, 135.28, 137.83, 144.36, 167.03. IR (KBr): 3440, 2935, 2241, 1732  $\text{cm}^{-1}$ .

***1-[(4-metilfenil)sulfonyl]-5-oxo-2,3,4,5-tetrahidro-1H-1-benzazepina-4-carbonitrilo, (C9)***

Se agregó *tert*-butóxido de potasio (1.76 g, 15.7 mmol) a una disolución de **3** (2.91 g, 7.81 mmol) en DMF ananhidro (8.748.74 mL) a una temperatura interna de -10 °C. La mezcla se calentó a 0 – 5 °C y se agitó por 2 h. Se agregó agua a la mezca a una temperatura de 0 – 5 °C, luego, se agregaron 2.2 mL de ácido clorhídrico 37 % gota a gota, y la mezcla se agitó a 5 °C por 1 h más. El precipitado se aisló por filtración como **C9 crudo**. Luego, se agregó metanol al C9 crudo y se agitó por 30 min a reflujo, subsecuentemente, la temperatura se bajó a 5 °C y se agitó por 1 h más. Los cristales resultantes se aislaron por filtración y se secaron para obtener **C9** como un polvo blanco que funde a 152 – 153 °C. Rendimiento: 77.2 %. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d6): δ 2.09 (2H, m), 2.41 (3H, s), 3.39 (2H, br s), 7.31-7.58 (8H, m), 11.1 (1H, br s). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d6): δ 21.79, 26.59, 56.64, 82.16, 119.10, 127.46, 129.27, 130.60, 132.00, 132.20, 135.22, 136.92, 137.54, 143.94, 166.04. IR (KBr): 3440, 2934, 2241, 1732 cm<sup>-1</sup>.



## 8. DISCUSION DE RESULTADOS

La vía de síntesis para el compuesto C9, fue originalmente propuesta por Tsunoda y cols. en 2004 como parte de la síntesis de Conivaptan. Con cambios menores, hemos tomado la misma vía de síntesis: metil 2-aminobenzoato fue mezclado con cloruro de *p*-toluensulfonilo (TsCl), en piridina; la mezcla de reacción se agitó a 25 °C por 11 h. A fin de incrementar el rendimiento, el tiempo de reacción fue incrementado a 7 h, sin embargo, el rendimiento fue 10 % menos que el ya reportado, con las principales pérdidas en la etapa de filtrado. Para finalizar la reacción, agregamos agua a 5 °C bajo agitación constante, por 1 h. Se enfrió a 5 °C la mezcla de reacción a fin de promover la formación de cristales de metil 2-[(4-metilfenil)sulfonil]amino}benzoato. Los cristales fueron aislados por filtración y después secados, con un rendimiento de 82.2 %. El 4-clorobutanonitrilo, carbonato de potasio y yoduro de potasio se mezclaron con el *N*-tosil benzoato de la reacción anterior, luego, la mezcla se disolvió en 2-butanona. La mezcla se agitó a reflujo por 12 h para luego dejarla atemperar. Fue necesario añadir agua destilada a 5 °C para favorecer la formación de cristales de metil 2-[(3-cianopropil)[(4-metilfenil)sulfonil]amino}benzoato. Luego, llevamos a cabo la reacción modificada de Dieckmann (Tsunoda et. al., 2004) a fin de cerrar la benzoacepina. Este enfoque incorpora el uso de *t*-BuOK en lugar de hidruro de sodio a fin de evitar la evolución de gas, además de la necesidad de purificar para remover el aceite necesario para remover el hidruro de sodio. Una vez disuelto el metil 2-[(3-cianopropil)[(4-metilfenil)sulfonil]amino}benzoato en DMF a -10 °C, se añadió *t*-BuOK. La mezcla fue suavemente agitada por 2 h, la temperatura se mantuvo entre 0 – 5 °C. Suavemente se agregó agua. Se agregó HCl conc. Gota a gota hasta un volumen final de 2.2 mL, con agitación constante. Después de 1 h, la mezcla formó un precipitado blanco (C9 crudo) que fue disuelto en metanol y se mantuvo a reflujo por 30 min. La mezcla de reacción se enfrió a 5 °C a fin de formar 1-[(4-metilfenil)sulfonil]-5-oxo-2,3,4,5-tetrahidro-1H-1-benzoazepina-4-carbonitrilo, (C9) como un precipitado blanco que funde a 152 – 153 °C, consistente con lo reportado por Tsunoda T. et, al. (2004). Los espectros de NMR para C9 (en DMSO-  $\delta_6$ ) y los espectros IR evidencian un grupo OH en forma de enol en la posición 5, consistente con lo ya reportado Tsunoda T. et, al. (2004). Una vez sintetizado el compuesto C9, fue sometido a ensayos biológicos como se describe a continuación.

A fin de evaluar el efecto de C9 sobre los V1AR, realizamos un modelo biológico de anillos de aorta. Se sabe que en la activación de AVPR2 endoteliales por AVP, se produce una liberación de óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador de vida media corta (Okamura, et. al., 1999). Los experimentos de anillos de aorta mostraron que el endotelio vascular no juega un papel importante sobre la máxima contracción de VSM inducida por AVP, posiblemente debido al tamaño tan pequeño de los anillos y a las pocas células endoteliales que liberan moléculas de NO que no son suficientes para inducir la relajación de los anillos.

Una vez que la influencia del endotelio sobre la contracción de los anillos de aorta fue eliminada, se evaluó el efecto de los compuestos sobre la contracción de anillos intactos. La actividad bloqueadora de AVP sobre la contracción de los anillos inducida por AVP fue valuada empleando varias concentraciones de C9 (0.0, 5.9, 59 and 590  $\mu\text{M}$ ). Los resultados mostraron que el DMSO no modifica la respuesta de AVP, mientras modifica la respuesta de AVP, mientras que dosis logarítmicas de C9 causan una disminución de la respuesta a AVP en una forma dosis-dependiente. Sin embargo, diferencias significativas ocurrieron solo en las dosis de 59 y 590  $\mu\text{M}$ . Estos resultados sugieren fuertemente que C9 tiene un efecto antagonista a AVP, posiblemente actuando en los AVPR1A.

Las arilamidas también fueron evaluadas en el modelo de anillos de aorta, sin embargo los resultados fueron muy variados. Mientras algunas arilamidas tienden a contraer el tejido como en el caso de C1, C2, C3, C5 y C14 ( $p > 0.05$ ) manera no significativa, los demás provocan relajación del anillo.

Se sabe que el fragmento arilamida se encuentra ampliamente distribuido en diversos fármacos, lo cual nos lleva a pensar que estos compuestos son capaces de llegar a diferentes tipos de receptores, y aunque los resultados evidencian que esta estructura por si sola no es capaz de bloquear la unión a AVP, muy probablemente actúen como bloqueadores a los canales de calcio. Los compuestos C4, C11, C12, C21 y C25, mostraron un efecto relajante del anillo de aorta que fue del 40 al 80 % respecto a la tensión inicial, cabe resaltar que los compuestos C21 y C25 guardan estructuras cercanas a nifedipina, el cual e

s una antagonista a los canales de calcio bien conocido. Esto pudiera quedar de antecedente para desarrollar este tipo de compuestos bloqueadores de canales de Calcio.

Se sabe que AVP es liberada cuando la osmolaridad plasmática se incrementa y /o su volumen es reducido. De igual forma, la liberación de AVP se inhibe cuando la osmolaridad plasmática disminuye y/o el volumen se incrementa (Jackson, 2006; Wagner and Braunwald, 1956). Los animales sometidos a la prueba de acuaresis, en la cual el volumen plasmático es inducido, experimentan una disminución en la secreción de AVP (Jackson, 2006). Así, midiendo los cambios en el flujo urinario, hemos evaluado el efecto de C9 como un bloqueador del efecto antidiurético provocado por AVP exógena.

La Fig. 39 muestra los efectos de AVP (50  $\mu$ U) y AVP mas C9 (100  $\mu$ g/Kg de p.c.) sobre el flujo urinario. Después de un periodo de estabilización, la administración de AVP indujo una disminución en el flujo urinario (efecto antidiurético), el cual regresa a su nivel basal. La administración de AVP junto con C9 al minuto 60 no indujo cambios importantes sobre el flujo urinario. Esto indica que C9 bloqueó el efecto antidiurético provocado por AVP. Estos resultados sugieren fuertemente que C9 puede actuar como un antagonista de los AVPR2.

Debido a que el flujo urinario también depende de los cambios en la presión arterial, ésta fue medida de forma simultánea a fin de descartar el efecto vasopresor de AVP a esa concentración. El resultado mostró que ni la administración de AVP sola ni la de AVP con C9 afectaron la presión sanguínea sistólica, diastólica o media. Estos resultados indican que a la dosis empleada, el efecto de AVP y C9 ocurren principalmente en el sistema tubular del riñón.

En relación con los efectos de AVP y C9 sobre la concentración de sodio urinario, ocurrió un inesperado y pasajero incremento en la concentración de sodio, sin cambios en el flujo urinario durante el periodo de estabilización. Yamamura, et. al. (1992) demostró el efecto acuarético de OPC31260, un antagonista a AVP ya probado, que al igual que C9, contiene un anillo benzoacepínico en su estructura, mismo que podría ser considerado como un posible farmacóforo de la familia de los vaptanes (Contreras-Romo, et al., 2013, submitted), soportando la idea que el mecanismo de efecto acuarético de C9 puede ser similar a la de

OPC31260. Estos experimentos sugieren que C9 posee afinidad por los AVPR1A y AVPR2.

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre la presión sanguínea, realizamos pruebas preliminares en la cuales notamos que el mayor efecto de las arilamidas se notaba a la concentración empleada (100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  p.c.), sin embargo al realizar el estadístico, para todos los casos resultó no significativo (valor  $p > 0.05$ ). El compuesto C9 no pudo ser evaluado ya que por su naturaleza altamente lipofílica no pudo ser administrado vía IV (el catéter se disolvía). Sin embargo, se requieren estudios más específicos a fin de determinar la concentración idónea a la cual se puedan obtener resultados satisfactorios.

Para explicar el posible mecanismo de acción de C9, también realizamos estudios teóricos de acoplamiento molecular (docking).

La estructura química de cada compuesto se construyó utilizando el programa HyperChem, para obtener sus estructuras 3D, cada una fue sometida a una minimización, luego la conformación asociada con la menor energía y máxima estabilidad se obtuvo mediante una optimización con el método semi-empírico AM1 en el programa Gaussian 98, para así realizar las pruebas de docking.

Los estudios de docking sugieren que el bolsillo de unión de C9 sobre los AVPR1A está constituido por residuos de amino ácidos como: T206, F207, P318, R214, S314, V217, Y216, S213, F189, G212 y W211. C9 exhibió importantes interacciones del tipo  $\pi$ - $\pi$  con F207, W211 y Y216. Sin embargo, es posible que la interacción que gobierna la gran afinidad de C9 sobre los AVPR1A se deba a puentes de hidrógeno con R214, hecho que coincide con otros estudios de dockin en la familia de los vaptanes (Contreras-Romo, et al., 2013, submitted).

En el caso de los AVPR2, los resultados mostraron que el bolsillo de unión está conformado por: W200, P199, Q180, Q174, I209, Y124, M123, F287, Q291 y A294 haciendo interacciones del tipo puente de hidrógeno entre C9 y la cadena lateral de Q291, además de interacciones del tipo  $\pi$ - $\pi$  con F287, Y124 y W200, principalmente.

Respecto a las energías libres de unión, los resultados no fueron alentadores, sin embargo, estudios de dinámica molecular han demostrado ser una excelente herramienta para encontrar la mejor conformación de las proteínas para poder realizar estudios de docking con éxito. Estudios posteriores de dinámica molecular, realizados por la Dra. Martínez-Archundia, et. al., (no publicados) , sugieren que una simulación de 5 ns del AVP1AR es necesaria para que la proteína sea estable, mientras que para el AVPR2 se requiere de 3 ns. Ya con estas simulaciones, es posible dilucidar las energías libres de unión, que para el AVPR1A fue de -8.47 kcal/mol y para el AVPR2 de -5.76 kcal/mol.

De acuerdo a estos resultados de docking, es posible que el compuesto C9 alcance los sitios activos de los AVPR1A y AVPR2. Debido a que el tamaño de molécula de C9 respecto a la de AVP es muy pequeña, es posible que C9 alcance la cavidad del receptor y así impida la unión de AVP. Además, este ligando contiene residuos aromáticos que facilitan su interacción con la proteína.



## CONCLUSION

Los resultados de este trabajo demostraron que la estructura química de C9 es similar a la mayoría de los vaptanes, cuyo núcleo de benzoacepina es un fragmento clave de esta familia de fármacos. Los estudios de docking mostraron que el compuesto alcanza el bolsillo de unión previamente reportado para los vaptanes, es decir, que interactúa con aminoácidos clave en el reconocimiento a AVP. C9 exhibió efectos vasopresores y acuareéticos cuando fue evaluado en modelos experimentales de contractilidad de músculo liso vascular y diuresis en rata. Los resultados indican que C9 puede ser desarrollado como un potencial fármaco en el tratamiento de patologías relacionadas al desequilibrio hidroelectrolítico tal como: hiponatraemia, el síndrome de secreción inapropiada de ADH, insuficiencia cardíaca, cirrosis hepática y ascitis, principalmente. Sin embargo, aún se requieren pruebas toxicológicas y modelos experimentales de estas enfermedades a fin de probar esta suposición.



## GLOSARIO

**Acoplamiento Molecular.** Método computacional que busca formas de unión entre ligandos potenciales (un fármaco) y un blanco macromolecular (normalmente células, proteínas o procesos químicos), cuya estructura es conocida experimentalmente. Particularmente, el acoplamiento molecular se aplica para encontrar la orientación y posición de un ligando en el sitio activo de su blanco macromolecular, sin conocer el resultado final, es decir, la conformación tridimensional de la unión ligando-receptor. Esta última es normalmente estudiada por la cristalografía de rayos X, o analizando los complejos de energía de la resonancia magnética nuclear. El objetivo de la técnica consiste en encontrar la unión más probable entre el ligando y el receptor, es decir, la que menos energía requiera (a menor energía, más fuerte la unión) así como el sitio idóneo de unión molecular.

**Agonista.** Es aquella sustancia que es capaz de unirse a un receptor celular y provocar una acción determinada en la célula generalmente similar a la producida por una sustancia fisiológica.

**Amida.** Una amida es un compuesto orgánico cuyo grupo funcional es de tipo  $RCONR'R''$ , siendo CO el grupo funcional carbonilo, N un átomo de nitrógeno, y R, R', R'' radicales orgánicos o átomos de hidrógeno. Se puede considerar como un derivado de un ácido carboxílico por sustitución de grupo oxidrilo (-OH) del ácido por un grupo  $-NH_2$ ,  $-NHR$  ó  $-NRR'$  llamado grupo amino.

**Antagonista.** Un antagonista es un tipo de fármaco que al unirse a un receptor celular no provoca una respuesta biológica, pero bloquea o detiene respuestas mediadas por agonistas.

**Benzoacepina.** O benzazepina, son compuestos químicos heterocíclicos que consisten en un anillo de benceno fusionado a un anillo de azepina.

**Descriptor molecular.** Es un valor numérico que representa propiedades características de una molécula.

**Modelado molecular.** El modelado molecular o simulación molecular es un término general que engloba métodos teóricos y técnicas computacionales para modelar, imitar y predecir el comportamiento de moléculas. Las técnicas y métodos utilizados se encuentran en un amplio rango de campos de la física (termodinámica, mecánica clásica, mecánica estadística, mecánica cuántica, física matemática y ciencia de materiales), la química computacional y la bioquímica para el estudio de sistemas moleculares que abarcan desde pequeños sistemas químicos a grandes moléculas biológicas y materiales cristalinos.

**QSAR.** Es el proceso por el cual la estructura química se correlaciona cuantitativamente con un proceso bien definido, como la actividad biológica (unión de un fármaco con un receptor) o la reactividad química (afinidad de una sustancia por otra para que produzcan una reacción).

**Receptor.** El término receptores designa a las proteínas que permiten la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular. Los receptores son proteínas o glicoproteínas presentes en la membrana plasmática, en las membranas de los orgánulos, en el citosol celular o en el núcleo celular, a las que se unen específicamente otras sustancias químicas llamadas moléculas señalizadoras, como las hormonas y los neurotransmisores. La unión de una molécula señalizadora a sus receptores específicos desencadena una serie de reacciones en el interior de las células (transducción de señal), cuyo resultado final depende no solo del estímulo recibido, sino de muchos otros factores, como el estadio celular, la presencia de patógenos, el estado metabólico de la célula, etc.

**Síntesis química.** Es el proceso por el cual se producen compuestos químicos a partir de simples o precursores químicos.<sup>1</sup> Su rama más amplia es la síntesis orgánica. También es realizada por los organismos vivientes en su metabolismo. El objetivo principal de la síntesis química, además de producir nuevas sustancias químicas, es el desarrollo de métodos más económicos y eficientes para sintetizar sustancias naturales ya conocidas, como por ejemplo el ácido acetilsalicílico (presente en las hojas del sauce) o el ácido ascórbico o vitamina C, que se encuentra de forma natural en muchos vegetales.

## BIBLIOGRAFIA

- Acher R, Chauvet J, Chauvet MT. Man and chimera: selective versus neutral oxytocin evolution. *Adv Exp Med Biol*, 1995. 395:615-627.
- Acher R, Chauvet J. The neurohypophysial endocrine regulatory cascade: precursors, mediators, receptors, and effectors. *Front Neuroendocrinol*, 1995. 16:237-289.
- Albright JD, De los Santos EF, Dusza, JP, Chan PS, Coupet J, Ru X, Mazandarani H, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000. 10:695–698.
- Albright JD, Reich MF, De los Santos EG, Dusza JP, Sum FW, Venkatesan AM, Coupet J, Chan PS. "5-Fluoro-2-methyl-N-[4-(5H-pyrrolo[2,1-c]- [1,4]benzodiazepin-10(11H)-ylcarbonyl)-3- chlorophenyl] benzamide (VPA-985): An Orally Active Arginine Vasopressin Antagonist with Selectivity for V2Receptors". *Journal of Medicinal Chemistry*. 1998. 41:2442–2444.
- Annane D, Decaux G, Smith N, and Conivaptan Study Group. Efficacy and Safety of Oral Conivaptan, a Vasopressin-Receptor Antagonist, Evaluated in a Randomized, Controlled Trial in Patients With Euvolemic or Hypervolemic Hyponatremia. *Am J of the Med Sci*. 2009. 337: 28-36.
- Aranapakam V, Albright JD, Grosu GT, De los Santos EG, Chan PS, Coupet J, Ru X, Saunders T, Mazandarani H. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 1999. 9:1737–1740.
- Archer R, du Vigneaud V. La structure de la vasopressine de boeuf. *Biochim Biochim Acta (Amst)*, 1953a. 12:487-488.
- Ashwell MA, Bagli JF, Caggiano TJ, Chan PS, Molinari AJ, Palka C, Park CH, Rogers JF, Sherman M, Trybulski EJ, Williams DK. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2000. 10:783–786.
- Ballesteros JA, Weinstein H. integrated methods for modeling G-protein coupled receptors. *Methods Neurosci*. 1995. 25: 366-428.

- 
- Bankir L. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2-receptor-mediated effects. *Cardiovasc Res.* 2001. 51:372-90.
- Barberis C, Mouillac B, Durroux T: Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J. Endocrinol.* 1998. 156:223–229.
- Bell J, Adler MW, Greenstein JI, Lui-Chen LY. Identification and characterization of 125I arginine vasopressin binding sites on human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci.* 1993. 52:95-105.
- Bichet DG. Vasopressin receptors in health and disease. *Kidney Int.* 1996. 49:1706-11.
- Birnbaumer M. “Vasopressin Receptors.” *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2000. 10:406-410.
- Bolignano D, Coppolino G, Criseo M, Campo S, Romeo A, Buemi M. Aquaretic agents: What’s beyond the treatment of hyponatremia?. *Curr Pharmaceut Desig.* 2007. 13:865-71.
- Bourque CW, Oliet SH, Richard D. Osmoreceptors, osmoreception and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol.* 1994. 15:231-274.
- Breslow E. Structure and folding properties of neurophysin and its peptide complexes: biological implications. *Regul Pept.* 1993. 45:15-9.
- Campbell, Neil A. *Biology.* 4th ed. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1996.
- Chorghade M S. *Drug discovery and development: Drug discovery. Volume 2.* Wiley-Interscience. 2007. 323.
- Correa-Basurto J, Espinosa RJ, González MM, Espinoza FM, Vazquez AI, Trujillo FJ. Inhibition of acetylcholinesterase by two arylderivates: 3<sup>a</sup>-Acetoxy-5H-pyrrolo(1,2-a)(3,1)benzoxazin-1,5-(3aH)-dione and cis-N-p-Acetoxy-phenylisomaleimide. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 2006. 21:133-138.

- Coupet J, Saunders T, Ru X, Mazandarani H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999. 9:1733–1736.
- Dale HH. On some physiological actions of ergot. *J Physiol (Lond)*, 1906. 34:163-206.
- Day TA, Randle JC, Renaud LP. Opposing alpha-and beta-adrenergic mechanisms mediate dose-dependent actions of norepinephrine on supraoptic vasopressin neurones in vivo. *Brain Res.* 1985. 358:171-179.
- De Troyer A, Demanet JC: Clinical, biological and pathogenic features of the síndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. A review of 26 cases with marked hyponatraemia. *Q J Med.* 1976. 45:521.
- Deeb O, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 104 (2010) 181-194.
- Di Malta A, Foulon L, Garcia G, Nisato D, Roux R, Serradeil-Legal C, Valette G, Wagnon, J (Sanofi-Synthélabo). Derivs. of 1-benzenesulfonyl-1,3-dihydro-indol-2-one, their preparation and pharmaceutical compsns. containing them. CA 2129215; EP 0636608; FR 2708605; JP 1995247269. 1998.
- du Vigneaud V, Gish DT, Katsoyannis PG. A synthetic preparation possessing biological properties associated with arginine–vasopressin. *J Am Chem Soc*, 1954a. 76:4751-4752.
- du Vigneaud V, Lawler HC, Popenoe EA. Enzymic cleavage of glycinamide from vasopressin and a proposed structure for this pressor-antidiuretic hormone of the posterior pituitary. *J Am Chem Soc*, 1953a. 75:4880-4881.
- du Vigneaud V, Ressler C, Swan JM, Roberts CW, Katsoyannis PG. The synthesis of oxytocin. *J Am Chem Soc*, 1954b. 76:3115-3121.
- du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem*, 1953b. 205:949-957.
- du Vigneaud V. A trail of research. Ithaca: *Cornell University Press*, 1952.

Ectopic ADH Syndrome Therapeutic Research Group, Yamaguchi K, Shijubo N, Kodama T, Mori K, Sugiura T, Kuriyama T, Kawahara M, Shinkai T, Iguchi H, Sakurai M. Clinical implication of the antidiuretic hormone (ADH) receptor antagonist mozavaptan hydrochloride in patients with ectopic ADH syndrome. *Jpn J Clin Oncol*. 2011. 41:148-52.

Elands J, Van Woudenberg A, Resink A, de Kloet ER. Vasopressin receptor capacity of human blood peripheral mononuclear cells issex dependent. *Brain Behav Immun*. 1990. 4:30-38.

Escalona AJC, Carrasco VR, Padrón GJA. *Diseño Racional de Fármacos*. Ciudad de la Habana. 2008. Editorial Universitaria. 45 pp.

Farini F. Diabete insipido ed opoterapia. *Gazz Osped Clin*, 1913. 34:1135-1139.

Ferguson JW, Therapondos G, Newby DE. Therapeutic role of vasopressin receptor antagonism in patients with liver cirrhosis. *Clinical Science*. 2003. 105:1-8.

Fishman JB, Dickey BF, Fine RE. Purification and characterization of the rat liver vasopressin (V1) receptor. *J Biol Chem*. 1987. 262:14049-14055.

Folkers G, Kubinyi H. 1997. *Diseño Racional de Fármacos*. Investigación y Ciencia. 254.

Fushimi K, Sasaki S, Marumo F. Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem*. 1997. 272:14800–14804

Gaussian 03, Revision C.02 (or D.01), M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C.

- Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.
- Gaussian 98 (Revision A.11), M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, P. Salvador, J. J. Dannenberg, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2001.
- Gieldón A, Kazmierkiewicz R, Slusarz R, Ciarkowski J. Molecular modeling of interactions of the non-peptide antagonist YM087 with the human vasopressin V1a, V2 receptors and with oxytocin receptors. 2001. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 15:1085-1104.
- Grazzini E, Lodboerer AM, Perez-Martin A, Joubert D, Guillon G. Molecular and functional characterization of V1b vasopressin receptor in rat adrenal medulla. *Endocrinology*. 1996. 137:3906–3914.
- Green JR, Buchan GC, Alvord EC Jr, et. al. Hereditary and idiopathic types of diabetes insipidus. *Brain*. 1967. 90:707.

Griebel G, Holsboer F. Neuropeptide receptor ligands as drugs for psychiatric diseases: the end of the beginning? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012. 11:462-478.

Gross P, Pehrisch H, Rascher W, Schöming A, Hackenthal E, Ritz E. Pathogenesis of clinical hyponatremia. Observations of vasopressin and fluid intake in 1000 hyponatremic medical patients. *Eur J Clin Invest*. 1987. 17:123-9.

Guillon G, Butlen D, Cantau B, Barth T, Jard S. Kinetic and pharmacological characterization of vasopressin membrane receptors from human kidney medulla: relation to adenylate cyclase activation. *Eur. J. Pharmacol*. 1982. 85:291–304.

Guillon G, Grazzini E, Andrez M, Breton C, Trueba M, Serradeil-LeGal C, Boccara G, Derick S, Chouinard L, Gallo-Payet N. Vasopressin: a potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocr Res*. 1998. 24:703-10.

Gupta J, Russell RJ, Wayman CP, Hurley D, Jackson VM. Oxytocin-induced contractions within rat and rabbit ejaculatory tissues are mediated by vasopressin V1A receptors and not oxytocin receptors. *British Journal of Pharmacology*. 2008 155:118–126.

Hansen JT, Koeppen BM. 1997. *Netter's Atlas of Human Physiology*.

Hawtin SR, Wesley VJ, Simms J, Argent CCH, Latif K, Wheatley. "The N-terminal juxtamembrane segment of the V1a vasopressin receptor provides two independent epitopes required for high-affinity agonist binding and signaling." *Mol. Endocrinology*. 2005. 19:2871–2881.

Howl J, Ismail T, Strain AJ, Kirk CJ, Anderson D, Wheatley M. Characterization of the human liver vasopressin receptor. *Biochem. J*. 1991. 276:189–195.

Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996. 14: 33-38.

Hupf H, Grimm D, Riegger GA, Schunkert H. Evidence for a vasopressin system in the rat heart. *Circ Res*. 1999. 84(3):365-70.

- Jackson EK. Vasopressin and other agents affecting the renal conservation of water. In: Brunton L, Lazo JS, Parker KL Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th edn. New York:McGraw-Hill. 2006:771–88.
- Jans DA, Peters R, Zsigo J, Fahrenholz F. The adenylate cyclase-coupled vasopressin V2-receptor is highly laterally mobile in membranes of LLC-PK1 renal epithelial cells at physiological temperature. *EMBO J*. 1989. 8:2481–2488.
- Jard S, Gaillard RC, Guillon G, Marie J, Schoenenberg P, Muller AF, Manning M, Sawyer WH. Vasopressin antagonists allow demonstration of a novel type of vasopressin receptor in the rat adenohypophysis. *Mol. Pharmacol*. 1986. 30:171–177.
- Johnson HM, Torres BA. Immunoregulatory properties of neuroendocrine peptide hormones; in Blalock JE, Bost KL (eds). *Neuroimmunoendocrinology*. Prog Allergy. Basel, Karger. 1988. 43:37-67.
- Johnson HM, Torres BA. Regulation of lymphokine production by arginine vasopressin and oxytocin: Modulation of lymphocyte function by neurohypophyseal hormones. *J Immunol*. 1985. 135:773s-775s
- Kinter LB, Caltabiano S, Huffman WF, 1993. Anomalous antidiuretic activity of antidiuretic hormone antagonists. *Biochem. Pharmacol*. 45:1731-1737.
- Kondo K, Ogawa H, Yamashita H, Miyamoto H, Tanaka M, Nakaya K, Kitano K, Yamamura Y, Nakamura S, Onogawa T, Mori T, Tominaga M. *Bioorg. Med. Chem*. 1999. 7:1743–1757.
- Kondo K, Ogawa H, Yamashita H, Miyamoto H, Tanaka M, Nakaya K, Kitano K, Yamamura Y, Nakamura S, Onogawa T, et al.; *Bioor. Med. Chem*. 1999. 7:1743.
- Koshimizu T, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, and Tanoue A. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev*. 2012. 92:1813–1864.

- Kovacs L, Robertson GL. Syndrome of inappropriate antidiuresis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992. 21:859-875.
- Lázló FA, Lázló F Jr., De Wied D. Pharmacology and clinical perspectives of vasopressin antagonists, *Pharmacol. Rev.* 1991. 43:73-108.
- Lee CR, Watkins ML, Patterson JH, Gattis W, O'Connor CM, Gheorghide M, Adams Jr. KF. Vasopressin: a new target for the treatment of heart failure. *Am. Heart J.* 1995. 146:9-18.
- Leng G, Dyball RE, Luckman SM. Mechanisms of vasopressin secretion. *Horm Res.* 1992. 37(1-2):33-8.
- Lengauer T. Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology.* 1996. 6(3):402-406.
- Lester MC, Nelson PB. Neurological aspects of vasopressin release and the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *Neurosurgery.* 1981. 8:735.
- Macion-Dazard R, Callahan N, Xu Z, Wu N, Thibonnier M, Shoham M. Mapping the binding site of six non-peptide antagonists to the human V2-renal vasopressin receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006. 316:564-71.
- Manning M, Chan WY, Sawyer WH. Design of cyclic and linear peptide antagonists of vasopressin and oxytocin: current status and future directions. *Regul. Pept.* 1993. 45:279-283.
- Manning M, Olma A, Klis W, Kolodziejczyk A, Nawrocka E, Misicka A, Seto J, Sawyer WH. Carboxy terminus of vasopressin required for activity but not binding. *Nature.* 1994. 308:652-653.
- Manning M, Sawyer WH. Discovery, development and some uses of vasopressin and oxytocin antagonists. *J. Lab. Clin. Med.* 1989. 114:617-632. [Published erratum in J.

- Lab. Clin. Med., 1990, 115:530. (Corrections to structure of vasopressin; headings in table VII; and heading in text, p. 624).
- Matsuhisa A, Kikuchi K, Sakamoto K, Yatsu T, Tanaka A. Chem. Pharm. Bull. 1999. 47:329–339.
- Matsuhisa A, Koshio H, Sakamoto K, Taniguchi N, Yatsu T, Tanaka A. Chem. Pharm. Bull. 1998. 46(10):1566-1579.
- Matsuhisa A, Tanaka A, Kikuchi K, Shimada Y, Yatsu T, Yanagisa WA. Non peptide arginine vasopressin antagonists for both V1a and V2-receptors: synthesis and pharmacological properties of 2-phenyl4-(2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepin-1-y)-Carbonyl) benzanilide derivations. Chem Pharm Bull. 1997. 45:1870-4.
- Matsuhisa A, Taniguchi N, Koshio H, Yatsu T, Tanaka A, Chem. Pharm. Bull. 2000. 48:21-31.
- Michell RH, Kirk CJ, Billah MM. Hormonal stimulation of phosphatidylinositol breakdown with particular reference to the hepatic effects of vasopressin. Biochem. Soc. Trans. 1979. 7:861- 865.
- Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson, AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. J. Comp. Chem. 1998. 19:1639-1662.
- Natig G, Semmo N, Semmo M, Nia AM, Fuhr U and Er F. Arginine vasopressin (AVP) and treatment with arginine vasopressin receptor antagonists (vaptans) in congestive heart failure, liver cirrhosis and syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (SIADH); European journal of clinical pharmacology. 2011. 1432-1041.
- Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin- CD water channels to plasma membrane. Proc Natl Acad Sci USA. 1995. 92:1013–1017

- 
- Nielsen S, Digiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. 90:11663–11667
- Norman P, Leeson PA, Rabasseda X, Castaner J, Castaner RM. *Drugs Future*. 2000. 25:1121–1130.
- Ocampo DD, Lewicka M, Larhammar D. The oxytocin/vasopressinreceptor family has at least five members in the gnathostome lineage, including two distinct V2 subtypes. *General and Comparative Endocrinology*. 2012. 175:135–143.
- Ogawa H, Yamamura Y, Miyamoto H, Kondo K, Yamashita H, Nakaya K, Chihara T, Mori T, Tominaga M, Yabuuchi Y. *J. Med. Chem*. 1993. 36:2011–2017.
- Ogawa H, Yamashita H, Kondo K, et al.; Orally active, nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonists: A novel series of 1-[4-(benzoylamino)benzoyl]-2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzazepines and related compounds. *J Med Chem*. 1996. 39:18, 3574.
- Ogawa H, Yamashita H, Kondo K, Yamamura Y, Miyamoto H, Kan K, Kitano K, Tanaka M, Nakaya K, Nakamura S, Mori T, Onogawa T, Tominaga M, Yabuuchi Y. *J. Med. Chem*. 1996. 39:3547–3555.
- Ohnishi A, Orita Y, Okahara R, Fujihara R, Inove T, Yamamura Y. Potent aquaretic agent. A novel nonpeptide selective vasopressin 2 antagonist (OPC-31260) in men. *J Clin Invest*. 1993. 92:2653-9.
- Oliver MD, Schäfer FRS. On the physiological action of extracts of pituitary body and certain other glandular organs. *J Physiol*. 1895. 18: 277-279.
- Ott I, Scott JC. The action of infundibulin upon the mammary secretion. *Proc Soc Exp Biol (NY)*. 1910. 8:48-49.

- Phillips PA, Abrahams JM, Kelly JM, Mooser V, Trinder D, Johnston CI. Localization of vasopressin binding sites in rat tissues using specific V1 and V2 selective ligands. *Endocrinology*. 1990. 126:1478–1484
- Quintanar-Stephano A, Chavira-Ramírez R, Kovacs K and Berczi I. Neurointermediate pituitary lobectomy decreases the incidence and severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Journal of Endocrinology*. 2005. 184:51–58
- Ramírez-Galicia G, Garduño-Juárez R, Correa-Basurto J, Deeb O. *Journal of Enzyme inhibition and Medicinal Chemistry*. 2012. 27:174-86.
- Randle JC, Bourque CW, Renaud LP. Alpha1-adrenergic receptor activation depolarizes rat supraoptic neurosecretory neurons in vitro. *Am J Physiol*. 1986;251:R569-R574.
- Raymond JR. Hereditary and acquired defects in signaling through the hormone-receptor-G protein complex. *Am J Physiol*. 1994. 266(2 Pt 2):F163-74.
- Reichlin S. *The neurohypophysis: physiological and clinical aspects*. Plenum publishing corporation. 1984. 101 pp.
- Reid IA. Role of nitric oxide in the regulation of renin and vasopressin secretion. *Front Neuroendocrinol* 1994. 15:351-383.
- Reyes Echeverría M. 2009. Estudio de toxicidad aguda del POLI-1 sobre hígado, riñón y sistema inmune. Tesis de maestría.
- Ridell DC, Mallonee R, Philips JA, et al. Chromosomal assignment of human sequences encoding arginine vasopressin-neurophysin II and growth hormone releasing factor. *Somat Cell Mol Genet*. 1985. 11:189-195.
- Robert F, Geenen V. Thymic neuropeptides and T lymphocyte development. *Ann NY Acad Sci*. 1992. 650:99-104.
- Robertson GL, Shelton RL, Athar S. The osmoregulation of vasopressin. *Kidney Int*. 1976. 10:25-37.

- 
- Robertson GL. Vaptans for the treatment of hyponatremia, *Nature Reviews Endocrinology*. 2011. 7:151-161.
- Robinson AG, Fitzsimmons MD. Vasopressin homeostasis: coordination of synthesis, storage and release. *Regul Pept*. 1993. 45(1-2):225-30.
- Robinson AG. DDAVP in the treatment of central diabetes insipidus. *N. engl. J. Med*. 1976. 294:507-511.
- Rodrigo J, Pena A, Murat B, Trueba M, Durroux T, Guillon G, Rognan D. Mapping the Binding Site of Arginine Vasopressin to V1a and V1b Vasopressin Receptors. *Molecular Endocrinology*. 2007. 21(2):512–523.
- Rosendo-Villalobos A. 2009. Síntesis de derivados del ácido antranílico y sus propiedades como antagonista a receptores de vasopresina. Tesis de maestría.
- Słusarz M, Gieidon A, Słusarz R, Ciarkowski J. Analysis of interactions responsible for vasopressin binding to human neurohypophyseal hormone receptors – molecular dynamics study of the activated receptor-vasopressin-G $\alpha$  systems. *J. Peptide Sci*. 2006. 12:180-189.
- Schrier RW, Berl T, Anderson RJ. Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release. *Am J Physiol*. 1979. 236:F321-F332.
- Serradeil-Le Gal C, Herbert JM, Delisee C, Schaeffer P, Raufaste D, Garcia C, Dol F, Marty E, Maffrand JP, Le Fur G. Effect of SR49059 a vasopressin V1a antagonist on human vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol*. 1995. 268:404–410.
- Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Derick S, Blankenstein S, Allen J, Pouzet B, Pascal M, Wagnon J, Ventura M A, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007. 293:R938–R949.

- Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Simiand J, Griebel G, Lacour C, Guillon G, et al. Characterization of SSR149415, a selective and orally-active vasopressin V1b receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002. 300:1122-30.
- Serradeil-Le Gal G, Wagnon J, Garcia G, Lacour C, Guinaudou P, Christophe B, et al. Biochemical and pharmacological properties of SR-49059, a new potent non-peptide antagonist of rat and human vasopressin V1 receptors. *J Clin Invest.* 1993. 92:224-31.
- Serradeil-LeGal C, Lacour C, Valette G, Garcia G, Foulon L, Galindo G, et al. Characterisation of SR 121 463A, a highly potent and selective, orally active vasopressin V2 receptor antagonist. *J Clin Invest.* 1996. 98:2729-38.
- Share L, Kimura T, Matsui K, et al. Metabolism of vasopressin. *Fed Proc.* 1985 44:59-61.
- Sherwood L (7Ed): *Human Physiology: From Cells to Systems*; California. Belmont :Brooks/Cole; 2009.
- Shimada Y, Akane H, Taniguchi N, Matsuhisa A, Kawano N, Kikuchi K, Yatsu T, Tahara A, Tomura Y, Kusayama T, Wada K, Tsukada J, Tsunoda T, Tanaka A. 2005. *Chem. Pharm. Bull.* 53:764-769.
- Shimada Y, Taniguchi N, Matsuhisa A, Sakamoto K, Yatsu T, Tanaka A. *Chem. Pharm. Bull.* 2000. 48:1644-1651.
- Shimada Y, Taniguchi N, Matsuhisa A, Yatsu T, Tahara A, Tanaka A. *Chem. Pharm. Bull.* 2003. 51:1075-1080.
- Sklar AH, Schrier R. Central nervous system mediators of vasopressin release. *Physiol Rev.* 1983. 63:1243-1280.
- Spilker B. *Multinational Drug Companies. Issues in Drug Discovery and Development.* 1989. Raven Press: New York.
- Tahara A, Tomura Y, Wada K, Kusayama T, Tsukada J, Takanashi M, Yatsu T, Uchida W, Tanaka A, Pharmacological profile of YM087, a novel potent nonpeptide vasopressin

- 
- V1A and V2 receptor antagonist, in vitro and in vivo. *J Phamacol Exp Ther.* 1997. 282:301-308.
- Tahtaoui C, Balestre M N, Klotz P, Rognan D, Barberis C, Mouillac B, Hibert M. Identification of the Binding Sites of the SR49059 Nonpeptide Antagonist into the V1a Vasopressin Receptor Using Sulfhydrylreactive Ligands and Cysteine Mutants as Chemical Sensors. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003. 278:40010-19.
- Thibonnier M, Roberts JM. Characterization of human platelet vasopressin receptors. *J. Clin. Invest.* 1985. 76:1857–1864.
- Thibonnier M. Vasopressin agonists and antagonists. *Horm. Res.* 1990. 34:124-128.
- Thrasher TN. Baroreceptor regulation of vasopressin and renin secretion: low-pressure versus high-pressure receptors. *Front Neuroendocrinol.* 1994. 15:157-196.
- Topliss JG (Ed). 1983. *Quantitative Structure-Activity Relationships of Drugs.* Academic Press: New York.
- Torres BA, Johnson HM. Neuroendocrine peptide hormone regulation of immunity. *Chem Immunol.* 1997. 69:155-84.
- Tsukada J, Tahara A, Tomura Y, Kusayama T, Wada K, Ishii N, Taniguchi N, Suzuki T, Yatsu T, Uchida W, Shibasaki M. *Vascular Pharmacology.* 2005. 42:47-55.
- Tsukada J, Tanaka A, Tomura Y, Wada K, Kusayama T, Ishii N, Motonori A, Yatsu T, Uchida W, Taniguchi N, Tanaka A. *Eur. J. Pharmacol.* 2002. 446:129-138.
- Tsunoda T, Tanaka A, Mase T, Sakamoto S. A new synthetic route to YM087, an arginine vasopressin antagonist. *Heterocycles.* 2004. 63(5):1113-1122.
- Tuppy H. The amino-acid sequence in oxytocin. *Biochim Biochim Acta (Amst)*, 1953. 11:449-450.

- Tute MS. 1990. History and Objectives of Quantitative Drug Design. *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Vol. 4. Quantitative Drug Design. Hansch C., Sammes PG., Taylor JB., (Eds) Pergamon Press: Oxford. 1-31.
- Udelson JE, Smith WB, Hendrix GH, et al, "Acute hemodynamic effects of conivaptan, a dual V(1A) and V(2) vasopressin receptor antagonist, in patients with advanced heart failure". *Circulation*. 2001. 104:2417–23.
- Van Balkom BWM, Savelkoul PJ, Markovich D, Hofman E, Nielsen S, van der Sluijs P, Deen PMT. The role of putative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem*. 2002. 277:41473–41479
- Verbalis JG, Goldsmith SR, Greenberg A, Schrier RW, Sterns RH. Hyponatremia treatment guidelines 2007: expert panel recommendations. *Am J Med*. 2007. 120:S1-21.
- Vincent JL, Su F. Physiology and pathophysiology of the vasopressinergic system. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2008. 22:243-252.
- Wang BC, Flora-Ginter G, Leadley RJ Jr, et al. Ventricular receptors stimulate vasopressin release during hemorrhage. *Am J Physiol*. 1988. 254:R204-R211.
- Yamamura Y, Nakamura S, Itoh S, Hirano T, Onogawa T, Yamashita T, Yamada Y, Tsujimae K, Aoyama M, Kotosai K, Ogawa H, Yamashita H, Kondo K, Tominaga M, Tsujimoto G, Mori T. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1998. 287:860–867.
- Yamamura Y, Ogawa H, Chihara T, Kondo K, Onogawa T, Nakamura S, Mori T, Tominaga M, Yabuuchi Y. *Science*. 1991, 252, 572–574.
- Yamamura Y, Ogawa H, Yamashita H, Chihara T, Miyamoto H, Nakamura S, et al. Characterization of a novel aquoretic agent OPC-31260 as an orally effective nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist. *Br J Pharmacol*. 1992. 105:787-791.

Zaoral M, Kole J, Sorm F. Amino acids and peptides. LXXI. Synthesis of 1-deamino-8-D-lysine vasopressin, and 1-deamino-8-D-arginine vasopressin. Coll. Czech. Chem. Commun. 1967. 32:1250-1257.

Zerbe R, Stropes L, Robertson G. Vasopressin function in the syndrome of inappropriate antidiuresis. Ann Rev Med. 1980. 3:315-27.



## ANEXOS

ANEXO 1. ESPECTROS IR

ANEXO 2. ESPECTROS NMR DE  $^1\text{H}$  Y  $^{13}\text{C}$





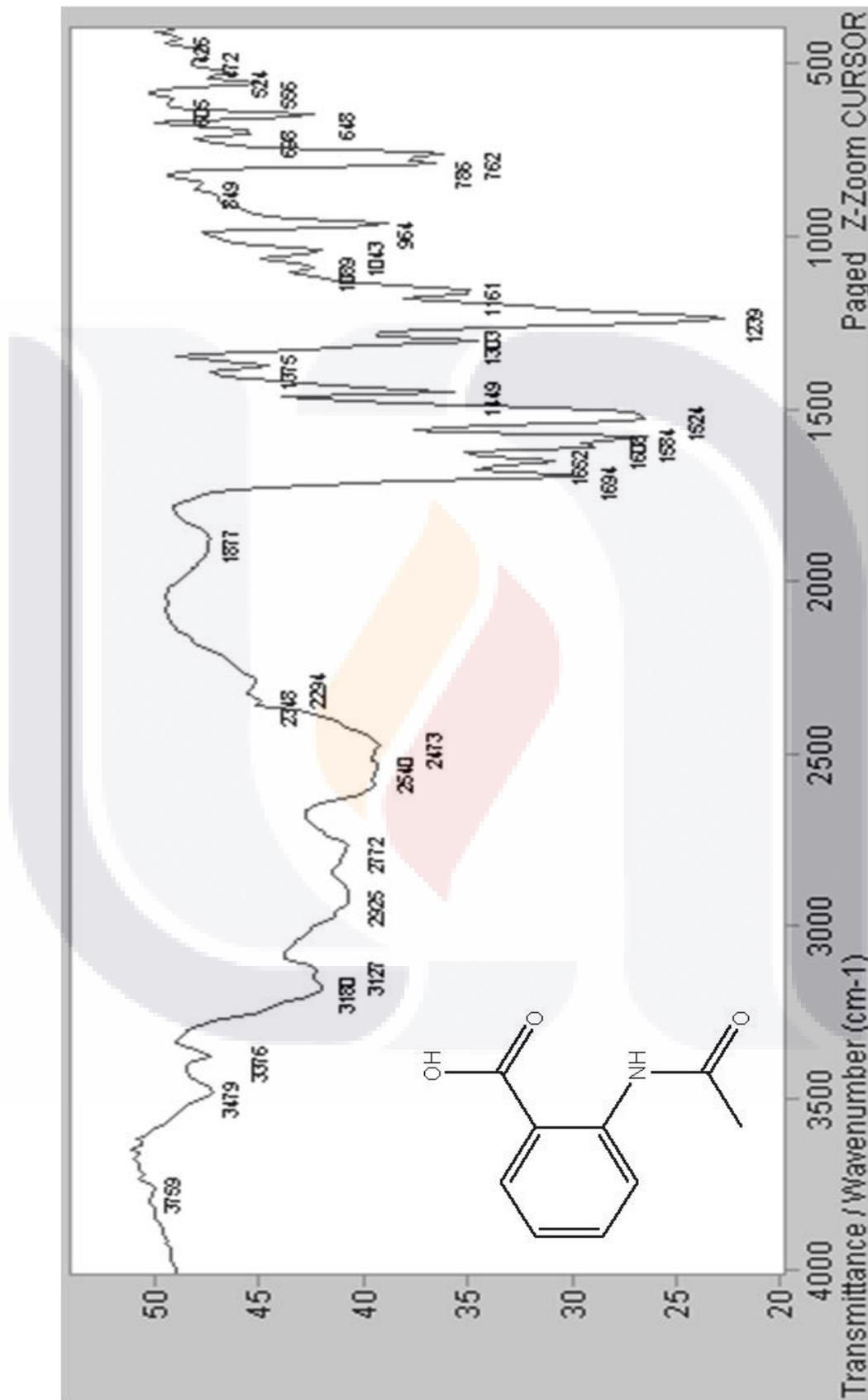


Figura 41. Espectro IR de C1.

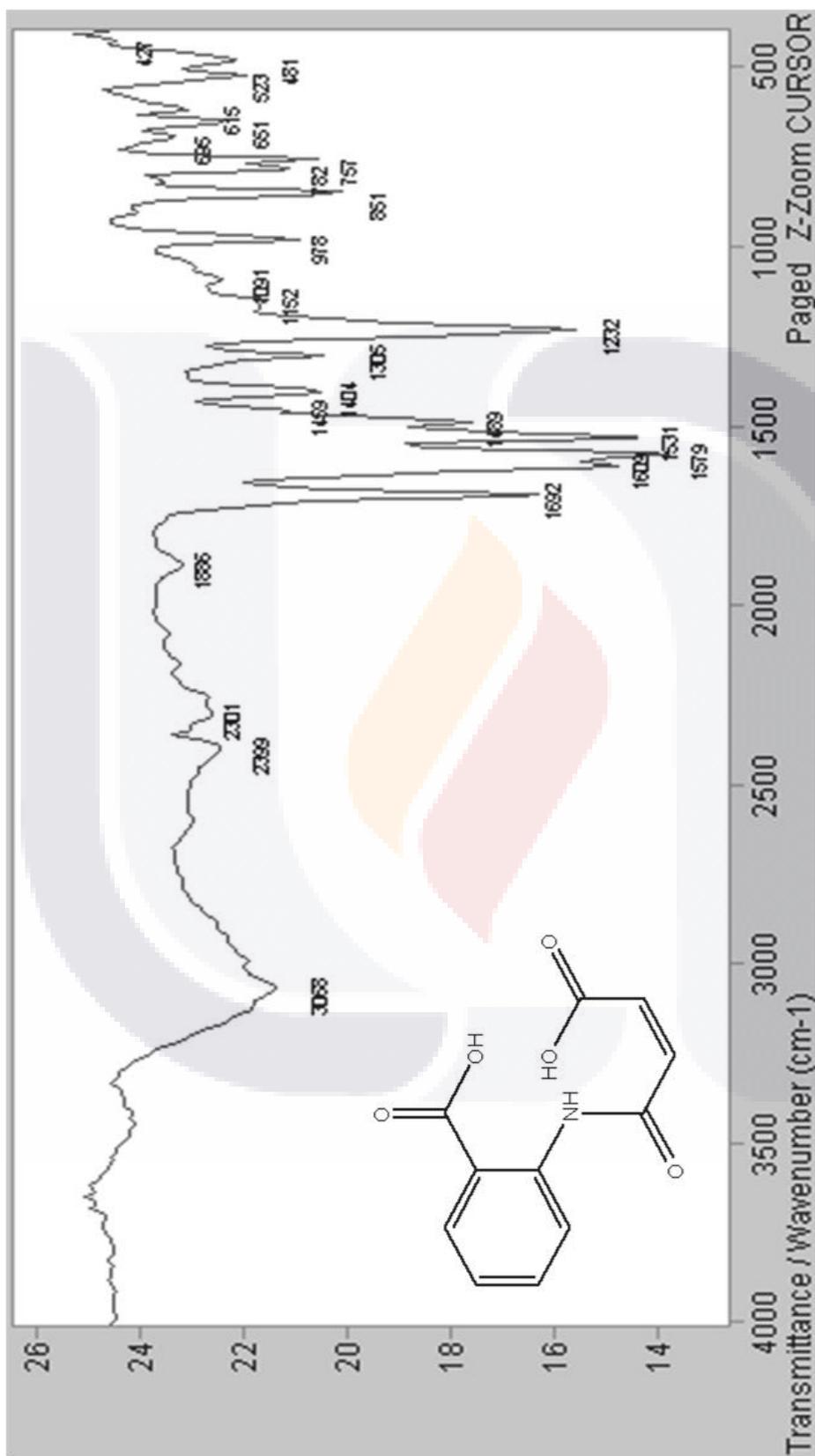


Figura 42. Espectro IR de C2.

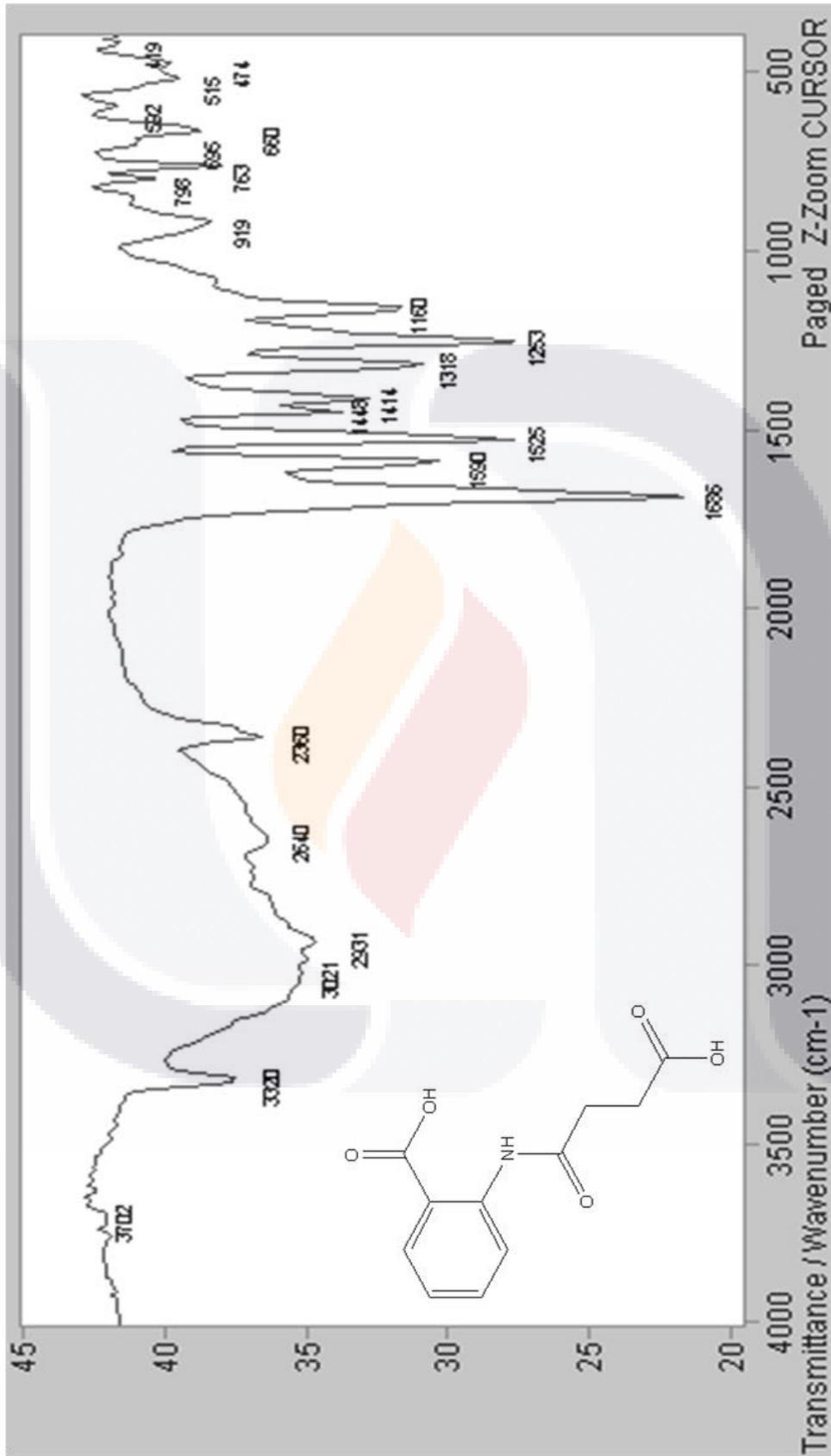


Figura 43. Espectro IR de C3.

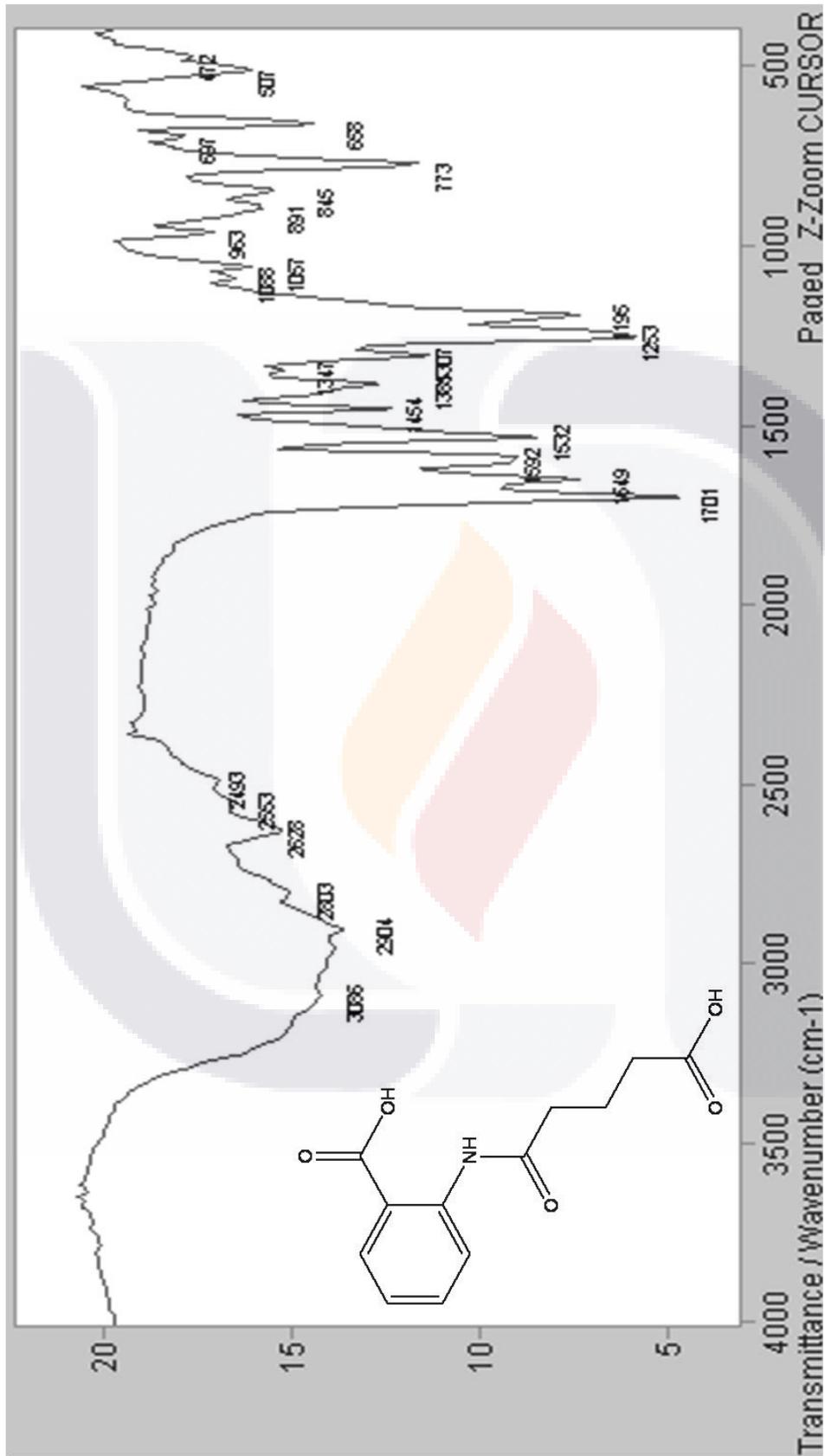


Figura 44. Espectro IR de C4.

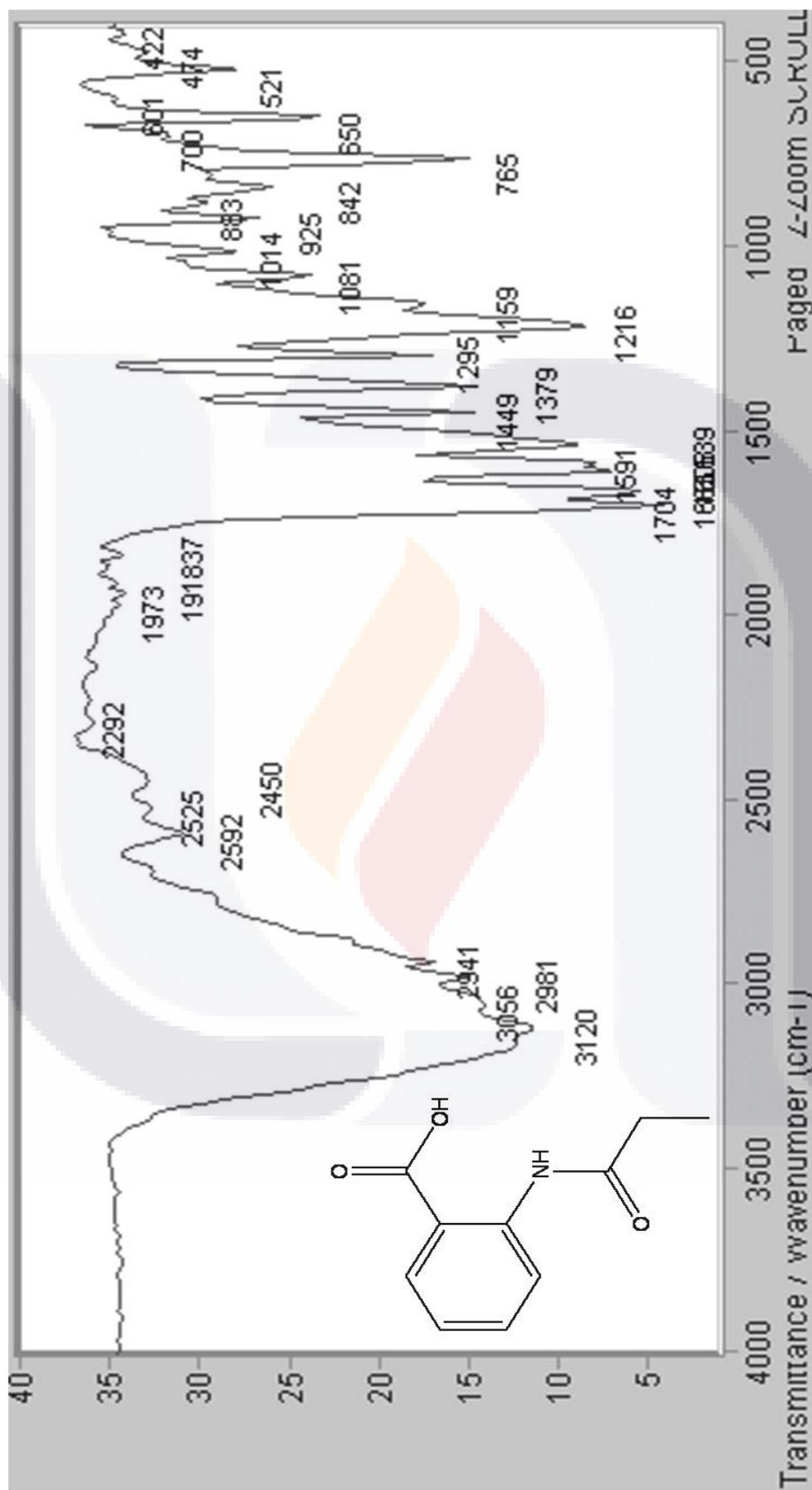


Figura 45. Espectro IR de C5.

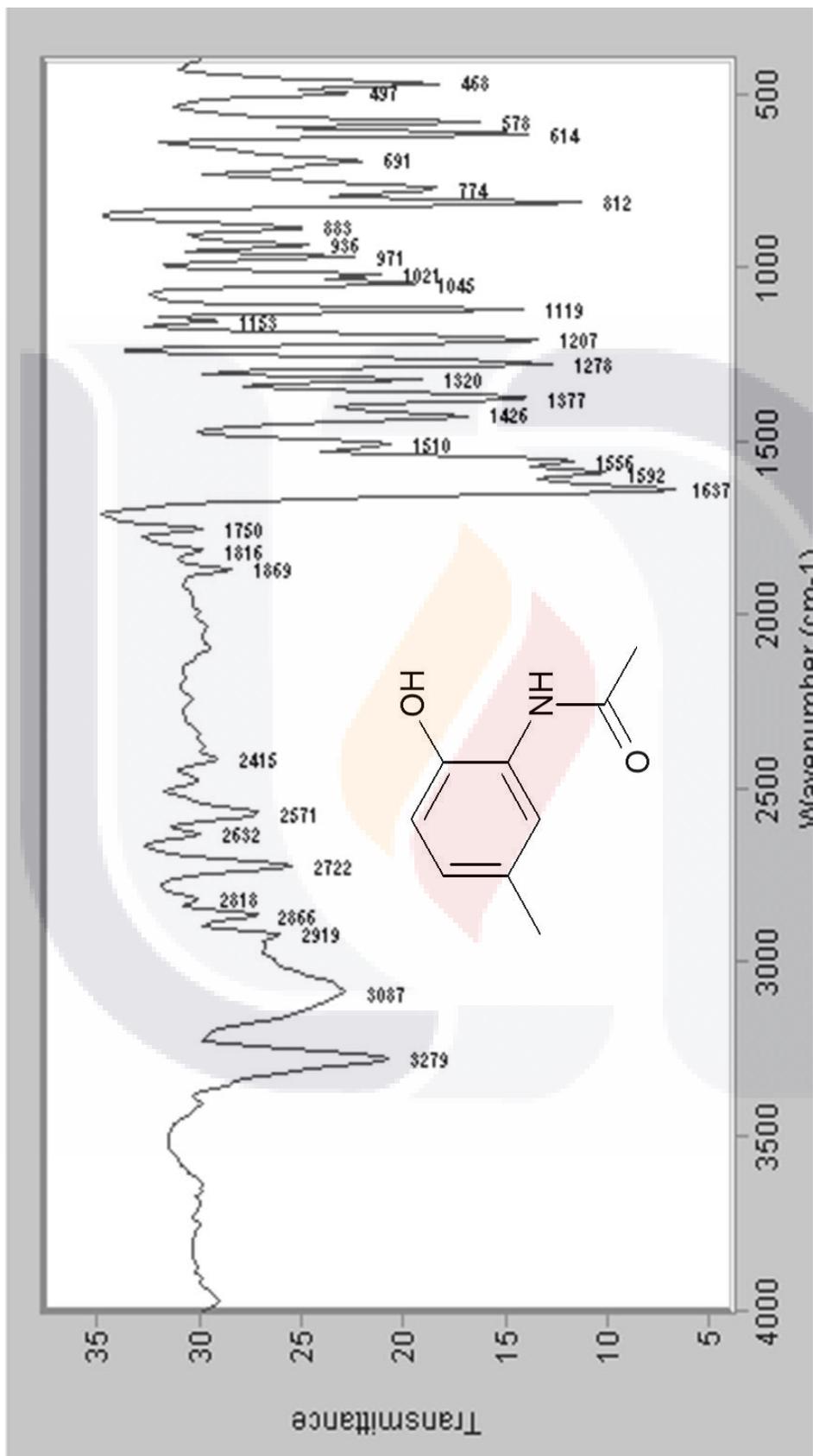


Figura 46. Espectro IR de C11.

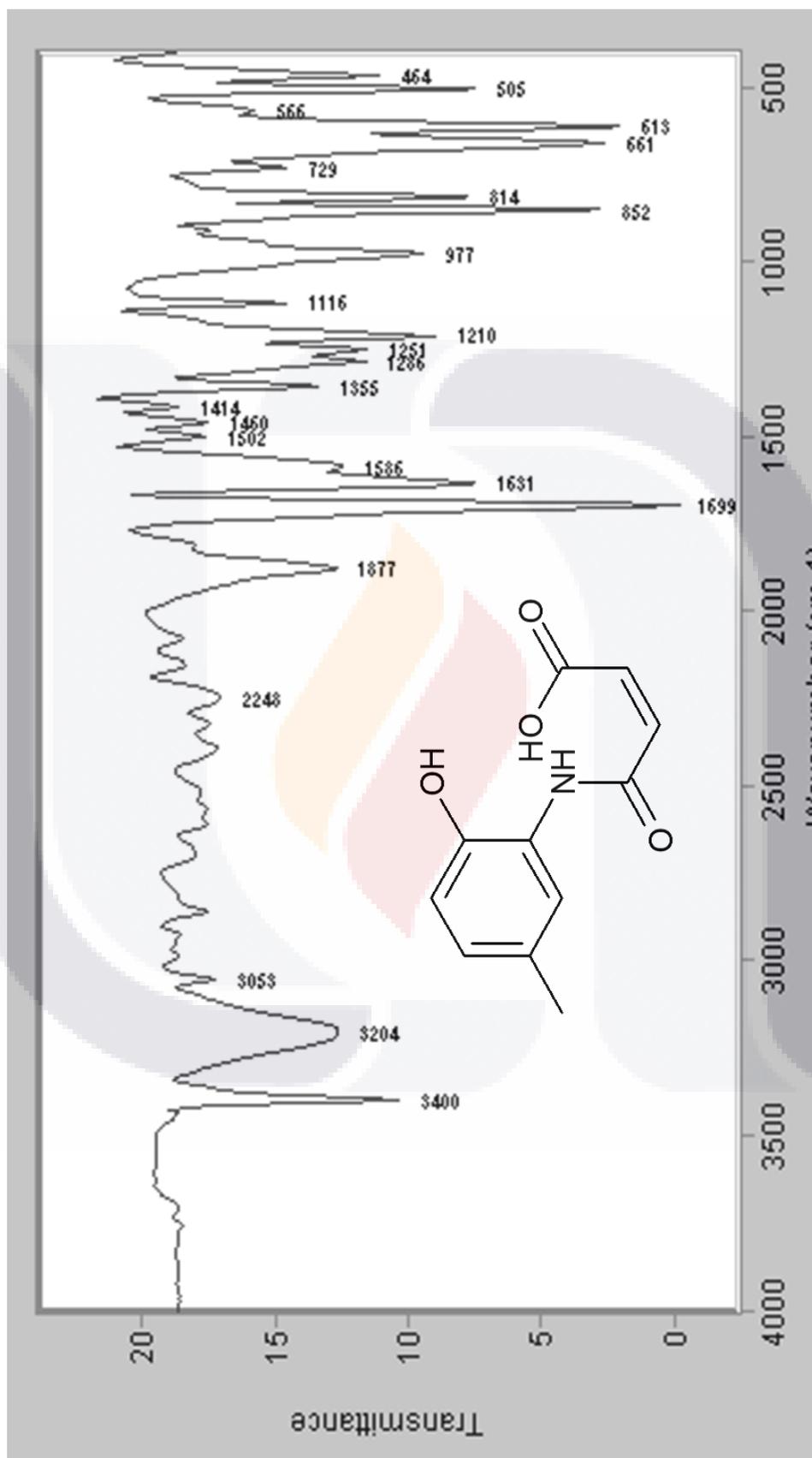
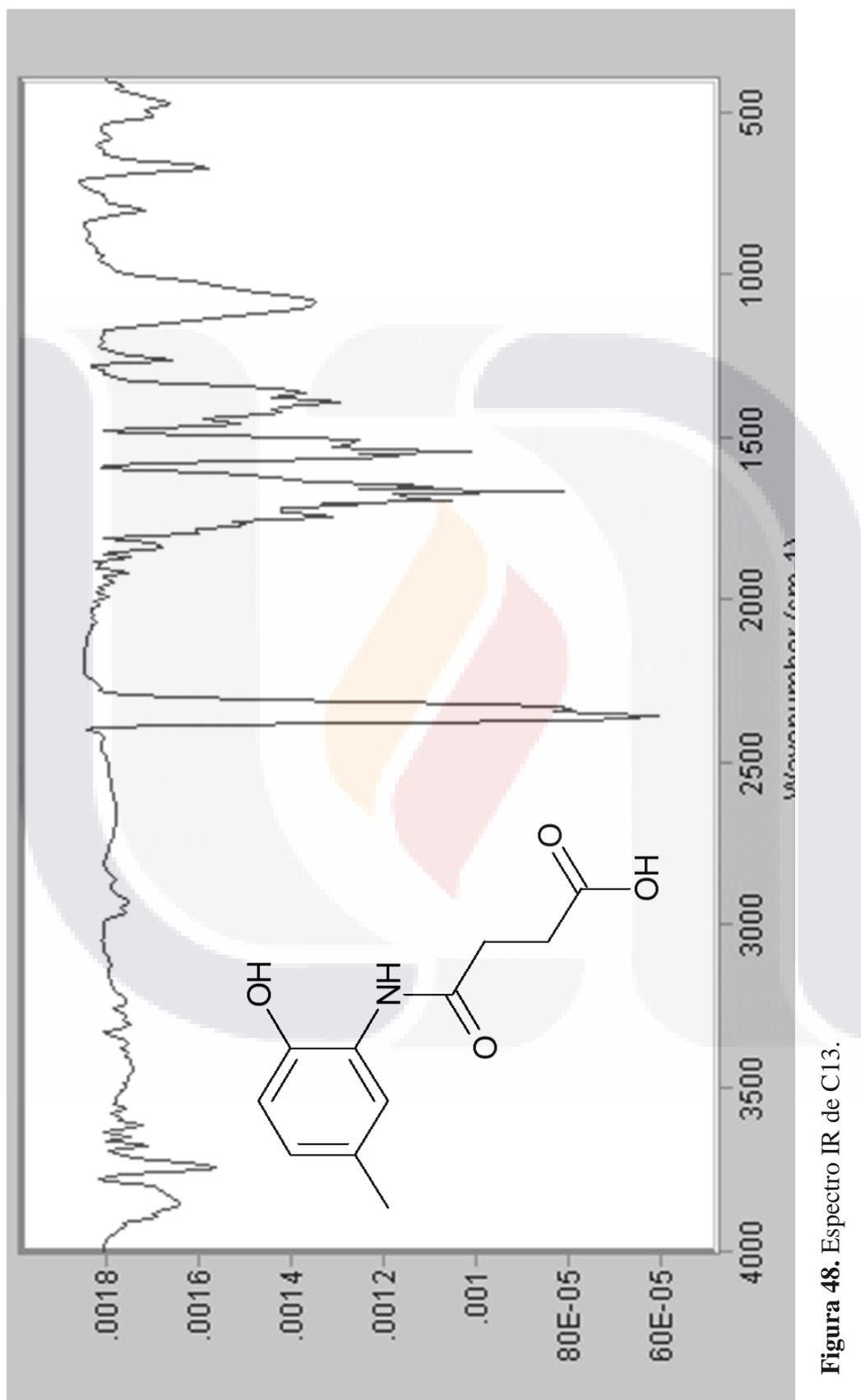


Figura 47. Espectro IR de C12.



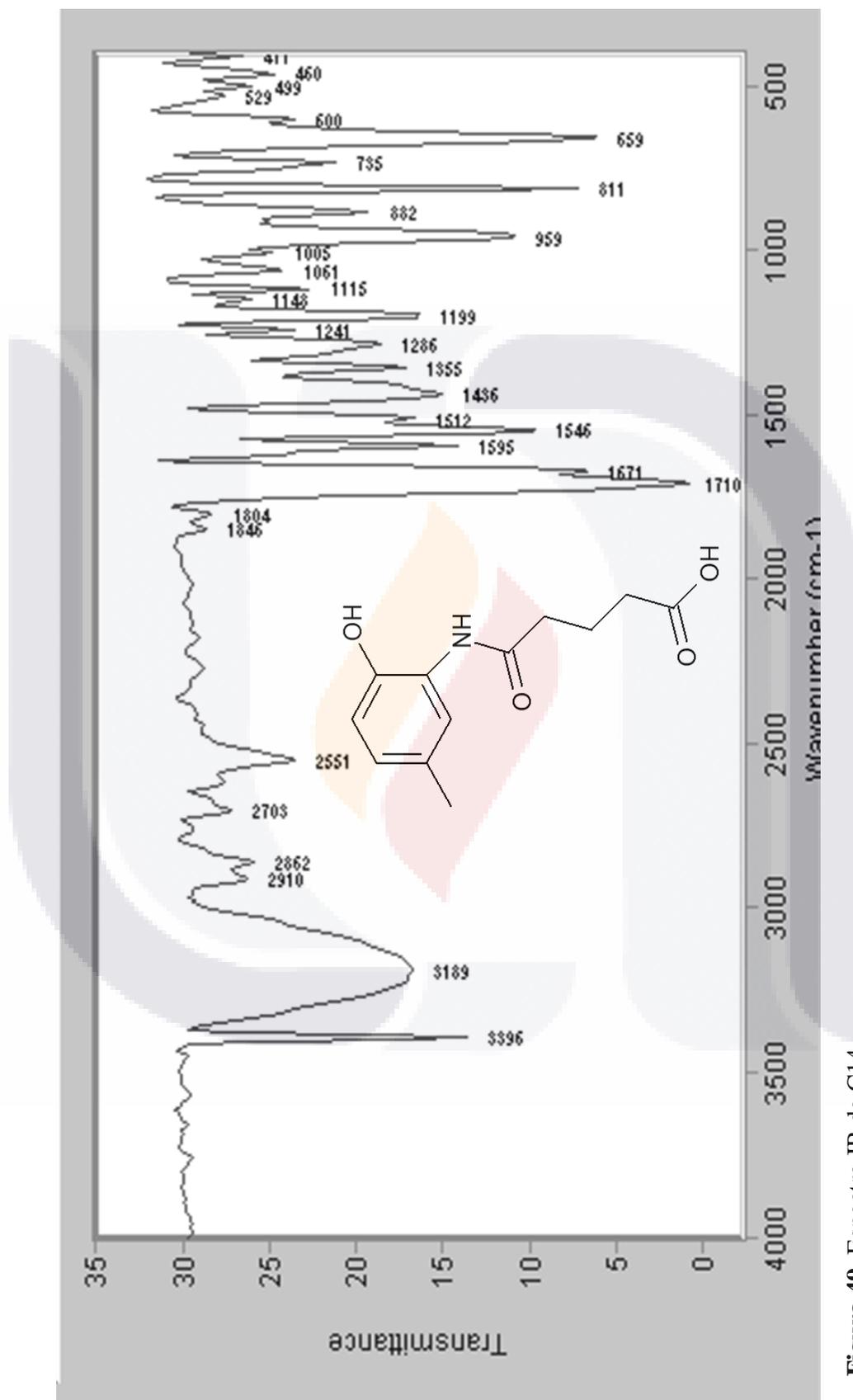


Figura 49. Espectro IR de C14.

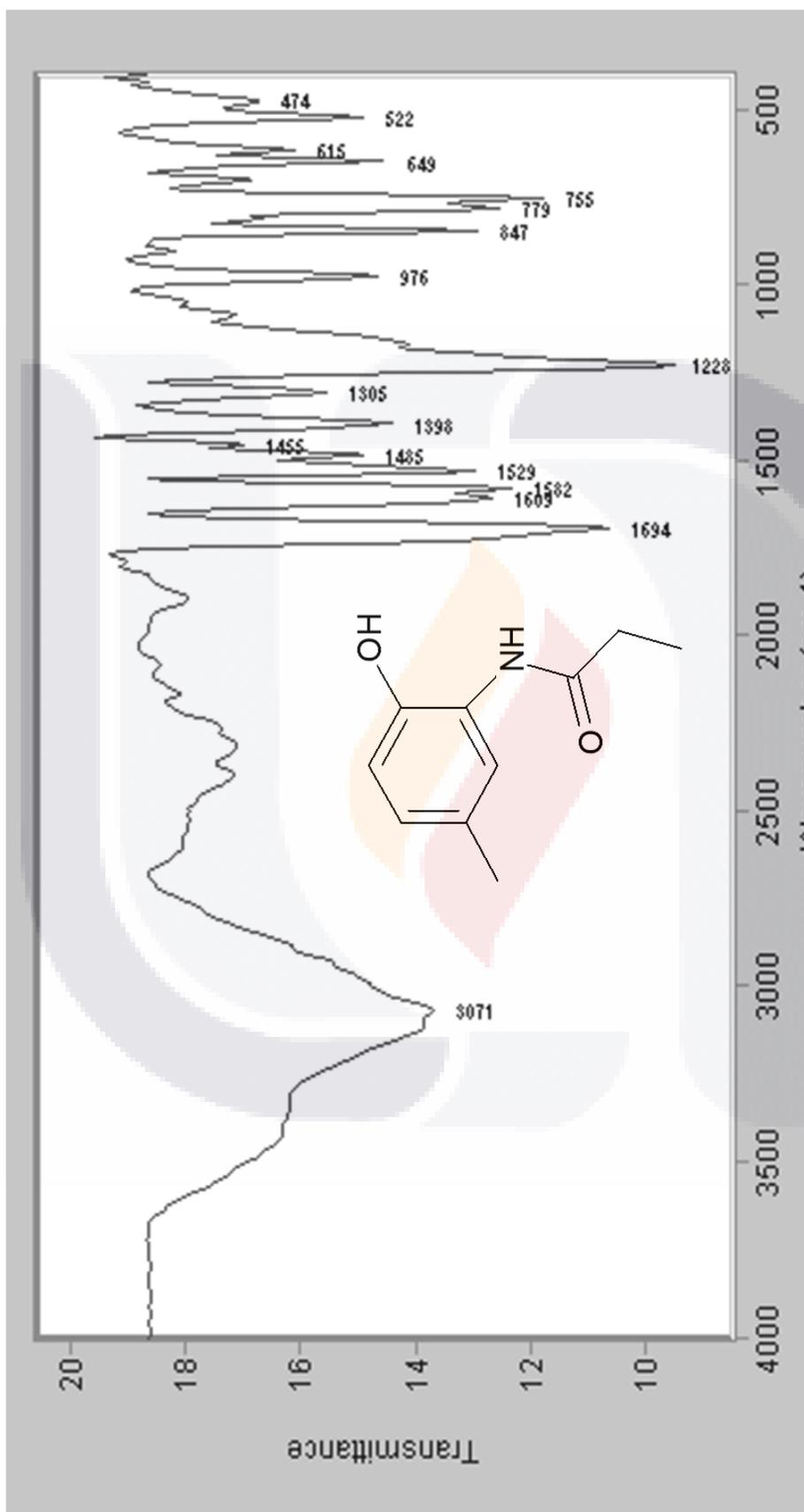


Figura 50. Espectro IR de C15.

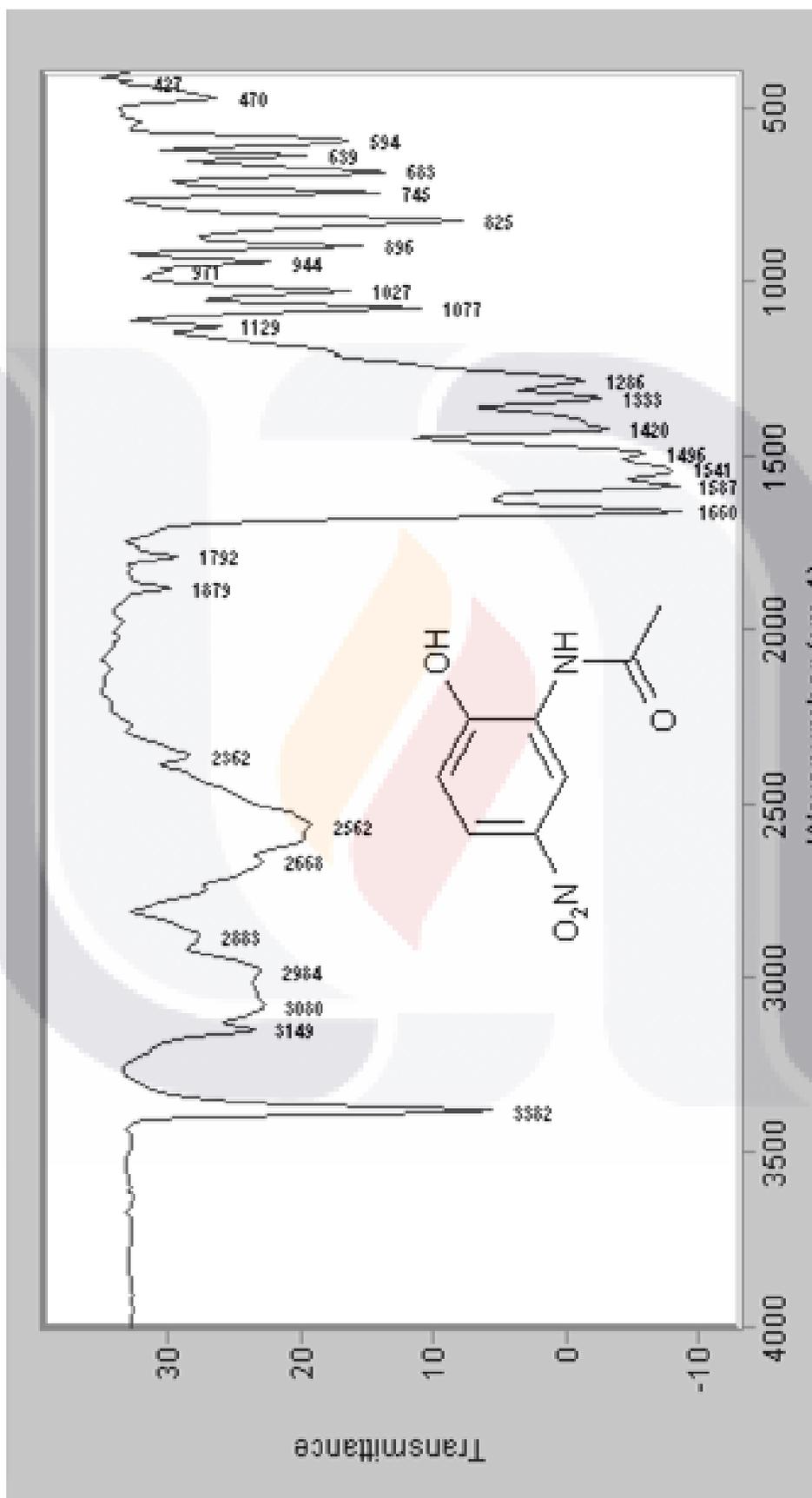


Figura 51. Espectro IR de C21.

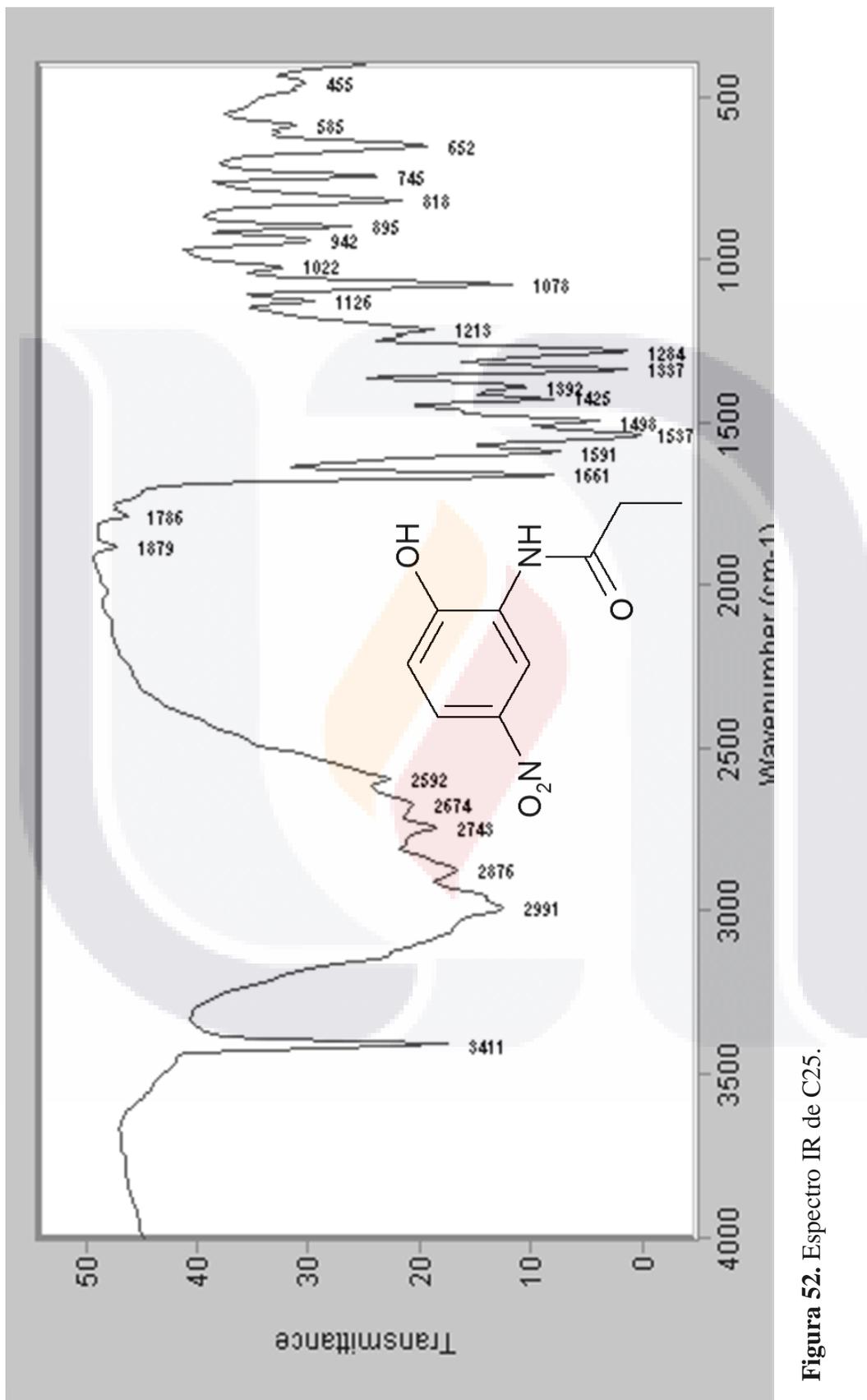


Figura 52. Espectro IR de C25.

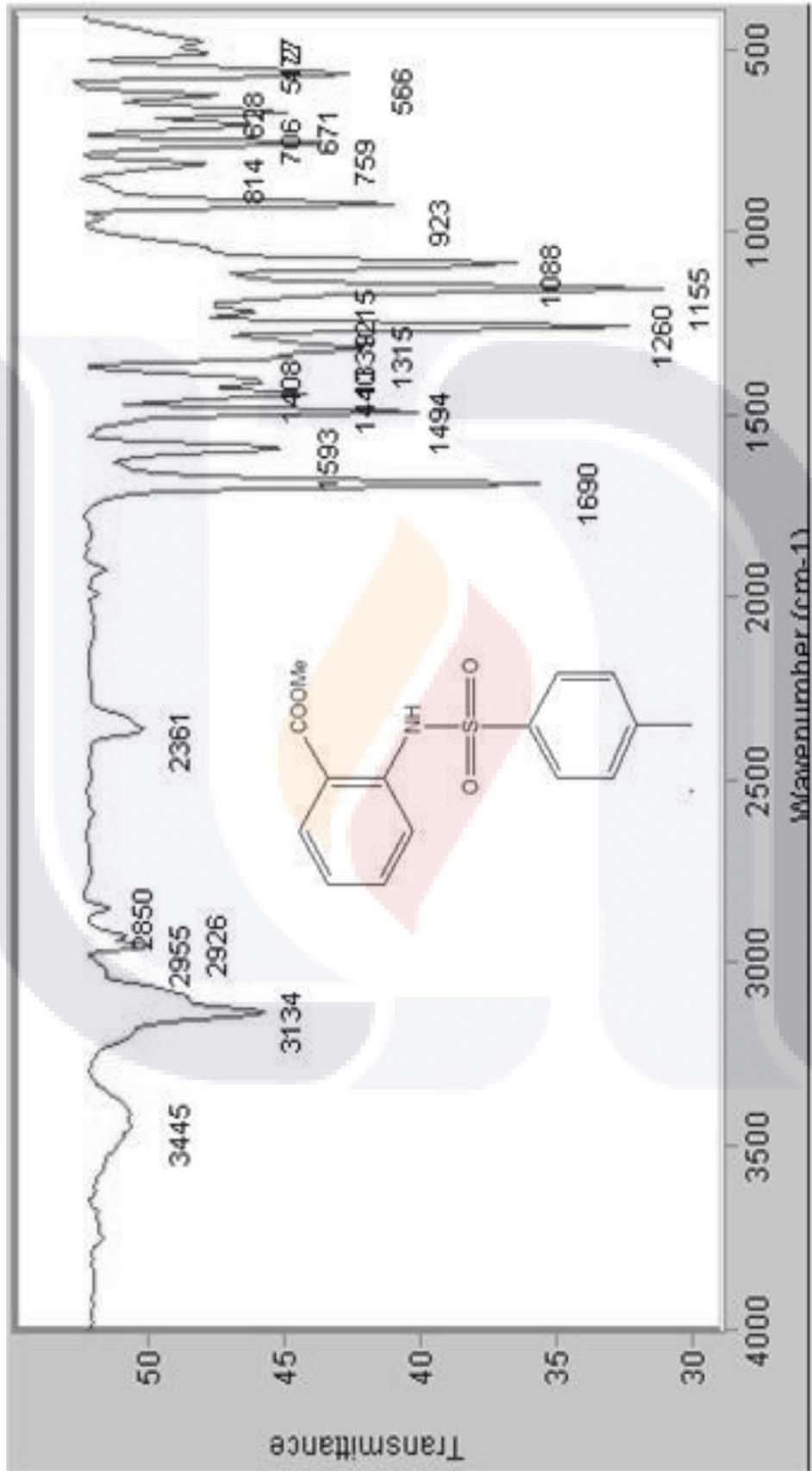


Figura 53. Espectro IR de C2.

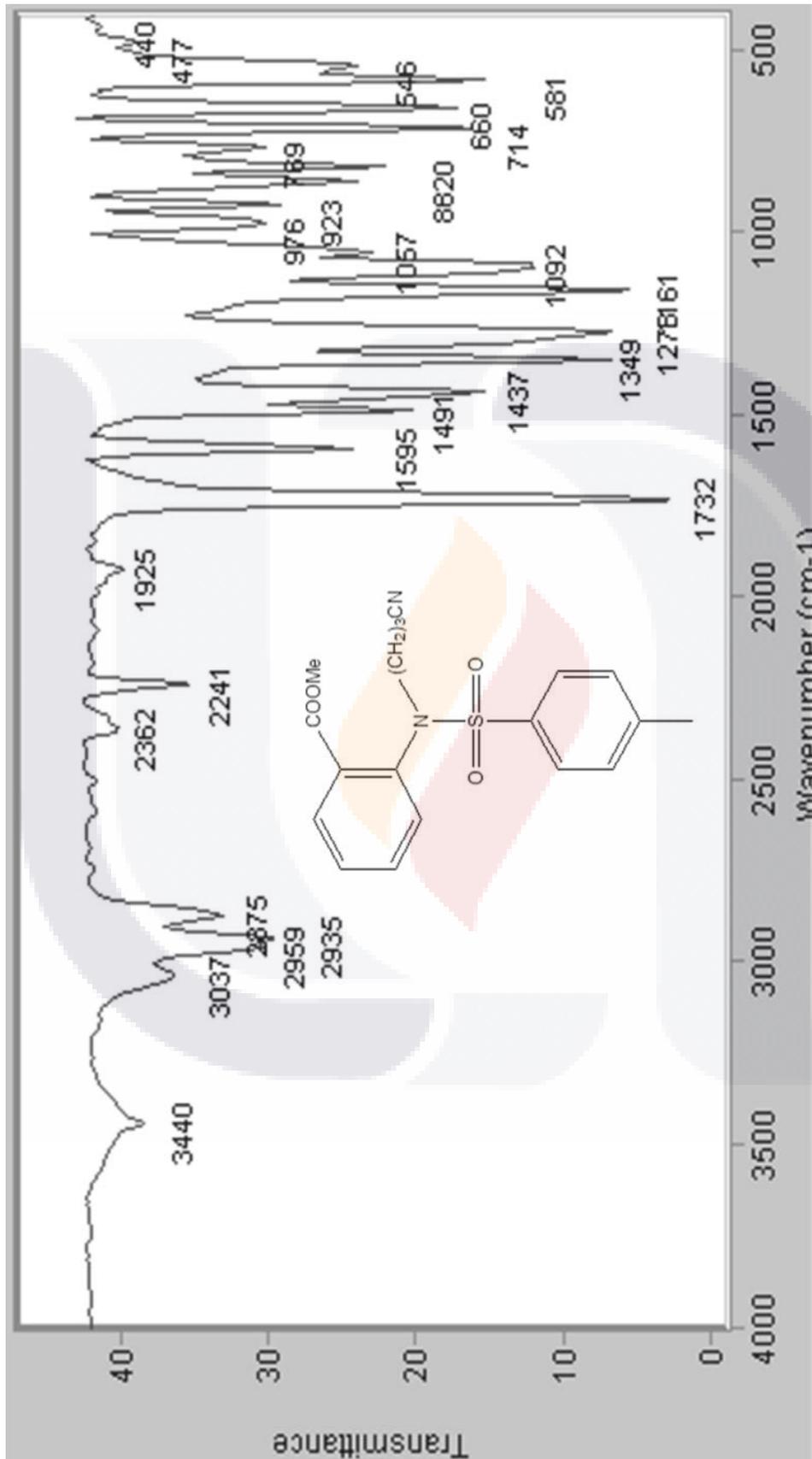


Figura 54. Espectro IR de C3.

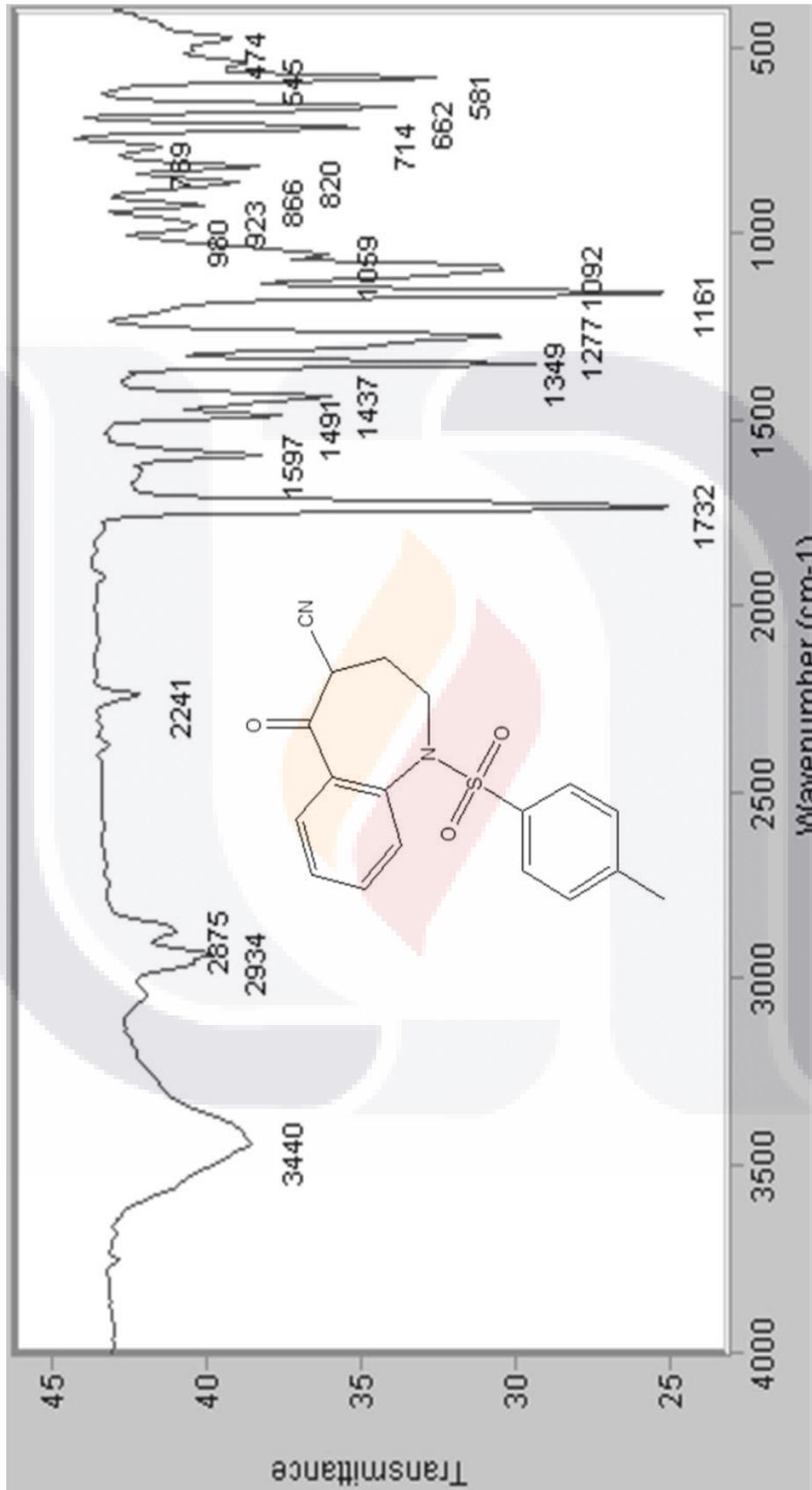
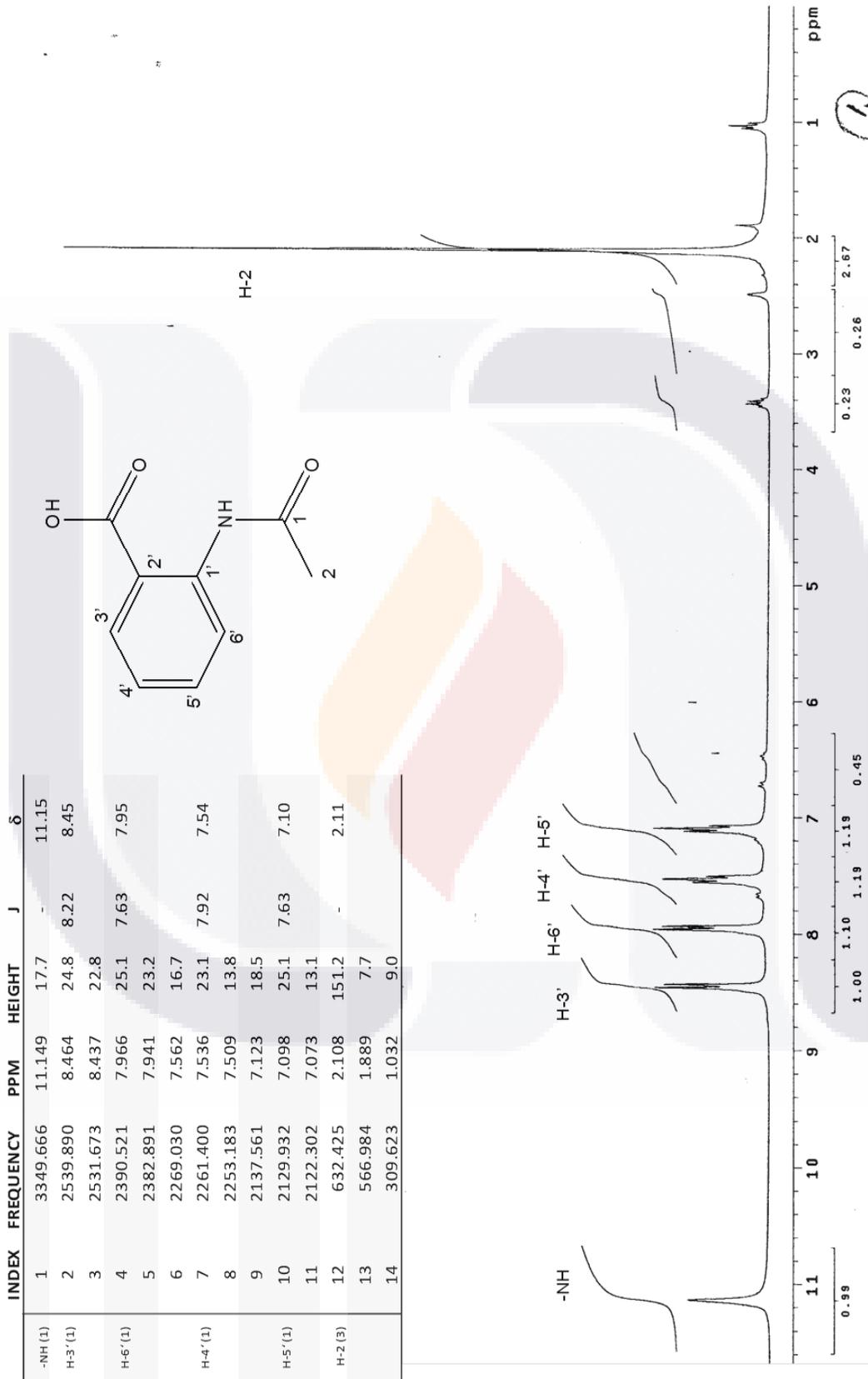


Figura 55. Espectro IR de C9.









**Figura 56.** NMR de  $^1\text{H}$  para C1. La asignación de las señales, la constante de acoplamiento (J) y la constante de desplazamiento ( $\delta$ ) se encuentran en la tabla.

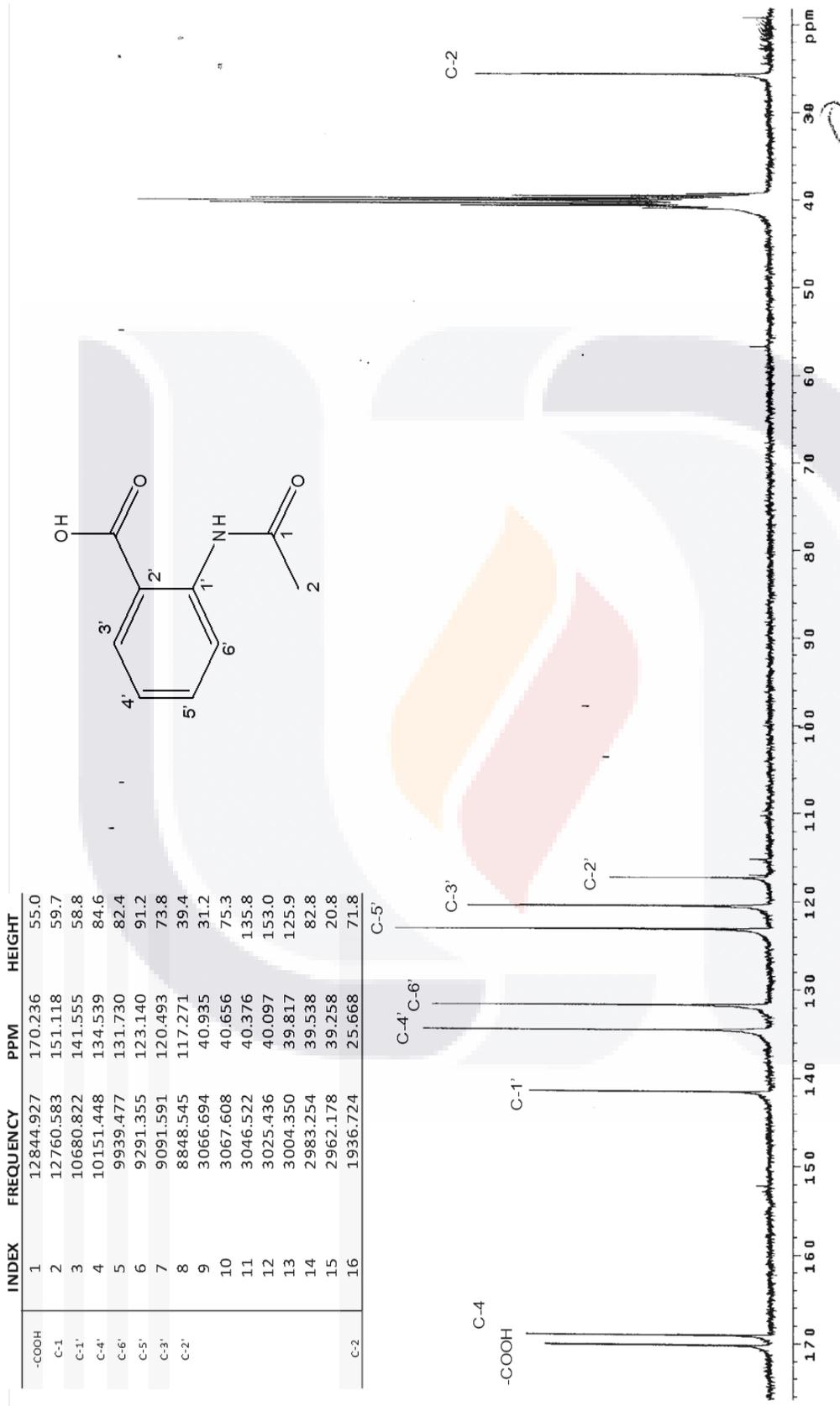
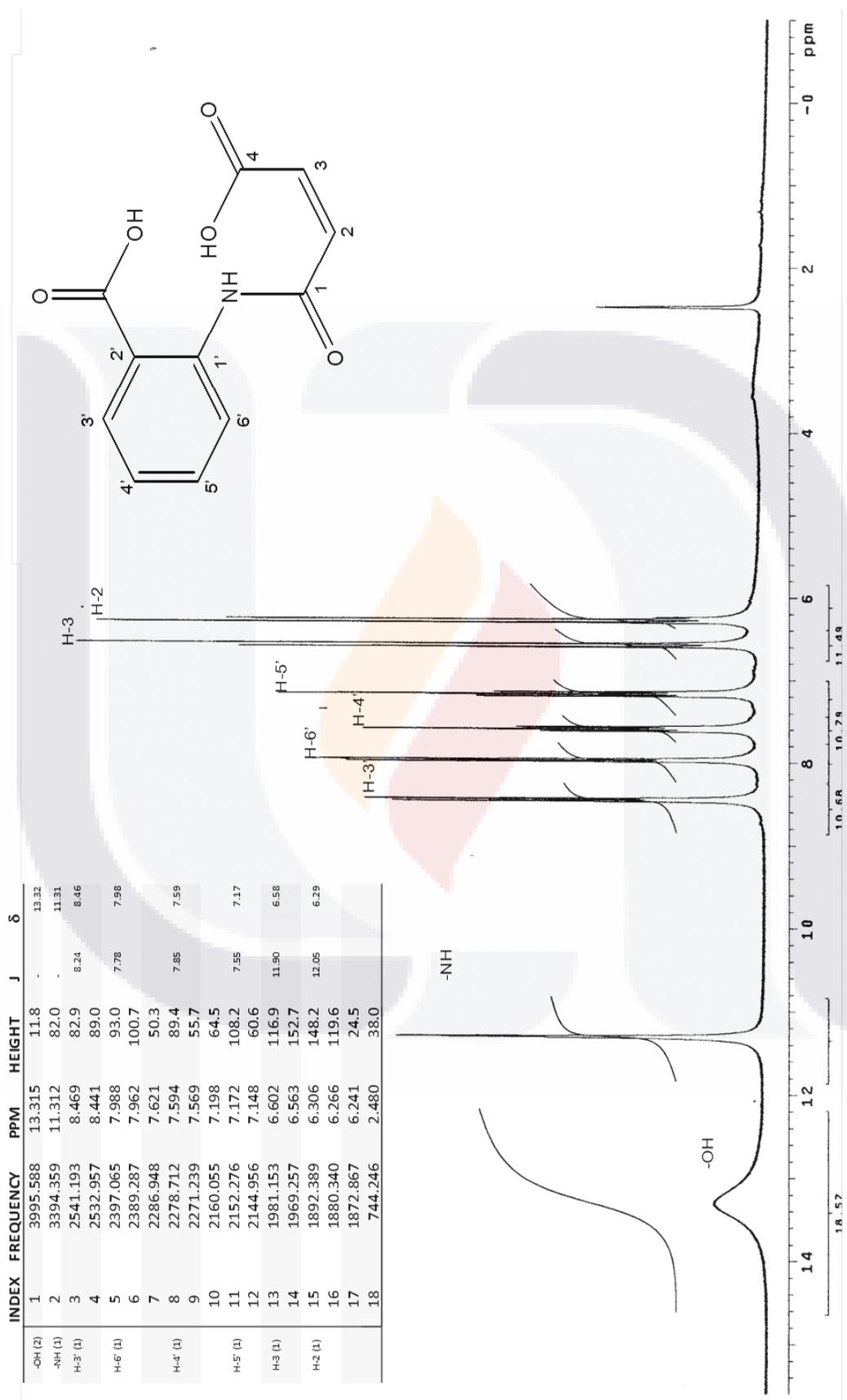


Figura 57. NMR de <sup>13</sup>C para C1. La asignación de las señales se encuentra en la tabla.



**Figura 58.** NMR de <sup>1</sup>H para C2. La asignación de las señales, la constante de acoplamiento (J) y la constante de desplazamiento ( $\delta$ ) se encuentran en la tabla.

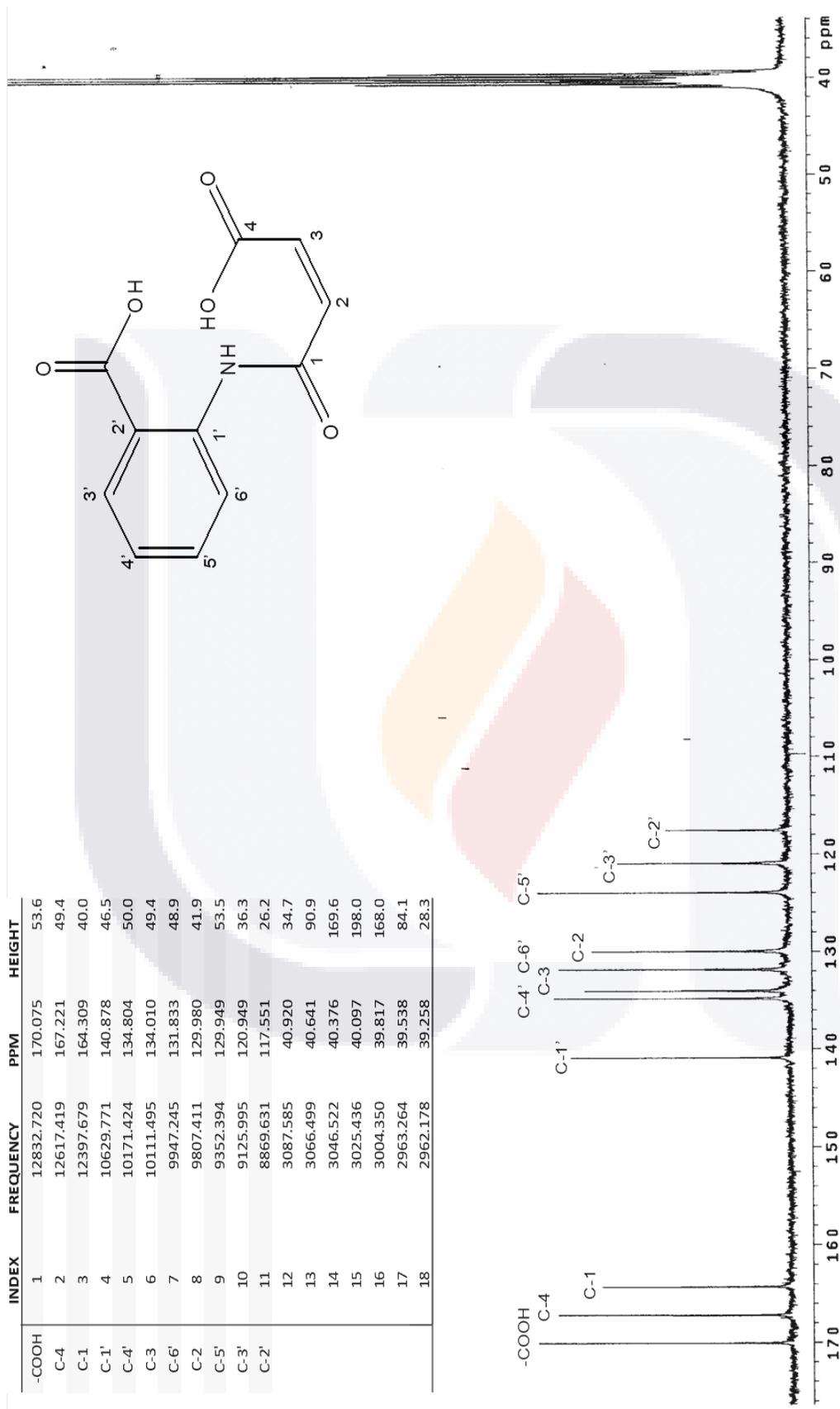
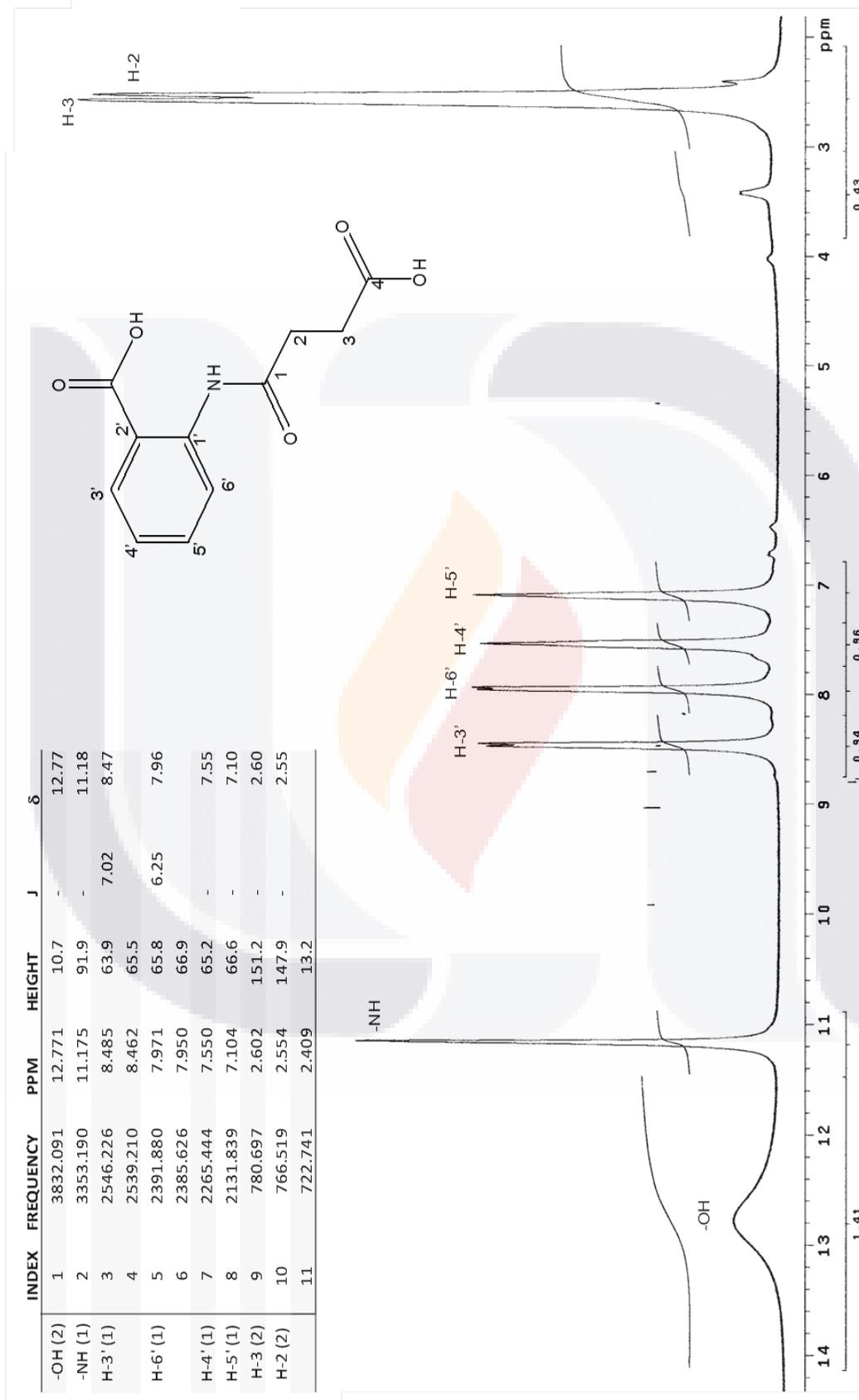


Figura 59. NMR de <sup>13</sup>C para C2. La asignación de las señales se encuentra en la tabla.



**Figura 60.** NMR de  $^1\text{H}$  para C3. La asignación de las señales, la constante de acoplamiento (J) y la constante de desplazamiento ( $\delta$ ) se encuentran en la tabla.

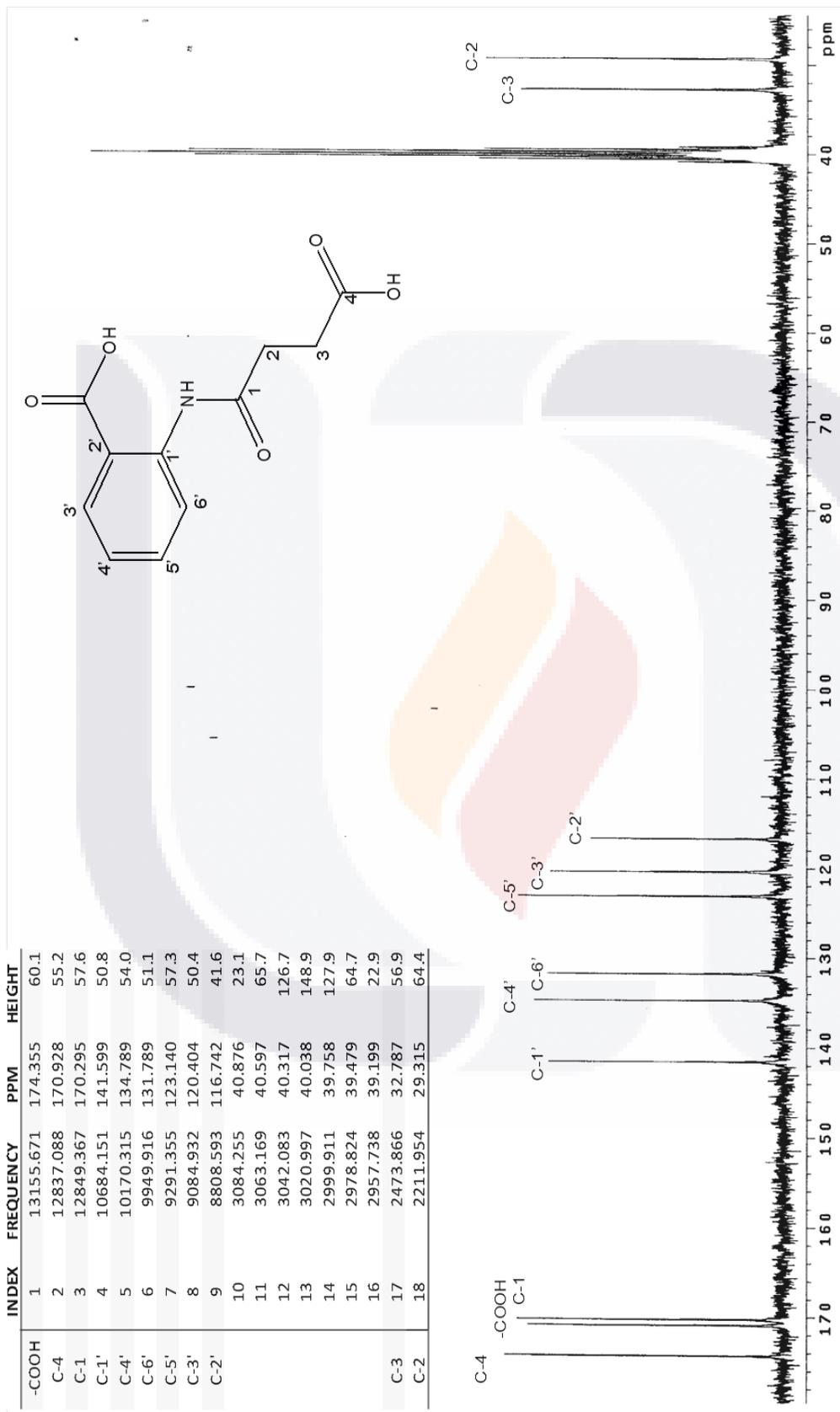


Figura 61. NMR de <sup>13</sup>C para C3. La asignación de las señales se encuentra en la tabla.

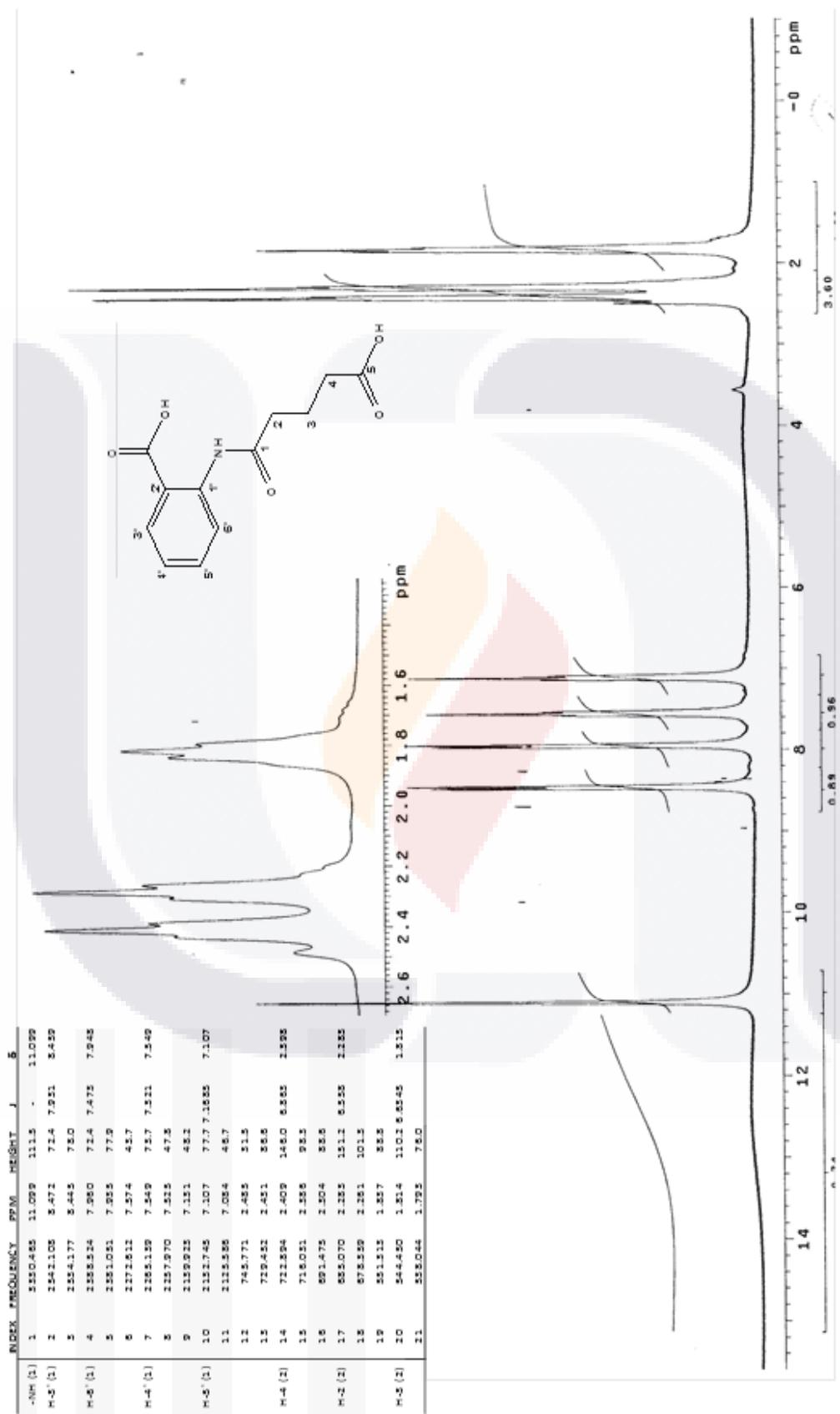


Figura 62. NMR de <sup>1</sup>H para C4. La asignación de las señales, la constante de acoplamiento (J) y la constante de desplazamiento (δ) se encuentran en la tabla.

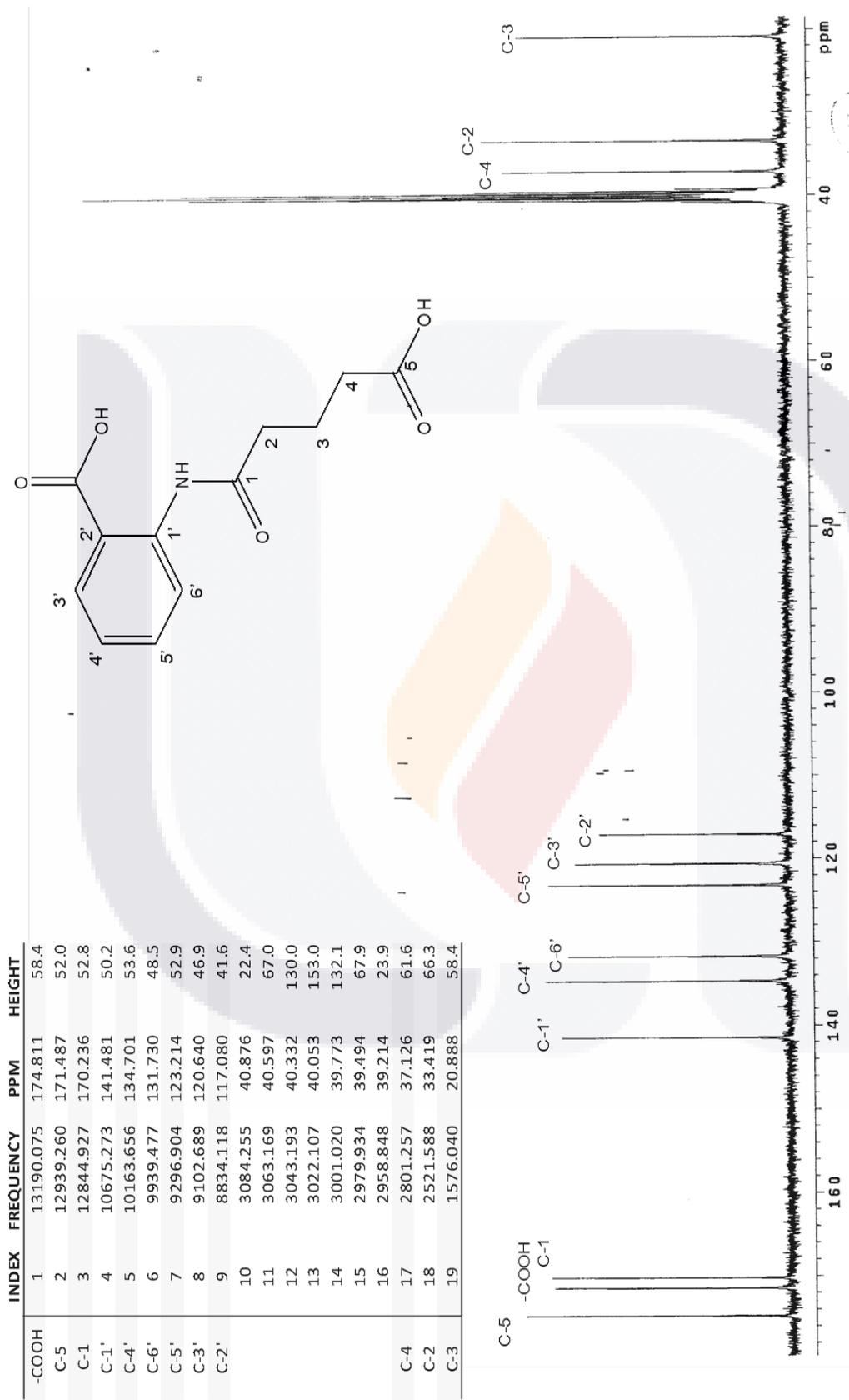
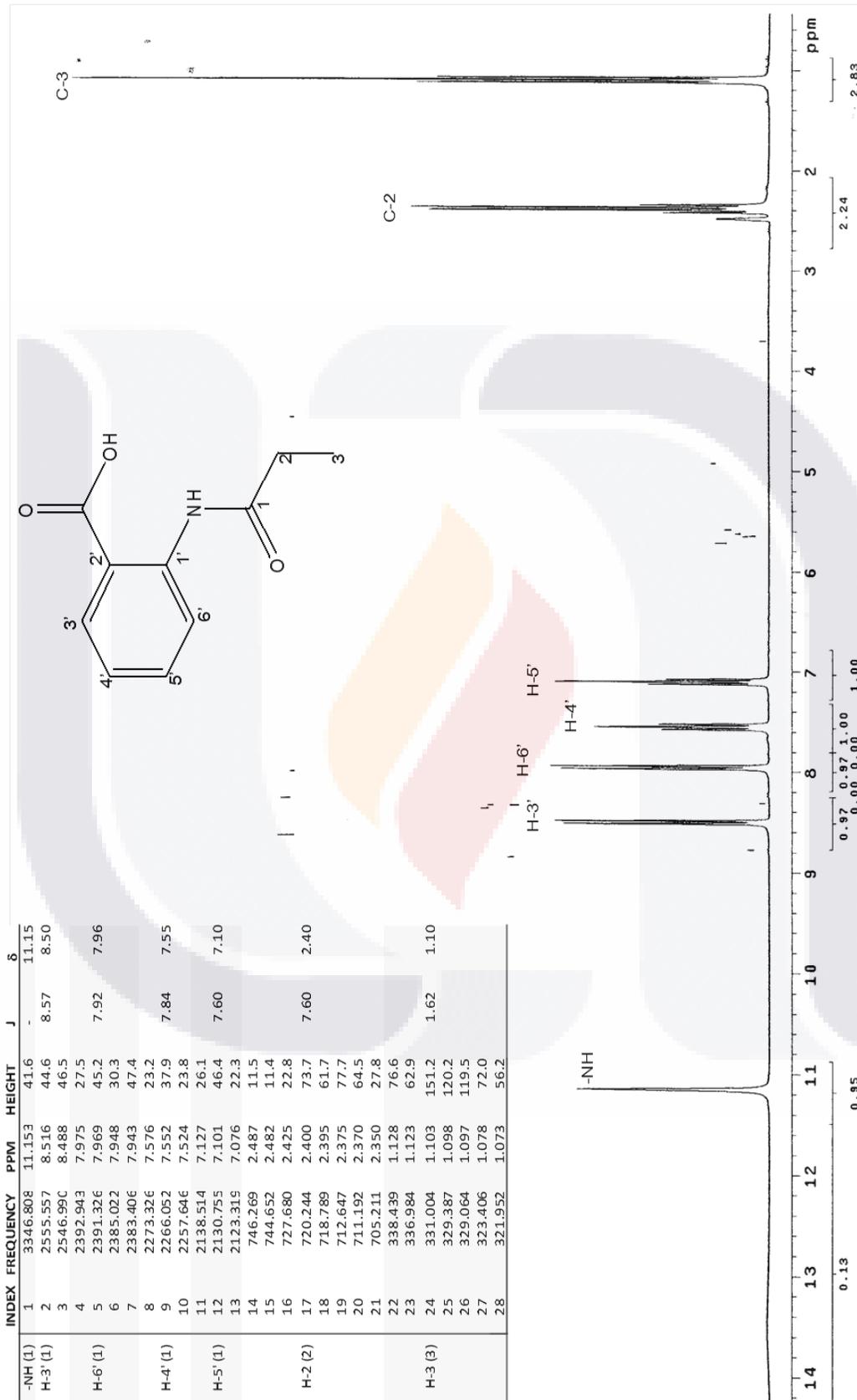


Figura 63. NMR de <sup>13</sup>C para C4. La asignación de las señales se encuentra en la tabla.



**Figura 64.** NMR de  $^1\text{H}$  para C5. La asignación de las señales, la constante de acoplamiento (J) y la constante de desplazamiento ( $\delta$ ) se encuentran en la tabla.

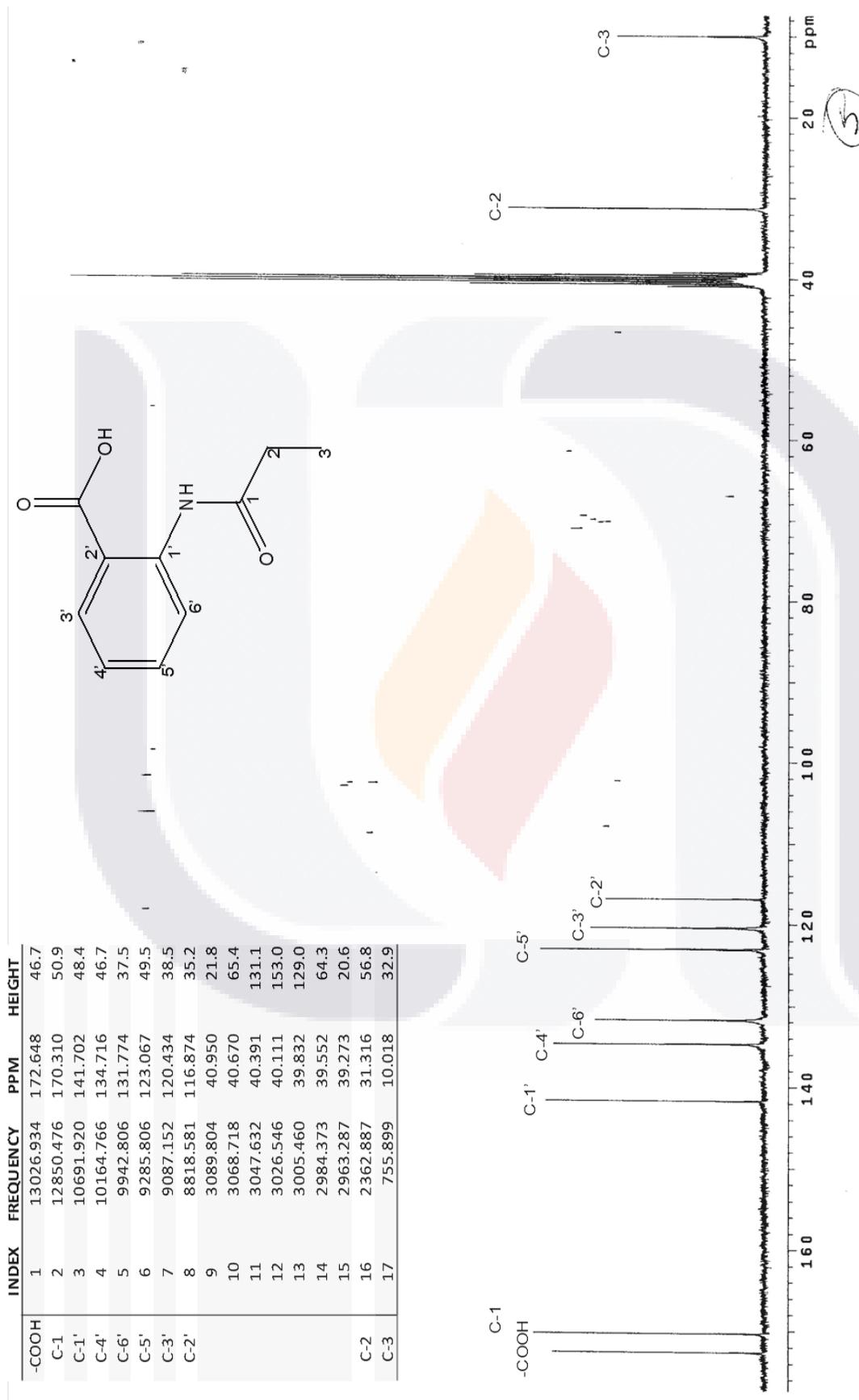
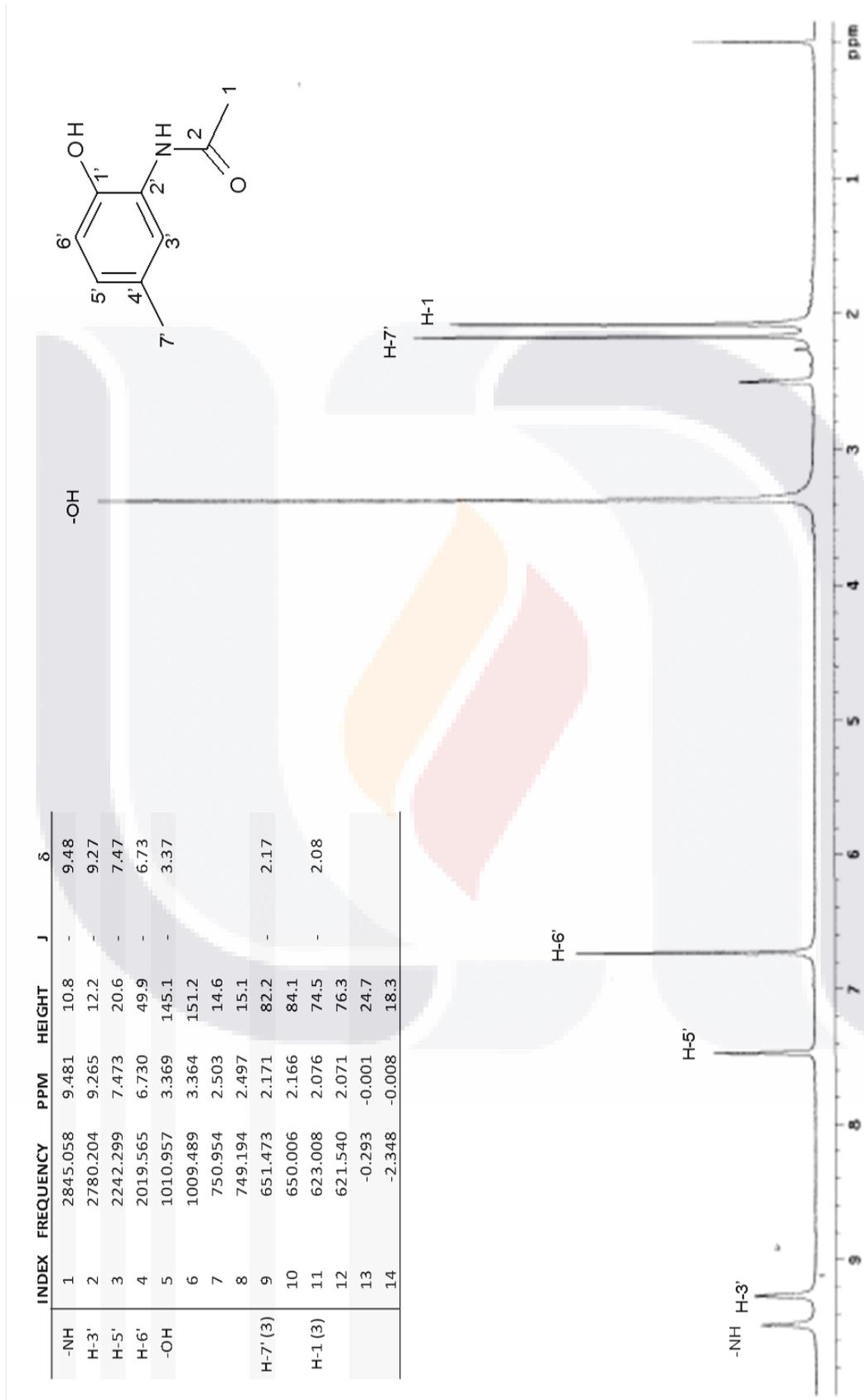


Figura 65. NMR de <sup>13</sup>C para C5. La asignación de las señales se encuentra en la tabla.



**Figura 66.** NMR de  $^1\text{H}$  para C11. La asignación de las señales, la constante de acoplamiento (J) y la constante de desplazamiento ( $\delta$ ) se encuentran en la tabla.

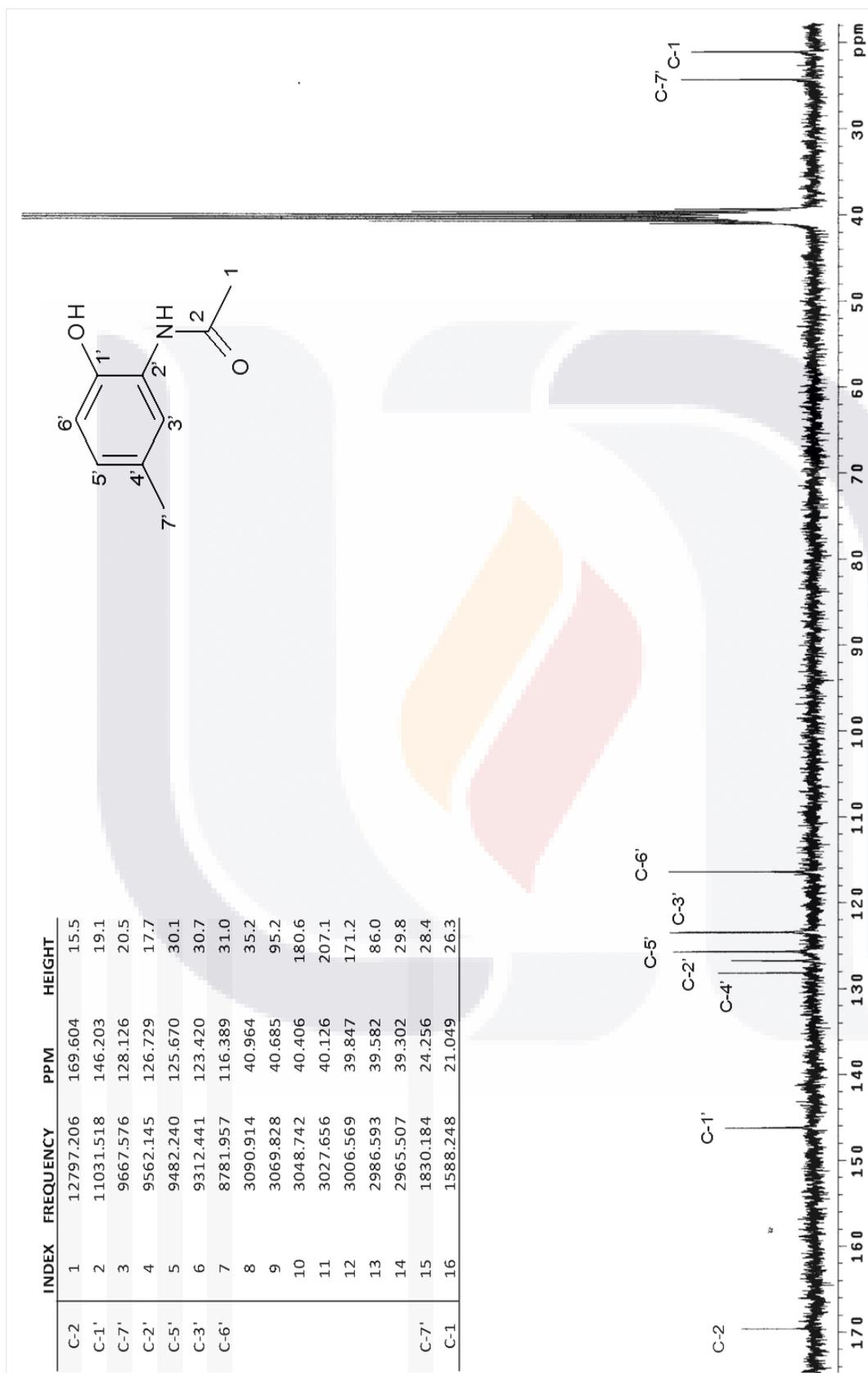
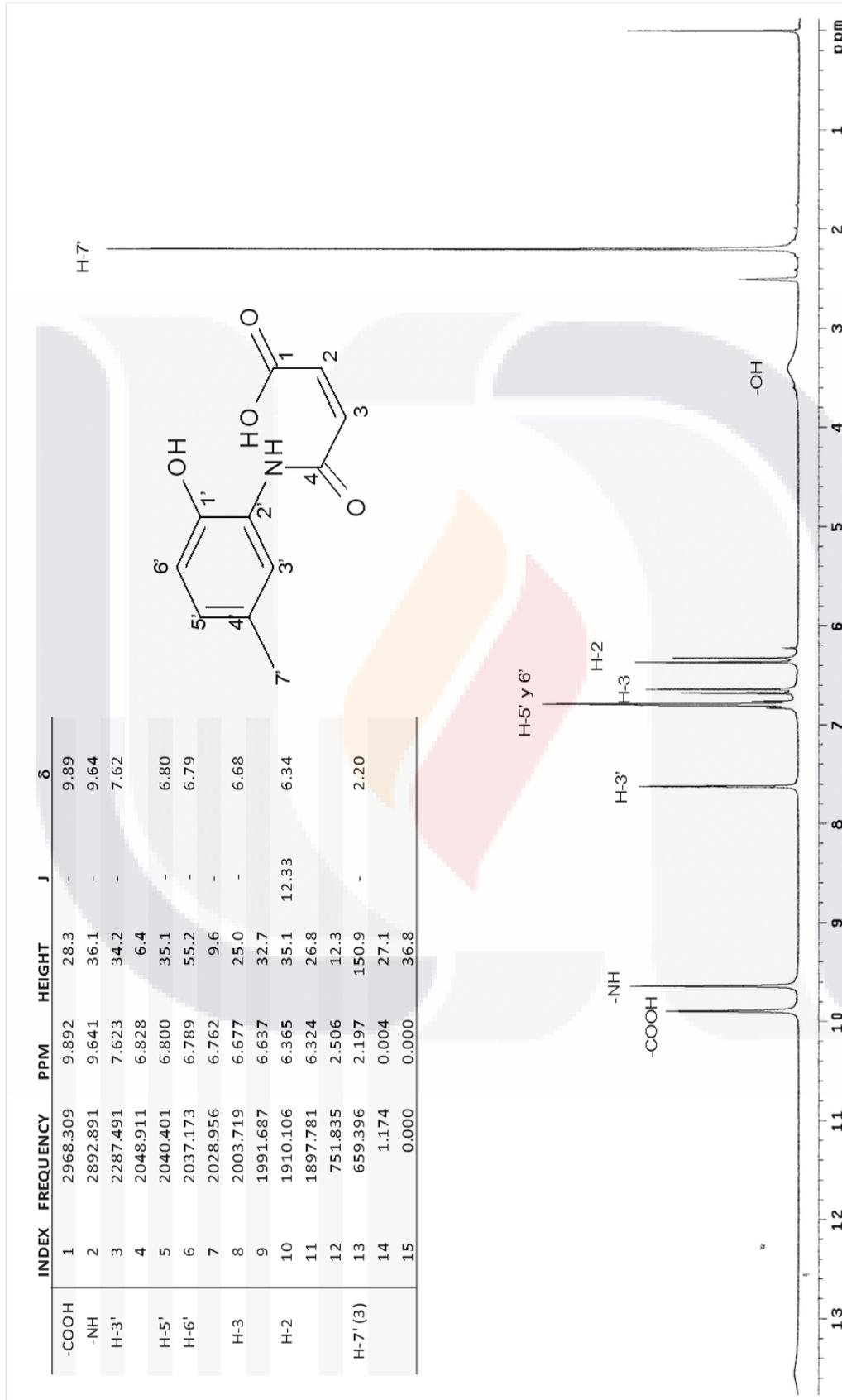


Figura 67. NMR de <sup>13</sup>C para C11. La asignación de las señales se encuentra en la tabla.



**Figura 68.** NMR de <sup>1</sup>H para C12. La asignación de las señales, la constante de acoplamiento (J) y la constante de desplazamiento ( $\delta$ ) se encuentran en la tabla.

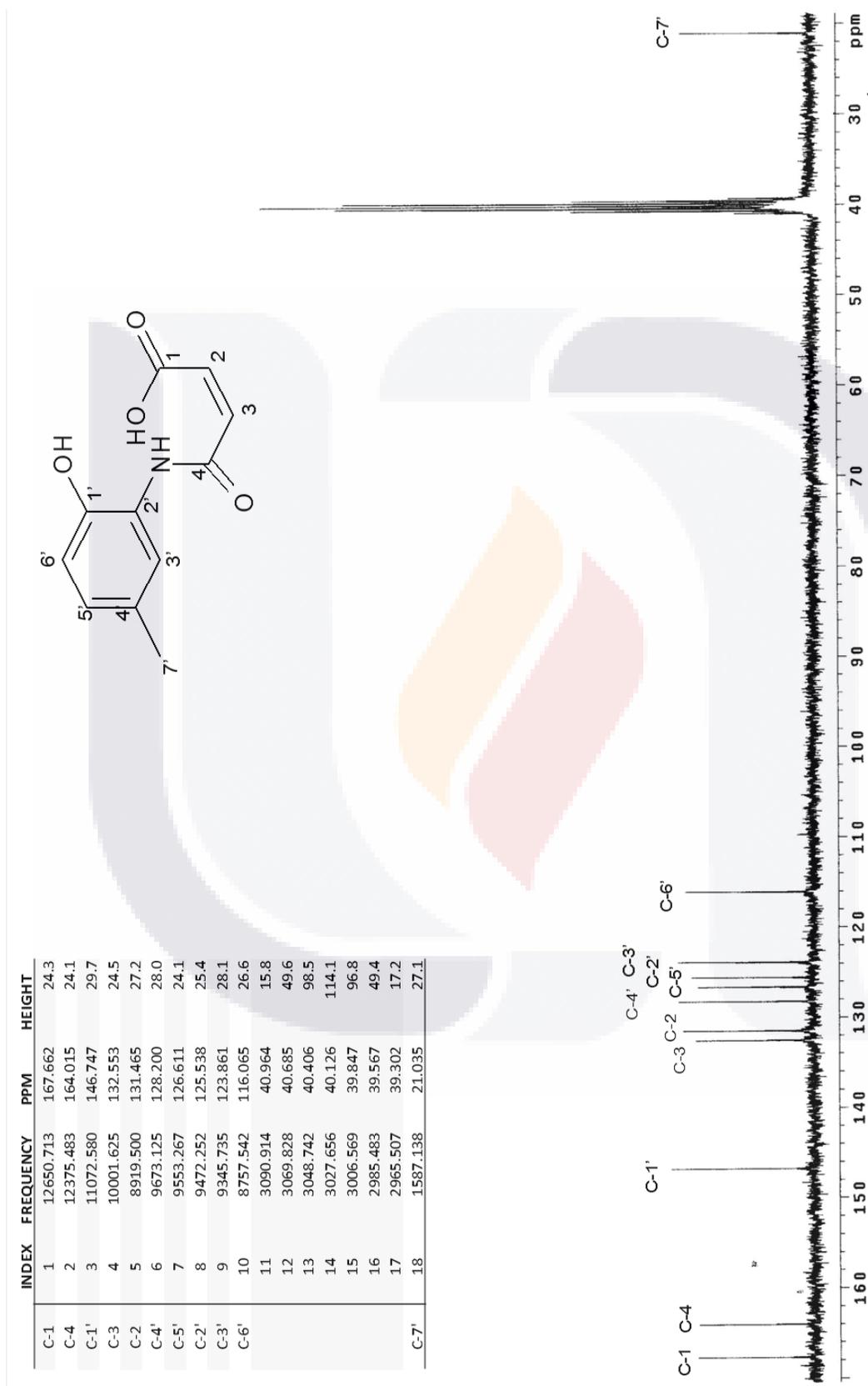
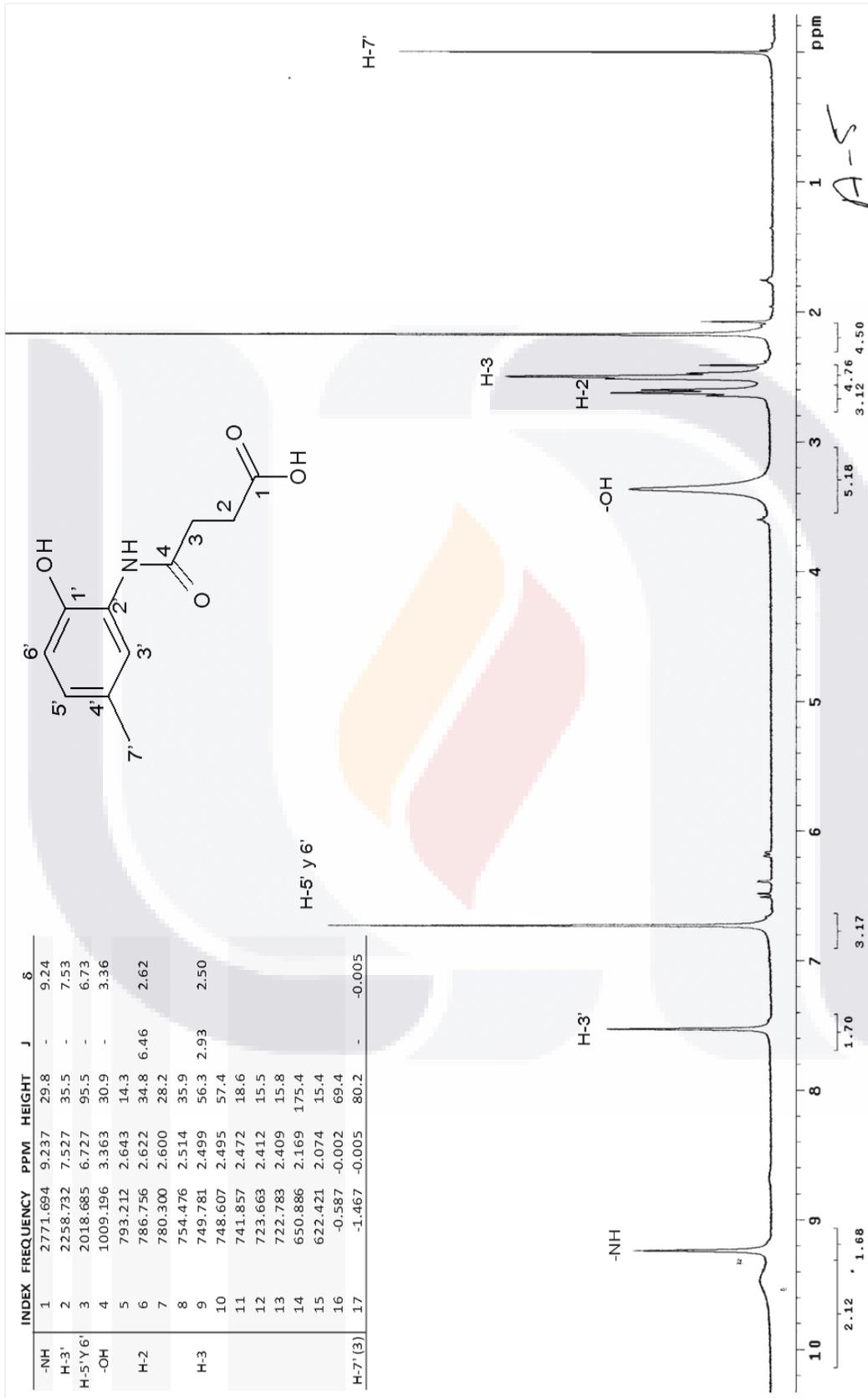


Figura 69. NMR de <sup>13</sup>C para C12. La asignación de las señales se encuentra en la tabla.



**Figura 70.** NMR de  $^1\text{H}$  para C13. La asignación de las señales, la constante de acoplamiento (J) y la constante de desplazamiento ( $\delta$ ) se encuentran en la tabla.

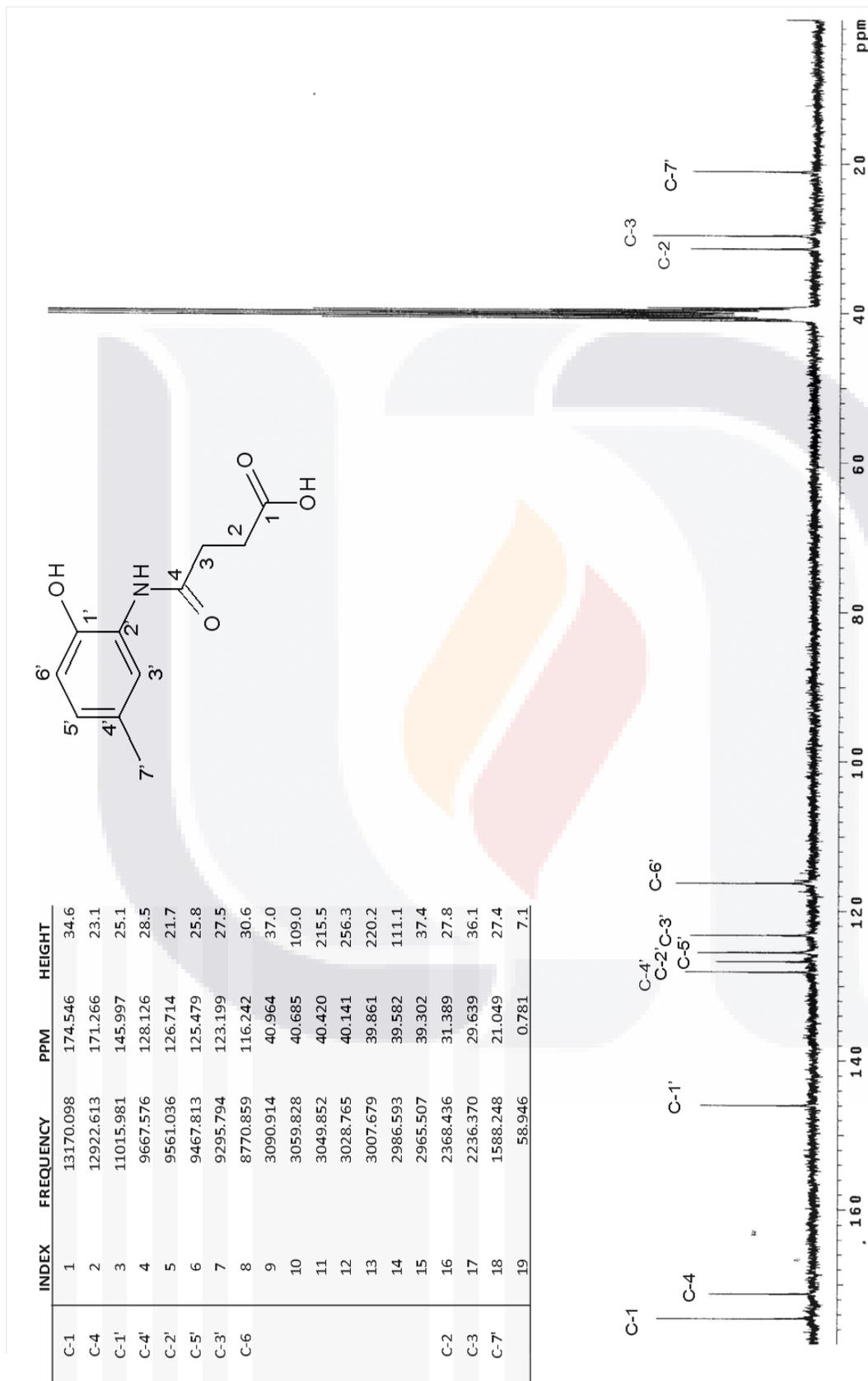
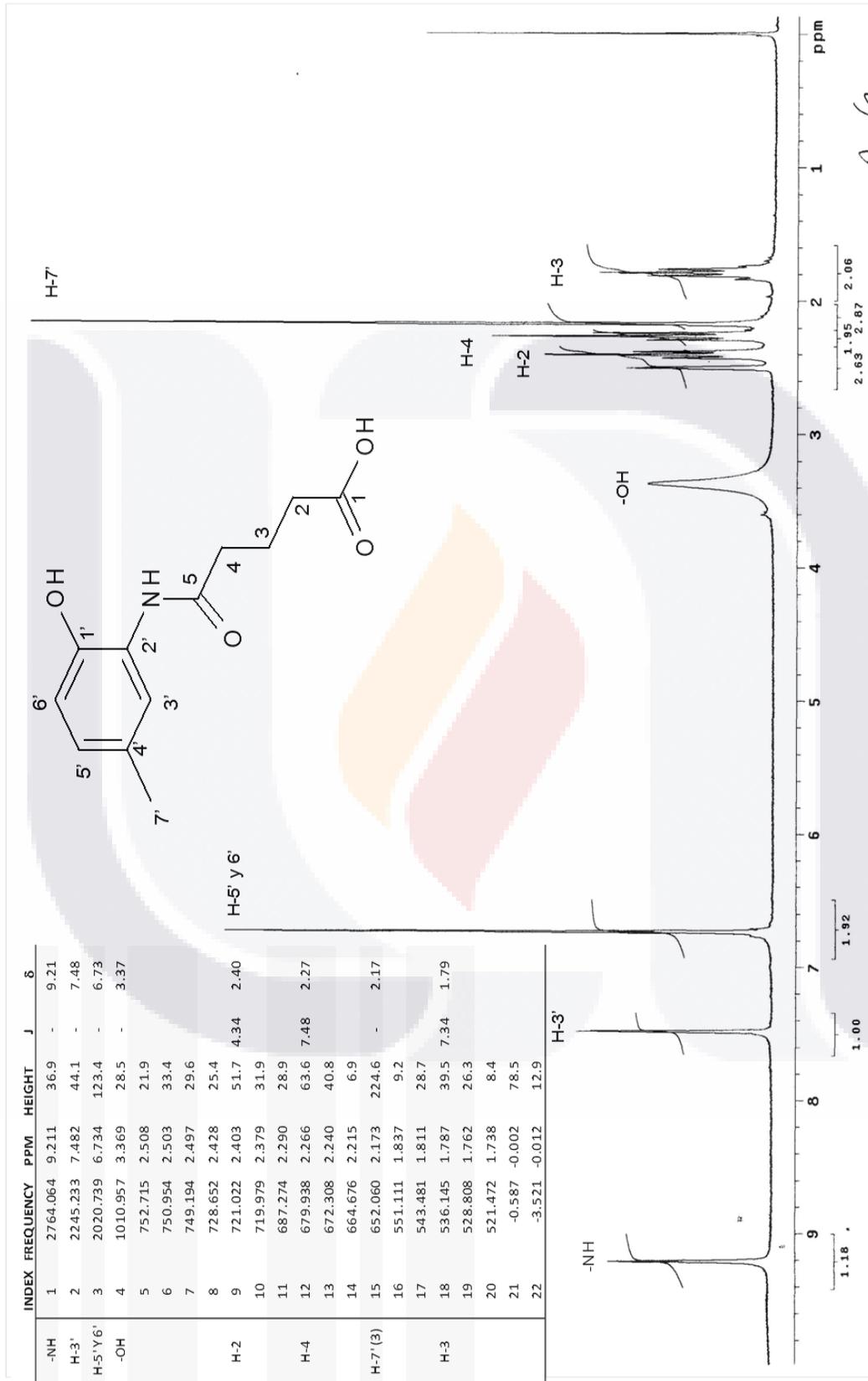


Figura 71. NMR de <sup>13</sup>C para C13. La asignación de las señales se encuentra en la tabla.



**Figura 72.** NMR de <sup>1</sup>H para C14. La asignación de las señales, la constante de acoplamiento (J) y la constante de desplazamiento (δ) se encuentran en la tabla.

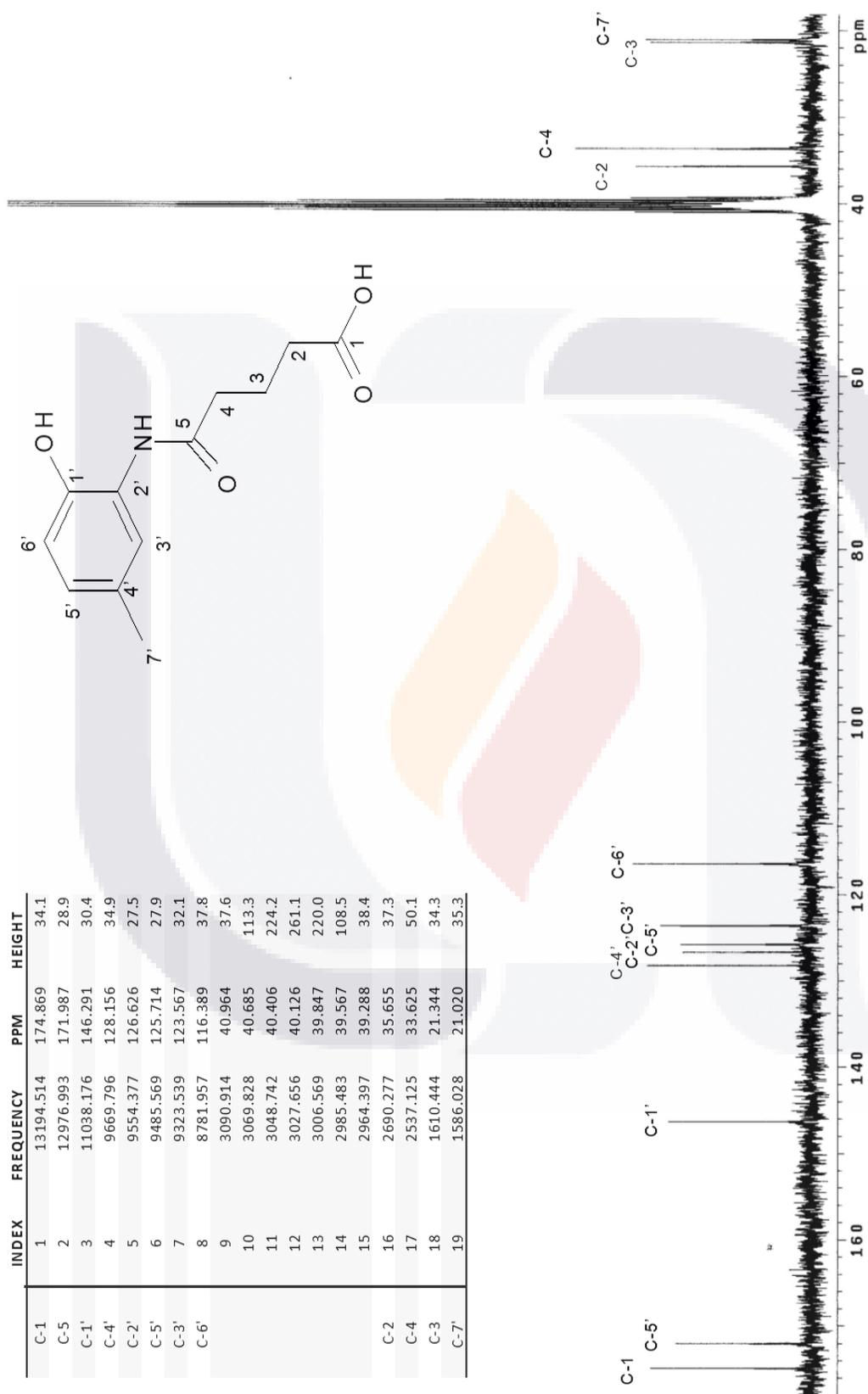
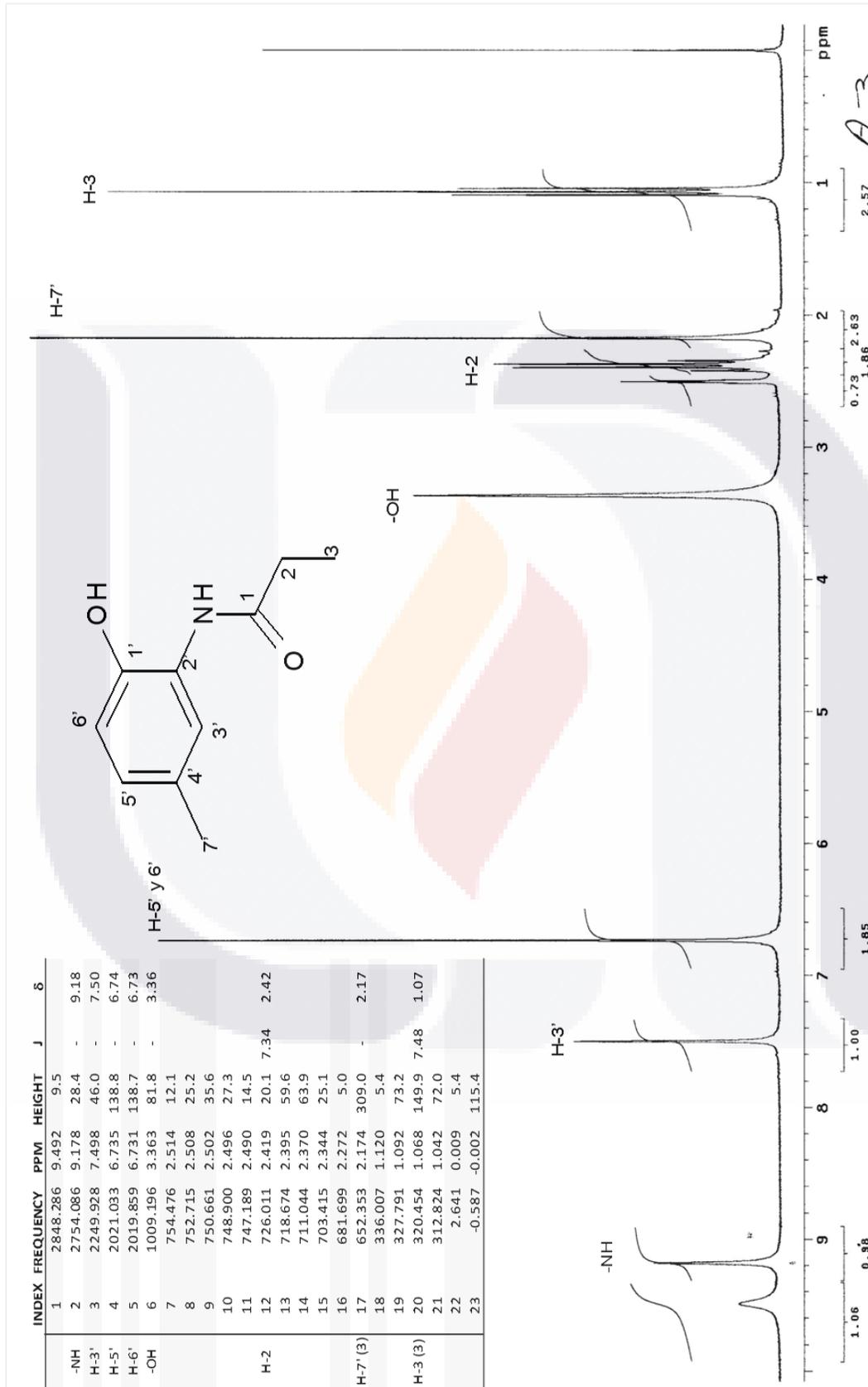


Figura 73. NMR de <sup>13</sup>C para C14. La asignación de las señales se encuentra en la tabla.



**Figura 74.** NMR de  $^1\text{H}$  para C15. La asignación de las señales, la constante de acoplamiento (J) y la constante de desplazamiento ( $\delta$ ) se encuentran en la tabla.

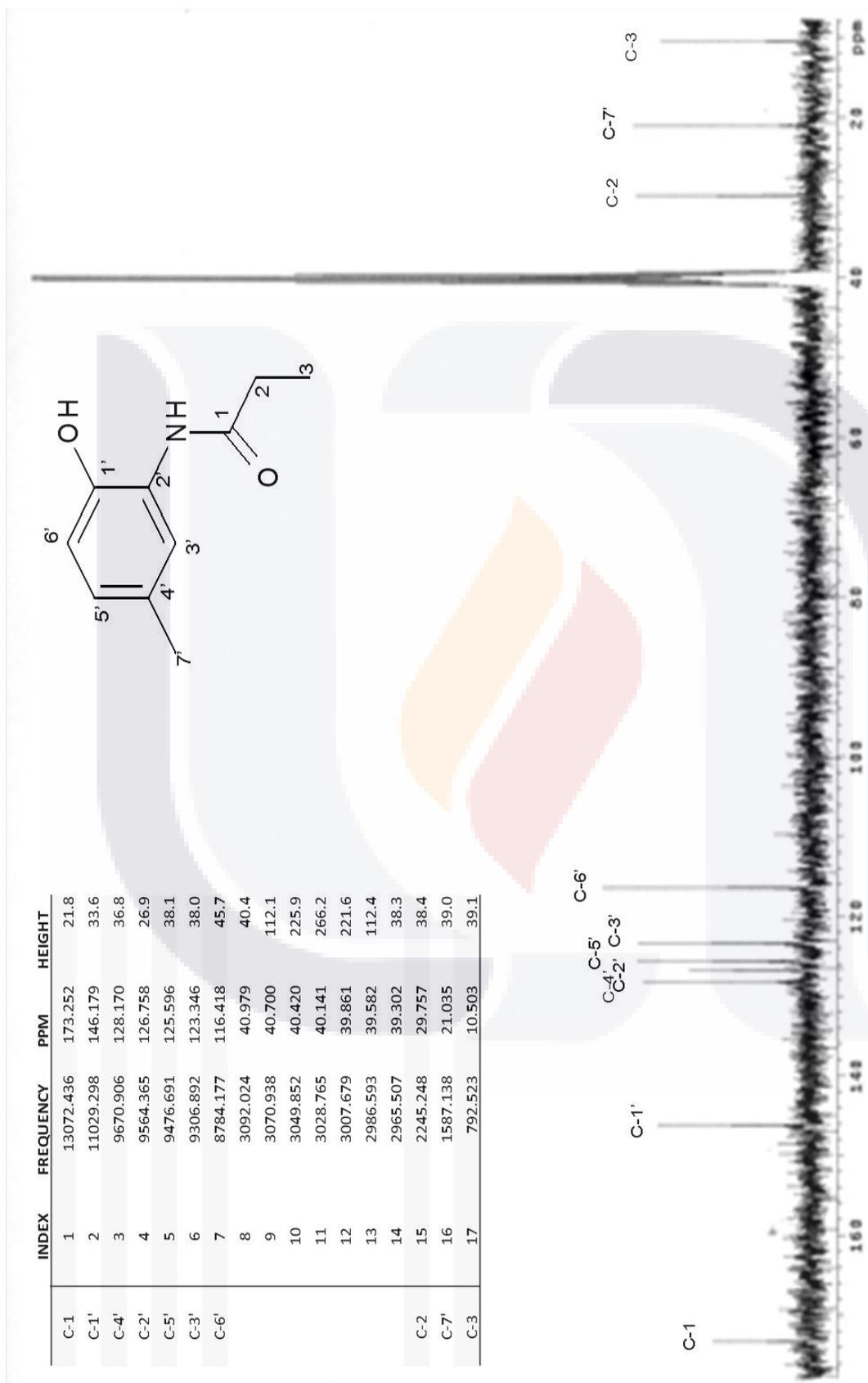
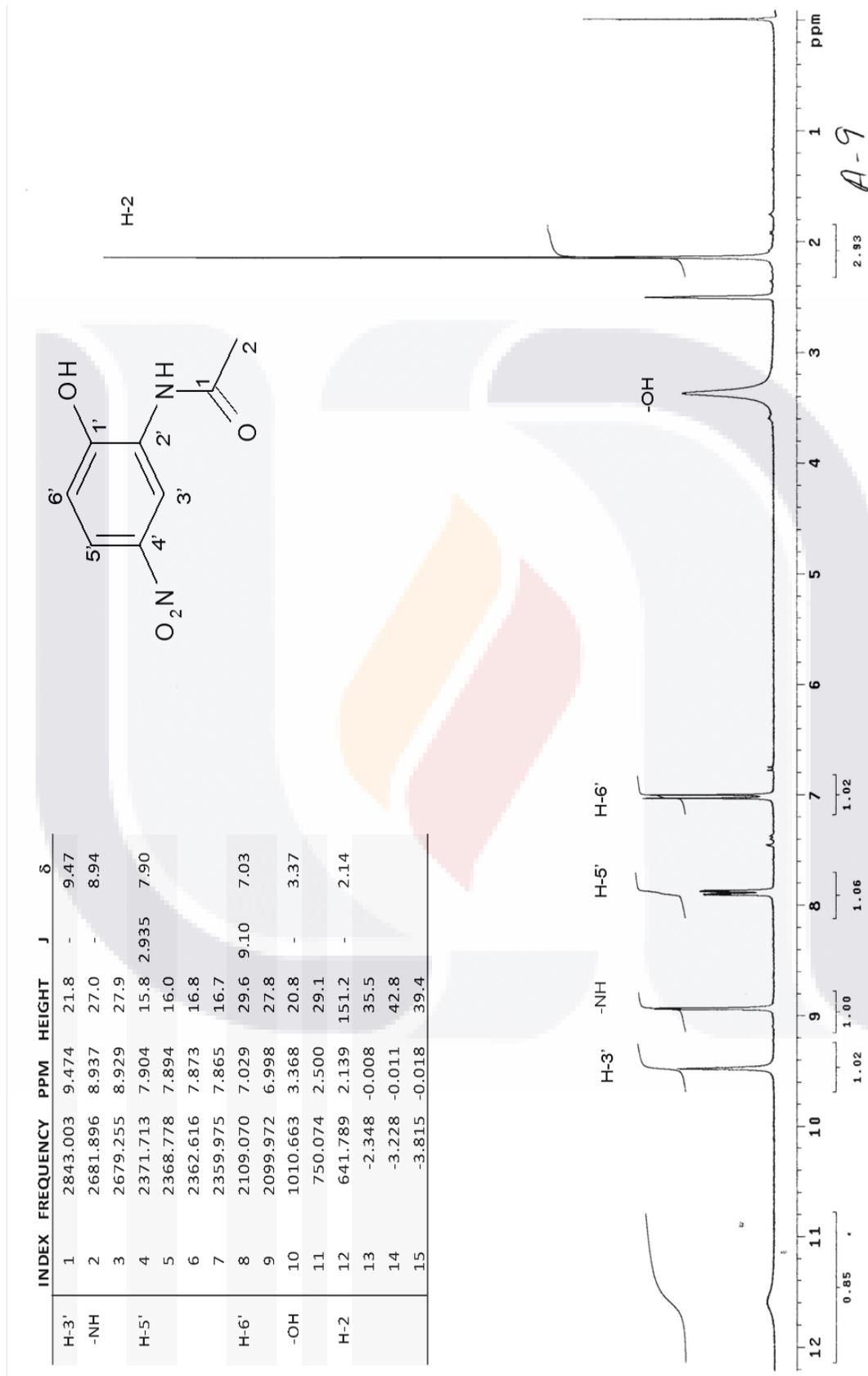


Figura 75. NMR de <sup>13</sup>C para C15. La asignación de las señales se encuentra en la tabla.



**Figura 76.** NMR de  $^1\text{H}$  para C21. La asignación de las señales, la constante de acoplamiento (J) y la constante de desplazamiento ( $\delta$ ) se encuentran en la tabla.

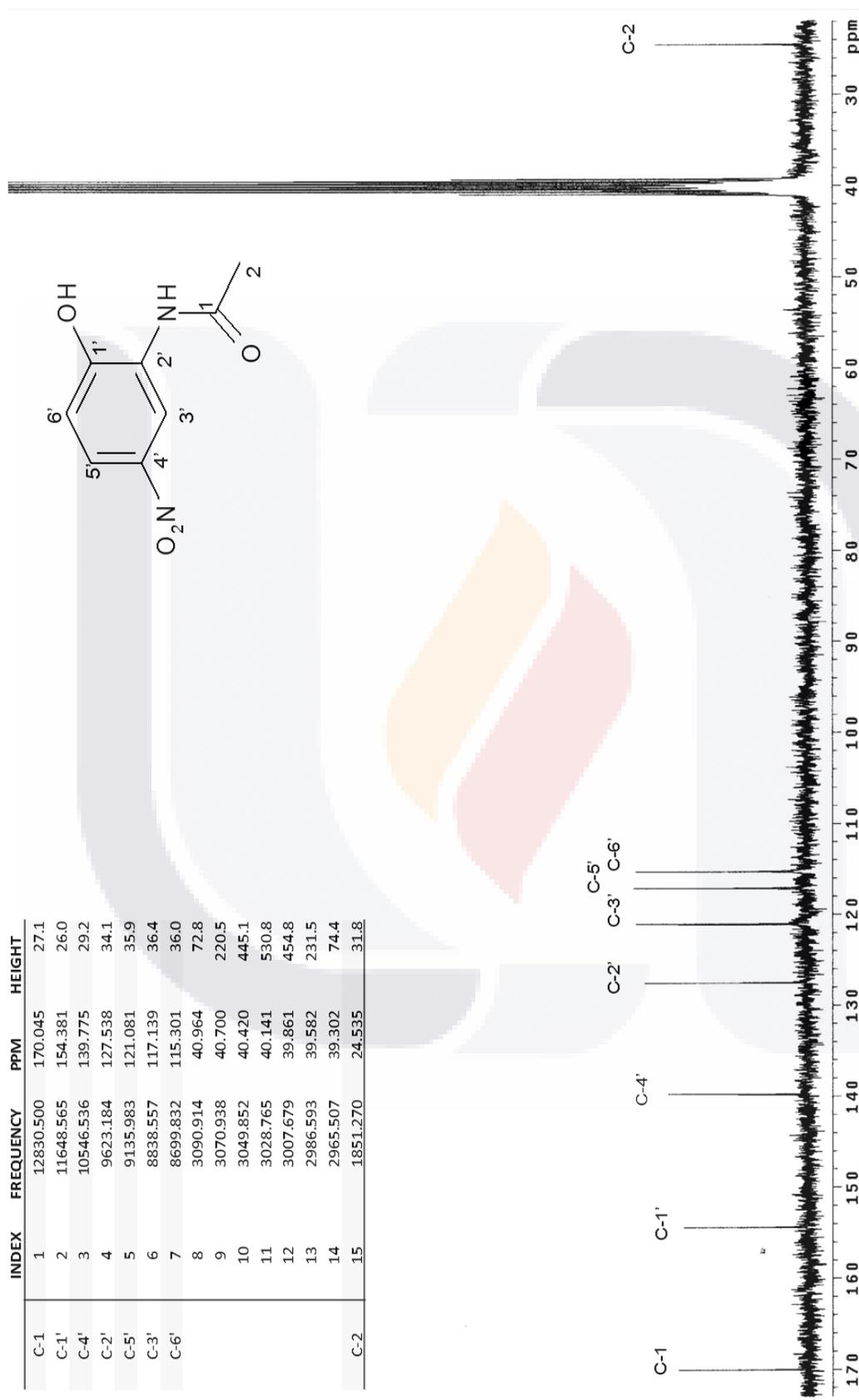
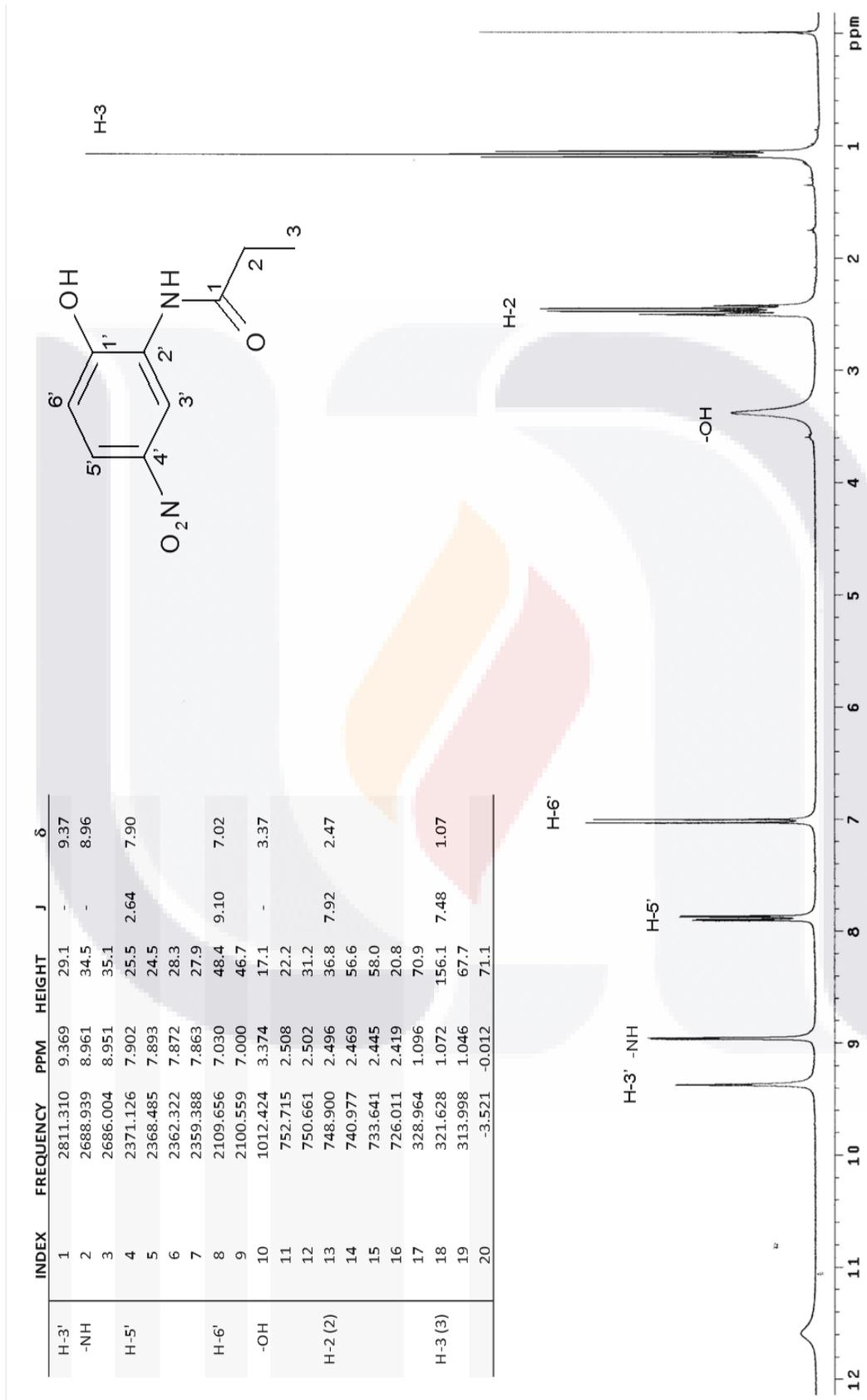


Figura 77. NMR de <sup>13</sup>C para C21. La asignación de las señales se encuentra en la tabla.



**Figura 78.** NMR de <sup>1</sup>H para C25. La asignación de las señales, la constante de acoplamiento (J) y la constante de desplazamiento ( $\delta$ ) se encuentran en la tabla.

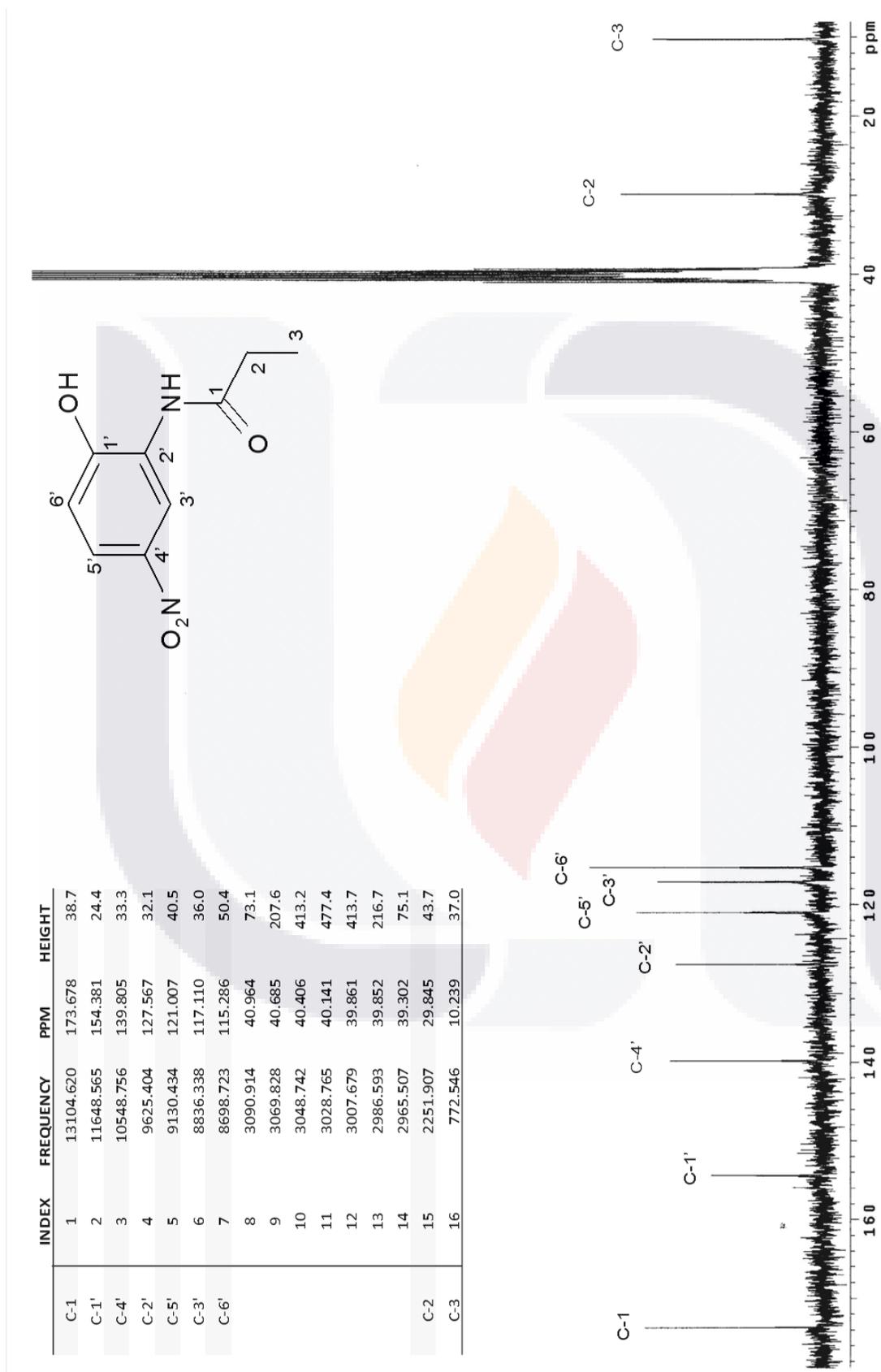


Figura 79. NMR de <sup>13</sup>C para C25. La asignación de las señales se encuentra en la tabla.

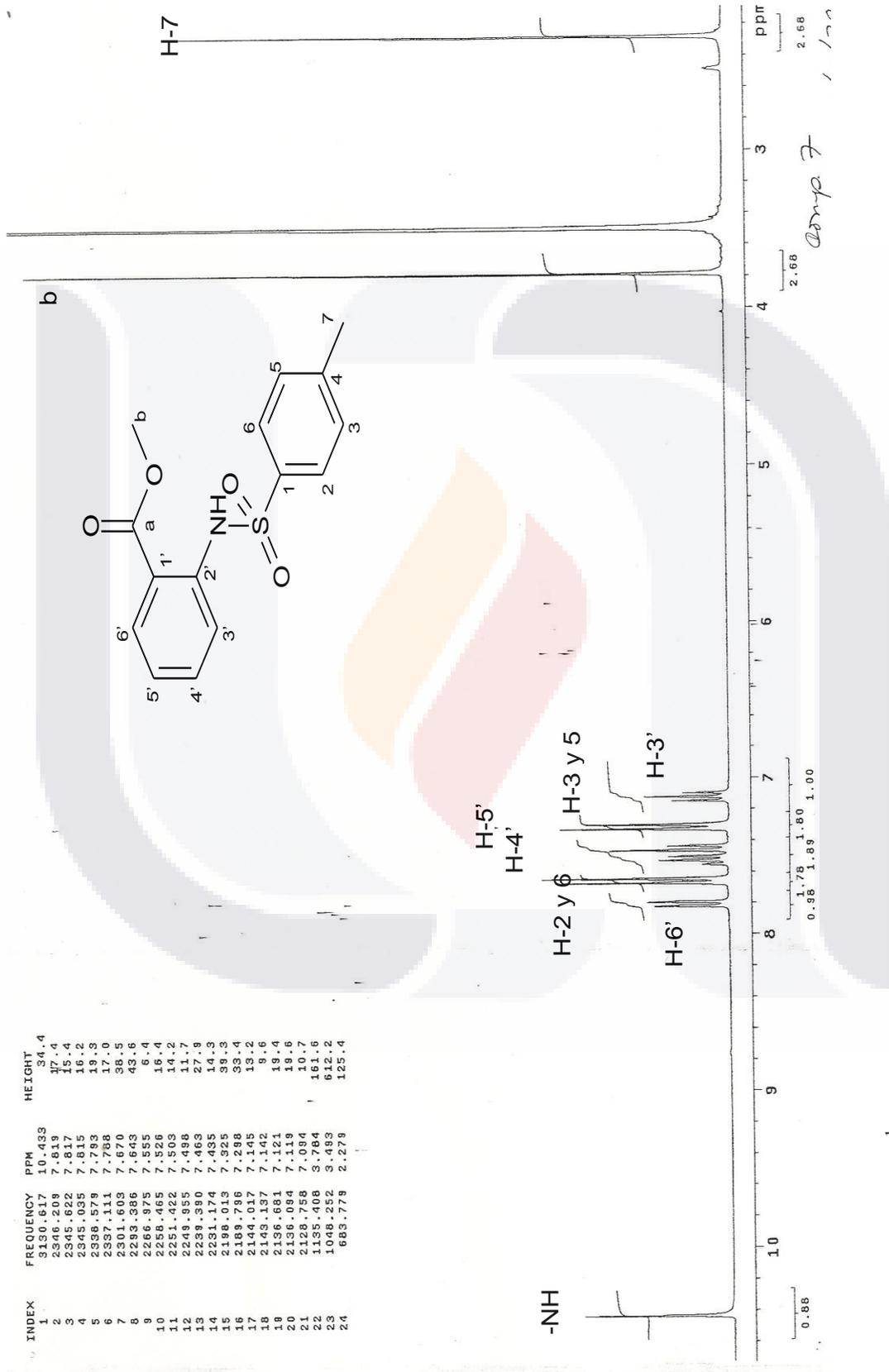


Figura 80. NMR de <sup>1</sup>H para (2).

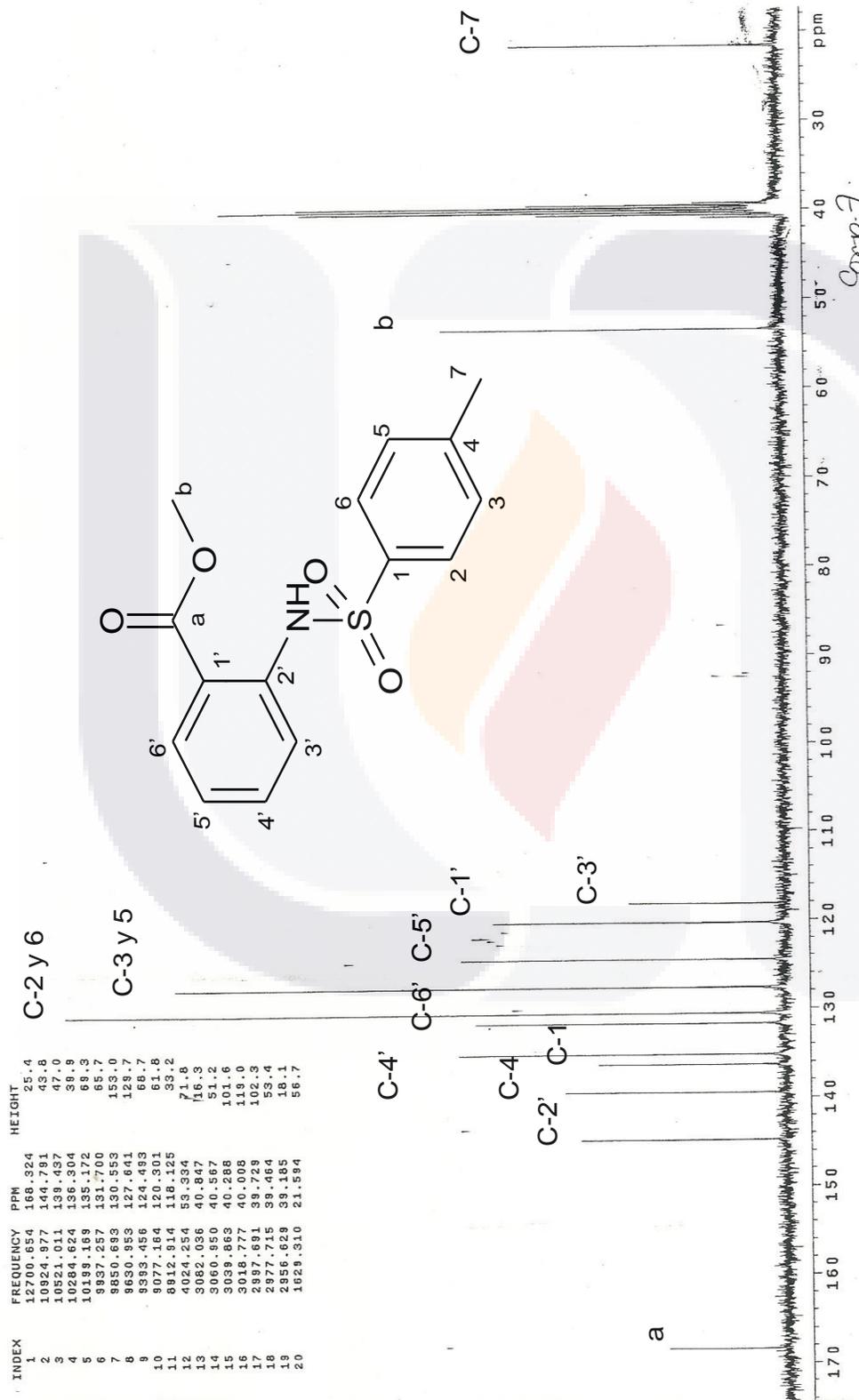


Figura 81. NMR de <sup>13</sup>C para (2).

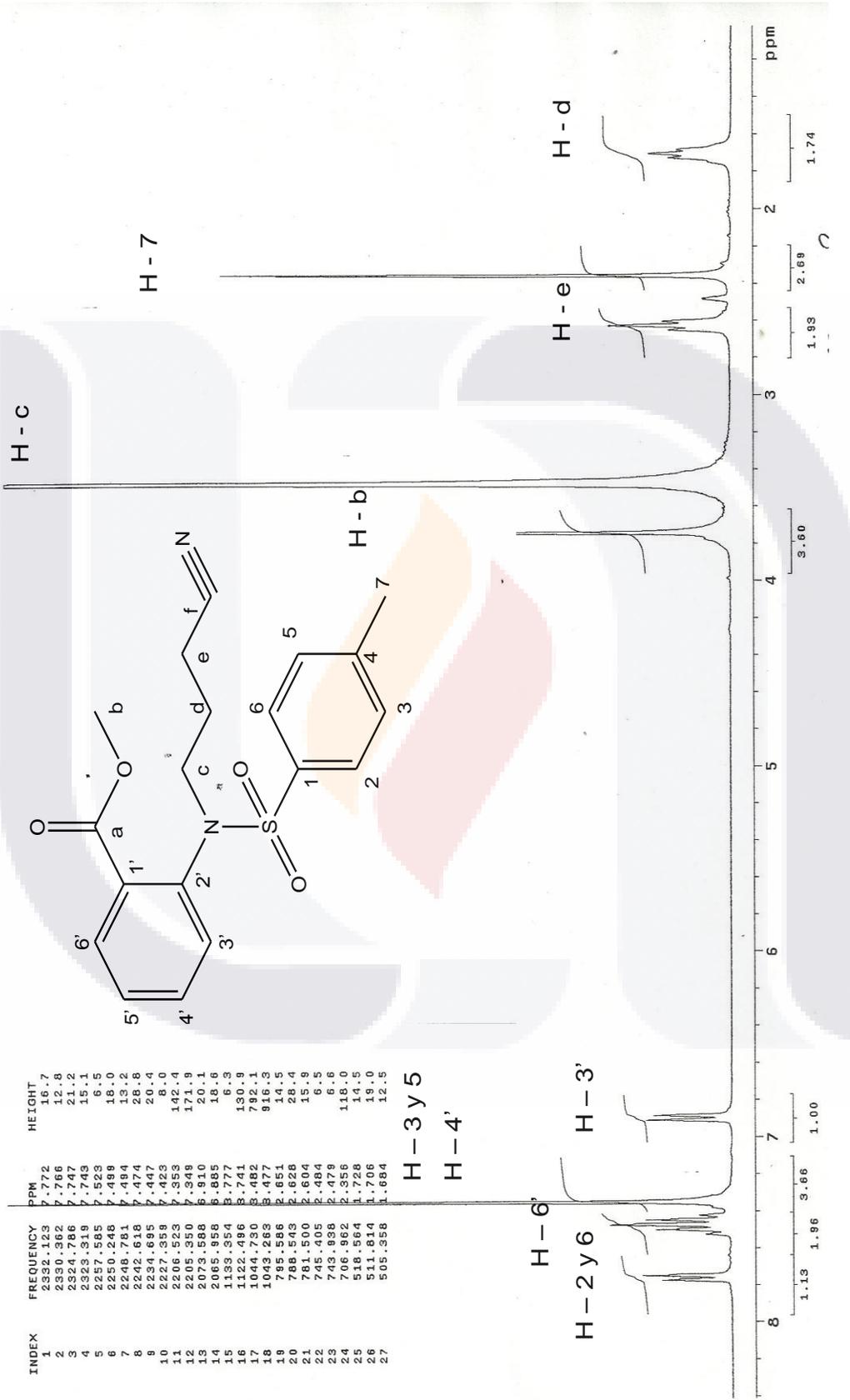


Figura 82. NMR de <sup>1</sup>H para (3).

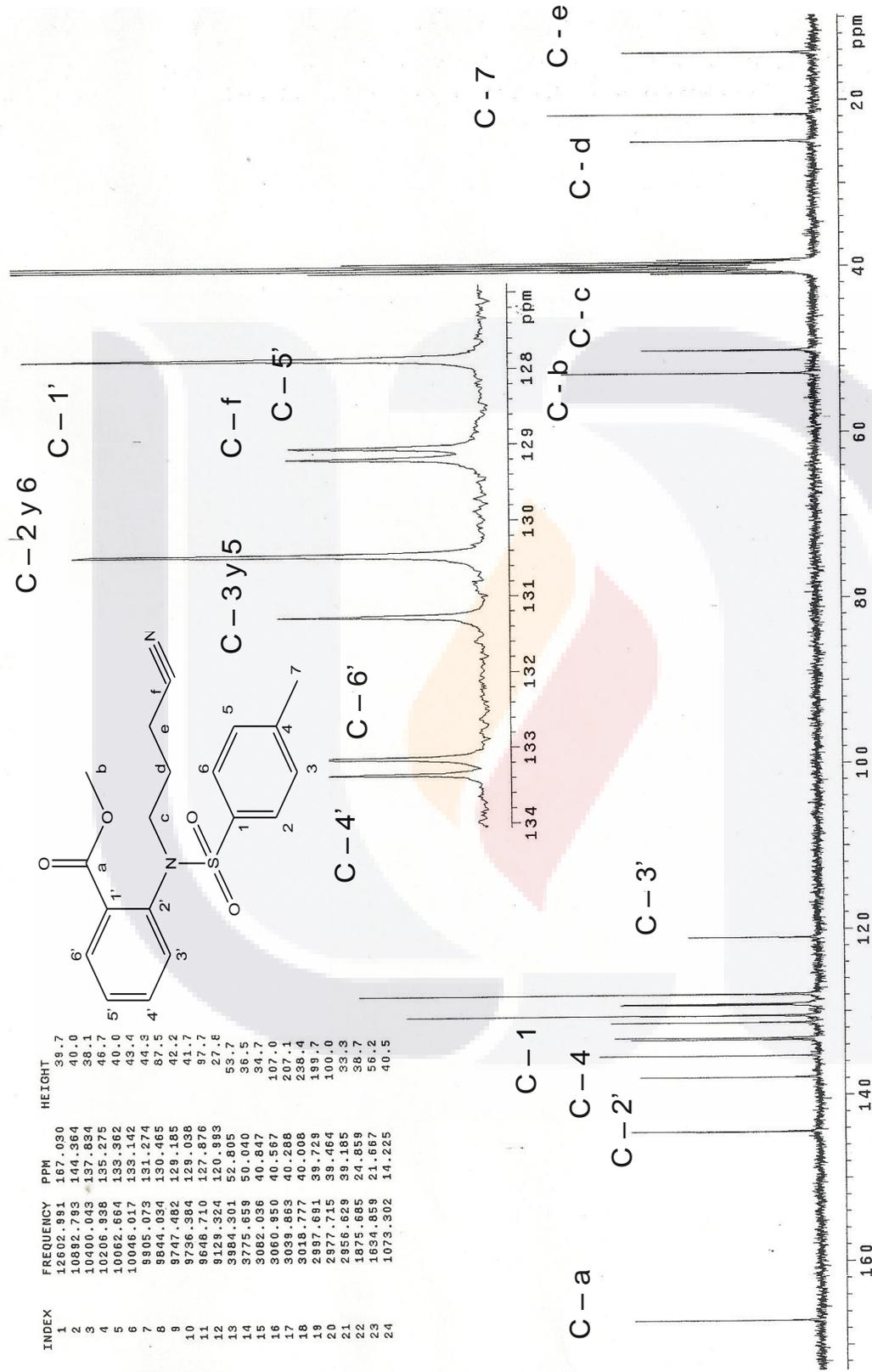


Figura 83. NMR de <sup>13</sup>C para (3).

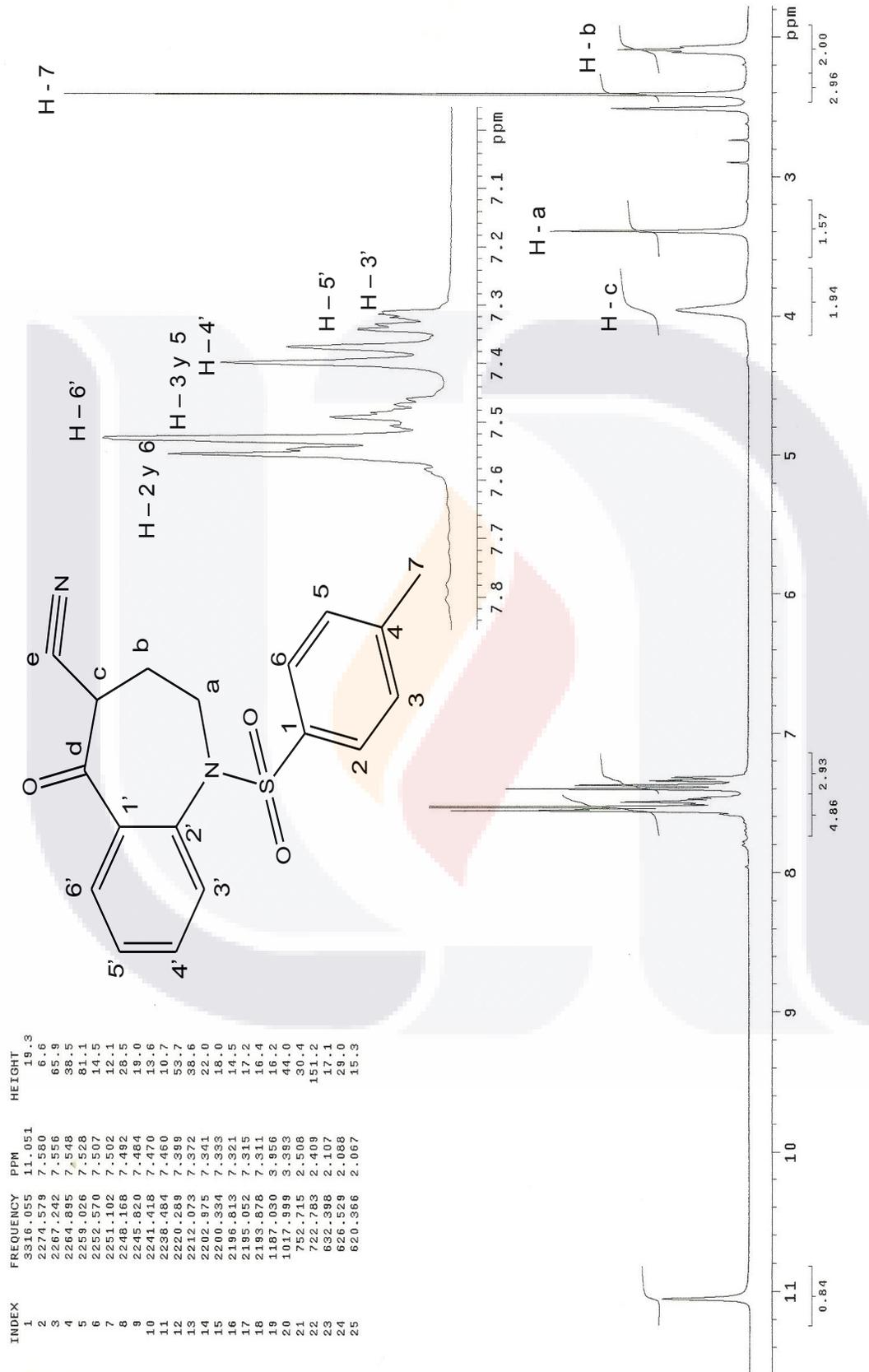


Figura 84. NMR de <sup>1</sup>H para (C9).

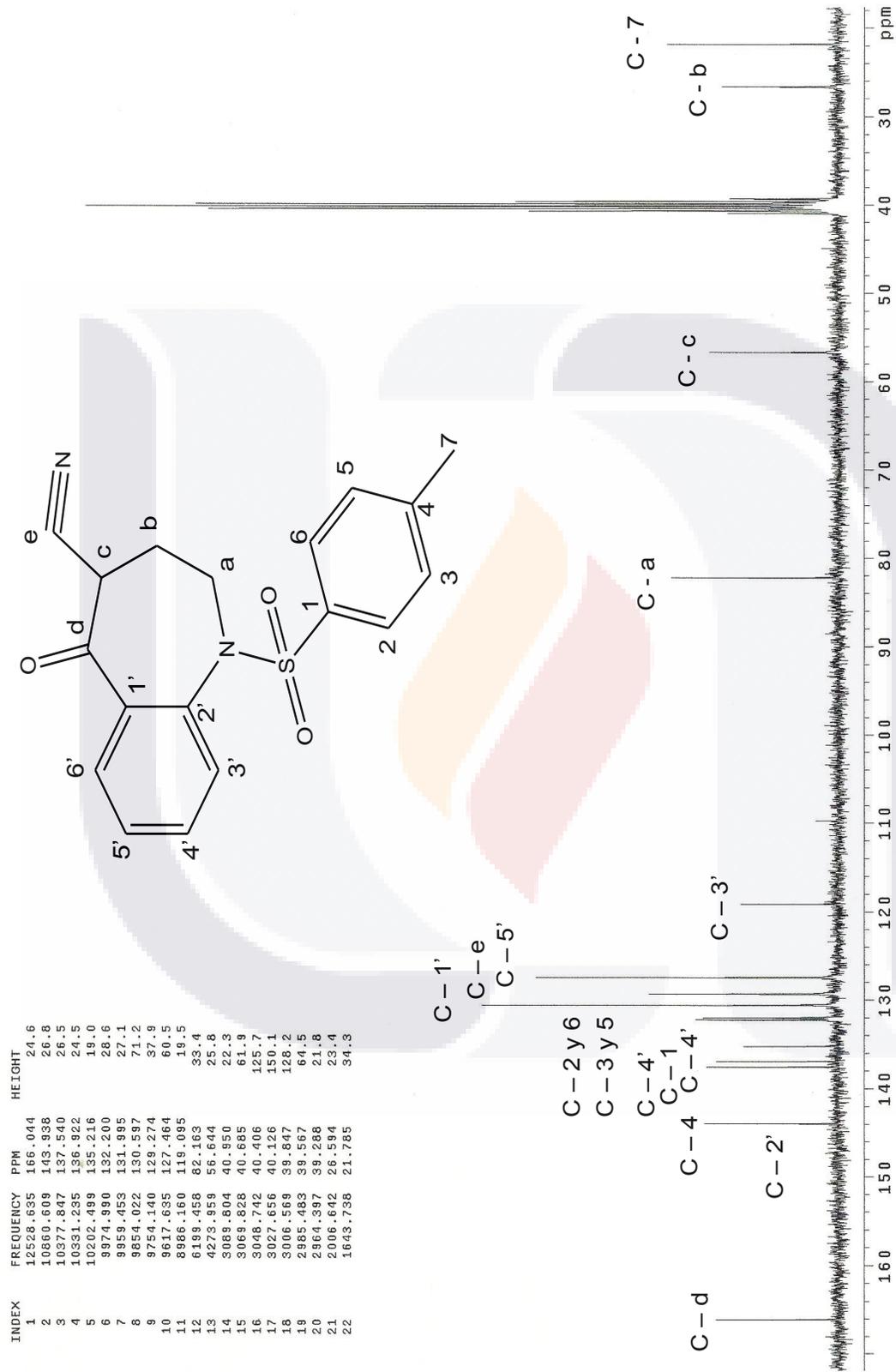


Figura 85. NMR de <sup>13</sup>C para (C9).

Nuevo Responder | Eliminar Archivar Correo no deseado | Limpiar Mover a

Mensaje original -----  
Asunto:[Disarmed] Your article in Medicinal Chemistry Research is now online at SpringerLink  
Fecha:Sat, 7 Sep 2013 00:23:19 +0200 (CEST)  
De:Springer <SpringerAlerts@springeronline.com>  
Responder a:Springer <springeralerts@springeronline.com> <springeralerts@springeronline.com>  
Para:aquinta@correo.uaa.mx  
CC:springeralert@springer.com



Online First: your article is published

07.09.2013

visit us at [springer.com](http://springer.com)

### Congratulations

Dear Springer Author,

Your article Theoretical studies, synthesis, and biological activity of 1-[(4-methylphenyl) sulfonyl]-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepine-4-carbonitrile (C9) as a non-peptide antagonist of the arginine vasopressin V1a and V2 receptors has just been published and is available as 'Online First' on SpringerLink:

**MailScanner ha detectado un posible intento de fraude desde "www.springer.com"**  
<http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s00044-013-0739-5>

It is fully accessible to all users at libraries and institutions that have purchased a SpringerLink license. If your article is published under one of our Open Access programs, it will be freely accessible to any user.

#### Citation Information

As an 'Online First' article, your paper is fully citable even before the journal's full issue has been compiled! Your article can be cited by its unique Digital Object Identifier (DOI) 10.1007/s00044-013-0739-5 in the following form:

*Author, Journal Title, Year, DOI*

Later on, after inclusion of your article in the paginated journal issue, please continue to use the DOI alongside the usual citation details in order to enable readers to easily find the article in print and online.

**Download Your e-Offprint (PDF file)**

Your 'Online First' electronic offprint is now available! Download your PDF file using the following link:

<http://www.springer.com/home?SGWID=0-0-1003-0-0&aqlid=2544375&download=1&checkval=c0950ea7842e287fb1bf16a9560b9558>

If the PDF file does not open automatically, please copy and paste the URL into your browser window. **Please note that your free e-offprint will only be available for four weeks!**

Your article will be assigned to a specific journal issue. After the production of that issue has been completed, you will be notified by email and a new, paginated e-offprint will become available to you as a free PDF-download. Any additional (printed) offprints or posters you might have ordered will then be shipped to you.

We encourage you to forward this email to your co-authors and mention your article and its DOI on your website or your social media profiles.

Thank you again for publishing with Springer. We look forward to your future contributions!

Best regards,

Your Springer Marketing Team

P.S.: For more information about publishing with us, visit our author website at [springer.com/authors](http://springer.com/authors), where you will find valuable services. If you have any further questions, please feel free to [contact our Author Helpdesk](#)

---

**Springer Customer Service Center**

Haberstr. 7  
69129 Heidelberg  
Germany  
phone: +49 6221 345 0  
fax: +49 6221 345 4229  
Book orders:  
[orders-HD-individuals@springer.com](mailto:orders-HD-individuals@springer.com)  
Other questions:  
[authorhelpdesk@springer.com](mailto:authorhelpdesk@springer.com)

**Springer New York, LCC**

233 Spring Street  
New York, NY 10013  
USA  
phone: +1 212 460 1500 or 800-  
SPRINGER  
(Weekdays 8:30am - 5:30pm ET)  
fax: +1 212 460 1700  
Book orders: [service-ny@springer.com](mailto:service-ny@springer.com)  
Other questions:  
[authorhelpdesk@springer.com](mailto:authorhelpdesk@springer.com)