



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

FACULTAD DE FARMACIA

“PREPARACIÓN DE *N*-(1-BENCILPIPERIDIN-4-IL)-  
4-ALQUILBENZAMIDAS COMO LIGANDOS  
VIRTUALES DEL RECEPTOR SIGMA-1”

T E S I S

P A R A O B T E N E R E L T I T U L O D E  
L I C E N C I A D O E N F A R M A C I A

P R E S E N T A

MARÍA FERNANDA RAMÍREZ RANFLA

**Director de Tesis**

Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

**Director Adjunto**

M. en F. Abraham Gutiérrez Hernández

CUERNAVACA, MORELOS 2024

*“Sobreviví a la peor depresión de mi vida  
con el corazón roto y hablándole al cielo,  
queriendo entender por qué me sucedió eso  
a mí. Y fue ahí cuando entendí, que si  
sobreviví a eso, no existe nada que no pueda  
superar”*

**-FRR-**

# AGRADECIMIENTOS

A **CONAHCyT** por el apoyo otorgado para el proyecto de Ciencia de Frontera 2023 CF-2023-I-822, "Diseño, síntesis y bioevaluación *in combo* de bencilpiperidinas como ligandos del receptor sigma-1 para el tratamiento experimental del dolor neuropático"

A la **Facultad de Farmacia** por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto, así como mi educación profesional.

Al **Dr. Emanuel Hernández Núñez** y **Dra. Gloria Ivonne Hernández Bolio** del Departamento de Recursos del mar en CINVESTAV, Unidad Mérida por la colaboración en los análisis espectroscópicos y espectrométricas.

Al **Dr. Israel Gonzáles Méndez** del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM y al **M. en F. Josué Martínez Miranda** de la Facultad de Química de la UNAM, Departamento de Farmacia, por su colaboración en los análisis espectroscópicos y espectrométricas.

Al **M. en F. Abraham Alberto Gutiérrez Hernández** (L-5 FF-UAEM) por sus aportaciones, observaciones y apoyo como director adjunto en la elaboración del proyecto.

Agradezco al comité revisor: **Dr. German Bernal Fernández, Dra. Blanca Estela Duque Montaña, Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza, Dra. Yoshajandith Aguirre Vidal, M. en C. Martha Hernández Labra** por sus observaciones.

Finalmente, y no menos importante, un agradecimiento especial al **Dr. Gabriel Navarrete Vázquez** por aceptarme en su grupo de investigación, tenerme la confianza de poder realizar el proyecto, por sus aportaciones y conocimientos brindados en las aulas de clases, así como en el laboratorio y vida personal, los cuales llevaron mi interés a la Química Farmacéutica, ¡MUCHAS GRACIAS!

## DEDICATORIAS

A mis padres, **Moisés Ramírez Rodríguez** y **Adriana Paola Ranfla Osorio** por brindarme la oportunidad de tener una buena educación, y apoyarme durante todos estos años en mi proceso de crecimiento profesional.

A mi hermano **José Emiliano Ramírez Ranfla** por mostrarme lo bueno que es tener un hermano permitiéndome ser su orientadora de vida, y guiarlo en el crecimiento profesional.

A mi mejor amigo **Emanuel Pérez Landa** por haberme acompañado durante todos estos años, por compartir y aprender cosas de él, por apoyarme en mis peores momentos y nunca dejarme sola, por ser un elemento fundamental para obtener este logro, de corazón te lo agradezco y espero que la vida nos de muchos más años de amistad.

A mi mejor amiga **Ingrid Janet Montiel Castro** de igual forma por acompañarme durante estos años y nunca dejar que me rindiera a pesar de las circunstancias.

A mis amigos de licenciatura, porque que sería de esas tardes de aventuras y buenos momentos de risas sin ellos, de igual forma llena de aprendizajes, **Rogelio, Ana Popoca, Laurita, Mariam, Diana, Tita, Nancy, Montse y Chewy.**

A mis queridos compañeros y familia del laboratorio, sobre todo a **Sam, Norma y Jorge** por ser mi ejemplo a seguir día con día, por los buenos ratos que pasamos juntos, por apoyo incondicional en mi crecimiento profesional y demostrarme que una verdadera amistad nunca se olvida.

De igual forma a **Conde, Abraham, Aldair, Luis, Dani, Diego y Sinuhe** por ser mi familia en el laboratorio, me han visto en mis peores momentos y apoyado durante todo momento, les agradezco de corazón por formar parte de mi vida y estancia en el Lab-5

## ABREVIATURAS

<b>AMP<sub>c</sub></b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CYP450</b>	Citocromo P450
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal media
<b>DHEA</b>	Dehidroepiandrosterona
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>hERG</b>	Gen Humano relacionado con el movimiento <i>a-go-go</i> provocado por éter
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IASP</b>	International Association for the Study of Pain
<b>JNK</b>	Cinasa N-terminal JUN
<b>Jo</b>	Constante de acoplamiento posición meta
<b>MAPK</b>	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
<b>MHz</b>	Mega hertz
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>NMDA</b>	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
<b>OECD</b>	Organización para Cooperación y el Desarrollo Económico
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RMSD</b>	Desviación de la raíz cuadrada media de las poblaciones atómicas
<b>S1RA</b>	Antagonista del receptor sigma-1
<b>SAR</b>	Relación estructura-actividad
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>TRPV</b>	Receptor de potencial transitorio V1

# ÍNDICE DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS .....	V
INDICE DE TABLAS .....	VII
INDICE DE ESPECTROS .....	VII
RESUMEN .....	VIII
<b>0. COMPUESTOS SINTETIZADOS .....</b>	<b>1</b>
Compuestos finales benzamidas piperidínicas .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
2.1 Definición de dolor .....	3
2.2 Dolor Neuropático y su prevalencia .....	5
2.3 Etiología del dolor neuropático .....	5
2.4 Mecanismos/ Fisiopatología .....	7
2.5 Síntomas del dolor neuropático .....	13
2.6 Diagnóstico de dolor neuropático .....	14
2.6.1 Escala de EVA .....	16
2.7 Tratamiento y terapias .....	16
2.8 Receptores Sigma .....	19
2.8.1 Receptor Sigma-1 .....	20
2.8.2 Activación molecular .....	22
2.9 Moléculas endógenas agonistas y antagonistas del receptor sigma-1 .....	24
2.10 Moléculas exógenas agonistas y antagonistas del receptor sigma-1 .....	25
2.10.1 Antagonista del receptor <b>sigma-1 (S1RA o E-52862)</b> .....	25
2.10.2 Haloperidol .....	26
2.10.3 <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-il)-4-fluorobenzamida ( <b>LMH-2</b> ) .....	27
2.10.3.1 Evaluación in vitro del compuesto <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-il)-4-fluorobenzamida ( <b>LMH-2</b> ) .....	27
2.10.3.2 Evaluación in vivo del compuesto <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-il)-4-fluorobenzamida ( <b>LMH-2</b> ) .....	28
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>31</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
5.1 Objetivo General .....	31
5.2 Objetivos específicos .....	31

<b>6. CONSIDERACIONES QUIMICO-FARMACÉUTICAS PARA EL DISEÑO MOLECULAR</b> .....	32
6.1    Diseño de los compuestos.....	32
6.2    Interacción molecular ligando proteína ( <b>LMH-2</b> → sigma-1).....	33
6.3    Reglas de Lipinski y Veber en el diseño de los compuestos con actividad biológica.....	36
<b>7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	38
7.1    Parte Química.....	39
7.1.1    Retrosíntesis de los compuestos.....	39
7.1.2    Metodología general para la síntesis de los compuestos de <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-il)-4-alkilbenzamida .....	39
7.2    Parte Computacional ( <i>In silico</i> a priori).....	40
7.2.1    Herramienta como predictor de dianas terapéuticas (“SwissTargetPrediction”).....	40
7.2.2    Espectro de Actividad Biológica para Sustancias (PASS, por sus siglas en inglés Prediction of Activity Spectra for Substances) .....	41
7.2.3    Software como herramienta predictiva de toxicidad aguda (ACD/ToxSuite) 42	
7.2.4    Programa abierto para visualización y análisis de datos (OSIRIS) DataWarrior .....	43
7.2.5    Predictor de Sitio metabólico BioTransformer 3.0.....	44
7.2.6    Predictor de propiedades de Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y Toxicidad (admetSAR 2.0 y ADMETlab 2.0) .....	45
7.3    EVALUACIÓN <i>in vitro</i> .....	46
7.3.1    Ensayo de unión para el receptor sigma-1 ( <i>binding</i> ) .....	46
7.4    Acoplamiento Molecular (Docking, <i>a posteriori</i> ) .....	47
<b>8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	48
8.1    PARTE QUÍMICA.....	48
8.1.1    Síntesis de <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-il)-4-metilbenzamida ( <b>FRR-1</b> ).....	48
8.1.2    Síntesis de <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-il)-4-terbutilbenzamida ( <b>FRR-2</b> ) .....	52
8.2    PARTE COMPUTACIONAL ( <i>In silico</i> ).....	56
8.2.1    Predicción de actividad biológica de los compuestos <b>FRR-1</b> y <b>FRR-2</b> con el programa PASS.....	56
8.2.2    Predicción de dianas terapéuticas de los compuestos <b>FRR-1</b> y <b>FRR-2</b> con el programa SwissTarget .....	57

8.2.3	predicción de propiedades de los cuasi-fármacos con el programa Osiris y DataWarrior .....	57
8.2.4	Propiedades admetSAr de los compuestos <b>FRR-1</b> y <b>FRR-2</b> .....	58
8.2.5	Predicción toxicológica de los compuestos <b>FRR-1</b> y <b>FRR-2</b> mediante el programa ACD/ToxSuite .....	60
8.2.6	Predicción de metabolitos y sitios metabolizables por Biotransformer 3.0. ....	63
8.3	EVALUACIÓN <i>in vitro</i> .....	65
8.4	ACOPLAMIENTO MOLECULAR “DOCKING” ( <i>A posteriori</i> ) .....	67
8.4.1	Acoplamiento molecular de haloperidol sobre el receptor sigma-1. ....	67
8.4.2	Acoplamiento molecular de <b>S1RA</b> sobre el receptor sigma-1 .....	68
8.4.3	Acoplamiento molecular de <b>LMH-2</b> .....	68
8.4.4	Acoplamiento molecular de <b>FRR-1</b> y <b>FRR-2</b> sobre el receptor sigma-1 .....	69
8.5	ANÁLISIS DE CONSENSO FARMACOLÓGICO .....	72
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>75</b>
<b>11</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>76</b>
11.1	Parte Química.....	77
11.1.1	Síntesis de <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-il)-4-metilbenzamida ( <b>FRR-1</b> ) .....	77
11.1.2	Síntesis de <i>N</i> -(1-bencilpiperidin-4-il)-4-terbutilbenzamida ( <b>FRR-2</b> ) .....	79
<b>12</b>	<b>ESPECTROS</b> .....	<b>81</b>
<b>13</b>	<b>REFERENCIAS Y FUENTES DE INFORMACIÓN CONSULTADAS</b> .....	<b>87</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS

Nº FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
FIGURA 1	Vías del dolor	4
FIGURA 2	Inflamación provocada a través de mediadores inflamatorios y sensibilización periférica	8
FIGURA 3	Sensibilización central	10
FIGURA 4	Esquema general de la sensibilización central	12
FIGURA 5	Síntomas positivos y negativos del dolor neuropático	13
FIGURA 6	Validación psicométrica ID-Pain para la detección del dolor neuropático	15
FIGURA 7	Escala de EVA, que va de 0 (sin dolor) a 10 (máximo dolor)	16
FIGURA 8	Estructura general del receptor sigma-1	21
FIGURA 9	Reconocimiento de ligando	22
FIGURA 10	Localización sub-celular del receptor sigma-1	22
FIGURA 11	Role de los receptores Sigma-1	23
FIGURA 12	Neuroesteroides, ligandos endógenos del receptor sigma-1.	24
FIGURA 13	Ligandos exógenos del receptor sigma-1 (Agonistas)	25
FIGURA 14	Estructura química del Antagonista selectivo de los receptores sigma-1 (S1RA por sus siglas en inglés Sigma-1 Receptor Antagonist)	26
FIGURA 15	Estructura química del <b>Haloperidol</b>	26
FIGURA 16	Estructura química del antagonista del receptor sigma-1 ( <b>LMH-2</b> )	27
FIGURA 17	Cuadro de afinidades de los receptores sigma de <b>LMH-2</b> y compuestos de referencia	28
FIGURA 18	Efecto alodínico y hiperalgésico del compuesto <b>LMH-2</b>	28
FIGURA 19	Curva dosis-respuesta del efecto antialodínico (A) y antihiperalgésico (B) de <b>LMH-2</b> .	29
FIGURA 20	Farmacóforo de <b>LMH-2</b> para la afinidad al receptor sigma-1	32
FIGURA 21	Diseño de estructuras basados en el fármaco <b>haloperidol, S1RA, 4-IBP y LMH-2</b>	32
FIGURA 22	Visualización en 3D del compuesto <b>LMH-2</b> en el sitio de unión del receptor sigma-1.	33
FIGURA 23	Modelos farmacofórico para ligandos selectivos Sigma-1	34
FIGURA 24	Modelo farmacofórico propuesto por Glennon	34

<b>FIGURA 25</b>	Patrón farmacóforo encontrado en los ligandos de los receptores sigma-1 aplicado a <b>LMH-2</b> .	35
<b>FIGURA 26</b>	Programa Molinspiration Cheminformatics online	37
<b>FIGURA 27</b>	Ruta retrosintética de los compuestos <b>FRR-1</b> y <b>FRR-2</b>	39
<b>FIGURA 28</b>	Síntesis de los productos finales, derivados piperidínicos.	39
<b>FIGURA 29</b>	Programa Swisstarget Prediction	40
<b>FIGURA 30</b>	Programa PASS online	41
<b>FIGURA 31</b>	Programa de ACD/ToxSuite	42
<b>FIGURA 32</b>	Programa OSIRIS (DataWarrior)	43
<b>FIGURA 33</b>	Programa de predicción del metabolismo BioTransformer 3.0	44
<b>FIGURA 34</b>	Programa admetSAR 2.0	45
<b>FIGURA 35</b>	Programa ADMETlab 2.0	46
<b>FIGURA 36</b>	Síntesis del compuesto <b>FRR-1</b>	48
<b>FIGURA 37</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (600MHz) del compuesto <b>FRR-1</b>	49
<b>FIGURA 38</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (150MHz) del compuesto <b>FRR-1</b>	50
<b>FIGURA 39</b>	Espectro de masas (IE) del compuesto <b>FRR-1</b>	51
<b>FIGURA 40</b>	Síntesis del compuesto <b>FRR-2</b>	52
<b>FIGURA 41</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400MHz) del compuesto <b>FRR-2</b>	53
<b>FIGURA 42</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100MHz) del compuesto <b>FRR-2</b>	54
<b>FIGURA 43</b>	Espectro masas (IE) del compuesto <b>FRR-2</b>	55
<b>FIGURA 44</b>	Metabolitos y sitio del metabolismo del compuesto <b>S1RA</b>	63
<b>FIGURA 45</b>	Metabolitos y sitio del metabolismo del compuesto <b>haloperidol</b>	64
<b>FIGURA 46</b>	Metabolitos y sitio del metabolismo de los compuestos <b>FRR-1</b> , <b>FRR-2</b> y <b>LMH-2</b> .	64
<b>FIGURA 47</b>	Visualización en 3D y 2D del confórmero <b>haloperidol</b> en el sitio de unión del receptor sigma-1	67
<b>FIGURA 48</b>	Interacciones 3D y 2D del confórmero <b>S1RA</b> en el sitio de unión del receptor sigma-1.	68
<b>FIGURA 49</b>	Interacciones 3D y 2D del confórmero <b>LMH-2</b> en el sitio de unión del receptor sigma-1.	69
<b>FIGURA 50</b>	Interacciones 3D y 2D del confórmero <b>FRR-1</b> en el sitio de unión del receptor sigma-1	70
<b>FIGURA 51</b>	Interacciones 3D y 2D del confórmero <b>S1RA</b> en el sitio de unión del receptor sigma-1	70

# ÍNDICE DE TABLAS

Nº TABLAS	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
TABLA 1	Características del dolor Neuropático y Nociceptivo	6
TABLA 2	Farmacoterapia para el dolor neuropático	17
TABLA 3	Valores de las reglas de Lipinski y Veber	37
TABLA 4	Propiedades fisicoquímicas de los compuestos finales	48
TABLA 5	Predicción de actividad biológica con el programa PASS Online	56
TABLA 6	Predicción de dianas terapéuticas de los compuestos <b>FRR1-2, LMH-2, S1RA y Haloperidol</b>	57
TABLA 7	Propiedades toxicológicas, quasi-fármaco y clasificaciones como fármaco de los compuestos finales <b>FRR1-2, LMH-2, S1RA y Haloperidol.</b>	58
TABLA 8	Resultados predictivos por admetSAR y ADMETlab para los compuestos <b>FRR-1, FRR-2, LMH-2, S1RA y Haloperidol.</b>	59
TABLA 9	Bloqueo de canales hERG	61
TABLA 10	Probabilidad de inhibición de las isoformas del CYP450	61
TABLA 11	Probabilidad de toxicidad aguda de los compuestos.	62
TABLA 12	Clasificación de toxicidad de la OECD	62
TABLA 13	Afinidad de los compuestos <b>FRR 1-2, LMH-2, S1RA y haloperidol</b>	65
TABLA 14	Correlación de resultados in vitro e in silico.	71
TABLA 15	Consenso farmacológico	73
TABLA 16	Sistemas utilizados como fase móvil para CCF	76

# INDICE DE ESPECTROS

Nº	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
<i>Espectro</i>		
<i>Espectro 1</i>	FRR-1: RMN <sup>1</sup> H, 600MHz, DMSO	81
<i>Espectro 2</i>	FRR-1: RMN <sup>13</sup> C, 150 MHz, DMSO	82
<i>Espectro 3</i>	FRR-2: RMN <sup>1</sup> H, 400 MHz, DMSO	83
<i>Espectro 4</i>	FRR-2: RMN (DEPT) <sup>13</sup> C, 100MHz, DMSO	84
<i>Espectro 5</i>	Masas (IE) compuesto <b>FRR-1</b>	85
<i>Espectro 6</i>	Masas (IE) compuesto <b>FRR-2</b>	86

## RESUMEN

El dolor neuropático es un padecimiento presente en diversas enfermedades, constituye un desafío significativo para la Salud Pública, afectando amplios sectores de la población y generando importantes implicaciones económicas y sociales relevantes. Aunque existen diversos tipos de fármacos para tratar dicho padecimiento, pero hoy en día no cubren las expectativas terapéuticas, actuando con baja eficacia o provocando una tolerancia en su uso crónico, disminuyendo la calidad de vida de los pacientes. Por lo tanto, es necesaria la investigación en el desarrollo de nuevas moléculas que ofrezcan alternativas terapéuticas más afectivas para tratar dicho padecimiento.

En ese contexto se ha elegido al compuesto **LMH-2**, un análogo del haloperidol, un neuroléptico que ha demostrado efecto nociceptivo en un modelo de dolor neuropático en estudios farmacológicos, el cual posee una alta afinidad hacia los receptores sigma-1 actuando como antagonista.

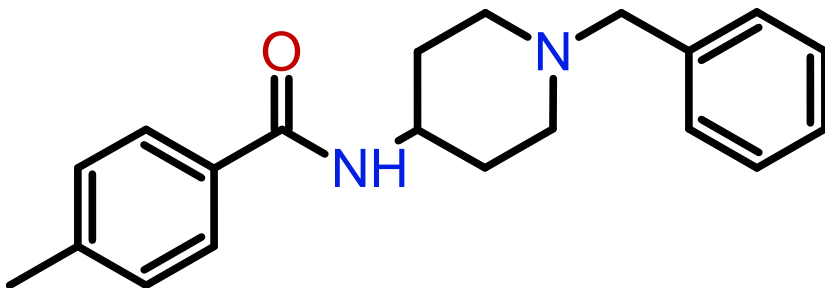
En este trabajo se describe el diseño y la síntesis de dos compuestos análogos del compuesto **LMH-2**, con una sustitución del grupo flúor en posición *para* (*p*) del benceno disustituido por un metilo en el compuesto **FRR-1** y un terbutilo en el compuesto **FRR-2**, con la finalidad de mejorar las propiedades farmacológicas del prototipo **LMH-2**. Sus estructuras fueron caracterizadas por técnicas espectroscópicas de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C y espectrométricas (espectrometría de masas).

Las propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas y toxicológicas se realizaron por estimaciones *in silico* con resultados adecuados; al efectuar un análisis de consenso farmacológico, se determinó que ambos compuestos fueron *hits* computacionales seguros. Los dos compuestos se evaluaron *in vitro* sobre el receptor sigma-1, observando que los compuestos propuestos fueron líderes experimentales, al presentar valores de afinidad nanomolares, resaltando al compuesto **FRR-2**, con afinidad de 4.8 nM.

Mediante acoplamiento molecular, se determinó que ambos compuestos mantuvieron afinidad con el receptor sigma-1, observando sus interacciones ligando-proteína primordiales para su reconocimiento, fundamentando el posible modo de unión y su relación con los resultados farmacológicos.

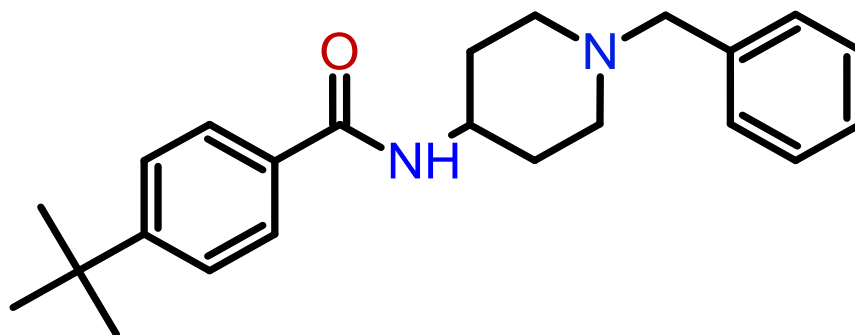
## 0. COMPUESTOS SINTETIZADOS

Compuestos finales benzamidas piperidínicas



FRR-1

*N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-metilbenzamida



FRR-2

*N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-terbutilbenzamida

# 1. INTRODUCCIÓN

El dolor neuropático es definido por la Asociación Internacional para el Estudio de Dolor (IASP) desde el año 2007 como el “dolor que se origina como consecuencia directa de una lesión o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial. Este tipo de dolor es muy complejo, y a pesar de los avances farmacológicos de los últimos años continúan siendo una causa de sufrimiento importante en pacientes con dolor crónico, ya que no responden a los analgésicos convencionales.<sup>1</sup>

En América Latina se estima que el dolor neuropático afecta al 2% de la población. De los pacientes que acuden a consulta por dolor, el 15% es de origen neuropático. La mayoría de los pacientes que presentan síntomas de dolor neuropático son manejados en atención primaria, y sólo la minoría son trasladados a especialistas del dolor, que generalmente son cuadros refractarios. A pesar de que existen tratamientos, ningún fármaco ha demostrado beneficio total y exclusivo para aliviar el dolor neuropático en la actualidad, sólo proporcionan beneficio parcial, por ejemplo, los casos de la pregabalina, gabapentina, lidocaína, carbamazepina, entre otros. Además, el tratamiento debe ser individualizado, seleccionando el fármaco más adecuado para el paciente dependiendo de la edad, comorbilidades asociadas, etc.

Dada esta problemática, es importante diseñar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad, que sean más eficaces y de baja toxicidad. Así como explorar nuevos blancos terapéuticos, para esto, se propuso diseñar, sintetizar y biosimilar compuestos bioactivos de tipo alquilbenzamidas, los cuales se espera que sean afines al receptor sigma-1 como una alternativa para el tratamiento del dolor neuropático.

## 2. ANTECEDENTES

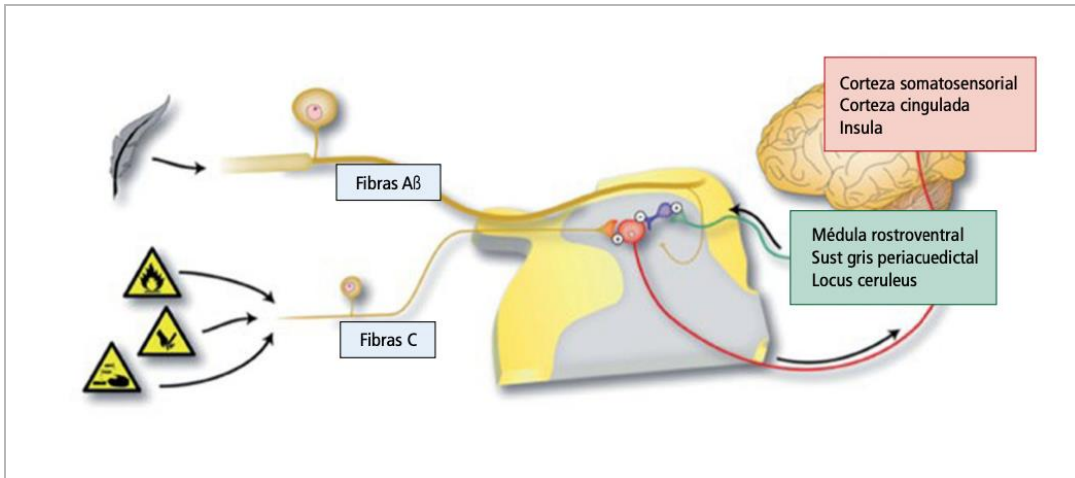
### 2.1 Definición de dolor

El dolor es un sistema de alarma que avisa que hay un daño actual o potencial y permite protegernos de ese daño, constituyendo un mecanismo de defensa. El dolor que se prolonga por más de tres meses es denominado dolor crónico, transformándose en una entidad patológica en sí mismo.

En el año 2007 se da como nueva definición por la AISP como “el dolor que se origina como consecuencia directa de una lesión o enfermedad que afecta el sistema somatosensorial”. En esta nueva definición, el término enfermedad se refiere a procesos patológico-específicos tales como inflamación, enfermedades autoinmunes o canalopatías, mientras que lesión se refiere a un daño macro o microscópicamente identificable.<sup>1,2</sup>

Es importante tener en cuenta que el dolor es, en principio, un mecanismo de defensa, cuya función es detectar y localizar los procesos que dañan las estructuras corporales, pero de igual manera es un fenómeno subjetivo que puede estar o no vinculado a una lesión o patología orgánica. Además, cuando esta vinculación existe, la intensidad del dolor no está necesariamente relacionada con la gravedad de la alteración que lo produce.

Por lo tanto, este mecanismo se activa cuando existe un estímulo mecánico, térmico o químico que activa los nociceptores, llevando la información hacia las neuronas nociceptivas en la asta posterior de la médula espinal, que se proyectan vía tálamo a las áreas corticales generando las características sensoriales y emocionales del dolor. Estas vías espinales pueden transmitir estímulos inhibitorios descendientes o influyentes facilitadoras desde el cerebro como se muestra en la **Figura 1.**<sup>1,3</sup>



**Figura 1. Vías del dolor**<sup>4</sup>

Se han descrito tres tipos principales de dolor:

- **Dolor nociceptivo:** surge del daño real o potencial al tejido no neural y se debe a la activación de los nociceptores A- $\delta$  y C en respuesta a un estímulo nocivo sobre los tejidos corporales, que pueden ser secundario a una lesión, enfermedad, infección o cirugía.
- **Dolor Inflamatorio:** debido a un daño periférico en tejidos, generando el proceso de inflamación y producido por mediadores químicos.
- **Dolor neuropático:** debido a una lesión primaria o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial debido a una disfunción en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) o Sistema Nervioso Central (SNC).<sup>5</sup>

Se han identificado muchos tipos de dolor neuropático, sin embargo, no hay una clasificación que satisfaga totalmente. La más frecuentemente utilizadas es la que se basa en la localización del generador del dolor, y lo divide en dos tipos:

- 1) Dolor de origen central (ej. Accidente cardiovascular, esclerosis múltiple)
- 2) Dolor de origen periférico (ej. Neuropatía diabética, neuropatía inducida por agentes quimioterapéuticos).<sup>5</sup>

Entre los tipos de dolor se encuentran los de presentación espontánea en ausencia de lesión causal, las reducciones anormales del umbral del dolor y los dolores producidos por tacto y estímulos mecánicos de baja intensidad. Estas



formas de dolor pueden ser considerados como expresiones alteradas del sistema neurofisiológico encargado del procesamiento de señales transmitidas.<sup>6</sup>

## 2.2 Dolor Neuropático y su prevalencia.

El dolor neuropático se produce por lesiones que alteran la estructura y función del sistema nervioso somatosensorial. Estas lesiones producen respuesta de manera espontánea ante la estimulación nociva e inocua, resultando en amplificación patológica.<sup>5</sup>

Este tipo de dolor posee una múltiple etiología, afectando del 25 al 29% de la población a nivel mundial mientras que en México se estima que afecta a 28 millones de personas. En un estudio del 2018 se observó que el 17% de los pacientes atendidos en los centros de atención primaria presentaron dolor crónico.

En nuestro país, se carece de información documental que caracterice la prevalencia de este fenómeno. Sin embargo, un estudio nacional de corte epidemiológico sugiere que individuos que acudieron a los centros de medicina familiar y presentaron una enfermedad dolorosa crónica claramente documentada, tuvieron cuadros frecuentemente asociados a dolor neuropático: por lesión de médula espinal (57%); por dolor lumbar con componente neuropático (37%); por neuropatía diabética (30%) y por dolor en esclerosis múltiple (28%).<sup>7</sup>

## 2.3 Etiología del dolor neuropático

Este síndrome de dolor crónico tiene su origen en un daño estructural de las vías de conducción y/o el cerebro. Estos cambios condicionan una de sus principales características: no requerir de un estímulo de los nociceptores para que el dolor se manifieste, implicando que no hay transducción o conversión de un estímulo nociceptivo, cualquiera que este sea, en un impulso eléctrico. Tal hecho es lo que permite considerar al dolor neuropático como una enfermedad neurológica.

El dolor nociceptivo, por el contrario, se detona por estímulos fisiológicos, como inflamación, calor o presión en los nociceptores correspondientes. Generando

una respuesta que suele ser de duración limitada y que no se asocia normalmente a una lesión del sistema nervioso (**Tabla 1.**).

**Tabla 1.** Características del dolor Neuropático y Nociceptivo

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	DOLOR NEUROPÁTICO	DOLOR NOCICEPTIVO
<b>Causa</b>	Daño al sistema nervioso, usualmente acompañado de cambios mal adaptativos del sistema nervioso	Daño a tejido actual o potencial
<b>Descriptor</b>	Lancinante, urente, punzante	Agudo, palpitante, presión
<b>Déficit sensorial</b>	Frecuente: adormecimiento, parestesias	Infrecuente: si está no tiene distribución metamérica
<b>Déficit motor</b>	Puede haber déficit si hay nervios afectados. Distonías y espasticidad si hay lesiones del SNC o del SNP (síndrome dolor regional complejos)	Puede haber debilidad por dolor
<b>Hipersensibilidad</b>	Dolor a menudo evocado por estímulos no dolorosos (alodinia) o respuesta exagerada a estímulos (hiperalgesia)	Poco común, salvo en territorio vecino a la lesión
<b>Carácter</b>	Es frecuente la irradiación distal	Irradiación es poco común y en general proximal a lesión
<b>Paroxismos</b>	Exacerbaciones frecuentes e impredecibles	Poco comunes, asociadas a actividad
<b>Signos autonómicos</b>	Cambios de color, temperatura, edema, diaforesis en 30-50% de pacientes	Poco común

Constituye esencialmente un sistema de alarma y defensa, ya que permite detectar la presencia de un daño orgánico o potencial. Una lesión estructural de un nervio deriva a dolor crónico con mayor probabilidad que el dolor producido por daño o tejido somáticos, se caracteriza por mala respuesta a los analgésicos convencionales y suele ser más refractario en el manejo.<sup>1</sup>

## 2.4 Mecanismos/ Fisiopatología

El dolor neuropático se presenta como consecuencia de un proceso de sensibilización que puede ser a nivel periférico o central, inducidos por una lesión. Ambos procesos se caracterizan por la disminución del umbral de activación de los nociceptores.

En el proceso de sensibilización periférica se presentan cambios en las fibras periféricas después de una lesión al nervio, es la primera fase de la afectación neuropática. En este estado los axones se degeneran y otros permanecen intactos pero capaces de generar hiperexcitabilidad (respuesta sensible a estímulos) en las fibras eferentes primarias.

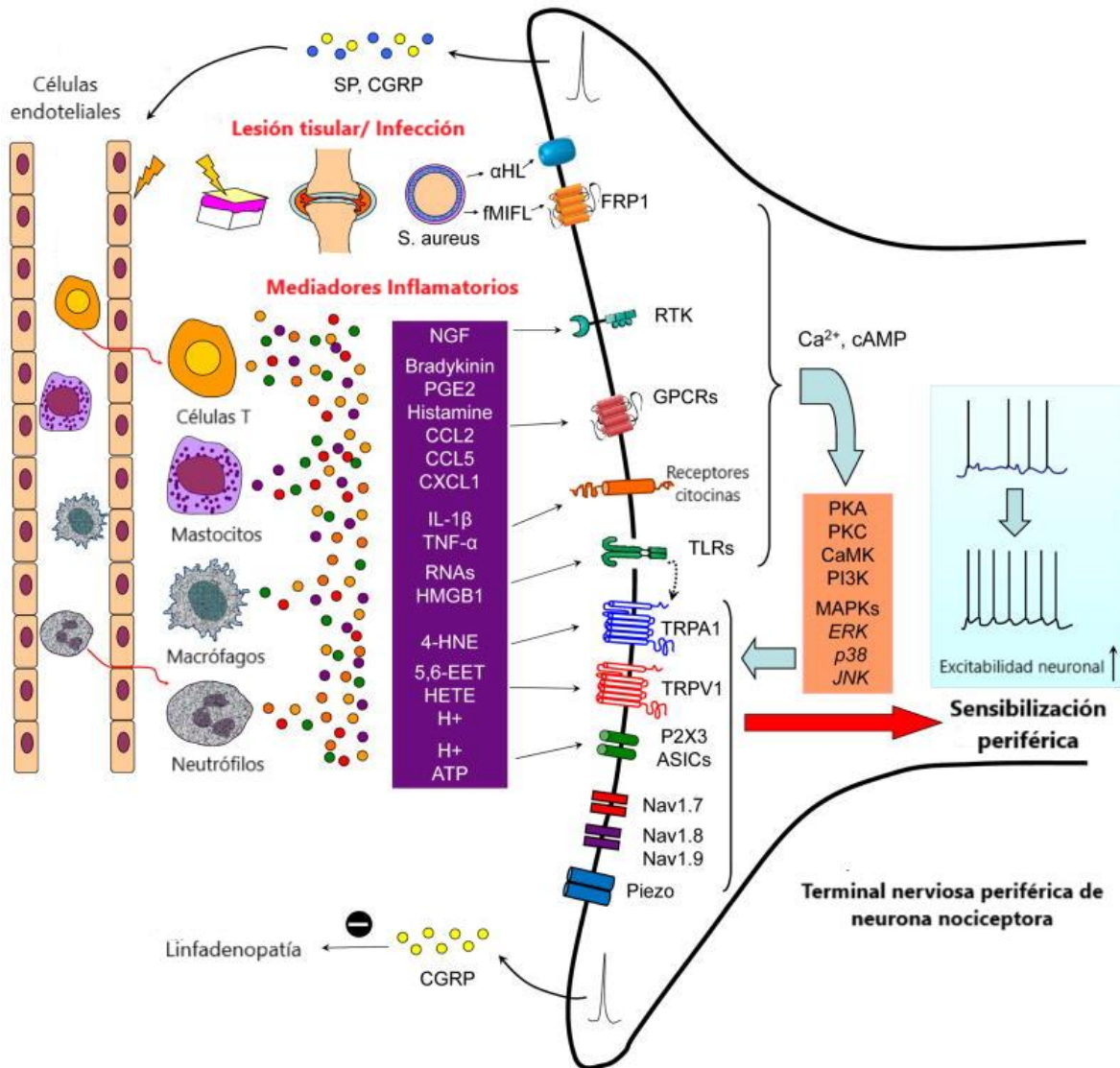
La lesión y la infección del tejido causan inflamación mediante la extravasación de plasmas y la infiltración de células inmunes como macrófagos, células T y neutrófilos en el tejido dañado. Las células inmunitarias infiltradas y las células residentes, incluidos mastocitos, macrófagos y queratinocitos, liberan varios mediadores inflamatorios, como bradisinina, prostaglandinas, H<sup>+</sup>, ATP, factores de crecimiento nervioso (NGF), citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) y quimiocinas proinflamatorias (CCL2, CXCL1, CXL5). Las neuronas nociceptivas expresan los receptores de todos estos mediadores inflamatorios, que actúan sobre sus respectivos receptores en las fibras nerviosas nociceptoras periféricas.

Estos receptores incluyen GPCR, receptores ionotrópicos y receptores de tirosina quinasa, y su activación da como resultados las generaciones de segundos mensajeros como Ca<sup>2+</sup> y cAMP, que a su vez activa varias quinasas, como PKA, PKC, CaMK, PI3K y MAPK (ERK, p38 y JNK). La activación de estas quinasas causa hipersensibilidad e hiperexcitabilidad de las neuronas nociceptoras (conocida como sensibilización periférica), a través de la modulación de moléculas de transducción clave, como el canal iónico potencial del receptor transitorio A1 y V1 (TRPA1 y TRPV1) y PIEZO (un canal iónico activado por estiramiento) como, así como moléculas conductoras clave como los canales de sodio.

Las neuronas nociceptoras también expresan TLR (es decir, TLR3, TLR4 y TLR7), estas pueden activarse mediante ligandos exógenos (conocidos como patrones moleculares activados por patógenos, que incluyen componentes virales

y bacterianos) y ligandos endógenos (conocidos como patrones moleculares activados por peligro. Ciertos miARN sirven como nuevos mediadores de dolor para activar los nociceptores a través de TLR7 que está acoplado con TRPA1.

La infección bacteriana también activa directamente los nociceptores e induce hiperexcitabilidad neuronal mediante la liberación de péptidos N-formilados bacterianos y la formación de la toxina  $\alpha$ -hemolisina ( $\alpha$ -HL) formadoras de poros. La formación de los nociceptores también libera sustancia P y CGRP que participan en la generación de inflamación neurogénica. El CGRP también regula la linfadenopatía después de la inflamación a través de los mediadores inflamatorios como se muestra en la **Figura 2**.<sup>8</sup>



**Figura 2.** Inflamación provocada a través de mediadores inflamatorios y sensibilización periférica.<sup>8</sup>

En el caso de una situación de dolor crónico, la periferia continúa mandando información nociceptiva hacia la asta dorsal de la médula espinal. Las células relacionadas en procesos inflamatorios como son los mastocitos, neutrófilos y basófilos liberan mediadores inflamatorios que provienen de estímulos nocivos, estos mediadores reducen el umbral de estimulación y generan que el nociceptor deje de ser exclusivamente un detector de estímulos dolorosos y que pueda ser también por estímulos no dolorosos.

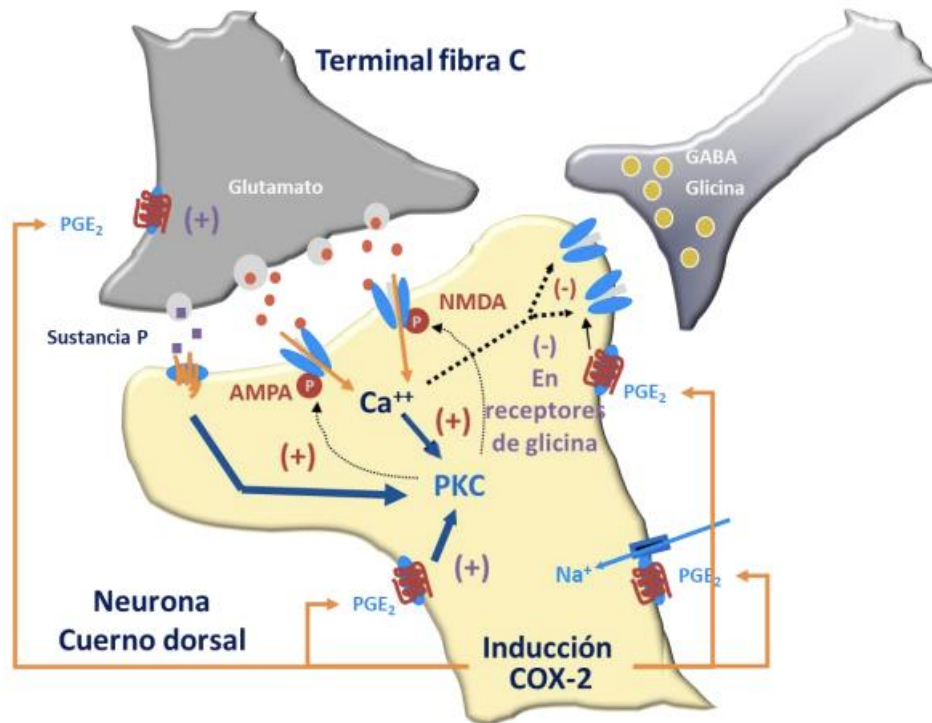
Por lo tanto, la neurona envía desde su soma, vesículas que liberan a las sustancias P y al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Estas dos sustancias una vez liberada en la periferia, se unen a sus respectivos receptores localizados en distintas células relacionadas con el proceso inflamatorio, mencionados previamente.<sup>8,9</sup>

Este tipo de unión causa la liberación de una serie de sustancias proinflamatorias, como lo son el factor de crecimiento neural derivado de la glía (GDNF), el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), bradicinina y serotonina que actúan a través de sus receptores y que constituyen la *sopa inflamatoria*. Produciendo cambios de pH, liberación de ATP de las células lesionadas, síntesis de óxido nítrico (NO), etc. Además, se favorece la síntesis de ciclooxigenasas (COX), que a su vez promueven la síntesis de prostaglandinas (PGs) y eicosanoides.<sup>8,9</sup>

Lo antes mencionado provoca la activación de segundos mensajeros intracelulares con dos efectos: la fosforilación de los canales de TRPV y los de Na<sup>+</sup> modificando el umbral y su cinética, lo que induce la amplificación de la señal hacia la médula espinal y los centros superiores. A todo esto, se le conoce como sensibilización periférica, lo que atribuye al dolor crónico.<sup>8,9</sup>

En el caso de la sensibilización central es debida a la existencia de un tejido dañado y el dolor persiste durante unos días o semanas, se produce como un mecanismo de adaptación de los nociceptores (fibras que perciben el dolor). La sensibilización central se refiere a la mayor capacidad de respuesta de las neuronas nociceptivas en el SNC ante la entrada aferente normal o subumbral. También los mecanorreceptores A- $\beta$  de bajo umbral obtienen accesos a los sistemas

transmisores del dolor, lo que provoca que los estímulos normalmente no dolorosos se perciban como doloroso (**Figura 3**).<sup>9</sup>



**Figura 3.** Sensibilización central

Al llegar una señal aumentada desde la periferia debido a la descarga sostenida de las fibras C, libera presinápticamente sustancias neuroexcitatorias como sustancias P (se une a receptores de neurocininas NK subtipo 1), péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) y ATP, en neuronas de salida en la lámina I de la asta dorsal superficial. Así mismo hay una liberación de glutamato, el cual, se une a receptores específicos de NMDA, y más tarde se une al receptor metabotrópico del glutamato.

Al activarse, los receptores de NMDA (normalmente silenciosos) localizados en la neurona postsináptica contribuyen a su despolarización, debido al aumento de calcio intracelular por la retirada de magnesio del receptor activado por glutamato. Accionando una serie de vías de señalización dependientes de calcio y segundos mensajeros, esta sucesión de eventos aumenta la excitabilidad de neuronas de salida y facilita la transmisión de mensajes de dolor al cerebro.

Cabe mencionar que también hay una serie de cambios intracelulares con expresión de oncogenes, síntesis de proteínas, activación enzimática (Proteincinasas, COX y NO, este último activa la liberación de sustancia P y COX favoreciendo la síntesis de PGs E2, la cual es sustancia algésica que aumenta la señal nociceptiva.<sup>9</sup>

También se ha demostrado que las lesiones del sistema nervioso periférico y central activan las células gliales de la médula espinal. Después de dicha lesión la microglía conduce a la liberación de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-1B, entre otras), actuando sobre las neuronas, éste es un mecanismo importante de dolor exagerado desaminando el dolor al tejido vecino fuera de la lesión nerviosa.

La neuroinflamación de la médula espinal provoca dolor crónico a través de interacciones neurona-glía y la sensibilización central. Esta neuroinflamación se desencadena por la liberación dependiente de la actividad de los activadores gliales de los terminales centrales de las neuronas aferentes primaria y/o por la disrupción de la barrera hematoencefálica. La activación y proliferación de la microglía y de astrocitos, así como de células inmunológicas, facilitan la neuroinflamación y por consiguiente la generación de citocinas antiinflamatorias y mediadores lipídicos proresolución (PRLM) para normalización, plasticidad sináptica y dolor crónico anormal (**Figura 4**).

Estos cambios amplifican de forma importante, manteniendo la señal nociceptiva que se produce en la asta dorsal de la médula, y producen lo que se conoce como sensibilización central.

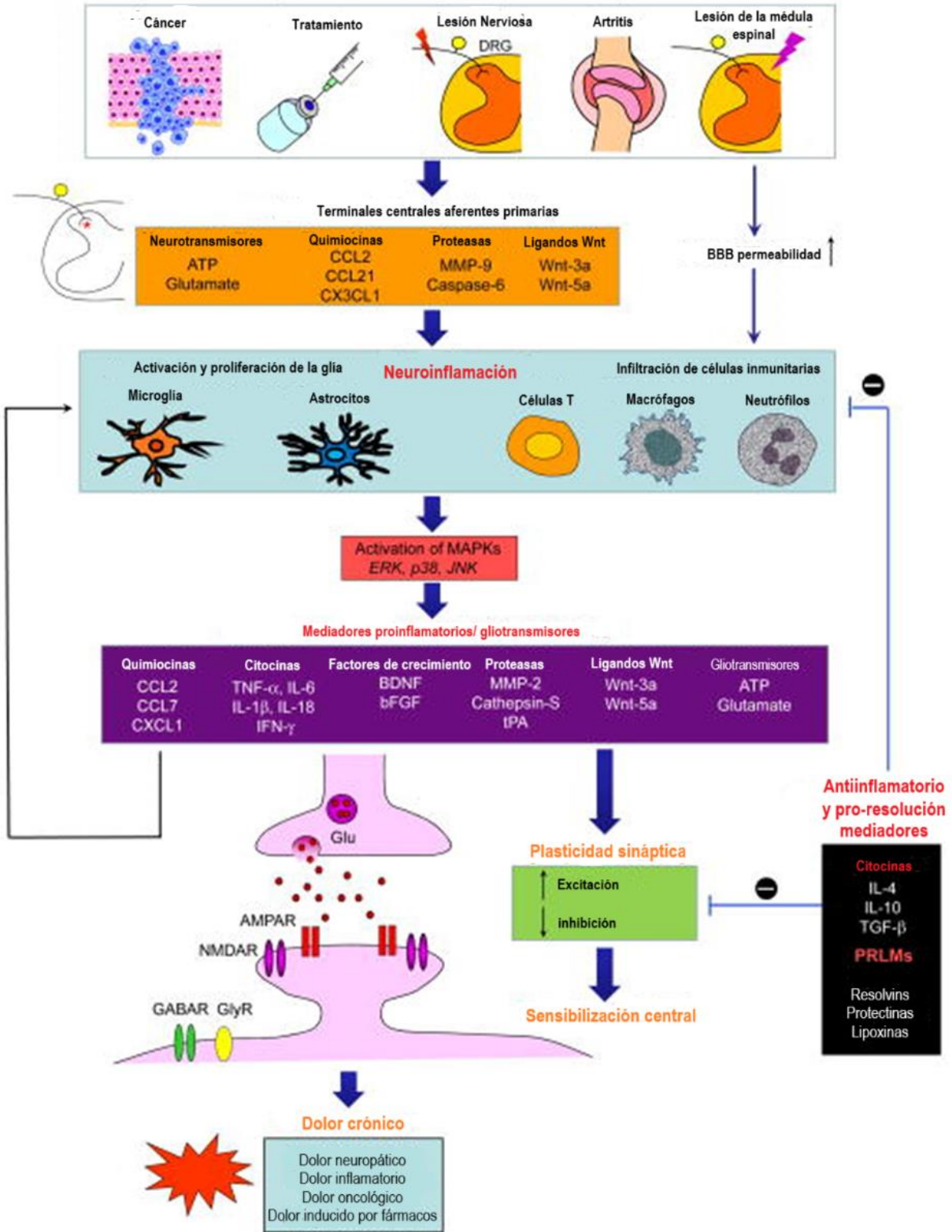
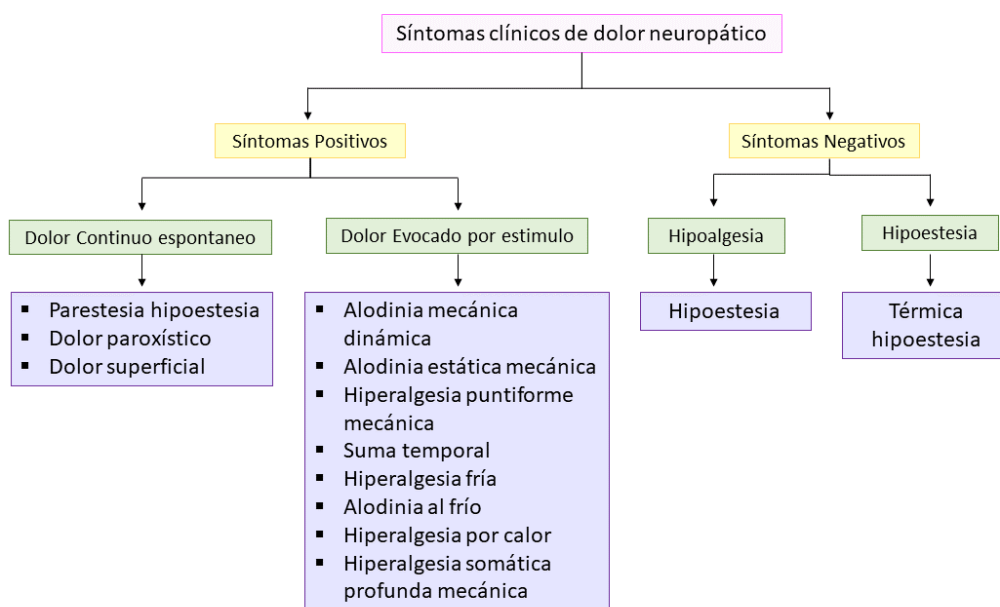


Figura 4. Esquema general de la sensibilización central.<sup>4</sup>



## 2.5 Síntomas del dolor neuropático

La evaluación de los síntomas del dolor neuropático es de suma importancia para la obtención de mejores mecanismos implicados para la identificación de nuevos enfoques terapéuticos. La base del dolor neuropático es la lesión o lesión de las neuronas aferentes, lo que conduce a entradas incompletas al sistema nervioso, lo que resulta en pérdida sensorial y desarrollo de síntomas sensoriales negativos (**Figura 5**).



**Figura 5.** Síntomas positivos y negativos del dolor neuropático.<sup>4</sup>

Los síntomas sensoriales positivos se deben a la hiperactividad y al aumento de la sensibilidad de los nociceptores, que se caracterizan por dos características distintivas; alodinia e hiperalgnesia. Los déficits sensoriales suelen incluir hipersensibilidad mecánica y térmica. Los síntomas positivos incluyen parestesia (sensación de hormigueo o hormigueo en la piel), sensaciones similares a descargas eléctricas, dolor continuo espontáneo (no inducido por un estímulo), así como dolor punzante.

Mientras que los síntomas negativos incluyen hipoalgesia (disminución de la sensibilidad al estímulo nociceptivo), hipoestesia (sensibilidad reducida a las vibraciones, entumecimiento), debilidad y cambios reflejos. Además, la mayoría de

los pacientes tienen hipersensibilidad, ardor, escozor, lancinación y dolores similares a los de un shock.

## 2.6 Diagnóstico de dolor neuropático

La diferenciación entre el dolor neuropático y nociceptivo se vuelve complicada porque están estrechamente relacionados a través de varias vías de dolor por lo tanto para obtener un diagnóstico preciso es fundamental para brindar el tratamiento adecuado, es por eso por lo que el diagnóstico adecuado depende de distintos aspectos, como el historial médico y el examen físico.

Para el examen físico se realizan pruebas electrofisiológicas, histológicas y de imágenes estructurales. Las técnicas electrofisiológicas son cruciales para identificar cualquier lesión somatosensorial debida a una lesión o enfermedad mediante el uso de estimulaciones eléctricas en fibras grandes y pequeñas juntas para determinar la velocidad de conducción nerviosa. Los potenciales evocados nociceptivos con una sensibilidad e intensidad adecuados se utilizan para identificar cualquier daño al nervio. Las técnicas de imaginación como la resonancia magnética y la ecografía, junto con la ecotextura, también se utilizan para la visualización y diagnóstico de la neuropatía periférica. <sup>4</sup>

Se estima que el dolor es la experiencia de un individuo con síntomas variables entre diferentes pacientes. En la mayoría de los casos el dolor neuropático se ha entendido como una combinación de síntomas positivos y negativos. Es por eso por lo que un solo síntoma no puede predecir el dolor neuropático, pero ciertos síntomas descriptivos del dolor elevan la probabilidad de identificar este tipo de dolor.

Existen otros métodos de diagnóstico que se basan en la expresión de la enfermedad por parte del paciente: las herramientas de detección verbal. Se han diseñado varios cuestionarios para identificar este tipo de dolor (**Figura 6**). <sup>4</sup>

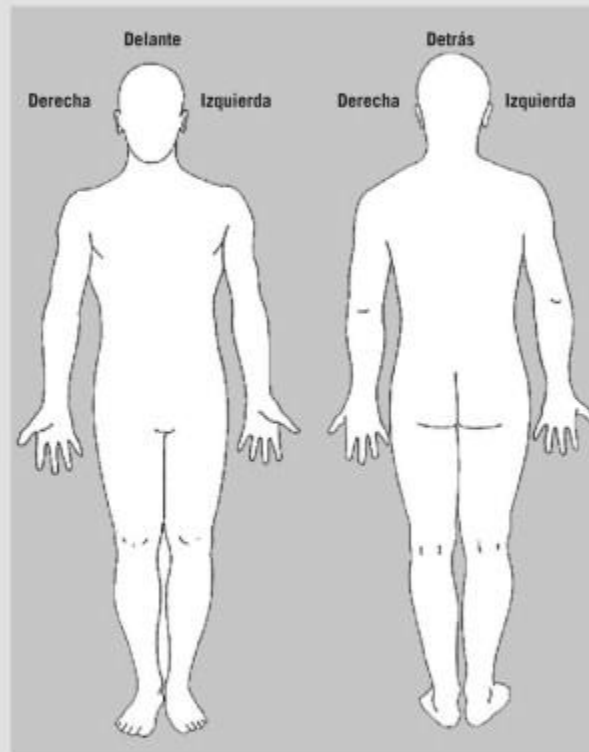
### Cuestionario de Detección de Dolor Neuropático®

(Versión española del cuestionario ID-PAIN® de Portenoy<sup>16</sup>)

1. Por favor, responda a las siguientes preguntas sobre su dolor.

- |   |                             |                             |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| a. ¿Tiene dolor?  | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No |
| b. ¿Tiene algún dolor <b>aparte</b> de dolor de cabeza o migraña? | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No |

2. Señale en la figura las zonas donde le duele



3. Marque **Sí** o **No** según haya sido su dolor en la última semana. Refiérase a las zonas marcadas en la figura anterior

- |  |                             |                             |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| a. ¿Ha notado el dolor como pinchazos?                     | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No |
| b. ¿Ha notado el dolor como quemazón?                      | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No |
| c. ¿Ha notado el dolor como acorchamiento?                 | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No |
| d. ¿Ha notado el dolor como descargas eléctricas?          | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No |
| e. ¿Empeora el dolor con el roce de la ropa o las sábanas? | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No |
| f. ¿El dolor es sólo en las articulaciones?                | <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No |

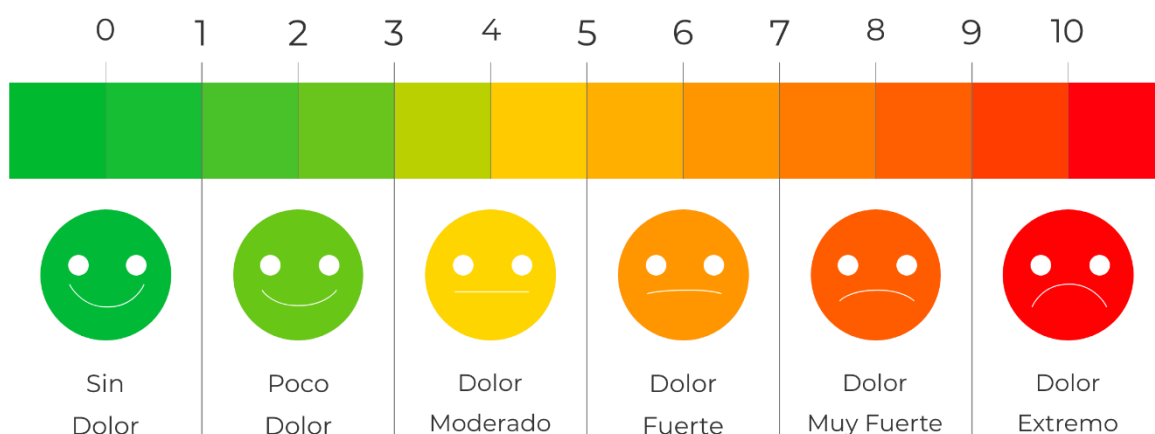
**Muchas gracias por su colaboración**

**Figura 6.** Validación psicométrica ID-Pain para la detección del dolor neuropático.<sup>4</sup>

Es necesario realizar varias pruebas para poder diagnosticar el dolor neuropático, las escalas de dolor y cada uno de los síntomas son cruciales para evaluar los efectos de cualquier terapia nueva o molécula bioactiva.<sup>4</sup>

### 2.6.1 Escala de EVA

Es necesario saber sobre la intensidad de dolor de cada individuo para proporcionar el analgésico adecuado, esto es con ayuda de la escala numérica o la escala visual analógica (EVA), la primera valora el dolor mediante números que van de menor a mayor en relación con la intensidad del dolor, que van de 0 a 10, siendo 0 ausencia y 10 el máximo dolor, la segunda lleva el método subjetivo más empleado por tener una mayor sensibilidad de medición, la cual no emplea numeración ni palabras descriptivas, consiste en una línea de 10 cm de longitud, en los extremos se señala el nivel de dolor que corresponde la intensidad de dolor. Con este tipo de escalas se puede ayudar a determinar la intensidad de dolor de cada paciente (**Figura 7**)<sup>9</sup>



**Figura 7.** Escala de EVA, que va de 0 (sin dolor) a 10 (máximo dolor)<sup>9</sup>

## 2.7 Tratamiento y terapias

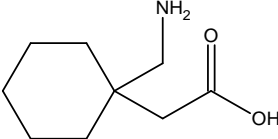
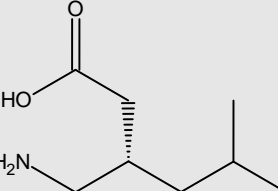
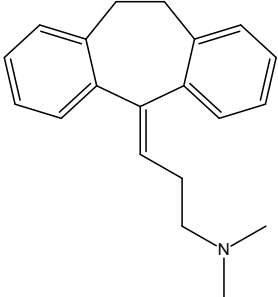
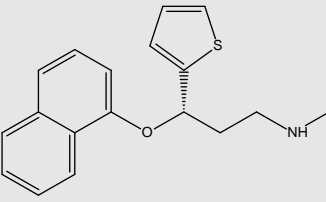
Los tratamientos del dolor neuropático generalmente están centrados en aliviar los síntomas, ya que rara vez se pueden tratar, por lo cual el tratamiento de las afecciones etiológicas como la diabetes mellitus suelen ser insuficientes para el alivio del dolor neuropático.

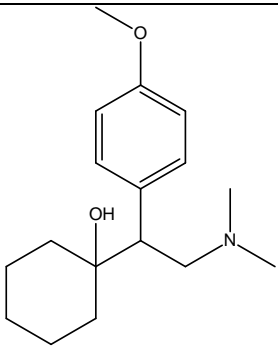
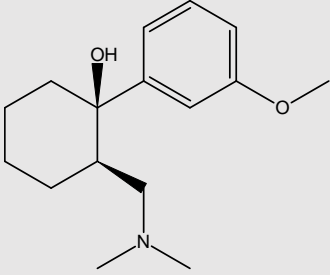
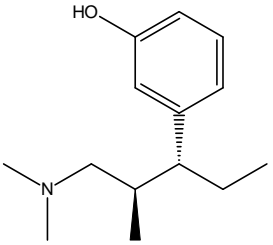
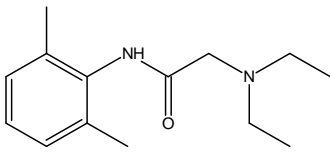
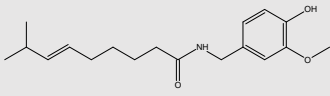
Desafortunadamente los pacientes que sufren este tipo de dolor no responden a los analgésicos convencionales como es el paracetamol, los AINES u opioides débiles como la codeína.<sup>10</sup>

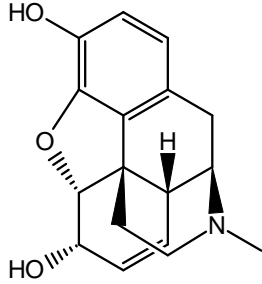
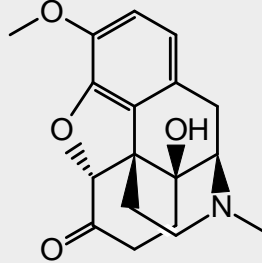
El Grupo de Interés Especial sobre Dolor neuropático (NeuPSIG) propuso los gabapentinoides, los antidepresivos tricíclicos (ATC) y también los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y norepinefrina (IRSN) como fármacos

de primera línea para el dolor neuropáticos. Se han propuestos lidocaína, capsaicina y tramadol como tratamiento de segunda línea, mientras que los opioides potentes como la morfina, oxicodona y la toxina botulínica A (BTX-A) se incluyeron como tratamientos de tercera línea para el dolor neuropático periférico. (Tabla 2)

**Tabla 2.** Farmacoterapia para el dolor neuropático.<sup>9,11</sup>

Terapia	Clase de Fármaco	Fármaco	Mecanismo de Acción	Efecto adverso
Terapia de primera línea	Gabapentinoídes	Gabapentina 	Ligando de canal de Ca <sup>2+</sup>	Letargo, vértigo, hinchazón periférica, visión borrosa.
		Pregabalina 	Ligando de canal de Ca <sup>2+</sup>	Letargo, vértigo, hinchazón periférica, aumento de peso corporal.
	Antidepresivos tricíclicos (ATC)	Amitriptilina 	Reducción en la recaptación de la norepinefrina (Ne) y serotonina (5-HT)	Efectos anticolinérgicos, prolongación del QT (arritmia), riesgo de suicidio, retención urinaria.
	Inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina (IRSN)	Duloxetina 	Inhibidor de la reaceptación de 5-HT y NA	Náuseas, letargo, estreñimiento, ataxia, sequedad de boca.
		Venlafaxina	Inhibidor selectivo de	Náuseas, vértigo, letargo,

			la recaptación de 5-HT y NA	hiperhidrosis, hipertensión.
Terapia de Segunda Línea	Opioides	Tramadol 	Agonista $\mu$ -opioide Agonista $\kappa$ -opioide Agonista $\delta$ -opioide	Náuseas/vómitos, estreñimiento, letargo, convulsiones, ataxia.
		Tapentadol 	Agonista $\mu$ -opioide	Náuseas/vómitos, estreñimiento, letargo, convulsiones, ataxia.
	Tratamiento tópico	Lidocaína 	Bloqueo de la conducción de los impulsos nerviosos	Eritema local y picazón y erupción.
		Capsaicina 	Inhibidor de liberación de la sustancia P.	Dolor, eritema, picazón; casos raros de presión arterial alta.
Terapia de tercera línea	Opioides Fuertes	Morfina	Agonista $\mu$ -opioide	Náuseas, vómitos, estreñimiento, mareos y letargo.

				
		<p>Oxicodona</p> 	Agonista $\mu$ -opioide	Náuseas, vómitos, estreñimiento, letargo, control respiratorio.
	Neurotoxina	Toxina botulínica	Bloqueo de la liberación de acetilcolina	Dolor en el lugar de la inyección.

En el caso de la gabapentina y la pregabalina han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). En uso para el tratamiento del dolor neuropático. Dado que la estructura es similar al neurotransmisor del ácido gamma-aminobutírico (GABA), estos se unen a la subunidad  $\alpha 2\text{-}\delta$  de los canales dependientes de voltaje de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que reduce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos dos han sido excelentes para el tratamiento del dolor diabético, la neuralgia herpética, la lesión medular y síndrome del miembro fantasma.<sup>11</sup>

## 2.8 Receptores Sigma

El receptor sigma se descubrió aproximadamente hace más de 40 años y originalmente se informó como un subtipo de receptores opiáceos. Tiempo después se demostró que el receptor sigma no se comportaba como un receptor opioide tradicional y se clasificó en dos subtipos diferentes: el receptor sigma-1 y el receptor sigma-2.<sup>12</sup>

A lo largo del tiempo se ha logrado identificar que los dos subtipos del receptor sigma desempeñan un papel importante. El receptor sigma-2 interactúa con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  para la movilización de iones y en la diferenciación

celular. Mientras que al receptor sigma-1, se le ha atribuido un papel en la modulación farmacológica para el tratamiento del dolor, este receptor se expresa abundantemente en varios centros del dolor de la región central del sistema nervioso central, modulando diversos receptores y canales.<sup>12</sup>

### 2.8.1 Receptor Sigma-1

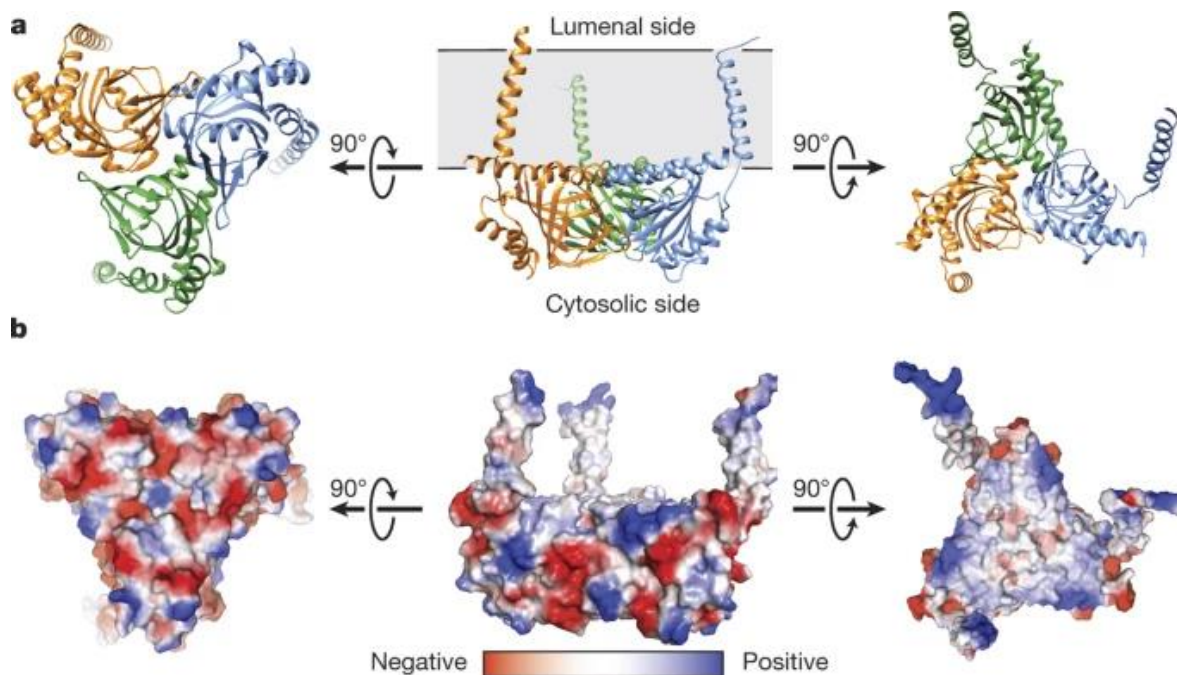
El receptor sigma-1 está codificado por el gen sigma-1 y se clasificó inicialmente como un subgrupo de receptor opioides, pero investigaciones posteriores han demostrado sobre una amplia gama de fenotipos estructurales y una secuencia de aminoácidos única.<sup>13</sup>

Los receptores sigma-1 son proteínas residentes del retículo endoplásmico (RE) y se localizan predominantemente en la región rica en colesterol de las membranas asociadas a las mitocondrias en el RE. Esta proteína es idéntica en los tejidos periféricos y en el cerebro, probablemente también puede ser similar en otros tejidos. En el cerebro, los receptores sigma-1 se distribuyen con mayor abundancia en el hipocampo y el hipotálamo, seguidos por el área cerebelosa, y se expresan principalmente en neuronas y células gliales del cerebro.<sup>13</sup>

De acuerdo con la determinación de la estructura de dicho receptor sigma-1 se encontró unido a PD144418, un antagonista de sigma-1 selectivo y de alta afinidad unido a un segundo ligando A-IBP, con una resolución de 3.2 Å.



En la **Figura 8** se muestra la estructura general del receptor sigma-1 revela una organización trimétrica con un eje de simetría triple no cristalografía normal al plano de la membrana.

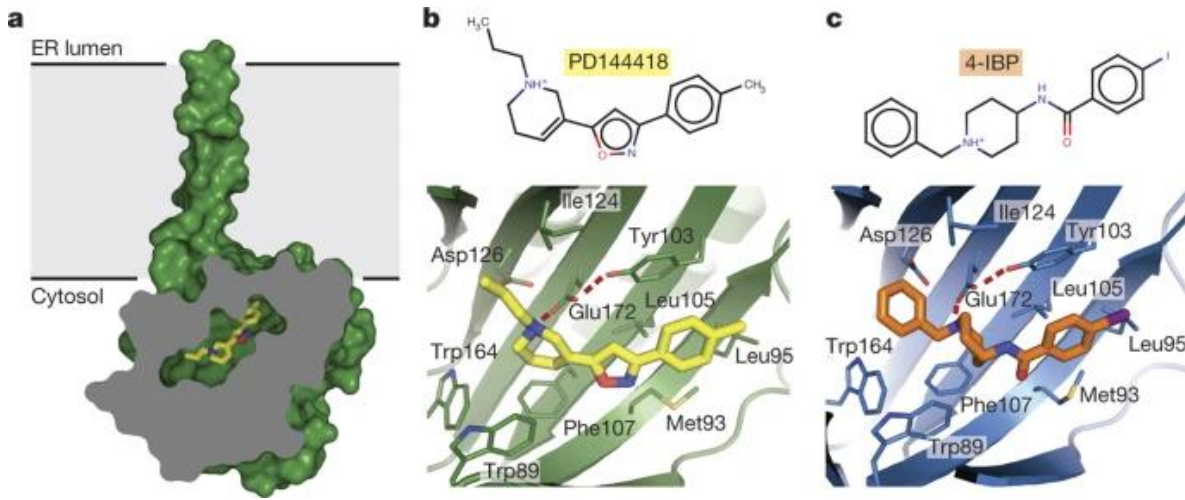


**Figura 8.** Estructura general del receptor sigma-1<sup>9,12,14</sup>

Los ligandos tienen una estructura química diversa y comportan características estructurales como la amina catiónica y el anillo aromático, por lo tanto, los dos ligandos, 4-IBP y PD1444418 son moléculas alargadas, cargadas positivamente y con un carácter hidrófobo sustancial, cabe mencionar que poseen características comunes entre los ligandos del receptor sigma-1, ya que ambos compuestos son moléculas alargadas, cargadas positivamente y con un carácter hidrófobo sustancial.<sup>15</sup>

Los dos ligandos se unen en posiciones similares, en cada caso interactuando con el receptor a través de una interacción cargada con el Glu172 altamente conservado, de acuerdo con experimentos de mutagénesis previos que identifican este residuo como esencial para la unión del ligando. Un segundo residuo con el cual interactúa es el Asp126, forma un enlace de hidrógeno con el Glu172, lo que indica que esté protonado al menos cuando los ligandos están unidos. Otros residuos que participan en el sitio de unión incluyen Val84, Trp89, Met93, Leu105, Phe107, Ile124, Trp164 y Leu182, que interactúan con las regiones hidrofóbicas en

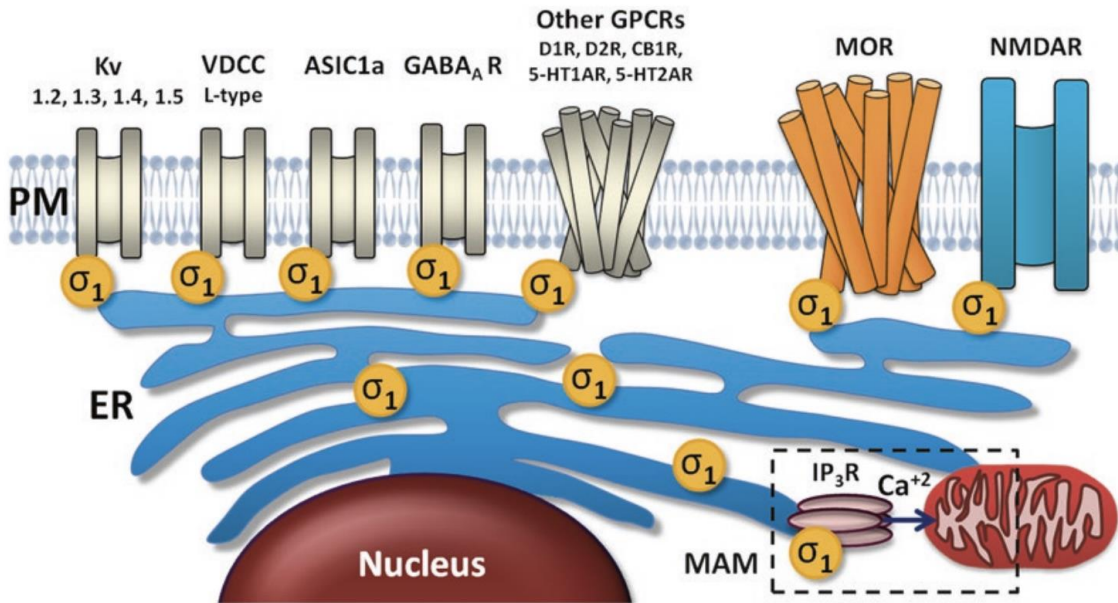
los ligandos unidos, y Trp103, que participa en una interacción de acoplamiento aromático en ambas estructuras como se muestra en la **Figura 9**.<sup>14</sup>



**Figura 9.** Reconocimiento de los ligandos en el receptor sigma<sup>9,14</sup>

### 2.8.2 Activación molecular

El receptor sigma-1 a nivel subcelular se localiza en membranas biológicas, así como las macrosómicas, mitocondriales, nucleares y plasmáticas **Figura 10**.<sup>9,16</sup>



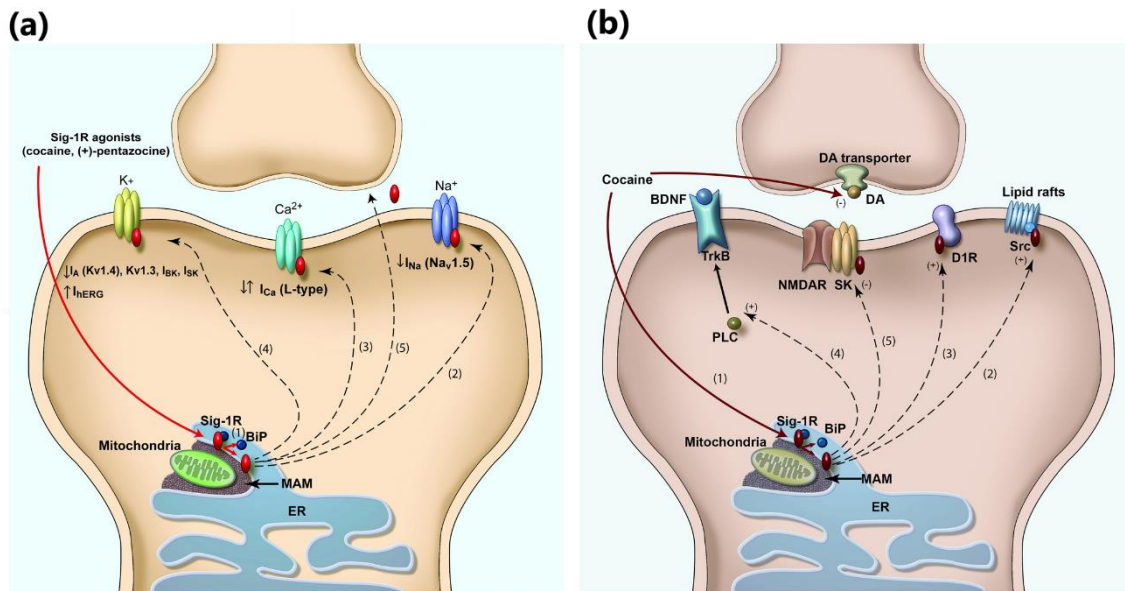
**Figura 10.** Localización sub-celular del receptor sigma-1<sup>9,16</sup>

La actividad chaperona del receptor sigma-1 está regulada con la interacción proteína-proteína directamente con otras chaperonas del retículo endoplásmico, la proteína de unión a inmunoglobulina/proteína regulada por glucosa de 78 kDa

(BiP/GRP78), sin embargo, el receptor sigma-1 se encuentra acoplado con BiP en su estado normal.

El receptor sigma-1 regula la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular mediada por el receptor IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato) en la MA. El  $Ca^{2+}$  emigrado a las mitocondrias activa la producción de ATP. Las neuronas agotadas con el receptor sigma-1 promueve la maduración de las espinas dendríticas y el reclutamiento de AMPA/NMDA a las membranas postsinápticas, también puede modular las proteínas postsinápticas, las cuales incluyen una variedad de canales iónicos ( $Na^{2+}$ ,  $K^+$ ), así como receptores acoplados a proteínas G (receptores opioides, DA, D2 y  $\mu$ ) mediante la translocación a la proximidad de la densidad postsináptica.

En estado anormal o de estrés (esto es debido a la activación de IP3 o disminución de la concentración de  $Ca^{2+}$  en el retículo endoplásmico) el receptor sigma-1 se disocia de BiP para activarse como chaperonas moleculares. El receptor sigma-1 tiene como objetivo de membranas receptores acoplados de proteínas G y varios canales iónicos, de estos se saben que interactúa con los receptores de NMDA (NMDAR), canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L (VDCC), receptores GABA A, receptores de dopamina D1 y D2, receptores cannabinoides y receptores 5-HT1A y 5-HT2A como se muestra en la **Figura 11**.

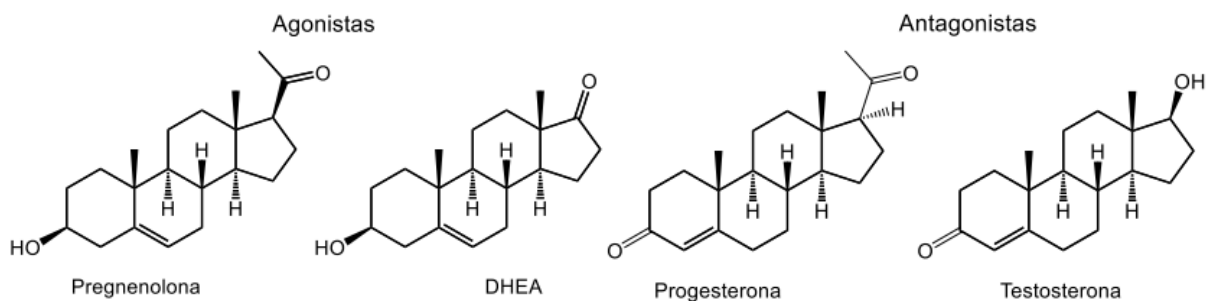


**Figura 11.** Roles de los receptores Sigma-1<sup>9,16,17</sup>

Tras la unión de los receptores sigma-1 o el agotamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplásmico, el receptor sigma-1 se disocia de BiP, cambiando así el estado activo. Por lo contrario, los antagonistas del receptor sigma-1 fortalece la asociación con BiP, lo que ayudará en la inhibición de la acción de los agonistas. En consecuencia, en los sistemas vivos, la actividad chaperona se activa rápidamente mediante aplicaciones de agonistas del receptor sigma-1 o mediante la activación de los receptores IP3 a través de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G en la membrana plasmática.<sup>9,16</sup>

## 2.9 Moléculas endógenas agonistas y antagonistas del receptor sigma-1

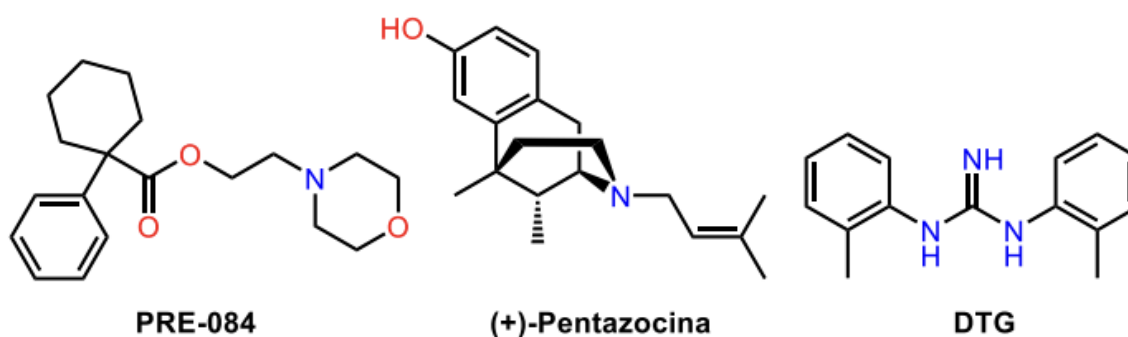
Existen moléculas endógenas (neuroesteroides) que pueden ser agonistas o antagonistas del receptor sigma-1 (**Figura 12**), moduladores de la actividad neuronal, estos ligandos se sintetizan en el SNC y SNP, estas moléculas son pregnenolona, dehidroepiandrosterona (DHEA), sus ésteres de sulfato, progesterona y alopregnenolona<sup>9</sup>. Entre los neuroesteroides, se sabe que la DHEA y la pregnenolona son agonistas, mientras que la progesterona y testosterona son antagonistas del receptor sigma-1.



**Figura 12.** Neuroesteroides, ligandos endógenos del receptor sigma-1.

## 2.10 Moléculas exógenas agonistas y antagonistas del receptor sigma-1

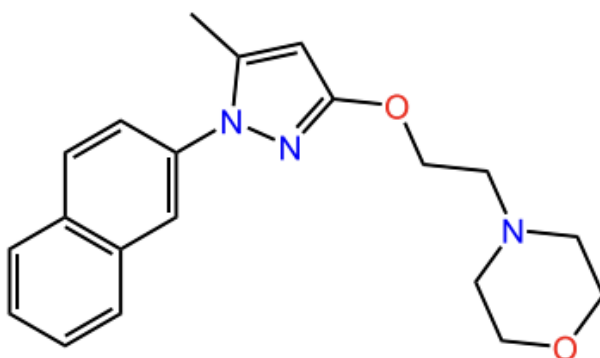
Existen moléculas exógenas (xenobióticos) agonistas y antagonistas del receptor sigma-1, los agonistas se muestran en la **Figura 13** y los antagonistas se describen en los siguientes subtemas.



**Figura 13.** Ligandos exógenos del receptor sigma-1 (Agonistas)

### 2.10.1 Antagonista del receptor sigma-1 (S1RA o E-52862)

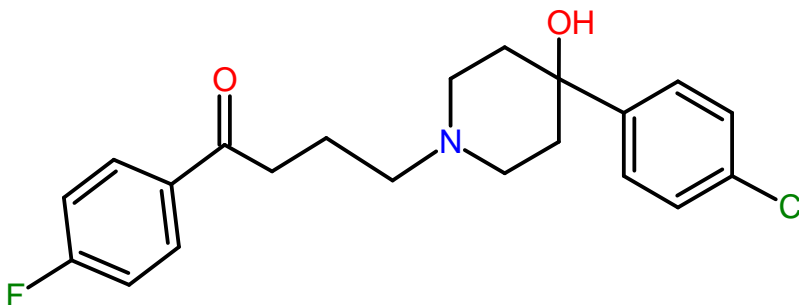
El **S1RA** es un antagonista del receptor sigma-1 el cual ha demostrado en ensayos *in vitro* alta afinidad por el receptor sigma-1 ( $K_i=17$  nM), no presentó actividad significativa sobre otros receptores, canales de iones o enzimas, atraviesa la barrera hematoencefálica para llegar a los receptores sigma-1 que se encuentran en el sistema nervioso central. Este fármaco presentó efecto analgésico para la fase I y II de estudios clínicos, obteniendo resultados en los estudios farmacocinéticos, mostrando ser seguro en dosis que van de los 400mg a 800 mg por día en estudios farmacocinéticos (**Figura 14**).<sup>18-20</sup>



**Figura 14.** Estructura química del antagonista selectivo de los receptores sigma-1 (S1RA por sus siglas en inglés Sigma-1 Receptor Antagonist)<sup>18</sup>

### 2.10.2 Haloperidol

Los laboratorios Janssen sintetizaron el compuesto haloperidol (**Figura 15**) el día 11 de febrero del año 1958. Paul Janssen junto con sus colegas vieron el compuesto, en aquel entonces llamado R1625 de gran interés, por su acción farmacológica similar a clorpromazina; sin embargo; haloperidol fue más potente, ya que produjo la actividad farmacológica a concentraciones más bajas. El día 28 de octubre del mismo año, se realizó la primera publicación clínica de los efectos de haloperidol como un neuroléptico, posteriormente se demostró en estudios clínicos que poseía actividad contra delirios y alucinaciones, ya que el número de pacientes crónicamente hospitalizados pudo abandonar el hospital psiquiátrico y vivir en su hogar después de la toma de este nuevo medicamento.<sup>21</sup>

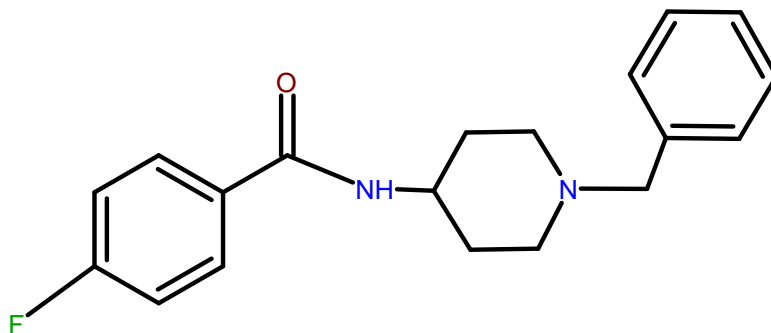


**Figura 15.** Estructura química del Haloperidol<sup>21</sup>



### 2.10.3 *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-fluorobenzamida (**LMH-2**)

El compuesto **LMH-2** fue sintetizado en el grupo de trabajo de Dr. Gabriel Navarrete, mostrando una alta afinidad por el receptor sigma-1 ( $K_i = 6 \text{ nM}$ ) en los ensayos *in vitro*, además los resultados de la parte *in silico* mostraron adecuadas propiedades farmacocinéticas, farmacológicas y toxicológicas. En evaluaciones *in vivo*, el compuesto mostró un efecto antinociceptivo en modelos murinos de dolor neuropático (**Figura 16**)<sup>22</sup>



**Figura 16.** Estructura química del antagonista del receptor sigma-1 (**LMH-2**).

#### 2.10.3.1 Evaluación *in vitro* del compuesto *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-fluorobenzamida (**LMH-2**).

Las afinidades de los receptores sigma- y sigma-2 se determinaron en estudios de unión a receptores en los que se emplearon los radioligandos [<sup>3</sup>H]-(+)-pentazocina y [<sup>3</sup>H]-di-o-tolilguanidina. Estos resultados se muestran en la **Figura 17** donde el compuesto **LMH-2** mostró una afinidad hacia el receptor sigma-1 de 6.0 nM, mientras que la afinidad hacia el receptor sigma-2 fue de 190 nM, exhibiendo una selectividad excepcional de 31,6 veces. En estudios de unión competitiva de radioligandos a receptores, se determinó un valor de  $K_i$  de 6.0 nM ( $pK_i = 8.22$ ) para la afinidad de sigma-1 de **LMH-2**, mientras que los valores de (+)-pentazocina y haloperidol mostraron la misma afinidad con valores de  $K_i = 5.7$  y 6.3 nM respectivamente. Sin embargo, S1RA, que se encuentra en ensayos clínicos de fase II, reveló una afinidad casi 3 veces menos [ $K_i = 17 \text{ nM}$  ( $pK_i$  de 7.73)] que el **LMH-2** y el haloperidol.<sup>22</sup>

Compuesto	$K_i$ (nM)		Selectividad
	$\sigma_1$	$\sigma_2$	$\sigma / \sigma_{12}$
<b>LMH-2</b>	6.0	190	31.6
Haloperidol	6.3	78	12
Di-o-tolilguanidina	89	58	0.7
(+)-pentazocina	5.7	-	-
<b>S1RA</b>	17	> 1000	> 58

Figura 17. Cuadro de afinidades de los receptores sigma de **LMH-2** y compuestos de referencia.<sup>22</sup>

### 2.10.3.2 Evaluación in vivo del compuesto *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-fluorobenzamida (**LMH-2**).

Para estos ensayos se utilizaron ratas simuladas (que recibieron una incisión quirúrgica sin la ligadura del nervio). El efecto alodínico (**Figura 18**) se determinó mediante la aplicación ipsilateral de un estímulo frío con acetona. La alodinia se mide como tiempo acumulado de lamido en segundo durante 1 min (panel A). El efecto hiperalgésico se estableció con un estímulo mecánico con filamento de von Frey de 15g. La respuesta correspondió a la media de 10 estímulos, y la respuesta máxima se consideró del 100% (panel B). En ambos paneles, las ratas con ligadura del nervio ciático (CCI) se compararon con las ratas sometidas a cirugía sin ligadura del nervio ciático (Sham). Los datos se expresan como media de seis ratas  $\pm$  E.S.M.

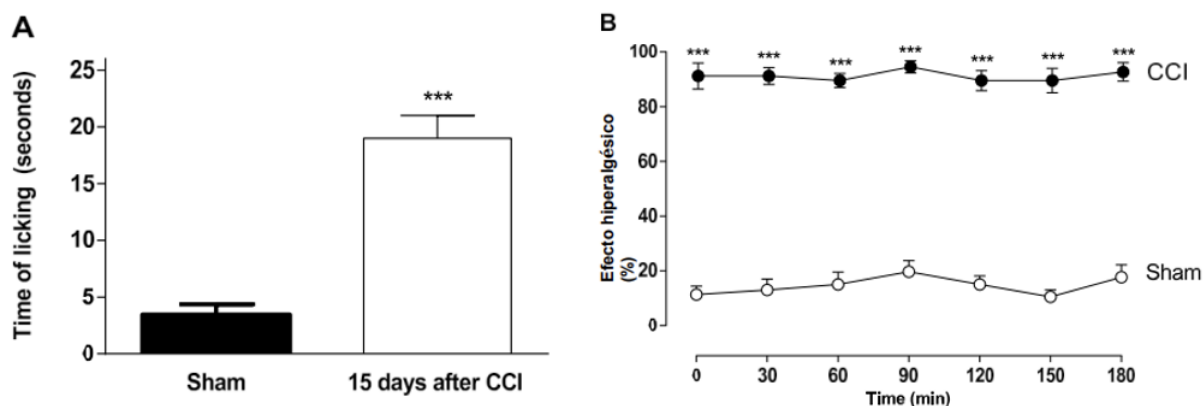
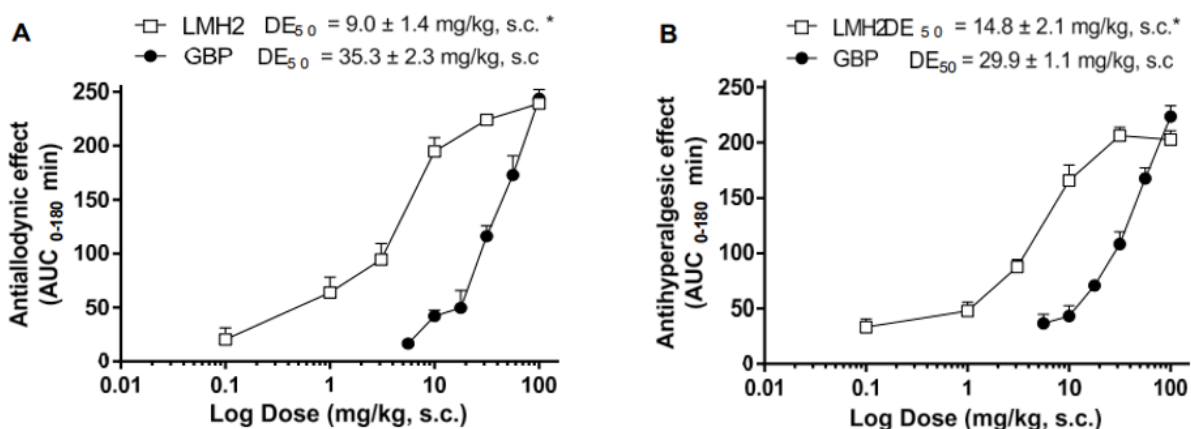


Figura 18. Efecto alodínico y hiperalgésico del compuesto **LMH-2**.<sup>22</sup>



En la **Figura 19** se muestra la curva dosis-respuesta del efecto antialodínico (A) y antihiperalgésico (B) efectos de la administración de **LMH-2** (0.1-100.0 mh/kg, s.c.) y gabapentina (GBP, 5,6-100.0 mg/kg). Se calculó el área bajo la curva (AUC) para cada uno de los fármacos de la curva temporal (efectos antialodínicos o antihiperalgésicos vs 0-180 min), el AUC se determinó mediante la regla trapezoidal. Cada punto experimental se muestra como el % de respuesta de la media de 6 animales experimentales  $\pm$  E.S.M. La  $ED_{50}$  se determinó mediante el método lineal y logarítmico, la diferencia significativa entre ambos valores se estableció mediante la *prueba t* de Student.<sup>22</sup>



**Figura 19.** Curva dosis-respuesta del efecto antialodínico (A) y antihiperalgésico (B) de **LMH-2**.<sup>22</sup>

### 3. JUSTIFICACIÓN

El dolor neuropático es un padecimiento que afecta al 3% de la población mundial, cuyo padecimiento va incrementando día a día, como un problema de salud pública con implicaciones económicas y sociales relevantes. En el 15% de los pacientes que van a consulta por dolor es de origen neuropático, derivado de patologías como la radiculopatía, la neuropatía diabética, el dolor neuropático asociado al cáncer, la quimioterapia, la radioterapia, la neuropatía relacionada al VIH, el síndrome doloroso regional complejo, la lesión de cordón espinal, la neuralgia trigémina; y el dolor fantasma.

Desafortunadamente, los antidepresivos, anticonvulsivos y opioides, que son los más utilizados para controlar este tipo de dolor, no cumplen con las expectativas de tratamiento de los pacientes debido a su baja eficacia y al dolor persistente. El tratamiento ineficaz de la neuropatía tiene un alto impacto económico en el sector sanitario y en la calidad de vida de los pacientes. Por lo tanto, no hay un solo fármaco que haya demostrado beneficio total para la eliminación del dolor neuropático, solo atenúan un poco el dolor.

Los pacientes afectados con este padecimiento sufren desórdenes del estado de ánimo, así como incapacidad de realizar actividades cotidianas incluyendo su desempeño de manera laboral y menos del 60% de estos pacientes tratados por este padecimiento sólo suelen obtener un efecto parcial.

De acuerdo con lo anterior mencionado, es importante y necesario proponer opciones terapéuticas que produzcan mayor eficacia y que tengan menos reacciones adversas asociadas a los fármacos que se prescriben en la actualidad.

Es por eso que en este proyecto se plantea el diseño, síntesis y biosimulación de nuevas entidades químicas para tratar el dolor neuropático. Por el cual se proponen una serie de moléculas que cumplan como antagonistas de los receptores sigma-1, los cuales han demostrado ser eficaces para el tratamiento de este tipo de dolor.

## 4. HIPÓTESIS

Los compuestos *N*-(bencilpiperidin-4-il)-4-alkuilbenzamidias (**FRR-1** y **FRR-2**) actuarán como ligandos del receptor sigma-1, comportándose como posibles antagonistas para el tratamiento experimental del dolor neuropático.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Diseñar, sintetizar y evaluar *in silico* e *in vitro* los compuestos *N*-(bencilpiperidin-4-il)-4-alkuilbenzamidias como antagonistas del receptor sigma-1 para el tratamiento del dolor neuropático.

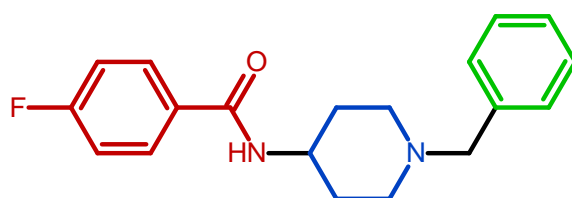
### 5.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar dos análogos de *N*-(bencilpiperidin-4-il) -4-alkuilbenzamidias (**FRR-1** y **FRR-2**) utilizando técnicas espectroscópicas (RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) y espectrométricas (EM).
- Llevar a cabo estudios de acoplamiento molecular (*Molecular Docking*) de los compuestos sobre el receptor sigma-1 para conocer su posible modo de unión.
- Realizar un análisis de predicción *in silico* de las propiedades farmacocinéticas, biofarmacéuticas, farmacodinámicas y toxicológicas de los compuestos propuestos para integrarlos en un análisis de consenso farmacológico, con el fin de seleccionar el candidato con mejores propiedades farmacéuticas.
- Evaluar *in vitro* la afinidad de los compuestos sobre el receptor sigma-1.

## 6. CONSIDERACIONES QUIMICO-FARMACÉUTICAS PARA EL DISEÑO MOLECULAR

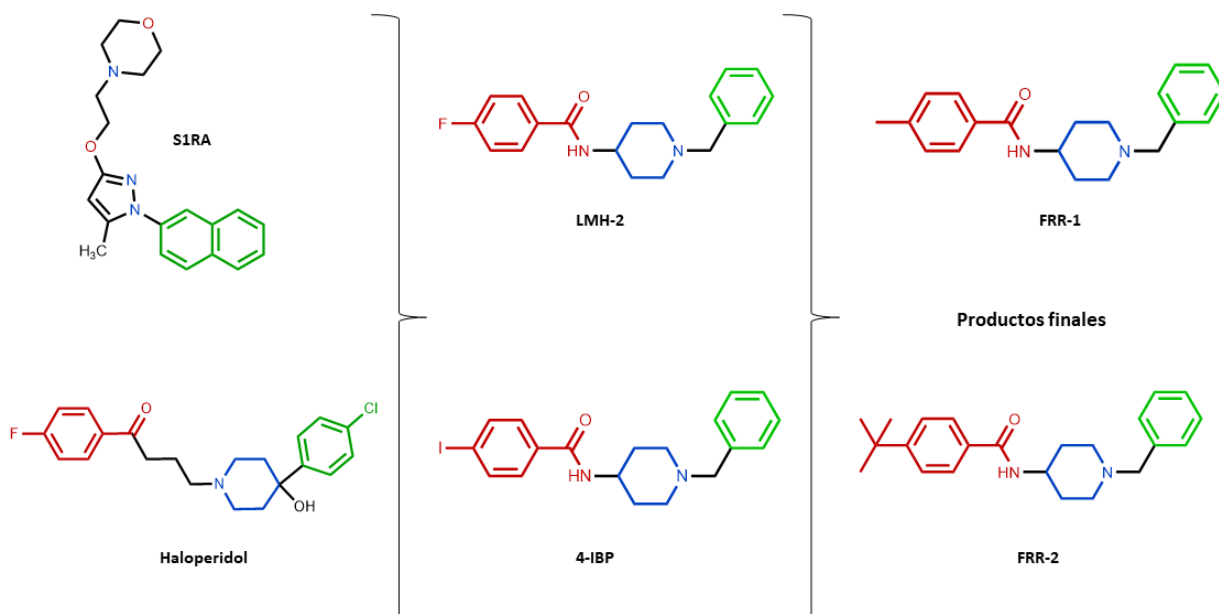
### 6.1 Diseño de los compuestos

Para la consideración del diseño de los compuestos (**FRR-1** y **FRR-2**) se tomó en cuenta el compuesto **LMH-2** el cual es un análogo del **haloperidol**, donde la amina terciaria ionizable es importante para la actividad. En la **Figura 20** se observa su estructura química y en esta se resaltan con colores los grupos funcionales importantes para mostrar afinidad sobre el receptor sigma-1.



**Figura 20.** Farmacóforo de **LMH-2** para la afinidad al receptor sigma-1

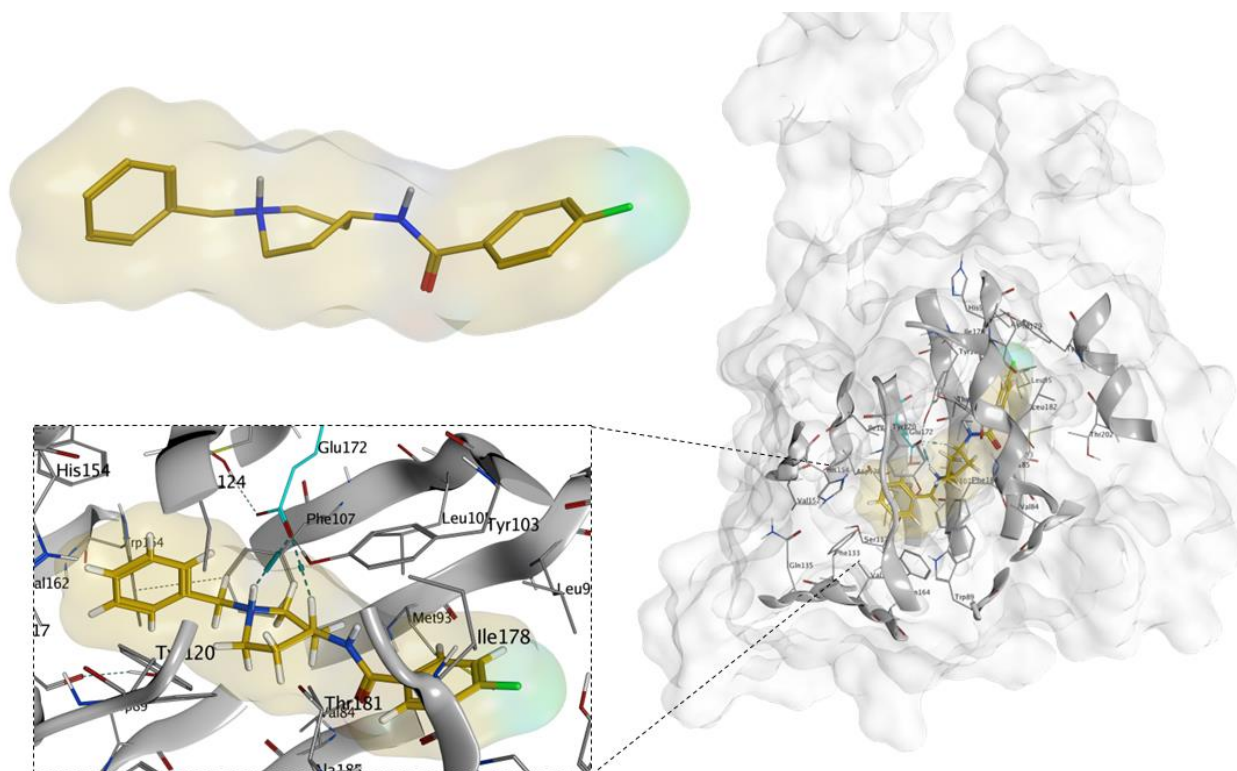
En esta serie de moléculas, **FRR-1** y **FRR-2** tienen el fragmento común benzamida piperidínica (sustituida en posición 4 del anillo del benceno). Para este proyecto es importante tener afinidad por los receptores sigma-1, y evitar la unión sobre los receptores centrales de dopamina. De esta manera no tendría la actividad incisiva en alucinaciones o sedación psicomotora como posee el haloperidol <sup>23</sup>(**Figura 21**).



**Figura 21.** Diseño de estructuras basados en el fármaco **haloperidol**, **S1RA**, **4-IBP** y **LMH-2**.

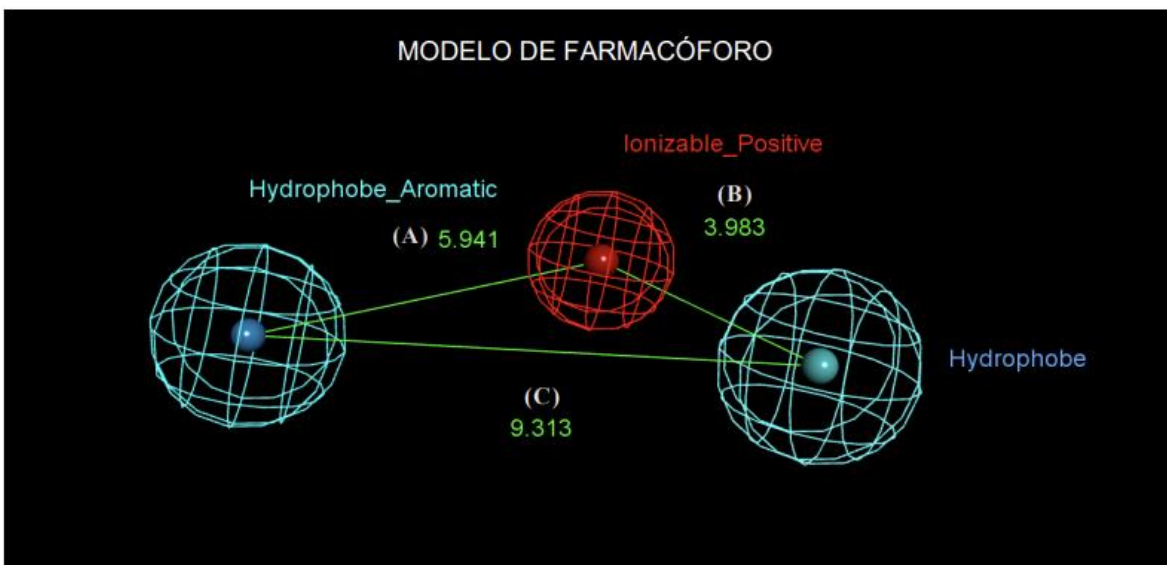
## 6.2 Interacción molecular ligando proteína (LMH-2 → sigma-1)

En la siguiente **Figura 22** se observa el acoplamiento molecular del compuesto **LMH-2** con el receptor sigma-1 (PDB ID: 5HK2). Los resultados fueron ordenados en grupos con  $\text{RMSD} < 0.5 \text{ \AA}$ . Se puede observar una interacción de tipo polar (3D) del residuo de aminoácido **Glu172** con el grupo hidroxilo unido al ciclo de piperidina. En la imagen se observa una interacción catiónica con este mismo aminoácido y el grupo amino ionizable del heterociclo.



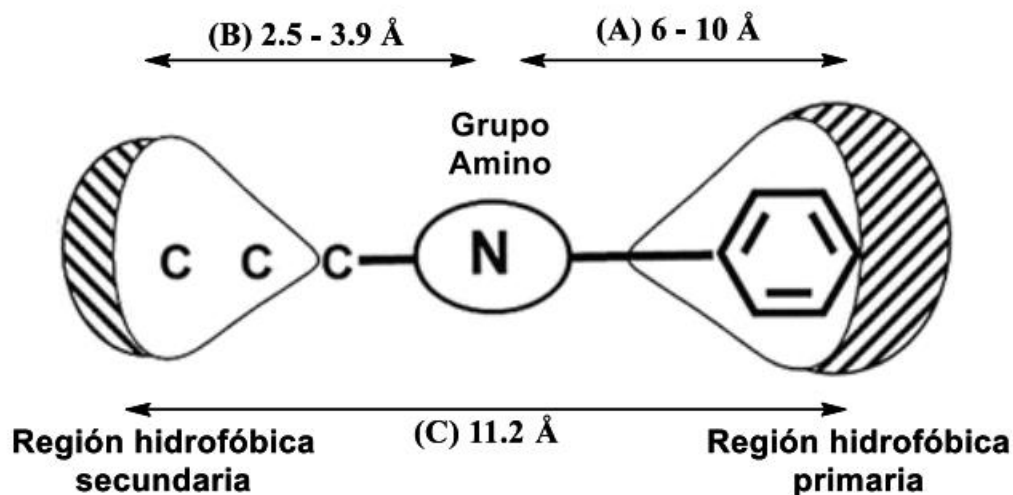
**Figura 22.** Visualización en 3D del compuesto **LMH-2** en el sitio de unión del receptor sigma-1.

Existen diferentes modelos farmacofórico que se han desarrollado como método para la explicación de la afinidad y creación de los ligandos sigma-1. Todos los modelos propuestos coinciden en los dos farmacóforos basados en este proyecto, en ellos se habla de tres importantes grupos funcionales repetidos en al menos el 70% de los ligandos probados: 2 fracciones hidrofóbicas y una región catiónica central. Los compuestos propuestos mantienen distancias muy cercanas a las propuestas en el grupo del **Dr. Gabriel Navarrete Vázquez (Figura 23)**.



**Figura 23.** Modelos farmacofóricos para ligandos selectivos del receptor Sigma-1.<sup>9</sup>

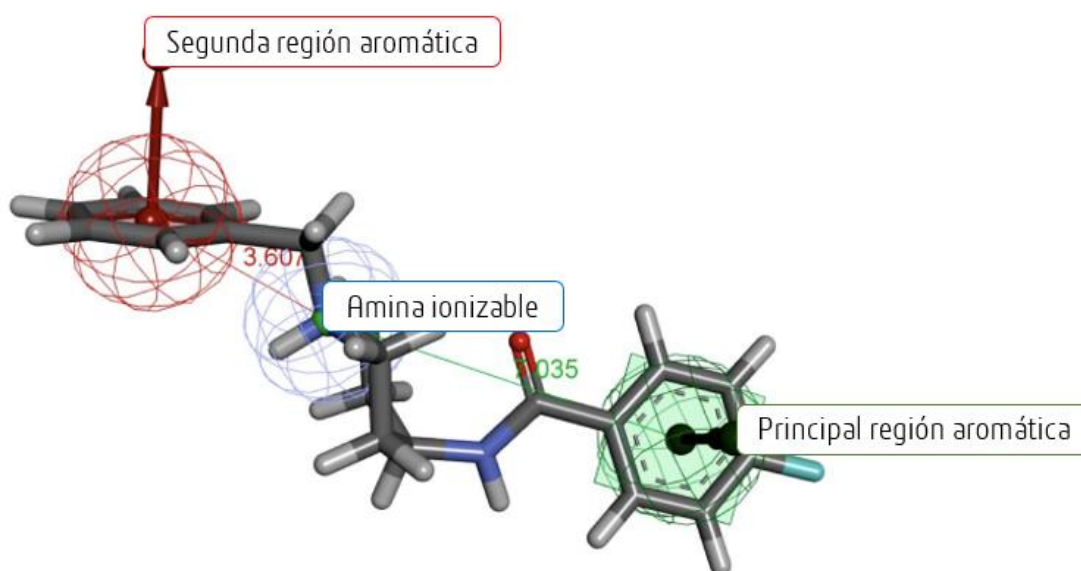
Las distancias mostradas en la **Figura 23** son: a) 5.941, b) 3.983 y c) 9.313 Å,<sup>24</sup> son muy cercanas en comparación con los compuestos propuestos en este proyecto para ser ligandos selectivos del receptor sigma-1. Si se hace referencia al grupo farmacofórico propuesto con Glennon, las distancias serían: a) 6-10, b) 3.5-3.9 y c) 11.2 Å<sup>25</sup>, como se muestra en la **Figura 24**, comparando las dos propuestas, se puede apreciar una similitud en las distancias, por lo cual ambos compuestos presentarían afinidad con el receptor de interés<sup>26</sup>



**Figura 24.** Modelo farmacofórico propuesto por Glennon.<sup>26</sup>

Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado, **LMH-2** se diseñó como un análogo del haloperidol y cumple con los requisitos de los modelos farmacofóricos descritos para ligandos del receptor sigma-1 de alta afinidad:

- I. Una amina terciaria ionizable que interactúa con los receptores sigma-1 mediante interacciones electrostáticas.
- II. Una región hidrófoba principal situada a 7.035 Å de la amina
- III. Una región hidrófoba secundaria de 3.607 Å de la amina (**Figura 25**)
- IV. Ambos grupos arilo pueden formar interacciones  $\pi$ - $\pi$  adicionales con el receptor sigma-1.<sup>22</sup>



**Figura 25.** Patrón farmacofórico encontrado en los ligandos de los receptores sigma-1 aplicado a **LMH-2**.<sup>22</sup>

El diseño químico farmacéutico fue empleado para realizar la modificación de manera racional, para mantener la actividad biológica, mejorar sus propiedades biofarmacéuticas, farmacocinéticas y reducir la toxicidad de las moléculas propuestas.

### 6.3 Reglas de Lipinski y Veber en el diseño de los compuestos con actividad biológica.

La regla de los 5 (regla de Lipinski), junto con las reglas de Veber son las más utilizadas para el diseño racional de nuevas moléculas, así como su predicción para una buena permeabilidad celular y por ende una absorción adecuada, ya que mantienen los compuestos propiedades estructurales similares a fármacos.

Para la regla de Lipinski y Veber, la molécula no debe presentar más de dos violaciones a los siguientes criterios, ya que podrían tener problemas de absorción, permeabilidad y biodisponibilidad, estas reglas son:

#### Regla de Lipinski <sup>27</sup>

- Peso molecular inferior a 500 g/mol.
- Número de donadores de puentes de hidrógeno menor a 5, expresado sobre la misma molécula.
- Número de aceptores de puentes de hidrógeno menos a 10 (2x5), expresado sobre la misma molécula.
- Coeficiente de partición (LogP) menos a 5.

#### Regla de Veber <sup>28</sup>

- $\leq 10$  enlaces rotables (flexibilidad molecular).
- $\leq 140 \text{ \AA}^2$  de área polar superficial (APS).
- $\leq 12$  puentes de hidrógenos totales (aceptores y donadores).

Para obtener esta información, se usó el servidor computacional Molinspiration Cheminformatics (**Figura 26**) que permite calcular las propiedades fisicoquímicas consideradas en las reglas antes mencionadas.



Molinspiration Products and Services  
 Calculation of Molecular Properties and Prediction of Bioactivity  
 Galaxy 3D Structure Generator  
 Molecular Database - Substructure and Similarity Search  
 Molinspiration Publications  
 Molinspiration FAQ  
 About Molinspiration

**molinspiration**  
 cheminformatics

**Molinspiration Cheminformatics Software**  
 Molinspiration offers broad range of cheminformatics software tools supporting molecule manipulation and processing, including SMILES and SDF file conversion, normalization of molecules, generation of tautomers, molecule fragmentation, calculation of various molecular properties needed in QSAR, molecular modelling and drug design, high quality molecule depiction, molecular database tools supporting substructure and similarity searches. Our products support also fragment-based virtual screening, bioactivity prediction and data visualization. Molinspiration tools are written in Java, therefore can be used practically on any computer platform.

**Free Web Tools for Cheminformatics Community**  
 Molinspiration supports internet chemistry community by offering free on-line services for calculation of important molecular properties (logP, polar surface area, number of hydrogen bond donors and acceptors and others), as well as prediction of bioactivity score for the most important drug targets (GPCR ligands, kinase inhibitors, ion channel modulators, nuclear receptors). Number of molecules processed per month exceeds 80,000!

**10,000 Citations in Scientific Papers!**  
 Molinspiration software is used by hundreds of cheminformatics experts in industry and academia to produce high-quality scientific results. According to the Google Scholar our tools are more than 4500 times cited! Check the (incomplete) list of publications produced with help of our software.

**Molinspiration now also on Touch Devices!**  
 Molinspiration interactive web services are available from now not only on desktop computers, but also on touch devices including iPhone, iPad and Android phones and tablets. Molecule structure input to our property calculation and bioactivity prediction services is powered by the JSME molecule editor written in JavaScript. Also our Galaxy 3D molecule visualizer that allows interactive display of molecules in various modes and visualization of surface molecule lipophilicity potential and polar surface area is written in JavaScript.

**Molinspiration Molecule Viewer**  
 Molinspiration Molecule Viewer allows visualization of collection of molecules encoded as SMILES or SDF file. SMILES is automatically transformed into molecule 2D representation by our depiction engine. Display of associated data, selection of molecules, built-in substructure search and export of selected molecules is supported. Viewer is written in Java, therefore is platform independent and may be used on any computer where the Java runtime is installed. Ask for free evaluation now!

Figura 26. Programa Molinspiration Cheminformatics online (<https://www.molinspiration.com/>).<sup>29</sup>

En el estudio se determinó que las moléculas finales diseñadas no presentan violaciones a las diferentes reglas, por lo que se estima que tendrá una adecuada permeabilidad por difusión pasiva, esto se muestra en la Tabla 2. Se realizó la comparación con los compuestos LMH-2, Haloperidol y S1RA (antagonista de los los receptores sigma-1 que se encuentra en fase II de experimentación).

Tabla 3. Valores de las reglas de Lipinski y Veber

	Valor de Referencia	FRR-1	FRR-1	LMH-2	Haloperidol	S1RA
PM (g/mol)	< 500	308.41	350.49	312.38	375.86	337.41
CLogP	<5	3.40	4.66	3.11	4.30	3.38
N° AH	<10	3	3	3	3	5
N°DH	<5	1	1	1	1	0
N°ER	<10	4	5	4	6	6
APS (A2)	<140	32.34	32.34	32.34	40.54	39.53
Violaciones (N°)	<2	0	0	0	0	0

PM: Peso Molecular; cLogP: Coeficiente de partición; AH: Aceptores de puentes de hidrógeno; DH: Donadores de puentes de hidrógeno; ER: Enlaces rotables; APS: Área polar superficial

## 7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El presente trabajo se dividió en dos partes como se describe a continuación:

1. **Parte química:** El diseño y la síntesis de los compuestos se realizó bajo la dirección del Dr. J. Gabriel Navarrete-Vázquez en el laboratorio 5 de Química Farmacéutica en la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (FF-UAEM). Las técnicas espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y espectrométricas se realizaron en colaboración con el Dr. Emanuel Hernández Núñez del departamento de recursos del mar, CINVESTAV Mérida, Al Dr. Israel González Méndez del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM y al M. en F. Josué Martínez Miranda de la Facultad de Química de la UNAM, Departamento de Farmacia.
2. **Parte computacional (*In silico*):** Se divide en dos partes, la primera es un estudio *a priori* (antes de la síntesis): Consta de la estimación del perfil farmacodinámico, es decir, de las actividades biológicas para determinar si la molécula poseerá o no la actividad propuesta; los programas utilizados son SwissTargetPrediction; la toxicidad aguda se calculó con el software ACD/ToxSuite, las propiedades cuasi-fármaco con el programa OSIRIS, y la predicción del metabolismo se realizó con BioTransformer 3.0. La segunda parte del estudio *a posteriori* (después de la evaluación farmacológica): consistió en el estudio de acoplamiento molecular (*Molecular Docking*) sobre el sitio de reconocimiento del receptor sigma-1, en este se observan las interacciones de unión ligando proteína. Esta parte se realizó en el Laboratorio 5 de Química Farmacéutica de la FF-UAEM.
3. **Parte farmacológica (*In vitro*):** La evaluación *in vitro* se realizó sobre el receptor sigma-1 en colaboración con el Dr. Bernhard Wunsch y el Dr. Dirk Schepmann del del instituto de Química Farmacéutica de la Universidad de Münster, Alemania.

## 7.1 Parte Química

### 7.1.1 Retrosíntesis de los compuestos

En la **Figura 27** se muestra el análisis retrosintético para obtener la ruta sintética adecuada para la obtención de moléculas propuestas **FRR-1** y **FRR-2**.

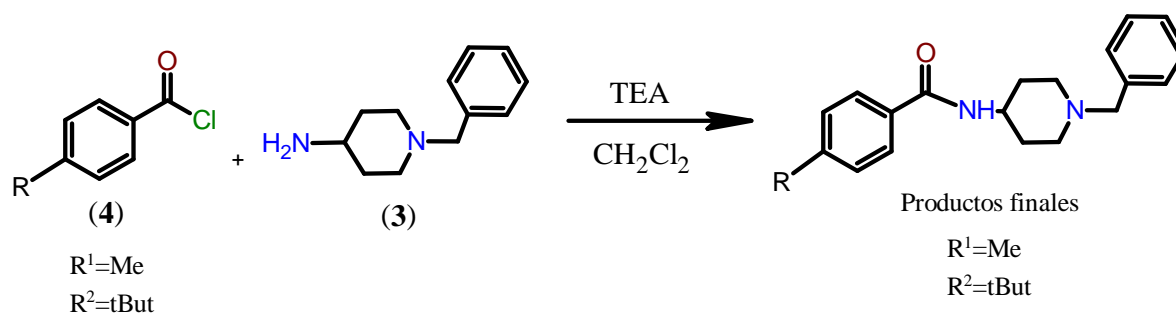


**Figura 27.** Ruta retrosintética de los compuestos **FRR-1** y **FRR-2**.

Una vez diseñada las moléculas finales de los compuestos **FRR-1** y **FRR-2**, se observa la desconexión en el grupo amida para así obtener el cloruro de ácido y la amina correspondiente, ambos compuestos se encuentran disponibles comercialmente.

### 7.1.2 Metodología general para la síntesis de los compuestos de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-alkilbenzamida

Para el proceso, se colocó la 4-aminobencilpiperidina (**3**) en agitación con trietilamina en diclorometano seco como disolvente. Posteriormente se hizo reaccionar con cloruro de benzoilo adecuadamente sustituido (**4**) mediante una reacción de Schotten-Baumann. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente para obtener los compuestos finales **FRR-1** y **FRR-2** (**Figura 28**).



**Figura 28.** Síntesis de los productos finales, derivados piperidínicos.

## 7.2 Parte Computacional (*In silico* a priori)

### 7.2.1 Herramienta como predictor de dianas terapéuticas ("SwissTargetPrediction")

El programa SwissTarget (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) es de libre acceso y fue diseñado para predecir algunos tipos de actividades biológicas basadas en la forma estructural de la molécula. Se compara la estructura de consulta en la biblioteca de más de 280 000 compuestos activos. Este programa fue utilizado para predecir la actividad analgésica de los compuestos sintetizados (**Figura 29**).<sup>30</sup>

SwissTargetPrediction

This website allows you to estimate the most probable macromolecular targets of a small molecule, assumed as bioactive. The prediction is founded on a combination of 2D and 3D similarity with a library of 370'000 known actives on more than 3000 proteins from three different species.

The webtool is described in detail here: [SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules, \*Nucl. Acids Res.\* \(2019\)](#). For technical information about the prediction algorithm, you can refer to: [Shaping the interaction landscape of bioactive molecules, \*Bioinformatics\* \(2013\) 29:3073-3079](#).

Select a species

- Homo sapiens
- Mus musculus
- Rattus norvegicus

Paste a SMILES in this box, or draw a molecule

Examples:  Clear

Predict targets

(Provide a SMILES before submitting)

Marvin JS  
by ChemAxon

POWERED BY ChemAxon

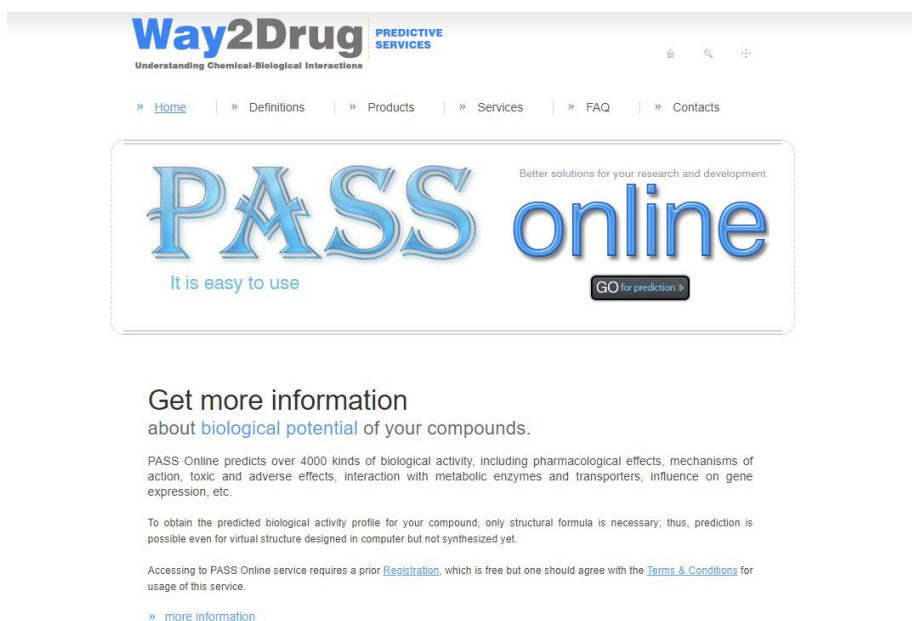
Swiss Institute of Bioinformatics - © 2023 | SIB privacy policy

**Figura 29.** Programa Swisstarget Prediction.<sup>31</sup>

## 7.2.2 Espectro de Actividad Biológica para Sustancias (PASS, por sus siglas en inglés Prediction of Activity Spectra for Substances)

El programa computacional PASS online (<https://www.way2drug.com/passonline/index.php>) **Figura 30** es de libre acceso y fue diseñado para predecir algunos tipos de actividad biológica simultáneamente basados en la forma estructural de la molécula.

Este programa provee información de una lista de diversas actividades biológicas, con estimaciones de probabilidad de actividad ( $P_a$ ) o inactividad ( $P_i$ ), con valores de 0 a 1. Valores de  $P_a > 0.7$  incrementa la posibilidad de que el compuesto muestre actividad de forma experimental, debido a que puede ser análogo de un fármaco conocido en su base de datos. Valores de  $P_a$  entre 0.5 a 0.7 indican que posibilidades de actividad experimental sean muy pequeñas. Para valores por debajo de  $P_a > 0.5$  este compuesto tiene poca probabilidad de que presente actividad experimental, sin embargo, en caso de que revele actividad biológica experimental, el compuesto será considerado, como una entidad química novedosa y no descrita. Este programa fue utilizado para predecir la actividad como antagonista del receptor sigma de los compuestos sintetizados.<sup>32</sup>

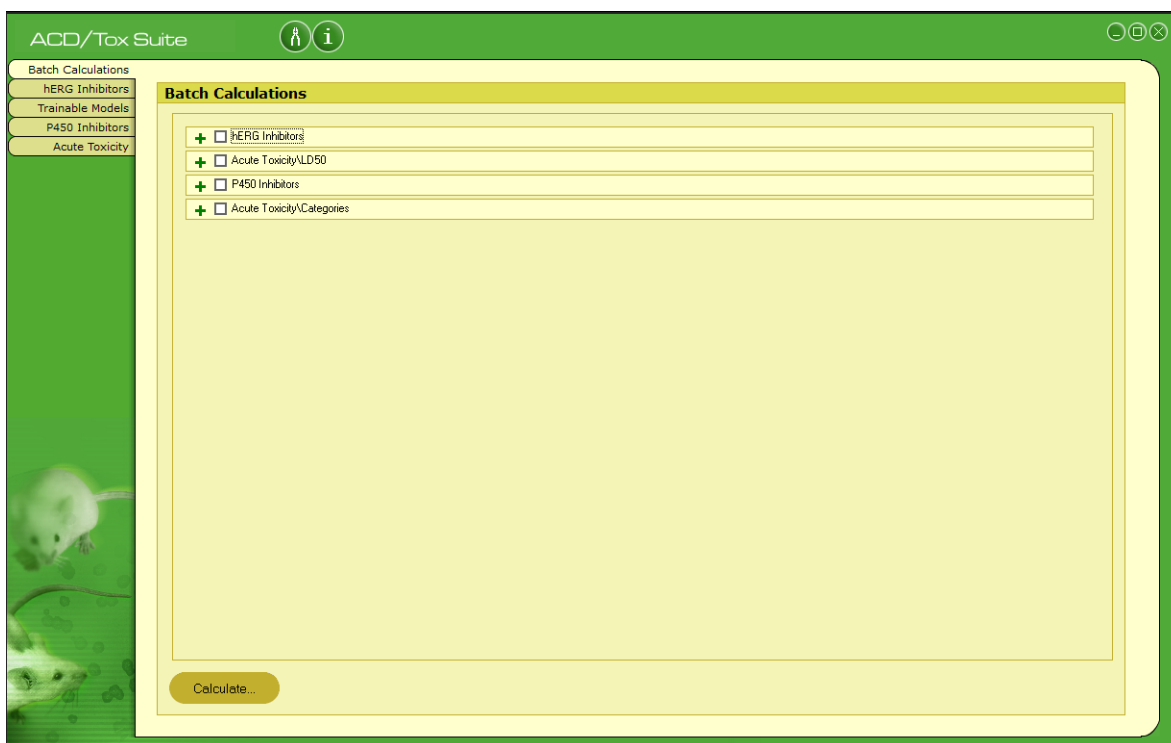


The image shows the homepage of the PASS online service. At the top, the logo for 'Way2Drug PREDICTIVE SERVICES' is displayed with the tagline 'Understanding Chemical-Biological Interactions'. Below the logo is a navigation menu with links for Home, Definitions, Products, Services, FAQ, and Contacts. The main content area features the 'PASS online' logo in large blue letters, with the text 'Better solutions for your research and development' and 'It is easy to use' below it. A 'GO for prediction' button is also visible. Below the main content, there is a section titled 'Get more information about biological potential of your compounds.' which includes a brief description of the service and a link to 'more information'.

**Figura 30.** Programa PASS online (<https://www.way2drug.com/passonline/index.php>)<sup>33</sup>

### 7.2.3 Software como herramienta predictiva de toxicidad aguda (ACD/ToxSuite)

El programa ACD/ToxSuite (**Figura 31**) es un software que permite predecir posibles efectos tóxicos, los cuales incluyen inhibición de canales hERG, inhibición de CYP450, toxicidad aguda, entre otros. <sup>32</sup>



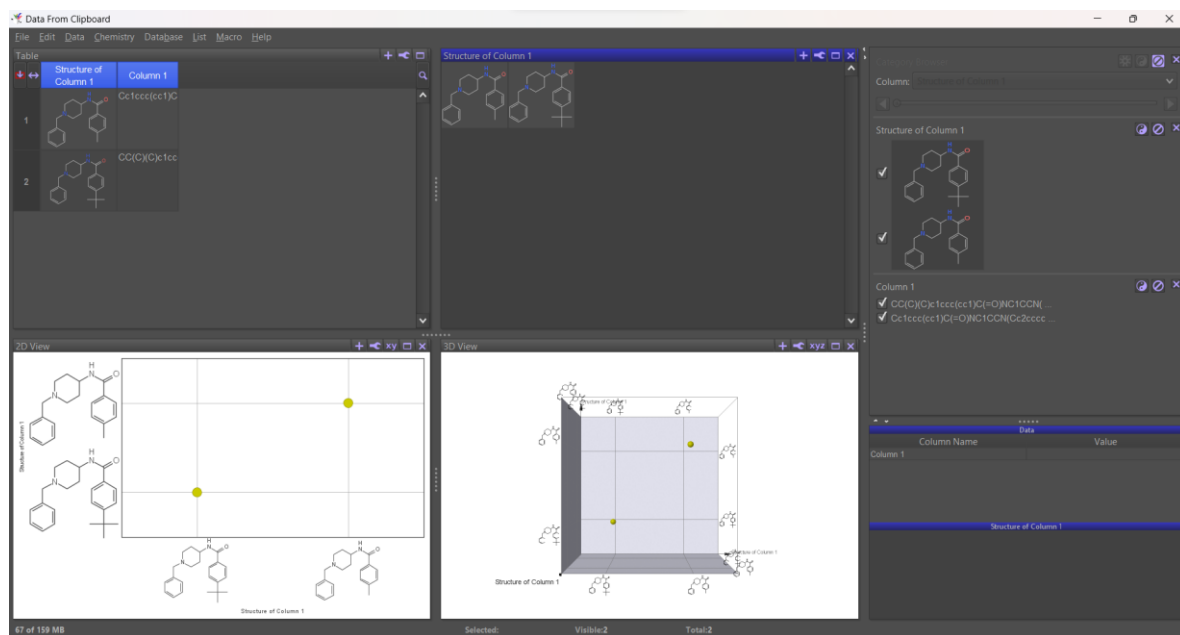
**Figura 31.** Programa de ACD/ToxSuite <sup>34</sup>

## 7.2.4 Programa abierto para visualización y análisis de datos (OSIRIS) DataWarrior

El programa OSIRIS (<https://openmolecules.org/datawarrior/>) **Figura 32** es un programa que permite calcular diversas propiedades como mutagenicidad, tumorigenicidad, irritabilidad, etc. Los resultados de la predicción son valores y codificados por colores. Propiedades con alto riesgo de efecto no deseado como mutagenicidad o una mala absorción intestinal se muestra en color rojo. Mientras que un color verde indica que el fármaco es inocuo.

El programa proporciona una semejanza de fármacos (Druglikeness) el cual combina medicamentos, fármacos y productos químicos disponibles en el marco, produciendo una lista de fragmentos disponibles.

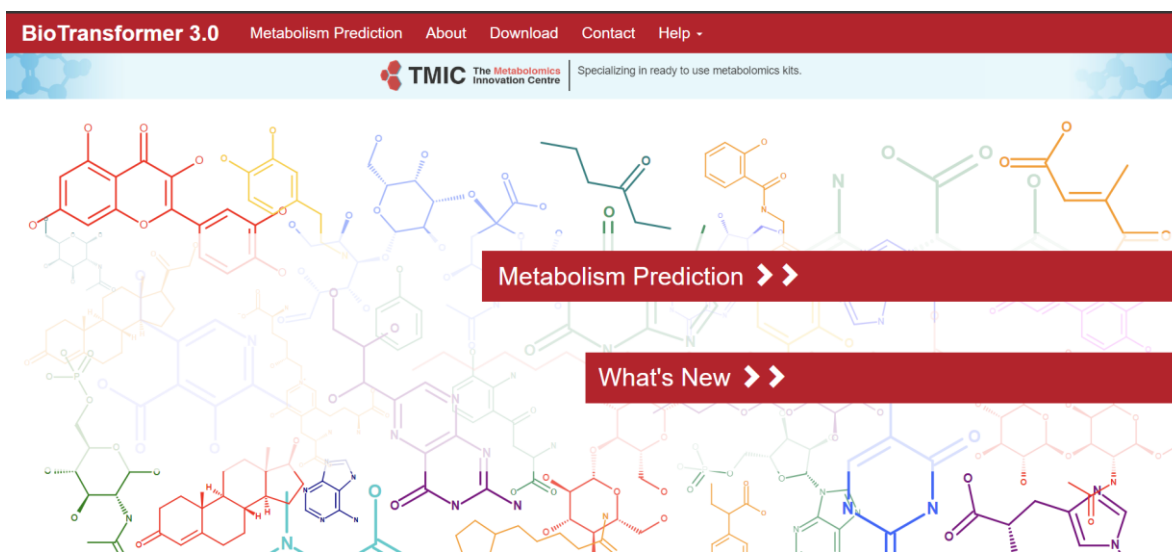
El programa proporciona un puntaje (Drug score), el cual combina propiedades de semejanza de fármacos, cLogP, peso molecular y de toxicidad en un valor que puede utilizarse para estudiar el potencial del compuesto sintetizado para llegar a ser un posible fármaco.<sup>35</sup>



**Figura 32.** Programa OSIRIS (DataWarrior).<sup>36</sup>

## 7.2.5 Predictor de Sitio metabólico BioTransformer 3.0

BioTransformer (**Figura 33**) consta de una herramienta de predicción del metabolismo (BMPT). El BMPT consta de cinco módulos de predicción independientes llamados #transformadores#, a saber: (1) el transformador basado en la Comisión de Enzimas (basado en EC), (2) el transformador CYP450 (fase I), (3) el transformador de fase II, (4) el transformador microbiano del intestino humano, y (5) el transformador microbiano ambiental. <sup>37</sup>



**Figura 33.** Programa de predicción del metabolismo BioTransformer 3.0 (<https://biotransformer.ca/>)<sup>38</sup>

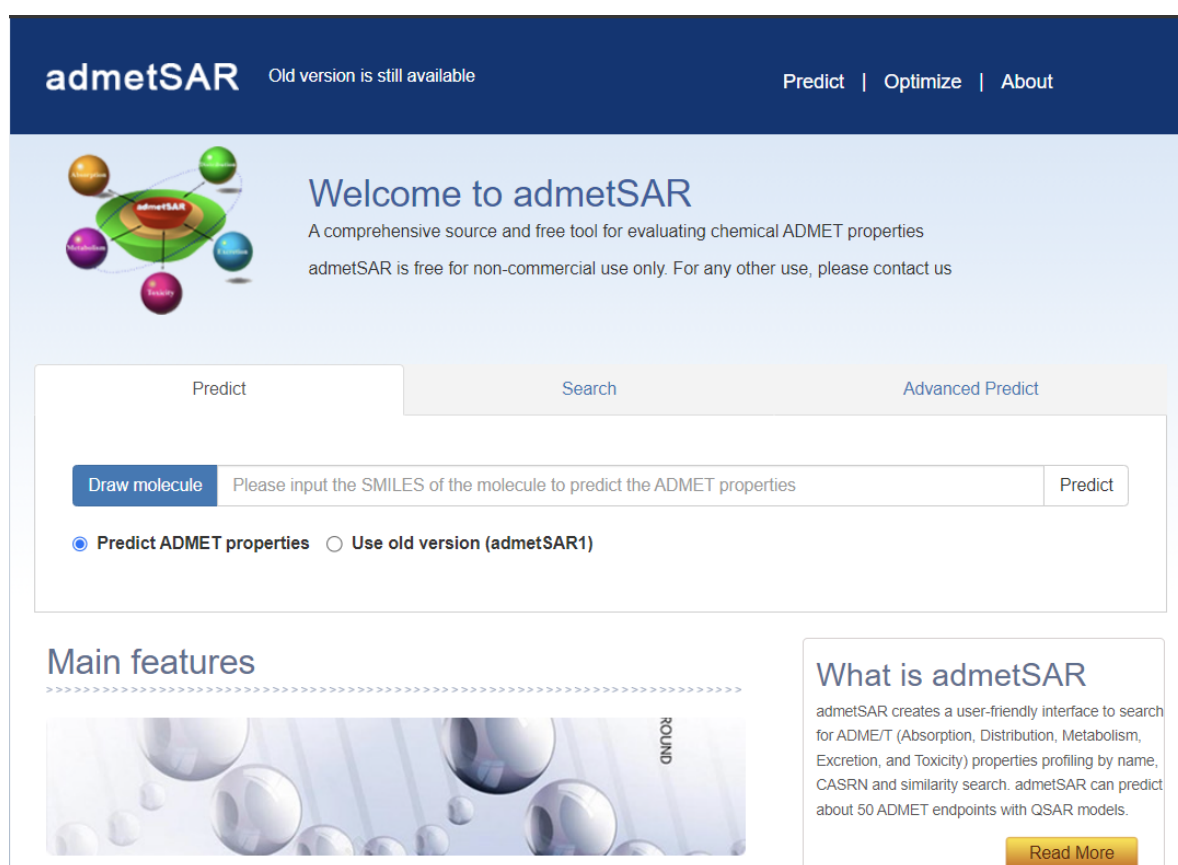


## 7.2.6 Predictor de propiedades de Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y Toxicidad (admetSAR 2.0 y ADMETlab 2.0)

Las herramientas computacionales

admetSAR2.0(<http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetSAR2>) y ADMETlab 2.0

(<https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluation/cal>) (**Figura 34** y **Figura 35**), es de libre acceso y pueden predecir parámetros relacionados con la absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad de las moléculas en cuestión. <sup>39,40</sup>



The screenshot shows the admetSAR 2.0 web interface. At the top, there is a dark blue header with the 'admetSAR' logo on the left and the text 'Old version is still available' next to it. On the right side of the header are navigation links: 'Predict | Optimize | About'. Below the header is a light blue section. On the left, there is a 3D molecular model with several colored spheres (orange, green, purple, blue, pink) connected by lines. To the right of the model, the text reads 'Welcome to admetSAR' in a large blue font, followed by 'A comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties' and 'admetSAR is free for non-commercial use only. For any other use, please contact us'. Below this is a white box containing a navigation bar with three tabs: 'Predict', 'Search', and 'Advanced Predict'. Under the 'Predict' tab, there is a 'Draw molecule' button on the left, a text input field with the placeholder 'Please input the SMILES of the molecule to predict the ADMET properties', and a 'Predict' button on the right. Below the input field are two radio buttons: 'Predict ADMET properties' (which is selected) and 'Use old version (admetSAR1)'. Below the white box is a section titled 'Main features' with a decorative border of small blue circles. To the right of this section is a box titled 'What is admetSAR' containing a short paragraph about the tool's capabilities and a 'Read More' button.

**Figura 34.** Programa admetSAR 2.0 (<http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetSAR2>) <sup>41</sup>

**ADMETlab 2.0**

Undesirable pharmacokinetics and toxicity of candidate compounds are the main reasons for the failure of drug development, and it has been widely recognized that absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) of chemicals should be evaluated as early as possible. ADMETlab 2.0 is an enhanced version of the widely used [ADMETlab](#) for systematical evaluation of ADMET properties, as well as some physicochemical properties and medicinal chemistry friendliness. With significant updates to functional modules, predictive models, explanations, and the user interface, ADMETlab 2.0 has greater capacity to assist medicinal chemists in accelerating the drug research and development process.

[Learn More](#)

**Figura 35.** Programa ADMETlab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/>)<sup>40</sup>

## 7.3 EVALUACIÓN *in vitro*

### 7.3.1 Ensayo de unión para el receptor sigma-1 (*binding*)

Para el ensayo se utilizó cerebro de cuyo, el cual se homogenizó con seis cantidades de sacarosa (0.32 M) en frío. Esta solución se centrifugó a 1200 rpm/10 min/4°C. El sobrenadante se preparó y se centrifugó a 23 500 rpm/20 min/4°C. El sedimento se re-suspendió en 5-6 cantidades de Buffer-TRIS (50 nM y pH 7.4) y se centrifugó nuevamente a 23 500/20 min/4°C. Este procedimiento se repite dos veces. El sedimento final se resuspendió entre 5-6 cantidades de buffer y se congeló a -80°C en porciones de 1.5mL que contiene aproximadamente 1.5 mg de proteína/mL. Posteriormente, se preparó una membrana de la corteza cerebral de cuyo que estaba congelada (alrededor 100 µg de proteína) y se incubó a varias concentraciones de los compuestos a evaluar de 2nM [<sup>3</sup>H]-(+)-pentazocina (22.0 Ci/mmol; Perkin Elmer) y solución Buffer-TRIS a 37 °C.

La constante de disociación (*K<sub>i</sub>*) describe la afinidad entre un ligando y una proteína en particular. Las afinidades ligando-proteína están influenciadas por las interacciones intermoleculares no covalentes entre las dos moléculas, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrófobas y fuerzas

Van der Waals. Cuanto menor sea la constante de disociación, más fuertemente se encuentra unido el ligando a la proteína. La unión no específica se determinó con 10  $\mu\text{M}$  de (+)-pentazocina. El valor de la  $K_i$  de (+)-pentazocina fue de 2.9 nM.<sup>9</sup>

#### 7.4 Acoplamiento Molecular (Docking, *a posteriori*)

El acoplamiento molecular es un método bioinformático que permite predecir y calcular computacionalmente la posición más favorable de interacción entre un ligando y un blanco (usualmente proteico) a partir de sus representaciones tridimensionales. Esta herramienta bioinformática no tiene una regla que se adapte a todos los casos y la mayoría de los programas empleados con esta finalidad, tienen diferentes métodos para tratar cada caso en particular.<sup>42</sup>

El anclaje molecular calcula la mejor orientación de los ligandos en el sitio de unión, es por eso por lo que esta técnica se usa para encontrar la conformación tridimensional de la unión ligando-sitio de acción.

La técnica consiste en encontrar el sitio de unión más probable entre un ligando y el sitio de acción con la menor energía de unión, con la cual se puede predecir la forma de unión y en algunos casos, explicar su efecto *in vivo* e *in vitro*.<sup>43</sup>

El software MOE (Molecular Operating Environment) apoya firmemente el diseño de moléculas bioactivas a través de la de la simulación molecular, análisis de estructuras de proteínas, procesamientos de datos de moléculas pequeñas, el estudio de acoplamiento de proteínas y moléculas, y así sucesivamente bajo operaciones unificadas.<sup>44</sup>

## 8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 PARTE QUÍMICA

En esta sección se sintetizaron dos compuestos finales alquilbenzamidás piperidínicas (**FRR-1** y **FRR-2**).

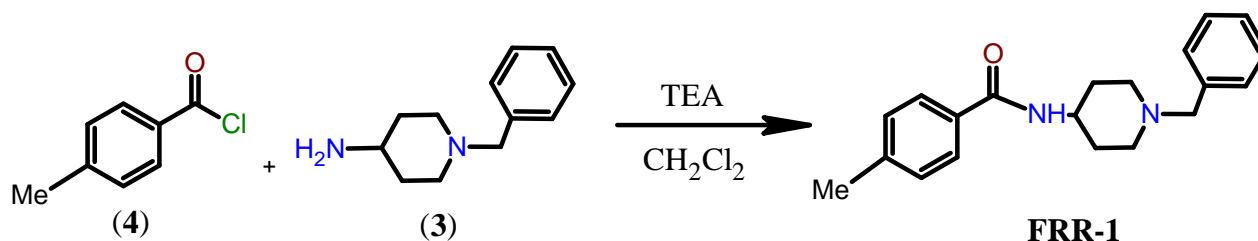
En la **Tabla 4** se aprecian las propiedades fisicoquímicas que se obtuvieron de los compuestos sintetizados, donde los compuestos tuvieron un tiempo de reacción entre 40 a 75h con rendimientos moderados y puntos de fusión indicativos de pureza.

**Tabla 4.** Propiedades fisicoquímicas de los compuestos finales.

Compuesto	PM (g/mol)	Tiempo de Rx (h)	Condiciones de Rxn	Rendimiento (%)	Estado	Punto de fusión (°C)
<b>FRR-1</b>	308.41	48h	5 ± 2°C	53.47	Cristales	163.8-165.7
<b>FRR-2</b>	350.49	72h	5 ± 2°C	59.25	Cristales	147.3-150.4

#### 8.1.1 Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-metilbenzamida (**FRR-1**)

La reacción consistió en adicionar la 4-amino-1-bencilpiperidina (**3**) con cloruro de *p*-toluilo (**4**) en medio básico con atmósfera de nitrógeno sobre condiciones de Schöotten-Baumann a temperatura ambiente, para generar la amida final **FRR-1** con un rendimiento del 53.47% (**Figura 36**)

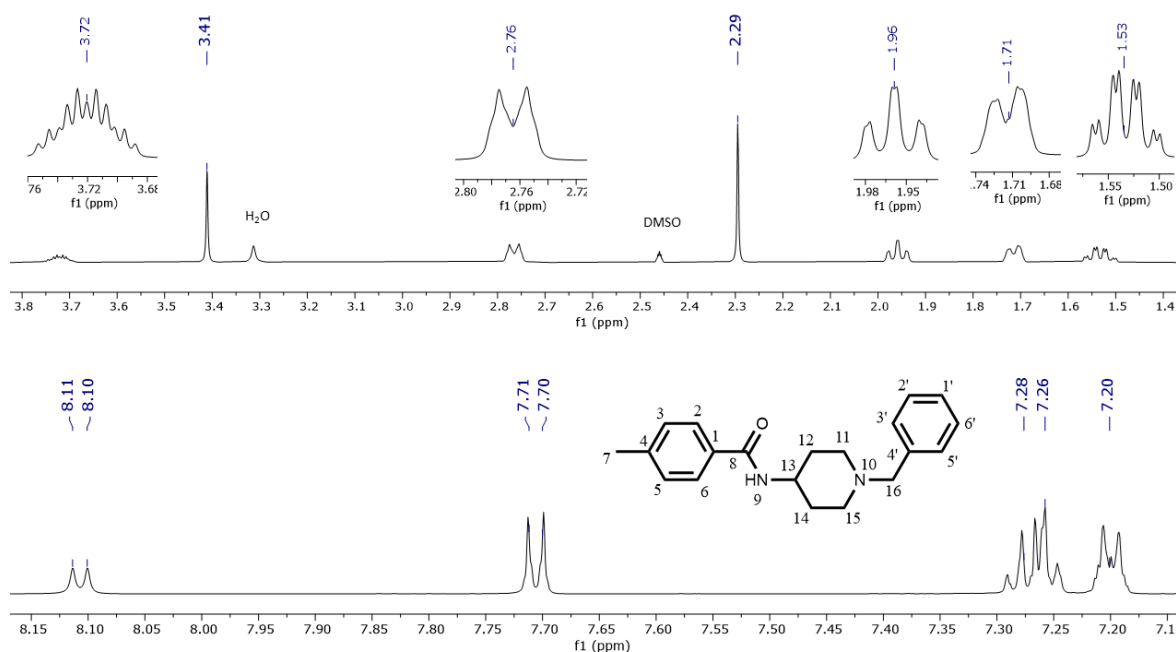


**Figura 36.** Síntesis del compuesto **FRR-1**

Para su caracterización estructural se obtuvo el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 37**) del compuesto **FRR-1**, en la zona alifática se obtuvo un cuarteto y una señal doble a un desplazamiento químico de 1.53 y 1.71 ppm correspondientes a los protones H-12 y H-14, dos señales un triplete y una señal doble a 1.96 y 2.76 ppm para los protones H-11 y H-15, una señal multiplete a 3.72 ppm del protón H-13 del heterociclo de la piperidina. Una señal simple a 2.29 ppm correspondiente a los tres

protones H-7 del metilo del benceno disustituido en posición *para* (*p*), después otra señal simple a 3.41 ppm del protón del metileno H-16, por ultimo las señales del DMSO a 2.46 ppm y el H<sub>2</sub>O a 3.31 ppm.

Para la parte aromática se observó una señal doble en 7.20 ppm correspondientes al protón H-1' del benceno monosustituido con los protones H-3 y H-5 con una  $J_o = 8.63$  Hz del benceno disustituido. A continuación, se observó una señal multiplete entre 7.26-7.28 ppm de los protones H-2', H-3', H-4' y H-6' del benceno monosustituido, entre 7.70 y 7.71 ppm se observó una señal doble correspondiente a los protones H-2 y H-6 con una  $J_o = 8.54$  Hz del benceno disustituido. También se logró identificar una señal doble en 8.10 ppm correspondiente al protón de la amida.



**Figura 37.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600MHz) del compuesto **FRR-1**

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto **FRR-1** (**Figura 38**) se esperaba un total de 20 señales donde solo se observaron 14 señales, esto se debe a los carbonos con propiedades química y magnéticamente equivalentes, por lo tanto, al inicio se observó una señal con desplazamiento químico de 21.5 ppm que corresponde al carbono C-7 del metilo en sustitución *para* (*p*) del benceno

disustituido, después en el anillo de la piperidina donde se observa una señal en 32.1 ppm la cual corresponde a los carbonos C-12 y C-14, una señal a 47.4 ppm del carbono C-13 ubicado cerca de la amida, por ultimo una señal a 52.8 ppm que corresponde a los últimos dos carbonos del anillo de la piperidina C-11 y C-15. En el desplazamiento a 62.7 ppm se encontró al carbono C-16 correspondiente al metileno entre la piperidina y el benceno mono sustituido, pasando a la zona aromática podemos ver un desplazamiento a 127.3 ppm correspondiente al C-1' de benceno mono sustituido, a 127.8 ppm se encontró una señal de los carbonos C-2 y C-6 ubicados cerca de la amida, con un desplazamiento a 128.7 ppm los carbonos C-3 y C-5 estos ubicados en el anillo de benceno disustituido, en un desplazamiento entre 129.2 y 129.2 ppm los carbonos C-2', C-3', C-5' y C-6' estos mostrándose como un doblete por ser química y magnéticamente equivalentes, en un desplazamiento a 132.5 ppm se encontró al carbono C-1 que se encuentra en el benceno disustituido unido al carbonilo de la amida, en 139.2 ppm el carbonos C-4' unido al metileno, a 141.3 ppm el carbonos C-4 unido al metilo en posición *para* (*p*) y por ultimo a 166.0 ppm se encontró el carbono C-8 correspondiente al carbono del carbonilo de la amida.

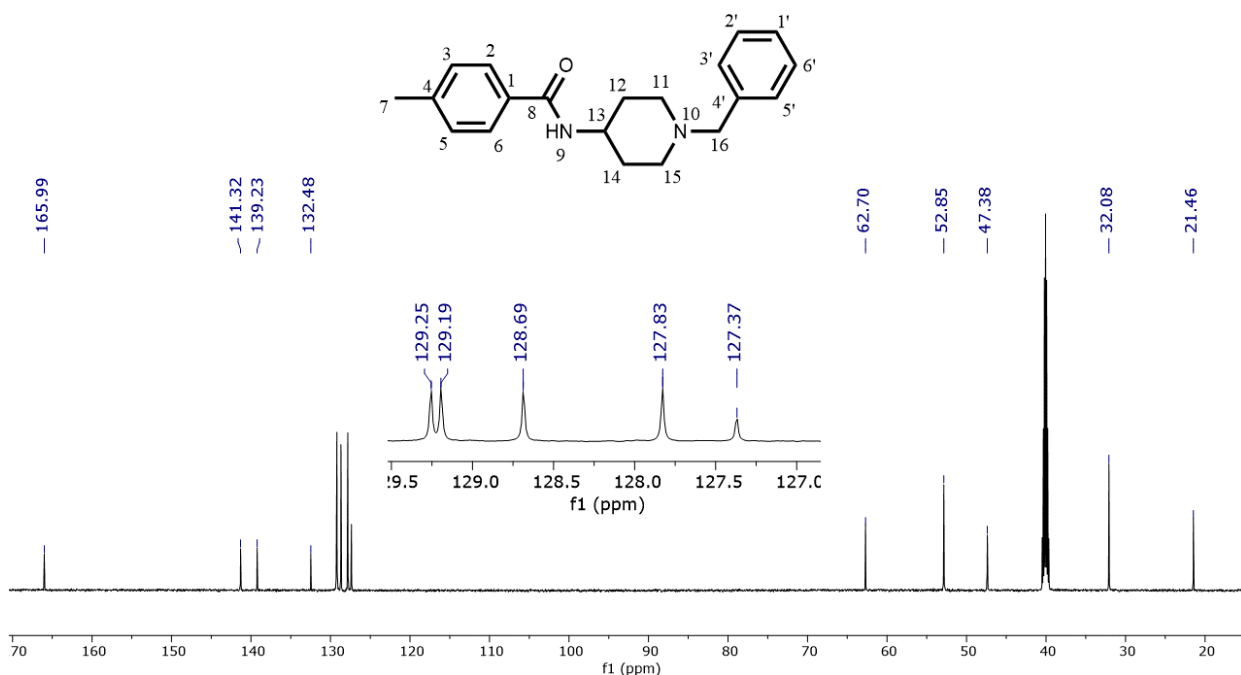
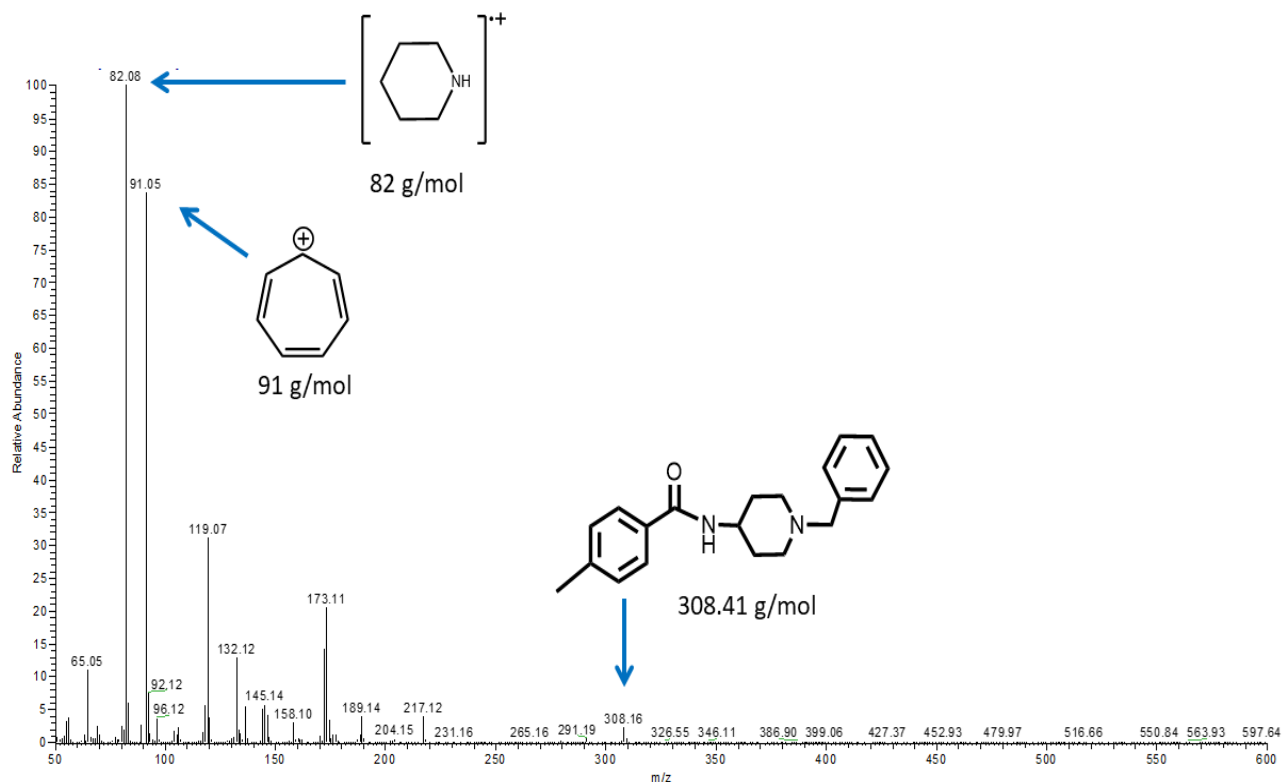


Figura 38. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (150MHz) del compuesto **FRR-1**

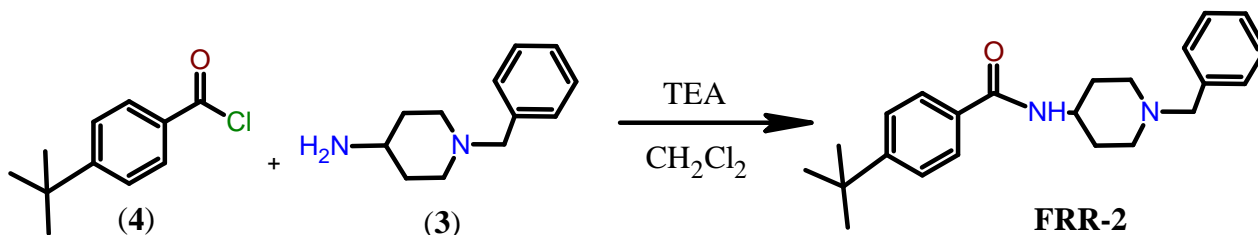
En el espectro de masas (IE) del compuesto **FRR-1** se observó una señal a 308.16 m/z correspondiente al ion cuasi-molecular ( $M^+$ ) con abundancia relativa de 2% correspondiente a la masa esperada del compuesto. La señal de 91 m/z corresponde a la formación del ion tropilio el cual tiene una abundancia relativa del 85%, la señal del pico base a 82 m/z corresponde a la pérdida de la piperidina (**Figura 39**).



**Figura 39.** Espectro de masas (IE) del compuesto **FRR-1**.

### 8.1.2 Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-terbutilbenzamida (FRR-2)

La reacción consistió en adicionar la 4-amino-1-bencilpiperidina (3) con el cloruro de 4-terbutilbenzoato (4) en medio básico con atmósfera de nitrógeno sobre condiciones de Schotten-Baumann a temperatura ambiente, para generar la amida final **FRR-2** con un rendimiento del 59.25% (**Figura 40**)

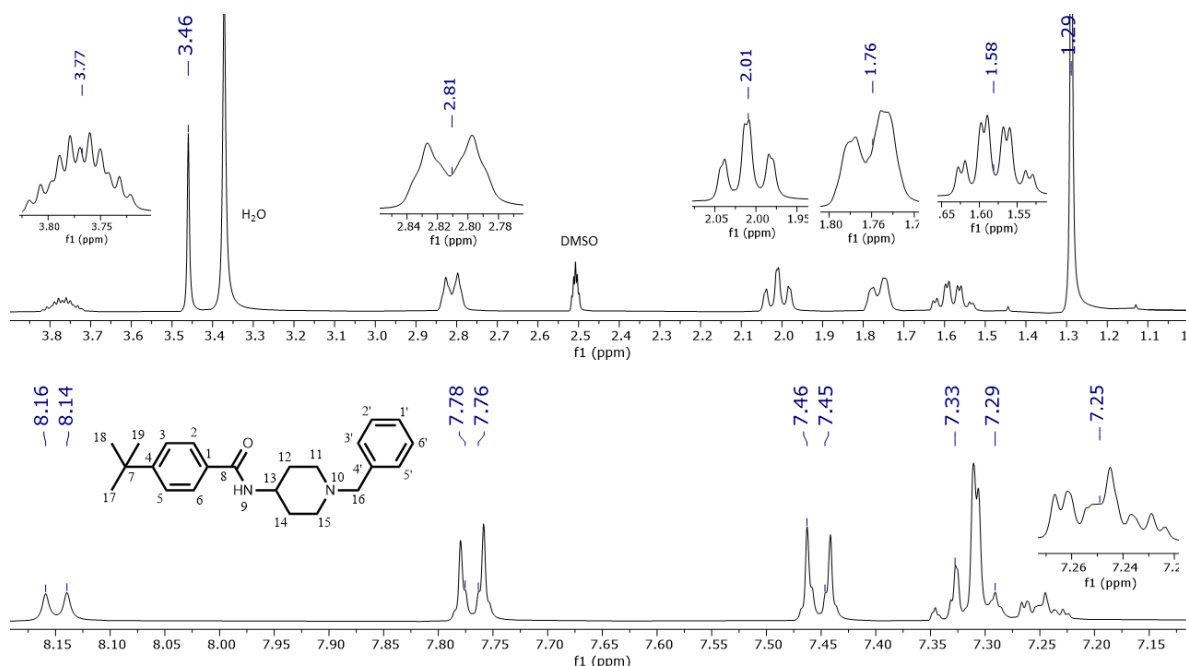


**Figura 40.** Síntesis del compuesto **FRR-2**

Para su caracterización estructural se obtuvo el espectro de RMN <sup>1</sup>H (**Figura 41**) del compuesto **FRR-2**, en la zona alifática se obtuvo una sola señal con un desplazamiento químico a 1.29 ppm correspondiente a los protones H-17, H-18 y H-19 de los metilos del terbutilo, de igual forma se observa un cuarteto y una señal doble en un desplazamiento de 1.58 ppm y 1.76 ppm corresponde a los protones H-12 y H-14, dos señales un triplete y una señal doble a 2.01 ppm y 2.81 ppm para los protones H-11 y H-15, una señal multiplete a 3.77 ppm del protón H-13 del heterociclo de la piperidina. Una señal simple a 3.46 ppm correspondiente del protón del metileno H-16, por último las señales del DMSO a 2.46 ppm y el H<sub>2</sub>O a 3.31 ppm.

Para la parte aromática se observa un multiplete en 7.25 ppm correspondiente al protón H-1' al igual que se observa un multiplete entre 2.29 y 7.33 ppm correspondiente a los protones H-3', H-4', H-5' y H-6' del benceno monosustituido. A continuación, se observa una señal doble entre 7.45 y 7.46 ppm correspondiente a los protones H-3 y H-5 con una  $J_o=8.59$  Hz de igual forma una señal doble entre 7.76 y 7.78 ppm para los protones H-2 y H-6 con una  $J_o=8.71$  Hz del benceno disustituido. Finalmente, se identificó una señal doble en un desplazamiento entre 8.14 y 8.16 ppm al protón de la amida H-9.





**Figura 41.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) del compuesto **FRR-2**

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **FRR-2** (Figura 42) se esperaba un total de 23 señales donde se esperaba ver 15 señales debido a los carbonos con propiedades química y magnéticamente equivalentes, por lo tanto, en un inicio se observó una señal con desplazamiento 31.8 ppm que corresponde a los carbonos terminales C-17, C-18 y C-19 del terbutilo en posición *para* (*p*) del benceno disustituido, después en un desplazamiento en 35.35 ppm se observó el carbono cuaternario C-7 del terbutilo, en 32.35 ppm los carbonos C-12 y C-14, al igual que en 53.10 ppm los carbonos C-11 y C-15, en 47.61 ppm el carbono C-13 del benceno de la piperidina, en un desplazamiento de 62.97 ppm se encontró al carbono C-16 correspondiente al metileno entre la piperidina y el benceno mono sustituido, pasando a la zona aromática se observó un desplazamiento a 125.68 ppm correspondiente a los carbonos C-3 y C-5, junto con un desplazamiento en 127.91 ppm correspondientes a los C-2 y C-6 ya que estos carbonos cuentan con propiedades química y magnéticamente equivalentes del anillo disustituido, con un desplazamiento en 127.64 ppm corresponde al C-1' a 128.95 y 129.51 ppm los carbonos C-2', C-3', C-5' y C-6 del anillo monosustituido, en un desplazamiento a 132.87 ppm corresponde a los carbonos cuaternarios C-1 y a 154.53 ppm el

carbono C-4 del anillo de benceno disustituido, en un desplazamiento a 139.50 ppm corresponde al carbono C-4' del benceno disustituido, por último en un desplazamiento a 166.38 ppm se encuentra el carbono C-8 correspondiente al carbono del carbonilo de la amida.

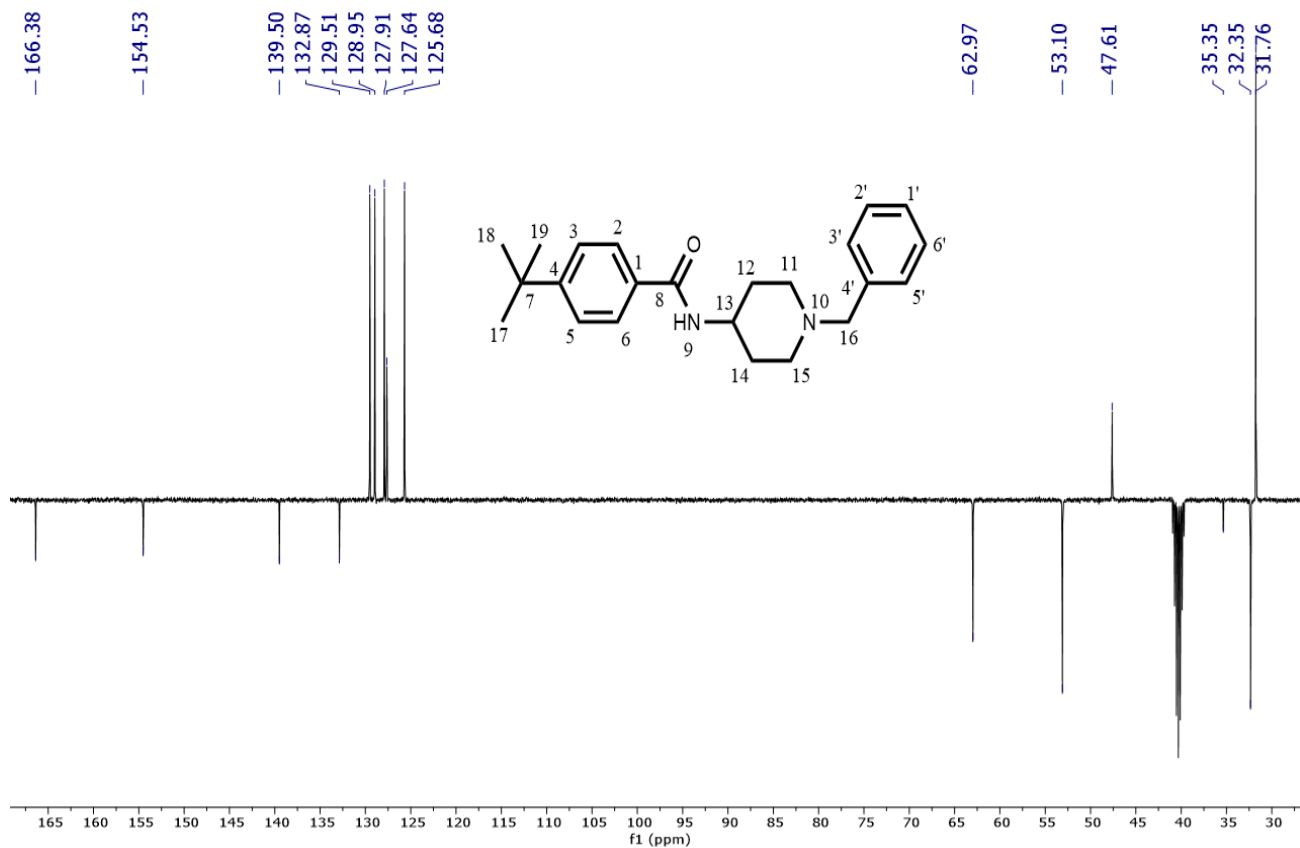
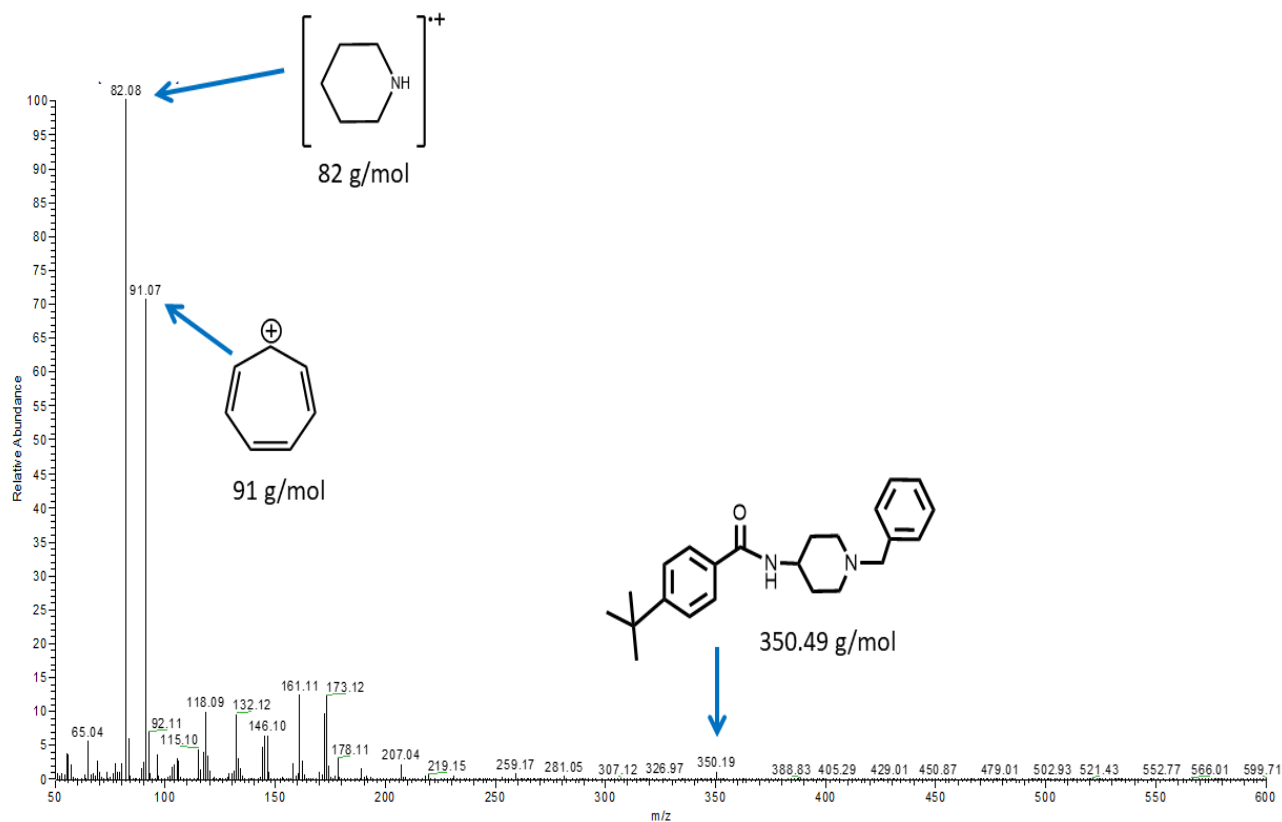


Figura 42. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100MHz) del compuesto **FRR-2**

En el espectro de masas (IE) del compuesto **FRR-2** se observó una señal a 350.49 m/z correspondiente al ion cuasi-molecular ( $M^+$ ) con abundancia relativa de 1% correspondiente a la masa esperada del compuesto. La señal de 91 m/z corresponde a la formación del ion tropilio el cual tiene una abundancia relativa del 70%, la señal del pico base a 82 m/z corresponde a la pérdida de la piperidina (**Figura 43**).



**Figura 43.** Espectro masas (IE) del compuesto **FRR-2**.

## 8.2 PARTE COMPUTACIONAL (*In silico*)

### 8.2.1 Predicción de actividad biológica de los compuestos **FRR-1** y **FRR-2** con el programa PASS.

El potencial biológico de los compuestos finales **FRR-1** y **FRR-2** fue calculado mediante el programa PASS, los resultados se resumen en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Predicción de actividad biológica con el programa PASS Online

	Antagonista del $R\sigma$		Antagonista del $R\sigma_1$	
	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>
<b>FRR-1</b>	0.94	0.27	10.4	0.10
<b>FRR-2</b>	0.99	0.26	10.1	0.11
<b>LMH-2</b>	18.0	0.16	18.0	0.06
<b>Haloperidol</b>	30.5	0.09	0.77	0.14
<b>S1RA</b>	21.3	0.124	22.0	0.75

**Pa**= probabilidad de actividad; **Pi**= probabilidad de inactividad

Se seleccionaron las actividades correspondientes a este proyecto, las cuales son actividades como posibles antagonistas de los receptores sigma sobre todo los de nuestro interés hacia el receptor sigma-1 de los compuestos **FRR-1** y **FRR-2** como posible tratamiento para el dolor.

### 8.2.2 Predicción de dianas terapéuticas de los compuestos **FRR-1** y **FRR-2** con el programa SwissTarget

Como diana terapéutica se seleccionó el receptor sigma-1 para la afinidad con los compuestos presentes en este proyecto.

En los resultados obtenidos por el programa se muestra que las predicciones del servidor SwissTarget (**Tabla 6**) calculó que los compuestos **FRR-1** y **FRR-2** tendrán una afinidad moderada, mientras que el compuesto **LMH-2** muestra de igual manera una moderada afinidad de manera predictiva, mientras que en los ensayos in vitro e in vivo este se obtuvo como el mejor candidato hacia estos receptores al igual que los compuestos **S1RA** y **haloperidol** que se reconocen como moléculas afines a los receptores sigma y sigma-1.

**Tabla 6.** Predicción de dianas terapéuticas de los compuestos **FRR1-2**, **LMH-2**, **S1RA** y **Haloperidol**.

Compuesto	Receptor intracelular $\sigma_1$ (%)
<b>FRR-1</b>	28.48
<b>FRR-2</b>	12.55
<b>LMH-2</b>	15.15
<b>Haloperidol</b>	100
<b>S1RA</b>	100

### 8.2.3 predicción de propiedades de los cuasi-fármacos con el programa Osiris y DataWarrior

El servidor computacional Osiris presenta valores numéricos y códigos de color para los diferentes criterios, los cuales se indican con rojo: alerta de ser un posible agente tóxico, Naranja: para intermedios y Verde: para los no tóxicos. En la **Tabla 6** se muestran los resultados indicados para los compuestos finales.

**Tabla 7.** Propiedades toxicológicas, cuasi-fármaco y clasificaciones como fármaco de los compuestos finales FRR1-2, LMH-2, S1RA y Haloperidol.

Compuesto	Mutagénico	Tumorigénico	Irritante	Efectos nocivos reproductivo
FRR-1	●	●	●	●
FRR-2	●	●	●	●
LMH-2	●	●	●	●
Haloperidol	●	●	●	●
S1RA	●	●	●	●



Ninguno de los compuestos indicó efecto mutagénico, tumorigénico, irritante o teratogénico. Estos resultados sugieren que son adecuados para el diseño de los nuevos compuestos con respecto a **S1RA**, que dio valores de ser tumorigénico y precaución de ser mutagénico esto debido al fragmento de naftol de la molécula. Sin embargo, haloperidol presenta valores que la caracterizan como una molécula no toxica al igual que el compuesto **LMH-2** sintetizado en el Laboratorio 5 de Química Farmacéutica de la UAEM por el Maestro en Farmacia Luis Alberto Melo que presenta adecuados resultados como los sintetizados.

#### 8.2.4 Propiedades admetSAR de los compuestos **FRR-1** y **FRR-2**

En la **Tabla 8** se observan los resultados teóricos de absorción, metabolismo y toxicidad calculados para los compuestos **FRR-1**, **FRR-2**, **LMH-2**, **S1RA** y **haloperidol**, basados en un modelo de QSAR por los servidores admetSAR y ADMETlab 2.0.

En la tabla se observa que los compuestos podrían atravesar la barrera hematoencefálica, lo cual es de suma importancia para este proyecto, ya que se desea que lleguen a SCN, y podrían ser sustrato de la glicoproteína P (datos desfavorables para los compuestos).

Esta proteína se encuentra distribuida ampliamente en las células del epitelio intestinal, se encarga de expulsar los xenobióticos previamente absorbidos hacia el lumen intestinal, se sabe que crea un eflujo para la expulsión de su sustrato que es dependiente de ATP.

**Tabla 8.** Resultados predictivos por admetSAR y ADMETlab para los compuestos **FRR-1**, **FRR-2**, **LMH-2**, **S1RA** y **Haloperidol**.

Modelo	FRR-1	FRR-2	LMH-2	S1RA	Haloperidol
<b>Absorción</b>					
<b>Absorción intestinal</b>	+	+	+	+	+
<b>Barrera hematoencefálica</b>	+	+	+	+	+
<b>Sustrato PGP</b>	+	+	+	-	-
<b>Metabolismo</b>					
<b>Sustrato CYP2C9</b>	-	-	-	-	-
<b>Sustrato CYP2D6</b>	+	+	+	-	+
<b>Sustrato CYP3A4</b>	-	+	+	+	+
<b>Toxicología</b>					
<b>Toxicidad AMES</b>	-	-	-	+	-
<b>Carcinogénesis</b>	-	-	-	-	-
<b>Glp.</b> - Glicoproteína P; <b>CYP.</b> - Citocromo P450, familia, subfamilia e isoforma					

En la parte de metabolismo, los programas sugieren que el compuesto **FRR-1** podría ser metabolizado por la isoforma CYP2D6, el compuesto **FRR-2** podría ser metabolizado por las isoformas CYP2D6 y CYP3A4, por lo que se predice que los dos compuestos serán metabolizados en reacciones de fase I por esta familia de citocromos.

Cabe mencionar, que es mejor que un compuesto sea sustrato de varias isoformas, ya que si es sustrato de solo una isoforma esta podría ser inhibida por otro agente xenobiótico y el ligando no ser metabolizado para su excreción, lo cual aumentaría sus efectos tóxicos al organismo.

Por último, en la parte toxicológica, los compuestos **FRR-1** y **FRR-2** no mostraron probabilidad de ser genotóxicos o carcinogénicos como previamente se había establecido en el programa OSIRIS. Los resultados para **S1RA** muestran un efecto genotóxico (AMES +), esto es debido a la probabilidad de fragmento, ya antes mencionado, que le confiere la toxicidad a la molécula.

#### 8.2.5 Predicción toxicológica de los compuestos **FRR-1** y **FRR-2** mediante el programa ACD/ToxSuite

La predicción de los compuestos **FRR-1**, **FRR-2**, **LMH-2**, **S1RA** y **haloperidol** se realizó con el programa ACD/ToxSuite que indicó diversos resultados de toxicidad como es el porcentaje de probabilidad del bloqueo de los canales hERG, la inhibición de las isoformas de la familia de CYP450, así como la toxicidad aguda (dosis letal media = DL<sub>50</sub>) por la vía de administración oral para el modelo en rata o ratón, así como su categoría en la clasificación de la OECD.

En la **Tabla 9** se encuentran las predicciones del perfil toxicológico de los compuestos FRR-1, FRR-2, LMH-2, S1RA y Haloperidol. Los compuestos **FRR-1**, **FRR-2** y **LMH-2** muestran una probabilidad moderada de ser cardiotóxicos entre 30-48%, el compuesto **S1RA** y Haloperidol muestran una probabilidad alta entre 70-90% de ser cardiotóxicos, por lo cual estos compuestos presentan una alarma en las propiedades de canales hERG por esa razón se utilizó como control positivo terfenadina, con una probabilidad del 98% (este fármaco fue retirado del mercado por sus efectos cardiotóxicos) y Clorfenamina, con una probabilidad del 93% y actualmente se encuentra en venta.

Con estos resultados se puede inferir que los compuestos diseñados presentarían un menor efecto cardiotóxico.



**Tabla 9.** Bloqueo de canales hERG

Compuesto	Probabilidad de bloqueo de canales hERG [10µM]
FRR-1	48%
FRR-2	39%
LMH-2	30%
S1RA	90%
Haloperidol	70%
Terfenadina	98%
Clorfenamina	93%

En la **Tabla 10** se muestra la probabilidad de la inhibición de las diferentes isoformas de la familia del CYP450. Los compuestos **FRR-1**, **FRR-2** y **LMH2** presentan una moderada probabilidad de inhibir la isoforma CYP2D6; sin embargo, mostraron baja probabilidad (menos del 10%) de inhibir la isoforma 3A4, al poseer un menor porcentaje de inhibición podría carecer de llevar a cabo la interacción fármaco-fármaco en comparación con el ketoconazol que fue retirado del mercado por la inhibición del CYP450.

Esto se debe a que esta isoforma es la más abundante en el cuerpo humano, así como también es una de las más importantes para el metabolismo de los fármacos, ya que se encarga de metabolizar más del 80% de los fármacos, en comparación con el compuesto **S1RA** que mostró del 20% de inhibir esta isoforma.

**Tabla 10.** Probabilidad de inhibición de las isoformas del CYP450

Compuestos	Inhibición de CYP450 [10 µM]				
	3A4	2D6	2C9	2C19	1A2
FRR-1	5%	51%	5%	5%	2%
FRR-2	7%	39%	4%	11%	0%
LMH-2	5%	54%	5%	5%	3%
Haloperidol	5%	63%	7%	6%	0%
S1RA	26%	16%	9%	5%	55%
Ketoconazol	93%	2%	14%	13%	0

En la **Tabla 11** se muestra la probabilidad de la toxicidad aguda (presencia de efectos tóxicos a una sola administración o administración en un rango de 24 horas), mostrando como afinidad el cálculo de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), observado que el compuesto haloperidol es más probable de ser tóxico en comparación con los demás compuestos.

**Tabla 11.** Probabilidad de toxicidad aguda de los compuestos.

Compuesto	DL <sub>50</sub> (mg/Kg) Vía Oral		Categoría OECD
	Ratón	Rata	
FRR-1	370	530	IV
FRR-2	380	690	IV
LMH-2	440	430	IV
S1RA	570	960	IV
Haloperidol	160	180	III

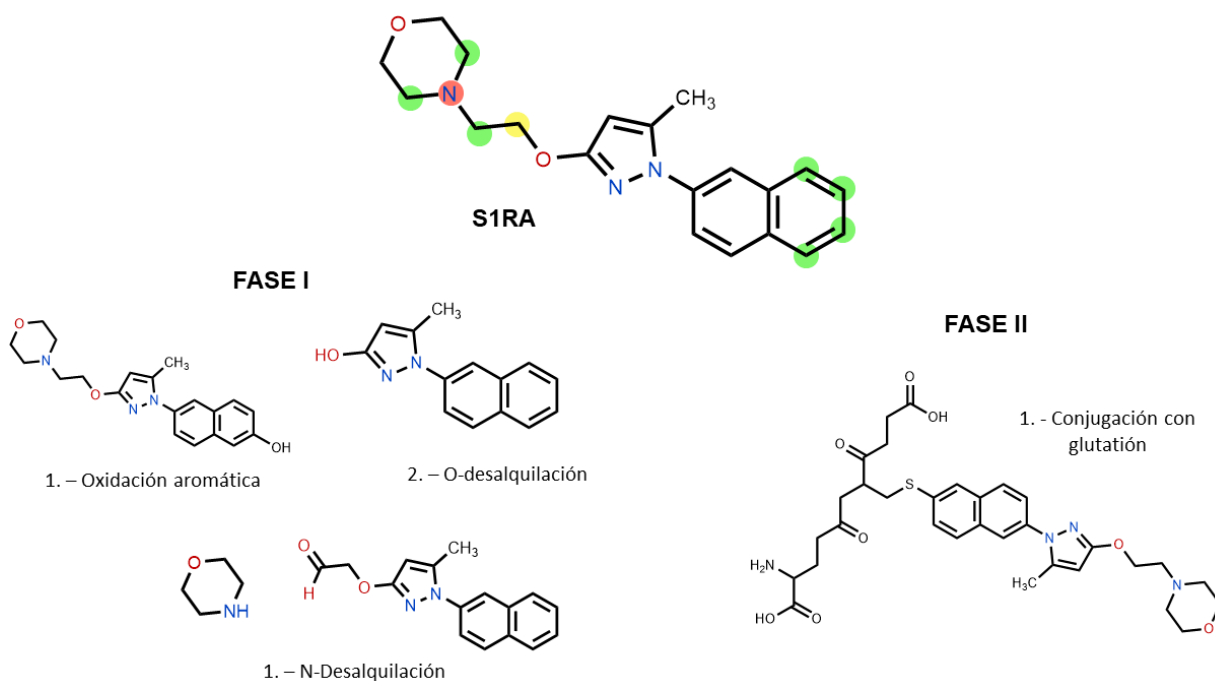
De acuerdo con los datos establecidos por el programa, todos los compuestos entran en la categoría IV establecida por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD). Los compuestos mostraron una toxicidad moderada ( $DL_{50}$ ) en comparación con el haloperidol que mostró ser tóxico en la toxicidad aguda de categoría III (**Tabla 12**).

**Tabla 12.** Clasificación de toxicidad de la OECD.<sup>45</sup>

Categoría	Rango de la DL <sub>50</sub>	Clasificación
I	$DL_{50} < 5\text{mg/Kg}$	Altamente tóxico
II	$5 \leq DL_{50} \leq 50\text{mg/Kg}$	Muy tóxico
III	$50 \leq DL_{50} \leq 300\text{mg/Kg}$	Tóxico
IV	$300 \leq DL_{50} \leq 2000\text{mg/Kg}$	Toxicidad moderada
V	$DL_{50} > 2000\text{mg/Kg}$	Sin peligro

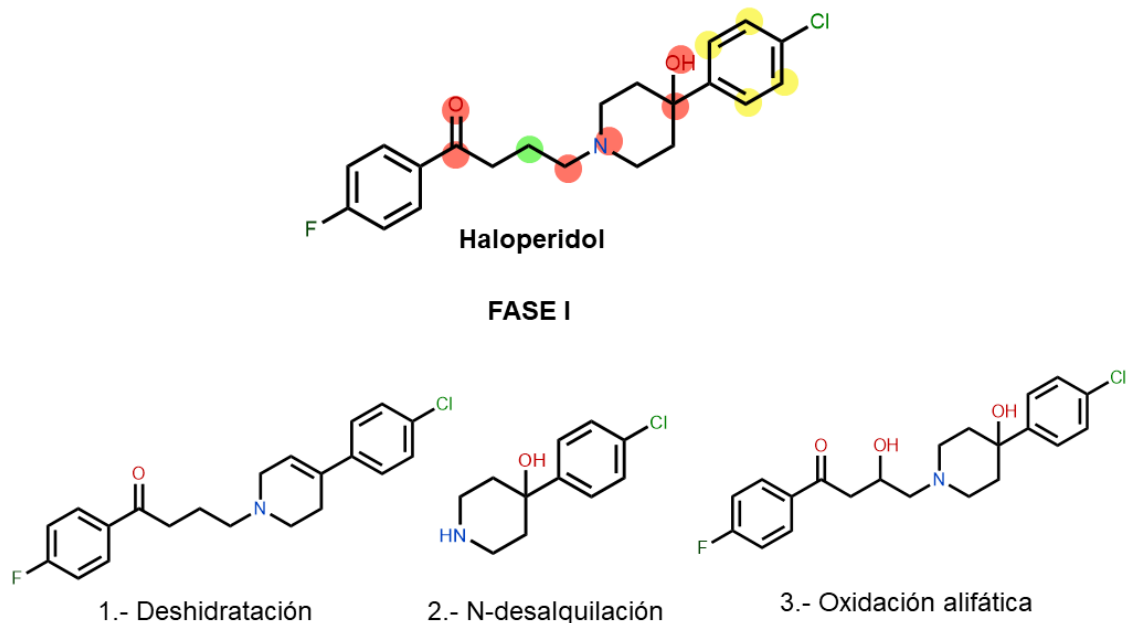
## 8.2.6 Predicción de metabolitos y sitios metabolizables por Biotransformer 3.0

La predicción del metabolismo de los compuestos sintetizados en este proyecto (**FRR-1** y **FRR-2**) se realizó mediante el servidor Biotransformer 3.0, de igual forma se obtuvieron los resultados para **S1RA** y **haloperidol**. Para la predicción de metabolismo del compuesto **S1RA** (**Figura 44**), los resultados se observan en la Figura 39 donde se observan los metabolitos de la **Fase I** (*N*-desalquilación, *O*-desalquilación y Oxidación aromática) y **Fase II** (Conjugación con glutatión).



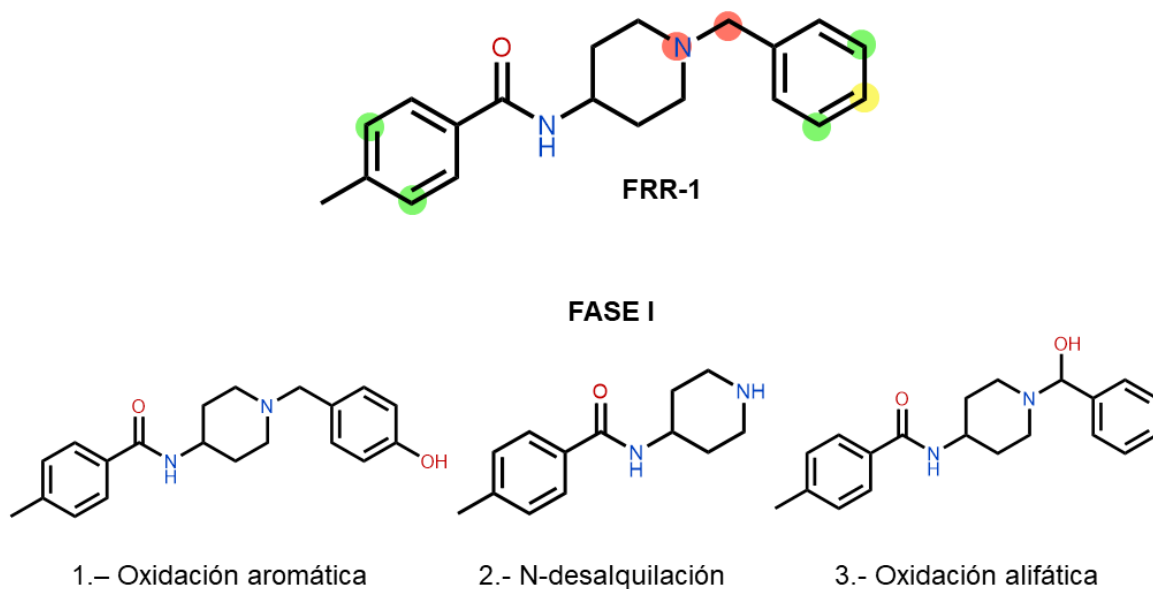
**Figura 44.** Metabolitos y sitio del metabolismo del compuesto **S1RA**.

Para la predicción del metabolismo del compuesto haloperidol los resultados se muestran en la **Figura 45**, donde se observan los metabolitos de reducción del alcohol adyacente a la piperidina, *N*-desalquilación y Oxidación alifática, siendo estas reacciones de **Fase I**.



**Figura 45.** Metabolitos y sitio del metabolismo del compuesto **haloperidol**.

Para la predicción del metabolismo de los compuestos **FRR-1** y **FRR-2** junto con el compuesto de referencia **LMH-2**, para todos los casos fueron idénticos, metabolismo de Fase I por N-desalquilación, Hidroxilaciones aromáticas y Oxidaciones alifáticas, como ejemplo se observa el metabolismo del compuesto **FRR-1** (Figura 46).

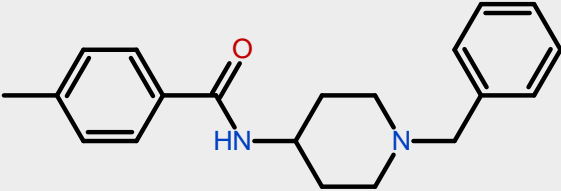
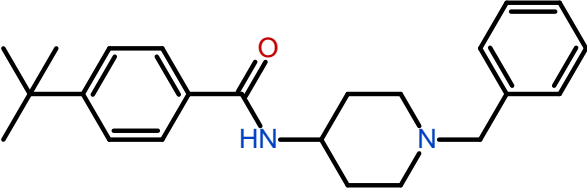
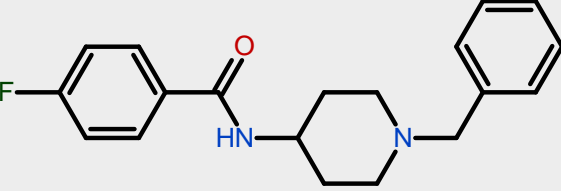
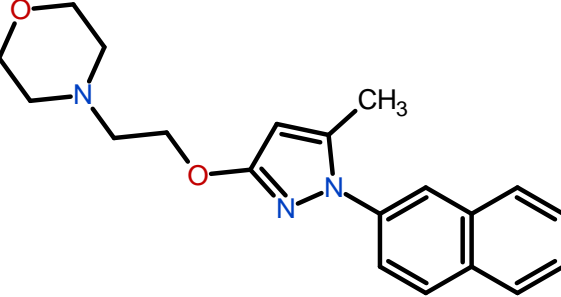
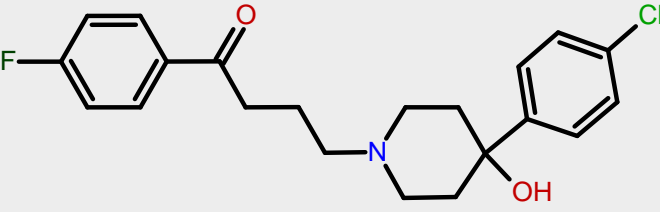


**Figura 46.** Metabolitos y sitio del metabolismo de los compuestos **FRR-1**, **FRR-2** y **LMH-2**.

### 8.3 EVALUACIÓN *in vitro*

En la **Tabla 13** se observan los resultados *in vitro* de la unión de los ligandos **FRR 1-2, LMH-2, S1RA** y **haloperidol** sobre el receptor sigma-1 (ensayos de unión “binding”), mostrando la constante de afinidad ( $K_i$ ) de cada uno de los compuestos a dicho receptor.

**Tabla 13.** Afinidad de los compuestos **FRR 1-2, LMH-2, S1RA** y **haloperidol**

#Compuesto	Fórmula	$K_i$ (nM)
FRR-1		12
FRR-2		4.8
LMH-2		6
S1RA		17
Haloperidol		6.3

Cómo se observa en la **Tabla 13**, el compuesto **FRR-1** posee una afinidad ( $K_i$ ) de 12 nM para el receptor sigma-1, si se compara con la actividad mostrada por el compuesto **S1RA**, se puede observar un aumento en la afinidad al receptor sigma-1. Si se compara esta afinidad con el compuesto **LMH-2** y **haloperidol** se puede ver disminución.

Por otra parte, el compuesto **FRR-2** posee una *K<sub>i</sub> experimental* de 4.8 nM para el receptor sigma-1, obteniendo 3.5 veces el aumento en la afinidad en comparación con **S1RA**, incluso teniendo una mayor afinidad que el compuesto **LMH-2** que fue de 6 nM y que el **haloperidol** de 6.3 nM.

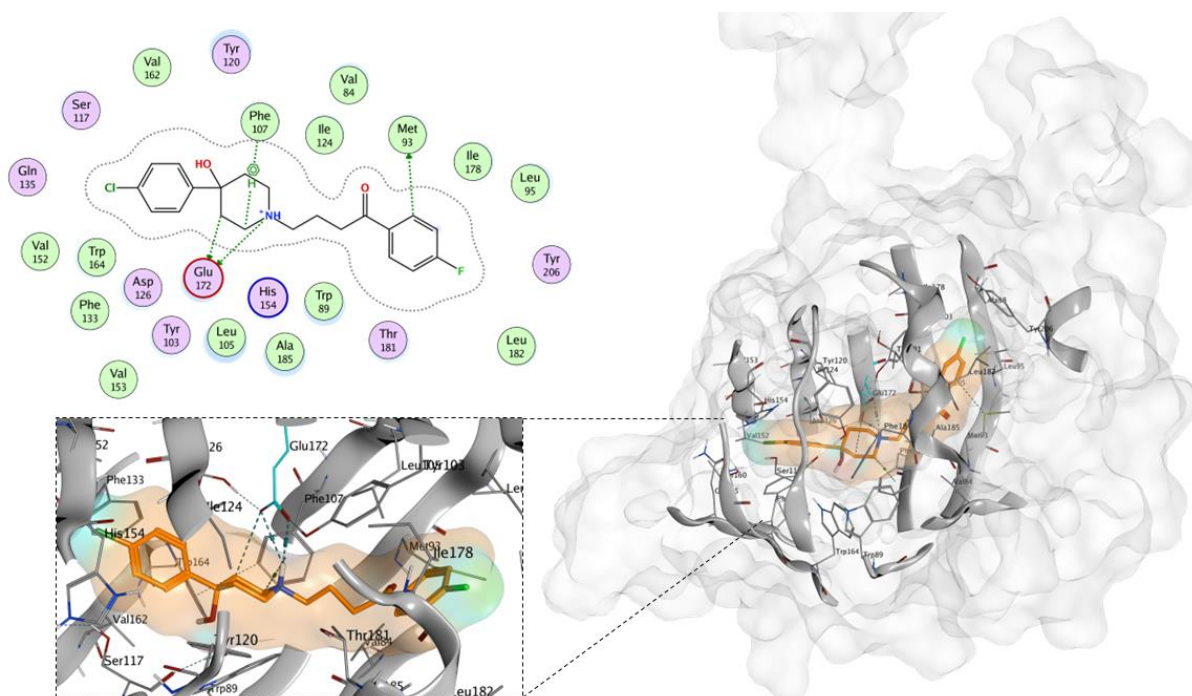
Como se mencionó, el compuesto **FRR-2** es la molécula que obtuvo una mayor afinidad por el receptor sigma-1 en comparación con el compuesto **FRR-1** que se observa la disminución de afinidad, aunque los valores de ambos compuestos son muy buenos, pues se encuentran en el bajo orden nanomolar, considerándose como líderes experimentales seguros.

## 8.4 ACOPLAMIENTO MOLECULAR “DOCKING” (A *posteriori*)

La estructura tridimensional del receptor sigma-1 se obtuvo co-cristalizada en la base de datos de PDB bajo el ID:5HK2 y con este cristal se realizó el acoplamiento molecular de los compuestos finales.

### 8.4.1 Acoplamiento molecular de **haloperidol** sobre el receptor sigma-1.

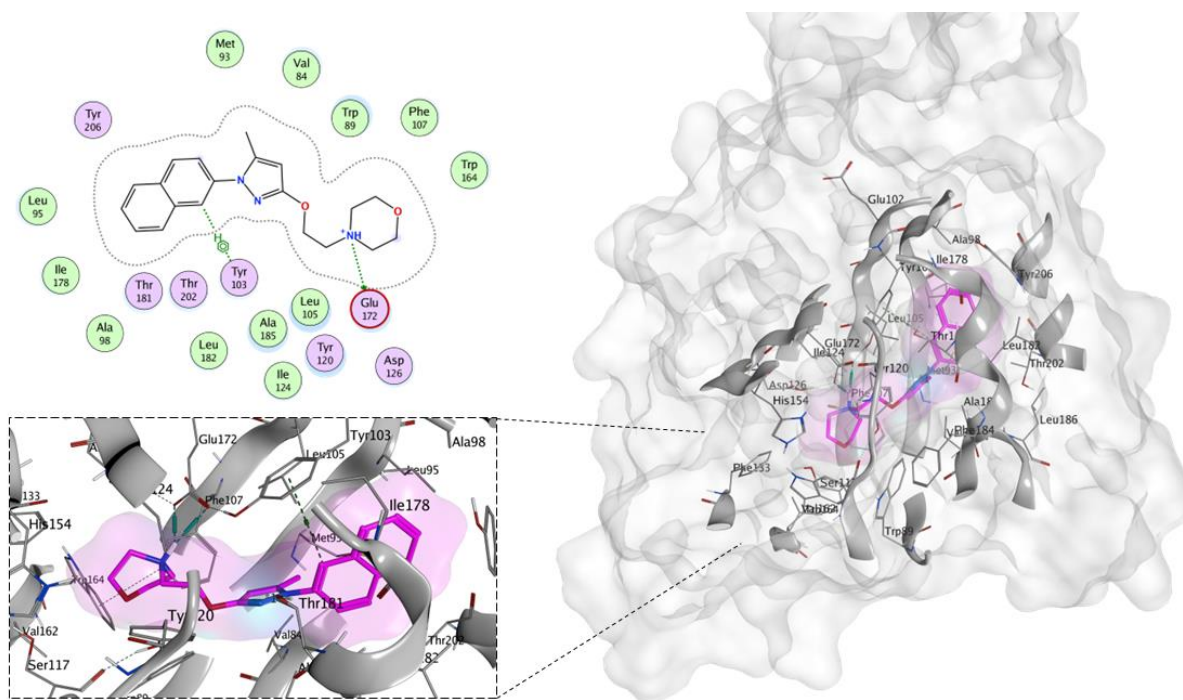
En la **Figura 47** se observan las interacciones de haloperidol con el receptor sigma-1 obtenidos por acoplamiento molecular (“Docking”). Los resultados fueron ordenados en grupos con  $RMSD < 0.5 \text{ \AA}$ . Para este compuesto se puede observar una interacción 2D y 3D de tipo  $\pi$ -hidrogeno con Phe107 al igual que una interacción de puente de hidrogeno con Met93 por último una interacción polar iónicas con el residuo de aminoácidos Glu172 y con el amino ionizable del heterociclo con una energía de unión ( $\Delta G$ ) de -10 Kcal/mol.



**Figura 47.** Visualización en 3D y 2D del conformero **haloperidol** en el sitio de unión del receptor sigma-1.

### 8.4.2 Acoplamiento molecular de **S1RA** sobre el receptor sigma-1

En la **Figura 48** se observa las interacciones del compuesto **S1RA** con el receptor sigma-1 obtenidos por el acoplamiento molecular. Los resultados fueron ordenados en grupos con  $RMSD < 0.5 \text{ \AA}$ . Este compuesto se observa una interacción en 2D y 3D con el residuo de aminoácido Glu172 con el nitrógeno de la morfolina y una interacción  $\pi$ -hidrogeno con el anillo de benceno del Tyr103. La energía de unión fue de  $-10.76 \text{ Kcal/mol}$ .

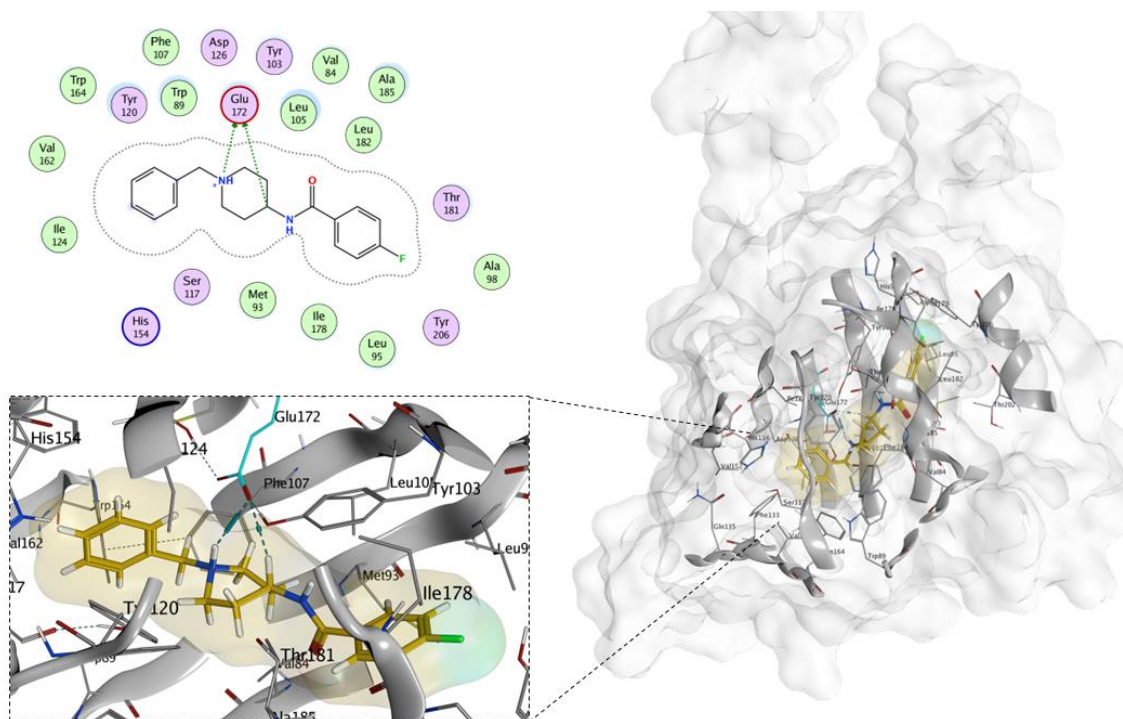


**Figura 48.** Interacciones 3D y 2D del conformero **S1RA** en el sitio de unión del receptor sigma-1.

### 8.4.3 Acoplamiento molecular de **LMH-2**

En la **Figura 49** se observan las interacciones del compuesto **LMH-2** con el receptor sigma-1 obtenidos por el *docking*. Los resultados fueron ordenados en grupos de  $RMSD < 2.0 \text{ \AA}$ . Para el compuesto se observa la interacción con el residuo de aminoácidos Glu172 y con el amino ionizable del heterociclo con una energía de unión ( $\Delta G$ ) de  $-8.85 \text{ Kcal/mol}$ .





**Figura 49.** Interacciones 3D y 2D del conformero **LMH-2** en el sitio de unión del receptor sigma-1.

#### 8.4.4 Acoplamiento molecular de **FRR-1** y **FRR-2** sobre el receptor sigma-1

En la **Figura 50** y **Figura 51** se observan las interacciones de los compuestos **FRR-1** y **FRR-2** con el receptor sigma-1 obtenidos por el *docking*. Los resultados fueron ordenados en grupos de  $RMSD < 2.0 \text{ \AA}$ . Para los compuestos se observa la interacción con el residuo de aminoácidos Glu172 y con el amino ionizable del heterociclo. Se calcularon las energías de unión para los siguientes conformeros:

(A) **FRR-1**  $\Delta G$ : -8.13 Kcal/mol.

(B) **FRR-2**  $\Delta G$ : -9.25 Kcal/mol.



Los resultados obtenidos de la energía de unión ( $\Delta G$ ) en el acoplamiento molecular se muestra en la **Tabla 14**, donde se muestra que los compuestos **FRR-1** y **LMH-2** tienen bajas energías de unión a comparación del compuesto **FRR-2**. Cabe mencionar que el compuesto **LMH-2** en los resultados *in vitro* mostro una afinidad de **6 nM**, mientras que el compuesto **FRR-1** mostró una afinidad de **12 nM**, mientras que la afinidad del compuesto **FRR-2** fue de **4.8 nM**, siendo esta mayor que el compuesto **S1RA** y **LMH-2**.

**Tabla 14.** Correlación de resultados *in vitro* e *in silico*.

Compuesto	<i>In silico</i> ( $\Delta G$ )	Afinidad <i>in vitro</i> (nM)
<b>FRR-1</b>	-8.13 $\pm$ 0.007	12
<b>FRR-2</b>	-9.25 $\pm$ 0.009	4.8
<b>LMH-2</b>	-8.85 $\pm$ 0.002	6
<b>S1RA</b>	-10.76 $\pm$ 0.005	17
<b>Haloperidol</b>	-10.7 $\pm$ 0.051	6.3

## 8.5 ANÁLISIS DE CONSENSO FARMACOLÓGICO

El análisis de consenso farmacológico para la selección de un líder computacional seguro combina los resultados de diferentes cálculos realizados *in silico*:

- Predicciones farmacodinámicas (Swisstarget prediction)
- Predicciones farmacocinéticas (AdmetSAR, ADMETlab, Biotransformer 3.0)
- Predicciones toxicológicas (ACD/ToxSuite, Osiris, AdmetSAR)

El argumento del análisis de consenso farmacológico consiste en que cuanto más coincidan los cálculos de que un compuesto es activo, con baja toxicidad y perfil farmacocinético adecuado, más confiable será la selección/discriminación de dicho compuesto bioactivo (para sintetizarlo y que muestre el efecto farmacológico adecuado).

En la **Tabla 15** se muestra los resultados de diferentes programas computacionales quimio-informáticos, se observa que los mejores resultados para el análisis *in vivo* los posee el compuesto **FRR-1**, no mostrando ninguna alerta en comparación con los otros compuestos, indicando que es el mejor candidato para la evaluación en ensayos *in vivo*.

**Tabla 15.** Análisis de consenso farmacológico.

Compuestos		FRR-1	FRR-2	LMH-2	Haloperidol	S1RA
PM (g/mol)		308.47	350.50	312.160	375	337
FD	Afinidad receptor $\sigma_1$	28.48%	12.55%	15.15%	100%	100%
	Pa: Probabilidad de actividad	32.5 %	24.7%	18.0%	7.7%	22%
BF	Solubilidad	Moderada				
	Log P	3.484	4.497	3.125	3.680	3.680
	Log D	3.420	4.129	3.142	3.490	3.306
FC	ABS intestinal	Absorción Intestinal Alta				
	BHE (+)					
	Sustrato Pgp					
Tox	AMES					
	Carcinogénesis					
	hERG					
	Clorfenamina 93%					
Ranking		II	I			
<b>DOCKING MOLECULAR ( MOE )</b>						
COMPUESTO		SCORE		RMSD		
Validación		-8.75		0.0264		
FRR-1		-8.13		0.0821		
FRR-2		-9.25		0.0319		

## 9 . CONCLUSIONES

- Se sintetizaron y caracterizaron químicamente los compuestos **FRR-1** y **FRR-2** con rendimientos de moderados a buenos.
- Los resultados de los estudios *in silico* muestran adecuadas propiedades biofarmacéuticas, farmacocinéticas, farmacodinámicas, y toxicológicas de **FRR-1** y **FRR-2**, sugiriendo una baja toxicidad calculada, con el efecto farmacológico de interés.
- En el estudio de anclaje molecular de los compuestos **FRR-1** y **FRR-2** sobre el receptor sigma-1 se observan interacciones similares a las de **S1RA** con el sitio de unión. **FRR-1** y **FRR-2** presentó interacciones con los aminoácidos **Glu172** y **Asp126**, por lo que podría comportarse como un antagonista del receptor sigma-1.
- El compuesto **FRR-2** fue el que obtuvo mayor afinidad al receptor sigma-1 en la evaluación *in vitro* (*binding*), con una  $K_i = 4.8$  nM, convirtiéndose de un líder computacional a un líder experimental seguro.
- El Análisis de Consenso Farmacológico indicó como líder computacional seguro al compuesto **FRR-2**, además de que mostró afinidad experimental *in vitro* contra el receptor sigma-1, por lo cual es el candidato para continuar con la evaluación farmacológica *in vivo* en modelos murinos de dolor neuropático.

## 10 . PERSPECTIVAS

- Realizar las pruebas *in vivo* en modelos murinos de dolor neuropático del compuesto **FRR-2**.
- Diseñar otros derivados de los compuestos con diferentes sustituyentes en los grupos arilos para observar la relación estructura-actividad sobre los receptores sigma-1.

## 11 . PARTE EXPERIMENTAL

Para la síntesis de los compuestos **FRR-1** y **FRR-2** se utilizaron reactivos de marca SIGMA-ALDRICH® y MERK®. Para el calentamiento y la agitación magnética se utilizó una parrilla de la marca CIMAREC® y un matraz bola de 25 mL acoplados con agitación magnética, tubo de adición y nitrógeno para aislar las reacciones con el medio ambiente. Además de usar un tubo lavador con trampa de gases para la formación de amidas. Para el monitoreo de las reacciones se utilizaron cromatografías en capa fina (CCF) de placas de aluminio de 2.5 x 4 cm cubiertas con gel de sílice. Para correr las placas se utilizó una cámara de elución de vidrio. Para la elución de las placas se utilizaron los sistemas observados en la siguiente **Tabla 16**.

**Tabla 16.** Sistemas utilizados como fase móvil para CCF.

Sistema	Comparación	Proporción
I	Hexano: CHCl <sub>3</sub> : AcEt	50:35:15
II	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MetOH	90:10

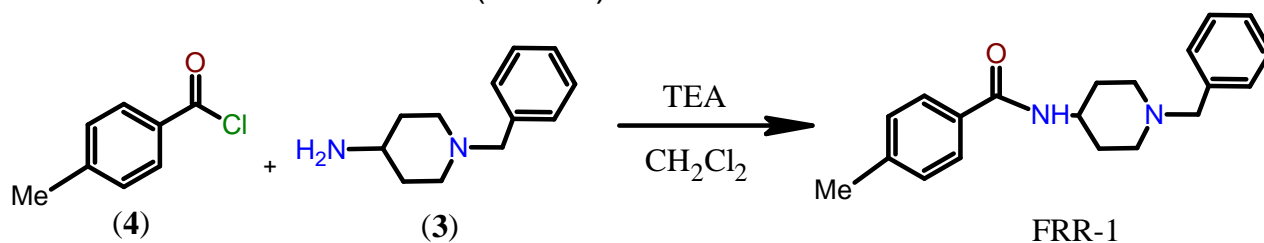
Para revelar las CCF se utilizó una lámpara UV marca ENTELA modelos UVGL-25 con longitud de onda de 254-365nm. Para evaporar los disolventes utilizados se usó un rotavaporador marca BÜCHI R-200 conectado a una bomba de vacío marca Vacuubrand® ME 2C. Para alto vacío se utilizó con una bomba marca BÜCHI V-700. El punto de fusión (p.f.) se determinó con un aparato Stanford Research System, modelo EZ-Melt. El pH se midió con tiras reactivas de la marca CRISA.

Todos los programas fueron utilizados y/o corrientes sobre una laptop ASUS VivoBook modelo K513EA con Sistema Operativo: Windows 11 de 64 bits, procesador de graficos Intel iRIS<sub>x</sub><sup>e</sup> y 12 GB de memoria RAM.



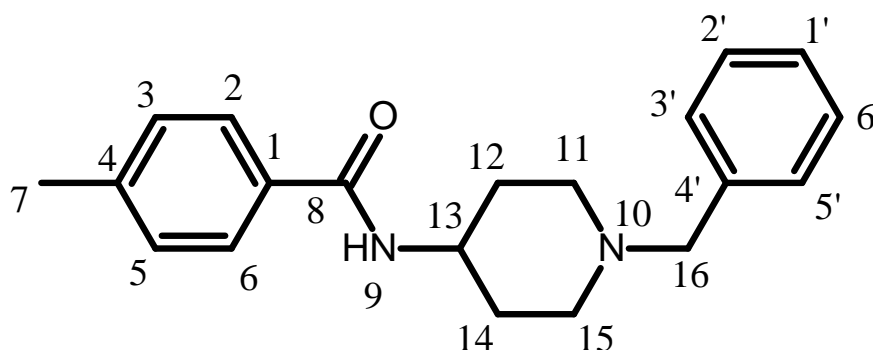
## 11.1 Parte Química

### 11.1.1 Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-metilbenzamida (**FRR-1**)



En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética, una trampa de gases y un embudo de adición de líquidos de presiones igualadas, se colocó 0.214362 ml (0.001051 mol) de 4-amino-1-bencilpiperidina (3) y se añadió 0.16112 ml (0.0015923 mol) de trietilamina en adición lenta (gota a gota), se dejó en agitación con 4 mL de diclorometano seco ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se colocó en baño de hielo ( $0-5^\circ\text{C}$ ) para añadir 0.1528 mL (0.00115161 mol) de cloruro de *p*-toluilo (4), posteriormente permaneció a temperatura ambiente y se dejó en agitación durante 48h.

Utilizando el **sistema I** se realizó una CCF, revelando la usencia de la materia prima, se rotaevaporó todo el diclorometano hasta sequedad. El compuesto se trato para llevar nuestro compuesto a un pH entre 8 y 9, se filtró y se dejó secar. Con una mezcla Etanol-Agua se recristalizo para obtener cristales blancos, con un peso de 0.1733 g, un punto de fusión de  $163.8-165.7^\circ\text{C}$  y un rendimiento de 53.47%.

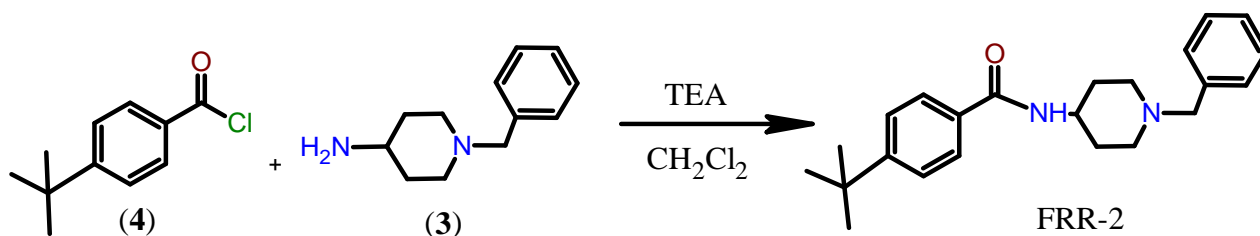


**RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ:** 8.11(d, 1H, NH), 7.71 (d, J<sub>o</sub>=8.54 Hz, 2H, H2,H6), 7.27 (m, 4H, H2', H3',H5',H6'), 7.20 (m, J<sub>o</sub>=8.63, 3H, H1',H3,H5), 3.72 (m, 1H, H13), 3.41 (s, 2H, H16), 2.76 (d, 2H, H11, H15), 2.29 (s, 3H, H7), 1.96 (t, 2H, H11, H15), 1.71 (d, 2H,H12,H14), 1.53 (m,2H,H12,H14).

**RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ:** 165.99 (C=O), 141.32 (C4), 139.23 (C4'), 132.48 (C1), 129 (C2', C3', C5', C6'),128.69 (C3, C5), 127.83 (C2, C6), 127.37 (C1'), 62.70 (C16), 52.85 (C11, C15), 47.38 (C13), 32.08 (C12, C14) 21.46 (C7).

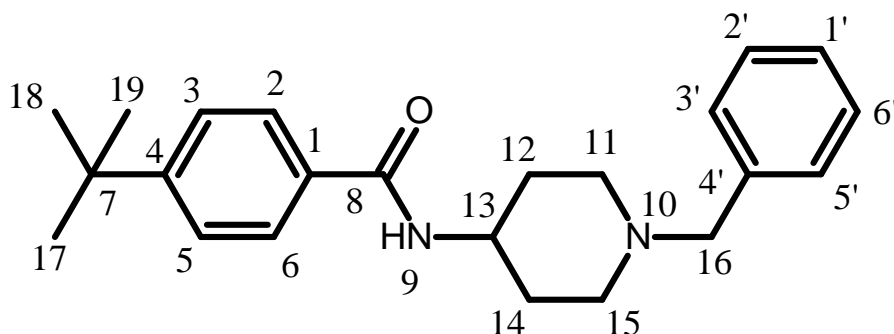
**EM (IE):** *m/z* (% int. rel.) (M<sup>+</sup>), 308.16 (2%), 91.05 (85%), 82.08 (100%).

### 11.1.2 Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-terbutilbenzamida (**FRR-2**)



En un matraz de bola de 25 mL equipado con agitación magnética, una trampa de gases y un embudo de adición de líquidos de presiones igualadas, se colocó 0.26795 ml (0.00131385 mol) de 4-amino-1-bencilpiperidina (3) y se añadió 0.101013 ml (0.00144219 mol) en adición lenta (gota a gota), se dejó en agitación con 4 mL de diclorometano seco (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se colocó en baño de hielo (0-5°C) para añadir 0.282258 mL (0.001445 mol) de cloruro de terbutilo (4), posteriormente permaneció a temperatura ambiente y se dejó en agitación durante 72 h.

Utilizando el **sistema II** se realizó una CCF, revelando la usencia de la materia prima, se rotaevaporó todo el diclorometano hasta sequedad. El compuesto se trató para llevar nuestro compuesto a un pH entre 8 y 9, se filtró y se dejó secar. Se realizaron repulpes con NaHCO<sub>3</sub> durante 30 minutos, Eter de petróleo (30 min), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1h), el compuesto se filtró y se dejó secar. Con una mezcla Metanol-Agua se cristalizó para obtener cristales blancos, con un peso final de 0.1856g, un punto de fusión de 147.3-150.4 °C y un rendimiento final del 59.25%.

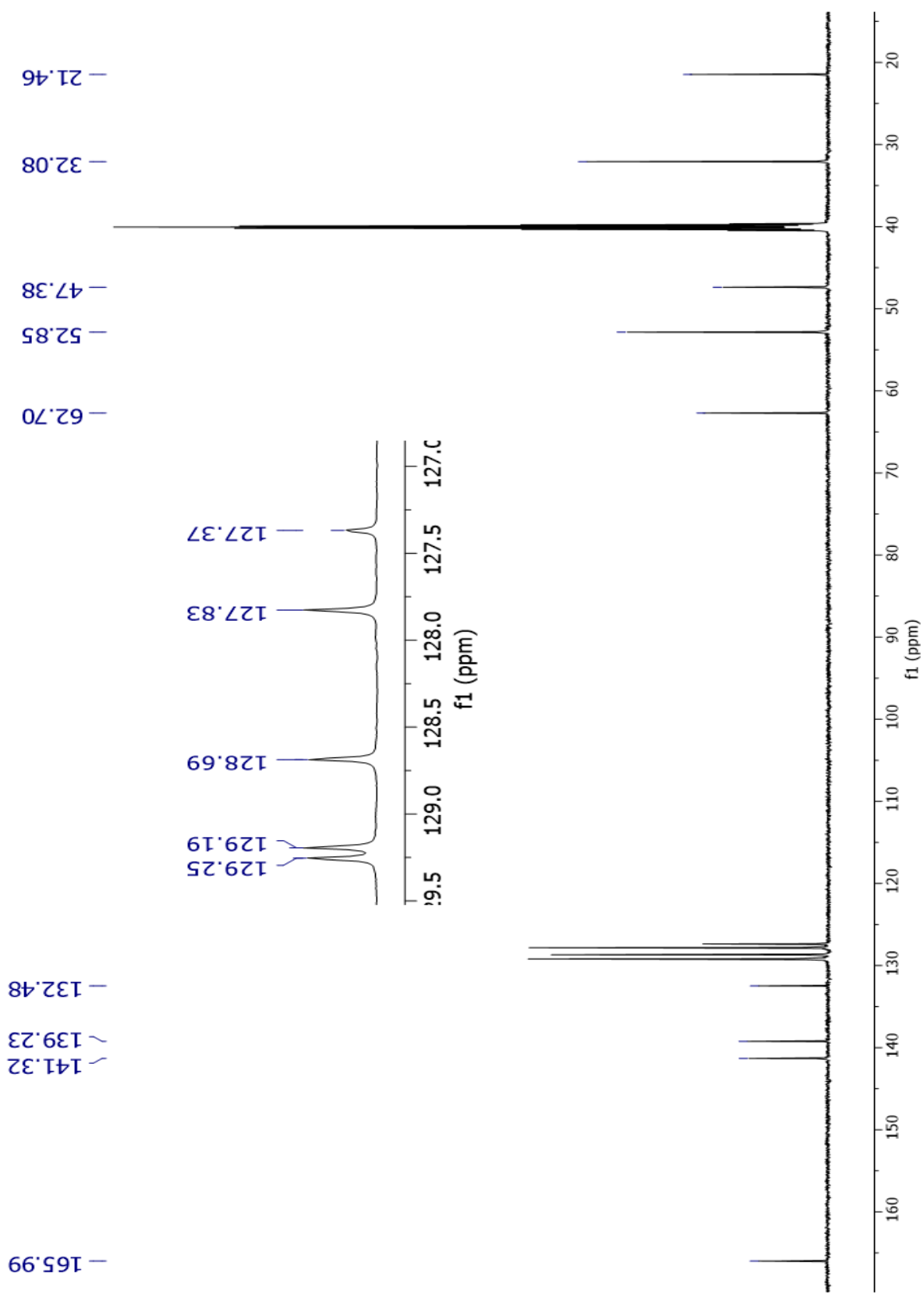


**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ:** 8.1 (d, 1H, NH), 7.77 (d, J<sub>o</sub>=8.71, 2H, C2, C6 ), 7.45 (d, J<sub>o</sub>=8.59, 2H, C3, C5), 7.3 (m, 4H, H2', H3', H5',H6'), 7.25 (m, 1H, H1'), 3.77 (m, 1H,H13), 3,46 (s,2H,H16), 2.81 (d, 2H, H11,H15), 2.0 (t,2H, H11, H15), 1.76 (d, 2H, H3, H5), 1.58 (m, 2H, H3, H5), 1.29 (s, 9H, H17,H18,H19).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ:** 166.38 (C=O), 154.53 (C4), 139.50 (C13), 132.87 (C1), 129.51 (C2', C3', C5',C6'), 128.95 (C2',C3',C5',C6'), 127.91 (C2, C6), 127.64 (C3, C5), 125.68 (C3, C5), 62.97 (C16), 53.10 (C11,C15), 47.61 (C13), 35.35 (C7), 32.35 (C12, C14), 31.76 (C17, C18, C19).

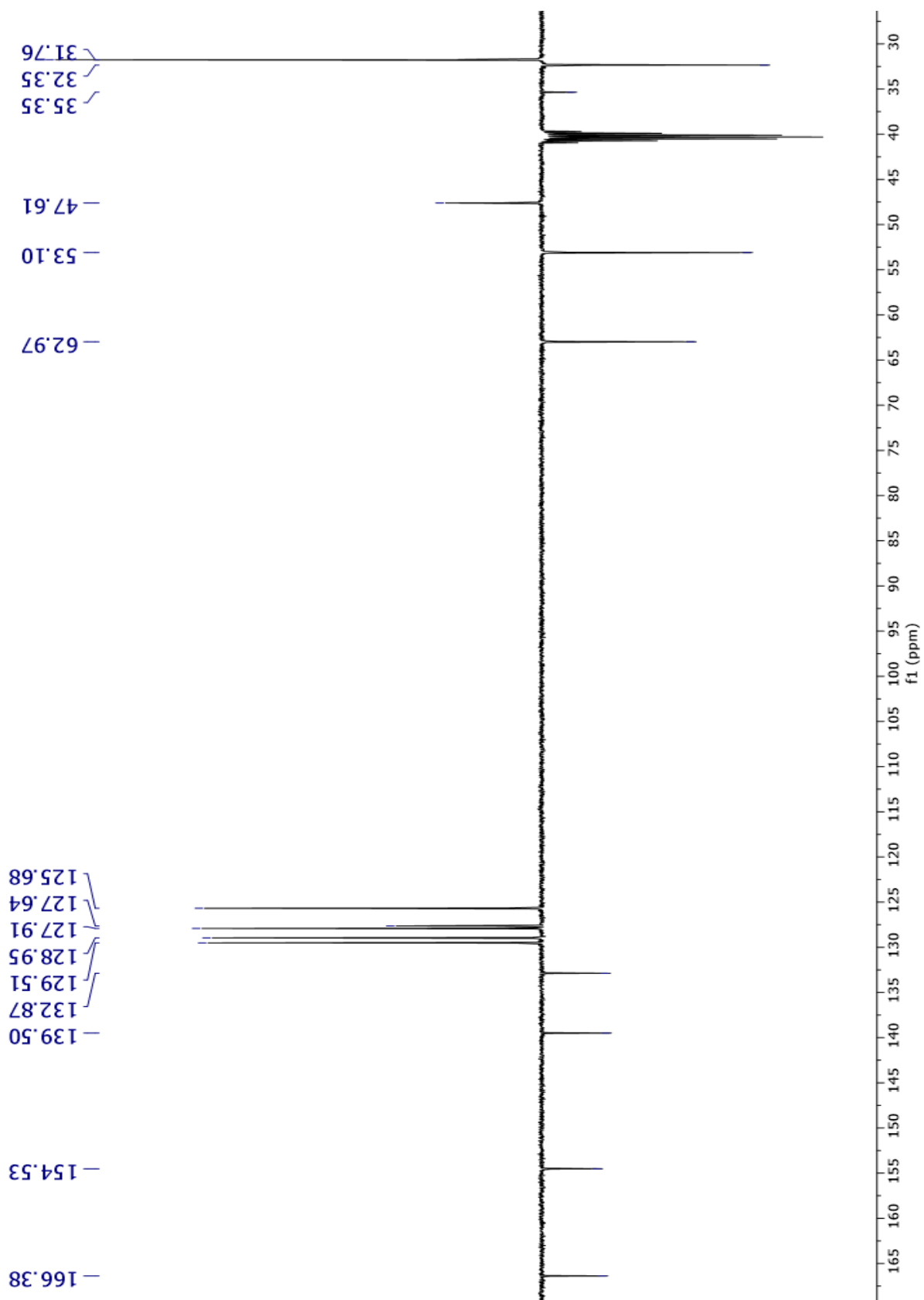
**EM (IE):** *m/z* (% int. rel.) (M<sup>+</sup>), 350.49 (1%), 91.07 (70%), 82.08 (100%).





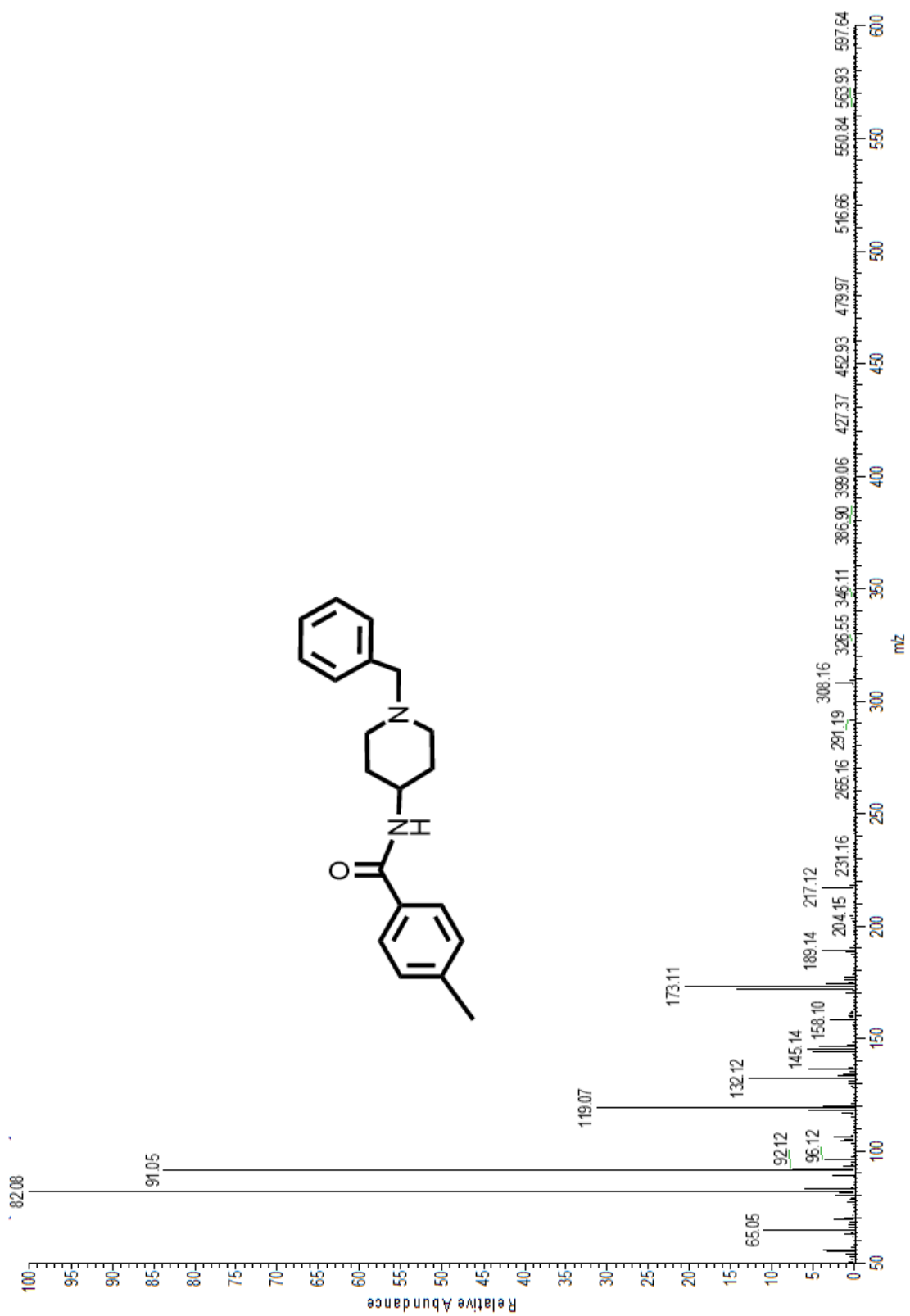
**Espectro 2.** RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **FRR-1** 150 MHz, DMSO



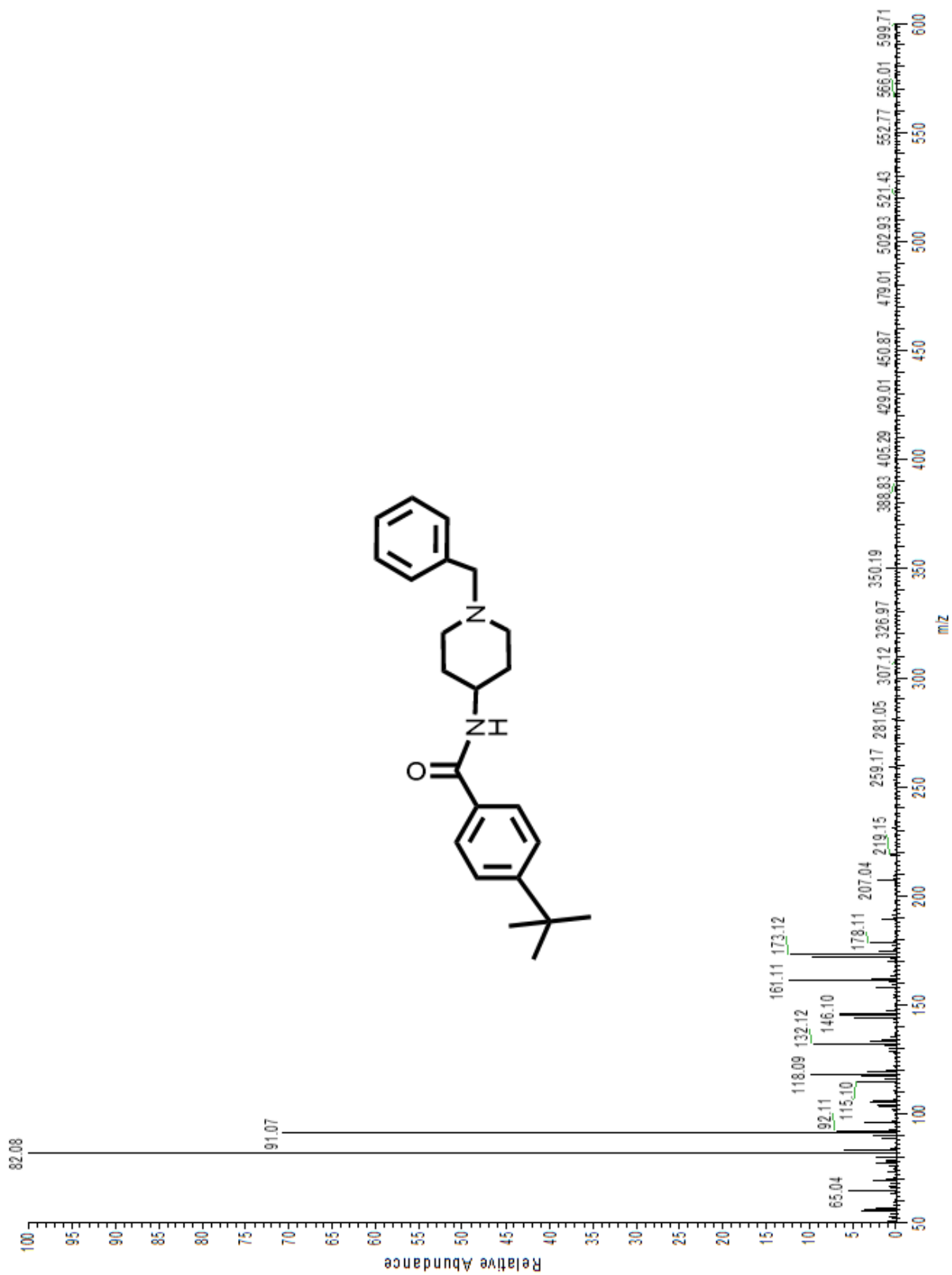


**Espectro 4.** RMN (DEPT)  $^{13}\text{C}$  del compuesto **FRR-2**, 100MHz, DMSO.





**Espectro 5. Masas (IE) compuesto FRR-1.**



**Espectro 6.** Masas (IE) compuesto FRR-2.

## 13 . REFERENCIAS Y FUENTES DE INFORMACIÓN CONSULTADAS

1. Velasco M. Dolor neuropático. *Revista Médica Clínica Las Condes*, **2019**;25(4):625-634. doi:10.1016/S0716-8640(14)70083-5
2. Vidal J. Versión actualizada de la definición de dolor de la IASP: un paso adelante o un paso atrás. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, **2020**. doi:10.20986/resed.2020.3839/2020
3. Arco Juan. *Curso Básico Sobre Dolor*. Vol 29.; **2021**.
4. Gálvez R, Pardo A, Cerón J, et al. Adaptación al castellano y validación psicométrica del cuestionario ID-Pain© para la detección de dolor neuropático. *Med Clin (Barc)*. **2018**;131(15):572-578. doi:10.1157/13128018
5. Barragán P, Cervantes C, Quiñonez G. Dolor neuropático: diagnóstico, mecanismos fisiopatológicos y tratamiento. *El Residente*. 2012;2(2011):96-104. Accessed September 11, **2023**. www.medigraphic.org.mx
6. Clemente M, Llorca G. Conceptos Generales en Dolor. *Máster del Dolor*. **2021**.
7. Covarrubias A, Guevara U, Gutiérrez C. Epidemiología del dolor crónico en México. *Revista Mexicana de Anestesiología*. Published online **2020**. www.medigraphic.org.mx
8. Ji R, Xu Z, Gao Y. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov*. **2014**;13(7):533-548. doi:10.1038/nrd4334
9. Melo L. *Síntesis y Evaluación Del Efecto Antinociceptivo de Benzamidas Pipedínicas y Morfolínicas*. Tesis de Maestría en Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, **2018**.
10. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3. doi:10.1038/nrdp. **2017**.
11. Cavalli E, Mammana S, Nicoletti F, Bramanti P, Mazzon E. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *Int J Immunopathol Pharmacol*. **2019**;33. doi:10.1177/2058738419838383

12. Weng C, Riad A, Lieberman B, et al. Characterization of Sigma-2 Receptor—Specific Binding Sites Using [3H] DTG and [125I] RHM-4. *Pharmaceuticals*. **2022**;15(12). doi:10.3390/ph15121564
13. Peng R, Jingya W, Nanxi L, Hui M. Sigma-1 Receptors in Depression: Mechanism and Therapeutic Development. *Front Pharmacol*. **2022**;13. doi:10.3389/fphar.2022.925879
14. Schmidt H, Zheng S, Gurpinar E, Koehl A, Manglik A, Kruse A. Crystal structure of the human  $\sigma_1$  receptor. *Nature*. **2016**;532(7600):527-530. doi:10.1038/nature17391
15. Melo L. *Síntesis de N-[2-(Morfolin-4-Il)Etil]-2-(Naftalen-1(2)-Iloxi)Acetamidas y Predicción de Su Afinidad Sobre El Receptor  $\sigma_1$  Mediante Anclaje Molecular Tamizado*. Tesis de Licenciatura en Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos; **2015**.
16. Smith S, Ping T. *Sigma Receptors: Their Roles in Disease and as Therapeutic*. Vol 964. Springer.; **2017**. doi:10.1007/978-3-319-50174-1
17. Kourrich S, Su T, Fujimoto M, Bonci A. The sigma-1 receptor: Roles in neuronal plasticity and disease. *Trends Neurosci*. **2012**;35(12):762-771. doi:10.1016/j.tins.2012.09.007
18. Szczepańska K, Bojarski A, Popik P, Malikowska N. Novel object recognition test as an alternative approach to assessing the pharmacological profile of sigma-1 receptor ligands. *Pharmacological Reports*. **2023**;75(5):1291-1298. doi:10.1007/s43440-023-00516-x
19. Bravo I, Perazzoli G, Yeste S, et al. Sigma-1 receptor inhibition reduces neuropathic pain induced by partial sciatic nerve transection in mice by opioid-dependent and -independent mechanisms. *Front Pharmacol*. **2019**; doi:10.3389/fphar.2019.00613
20. Wunsch B. The  $\sigma_1$  receptor antagonist S1RA is a promising candidate for the treatment of neurogenic pain. *J Med Chem*. **2012**;55(19):8209-8210. doi:10.1021/jm3011993
21. Seeman M. Philip Seeman's contributions to the story of schizophrenia. *Psychol Med*. Published online **2022**. doi:10.1017/S0033291721004803

22. Déciga M, Melo L, Navarrete G, et al. Design and synthesis of N-(benzylpiperidiny)-4-fluorobenzamide: A haloperidol analog that reduces neuropathic nociception via  $\sigma_1$  receptor antagonism. *Life Sci.* **2020**;245. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117348
23. Zhao J, Veeranan R, Baker F, et al. Defining the ligand-dependent proximate of the sigma 1 receptor. *Front Cell Dev Biol.* **2023**;11. doi:10.3389/fcell.2023.1045759
24. Cao X, Yao Z, Dou F, et al. Synthesis and Biological Evaluation of Sigma-1 ( $\sigma_1$ ) Receptor Ligands Based on Phenyl-1,2,4-oxadiazole Derivatives. *Chem Biodivers.* **2019**;16(3). doi:10.1002/cbdv.201800599
25. Glennon R. Pharmacophore Identification for Sigma-1 Receptor Binding: Application of the “Deconstruction - Reconstruction - Elaboration” Approach. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* **2005**;5(10):927-940. doi:10.2174/138955705774329519
26. Espinosa J. *N-(2-Morpholin-4-Yl-Ethyl)-2-(1naphthyloxy) Acetamide Inhibits the Chronic Constriction Injury-Generated Hyperalgesia via the Antagonism of Sigma-1 Receptors.* Tesis de Doctorado de Neurofarmacología, Instituto Politécnico Nacional; **2018**.
27. Ivanović V, Rančić M, Arsić B, Pavlović A. Lipinski’s rule of five, famous extensions and famous exceptions. *POPULAR SCIENTIFIC ARTICLE.* **2017**;3(1):171-177.
28. Pathania S, Singh P. Analyzing FDA-approved drugs for compliance of pharmacokinetic principles: should there be a critical screening parameter in drug designing protocols? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2021;17(4):351-**354**. doi:10.1080/17425255.2021.1865309
29. Molinspiration Cheminformatics. Accessed December 9, 2023. <https://www.molinspiration.com/>
30. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res.* **2019**;47(W1): W357-W3664. doi:10.1093/NAR/GKZ382

31. SwissTargetPrediction. Accessed December 11, **2023**. <http://www.swisstargetprediction.ch/>
32. Filimonov D, Lagunin A, Glorizova T, et al. PREDICTION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY SPECTRA OF ORGANIC COMPOUNDS USING THE PASS ONLINE WEB RESOURCE. *Chem Heterocycl Compd (N Y)*. **2014**;50(3). <http://www.way2drug.com/passonline>
33. Way2Drug - main. Accessed December 12, **2023**. <https://www.way2drug.com/passonline/index.php>
34. Savale S. Genotoxicity of Drugs Introduction Prediction and Evaluation. *Asian Journal of Biomaterial Research*. Published online **2018**.
35. López E, Naveja J, Medina J. DataWarrior: an evaluation of the open-source drug discovery tool. *Expert Opin Drug Discov*. **2019**;14(4):335-341. doi:10.1080/17460441.2019.1581170
36. [www.openmolecules.org](http://www.openmolecules.org). Published 2023. Accessed December 13, **2023**. <https://openmolecules.org/help/basics.html>
37. Djoumbou Y, Fiamoncini J, Gil A, Greiner R, Manach C, Wishart D. BioTransformer: A comprehensive computational tool for small molecule metabolism prediction and metabolite identification. *J Cheminform*. **2019**;11(1). doi:10.1186/s13321-018-0324-5
38. BioTransformer 3.0. Accessed December 16, **2023**. <https://biotransformer.ca/>
39. Yang H, Lou C, Sun L, et al. AdmetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics*. **2019**;35(6):1067-1069. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTY707
40. Xiong G, Wu Z, Yi J, et al. ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res*. **2021**;49(W1): W5-W14. doi:10.1093/nar/gkab255
41. admetSAR. Accessed December 17, **2023**. <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar2>
42. Ballón W, Grados R. Acomplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*. **2019**;7(2):55-72. Accessed

December

17,

**2023.**

[http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2310-02652019000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652019000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

43. Prieto F, Arciniega M, Medina J. Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. **2018**;21. doi:10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143
44. Molecular Operating Environment (MOE) | MOEsaic | PSILO. Accessed December 17, **2023**. <https://www.chemcomp.com/Products.htm>
45. García J, Navas I. *TOXICOLOGÍA EXPERIMENTAL: EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y EL RIESGO.*; **2021**.



**UANL**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Academia Mexicana de Química Orgánica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Subdirección Académica de Química Industrial

OTORGAN LA PRESENTE

# CONSTANCIA

**María Fernanda Ramírez Ranfla, Emanuel Hernández Nuñez, Gabriel Navarrete Vázquez**

Por la presentación del cartel titulado:

*“Preparación de N-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-alquilbenzamidas como ligandos virtuales del receptor  $\sigma_1$  para el tratamiento del Dolor Neuropático”*

XVIII REUNIÓN DE LA ACADEMIA MEXICANA DE QUÍMICA ORGÁNICA  
LOS DÍAS 12 Y 13 DE OCTUBRE, 2023

*Alere Flammam Veritatis*  
Academia Mexicana de Química Orgánica  
Octubre, 2023

  
Dra. Argelia Vargas Moreno  
DIRECTORA, FCC

  
Dr. Ivan Othar Kombeo Estudillo  
PRESIDENTE DE LA AMOO A.C.

  
Dr. Israel Alejandro López-Hernández  
SUBDIRECTOR ACADEMICO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

  
Dr. Eugenio Hernández Fernández  
COMITÉ ORGANIZADOR LOCAL  
LÍDER DEL CA UANL-401



  
La **excelencia**  
por principio  
la **educación**  
como instrumento



# LatinXChem

This is to certify that

**Fernanda Ramírez-Ranfla, Emanuel Hernández-Nuñez, Gabriel Navarrete-Vázquez**

participated in the #LatinXChem Twitter Conference 2023 on October 16 and 17, with the poster entitled:

***Preparación de N-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-alquilbenzamida como ligandos al receptor Sigma-1***



Gabriel Merino

On behalf of the  
#LatinXChem Organizing Committee



María A. Fernández

On behalf of the  
#LatinXChemOrg category



# LVI Congreso Nacional, X Internacional y IV Virtual de Ciencias Farmacéuticas

06 al 08 de  
noviembre 2023  
Centro de Convenciones Puebla

La Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.

otorga la presente

## CONSTANCIA

a **María Fernanda Ramírez Ranfla, Emanuel Hernández-Nuñez, Gabriel Navarrete-Vázquez**

Por la presentación de su trabajo titulado:

**“Preparación de N-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-alkilbenzamidas como ligandos virtuales del receptor  $\sigma 1$  para el tratamiento del dolor neuropático”**

en el marco del LVI Congreso Nacional, X Internacional y IV Congreso Virtual de Ciencias Farmacéuticas  
Puebla Pue., del 6 al 8 de noviembre, 2023

**Dra. Angélica Meneses Acosta**  
Presidente de la AFM

**Dr. Cairo David Toledano Jaimes**  
Director de Ciencia y Tecnología, AFM

Las ciencias farmacéuticas fortaleciendo el sistema de salud



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Licenciatura

Cuernavaca, Morelos, 01 de marzo de 2024  
FF/D/SD/JLF/041/2024  
Asunto: VOTOS APROBATORIOS

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE  
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES  
UAEM**

P R E S E N T E

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo **“PREPARACIÓN DE N-(1- BENCILPIPERIDIN-4-IL)-4-ALQUILBENZAMIDAS COMO LIGANDOS VIRTUALES DEL RECEPTOR SIGMA-1”** presentado por la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. María Fernanda Ramírez Ranfla (10024569)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**Jurado**

Dr. Germán Bernal Fernández

Dra. Blanca Estela Duque Montaña

Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

*Firma electrónica*

M. en C. Martha Hernández Labra

Dra. Yoshajandith Aguirre Vidal



Atentamente  
***Por una humanidad culta***

**M.P.D. REYNA AMERICA SERRANO LÓPEZ  
SECRETARIA DE DOCENCIA**

C.i.p. – Archivo digital  
FSLs/bedm



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio 61,  
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3698 / licenciatura\_ff@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2024-03-01 12:33:32 | Firmante

EBv0lcjKjLqtroWfYdoznu+ed01AX0k/dWuIDVyl/o7Hmp5dkOLD6VnBimV0QwPVSdydB5ktWp0RNMLe8fQHJ6KeN6FD9Ro04swEbZEMao0yolw2ESeflRiiDs7ytXHIgnqPRV2AloA3BVxdguhdJj/9XziB6MqQOtVDFXc586cTE7g9kD6TTxE+wQlr0I2/Omx5P49+iEN9COcx+N5vj3fVON3Z9NqeX727dzJn/UpHkFlycEVe0CqM5p+N/oljkGleUpbuwsd4rJab7+3Tv0wr6HS6+T9aJvK6p6dEe744L5tAGgsfXS74j0Glyq49jaAIemTbSVO7XbFsh2nw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



16nQfskiT

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/UUNynS8AtlcNufS5vGyHGURyJy0aoP6a>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2024-04-10 17:16:38 | FIRMANTE**

LABMk19CUHfi0BrmmqvfiS5mmiB+r8IXz57EncbenbVdFOZXYs1h7WUkkjIEPfmptcpfrtlSHXWlnWhsIM4pRZhw4KhsYL4pBWwNht6yIF59wbXJ/dfsV8ASNww/fKgegQHakOne gKIvo8Bj79Vw9Z4WKhIAS444IEGTnl9y9afdVRckhVtQPtdKzxCr8Nal70cb1c/SXi3Kqyvl4JGxBCBj3XO+POE3rK+hoSITfjLkwmhwGIJFZeQ9Z/M8xCg00Ftl/Vy/ha6qVrGyorrVe Qua69vbwUQRFORQvWwH0dJLIAA14uh1ewEWle9DwShUT5eORIX74o3hRFC4Q==

**JESSICA NAYELLI SANCHEZ CARRANZA | Fecha:2024-04-10 19:16:23 | FIRMANTE**

JCF34mmK4nxdY6e5ppjSCmFgxKrHXnXxGye/vrQJTa4/1eDxYZ2xoVZvl6veCWcivnF3pTtjdp8FpxF9I5MivxPv7SXWmHBCxWtiSb7dgMyLaI3j6ciNSp9pXQ4TeNOVwSkCzco0 Ssm61vUeV1flnFGhcDjTVCGHfhEawsCP8jXYkd7Syjc9Y56t+o97wPuPX36rBRcIlPgaiCc3GYpD9XeARkK6ZHHmckMCEsMEK0VGK7FQ1dmOiiPCZmCu4DPX8mXOGf+FO wzQVQ7Q2aNRPRTRhGCF7IrkbugdQ5x247d4fpwPCHaC7QoJD+Wn0vWGmitq97NhhjRuV4ofQQ==

**BLANCA ESTELA DUQUE MONTAÑO | Fecha:2024-04-10 19:18:14 | FIRMANTE**

OsmB/5fwGo66kr7iOQI9tdymllMKAMcnc2K55U6sRHYMYSD/I7Vnt7+62PR4bNeBkN8Vgir1SwctFFuYxPgU/tbbyr4RTfh2M/7LzWzK9kSVvhd2QaGSufrJHMLfi2dL6biDO4PNhzpn Xk8lltD1goqSd3hSiUQoHd5AfeSAKfdK3CHCo5VfSHdeXEPgPcDjDlkmfO1LBywrJRFvG4B2JpdYOBXZkg6LVf274CKyt78Qs9R23ZpNQBol1TTTkhUlqbSSwcjo6VQbVtPg2fY 3BY5mLAu8gclT0OC6BfaCERwp6NkTaCLBrihJEL/c3q3oJXQOfjEMShM7FWVZw==

**YOSHAJANDITH AGUIRRE VIDAL | Fecha:2024-04-11 10:32:27 | FIRMANTE**

F+pEbWcVlxjGZ2Ee5/Xn6rZiHOuRiXD4uW2TT3ssJezAiC5BM4y3943I+iWp+Ep4EiKHyyf3ppUvvOnP0PrjK5HsbYwcRQH/4Ms4WZ7aELschPCogsTTKp1N1d7nrLkeSBqwhoY o3PUQ2afio1rERQ8PFtoRTgC3Y9LTUplqtFy+xBhuRNLTV3MJ5JmD6K95LkY1FM1y7znJniiFvx9+Irc6iG+NGcHTWpueqX5LwxmCHOcU/WwOHlkoFd0m3C6kACbaRzhGG/f6f w5OnUL5njwlq4y4//I4Pp8mGLGxzn/7dGCXBiX9SrDd6aTND6x1kSg4BrerzmwnwklncQ==

**MARTHA HERNANDEZ LABRA | Fecha:2024-04-11 12:45:05 | FIRMANTE**

Xh+ij2GXFcS1rn2bad3k8eeOYO8bh7jcfwOLPR+MqCmBGXr1523T/avlqPFP8nCcWGLY9cNEejiEGL3WWE6BZc4iDwEgllfslj9F7gBowrZheuO+/Kwmc4fGgaebaofroxg/disT07 2kJfgfbV9xMfkzUOpzSi3AibvyR9mj6DEKQZCe/2/mJerGL+jKU/IW3g71jMcRcluTb+liDxOB0SW2XovHBq7XIfUelPWQ6ha6DM7dNonAykULoaPpWSvPJB/KW26mcGIGMEKPB S0hoO1bRvTmqzYA5715nfkHYDSJtYfMK0oc+HMmqNR0MrWvSxuuEYVGzNOPVE2CQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**cfZ0OudRI**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/MgMrpnN29KldOVbRsFRXGUuYpcq1PtIL>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029