UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

“Diseño, síntesis y bioevaluación de *N*-acil-4-aminobencilpiperidinas como ligandos del receptor sigma-1”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN FARMACIA

PRESENTA:
WENDY YASMIN ARRATIA DAMIAN

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN GABRIEL NAVARRETE VÁZQUEZ

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

CUERNAVACA MORELOS
MAYO 2025

AGRADECIMIENTOS

A CONAHCYT por otorgarme la beca (CVU/Becario **1251178**) para la realización de este proyecto, así como el apoyo otorgado para el proyecto de investigación: financiamiento del Proyecto Ciencia de Frontera **CF-2023-I-822**.

Al Dr. Emanuel Hernández Núñez del Departamento de Posgrado e investigación, Instituto Tecnológico Superior de Calkiní, al cDr. Josué Martínez Miranda de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y al doctor David Morales Morales del Instituto de Química de la UNAM por la colaboración en la obtención de los espectros de los análisis espectroscópicos y espectrométricos.

Al Dr. Héctor Torres Gómez y al Profr Dr. Bernard Wünsch del departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Münster Alemania por su colaboración en los ensayos *in vitro*.

A la Dra. Myrna Déciga Campos, a la M.C. Diana Karen Morales Galindo de la Escuela Superior de Medicina y al Dr. Vinicio Granados Soto del Departamento de Farmacología del Cinvestav sede-Sur del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por la colaboración en los ensayos *in vivo*.

Al comité revisor de tesis: Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, Dra. Judith González Christen, Dra. Myrna Déciga Campos, Dra. Yoshajandith Aguirre Vidal, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez por sus observaciones y aportaciones, pero sobre todo por el valioso tiempo que emplearon para la revisión de este proyecto. Agradecimiento especial:

Al Dr. Gabriel Navarrete Vázquez por aceptarme nuevamente en su equipo de trabajo, por orientarme tanto en la vida académica como en la personal. Por su paciencia, sus observaciones, pero sobre todo por sus regaños y valiosos consejos.

DEDICATORIAS

A mi madre Liboria Damian, sé que estarías orgullosa de tu chaparrita. A mi padre, Juan Arratia Gracias por siempre creer en mí, los amo mucho. ♥

A mis Hermanos Mayo y Ale por apoyarme en todo; a mis sobrinas Caro y Blan, gracias por ser como unas hermanas para mí, por aconsejarme y por cuidarme, las quiero; a mis sobrinos Cris y Ale, gracias por alegrar mis visitas, son tremendos. Los quiero demasiado.

A mis compañeros y amigos del L-5: Gracias a ustedes pasé una maestría muy divertida Georgy, Alda, Dani, Normis, Sam, Ahilyn, Diego, Abraham, Conde Luis, Garita, Adriel y Oscar los quiero. Pero sobre todo agradecer a Abraham, Conde y a la Dra. Blanca por sus enseñanzas y su paciencia.

Al Dr. Yordin Ocampo por su apoyo incondicional, por sus consejos y motivación, eres un gran amigo.

Por último, al doctor Gabriel, quien es un excelente tutor y maestro. Gracias por todas sus enseñanzas en todos los ámbitos. Sabe que lo quiero mucho Doc.

ABREVIATURAS

ACOFA	Análisis de consenso farmacológico
ATP	Adenosín trifosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ATC	Antidepresivos tricíclicos
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BIP	Proteína de unión a inmunoglobulina
CaMK	Ca^{2+}/proteína quinasa dependiente de calmodulina
CGRP	Péptido relacionado a genes de calcitonina
CYP450	Citocromo P 450
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DL_{50}	Dosis letal media
DMF	Dimetilformamida
DMSO-δ	Dimetilsulfóxido deuterado
DN	Dolor neuropático
EM	Espectrometría de masas
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
hERG	Gen Humano relacionado con el movimiento a-go-go provocado por éter
HINT1	Proteína de unión a nucleótido codificada por el gen HINT1
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratecal
IASP	International Association for the Study of Pain
IE	Impacto electrónico
IGF	Intercambio de grupo funcional
IP3	Inositol trifosfato
^1J	Constante de acoplamiento a un enlace de distancia de Flúor
^2J	Constante de acoplamiento a dos enlaces de distancia de Flúor
^3J	Constante de acoplamiento a tres enlaces de distancia de Flúor
^4J	Constante de acoplamiento a tres enlaces de distancia de Flúor
J_m	Constante de acoplamiento posición meta
JNK	Cinasa *N*-terminal JUN
J_o	Constante de acoplamiento posición orto
KCC2	Cotransportador K-Cl tipo 2
kDa	Kilo Dalton

K_i	Constante de afinidad
LNE	Ligadura de Nervios Espinales
m	Multiplete
MAM	Membrana del retículo endoplásmico asociada a mitocondria
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
MHz	Mega Hertz
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NMDA	Receptores *N*-metil-*D*-aspartato
OECD	Organización para Cooperación y el Desarrollo Económico
PAINS	Pan-assay interference compounds
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Desviación de la raíz cuadrada media de las poblaciones atómicas
s	Singulete
S1RA	4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oxi]etil]morfolina (Antagonista del receptor sigma-1)
SAR	Relación estructura-actividad
SNARE	Factor sensible a la N-etilmaleimida
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SP	Sustancia P
t	Triplete
TGI	Tracto gastrointestinal
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPSA	Área polar superficial topológica
TRP	Receptores de potencial transitorio
TRPV	Receptor de Potencial Transitorio Vainilloide
σ_1R	Receptor sigma-1
σ_2R	Receptor sigma-2
VGCC	Canales de calcio dependientes de voltaje

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS ..... *II*
DEDICATORIAS ..... *III*
ABREVIATURAS ..... *IV*
CONTENIDO ..... *VI*
ÍNDICE DE FIGURAS ..... *X*
ÍNDICE DE TABLAS ..... *XIV*
ÍNDICE DE ESPECTROS ..... *XV*
RESUMEN ..... *XVI*
ABSTRACT ..... *XVII*
ÍNDICE DE COMPUESTOS FINALES ..... *XVIII*
1. INTRODUCCIÓN *19*
1. ANTECEDENTES *20*
1.1. Definición del dolor **20**
1.2. Tipos de dolor **20**
1.3. Nocicepción **21**
1.3.1. Mecanismos de nocicepción **21**
1.3.2. Nociceptores **22**
1.4. Dolor neuropático **24**
1.5. Epidemiología **24**
1.6. Mecanismos del dolor neuropático **25**
1.6.1. Sensibilización periférica **25**
1.6.2. Descargas ectópicas **26**
1.6.3. Sensibilización central **26**
1.6.4. Desinhibición gabaérgica **27**
1.7. Tratamiento del dolor neuropático **28**
1.7.1. Tratamiento de primera línea **30**
1.7.1.1. Gabapentinoides **30**
1.7.1.2. Antidepresivos tricíclicos (ATC) **30**
1.7.1.3. Inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRSN) **31**
1.7.2. Tratamiento de segunda línea **31**
1.7.2.1. Opioides **31**
1.7.2.2. Anestésicos locales **32**

1.7.3. Tratamiento de tercera línea 32
1.7.3.1. Opioides fuertes 32
1.7.3.2. Neurotoxinas 33
1.8. Receptores σ 34
1.9. Receptor σ_1 (σ_1R) 34
1.10. Ligandos del σ_1R 36
1.11. Antagonismo del receptor σ_1 39
1.11.1. Haloperidol 40
1.11.2. AAO-1 41
1.11.3. LMH-2 42
2. JUSTIFICACIÓN 45
3. HIPÓTESIS 45
4.1. Objetivo general: 46
4.2. Objetivos particulares: 46
5. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO MOLECULAR 47
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL 49
6.1. Parte *in silico* 50
6.1.1. Predicción de las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción: admet-SAR, SwissADME, ADMETlab 3.0 y ADMET-AI 50
Predicción de las propiedades toxicológicas 51
6.1.2. Predicción del perfil farmacodinámico 51
6.1.3. Acoplamiento molecular dirigido 52
6.1.4. Modelado por homología 52
6.2. Parte química 53
6.2.1. Retrosíntesis 53
6.2.1.1. Retrosíntesis de los compuestos de tipo benzamida 53
6.2.1.2. Retrosíntesis de los compuestos de tipo urea 53
6.2.2. Síntesis química 54
6.2.2.1. Metodología para la síntesis de los compuestos *N*-(1-bencilpepiridin-4-il)benzamidas (WAD 1-3) 54
6.2.2.2. Metodología para la síntesis de los compuestos de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N´*-arilureas (WAD 4-9). 55
6.3. Evaluación *in vitro*: Radioinmunoensayo (binding sobre σ_1R) 56
6.3.1. Preparación de la membrana de cerebro de cuyo 56

6.3.2. Preparación de la membrana de hígado de rata 56
6.3.3. Ensayo de unión general 56
6.3.4. Ensayo de unión σ_1R 57
1.1.1. Ensayo de unión σ_2R 57
1.2. Evaluación *in vivo* 58
1.2.1. Animales 58
1.2.2. Modelo de ligaduras espinales (LNE) 58
1.2.3. Evaluación de alodinia mecánica 59
1.2.4. Análisis estadístico 60
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 61
2.1. Parte *in silico* 61
2.1.1. Propiedades biofarmacéuticas 61
2.1.2. Propiedades farmacocinéticas 63
2.1.3. Propiedades toxicológicas 67
2.1.4. Propiedades farmacodinámicas 69
2.1.5. Acoplamiento molecular *a priori*. 70
2.1.5.1. Acoplamiento molecular dirigido de los compuestos sobre σ_1R 70
2.1.6. Análisis de consenso farmacológico (ACOFA) para la selección de un líder computacional seguro (Safe Lead) 73
2.2. Parte química 75
2.2.1. Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-clorobenzamida (WAD-1) 76
2.2.2. Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-3,4-diclorobenzamida (WAD-2) 79
2.2.3. Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-carbonitrilbenzamida (WAD-3) 83
2.2.4. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-(trifluorometil)fenil]urea (WAD-4) 84
2.2.5. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-clorofenil]urea (WAD-5) 85
2.2.6. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-fluorofenil]urea (WAD-6) 87
2.2.7. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-cloro-3-trifluorometilfenil]urea (WAD-7) 88
2.2.8. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-fenilurea (WAD-8) 90
2.2.9. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-fenilurea (WAD-9) 91
2.3. Parte farmacológica 93
2.3.1. Ensayos *in vitro* 93
2.3.2. Ensayos *in vivo* 94

2.3.2.1. Validación del método de LNE 94
3.1.1.1. Determinación de la concentración del compuesto PRE-084 para obtener un efecto alodínico 95
3.1.1.2. Determinación del efecto antialodínico del compuesto WAD-2 96
3.1.1.3. Determinación del efecto antialodínico del compuesto WAD-2 97
3.1.2. Acoplamiento molecular *a posteriori* 99
3.1.2.1. Modelado por homología del σ_2R 100
3.1.2.1.1. Validación del modelado 101
3.1.2.2. Acoplamiento molecular dirigido de los compuestos sobre σ_2R 103
3.1.2.3. Acoplamiento molecular dirigido de los compuestos sobre el receptor D_2 de dopamina 105
3.1.2.4. Acoplamiento molecular dirigido de los compuestos sobre el canal hERG 109
3.1.3. *Lead* optimization 111
4. CONCLUSIONES 114
5. PERSPECTIVAS 115
6. PARTE EXPERIMENTAL 116
6.1. Reactivos 116
6.2. Instrumentación requerida para la síntesis de los compuestos 116
6.2.1. Síntesis convencional 116
6.2.2. Síntesis asistida con microondas 116
6.2.3. Cromatografía 117
7. BIBLIOGRAFÍA 152

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación del dolor de acuerdo con su función.[3] 20
Figura 2.Mecanismo de nocicepción. Modificado de *Pathophisiology of Pain*. [8] 22
Figura 3. Canales presentes en los nociceptores tipo C. Modificado de Benarroch et al. [12] 23
Figura 4. Características del dolor neuropático.[14] 24
Figura 5. Mecanismo de neurotransmisión química en una fibra nociceptiva.[13] Imagen realizada en Biorender.com 25
Figura 6. Descargas ectópicas y generación de potenciales aberrantes.[7] 26
Figura 7. Sensibilización central.[20] Imagen realizada en Biorender.com 27
Figura 8. Desinhibición gabaérgica.[23] Imagen realizada en Biorender.com 28
Figura 9. Estructura química de los gabapentinoides. 30
Figura 10. Estructura química de la Amitriptilina 31
Figura 11. Estructura química de duloxetina y venlafaxina (IRSN) 31
Figura 12. Estructura química de tramadol y tapentadol. 32
Figura 13. Estructura química de lidocaína y capsaicina, anestésicos locales. 32
Figura 14. Estructura química de morfina y oxicodona. 33
Figura 15. Estructura tridimensional de la toxina botulínica.[41] 33
Figura 16. Funciones e interacciones de σ_1R en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas.[45] Imagen realizada en Biorender.com 35
Figura 17. Mecanismo de modulación de NMDA al unirse con σ_1R activado.[19] Imagen realizada en Biorender.com 35
Figura 18. Mecanismo de modulación de MOR al unirse con el σ_1R activado.[19] Imagen realizada en Biorender.com 36
Figura 19. Ligandos endógenos de σ_1R 37
Figura 20. Diagrama 3D de interacciones entre ligandos endógenos y σ_1R. A), Progesterona unida a σ_1R [51]; B) Esfingosina unida a σ_1R. [52] 37
Figura 21. Patrón farmacofórico de los ligandos de σ_1R propuesto por Glennon y ligandos representativos.[55] 38
Figura 22. Interacciones entre el antagonista PD144418 (color naranja), y la agonista pentazocina (color verde) y σ_1R. [45] 39
Figura 23 Mecanismo de acción de los antagonistas del receptor σ_1. Editado de Smith y colaboradores. [60] 40
Figura 24. A) Estructura química del haloperidol, B) Interacción de haloperidol con σ_1R.[55] 40
Figura 25. Ensayos in vivo del fármaco haloperidol en un modelo de dolor neuropático.[61] 41
Figura 26. Evaluación *in vivo* del efecto antinociceptivo de **AAO-1**.[64] 42
Figura 27. Interacciones entre el compuesto **LMH-2** y σ_1R.[54] 42
Figura 28. Evaluación in vivo del compuesto **LMH-2.**[54] 43
Figura 29. Efecto antialodínico y antihiperalgésico del compuesto **LMH-2**, haloperidol y gabapentina. [66.] 43

Figura 30. Efectos extrapiramidales asociados a la administración de **LMH-2**, gabapentina y haloperidol. Modificado de Deciga-Campos y colaboradores. [66] 44
Figura 31. Patrón farmacofórico de los ligandos de σ_1R propuesto por Glennon.[53] 47
Figura 32. A) Propuestas de modelos farmacofóricos para los ligandos de σ_1R. B) Sobreposicionamiento de los compuestos **WAD 1-9**. 47
Figura 33. Consideraciones para el diseño de los compuestos **WAD 1-9.** 48
Figura 34. Programas usados para predecir las propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas. 50
Figura 35. Programas usados para la predicción de propiedades toxicológicas. 51
Figura 36. Herramientas usadas para la predicción de propiedades farmacodinámicas. 51
Figura 37. Herramientas usadas para acoplamiento molecular y visualización. 52
Figura 38. Evaluación in vitro de la afinidad del compuesto **WAD-2** con σ_1R y σ_2R. Imagen realizada en Biorender.com 57
Figura 39. Evaluación in vivo de alodinia mecánica del compuesto **WAD-2**. Imagen realizada en Biorender.com 59
Figura 40. Estructura general de la gráfica de resultados..... 60
Figura 41. Predicción del metabolismo de los compuestos **WAD 1-9.**..... 65
Figura 42. Interacciones entre el compuesto **4-IBP** con el receptor σ_1. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D 71
Figura 43. Interacciones entre el compuesto **WAD-7** y σ_1R. A) Visualización 2D, B) Visualización 3D. 72
Figura 44. Espectro de ^{1}H del compuesto **WAD-1**..... 78
Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-1**. 78
Figura 46.Espectro de masas IE del compuesto **WAD-1**..... 79
Figura 47. Espectro de ^{1}H del compuesto **WAD-2**..... 81
Figura 48. Espectro de ^{13}C del compuesto **WAD-2**. 82
Figura 49. Espectro de masas IE del compuesto **WAD-2**..... 82
Figura 50. Validación LNE.A) Curso temporal del 50% del umbral de retiro de ratas con LNE, respecto a ratas Sham y Naive. B) ABC del curso temporal..... 94
Figura 51. Efecto alodínico de **PRE-084.** A). Curso temporal del 50% del umbral de retiro de **PRE-084** B) Área bajo la curva (ABC) del curso temporal..... 95
Figura 52. Efecto antialodínico de **WAD-2** en un modelo de LNE. A) Curso temporal del 50% del umbral de retiro de WAD-5. B) ABC del curso temporal A..... 97
Figura 53. Determinación del efecto de **WAD-2** en presencia de **PRE-084** en ratas con LNE. Curso temporal del 50% del umbral de retiro de **WAD-2** (30 µg i.t.), **WAD-2** (30 µg i.t.) administrado individualmente o en presencia de **PRE-084**. B) ABC del curso temporal A. 98
Figura 54. Interacciones del compuesto **WAD-2** con σ_1R. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D 99
Figura 55. PLIF **4-IBP** vs **WAD-2**. A) Interacciones 2D entre **4-IBPI** y σ_1R; B) Interacciones 2D entre **WAD-2** y σ_1R; C) Diagrama PLIF de **4-IBP** y **WAD-2** con σ_1R... 100
Figura 56. Sobreposicionamiento estructura molde vs modelo obtenido por homología.101
Figura 57. QMEAN obtenido para la estructura obtenida mediante modelado por homología. 102

Figura 58. Diagrama de Ramachandran. 103
Figura 59. Interacciones entre el compuesto **PB28** con el σ_2R. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D 104
Figura 60. Interacciones entre el compuesto **WAD-5** con el σ_2R. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D. 105
Figura 61. Interacciones del fármaco **haloperidol** con el receptor D_2 de dopamina. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D..... 106
Figura 62. Interacciones del compuesto **WAD-5** con el receptor D_2 de dopamina. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D..... 107
Figura 63. A) Haloperidol y **WAD-5** con el receptor D2; B) **WAD-5** con el receptor D_2. . 108
Figura 64. PLIF Haloperidol vs **WAD-5**. A) Interacciones 2D entre haloperidol y el receptor D_2 de dopamina; B) Interacciones 2D entre **WAD-5** y el receptor D_2 de dopamina; C) Diagrama PLIF de haloperidol y **WAD**-5 con el receptor D_2 de dopamina..... 108
Figura 65. Interacciones del compuesto **Astemizol** con el canal hERG. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D. 110
Figura 66. Interacciones del compuesto **WAD-2** con el canal hERG. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D..... 110
Figura 67. PLIF astemizol vs **WAD-2**. A) Interacciones 2D entre astemizol y el canal hERG; B) Interacciones 2D entre **WAD-2** y el canal hERG; C) Diagrama PLIF de astemizol y **WAD-2** con el canal hERG..... 111
Figura 68. Hibridación de los compuestos **LMH-2** y **AAO-1** para la obtención del compuesto **WAD-2**..... 112
Figura 69. Lead optimization 113

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Retrosíntesis de los compuestos **WAD 1-3**. 53
Diagrama 2. Retrosíntesis de los compuestos **WAD 4-9**. 54
Diagrama 3. Síntesis de los compuestos **WAD 1-3**. 54
Diagrama 4. Síntesis de los compuestos **WAD 4-9**. 55
Diagrama 5. Síntesis del compuesto **WAD-1**. 76
Diagrama 6. Síntesis del compuesto **WAD-2**. 79
Diagrama 7. Síntesis del compuesto **WAD-3**. 83
Diagrama 8. Síntesis del compuesto **WAD-4**. 84
Diagrama 9. Síntesis del compuesto **WAD-5**. 86
Diagrama 10.Síntesis del compuesto **WAD-6** 87
Diagrama 11. Síntesis del compuesto **WAD-7**. 88
Diagrama 12. Síntesis del compuesto **WAD-8**. 90
Diagrama 13. Síntesis del compuesto **WAD-9**. 91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos empleados para el tratamiento de dolor neuropático. [26,27] 29
Tabla 2. Predicción de las propiedades biofarmacéuticas de los compuestos **WAD 1-9.** 61
Tabla 3. Predicción de las propiedades farmacocinéticas de los compuestos **WAD 1-9.**. 63
Tabla 4. Probabilidad de inhibición de CYP 450 por los compuestos **WAD 1-9.** 66
Tabla 5. Predicción de las propiedades toxicológicas de los compuestos **WAD 1-9.** 67
Tabla 6. Predicción de la dosis letal media de los compuestos **WAD 1-9**. 69
Tabla 7. Resultados de la predicción de la afinidad de los compuestos **WAD 1-9 con σ_1R**. 70
Tabla 8. Validación del acoplamiento molecular dirigido sobre el receptor σ_1. 71
Tabla 9. Acoplamiento molecular refinado de los compuestos **WAD 1-9** con el receptor σ_1. 72
Tabla 10. Análisis de consenso farmacológico de los compuestos **WAD 1-12.** 74
Tabla 11. Síntesis de los compuestos **WAD 1-12**. 75
Tabla 12. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-1**. 76
Tabla 13. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y 13C del compuesto **WAD-2**..... 80
Tabla 14. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-3**. 83
Tabla 15. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-4**. 84
Tabla 16. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-5**. 86
Tabla 17. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-6**. 87
Tabla 18. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-7**. 89
Tabla 19. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-8**. 90
Tabla 20. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-9**. 91
Tabla 21. Evaluación in vitro del compuesto **WAD-2**. 93
Tabla 22. Resultados cuantitativos del diagrama de Ramachandran..... 103
Tabla 23. Validación del acoplamiento molecular dirigido sobre σ_2R. 104
Tabla 24. Validación del acoplamiento molecular dirigido sobre el receptor D_2 de dopamina. 106
Tabla 25. Validación del acoplamiento molecular con el canal hERG..... 109
Tabla 26. Costo de materias primas utilizadas. 116
Tabla 27. Fases móviles utilizadas para la elución de las placas CCF. 117

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1.Espectro de RMN ^{1}H del compuesto **WAD-1**. 127
Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **WAD-1**. 128
Espectro 3. Espectro de masas (IE) del compuesto **WAD-1**. 129
Espectro 4. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-2**. 130
Espectro 5. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-2**. 131
Espectro 6. Espectro de masas (IE) del compuesto **WAD-2**. 132
Espectro 7. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-3**. 133
Espectro 8. Espectro de RMN de 13C del compuesto **WAD-3**..... 134
Espectro 9. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-4**. 135
Espectro 10. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-4**. 136
Espectro 11. Espectro de masas (IE) del compuesto **WAD-4**. 137
Espectro 12. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-5**. 138
Espectro 13. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-5.** 139
Espectro 14. Espectro de masas (IE) del compuesto **WAD-5** 140
Espectro 15. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-6**. 141
Espectro 16. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-6**. 142
Espectro 17. Espectro de masas (IE) del compuesto **WAD-6**. 143
Espectro 18. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-7**. 144
Espectro 19. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-7**. 145
Espectro 20. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-8**. 146
Espectro 21. Espectro de RMN de 13C del compuesto **WAD-8**..... 147
Espectro 22. Espectro de MASAS (IE) del compuesto **WAD-8** 148
Espectro 23. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-9.** 149
Espectro 24. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-9**. 150
Espectro 25.Espectro de MASAS (IE) del compuesto **WAD-9**. 151

RESUMEN

El dolor neuropático es una enfermedad que afecta al 30% de la población mundial disminuyendo su calidad de vida. El tratamiento de esta enfermedad no puede abordarse con analgésicos comunes, por lo tanto, se emplean medicamentos que incluyen antidepresivos, anestésicos, y/o el uso de opioides que no son completamente eficaces y presentan riesgo de efectos adversos severos. Por lo tanto, es necesario investigar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad. El receptor σ_1 se ha considerado una diana de interés ya que se ha evidenciado que su modulación con antagonistas en ensayos *in vivo* disminuye la alodinia y la hiperalgesia. Se han reportado diversos antagonistas sintéticos de este receptor, uno de ellos es el compuesto **S1RA** que se encuentra en ensayos clínicos de fase IIa para el tratamiento del dolor neuropático. Otro compuesto que ha mostrado una afinidad en valores nanomolares con el receptor σ_1, así como efecto antialodínico y antihiperalgésico en modelos de rata con dolor neuropático, es el compuesto **LMH-2.**

Por lo tanto, en este proyecto se llevó a cabo el diseño, la síntesis de compuestos análogos del compuesto **LMH-2.** El estudio *in silico* de los compuestos diseñados se realizó utilizando herramientas quimioinformáticas con el fin de realizar un consenso de los datos recabados y priorizar síntesis y bioevaluación de los compuestos *hits* computacionales seguros. Los compuestos fueron caracterizados mediante RMN ^{1}H y ^{13}C y por espectrometría de masas. Basado en los resultados del análisis de consenso farmacológico, se optó por priorizar bioevaluación *in vitro* del compuesto **WAD-2.** La evaluación *in vitro* se llevó a cabo mediante un radioinmunoensayo (binding) para poder determinar la afinidad del compuesto **WAD-2** con el receptor σ_1. Los compuestos mostraron afinidad en el bajo orden nanomolar (16 nM y 4.2 nM, respectivamente), catalogándose como *Leads* experimentales. Para finalizar, se realizó la evaluación *in vivo* del compuesto **WAD-2** en un modelo de ratas Wistar con ligaduras de nervios espinales (LNE). En el ensayo *in vivo* se evaluó la alodinia táctil usando filamentos de Von Frey y se administraron 3 diferentes concentraciones del compuesto **WAD-2 (**100, 150 y 300 μg) por vía intratecal.

En conclusión, el compuesto **WAD-2** fue uno de los compuestos que resaltaron en el análisis de consenso farmacológico seleccionado como hit computacional seguro. Posteriormente, en el ensayo *in vitro* mostró una afinidad con el receptor σ_1 de 4.2 nM catalogándose como *Lead* experimental. Finalmente, en el estudio *in vivo* mostró un efecto antialodínico dependiente de la concentración, validando experimentalmente el análisis *in silico* de consenso farmacológico utilizado.

ABSTRACT

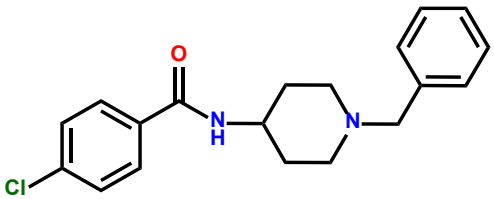
Neuropathic pain is a condition that affects at least 30% of the population diminishing their quality of life. Treatment for neuropathic pain cannot be approached with common analgesics; therefore, antidepressants, anesthetics, and/or opioids are employed which are not completely effective and present a risk of adverse effects. Therefore, there is a need to investigate new therapeutic targets for the treatment of this disease. The σ_1 receptor has been considered a target of interest since its modulation with antagonists has been shown in rat assays to decrease allodynia and hyperalgesia. Several synthetic antagonists of this receptor have been reported, **S1RA** a σ_1 antagonistic compound which is in phase IIa clinical trials for the treatment of neuropathic pain. Another compound that has shown an affinity in nanomolar values with the σ_1 receptor, as well as antiallodynic and antihyperalgesic effect in rat models of neuropathic pain, is compound **LMH-2**.

Therefore, in this project, the design and synthesis of compounds analogous to the **LMH-2** compound was carried out. *In silico* assay of the designed compounds, was performed using chemoinformatics tools to establish a consensus of the collected data and to prioritize synthesis and bioassessment of the computationally safe compounds. The compounds were characterized by ^{1}H and ^{13}C NMR and mass spectrometry. Based on the results of the pharmacological consensus analysis, we chose to prioritize in vitro bioassessment of compound **WAD-2**. *In vitro* assay: a radioimmunoassay (binding) was performed to determine the affinity of **WAD-2** and **WAD-2** compound with σ_1 receptor. The compound showed affinity in the low nanomolar order (4.2 nM, respectively), being classified as experimental leads. Finally, *in vivo* for **WAD-2** compound was performed in a Wistar rat model with spinal nerve attachments (SNL). *In vivo* assay: tactile allodynia was evaluated using Von Frey filaments and 3 different concentrations of **WAD-2** compound (100, 150 and 300 μg) were administered intrathecally.

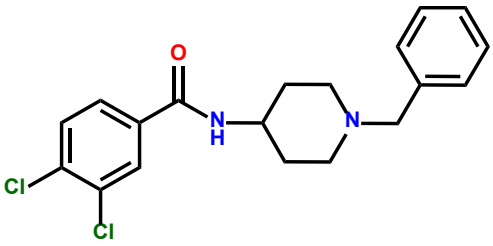
In conclusion, compound **WAD-2** stood out in the pharmacological consensus analysis and was selected as a computationally safe hit. Subsequently, in the *in vitro* assay it showed an affinity for the receptor σ_1 of 4.2 nM and was classified as an experimental lead. Finally, in the *in vivo* study it showed a concentration-dependent anti-allodynic effect.

ÍNDICE DE COMPUESTOS FINALES

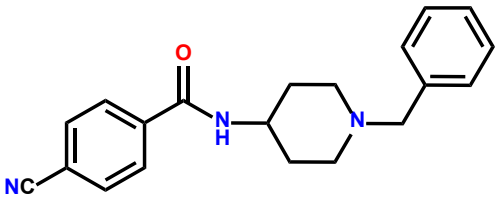
SERIE A (BENZAMIDAS)



N-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-clorobenzamida
WAD-1

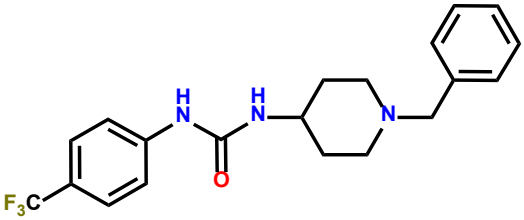


N-(1-bencilpiperidin-1-il)-3, 4-diclorobenzamida
WAD-2

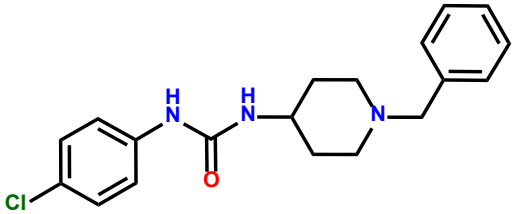


N-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-cianobenzamida
WAD-3

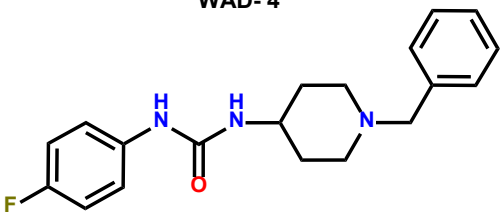
SERIE B (UREAS)



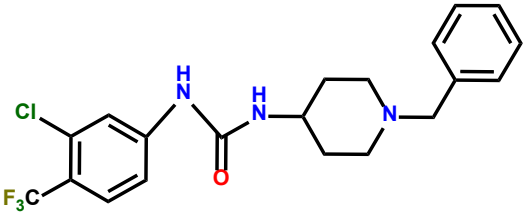
1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-(trifluorometil)fenil]urea
WAD- 4



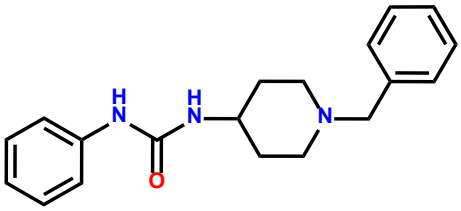
1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-(cloro)fenil]urea
WAD-5



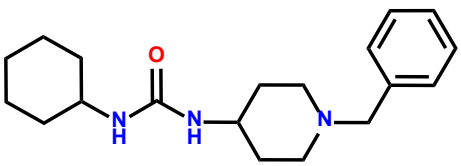
1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-fluoro)fenil]urea
WAD-6



1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-cloro-3-trifluorometil]fenil]urea
WAD-7



1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[fenil]urea
WAD-9



1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[ciclohexil]urea
WAD-9

1. INTRODUCCIÓN

El dolor neuropático es un “dolor causado por una lesión o enfermedad en el sistema nervioso somatosensorial central o periférico” que afecta a millones de personas a nivel mundial. este padecimiento reduce drásticamente la calidad de vida de las personas. Actualmente no hay un tratamiento específico y completamente eficaz para esta enfermedad, por lo que sigue siendo un reto la búsqueda de fármacos que puedan emplearse para tratar el dolor neuropático.

Los fármacos que se emplean para el tratamiento del dolor neuropático son de tipo gabapentinoide, anestésico local, antidepresivo y de tipo opioide, sin embargo, estos presentan poca eficacia y alto riesgo de efectos adversos. Aunado a esto se sabe que los fármacos de tipo opioide tienden a generar farmacodependencia y esto pondría en riesgo a los pacientes que usen este tipo de tratamiento.

Recientemente, los receptores σ_1 se han convertido en una diana terapéutica de amplio interés para el tratamiento del dolor neuropático. El antagonismo de este receptor ha mostrado efecto antialodínico, y antihiperalgésico. El fármaco haloperidol (un agente antipsicótico que muestra actividad mediante el antagonismo de los receptores de Dopamina D_2), también ha mostrado actividad como antagonista de los receptores σ_1 por lo que también se ha relacionado con el tratamiento del dolor neuropático. Adicionalmente, el compuesto **LMH-2** (un compuesto de tipo *N*-acilpiperidina) desarrollado por nuestro grupo de investigación mostró efecto antihiperalgésico y antialodínico en modelos de rata y ratón, cabe resaltar que el compuesto **LMH-2** no mostró los efectos extrapiramidales asociados al antagonismo del receptor D_2 de dopamina.

Debido a lo anteriormente mencionado en este proyecto se proponen compuestos de tipo *N*-acilpiperidinas que funcionen como agentes antialodínico y antihiperalgésicos, que presenten menos efectos adversos, que no generen farmacodependencia y que pudieran emplearse para el tratamiento del dolor neuropático.

El proyecto se divide en 3 partes: la primera parte consta de diseño racional de los compuestos y la evaluación *in silico* de sus propiedades farmacológicas mediante herramientas químico-informáticas, la segunda parte consta de la síntesis, purificación y caracterización de los compuestos, mientras que la tercera parte está conformada por la evaluación biológica de los compuestos que presenten las mejores propiedades en la evaluación *in silico* (*Hits* computacionales seguros): una evaluación *in vitro* mediante un radioinmunoensayo de afinidad, y un ensayo *in vivo* de alodinia mecánica en un modelo de ligadura de nervios espinales.

1. ANTECEDENTES

1.1. Definición del dolor

El dolor está definido por la IASP como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada, o similar a la asociada con daño tisular real o potencial”.[1]

El dolor puede definirse como una sensación de angustia y subjetiva, así como una experiencia emocional que está vinculada a un daño tisular real o potencial, con el propósito de notificar al mecanismo de defensa del organismo que reaccione ante un estímulo para evitar más daños tisulares.[2]

1.2. Tipos de dolor

El dolor se puede clasificar de acuerdo con el tiempo de duración, patogenia e intensidad. De acuerdo con la duración, se divide en dolor agudo y dolor crónico: el dolor agudo tiene una duración de 1-3 meses, mientras que el dolor crónico tiene una duración superior a los 3 meses.[3]

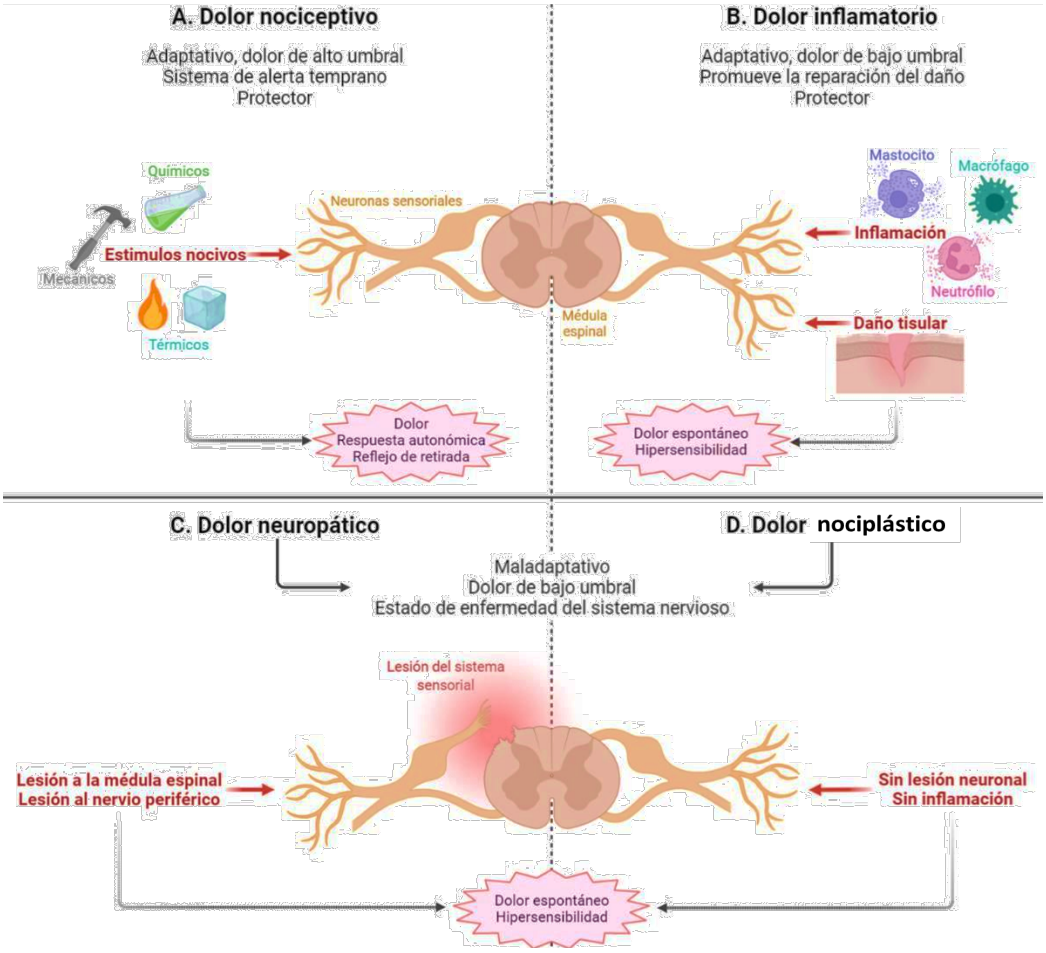


Figura 1. Clasificación del dolor de acuerdo con su función.[3]

Como se puede observar en la **Figura 1**, el dolor también se puede clasificar de acuerdo con su funcionalidad de protección o de daño (adaptativo y maladaptativo). El dolor adaptativo cumple la función de proteger las lesiones y evitar daños más grandes, mientras el dolor maladaptativo no ofrece una función protectora, ya que este dolor se desarrolla después de una lesión al sistema nervioso. El dolor adaptativo se divide a su vez en dolor nociceptivo y dolor inflamatorio; el dolor nociceptivo involucra la activación de nociceptores por estímulos mecánicos, térmicos y químicos, mientras que el dolor inflamatorio representa una hipersensibilidad en la presencia de alguna inflamación causada por un patógeno. Por otro lado, el dolor maladaptativo se divide en dolor neuropático y en dolor nociplástico; el dolor neuropático es un dolor causado por alguna lesión en el sistema nervioso periférico, o bien en el sistema nervioso central, mientras que el dolor nociplástico se presenta sin causa aparente con dolor generalizado como la fibromialgia sin que haya un estímulo nocivo, ni inflamación detectable ni lesiones en el SNP o SNC.[3–5]

1.3. Nocicepción

La nocicepción funciona como un importante sistema de detección que codifica estímulos nocivos. Este proceso depende de los nociceptores, que son neuronas especializadas que detectan y responden a estímulos térmicos, mecánicos y químicos en el entorno.[6]

1.3.1. Mecanismos de nocicepción

Cuando un estímulo térmico, químico, o mecánico es captado por los nociceptores estos llevan a cabo una señalización. La percepción de una serie de eventos sensoriales es requerida por el cerebro para detectar un estímulo y producir una respuesta. Existen principalmente cuatro etapas en la percepción de un estímulo mecánico, químico o térmico (**Figura 2**):

1) Sensibilidad y transducción de señales de tipo químico a tipo eléctrico.
2) Transmisión de las señales desde la periferia a la médula de la asta dorsal vía Sistema Nervioso Periférico (SNP).
3) Modulación de las señales para transmisión al cerebro vía Sistema Nervioso Central (SNC) (inhibición o generación del potencial de acción).
4) Percepción del dolor donde se conjunta la información de la nocicepción y factores emocionales para generar una respuesta.[7]

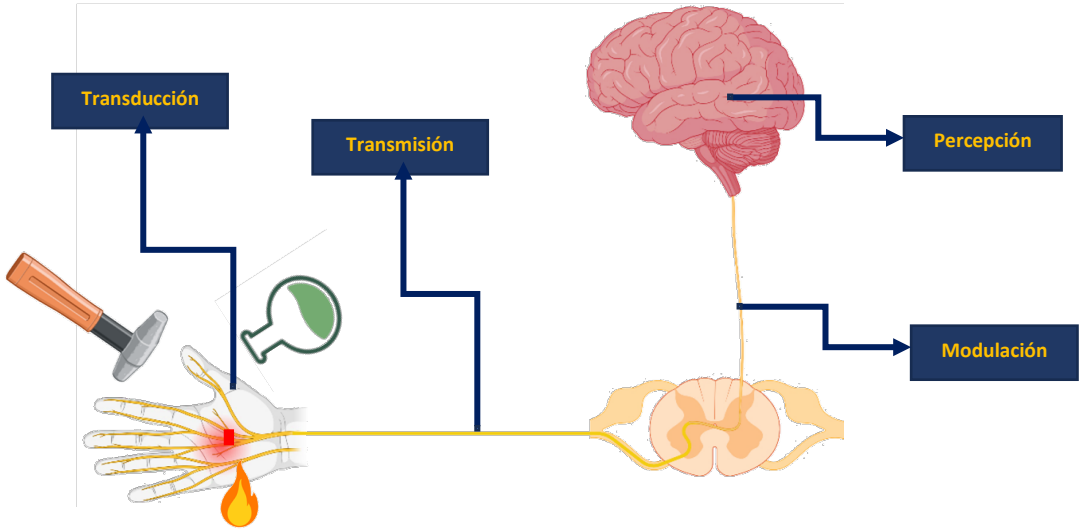


Figura 2.Mecanismo de nocicepción. Modificado de *Pathophisiology of Pain*. [8]

La transducción o generación del potencial de acción se inicia cuando un estímulo activa los nociceptores, y se liberan los neurotransmisores en la terminal del axón. La transmisión sináptica son eventos químicos usados para trasmitir impulsos nerviosos entre las neuronas. Existen múltiples niveles del SNC envueltos en la transmisión del dolor. Cuando un estímulo nocivo activa un canal iónico en un nociceptor, se produce un potencial de acción. Un potencial de acción en la terminación presináptica crea una despolarización de la membrana la cual causa la apertura de canales de sodio. La entrada de sodio conlleva la activación de canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), y la consiguiente entrada de Ca^{2+} en el axón terminal. El Ca^{2+} se une a la proteína sensible a Ca^{2+} y ocurre una interacción con el receptor de la proteína activadora del factor sensible a la *N*-etilmaleimida (SNARE). El rol de SNARE es promover la fusión de las vesículas sinápticas a las membranas del axón terminal en las neuronas, lo que causa la liberación inmediata de Ca^{2+} y neurotransmisores al espacio sináptico.[2,9] La transmisión del dolor es dependiente de la homeostasis de las influencias excitatorias o inhibitorias que actúan en los circuitos neuronales del sistema somatosensorial. Si se alcanza una magnitud de potencia suficiente se genera la activación del canal de Na^{+}.[2]

1.3.2. Nociceptores

Los nociceptores son terminaciones nerviosas especializadas que están localizadas en la piel, músculo hueso y en la mayoría de los órganos internos y su función es detectar estímulos químicos, mecánicos y térmico que dañan, o que podrían dañar al organismo. Las fibras nociceptivas se dividen en 4 tipos:

- Fibras α: Fibras mielinizadas que no tienen sensibilidad térmica, tienen un diámetro de 13 a 20 μm y una velocidad de conducción de 80 a 120 m/s.

- Fibras β: Fibras mielinizadas con función mecanorreceptora (información táctil y de presión), no tienen sensibilidad térmica, tienen un diámetro de 6-12 μm y una velocidad de conducción de 35 a 90 m/s.
- Fibra A-δ: Fibras mielinizadas con sensibilidad térmica (frío y calor) y mecanotérmica tienen un diámetro de 1-5 μm y una velocidad de conducción de 5 a 40 m/s.
- Fibras C: Fibras no mielinizadas con sensibilidad térmica, mecánica y/o química, tienen un diámetro de 0,02 a 1,5 μm y una velocidad de conducción de 0,5 a 2 m/s. [2,10,11]

La velocidad de transmisión está directamente relacionada con el diámetro de los axones de las neuronas sensoriales, así como con la presencia o ausencia de mielina. Como se puede observar en la **Figura 3**, los nociceptores expresan una amplia variedad de canales dependientes del voltaje (p. ej., Na_V, Ca_V, K_V) que transducen el potencial del receptor en un potencial de acción o, más comúnmente, un conjunto de potenciales de acción que codifican la intensidad de un estímulo nocivo aplicado dentro de sus campos receptivos. Existen otros canales iónicos que regulan la detección de estímulos térmicos nocivos, como el canal de cloruro TMEM16A/anoctamina y los canales de potasio TREK1, TREK2 y TRAKK. [11]

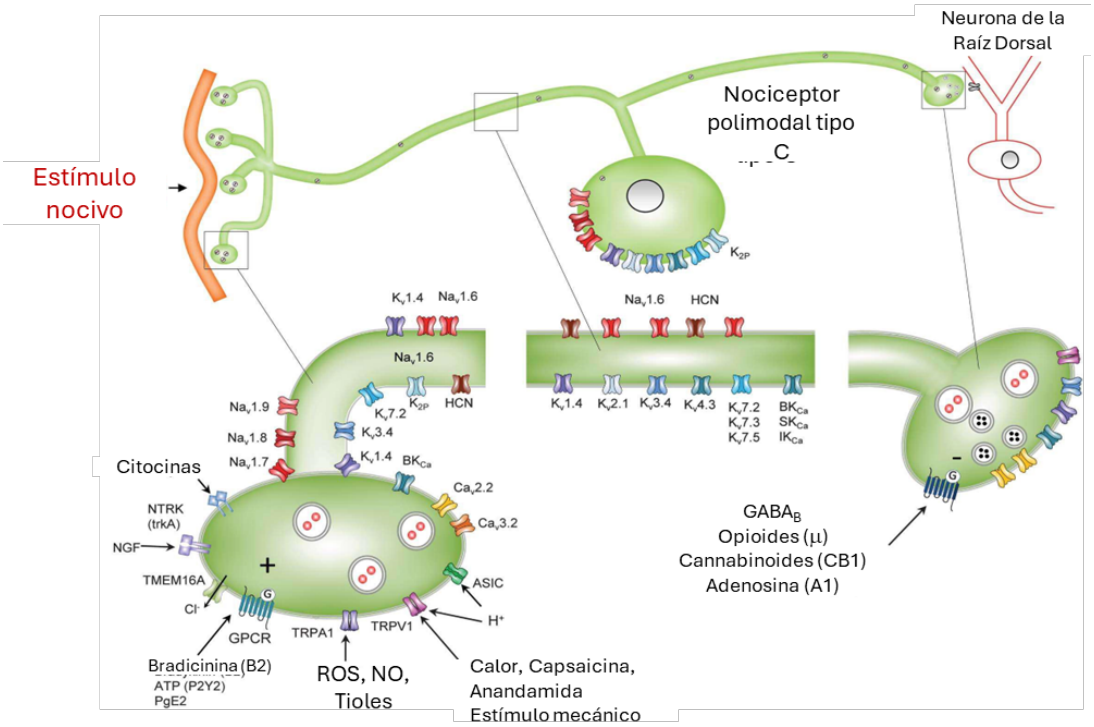


Figura 3. Canales presentes en los nociceptores tipo C. Modificado de Benarroch et al. [12]

Las fibras tipo C son muy diversas, hay algunas fibras peptidérgicas que sintetizan sustancia P, péptido relacionado a genes de calcitonina (CGRP) y expresan el receptor tirosina quinasa A para el factor de crecimiento nervioso (NGF), así como canales TRPVA y TRPA1. Existen unas fibras no peptidérgicas que expresan receptor c-Ret para el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y receptores $P2X_3$. Las fibras tipo C expresan receptores de potencial transitorio (TRP), que son canales iónicos activados por ligando que controlan una variedad de sensaciones incluyendo cambios mecánicos y de temperatura, así como estímulos dolorosos. Los TRP son esenciales en la primera etapa de la percepción del dolor ya que ellos transducen estímulos nocivos en impulsos. Hay un número de canales TRP incluyendo TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 Y TRPA1 [6]

1.4. Dolor neuropático

El dolor neuropático (DN) es un "dolor causado por una lesión o enfermedad en el sistema nervioso somatosensorial central o periférico".[1] Puede describirse como una sensación quemante, punzante, hormigueante, o como un dolor que oprime o congela. [7] Este tipo de dolor está generalmente caracterizado por una respuesta exagerada a estímulos térmicos o mecánicos nocivos (hiperalgesia), una sensación de dolor ante estímulos que normalmente son inocuos (alodinia) y dolor espontáneo (**Figura 4**).[13,14]

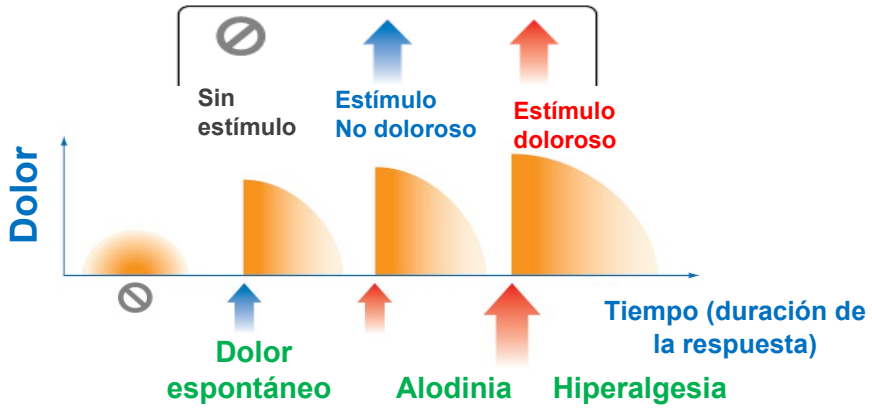


Figura 4. Características del dolor neuropático.[14]

1.5. Epidemiología

El DN es una enfermedad que afecta la menos al 30% de la población a nivel mundial. Las estimaciones de la prevalencia del dolor neuropático basadas en la población son importantes para determinar las necesidades de recursos (clínicos, financieros, educativos) de la atención primaria, donde se trata y gestiona a la mayoría de las personas con dolor crónico, y para orientar las estrategias de tratamiento y prevención.[15] Las estimaciones de su prevalencia en la población

general varían entre un 1% y un 7-8%; sin embargo, si se tienen en cuenta afecciones como la diabetes (26%), el herpes zóster (19%) y el dolor posquirúrgico (10%), la incidencia es mucho mayor.[16]

1.6. Mecanismos del dolor neuropático

Generalmente, el DN es el resultado de alteraciones en la actividad neuronal, tales como: la sensibilización de las neuronas de la raíz del ganglio dorsal y del ganglio trigeminal, así como la sensibilización de las neuronas nociceptivas centrales de la médula espinal, el núcleo trigémino, y el tronco y la corteza encefálicos.[13] Los mecanismos que desencadenan dolor neuropático involucran:

- Sensibilización periférica
- Descargas ectópicas
- Sensibilización central
- Desinhibición gabaérgica.

1.6.1. Sensibilización periférica

En el DN las células inmunológicas están implicadas, cuando sucede un daño al nervio , las células del sistema inmune liberan sustancias mediadoras de la inflamación (bradicinina, histamina, IL-1b, TNF-a, quimiocinas, etc.) que se unirán a sus respectivos receptores en las fibras nerviosas y se llevará a cabo una señalización vía segundos mensajeros (Ca^{2+} y AMPc) que activarán las cinasas (PKA, PKC, PI3K) que modularán la transcripción y actividad de los receptores TRPA1, TRPV1 y los canales de sodio dependientes de voltaje causando una hipersensibilidad e hiperexcitabilidad de los nociceptores (**Figura 5**).[13]

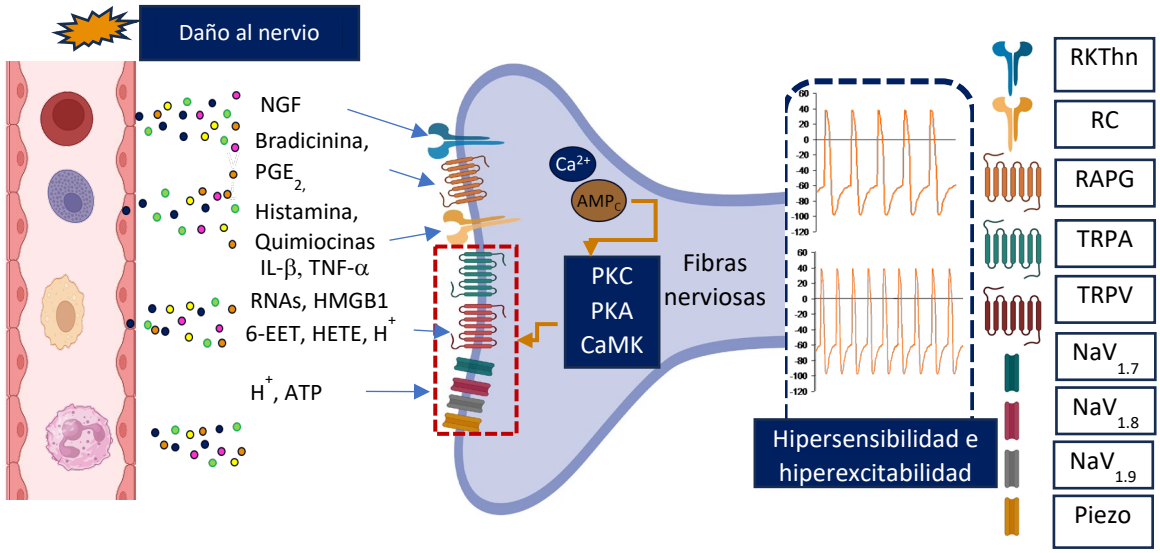


Figura 5. Mecanismo de neurotransmisión química en una fibra nociceptiva.[13]
Imagen realizada en Biorender.com

1.6.2. Descargas ectópicas

Las descargas ectópicas (**Figura 6**) son más frecuentes en las fibras A, dentro de los factores que aparecen como responsables de las descargas ectópicas se encuentran la sensibilización de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, la desensibilización de los canales de K^+ y la posible reducción de umbral de los canales TRP. La actividad ectópica puede generar parestesia y disestesia.[7]

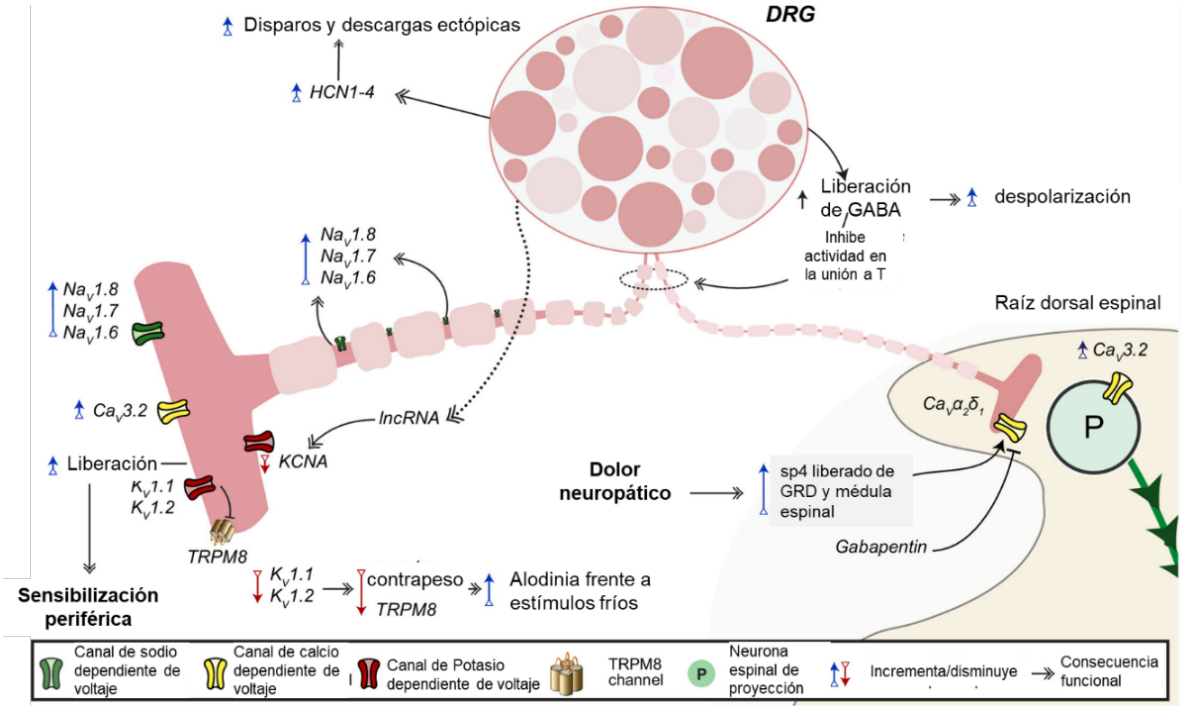


Figura 6. Descargas ectópicas y generación de potenciales aberrantes.[7]

1.6.3. Sensibilización central

En condiciones fisiológicas, un estímulo doloroso induce la liberación de glutamato, aspartato, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), péptido relacionado a genes de calcitonina (CGRP) y la sustancia P (SP) desde las neuronas de primer orden para que estas se unan a sus respectivos receptores en la neurona de la asta dorsal de la médula espinal donde inducen la sensibilización. El CGRP se une a su receptor y favorece la entrada de calcio en la neurona, el glutamato se une a los receptores AMPA y a sus receptores metabotrópicos. A pesar de que el glutamato es muy afín a los receptores NMDA, en condiciones normales este receptor se encuentra bloqueado por el ion Mg^{2+}. [17]

Después de un estímulo nocivo (**Figura 7**), el glutamato actúa en los receptores AMPA y se general potenciales que activan los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCC) generando un aumento de Ca^{2+} intracelular que activa las proteínas cinasas dependientes de calcio que fosforilan al receptor NMDA, lo que permite que

el Mg^{2+} deje de bloquear y se abra el canal para dar pie a una actividad excitatoria dual del glutamato al unirse a los receptores AMPA y NMDA. [7,17,18] Cabe mencionar que niveles altos de Ca^{2+} también suelen activar a los receptores σ_1, favoreciendo su separación de la proteína de unión a inmunoglobulina (BIP) y consecuente traslocación a distintas proteínas, una de ellas el receptor NMDA.[19]

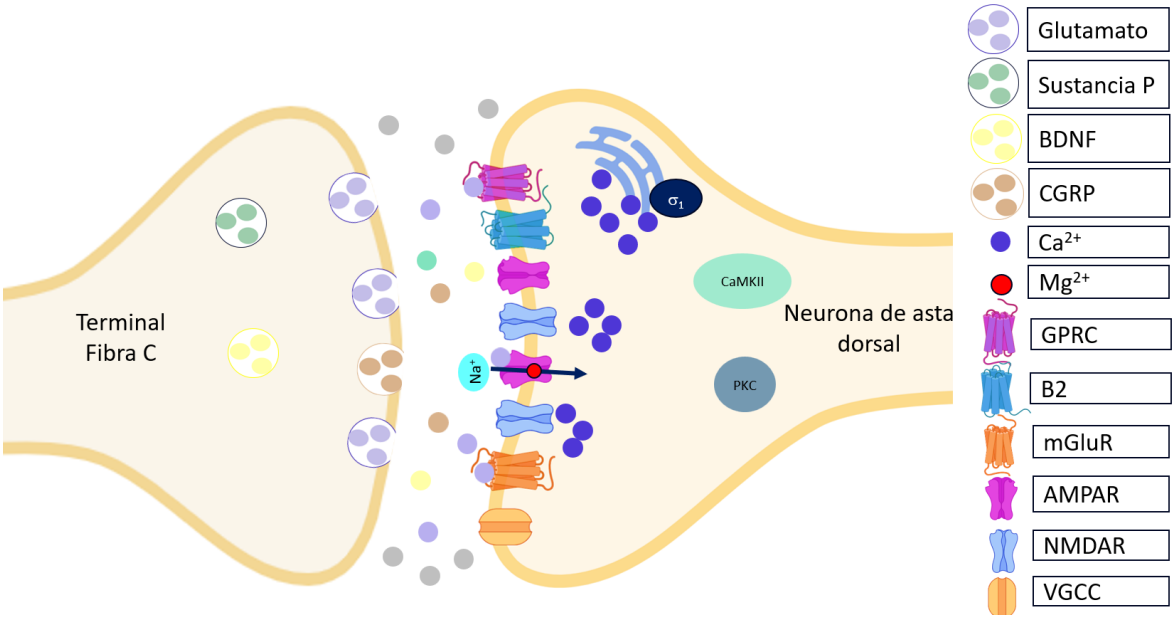


Figura 7. Sensibilización central.[20] Imagen realizada en Biorender.com

Además, las lesiones en los nervios aumentan significativamente la expresión de la subunidad NR2B de los receptores NMDA de las células del sistema nervioso central lo que induce un incremento en la actividad del receptor y por lo tanto el dolor neuropático persiste. Adicionalmente, en la sensibilización central cuando hay una lesión se ven implicadas algunas células del sistema inmune del SNC: microglía y astrocitos. Estas células inducen un aumento de interleucinas proinflamatorias (IL-2β, IL-6, IL-8 y TNF-α) que desencadenan una hiperexcitabilidad neuronal.[7,17,18]

1.6.4. Desinhibición gabaérgica

En condiciones normales las neuronas expresan receptores $GABA_A$ que tienen una función inhibitoria en el SNC al permitir la entrada de iones Cl^- al interior de las células. Cuando sucede un daño en los nervios, las quimiocinas activan la microglía y se promueve la liberación de interleucinas proinflamatorias, factores de crecimiento, especies reactivas de oxígeno, el Factor Neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el Factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), entre otros que favorecen la sensibilización central. [21,22]

El Factor Neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) liberado por la microglía se une a sus receptores TrkB en la neurona de proyección, lo que se ha relacionado con una disminución en la expresión de KCC2 que ocasiona una acumulación de iones Cl^- intracelular. Esta acumulación conduce a la activación de los receptores $GABA_A$ para el transporte de los iones Cl^- al exterior de la neurona generando una despolarización en las neuronas. Al realizar un flujo invertido, los receptores $GABA_A$ pierden su funcionalidad inhibitoria pasando a ser canales excitatorios. Al ya no tener un sistema inhibitorio se aumenta la excitabilidad neuronal lo que conlleva al desarrollo del dolor neuropático (**Figura 8**).[21,22]

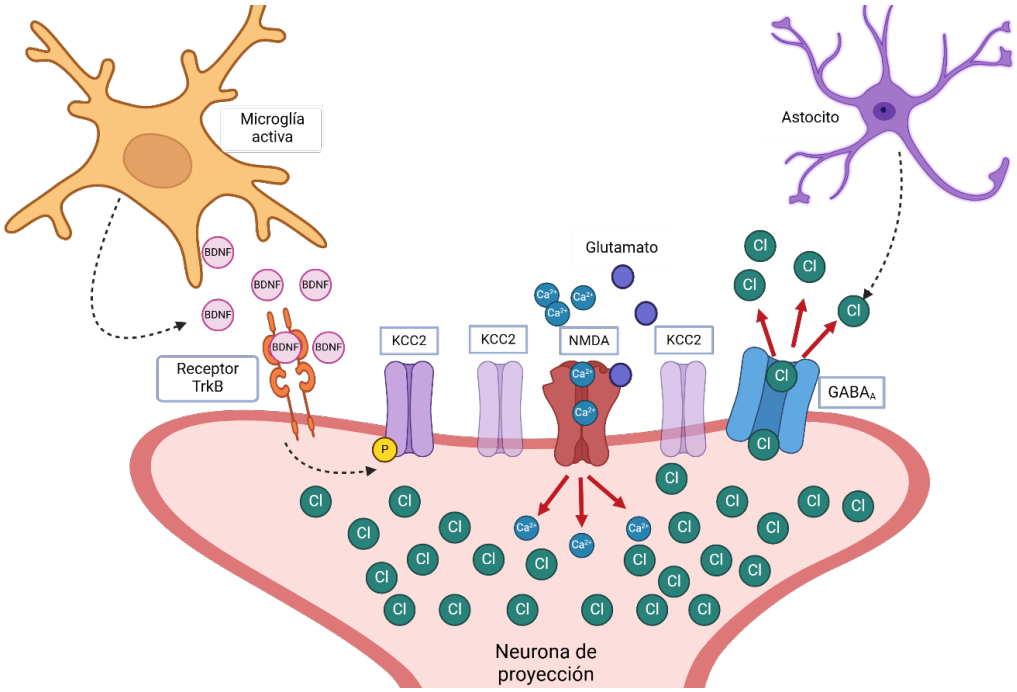


Figura 8. Desinhibición gabaérgica.[23]
Imagen realizada en Biorender.com

1.7. Tratamiento del dolor neuropático

En la actualidad no existe un tratamiento específico para el dolor neuropático, ya que los analgésicos tradicionales no funcionan en esta patología, por lo tanto, se emplean fármacos de tipo antidepresivo, anestésico u opioide. (**Tabla 1**). Sin embargo, los fármacos usados parecen no ser muy efectivos para reducir las molestias ocasionadas por la enfermedad y muestran numerosos efectos adversos. Así mismo, el uso de opioides se ha relacionado con problemas de farmacodependencia. Por lo tanto, es importante continuar con la búsqueda de agentes que posean menos efectos adversos y mejor eficacia para el tratamiento del dolor.[24] Recientemente se han estudiado los receptores sigma, quienes parecen ser una diana prometedora para el tratamiento del dolor neuropático.[25]

Tabla 1. Fármacos empleados para el tratamiento de dolor neuropático. [26,27]

		Fármacos	Dosis	Efectos adversos
Primera línea	Gabapentinoides	Gabapentina	150-600 mg/día	Letargia, vértigo, hinchazón periférica, visión borrosa y aumento de peso corporal.
		Pregabalina	300-3600 mg/día	
	ATC	Amitriptilina	10-150 mg/día	Efectos anticolinérgicos, prolongación de QT (arritmias) y ataxia.
	IRSN	Duloxetina	20-120 mg/día	Náuseas, letargia, estreñimiento, resequedad bucal y ataxia.
		Venlafaxina	150-225 mg/día	Náuseas, vértigo, letargia, hipertensión.
Segunda línea	Opioides	Tramadol	25-400 mg/día	Náusea, vómito, constipación, letargia y ataxia.
		Tapentadol	50-600 mg/día	
	Tratamiento tópico	Lidocaina	5% (paches)	Eritema, picazón y erupción cutánea.
		Capsaicina	8% (parches)	
Tercera línea	Opioides fuertes	Morfina	10-120 mg/día	Náuseas, vómitos, estreñimiento, mareos y letargo.
		Oxicodona	12-120 mg/día	
	Neurotoxinas	Toxina botulínica	25-300 U BTX-A	Dolor en el sitio de inyección.

1.7.1. Tratamiento de primera línea

El tratamiento de primera línea incluye el uso de gabapentinoides que reducen la afluencia de Ca^{2+} y el uso de antidepresivos que inhiben la recaptación de serotonina y norepinefrina.

1.7.1.1. Gabapentinoides

Gabapentina y pregabalina (**Figura 9**), son compuestos gabapentinoides sintéticos que fueron originalmente diseñados como análogos del neurotransmisor ácido γ-aminobutírico (GABA).[28] A pesar de su analogía con GABA, estos gabapentinoides no mostraron actividad frente a los receptores de GABA y se consideraban inactivos. Ahora se sabe que se unen a la subunidad α2-δ de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje (VGCC) reduciendo la afluencia de Ca^{2+} y la consiguiente liberación de glutamato norepinefrina y sustancia P.[29,30] La subunidad α2δ-1 está altamente expresada en los ganglios de la raíz dorsal y en la asta dorsal espinal y está significantemente regulada tras una lesión nerviosa y relacionada con la alodinia. [31] El fármaco gabapentina está recomendado como primera línea en el tratamiento del dolor neuropático, sin embargo, se ha reportado que presenta poca eficacia y efectos adversos como letargia, hinchazón, vértigo, entre otros.[31]

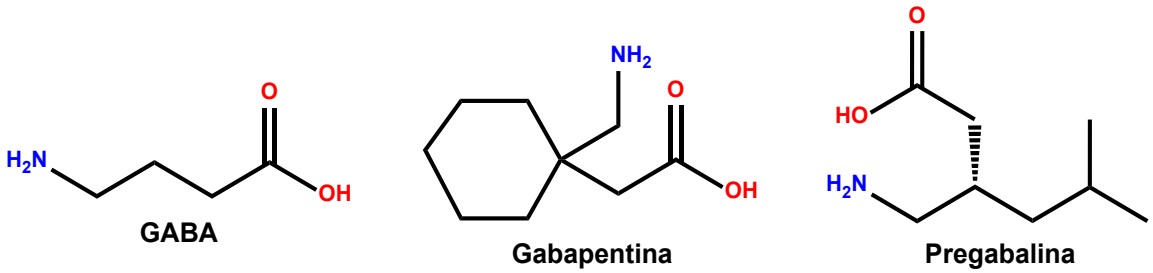


Figura 9. Estructura química de los gabapentinoides.

1.7.1.2. Antidepresivos tricíclicos (ATC)

Los antidepresivos tricíclicos son capaces de reducir el dolor en los pacientes debido a la capacidad de reducir la actividad de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Amitriptilina también bloquea canales de Na^+, por lo tanto, tiene la capacidad de reducir el DN. La amitriptilina (**Figura 10**) es un fármaco ATC que se usa ampliamente para tratar DN, está recomendado como primera línea de tratamiento. Debido a que los efectos adversos están relacionados a las dosis, se debe tener cuidado con su uso terapéutico. Algunos de los efectos asociados al uso de amitriptilina incluyen hipotensión y taquicardias. [32,33]

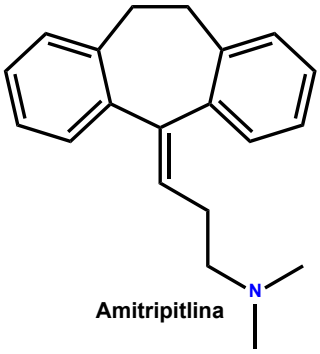


Figura 10. Estructura química de la Amitriptilina

1.7.1.3. Inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRSN)

Esta clase de fármacos han sido usados por muchos años [34]como tratamiento de primera línea para el dolor neuropático debido a su efecto como inhibidores de la recaptación de estos neurotransmisores, de manera similar a los ATC, sin embargo, los fármacos duloxetina y venlafaxina (**Figura 11**) han mostrado una mejor tolerabilidad en los pacientes con DN debido a su selectividad. [33,35]

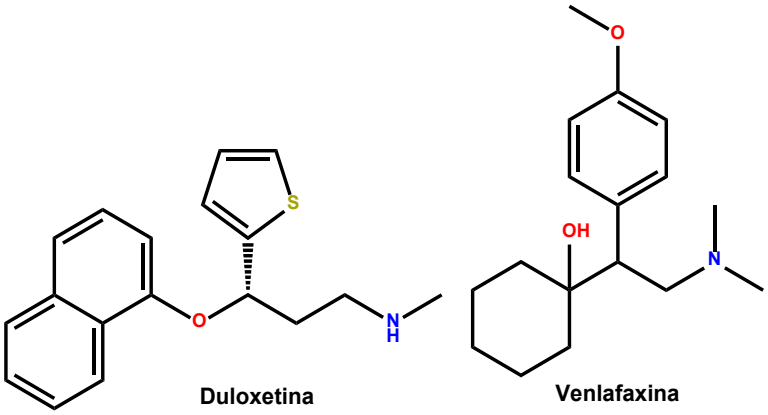


Figura 11. Estructura química de duloxetina y venlafaxina (IRSN)

1.7.2. Tratamiento de segunda línea

1.7.2.1. Opioides

El tramadol y tapentadol (**Figura 12**) son agonistas débiles de los receptores μ-opioides que también inhiben la recaptura de serotonina y norepinefrina, se ha demostrado que este tratamiento es útil para el tratamiento de dolor neuropático periférico. Sin embargo, existen algunos de los efectos adversos asociados con el uso de tramadol son somnolencia, constipación, disnea, náuseas, así como el riesgo de tolerancia y concomitante abuso de estos agentes analgésicos, por lo tanto, son considerados como segunda línea de tratamiento.[36,37]

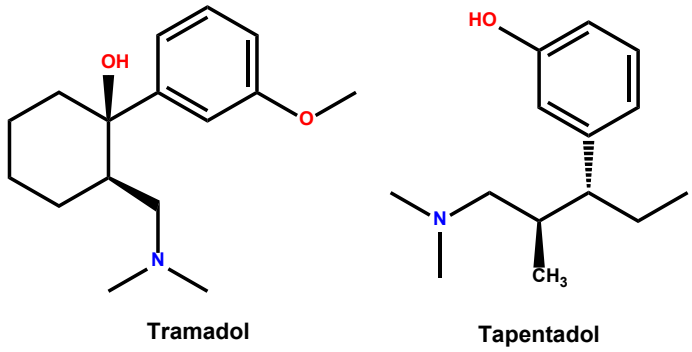


Figura 12. Estructura química de tramadol y tapentadol.

1.7.2.2. Anestésicos locales

Los anestésicos locales son considerados en la segunda línea de tratamiento del dolor neuropático periférico. Se recomienda usar parches con 8% de capsaicina o 5% de lidocaína para el tratamiento del dolor, especialmente en pacientes con comorbilidades y polifarmacia (**Figura 13**). Los parches de lidocaína bloquean los canales de Na^+ dependientes de voltaje y, por lo tanto, inhiben los impulsos nociceptivos. Por otro lado, la capsaicina es un potente agonista de los receptores vainilloides 1 (TRPV1). [38]

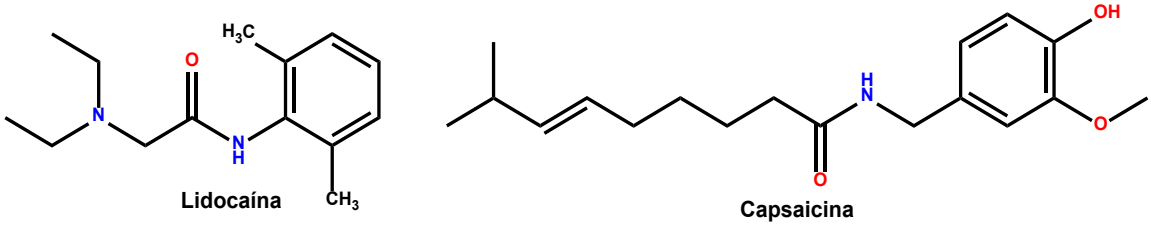


Figura 13. Estructura química de lidocaína y capsaicina, anestésicos locales.

1.7.3. Tratamiento de tercera línea

1.7.3.1. Opioides fuertes

Los fármacos opioides fuertes como la morfina y la oxicodona (**Figura 14**) son considerados como tercera línea del tratamiento de DN es casos moderados a fuertes debido a los numerosos efectos adversos que conlleva su uso. El uso de opioides puede proporcionar un alivio del dolor, sin embargo, su efecto es ineficaz y la duración solo funciona corto plazo. El uso de este tipo de fármacos se ve muy limitado debido a que trae consigo numerosos efectos secundarios graves: estreñimiento, vómitos, nausea, sedación, disforia, farmacodependencia y tolerancia.[34]

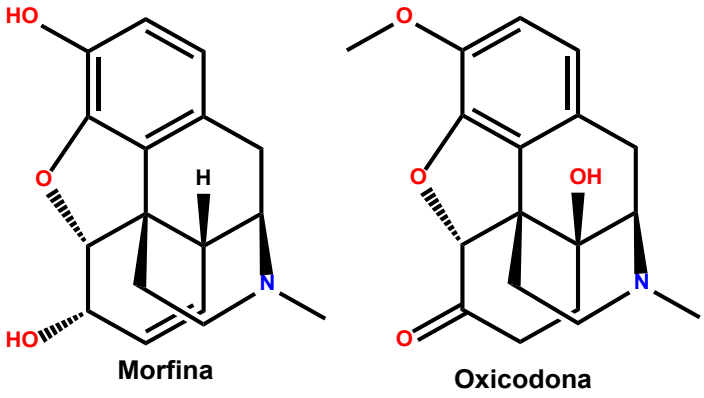


Figura 14. Estructura química de morfina y oxicodona.

1.7.3.2. Neurotoxinas

La toxina botulínica (**Figura 15**) es una neurotoxina que se usa ampliamente como tratamiento de la distonía y la espasticidad debido a su capacidad de bloquear de la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular y las terminaciones colinérgicas lo que provoca una relajación muscular. Así mismo, la toxina es usada en la tercera línea del tratamiento del dolor neuropático ya que bloquea la liberación de varios neuropéptidos mediadores del dolor como la sustancia P y el glutamato en las terminaciones nerviosas y en la raíz del ganglio dorsal, además bloquea lo canales de Na^+ e inhibe la actividad de los receptores vainilloides 1 (TRPV1) que están implicados en la transducción de estímulos nocivos. [39,40]

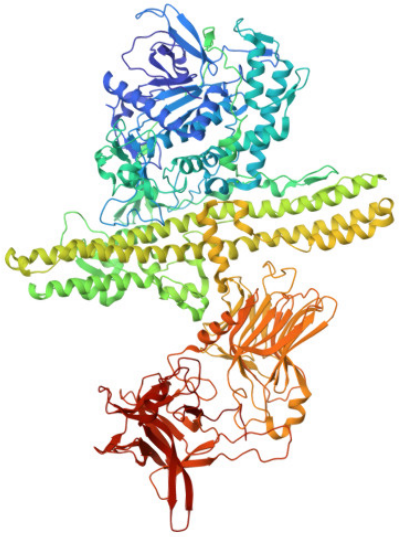


Figura 15. Estructura tridimensional de la toxina botulínica.[41]

1.8. Receptores σ

Los receptores sigma fueron inicialmente propuestos en 1976 como subtipos de la familia de receptores opioides. En la actualidad se sabe que los receptores sigma son receptores no opioides y se clasifican en dos subtipos denominados σ_1 y σ_2, que están caracterizados por sus diferencias en sus funciones celulares, sus perfiles farmacológicos y en su distribución tisular.[42] Los receptores sigma se expresan en el hipocampo, la corteza frontal y el bulbo olfatorio, Se sabe que σ_1R está expresado en neuronas y otros tipos celulares del SNC (astrocitos, microglía y oligodendrocitos) también, se encuentra en corazón, pulmones, hígado, riñones y gónadas.[43,44]

1.9. Receptor σ_1 (σ_1R)

El receptor σ_1 (σ_1R) es una proteína chaperona activada por Ca^{2+} que se encuentra principalmente en la membrana del retículo endoplásmico asociada a mitocondria (MAM). Estructuralmente es una proteína de un dominio transmembranal con una secuencia de 223 aminoácidos con peso molecular es de 25.3 kDa. [42]

En el SNC, σ_1R está involucrado en la neuroprotección, neuroinflamación, neurotransmisión y neuroplasticidad y su funcionalidad está asociada con funciones avanzadas del cerebro como memoria, cognición, dolor y neurodegeneración, por lo tanto, ha sido propuesto como diana terapéutica para desordenes del SNC como enfermedades neurodegenerativas, dolor, accidentes cerebrovasculares, degeneración de la retina y depresión.[42,45]

Fisiológicamente, σ_1R es conocido como un receptor que regula la neurotransmisión y se encuentra asociado con la proteína de unión a inmunoglobulina (Bip) y regula la señalización de Ca^{2+} del retículo endoplásmico a la mitocondria mediante el receptor de inositol trifosfato y la arborización de las dendritas espinales en el hipocampo mediante la regulación de las especies reactivas de oxígeno. [42,45]

En situaciones de estrés celular, los niveles de Ca^{2+} aumentan y σ_1R es activado, se disocia de Bip y se favorece la unión al receptor IP3. Cuando σ_1R es activado, transloca a otras áreas de la célula donde modula diferentes canales y receptores. σ_1R modula los receptores NMDA, receptores GABA y receptores opioides, varios canales iónicos dependientes de voltaje, como los canales de K^+, canales de Ca^{2+} (**Figura 16**). Otro mecanismo de activación de este receptor es mediante la unión con un agonista o bien con la disminución de los niveles de calcio dentro del retículo endoplásmico. [46–48]

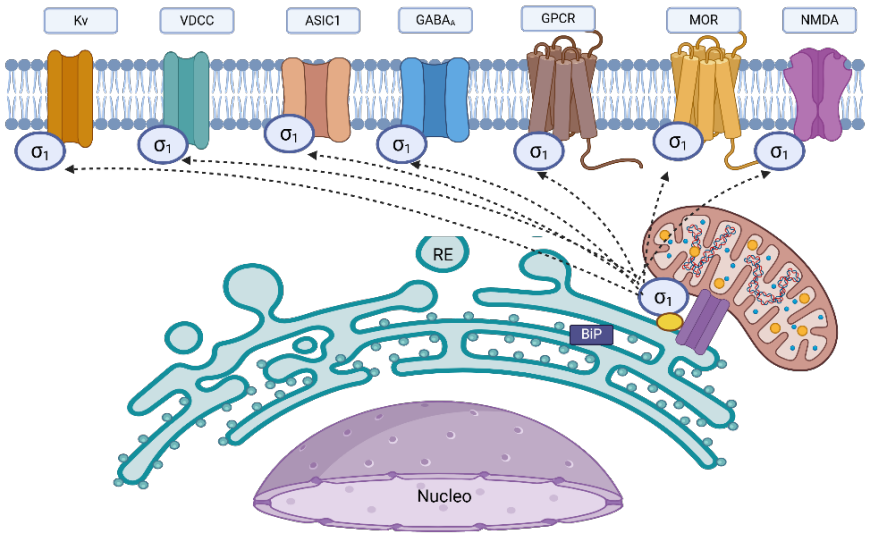


Figura 16. Funciones e interacciones de σ_1R en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas.[45] Imagen realizada en Biorender.com

Una de las interacciones más estudiada es con el receptor NMDA, cuando σ_1R es activado y transloca hasta el receptor NMDA, se une de manera competitiva impidiendo la unión con sus reguladores: la proteína de unión calcio-calmodulina-(CaM) y la proteína de unión a nucleótido codificada por el gen *HINT1* (HINT1). El complejo σ_1R – NMDA dificulta que calmodulina pueda modular negativamente el canal, lo que conlleva a una mayor actividad del canal permitiendo la entrada de Ca^{2+} que a su vez activa a las cinasas II dependiente de Ca^{2+} que favorece la fosforilación de la subunidad NR1 de NMDA, lo que incrementa su actividad y una modulación negativa de los receptores μ–opioides reduciendo la analgesia mediada por opioides y generando tolerancia a este tipo de tratamientos (**Figura 17**). [19,49]

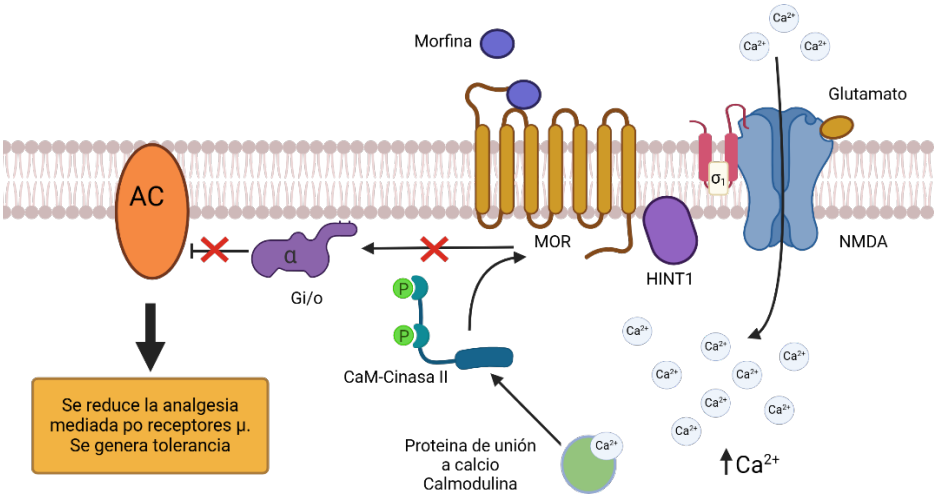


Figura 17. Mecanismo de modulación de NMDA al unirse con σ_1R activado.[19] Imagen realizada en Biorender.com

Otra interacción bastante estudiada en presencia de un agonista de σ_1R es con el receptor μ-opioide. Cuando σ_1R es activado se une a la proteína HINT1 y este complejo se asocia al receptor μ-opioide. Cuando el receptor μ–opioide es activado, se disocia la subunidad alfa y se lleva a cabo la activación de la fosfolipasa C que convierte el fosfatidilinositol en inositol trifosfato y diacilglicerol llevando a una cascada de señalización vía segundos mensajeros que induce la liberación de Ca^{2+} intracelular y la consecuente activación del receptor NMDA incrementando la nocicepción mediada por NMDA (**Figura 18**)

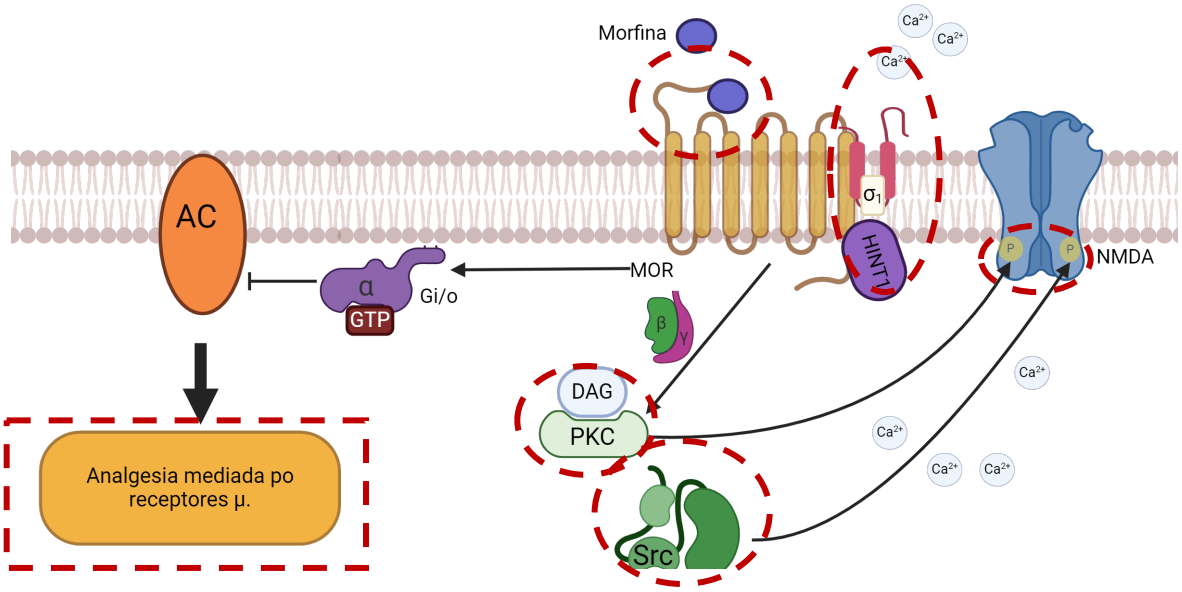


Figura 18. Mecanismo de modulación de MOR al unirse con el σ_1R activado.[19]
Imagen realizada en Biorender.com

Debido a que σ_1R es una proteína chaperona, también regula las corrientes de iones, aumenta la expresión de canales Kv 1.2 y bloquea los canales Kv 1.3, Kv 1.4, Kv 1.5 y los canales de Ca^{2+} tipo L. Dichas modulaciones están relacionadas con la despolarización y la disminución del umbral de activación lo que genera alodinia e hiperalgesia.

1.10. Ligandos del σ_1R

Los compuestos agonistas endógenos de σ_1R reportados por la literatura incluyen alquilaminas de cadena larga como esfingosina y *N,N*-dimetilesfingosina, así como, algunos neuroesteroides como pregnenolona y la dehidroepiandrosterona. mientras que el antagonista endógeno de σ_1R es la progesterona (**Figura 19**).[50]

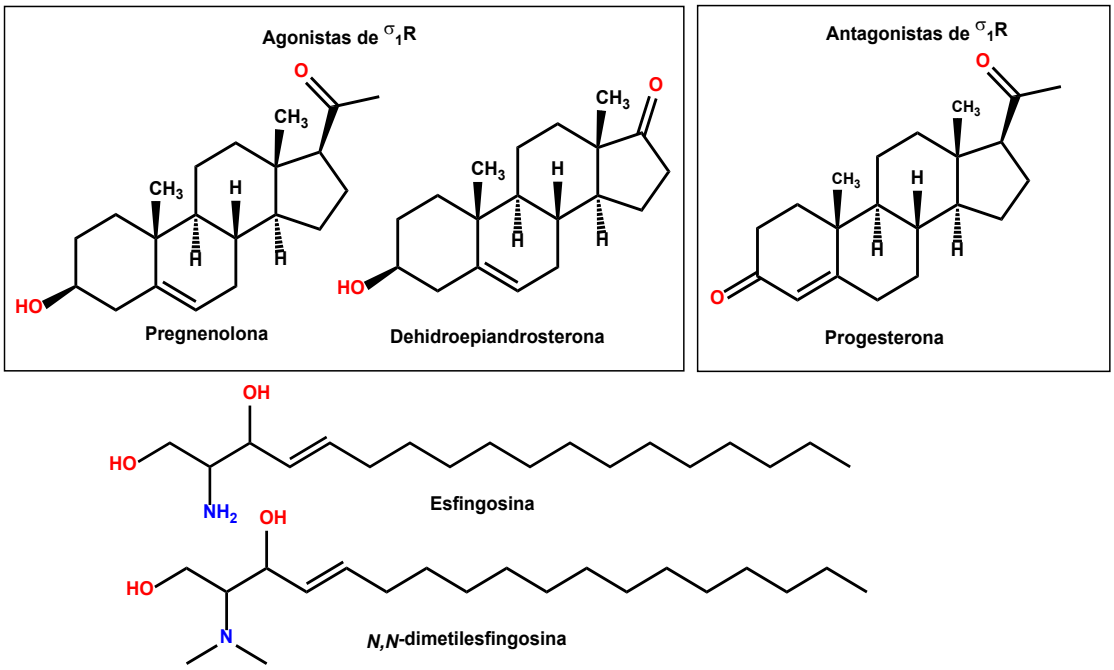


Figura 19. Ligandos endógenos de σ_1R

Hasta la fecha no se sabe cómo los ligandos modulan de manera agonista o antagonista a σ_1R, sin embargo, se ha reportado que los compuestos agonistas inducen un cambio conformacional en el receptor dado por la separación de los grupos amino y carboxilo terminales, lo que le permite interaccionar con los diferentes canales y receptores, mientras que los compuestos antagonistas no generan este cambio y por lo tanto se ve modificada la capacidad de unirse con otras proteínas (**Figura 20**).

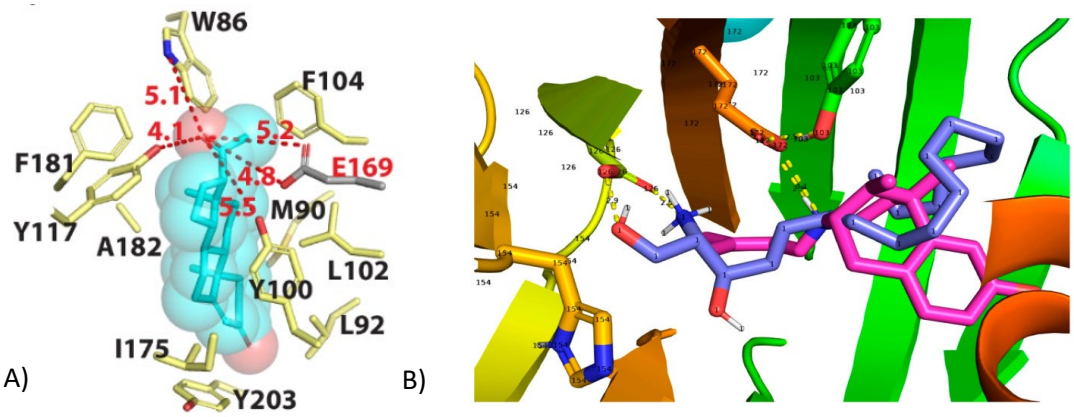


Figura 20. Diagrama 3D de interacciones entre ligandos endógenos y σ_1R. A), Progesterona unida a σ_1R [51]; B) Esfingosina unida a σ_1R. [52]

Se ha establecido ya un farmacóforo de los ligandos σ_1R propuesto por Glennon[53] y modificado por Navarrete[54] y colaboradores que consiste en grupo ionizable positivamente que es clave para la interacción con el residuo Glu-172, y anillos aromáticos laterales que reforzarán la unión con la diana con interacciones hidrofóbicas. Existe una variedad de ligandos de σ_1R reportados en la literatura que comparten gran similitud estructural, todos ellos contienen una amina básica (**Figura 21**).

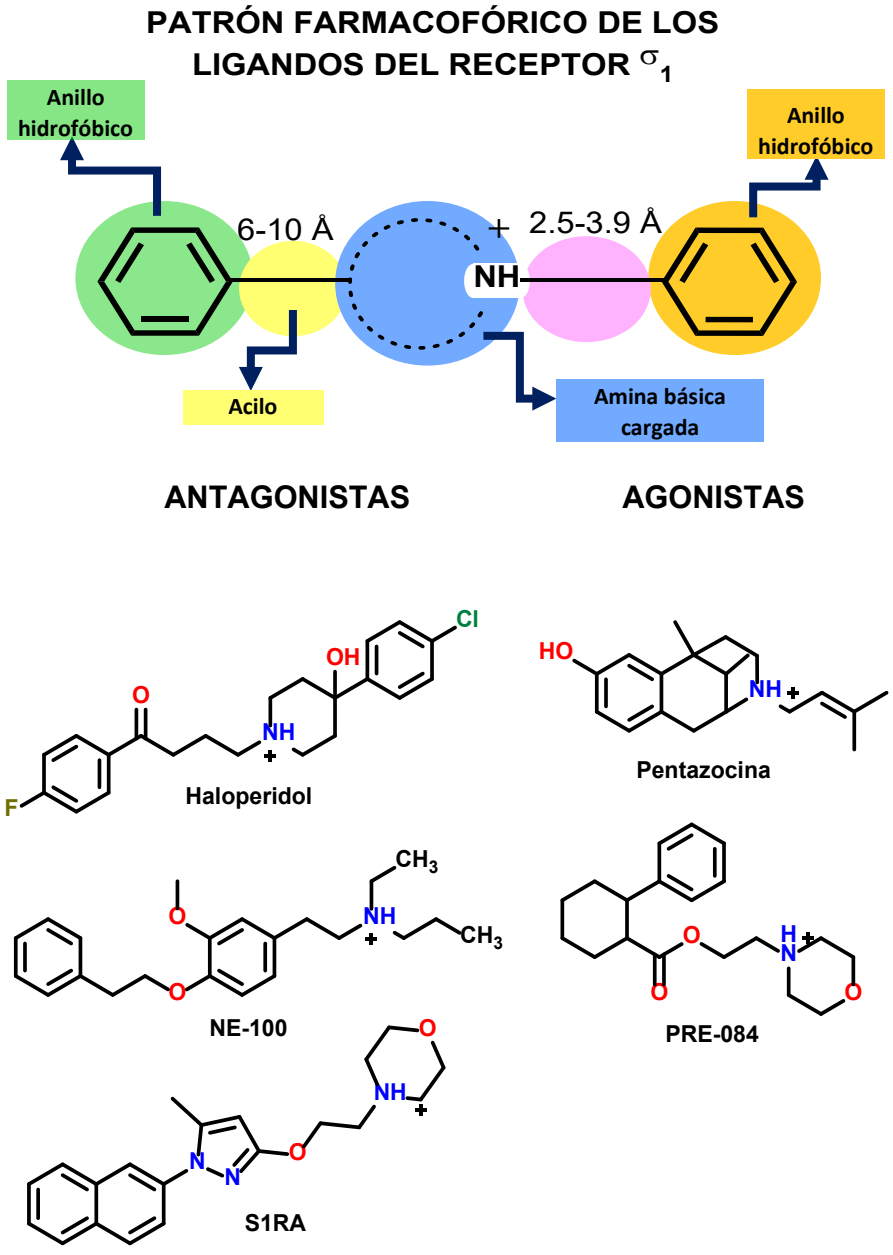


Figura 21. Patrón farmacofórico de los ligandos de σ_1R propuesto por Glennon y ligandos representativos.[55]

Los ligandos interactúan con σ_1R mediante interacciones electrostáticas entre el residuo de aminoácido Glu-172 y el nitrógeno básico cargado presente en la mayoría de los ligandos sintéticos del receptor. Además, se presentan interacciones de van der Waals entre la región hidrofóbica y los residuos de aminoácido Val-84, Trp-89, Met-93, Tyr-103, Leu-105, Phe-107, Ile-124 y Trp-164 (**Figura 22**).[45]

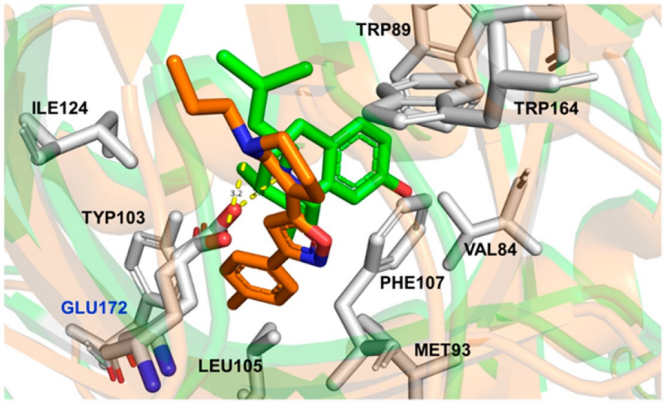


Figura 22. Interacciones entre el antagonista PD144418 (color naranja), y la agonista pentazocina (color verde) y σ_1R. [45]

1.11. Antagonismo del receptor σ_1

Varios estudios han mostrado que el antagonismo de σ_1R, disminuye la señalización del dolor neuropático. Se han usado ratones σ_1R Knockout para identificar que realmente σ_1R participa en la modulación de las vías de señalización del dolor.[56] Para ello se evaluaron modelos de ratón con dolor neuropático y ratones expuestos a estímulos químicos como capsaicina y formalina en donde los ratones mostraron una menor respuesta dolorosa. [57,58]

Debido a que σ_1R es una proteína chaperona que interactúa con varios canales y receptores, aun no se ha logrado una completa comprensión de los mecanismos por los cuales el antagonismo de σ_1R regula negativamente la señalización del dolor. Uno de los mecanismos más estudiados, es la interacción del complejo Receptor σ_1 – proteína HINT1 – NMDA. Cuando σ_1R, uno se une al a un antagonista, el receptor no genera ciertos cambios conformacionales [59] y por lo tanto no será capaz de acoplarse con el receptor NMDA, lo que permitirá que este sea modulado negativamente por la proteína de unión a Ca^{2+}-calmodulina. Al modular de manera negativa al receptor NMDA se reduce la entrada de Ca^{2+} a la célula y la proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} no es activada y por lo tanto no se modula el receptor μ-opioide de manera negativa permitiendo que cuando se administre algún opioide se genere la respuesta analgésica se reduzca la tolerancia frente a esta clase de fármacos (

Figura 23).[19]

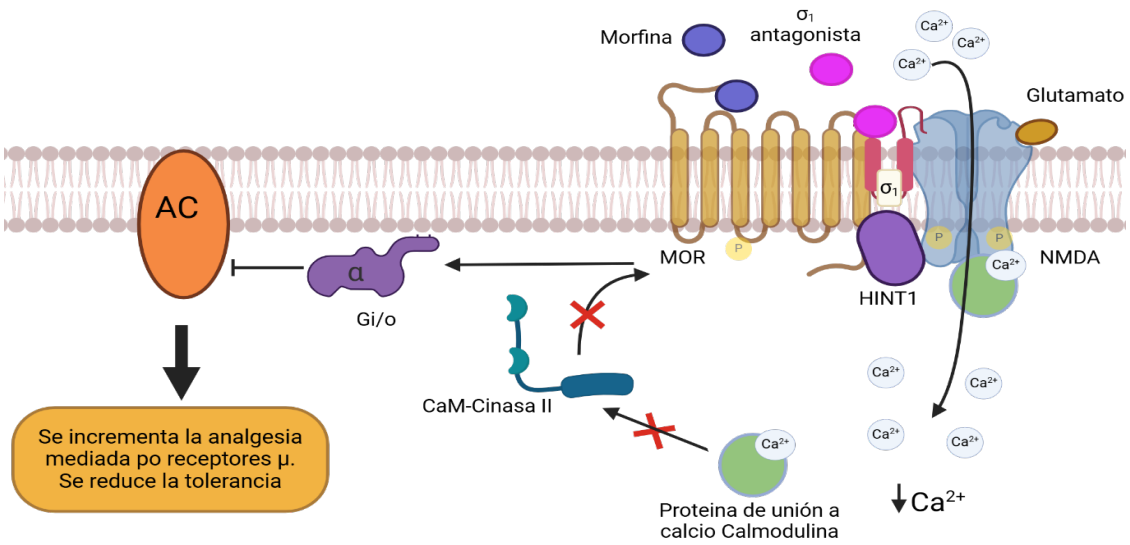


Figura 23 Mecanismo de acción de los antagonistas del receptor σ_1. Editado de Smith y colaboradores. [60]

1.11.1. Haloperidol

El haloperidol fue sintetizado por primera vez en 1958 por Jansen para el tratamiento de los episodios de psicosis en pacientes esquizofrénicos por su actividad como antagonista de los receptores dopaminérgicos D_2, sin embargo, en algunos estudios se reportado un efecto analgésico que pudiera estar mediado principalmente por el antagonismo de σ_1R.

En la **Figura 24** podemos observar que el fármaco haloperidol se une a σ_1R mediante la interacción electrostática antes mencionada entre la amina básica del anillo de piperidina y el residuo de aminoácido Glu-172 (E172).

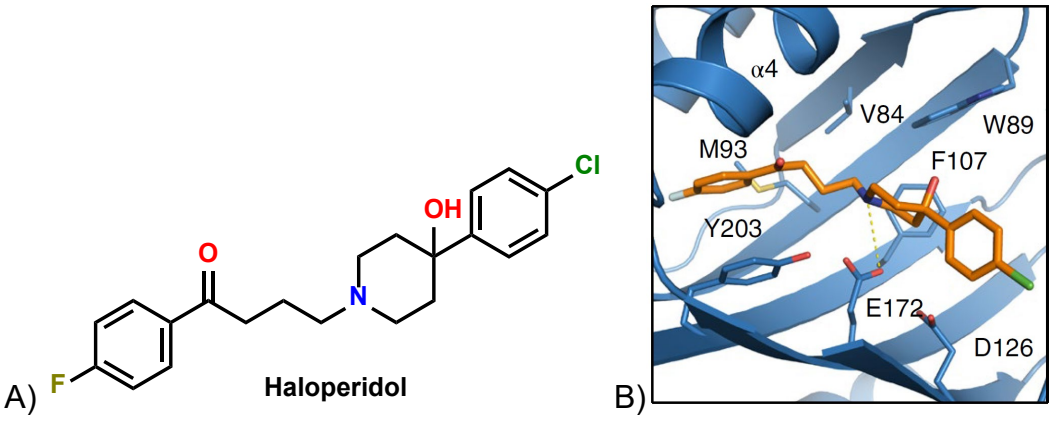


Figura 24. A) Estructura química del haloperidol, B) Interacción de haloperidol con σ_1R.[55]

En un estudio de Espinosa y colaboradores observaron un efecto antinociceptivo, antialodínico y antihiperalgésico al administrar haloperidol en ratas con dolor neuropático (**Figura 25**).[61,62]

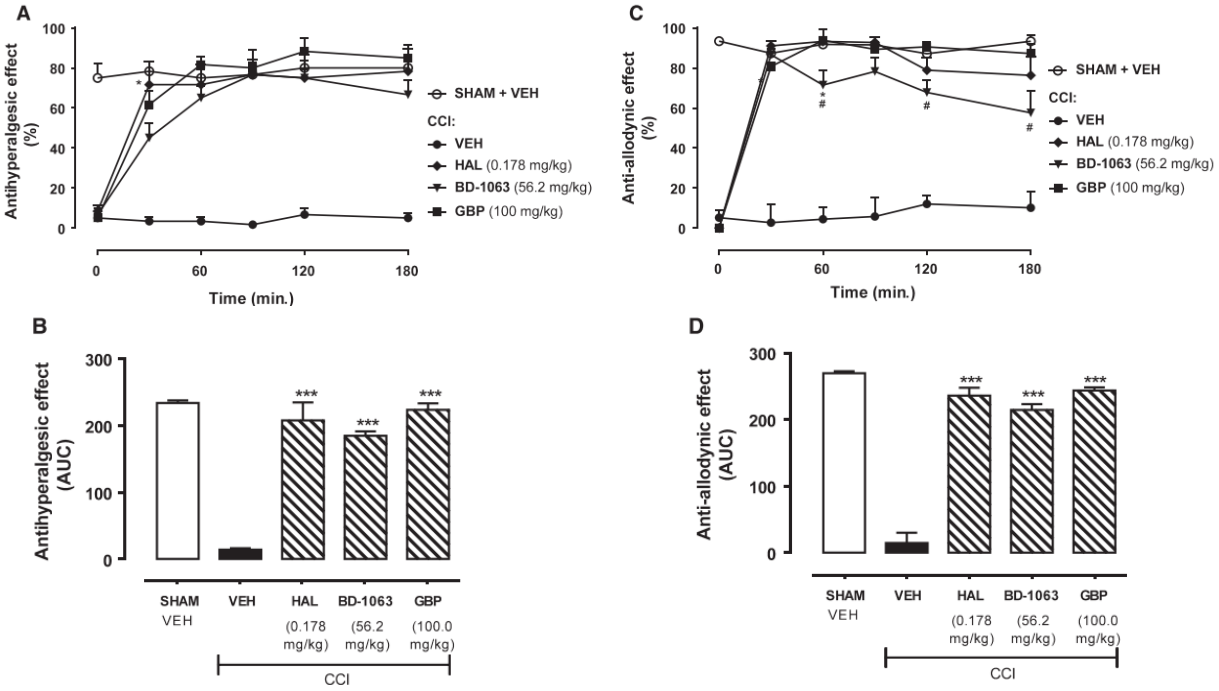


Figura 25. Ensayos *in vivo* del fármaco haloperidol en un modelo de dolor neuropático.[61]

1.11.2. AAO-1

El compuesto **AAO-1** es un análogo del compuesto **S1RA** (antagonista de σ_1R) que fue desarrollado, sintetizado y evaluado por nuestro grupo de trabajo. [63] Al cuál se le hizo un remplazo bioisostérico del anillo naftilo por un anillo sustituido con los átomos de cloro en posiciones 3 y 4, ocupando el mismo espacio estérico que un bifenilo. En adición, se realizó el cambio del anillo imidazol por un grupo amida y la estructura básica de la morfolina se conservó. Dichos cambios mostraron mejores propiedades farmacocinéticas y menos toxicidad en las estimaciones realizadas en programas quimioinformáticas. [63] El compuesto fue evaluado en un modelo de formalina (**Figura 26**). A las ratas se les administró formalina para inducir nocicepción aguda, el compuesto **PRE-084** como agente pronociceptivo y el compuesto **AAO-1** (**C 1**) como agente antinociceptivo. Como se puede observar en la **Figura 26**, hay una respuesta pronociceptiva al administrar **PRE-084** (agonista de σ_1R), dicho efecto se reduce al administrar el compuesto **AAO-1** (antagonista de σ_1R). De esta manera se valida que el efecto anticonceptivo esta dado por la modulación de los receptores σ_1R.

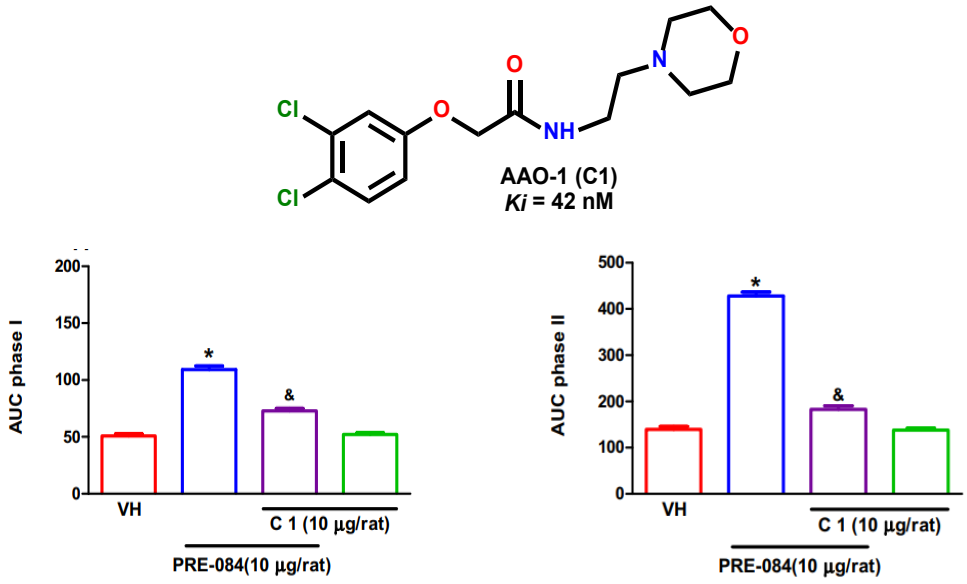


Figura 26. Evaluación *in vivo* del efecto antinociceptivo de **AAO-1**.[64]

1.11.3. LMH-2

El compuesto **LMH-2** es un análogo del fármaco haloperidol que también fue desarrollado y sintetizado por nuestro grupo de investigación.[54] A partir del fármaco haloperidol se realizaron modificaciones estructurales.[65] El diseño se basó en el intercambio bioisostérico no clásico de grupos funcionales que pudieran reducir la toxicidad, mejorar la actividad y la biodisponibilidad. Dichas modificaciones ya han sido reportadas por nuestro grupo de trabajo.[63] En la **Figura 27** se observan las interacciones moleculares entre **LMH-2** y σ_1R, destacando al contacto electrostático con el residuo Glu-172.

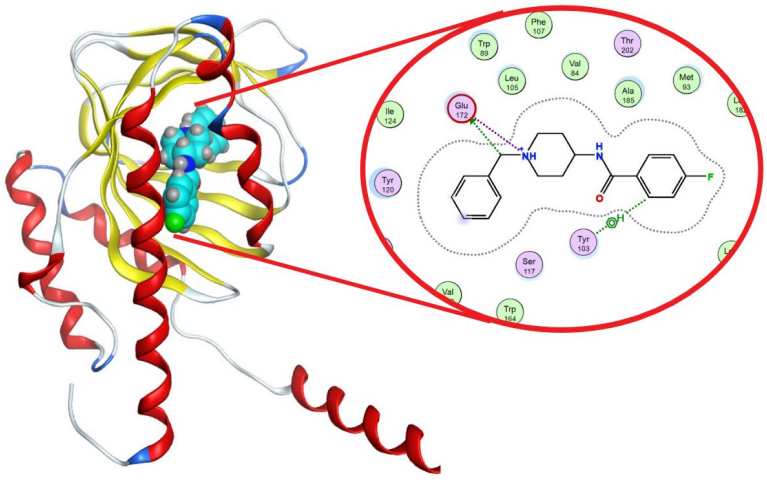


Figura 27. Interacciones entre el compuesto **LMH-2** y σ_1R.[54]

El compuesto **LMH-2** fue evaluado en un modelo de rata con ligaduras de nervios espinales para determinar su efecto antialodínico y antihiperalgésico **(Figura 28**). En dicho ensayo, el compuesto **LMH-2** mostró ser 2 veces más potente como agente antihiperalgésico y 4 veces más potente como agente antialodínico que el fármaco de referencia gabapentina.[54]

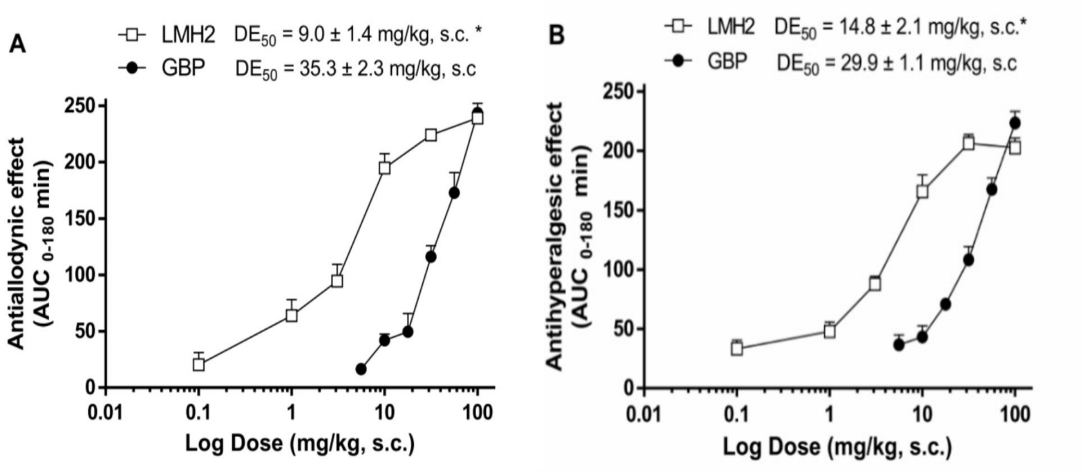


Figura 28. Evaluación *in vivo* del compuesto **LMH-2.**[54]

En 2024, Déciga y colaboradores evaluaron el compuesto **LMH-2** en un modelo de ratón con dolor neuropático inducido por hiperglucemia crónica donde se usó el fármaco haloperidol, el fármaco gabapentina y el compuesto **PRE-084** (agonista del σ_1R) como referencias. Ellos pudieron observar que el compuesto **LMH-2** produce un efecto antialodínico mejor que la gabapentina y un efecto antihiperalgésico similar que la gabapentina. En adición, observaron una relación entre la modulación del σ_1R y el efecto antialodínico, pero no respecto al efecto antihiperalgésico (**Figura 29**). [66]

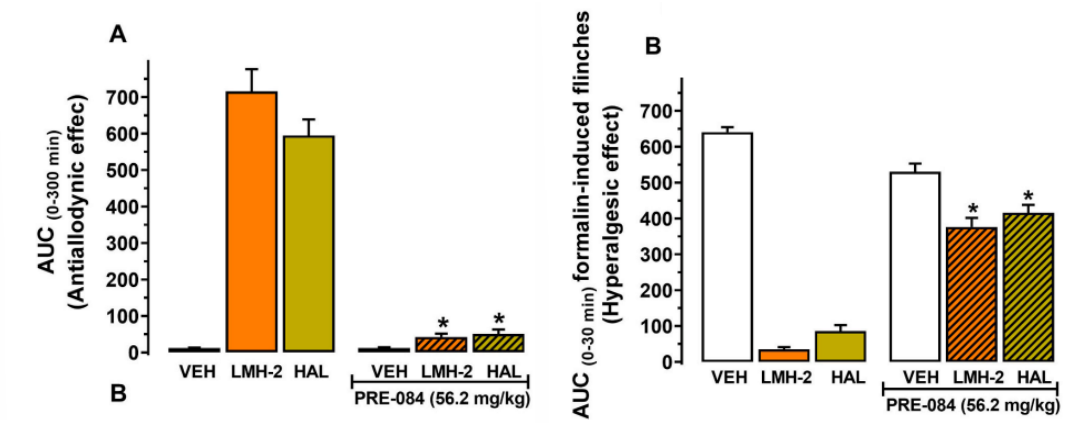


Figura 29. Efecto antialodínico y antihiperalgésico del compuesto **LMH-2**, haloperidol y gabapentina. [66.]

Para la evaluación de los efectos extrapiramidales asociados al antagonismo del receptor D_2 de dopamina se realizó la prueba de Rotarod. En ese estudio pudieron observar que gabapentina y **LMH-2** no inducen disminución de la coordinación motora ni catalepsia en comparación con el fármaco haloperidol (**Figura 30**). [66]

Tabla 1. Alteraciones en las conductas exploratorias inducidas por **LMH-2**, **HAL** y **GBP** en las pruebas de campo abierto y cilindro.

	Prueba de campo abierto		Prueba de cilindro
Tratamiento	**Numero de brincos**	**Número de cruces**	**Número de levantamientos**
VEH	24.5 ± 1.6	69.7 ± 8.1	37.8 ± 2.9
HAL (1 mg/Kg)	4.7 ± 0.9 *	28.2 ± 4.3 *	3.0 ± 2.2 *
HAL (0.18 mg/Kg)	16.2 ± 7.5 *#	38.8 ± 7.6	13.8 ± 5.0*
LMH-2 (56.2 mg/Kg)	26.3 ± 1.8 #	58.8 ± 2.3 #	26.8 ± 3.1 #
GBP (56.2 mg/Kg)	32.5 ± 2.5 #	58.3 ± 6.7 #	26.0 ± 2.1 #

Los valores son con media ± E.S.M. de 6 animales. * P<0.05 frente a VEH, # P<0.05 frente a HAL (1 mg/kg), $F_{(4,75)}$=24.88, ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey.

Tabla 2. Alteraciones en las pruebas de catalepsia y rotarod inducidas por **LMH-2** y **GBP** en comparación con 1 mg/kg de **HAL**.

	Tiempo de en catalepsia (seg) Tiempo de evaluación			Latencia a la caída en la prueba Rotarod (min) Tiempo evaluación		
Tratamiento	**1 h**	**2 h**	**3 h**	**1 h**	**2 h**	**3 h**
VEH	12.7 ± 2.9	14.0 ± 3.3	18.3 ± 5.26	3.9 ± 0.04	4.0 ± 0.01	3.9 ± 0.03
HAL (1 mg/Kg)	105.3 ± 6.4 *	111.2 ± 6.6 *	103.3 ± 10.1 *	1.8 ± 0.2 *	1.7 ± 0.2 *	1.8 ± 0.3 *
HAL (0.18 mg/Kg)	77.3 ± 14.4*	95.5 ± 9.7 *	93.7 ± 6.1 *	2.6 ± 0.4	2.1 ± 0.3 *	2.3 ± 0.4
LMH-2 (56.2 mg/Kg)	28.7 ± 9.3 #	24.7 ± 9.5 #	22.3 ± 6.2 #	3.4 ± 0.4 #	3.3 ± 0.4 #	3.3 ± 0.4
GBP (56.2 mg/Kg)	19.3 ± 3-4 #	29.0 ± 5.0 #	34.2 ± 5.1 #	2.5 ± 0.2 *	1.8 ± 0.3 *	2.2 ± 0.2 *

Los valores son con media ± E.S.M. de 6 animales. * P<0.05 frente a VEH, # P<0.05 frente a HAL (1 mg/kg), $F_{(25,75)}$=4.232 (catalepsia) y $F_{(25,75)}$=7.276 (rotarod), ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey, respectivamente.

Figura 30. Efectos extrapiramidales asociados a la administración de **LMH-2**, gabapentina y haloperidol. Modificado de Deciga-Campos y colaboradores. [66]

2. JUSTIFICACIÓN

El dolor neuropático presenta una alta incidencia en la población y el daño causado por este padecimiento disminuye considerablemente la calidad de vida de los pacientes. Adicionalmente, el tratamiento disponible para el dolor neuropático no es efectivo, por lo tanto, es de suma importancia contar con alternativas terapéuticas innovadoras y efectivas. Con base en lo anterior, en este proyecto se plantea el diseño de una serie de moléculas análogas del compuesto **LMH-2**, compuesto antagonista de los receptores σ_1, que actúen como agentes antialodínicos, con la finalidad de disminuir el dolor neuropático y por lo tanto mejorar la calidad de vida de los pacientes, así mismo, generar un menor gasto sanitario y reducir la problemática de farmacodependencia asociado al uso de medicamentos opioides.

3. HIPÓTESIS

Los compuestos *N*-acilpiperidinas (**WAD 1-9**) diseñados en este proyecto poseerán efecto antialodínico en un modelo de dolor neuropático al ser antagonistas del receptor σ_1.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Diseñar, sintetizar y evaluar *in combo* una serie de compuestos *N*-acilpiperidinas (**WAD 1-12**) como antagonistas del receptor σ_1 para el tratamiento experimental del dolor neuropático.

4.2. Objetivos particulares:

- Diseñar, sintetizar, purificar y caracterizar compuestos *N*-acilpiperidinas (**WAD 1-9**).
- Llevar a cabo predicciones *in silico* de las características farmacodinámicas, farmacocinéticas y toxicológicas de los compuestos diseñados empleando herramientas quimioinformáticas.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular de la serie de compuestos **WAD 1-9** para determinar el posible modo de unión sobre el receptor σ_1.
- Realizar un análisis de consenso farmacológico (ACOFA) para la selección de *Hits* computacionales seguros para priorizar su síntesis y realizar evaluaciones biológicas.
- Evaluar *in vitro* la afinidad de los compuestos *hits* computacionales sobre el receptor σ_1.
- Evaluar *in vivo* el efecto antinociceptivo de los *hits* computacionales en un modelo de ligaduras de nervios espinales (LNE).

5. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO MOLECULAR

Para el diseño de los compuestos **WAD 1-9**, se tomó como referencia el patrón farmacofórico de los ligandos de σ_1R que consta de una amina terciaria ionizable a pH fisiológico que es importante para la interacción con el residuo de aminoácido Glu-172, una región aromática del lado derecho con un espaciador de 2.5-3.9 Å y una segunda región aromática del lado izquierdo con un espaciador entre 6-10 Å que son relevantes para reforzar con interacciones hidrofóbicas entre el compuesto y σ_1R (**Figura 31**).

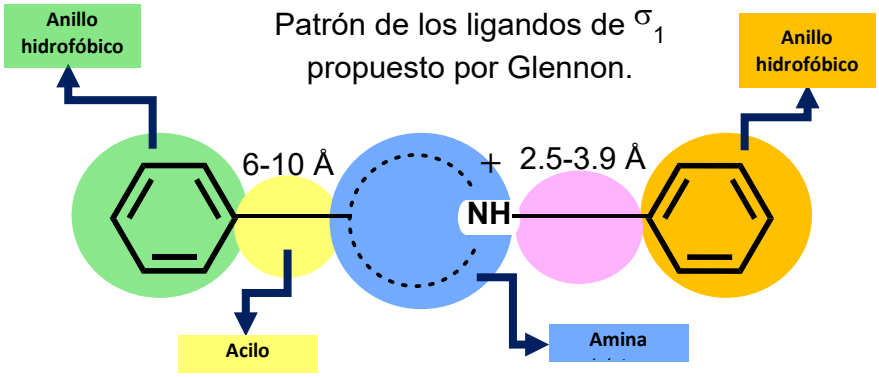


Figura 31. Patrón farmacofórico de los ligandos de σ_1R propuesto por Glennon.[53]

Como se puede observar en la **Figura 32**, los compuestos diseñados en este proyecto que cumplen con las distancias establecidas en los modelos farmacofóricos de Glennon, PricI y Navarrete, que determinan valores de distancias entre las regiones aromáticas y la amina básica:

- Distancia A: Distancia entre el centro del anillo aromático adyacente al grupo acilo y el nitrógeno cargado.
- Distancia B: Distancia entre el centro del anillo aromático adyacente a la piperidina y el nitrógeno cargado.
- Distancia C: Distancia entre los centros de ambos anillos aromáticos.

Modelo para antagonistas σ_1	Distancia intramolecular (Å)		
	A	B	C
Glennon (2005)	6-10	2.5-3.9	7-9
PricI (2011)	3.6	7.0	8.5
Navarrete-Vazquez (2016)	5.9	3.9	9.3

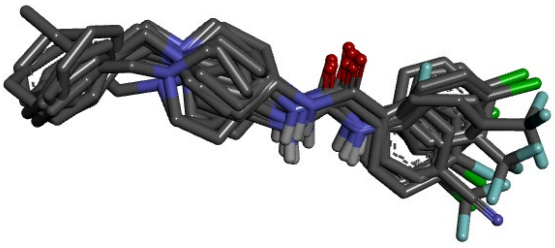


Figura 32. A) Propuestas de modelos farmacofóricos para los ligandos de σ_1R. B) Sobreposicionamiento de los compuestos **WAD 1-9**.

Adicionalmente se consideró al compuesto **S1RA,** el cual ha mostrado una afinidad con valor de *Ki* de 17 nM sobre σ_1R en ensayo *in vitro*, cabe mencionar que actualmente se encuentra en evaluaciones preclínicas de fase IIa para el tratamiento del dolor neuropático.[67] Además, se consideraron a los compuestos desarrollados en nuestro grupo de investigación: **LMH-2** y **AAO-1**. [54,64]

Los compuestos diseñados en este proyecto son análogos del compuesto **LMH-2**, cuya afinidad sobre σ_1R de 6 nM ha sido reportada.[54] Las modificaciones estructurales realizadas para el diseño constan de intercambios bioisostérico clásicos univalentes del átomo de hidrógeno por un halógeno (Cl o F) o bien por un grupo CF_3 en las posiciones, *meta* y/o *para* del anillo aromático vecino al grupo carbonilo, esto con la finalidad de modificar las propiedades electrónicas y/o lipofílicas de los compuestos.[68,69] Aunado a esto, el remplazamiento bioisostérico del hidrógeno en posición *para* del anillo por un halógeno se realizó para evitar la *p*-hidroxilación en el proceso de metabolismo de fase I y de esta manera prologar la vida media del fármaco y permitir que este llegue a su sitio de acción. Otra razón para usar átomos de cloro en el diseño fue para favorecer interacciones de tipo σ-hole con el sitio de unión de la proteína (**Figura 33**). En el caso de los compuestos **WAD 4-9** se realizó un intercambio bioisostérico del grupo amida por una urea**.** De esta manera se podrían reforzar las uniones de los compuestos mediante interacciones de puente hidrógeno reforzado y/o mejorar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos.[70] Así mismo, al realizar diferentes sustituciones se podrían conjuntar los datos obtenidos en este proyecto con trabajos previos y futuros para desarrollar un análisis de relación estructura-actividad.

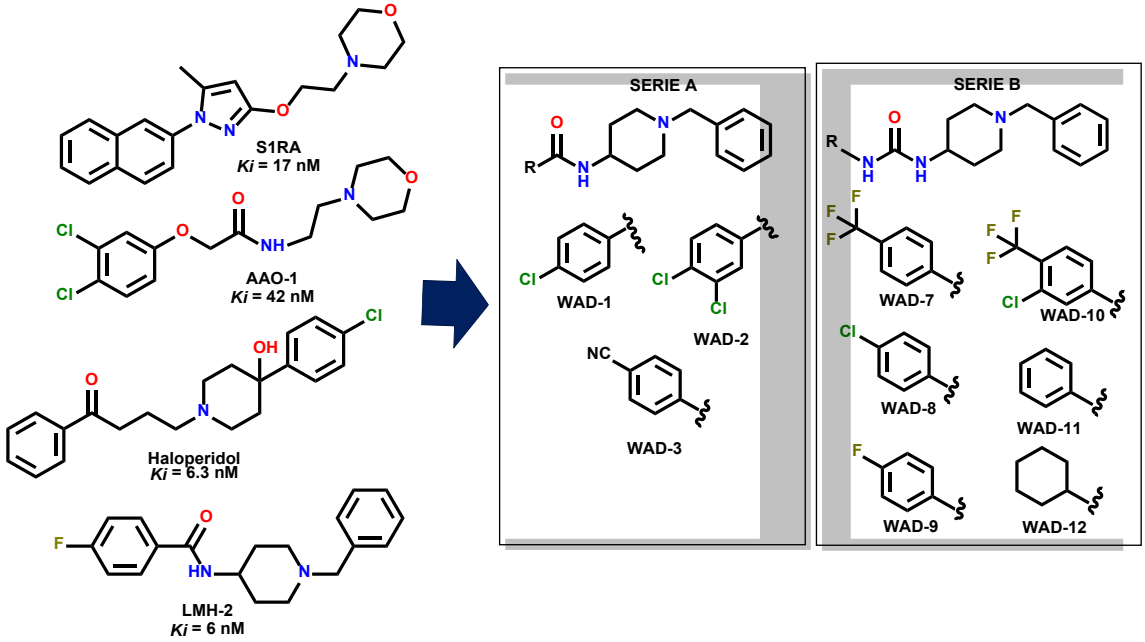


Figura 33. Consideraciones para el diseño de los compuestos **WAD 1-9.**

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La metodología empleada para el desarrollo de este proyecto de tesis se dividió en tres partes:

a) Parte *in silico*: El diseño y la evaluación *in silico* de los compuestos se desarrolló en el Laboratorio 5 de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (FF-UAEM) bajo la dirección del Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez. En esta parte de la evaluación se usaron herramientas quimioinformáticas para la predicción de las propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas (AdmetSAR, AdmetLab, SwissADME y ADMET-AI), para la predicción del espectro de actividad biológica (SIGMAP), y para la predicción del perfil toxicológico (AdmetSAR, ACD/Tox. Suite, y Admet AI). El acoplamiento molecular dirigido de la serie de compuestos **WAD 1-9** con el receptor σ_1 y el modelado por homología y acoplamiento con el receptor σ_2 se llevó a cabo usando el servidor MOE.

b) Parte química: El análisis retrosintético y la síntesis de los compuestos finales **WAD 1-9** se llevó a cabo en el Laboratorio 5 de la FF-UAEM bajo la dirección del Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez. Para esta parte se hizo reaccionar 4-amino-1-bencilpiperidina con los electrófilos debidamente sustituidos. Los compuestos sintetizados fueron caracterizados mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas por impacto electrónico (EM-IE) en colaboración con el Dr. Emanuel Hernández Núñez del Departamento de Posgrado e investigación, Instituto Tecnológico Superior de Calkiní, el cDr. Josué Martínez Miranda de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y el doctor David Morales Morales del Instituto de Química de la UNAM

b) Parte farmacológica: La evaluación *in vitro* se realizó en colaboración con el Dr. Héctor Torres Gómez y el Profr. Dr. Bernard Wünsch del departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Münster Alemania. En esta parte se llevó a cabo un estudio de radioinmunoensayo (binding) donde se usó cerebro de cuyo como fuente de receptores sigma y pentazocina tritiada [^{3}H](+)-pentazocina) como ligando radiomarcado. La evaluación *in vivo* del efecto antialodínico se realizó en colaboración con la Dra. Myrna Déciga Campos, la M.F. Diana Morales Galindo de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y el Dr. Vinicio Granados Soto del departamento de farmacobiología del Cinvestav-Unidad Sur. En esta parte se usó el modelo de ligadura de nervios espinales (LNE) para generar dolor neuropático y para la evaluación de alodinia táctil se utilizaron filamentos de Von Frey mediante el método up & down.

6.1. Parte *in silico*

En la evaluación *in silico* se emplearon herramientas quimioinformáticas, donde generalmente se ingresan las estructuras químicas en código de sistema de introducción linear molecular simplificado (SMILES, por sus siglas en inglés), ya sea individualmente o recopiladas en un archivo con extensión CVS dependiendo la compatibilidad de los programas. Las estimaciones se generan mediante la comparación de las estructuras ingresadas frente a las estructuras contenidas en las bases de datos con las propiedades de interés reportadas. Generalmente los datos se obtienen en tablas muy prácticas y fáciles de analizar y la mayoría de los portales proporcionan archivos descargables en formato PDF o CVS.

6.1.1. Predicción de las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción: admet-SAR, SwissADME, ADMETlab 3.0 y ADMET-AI

Para realizar las estimaciones de las propiedades ADMETox se usaron los siguientes portales y programas que están disponibles en internet:

- admetSAR 3.0. (https://lm md.ecust.edu.cn/admetsar3/predict.php) [71]
- SwissADME (http://www.swissadme.ch/index.php) [72]
- ADMETlab 3.0 (https://admetlab3.scbdd.com/) [73]
- ADMET-AI (https://admet.ai.greenstonebio.com/) [74]
- Biotransformer (https://biotransformer.ca/) [75]

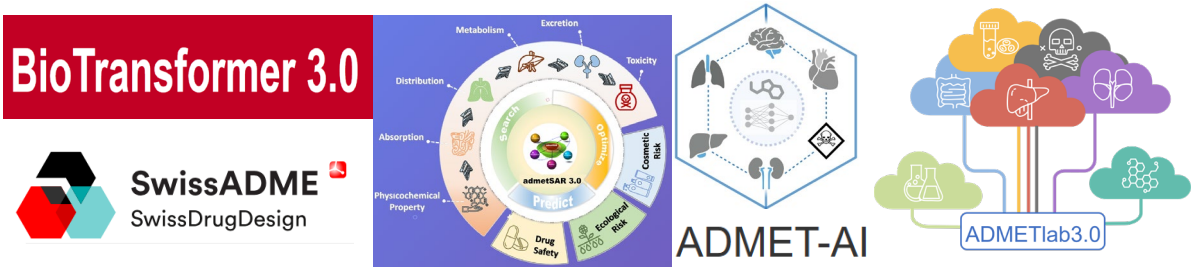


Figura 34. Programas usados para predecir las propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas.

Estos servidores de libre acceso (**Figura 34**) permiten realizar estimaciones de las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas, farmacocinéticas y toxicológicas de los compuestos ingresados a la base (log P, solubilidad, permeabilidad, inhibición de CYP 450, absorción intestinal, entre otros) mediante un análisis de similitud estructural entre los compuestos que se quieren estudiar y los que ya se encuentran en sus respectivas bases de datos.

Predicción de las propiedades toxicológicas

Para las estimaciones de esta categoría se emplearon uno de los portales antes mencionados, y los programas que se mencionan a continuación (**Figura 35**):

- DataWarrior. [76]
- ACD/Toxsuite. [77]

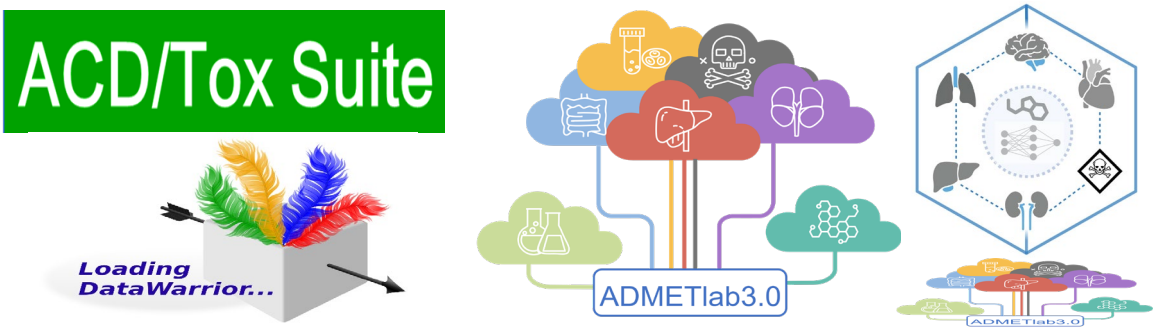


Figura 35. Programas usados para la predicción de propiedades toxicológicas.

Data Warrior es un programa gratuito que permite realizar predicciones de las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas (TPSA, log P, mutagenicidad, teratogenicidad, e irritabilidad) de los compuestos. Mientras que el servidor ACD/ToxSuite es un programa que requiere licencia para su uso en el cual se pueden realizar estimaciones de inhibición de algunas de las isoformas de CYP-450, toxicidad aguda, y bloqueo de los canales hERG.

6.1.2. Predicción del perfil farmacodinámico

La predicción de las propiedades en esta categoría se llevó a cabo usando los siguientes portales gratuitos (**Figura 36**):

- SIGMAP (https://www.ba.ic.cnr.it/softwareic/sigmap/#)

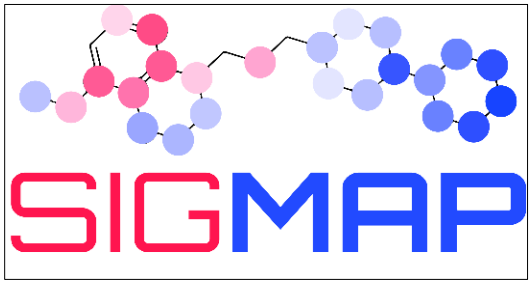


Figura 36. Herramientas usadas para la predicción de propiedades farmacodinámicas.

El servidor SIGMAP es una herramienta de inteligencia artificial de libre acceso que nos permite estimar la afinidad con σ_1R. Esta herramienta se basa en un análisis de similitud estructural entre los compuestos ingresados y los compuestos disponibles en su base de datos.[78]

6.1.3. Acoplamiento molecular dirigido

El acoplamiento molecular es una herramienta computacional que juega un papel clave en el diseño y desarrollo de fármacos asistido por computadora que analiza la conformación y la orientación ("pose") de las moléculas en el sitio de unión de un blanco macromolecular. Este ensayo se usa para identificar las dianas con las que los ligandos presentan una buena complementariedad (ajuste inducido), además permite predecir los patrones de interacción para evaluar los posibles modos de unión de ligando-receptor. Para este estudio empleamos el programa MOE que requiere licencia para su uso (**Figura 37**). [79–81] El programa Pymol es un servidor que brinda una licencia educacional en donde nos permite realizar visualizaciones 3D de los resultados obtenidos en el acoplamiento. Su portal es muy intuitivo y nos permite obtener imágenes y animaciones en video con muy buena resolución.



Figura 37. Herramientas usadas para acoplamiento molecular y visualización.

6.1.4. Modelado por homología

Para realizar el modelado por homología se realizó una búsqueda de la secuencia de la estructura primaria del receptor σ_2 de humano se realizó en el portal Uniprot (https://www.uniprot.org/). Posteriormente, con la secuencia de la estructura primaria se realizó la búsqueda de una estructura cristalizada adecuada del receptor σ_2, para seleccionar el cristal adecuado, se decidió considerar la proteína con código **7M93** de Protein data bank (https://www.rcsb.org/) ya que la proteína tenía un ligando co-cristalizado para obtener un templete adecuado que mantuviera la cavidad para poder realizar el acoplamiento molecular.

6.2. Parte química

6.2.1. Retrosíntesis

El análisis retrosintético es una parte importante para la obtención de compuestos de partida (equivalentes sintéticos) y la elección de una ruta síntesis adecuada para la obtención de los compuestos diseñados en este proyecto. A partir de los compuestos finales se realizan desconexiones y/o intercambios de grupos funcionales para la obtención de los sintones y retrones y sus correspondientes equivalentes sintéticos.

6.2.1.1. Retrosíntesis de los compuestos de tipo benzamida

En la retrosíntesis de los compuestos **WAD 1-6** se realizó una desconexión entre el carbonilo y el nitrógeno de la amida, dando al catión acilo y al anión amino, por lo tanto, sus correspondientes equivalentes sintéticos son los halogenuros de ácido debidamente sustituidos y la 4-amino-1-bencilpiperidina los cuales se encuentran comercialmente disponibles (**Diagrama 1**).

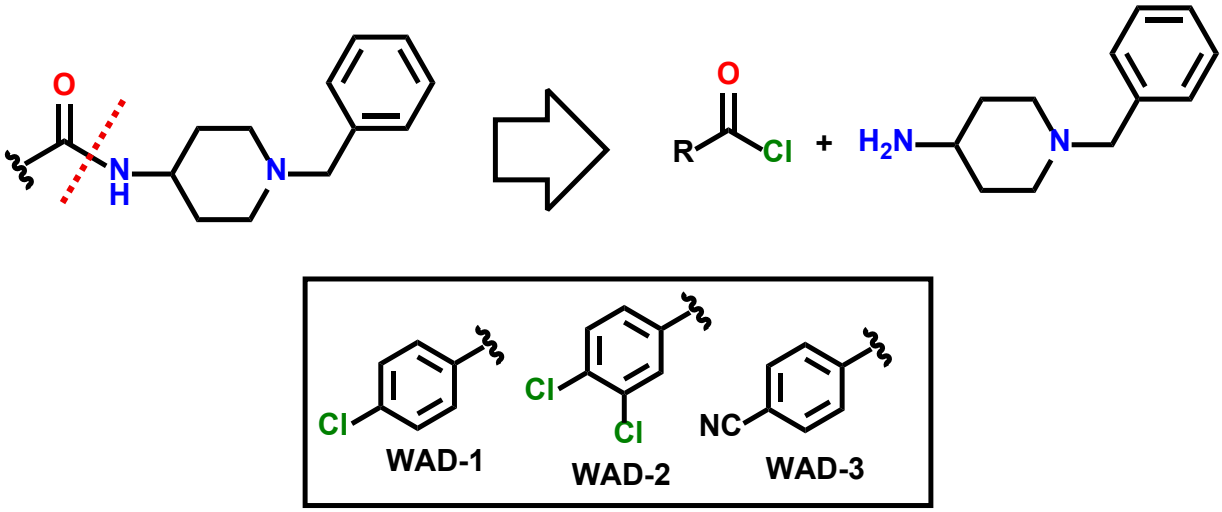


Diagrama 1. Retrosíntesis de los compuestos **WAD 1-3**.

6.2.1.2. Retrosíntesis de los compuestos de tipo urea

En la retrosíntesis de los compuestos **WAD 4-9** se realizó una desconexión entre el nitrógeno vecino al anillo piperidina y el carbonilo de la urea generando a los isocianatos de fenilo debidamente sustituidos y la 4-amino-1-bencilpiperidina (**Diagrama 2**) comercialmente disponibles.

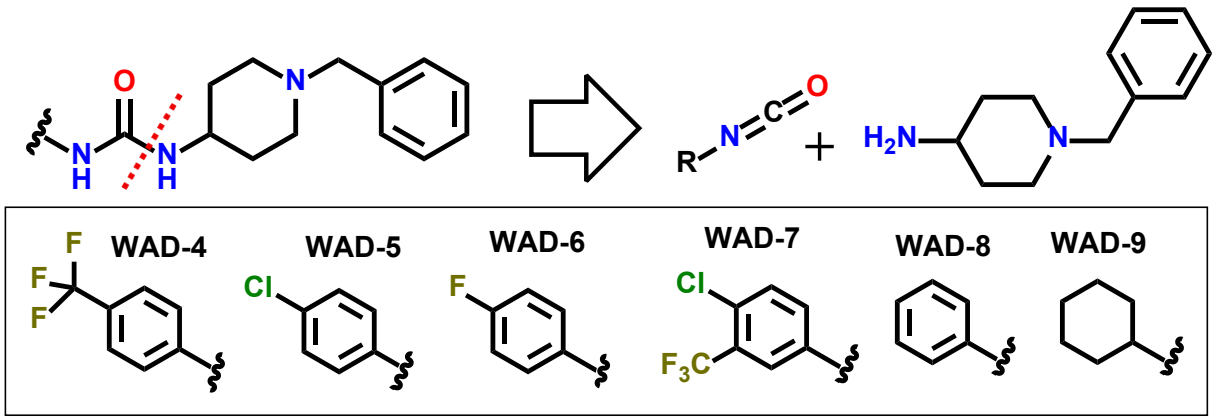


Diagrama 2. Retrosíntesis de los compuestos **WAD 4-9**.

6.2.2. Síntesis química

6.2.2.1. Metodología para la síntesis de los compuestos *N*-(1-bencilpepiridin-4-il)benzamidas (WAD 1-3).

La síntesis de los compuestos **WAD 1-3** se llevó a cabo mediante la reacción de Schotten-Baumann, utilizando 4-amino-1-bencilpiperidina y los cloruros de benzoilo adecuadamente sustituidos en las posiciones 3 y 4 (**Diagrama 3**).

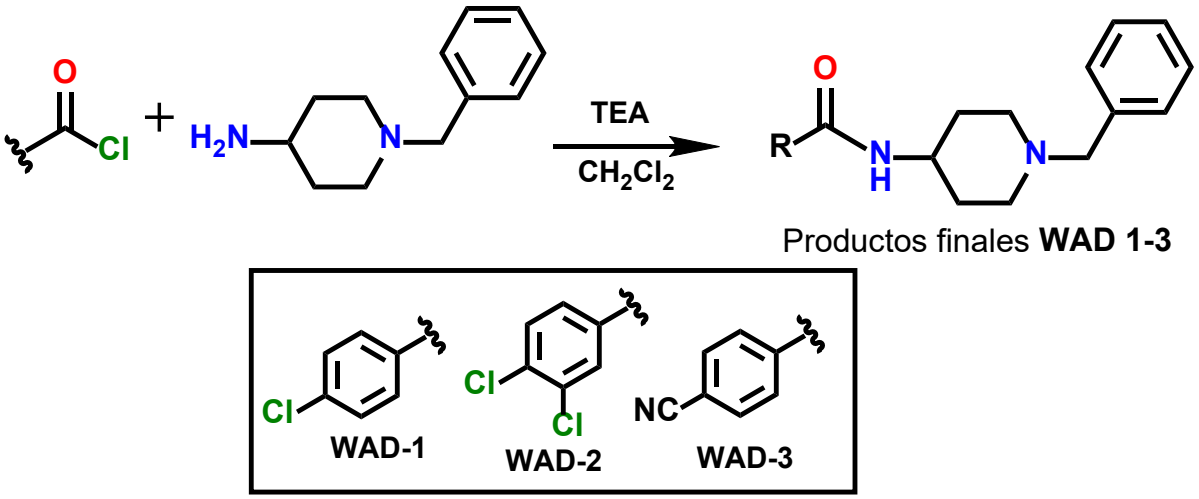
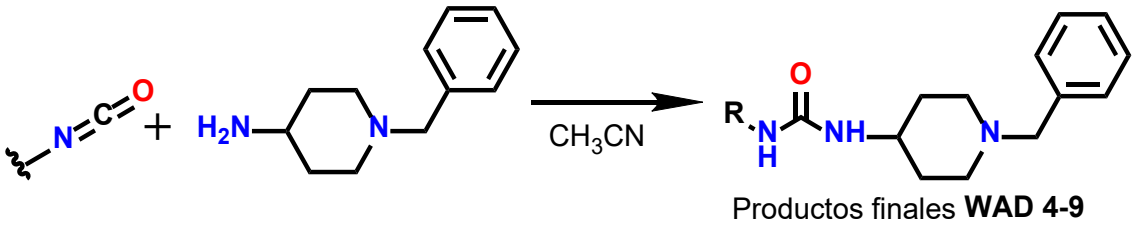


Diagrama 3. Síntesis de los compuestos **WAD 1-3**.

6.2.2.2. Metodología para la síntesis de los compuestos de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-*N´*-arilureas (WAD 4-9).

Los compuestos **WAD 4-9** se obtuvieron mediante la síntesis de Whöler, que se llevó a cabo utilizando 4-amino-1-bencilpiperidina y los isocianatos de arilo o cicloalquilo adecuadamente sustituidos en las posiciones 3 y 4 (**Diagrama 4**).



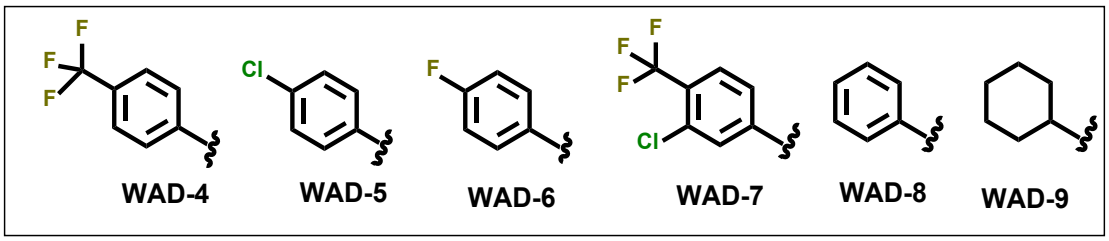


Diagrama 4. Síntesis de los compuestos **WAD 4-9**.

6.3. Evaluación *in vitro*: Radioinmunoensayo (binding sobre σ_1R)

Para la evaluación *in vitro* se llevó a cabo un radioinmunoensayo (binding) en el cual se empleó cerebro de cuyo como fuente de σ_1R y pentazocina titriada ([^{3}H]-(+)-Pentazocina). Para el caso de los σ_2R se usó hígado de rata como fuente de los receptores y di-*orto*-tolilguanidina titriada ([^{3}H]-(+)-DTG) como ligando radiomarcado (**Figura 38**).[82]

6.3.1. Preparación de la membrana de cerebro de cuyo

El cerebro de cuyo se homogenizó con sacarosa (0.32 M) en frío. Esta solución se centrifugó a 1200 rpm/10minutos/4°C. El sobrenadante se separó y se centrifugó a 23 500 rpm/20minutos/4°C. El sedimento se re-suspendió en 5-6 cantidades de Buffer-TRIS (50 nM y pH 7.4) y se centrifugó nuevamente por duplicado. El sedimento final se re-suspendió en 5-6 cantidades de buffer y se conservó a -80°C en porciones de 1.5 mL que contienen aproximadamente 1.5 mg de proteína/mL. [82]

6.3.2. Preparación de la membrana de hígado de rata

El hígado de rata se homogenizó con sacarosa (0.32 M) en frío. Esta solución se centrifugó a 1200 rpm/10minutos/4°C. El sobrenadante se separó y se centrifugó a 31 000 rpm/20minutos/4°C. El sedimento se re-suspendió en 5-6 cantidades de Buffer-TRIS (50 nM y pH 8) y se centrifugó nuevamente a 31 000 rpm/20minutos/4°C. El sedimento final se re-suspendió en 5-6 cantidades de buffer y se conservó a -80°C en porciones de 1.5 mL que contienen aproximadamente 2 mg de proteína/mL.[82]

6.3.3. Ensayo de unión general

Para la preparación del compuesto se disolvieron aproximadamente 10 μmol (2-4 mg) en la cantidad requerida de DMSO para obtener una solución stock de 10 mM. Para obtener las concentraciones requeridas para la evaluación se realizaron diluciones a partir de la solución con la solución tampón correspondiente a cada evaluación. Se remojaron los filtros en solución acuosa de polietilamina al 0.5% durante dos horas antes de utilizarse. Las evaluaciones se realizaron por duplicado. En la placa de 96 pocillos se colocaron:

- 50 μL de buffer.
- 50 μL de diferentes concentraciones del compuesto **WAD-2**.
- 50 μL del radioligando.
- 50 mL del receptor (100 μg)

La placa de 96 pocillos se mantuvo en agitación a 500 – 600 rpm durante 2h. Posteriormente se filtraron los pocillos, cada pocillo fue lavado con alrededor de 300 µL de agua. Los filtros se secaron a 95° C y se fundió el centellador sólido sobre los filtros secos a 95°C durante 5 minutos. La radioactividad atrapada en el filtro se midió con el contador de centelleo durante 5 minutos. La CI_{50} se determinó mediante una regresión no lineal y posteriormente se transformó en Ki. Los valores de Ki son dados como un promedio ± error estándar de la media de tres experimentos independientes. [82]

6.3.4. Ensayo de unión σ_1R

Para el ensayo se usó [^{3}H]-(+)-Pentazocina (22.0 Ci/mmol; Perkin Elmer) como ligando radiomarcado. La preparación de la membrana del corte de cerebro de cuyo (100 µg de proteína) fue incubada con 2 nM de [^{3}H]-(+)-Pentazocina, solución buffer TRIS (50 nM, pH 7.4) a 37°C. El valor de K_d de (+) pentazocina es de 2.9 nM. [82]

1.1.1. Ensayo de unión σ_2R

Para el ensayo se usó ([^{3}H]-DTG) (specific activity 50 Ci/mmol; ARC, St. Louis, MO, USA). La preparación de la membrana del corte de hígado de rata (100 µg de proteína) fue incubada con 3 nM de [^{3}H]-(+)-DTG, solución buffer (500 nM (+)-pentazocina en 50 nM TRIS, pH 7.4) a 25°C. El valor de K_d de DTG es de 17.9 nM. [82]

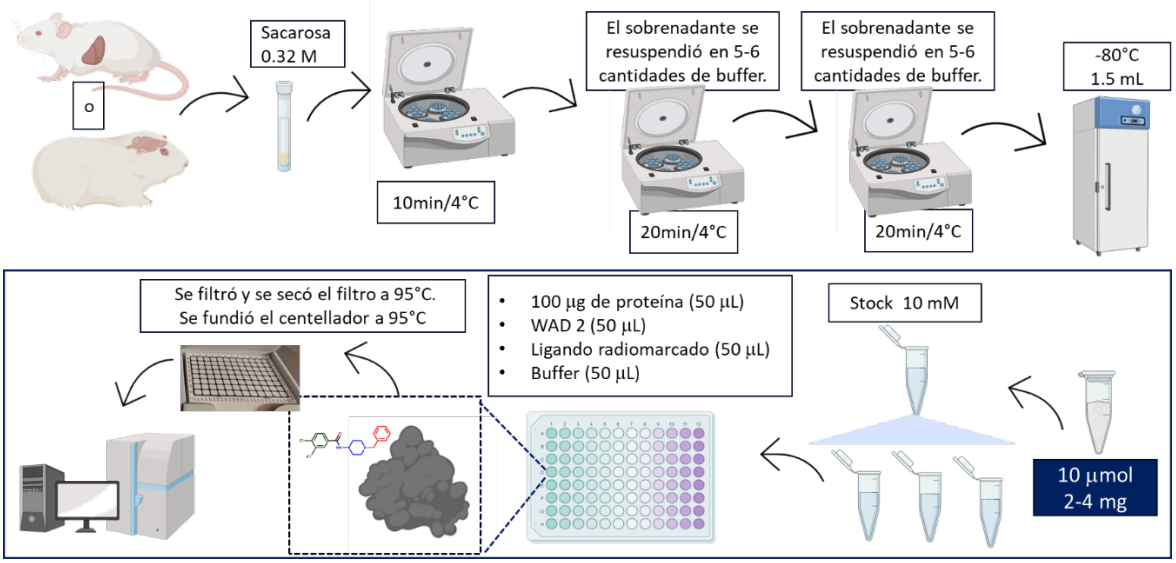


Figura 38. Evaluación *in vitro* de la afinidad del compuesto **WAD-2** con σ_1R y σ_2R. Imagen realizada en Biorender.com

1.2. Evaluación *in vivo*

1.2.1. Animales

Para la evaluación *in vivo* se emplearon ratas Wistar hembra con un peso de 120-140 g al momento de realizar la cirugía. Las evaluaciones se realizaron de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 y las especificaciones técnicas para el uso de animales siguiendo un modelo de dolor autorizado por la IASP. El protocolo para la evaluación de alodinia está autorizado por el CICUAL del CINVESTAV (0042-13). Para el experimento se consideraron 6 grupos con una "n" de 6 ratas:

1) **Naive**: Este grupo de ratas es el grupo control para la validación del modelo de LNE, al cual no se le realiza ningún tratamiento.
2) **Sham**: Grupo que se usa para la validación del modelo de LNE, las ratas son diseccionadas para exponer los nervios espinales, sin embargo, no son ligadas.
3) **LNE**: Este grupo de ratas es usado para realizar la validación cirugía del modelo de LNE. A este grupo se le realiza una ligadura de los nervios espinales L_5 y L_6.
4) **PRE-084**: Grupo con cirugía al que se le administra el agonista σ_1R **PRE-084** que se utiliza como control negativo en la determinación del efecto antialodínico de **WAD-2**.
5) **WAD-2**: Grupo con cirugía de LNE, al que se les administra el potencial antagonista σ_1R **WAD-2** para la determinación de su efecto antialodínico.
6) **WAD-2+PRE-084**: Grupo de ratas al cual se le administran el agonista σ_1R **PRE-084** y 1.5 h después de coadministra el potencial antagonista σ_1R **WAD-2**, para la determinación de la respuesta antialodínica de **WAD-2**.

1.2.2. Modelo de ligaduras espinales (LNE)

Previo a la cirugía, se realizó una evaluación basal con filamentos de Von frey. Posteriormente a los grupos **PRE-084**, **WAD-2** y **WAD-2+PRE-084** se les realizó una cirugía de ligadura de los nervios espinales L_5 y L_6 (LNE, por sus siglas en inglés) para interrumpir la neurotransmisión y generar un modelo de dolor neuropático con alodinia.[83,84] Las ratas se anestesiaron con ketamina/xilacina (50/12 mg/Kg, i.p.), posteriormente se realizó una disección para exponer los nervios espinales del lado izquierdo L_5 y L_6 y ser ligados con sutura de seda. Al grupo **sham** se les realizó una falsa cirugía, en donde solo se abrió la rata, y se expusieron los nervios L_5 y L_6 pero no se ligaron. El grupo **Naive** se dejó intacto.

1.2.3. Evaluación de alodinia mecánica

La evaluación se realizó con filamentos de Von-Frey (Stoeling co, IL) que son de diferentes calibres que corresponden a diferente fuerza aplicada con los que se aplicó presión en la superficie plantar de la pata izquierda trasera (método up & down).

Las evaluaciones de alodinia táctil de los grupos **PRE-084**, **WAD-2** y **WAD-2+PRE-084** fueron evaluadas 14 días después de la cirugía, donde se realizó un curso temporal de 8 h, en el cual se realizó la determinación de alodinia con los filamentos a las 0, 0.5, 1, 2, 3, 4,6 y 8 h posteriores a la administración intratecal. La prueba consistió en estimular durante 5-8 segundos la parte media de la superficie plantar. La conducta que se consideró como alodinia táctil se cuantificó como el 50% de umbral de retiro (**Figura 39**).

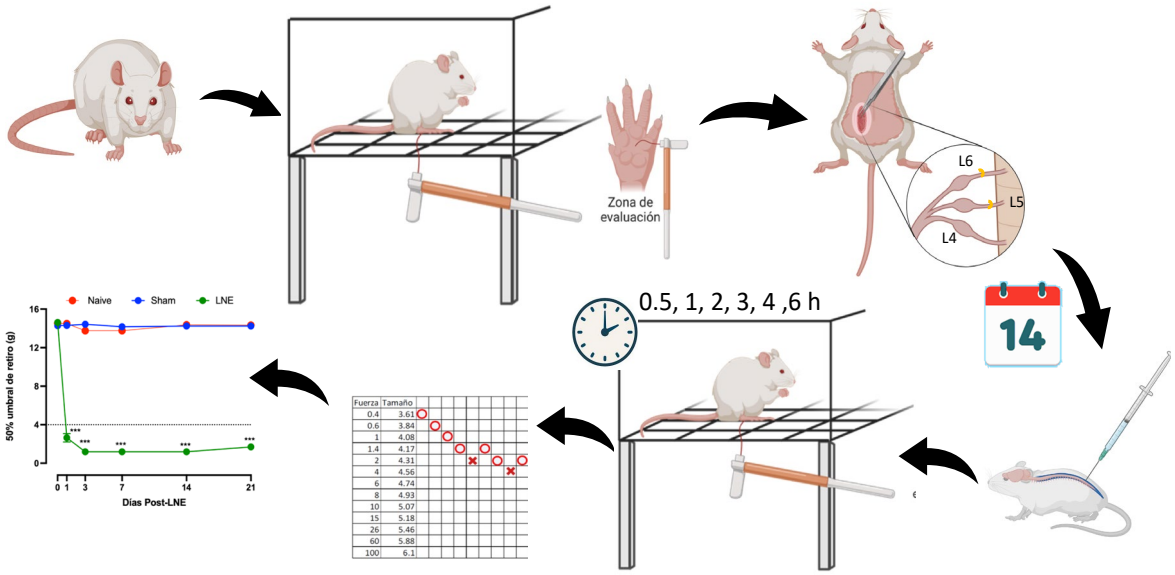


Figura 39. Evaluación *in vivo* de alodinia mecánica del compuesto **WAD-2**. Imagen realizada en Biorender.com

Una respuesta positiva se consideró cuando el animal retiró la pata y se registró con "X"; mientras que una respuesta negativa consistió cuando el animal no retiró la pata y se registró con "0". A partir de la primera respuesta positiva, se realizaron 4 evaluaciones adicionales para obtener cinco mediciones registradas. Con estos valores y el valor del último filamento utilizado se calculó el 50% del umbral de retiro empleando la siguiente fórmula:

$$50\%\ Umbral\ de\ retiro\ (g) = \frac{(10^{(Xf+k\delta)})}{1000}$$

Donde: Xf es el valor del último filamento utilizado; k es el factor de corrección basado en los patrones de respuesta de la tabla de calibración; δ es la diferencia de promedios entre estímulos.

Los resultados de este proyecto se presentan en gráficas de curso temporal en donde se presenta el tiempo en horas (h) en el eje de las "x" y el 50% del umbral de retiro (g) en el eje de las "y". Cabe mencionar que para el caso de las Ratas Sham y Naive los resultados oscilan en 15 g (valores basales), y se considera alodinia táctil cuando el 50% de umbral de retiro es menor a 4 g. Adicionalmente los resultados son presentados en gráficos de barras en donde se muestra el área bajo la curva correspondiente al curso temporal.

Para poder interpretar las gráficas de los resultados, es importante mencionar que cuando las ratas tienen un valor del 50% de umbral de retiro igual o menor a 4 g se considera que las ratas son alodínicas, y se considera un valor basal (sin alodinia) cuando se alcanzan de 12 a los 15 g (**Figura 40**).

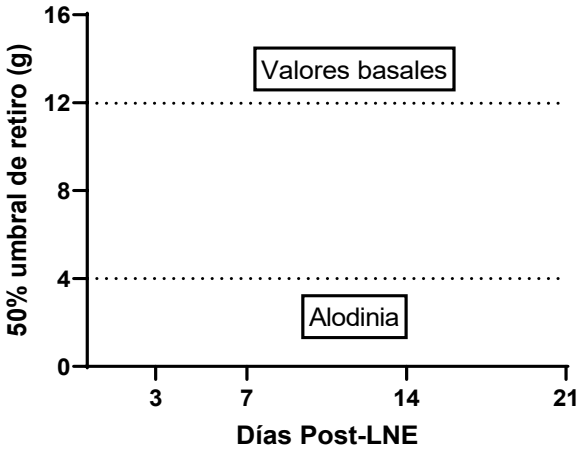


Figura 40. Estructura general de la gráfica de resultados.

1.2.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se expresaron los resultados obtenidos como un promedio ± error estándar de la media. Así mismo, se usó un estudio ANOVA de una vía para saber si existían diferencias significativas entre los grupos. Adicionalmente, se realizó una prueba post hoc de Tukey donde se contempló un valor $p \leq 0.05$ para comparar las concentraciones administradas *vs* el vehículo. Adicionalmente, se determinó el área bajo la curva (ABC) para dosis administrada del agonista σ_1R **PRE-084** y del potencial antagonista σ_1R **WAD-2.**

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Parte *in silico*

2.1.1. Propiedades biofarmacéuticas

En este proyecto se usaron las herramientas SwissADME, y AdmetSAR 3.0, Admet AI y AdmetLab 3.0 para la predicción de las propiedades biofarmacéuticas, en donde se usó como control el compuesto **LMH-2** y el fármaco haloperidol. (**Tabla 2**)

Tabla 2. Predicción de las propiedades biofarmacéuticas de los compuestos **WAD 1-9.**

	Log $D_{7.4}$		Solubilidad acuosa (%)				Permeabilidad Caco2 ($x10^{-6}$ cm/s)				TPSA (Å²)
	Admet Lab	Score	Admet SAR	Admet Lab	Swiss ADME	Score	Admet SAR	Admet Lab	Admet AI	Score	Score
WAD -1	3.20		174.18	104.33	13.93		-4.22	-5.07	-4.86		32.34
WAD -2	3.55		29.73	23.05	3.87		-4.38	-5.43	-4.87		32.34
WAD -3	2.74		630.01	211.02	52.50		-4.45	-5.20	-4.86		56.13
WAD -4	3.64		56.86	8.80	7.58		-4.68	-5.00	-5.00		44.37
WAD -5	3.27		38.14	42.17	7.30		-4.56	-5.26	-4.86		44.37
WAD -6	2.99		92.49	96.90	45.18		-4.57	-5.15	-4.88		44.37
WAD -7	3.77		7.09	6.33	1.96		-4.80	-5.37	-4.93		44.37
WAD -8	2.89		600.54	176.75	177.88		-4.64	-5.14	-4.77		44.37
WAD -9	3.07		92.89	83.28	296.11		-4.59	-4.96	-4.65		44.37
HAL	3.37		34.18	12.56	54.82		-4.40	-4.78	-4.86		40.54
LMH-2	2.88		704.20	110.86	140.92		-4.22	-4.94	-4.83		32.34

- **Log D**: **<1** Absorción desfavorable; **1 - 3** Absorción favorable; **>3** Absorción errática
- **Solubilidad acuosa**: **> 60 µg/ml** Buena solubilidad; **10 – 60 µg/ml** Moderada solubilidad; **<10** Poca solubilidad
- **Permeabilidad**: **≥ 3 x 10^{-6} cm/s** Buena permeabilidad; **< 3 x 10^{-6} cm/s** Poca permeabilidad
- **TPSA:** **< 60 Å²**

El desarrollo de productos farmacéuticos requiere un buen análisis previo del perfil biofarmacéutico y farmacocinético. Si no se realiza un estudio adecuado, los compuestos tendrán pocas probabilidades de progresar más allá de los ensayos preclínicos. Las evaluaciones *in silico* de las propiedades biofarmacéuticas con el uso de herramientas químico-farmacéuticas permiten predecir la capacidad de un compuesto para disolverse, permear en las células y ser absorbido en el tracto gastrointestinal (TGI). Los criterios evaluados en esta sección involucran las reglas de Lipinski y Veber que están designadas para moléculas pequeñas, en ellas establecen valores necesarios para que las moléculas tengan la capacidad de permear por difusión pasiva. Dentro de los criterios considerados en estas reglas son:

- Peso molecular menor a 500
- Log P menor o igual a 5
- # de Donadores de puentes de hidrógeno menor a 5
- # de aceptores de puentes de hidrógeno menor a 10
- TPSA menor a 140 Å.

Para reducir gastos de obtención y bioevaluación de compuestos es recomendable la evaluación *in silico* para seleccionar los compuestos con los mejores valores obtenidos en la predicción de las propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas, y posteriormente producirlos y evaluarlos.[72] De acuerdo con los resultados de las predicciones, los compuestos no irrumpen ninguna de las reglas previamente mencionadas, por lo que se esperaría que los compuestos no presenten problemas de permeabilidad ni de absorción por difusión pasiva.

Los compuestos diseñados en este proyecto mostraron valores de área polar superficial topológica (TPSA) desde 32.33 hasta 44.3. Los compuestos **WAD-3**, **WAD-6** y **WAD 8-9** mostraron valores de Log $D_{7.4}$ satisfactorios que favorecen que un compuesto tenga la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica de acuerdo con las reglas de Clark (TPSA<60-70 $Å^2$ y Log D=1-3).[85]. Otra propiedad que se evaluó fue la solubilidad acuosa, donde la mayoría los compuestos mostraron probabilidades de ser medianamente solubles, sólo los compuestos **WAD-1**, **WAD-3**, **WAD-6, WAD 8-9** mostraron buenas probabilidades de ser altamente hidrosolubles. Cabe mencionar que los compuestos presentados en el proyecto son de carácter básico (pKa alrededor de 10), por lo tanto, se encontrarán en forma ionizada en un pH fisiológico y la solubilidad acuosa aumentará. Además, todos los compuestos tienen un fragmento amino de carácter básico que permiten generar una sal clorhidrato y mejorar los problemas de solubilidad. Finalmente, en la permeabilidad en células Caco2 (células de cáncer de colon con glicoproteína P altamente expresada) los compuestos presentaron buenas probabilidades de permear este tipo de células.

2.1.2. Propiedades farmacocinéticas

En el desarrollo de moléculas bioactivas y fármacos es importante evaluar el perfil farmacocinético ya que la mayoría de los fármacos fracasan debido a problemas en la parte ADME. Por lo tanto, en este proyecto se realizaron estimaciones del perfil farmacocinético de los compuestos diseñados con los predictores ADMETlab3, SwissADME y AdmetSAR3.0, Admet – AI, biotransformer 3.0 y ACD/ToxSuite, En la **Tabla *3*** se muestran las estimaciones de algunas propiedades ADME, para los nuevos compuestos, usando al fármaco haloperidol, y al compuesto **LMH-2** como controles.

Tabla 3. Predicción de las propiedades farmacocinéticas de los compuestos **WAD 1-9.**

	Absorción intestinal (%)				Barrera hematoencefálica (%)				Sustrato de glicoproteína P (%)			
	Admet SAR	Admet Lab	Admet AI	Score	Admet SAR	Admet Lab	Swiss ADME	Score	Admet SAR	Admet Lab	Swiss ADME	Score
WAD -1	99.1	100	100		98.0	99.1	98		51.7	12.2	No	
WAD -2	99.2	100	100		98.3	99.8	98		43.3	10.0	No	
WAD -3	99.0	99.9	98		95.6	31.6	95		42.8	6.6	No	
WAD -4	99.1	100	100		97.2	97.9	98		63.6	55.8	No	
WAD -5	99.0	100	100		96.8	97.3	99		65.1	20.6	No	
WAD -6	98.8	100	100		95.8	95.6	99		69.4	39.3	No	
WAD -7	99.1	100	100		96.2	95.8	98		58.1	7.9	No	
WAD -8	97.8	100	100		95.2	90.9	99		63.5	52.0	No	
WAD -9	98.6	100	100		95.9	93.0	99		51.5	14.1	No	
HAL	98.8	100	100		98.1	99.9	96		51.6	37.2	No	
LMH-2	99.1	100	100		97.8	98.7	99		50.2	27.2	No	

Absorción **67 - 100 %** Probabilidad alta; **34 - 66 %** Probabilidad media; **0 - 33 %** Probabilidad baja
Barrera hematoencefálica: **67 - 100 %** Probabilidad alta; **34 - 66 %** Probabilidad media; **0 - 33 %** Probabilidad baja
Sustrato glucoproteína P: **0 - 33 %** Probabilidad baja; **34 - 66 %** Probabilidad media; **67 - 100 %** Probabilidad Alta

Como se puede observar en la tabla anterior, todos los compuestos de la serie **WAD 1-9** presentaron buenas probabilidades de ser bien absorbidos en el intestino. Así mismo, todos los compuestos presentaron altas probabilidades de atravesar la barrera hematoencefálica, propiedad que se requiere para que los compuestos diseñados lleguen a su sitio diana en el sistema nervioso. Finalmente, la mitad de los compuestos presentaron probabilidad de no ser sustratos de la glicoproteína P, una bomba de eflujo que se encuentra en células del intestino y riñón que está implicada en la resistencia de fármacos lo que trae como consecuencia una disminución en la biodisponibilidad y finalmente un tratamiento ineficaz.[85] Los compuestos **WAD-4, WAD-6** y **WAD 8** mostraron probabilidades intermedias de ser sustratos de la glicoproteína P.

Por otro lado, el metabolismo/biotransformación de los compuestos fue evaluado con el programa Biotransformer 3, un servidor que nos brinda predicciones de los metabolitos que pudieran formarse a partir del compuesto ingresado en el programa (**Figura 41**).[75]

En la predicción de metabolismo de los compuestos **WAD 1-9**, todos mostraron probabilidad de ser metabolizados por el CYP1A2 mediante una *p*-hidroxilación en el (o los anillos) de benceno monosustituido(s), seguido por reacciones de Fase II, conjugación con ácido glucurónico. Mediante el CYP1A2, también se podría llevar a cabo una *N*-desalquilación de la amina alicíclica terciaria, seguida por una glucuronidación. Otra vía de metabolismo que se podría llevar a cabo es una *N*-oxidación de la amina mediada por flavina monooxigenasa y una hidroxilación del carbono alifático adyacente al anillo aromático. Finalmente, otra predicción de metabolismo está dada una apertura del anillo piperidina mediante el CYP 3A4, seguido por una glucuronidación o una conjugación con una glicina. En esta evaluación, se pudo observar que los metabolitos estimados fueron más hidrosolubles, dicha información nos permite predecir que los compuestos diseñados se podrían eliminar adecuadamente y no habría acumulación en el organismo que genere una toxicidad.

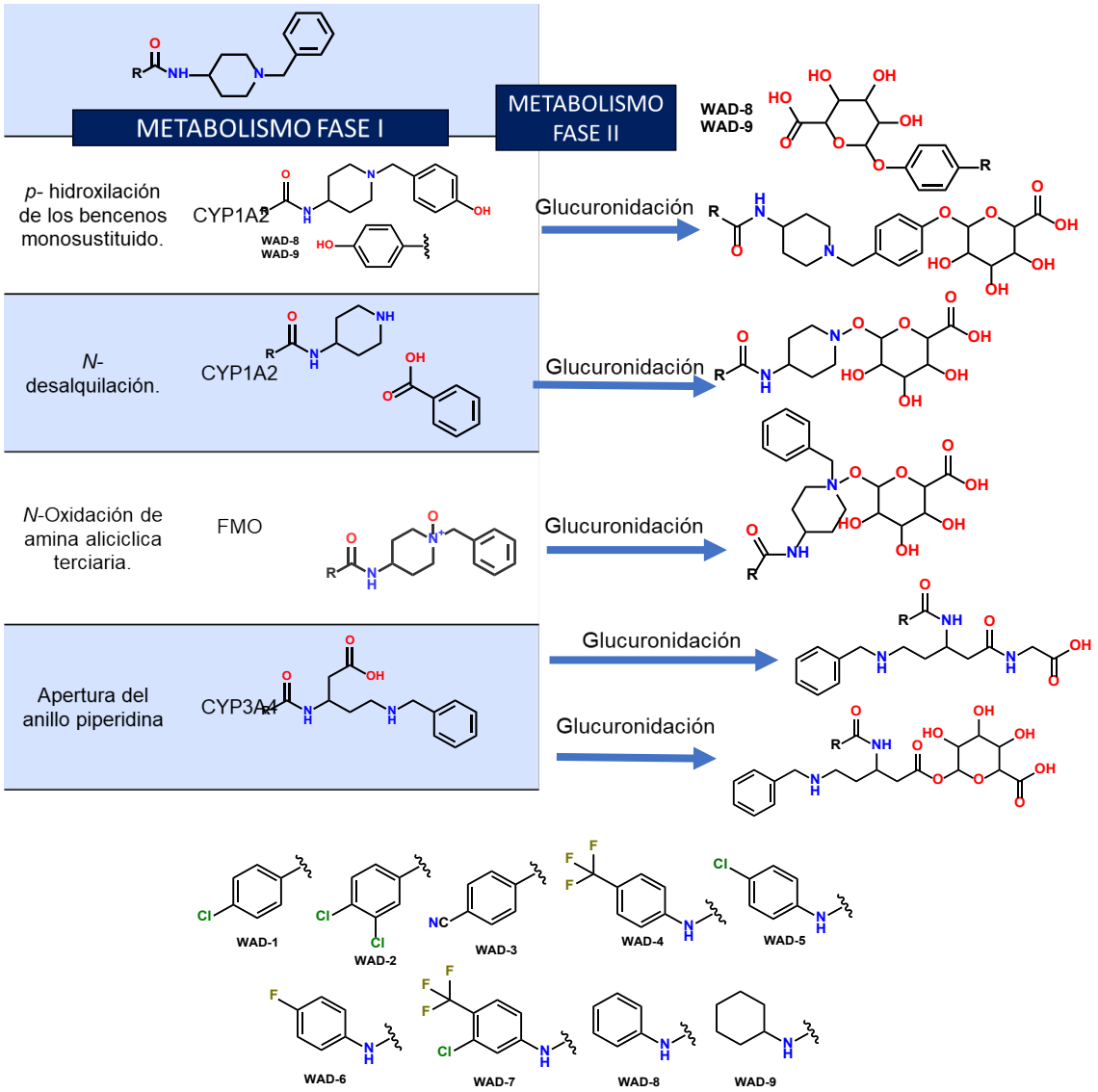


Figura 41. Predicción del metabolismo de los compuestos **WAD 1-9.**

Otra de las propiedades farmacocinéticas de relevancia para su estudio toxicológico en la química farmacéutica es la capacidad de un compuesto para inhibir a las isoformas del CYP450. La evaluación computacional de esta propiedad se evaluó con los programas ACD Toxsuite, admetLab 3.0 y AdmetSAR 3.0. Las isoformas que son consideradas en esta evaluación son las 3A4, 2C9, 2C19, 2D6 y 1A2 dado que son las más relevantes en el metabolismo de fármacos. Dado que las 3 primeras familias de este complejo proteico son las que están mayormente implicadas en el metabolismo de fármacos, su estudio es de relevancia, ya que, la inhibición de estas isoformas podría traer consigo interacciones farmacológicas cuando se están usando 2 o más fármacos.

Tabla 4. Probabilidad de inhibición de CYP 450 por los compuestos **WAD 1-9.**

	Probabilidad de inhibición de CYP (IC_{50} <10 μM)																			
	3A4 (%)				2D6 (%)				2C9 (%)				2C19 (%)				1A2 (%)			
	ACD toxsuite	Admet AI	Admet Lab	S	ACD toxsuite	Admet AI	Admet Lab	S	ACD toxsuite	Admet AI	Admet Lab	S	ACD toxsuite	Admet AI	Admet Lab	S	ACD toxsuite	Admet AI	Admet Lab	S
WAD-1	6	5.7	5.5		61	91.9	100		9	7.0	1.5		9	57.0	99.8		6	19.6	2.4	
WAD-2	7	22.1	40.2		64	94.3	100		15	23.4	15.1		8	76.5	99.7		5	41.8	0.9	
WAD-3	7	3.6	0.3		18	34.3	99.9		5	4.8	0.6		3	16.4	99.4		2	7.8	0.1	
WAD-4	5	6.8	27.5		48	80.7	99.8		3	6.4	0.0		4	35.9	4.2		1	21.5	0.0	
WAD-5	4	4.2	0.4		63	90.5	99.9		3	9.4	0.1		4	57.0	41.6		3	18.2	0.1	
WAD-6	3	1.9	0.3		52	74.1	99.8		2	5.1	0.0		2	30.2	2.1		3	9.6	0.0	
WAD-7	4	39.6	12.0		55	92.9	99.9		4	19.8	0.2		4	74.8	4.7		1	43.8	0.1	
WAD-8	4	0.5	0.5		56	61.7	99.6		2	2.3	0.1		3	17.1	1.7		4	4.6	0.1	
WAD-9	3	1.9	15.9		61	79.7	99.9		2	0.6	0.0		2	6.1	4.2		0	2.0	0.0	
HAL	3	7.4	0.0		52	95.7	100		5	6.7	0.0		4	28.6	0.0		0	16.3	0.0	
LMH-2	5	1.5	9.9		54	78.5	100		5	5.1	0.4		5	27.1	97.7		3	14.0	0.1	
Clo	85	94	99.9		7	77	99.2		41	90	99.9		80	98	99.9		12	67	99.9	

0 - 33 % Probabilidad baja; **34 - 66 %** Probabilidad media; **67 - 100 %** Probabilidad alta
S = Score; HAL = Haloperidol; Clo = Clotrimazol

Los datos mostrados en la **Tabla 4** indican que todos los compuestos diseñados en este proyecto (**WAD 1-9)** presentan muy bajas probabilidades de inhibir el CYP 3A4, la isoforma más abundante, y una de las encargadas del casi 50% de las reacciones metabólicas del complejo CYP450,[85] el porcentaje de probabilidad es incluso menor que la probabilidad para el compuesto **S1RA**, el cual ya se encuentra en ensayos clínicos de fase II y mucho menor que Clotrimazol, un fármaco antimicótico que actualmente está disponible en el mercado. Así mismo, todos los compuestos diseñados en este proyecto mostraron bajas probabilidades de inhibir algunas isoformas, como la 2C9, 2C19 y 1A2, mientras que **S1RA** presentó probabilidades intermedias de inhibir a la isoforma 1A2; clotrimazol por otro lado presenta probabilidades intermedias de inhibir a la isoforma 2C9 y altas probabilidades de inhibir a las isoformas 3A4 y 2C19.

La mayoría de los compuestos diseñados presentaron probabilidades de intermedias a altas de ser inhibidores de la isoforma 2D6 del CYP450, resultados que se asemejan al del fármaco haloperidol. Existe una variedad de fármacos que inhiben a esta isoforma, sin embargo, aún están disponibles en el mercado, además, a pesar de que la isoforma 2D6 es una de las isoformas más importantes en el metabolismo, es también una de las isoformas menos abundantes en el hígado.

2.1.3. Propiedades toxicológicas

Las propiedades toxicológicas de la serie de compuestos **WAD 1-9** fueron estudiadas usando los servidores AdmetLab, AdmetSAR y ACD/ToxSuite. En esta evaluación se usaron haloperidol y **LMH-2** como compuestos control (**Tabla 5**).

Tabla 5. Predicción de las propiedades toxicológicas de los compuestos **WAD 1-9.**

	Mutagènico (%)				Carcinogénico (%)				Bloqueador de Canales hERG (%)				
	Admet SAR	Admet Lab	Admet AI	S	Admet SAR	Admet Lab	Admet AI	S	Admet SAR	Admet Lab	Admet AI	ACD Tox suite	S
WAD-1	28.3	16.9	28.4		28.1	8.9	14.5		95	89.6	92.6	68	
WAD-2	46.4	16.2	27.0		30.6	14.4	18.9		97.3	91.4	94.6	73	
WAD-3	22	35.3	33.8		26	17.5	20.3		66.1	91.6	89.4	48	
WAD-4	29.6	10.3	11.3		26.2	4.0	35.3		92.9	78.6	97.3	90	
WAD-5	24.9	16.6	14.0		24.1	6.5	16.7		97.4	79.7	92.9	83	
WAD-6	19.2	34.5	20.4		23	15.3	19.3		94.1	74.7	94.2	55	
WAD-7	32	7.3	9.0		21.9	3.3	35.2		97.3	81.5	97.1	95	
WAD-8	15.6	25.6	8.8		25.8	6.4	10.7		84.2	67.4	92.2	68	
WAD-9	19.5	8.7	3.8		25.9	3.2	5.5		74.6	60.0	91.5	36	
HAL	41.2	6.4	3.5		24.7	15.8	6.6		97.7	94.5	92.0	90	
LMH-2	19.9	34.7	45.5		24.6	21.3	16.4		88	86.6	95.7	30	
									Clorfenamina				

0 - 33 % Probabilidad baja; **34 - 66 %** Probabilidad media; **67 - 100 %** Probabilidad alta
S = Score

Como se puede apreciar en la tabla anterior, la mayoría de los compuestos diseñados en este proyecto presentaron altas probabilidades de no ser mutagénicos ni tumorogénicos, sin embargo, es importante recordar que las evaluaciones *in silico* no garantizan la seguridad de los compuestos, para corroborar estos datos se deben realizar ensayos biológicos *in vitro* como la prueba de AMES para mutagenicidad.

Los compuestos mostraron probabilidades intermedias a altas de ser bloqueadores de los canales hERG, los cuales están estrechamente relacionados con cardiotoxicidad y síndrome de QT largo. Estos resultados pueden deberse a que hay una amina terciaria en la estructura química de los compuestos propuestos, y en la literatura se ha reportado diversidad de compuestos con aminas terciarias que se sabe son bloqueadores de los canales hERG.[86,87]

Debido a estos resultados se decidió realizar un estudio de acoplamiento molecular para conocer el posible modo de unión de los compuestos con el canal de potasio, y la probable afinidad que podría presentarse. No obstante, para corroborar estos datos empíricos se podría realizar una prueba experimental que permita determinar si los compuestos realmente son bloqueadores de hERG. Uno de los ensayos más utilizados para esta propiedad es el ensayo de Patch Clamp.[85] Cabe mencionar que existen fármacos como el haloperidol y la clorfenamina que a pesar de ser capaces de bloquear canales hERG siguen a la venta en el mercado, otro ejemplo es el compuesto **S1RA** el cual a pesar de mostrar alertas de bloqueo de canales hERG se encuentra en ensayos clínicos de fase II.

La predicción de la dosis letal media y de la clasificación de la OECD se realizó con el servidor ACD Toxsuite donde se usó haloperidol, y los compuestos **S1RA** y **LMH-2** como control. Los resultados se muestran en la **Tabla 6**.

En la tabla puede observarse que todos los compuestos diseñados en este proyecto se clasifican de acuerdo con su DL_{50} dentro de las categorías 3-5 donde se encuentra los compuestos control (haloperidol y **S1RA**) y la mayoría de los fármacos disponibles en el mercado. Sin embargo, es importante recordar que los ensayos *in silico* no remplazan a los ensayos biológicos, por lo tanto, se debe considerar que estimaciones deben complementarse al realizar pruebas biológicas para la determinación de la toxicidad de los compuestos diseñados.

Tabla 6. Predicción de la dosis letal media de los compuestos **WAD 1-9**.

DL_{50} mg/Kg					
Compuesto/Propiedad	Rata IP	Rata PO	Ratón IP	Ratón PO	Categoria OECD
WAD-1	340	480	180	370	3-4
WAD-2	480	520	330	470	3-4
WAD-3	450	1300	420	890	4-5
WAD-4	210	470	230	420	3-4
WAD-5	330	1100	220	680	4-5
WAD-6	180	720	470	860	3-4
WAD-7	230	550	640	840	4-5
WAD-8	140	1000	180	1000	4-5
WAD-9	110	750	390	1000	4
HAL	200	960	510	570	4-5
S1RA	340	480	180	370	3-4
LMH-2	220	430	250	440	3-4

Categoría OCDE 1: $DL_{50} \leq 5$mg/kg (Peligro, mortal en caso de ingestión),
Categoría OCDE 2: 5mg/kg < $DL_{50} \leq 50$mg/kg (Peligro, mortal en caso de ingestión),
Categoría OCDE 3: 50mg/kg < $DL_{50} \leq 300$mg/kg (Peligro, tóxico en caso de ingestión),
Categoría OCDE 4: 300mg/kg < $DL_{50} \leq 2000$mg/kg (Advertencia, tóxico en caso de ingestión),
Categoría OCDE 5: 2000mg/kg < $DL_{50} \leq 5000$mg/kg (Advertencia, puede ser nocivo en caso de ingestión)

2.1.4. Propiedades farmacodinámicas

La predicción de la afinidad de los compuestos **WAD 1-9** se evaluó con la herramienta SIGMAP, el fármaco haloperidol y el compuesto **LMH-2** se usaron como referencia. Los resultados se muestran en la **Tabla 7**.

En este servidor asistido por inteligencia artificial se realizó la comparación de los compuestos ingresados frente a 2018 compuestos contenidos en su base de datos con afinidad experimental reportada con el receptor σ_1 y a partir de esto se determinó la probabilidad de afinidad con el mismo.[78]

Tabla 7. Resultados de la predicción de la afinidad de los compuestos **WAD 1-9 con *σ1R***.

Compuesto	Unión a σ1 (1μM)
WAD-1	76.8
WAD-2	70.8
WAD-3	80.8
WAD-4	68.5
WAD-5	82.4
WAD-6	91.8
WAD-7	68.5
WAD-8	82.6
WAD-9	52.3
HALOPERIDOL	87.4
LMH-2	90.1

0 - 33 % Probabilidad baja; **34 - 66 %** Probabilidad media; **67 - 100 %** Probabilidad alta

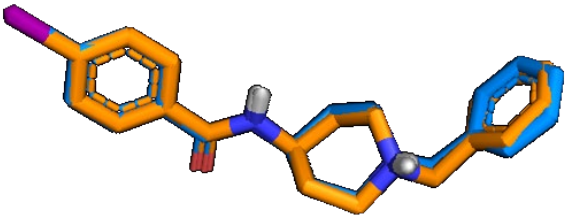
En la tabla anterior se puede observar que los compuestos **WAD-1-8,** y mostraron probabilidades altas de unirse al receptor σ1 al igual que el compuesto **LMH-2** y el fármaco haloperidol (compuestos de referencia). El compuesto **WAD-9** presentó probabilidades intermedias de unirse a σ1R. Una vez que determinamos que los compuestos tienen probabilidades de intermedias a buenas para unirse a la diana de interés, se realizó el acoplamiento molecular de los compuestos **WAD 1-9** con σ1R para conocer el posible modo de unión.

2.1.5. Acoplamiento molecular *a priori*.

2.1.5.1. Acoplamiento molecular dirigido de los compuestos sobre σ1R

En el primer caso, se realizó el acoplamiento molecular refinado de los compuestos con el receptor σ1 usando el programa MOE y el archivo **5HK2** que fue obtenido de la base de datos Protein Data Bank (PDB). En el ensayo de acoplamiento molecular se corrieron 100 salidas con cada compuesto por triplicado para validar el método. Para evaluar la reproducibilidad y confiabilidad del experimento computacional, se llevó a cabo la validación. En la validación, un valor de la desviación estándar cuadrática media (RMSD) menor a 3 Å indica que los resultados son confiables y que la simulación es confiable y reproducible.

Tabla 8. Validación del acoplamiento molecular dirigido sobre el receptor σ_1.



Acoplamiento molecular		
COMPUESTO	**SCORING (Kcal/mol)**	**RMSD**
4-IBP	-8.70±0.013	0.242±0.004

En la **Tabla 8** se puede observar los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular. El compuesto cocristalizado (4-IBP) mostró una energía de unión de -8.7 Kcal/mol y valor de RMSD de 0.242 Å, por lo que se considera un método validado. Para visualizar los datos de manera gráfica, se muestra que el compuesto 4-IBP que se reacopló (color azul) adoptó una conformación espacial casi idéntica al compuesto cocristalizado (color naranja).

Respecto a las interacciones, en la **Figura 42** se puede observar la interacción electrostática clásica que se presentan entre la amina terciaria del compuesto **4-IBP** y el residuo de aminoácido Glu-172 de σ_1R. También se observó una interacción de tipo puente de hidrógeno reforzado entre el NH de la amida y Glu-172. Adicionalmente se presentaron interacciones hidrofóbicas entre el ligando cocristalizado y σ_1R. [88]

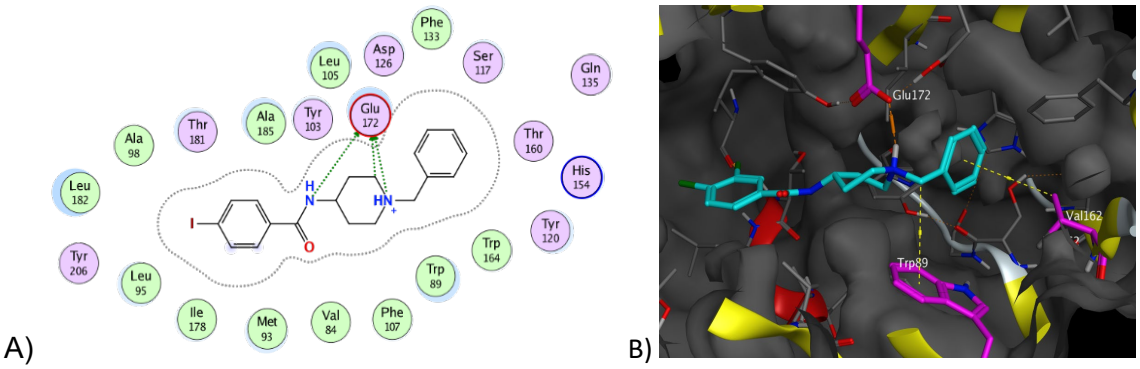


Figura 42. Interacciones entre el compuesto **4-IBP** con el receptor σ_1. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D

Los resultados de los acoplamientos moleculares realizados de los compuestos **WAD 1-9** sobre el receptor σ_1 se muestran en la **Tabla 9**. Para dicho estudio se usaron los compuestos **LMH-2** y **4IBP** como referencia.

Tabla 9. Acoplamiento molecular refinado de los compuestos **WAD 1-9** con el receptor σ_1.

COMPUESTO	SCORE	RANKING
WAD-1	-8.191±0.097	9
WAD-2	-8.577±0.078	4
WAD-3	-8.391±0.082	7
WAD-4	-8.831±0.085	**2**
WAD-5	-8.460±0.053	4
WAD-6	-8.403±0.076	6
WAD-7	-9.072±0.193	**1**
WAD-8	-8.352±0.214	8
WAD-9	-8.725±0.085	**3**
LMH-2	-7.970±0.046	-
4-IBP	-8.70±0.013	-

Como se puede observar, todos los compuestos presentaron energías de unión mayor al compuesto **LMH-2**. Cabe mencionar que los compuestos diseñados obtuvieron un orden de la siguiente manera: **WAD-7>WAD-4=WAD-9> WAD-2=WAD-5>WAD-6=WAD-3=WAD-8=WAD-1.**

Debido que se obtuvieron gran cantidad de datos de los acoplamientos de cada uno de los compuestos con el receptor, solo se muestran los diagramas de las interacciones de σ1R con el compuesto **WAD-7** que obtuvo la mejor energía de unión.

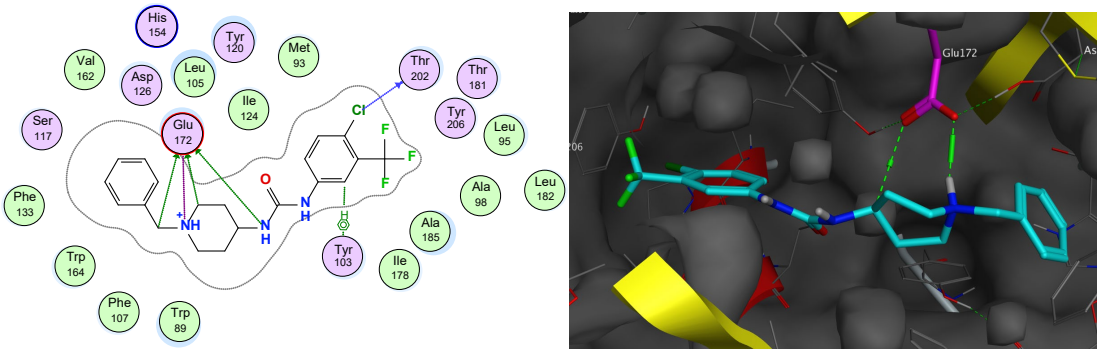


Figura 43. Interacciones entre el compuesto **WAD-7** y σ_1R. A) Visualización 2D, B) Visualización 3D.

En la **Figura 43** se puede observar la interacción electrostática clásica que se presenta entre la amina terciaria del compuesto **WAD-7** y el residuo de aminoácido Glu-172 de σ_1R.

2.1.6. Análisis de consenso farmacológico (ACOFA) para la selección de un líder computacional seguro (Safe Lead)

En el análisis de consenso farmacológico (**Tabla 10**) se resumieron todos los datos recabados en la evaluación *in silico* de las propiedades biofarmacéuticas, farmacocinéticas, farmacodinámicas y toxicológicas de los compuestos diseñados en este proyecto. El propósito del consenso es la selección de *hits* computacionales seguros para priorizar su síntesis y bioevaluación con base los resultados obtenidos en cada una de las categorías. Los resultados se muestran en la tabla representados con un código de colores tipo semáforo que indica lo siguiente: **Color verde**: resultado muy satisfactorio; **Color amarillo:** resultado satisfactorio; y **Color rojo**: resultado poco satisfactorio. Para cada color se ha asignado un valor numérico, facilitando así la selección de los *hits* computacionales seguros. Para el color verde, se asigna un valor de 1, para el color amarillo se asigna el valor de 0, y para el color rojo se asigna el valor -1.[89]

Como se muestra en la tabla, los compuestos presentaron buenas propiedades biofarmacéuticas, los compuestos mostraron alertas en cuanto a la solubilidad, sin embargo, esta propiedad podría modificarse o mejorarse formando clorhidratos de amina, por lo tanto, ninguno de los compuestos es descartado. En la evaluación de las propiedades farmacocinéticas los compuestos **WAD-4, WAD-6,** y **WAD-8** mostraron probabilidades intermedias de ser sustratos de la glicoproteína P. En el perfil farmacodinámico todos los compuestos presentaron buenas energías de unión en el ensayo de acoplamiento molecular, además, la mayoría de los compuestos mostraron probabilidad alta probabilidad de unión con el σ_1R, solo el compuesto **WAD-9** mostró probabilidad intermedia. En la parte toxicológica, todos los compuestos presentaron probabilidades altas de ser bloqueadores de los canales hERG, quienes están estrechamente relacionados con síndrome de QT largo y cardiotoxicidad, por lo tanto, se sugiere realizar un acoplamiento molecular sobre este receptor y con base en esos resultados se puedan realizar evaluaciones toxicológicas a futuro. Finalmente, en este perfil, los compuestos presentaron altas probabilidades de no ser mutagénicos ni carcinogénicos.

Con base en todos los datos recabados y los argumentos anteriormente mencionados se hizo un punto de corte en valor numérico de 9, por lo tanto, se optó por priorizar la síntesis y bioevaluación de los compuestos de la siguiente manera **WAD 1-2**, **WAD 4-5** y **WAD 8-9**. Sin embargo, en la evaluación experimental de la solubilidad acuosa se observó que el compuesto **WAD-2** fue el único soluble en el medio y por lo tanto se decidió realizar la evaluación *in vitro* de la afinidad del compuesto **WAD-2** con los receptores σ.

Tabla 10. Análisis de consenso farmacológico de los compuestos **WAD 1-12.**

Propiedad	WAD-1	WAD-2	WAD-3	WAD-4	WAD-5	WAD-6	WAD-7	WAD-8	WAD-9
TPSA	32.34	32.34	56.13	44.37	44.37	44.37	44.37	44.37	44.37
Log $D_{7.4}$									
Solubilidad acuosa *in silico*									
Permeabilidad CaCo2									
HIA									
BHE									
Sustrato gp P									
Metabolismo									
Actividad/ Afinidad									
Docking MOE									
Bloq hERG (%)									
Mutagenicidad									
Carcinogenicidad									
DL_{50}									
Puntaje	**10**	**9**	**12**	6	**10**	**10**	7	8	**11**
Solubilidad acuosa experimental									

HIA= Absorción intestinal; BHE= Barrera hematoencefálica

Resultado muy satisfactorio (+1) Resultado satisfactorio (0)

Resultado poco satisfactorio

2.2. Parte química

En este proyecto se sintetizaron 12 compuestos finales, la serie A de amidas (**WAD 1-6**) y la serie B de ureas (**WAD 7-12**). Los resultados son presentados de manera general en la **Tabla 11.**

Tabla 11. Síntesis de los compuestos **WAD 1-12**.

Compuesto	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento crudo (%)	Rendimiento final (%) Compuesto puro	Punto de fusión (°C)	Aspecto físico
WAD-1	21	88.9	49.1	195.8 – 197.9	Cristales con forma de hojuelas.
WAD-2	20	84.7	47.5	179.2 – 182.0	Cristales con forma de aguja
WAD-3	48	52.4	36.8	168.3-169.9	Cristales amorfos
WAD-4	6	95.0	40.5	163.4-165.5	Sólido blanco
WAD-5	25	58.0	40.5	185.8-188.2	Sólido blanco
WAD-6	5	70.7	56.2	163.0-166.1	Sólido blanco
WAD-7	0.5	80.6	22.6	164.4-169.5	Sólido blanco
WAD-8	50	85.0	61.6	167.1-168.5	Sólido blanco
WAD-9	48	90.8	68.6	172.1-174.2	Sólido blanco

Los compuestos se obtuvieron con tiempos de reacción que van desde 5 h hasta 50 h en condiciones convencionales a temperatura ambiente, a excepción del compuesto **WAD-7** que se sintetizó usando un reactor de microondas CEM a temperatura y potencia controladas. Se determinaron los puntos de fusión de los compuestos, los cuales resultaron con intervalos característicos de pureza. Para la identificación de los compuestos sintetizados y purificados previamente, se llevaron a cabo análisis espectroscópicos de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{1}H a 600 MHz y de ^{13}C a 150 MHz y análisis espectrométrico de masas por impacto electrónico (EM-IE) en colaboración con el Dr. Emmanuel Hernández Núñez, el cDr. Josué Martínez Miranda y el Dr. David Morales Morales.

2.2.1. Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-clorobenzamida (WAD-1)

Para obtener el compuesto **WAD-1** se hizo reaccionar la 4-aminobencilpiperidina (**10**) con cloruro de 4-clorobenzoilo (**11**), usando trietilamina (TEA) como base y diclorometano (CH_2Cl_2) como disolvente. La amida **WAD-1** se obtuvo con un rendimiento crudo de 88.9%. **(Diagrama 5**)

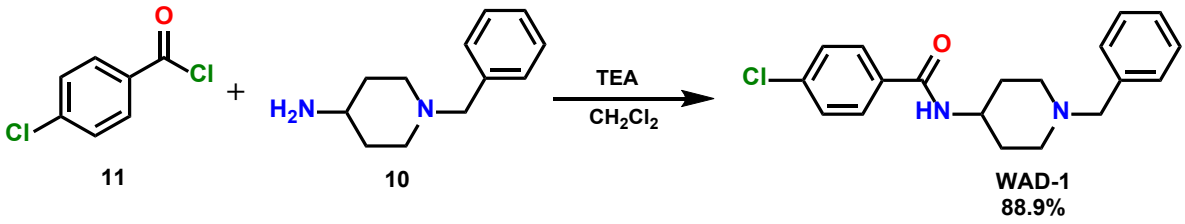
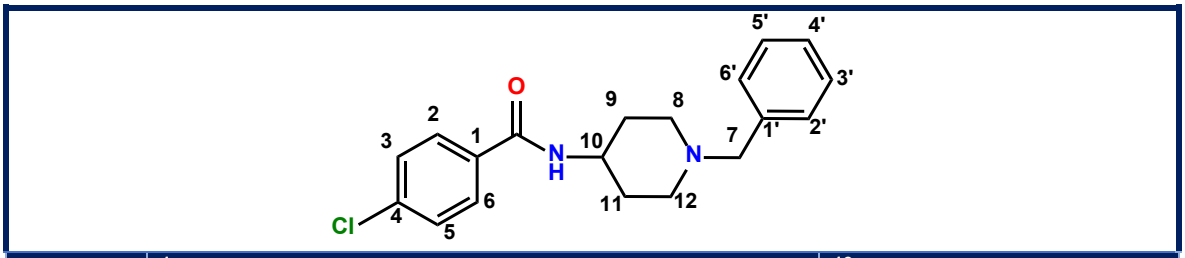


Diagrama 5. Síntesis del compuesto **WAD-1**.

Tabla 12. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-1**.



	^{1}H	^{13}C
C=O	---	165.1
NH	8.33 (*d*, 1H, J_o = 7.66 Hz)	---
1	---	136.4
2	7.52 (*d*, 2H, J_o = 7.85 Hz)	129.2
3	7.85 (*d*, 2H, J_o = 8.49 Hz)	129.8
4	---	139.1
5	7.85 (*d*, 2H, J_o = 8.49 Hz)	129.8
6	7.52 (*d*, 2H, J_o = 7.85 Hz)	129.2
1'	---	134.0
2'	7.29-7.33 (*m*, 4H)	128.8
3'	7.29-7.33 (*m*, 4H)	128.7
4'	7.23-7.26 (*m*, 1H)	127.4
5'	7.29-7.33 (*m*, 4H)	128.7
6'	7.29-7.33 (*m*, 4H)	128.8
7	3.46 (*s*, 2H)	62.7

8	2.01 (*t*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.77 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 2.48 Hz) 2.81 (*d*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.04 Hz)	52.8
9	1.57 (*qd*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.05 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ 3.81 Hz) 1.76 (*d*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.36 Hz)	32.0
10	3.72-3.78 (*m*, 1H)	47.6
11	1.57 (*qd*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.05 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ 3.81 Hz) 1.76 (*d*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.36 Hz)	32.0
12	2.01 (*t*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.77 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 2.48 Hz) 2.81 (*d*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.04 Hz)	52.8

Para la caracterización del anillo de piperidina se consideró el ángulo diedro, las constantes de acoplamiento y la representación de silla para poder asignar adecuadamente las señales (**Figura 44**).

En el espectro de protón podemos observar un cuarteto a 1.57 ppm que integra para 2 protones con constantes de acoplamiento (*J*) de 3.81 y 12.05 Hz que corresponde a los protones ecuatoriales de las posiciones 9 y 11 del anillo de piperidina. A 1.76 se observa un doblete que integra para 2 protones con *J* = 12.36 Hz que corresponden a los protones axiales de las posiciones 9 y 11. A 2.01 ppm se observa un triplete que integra para 2 protones con *J* = 2.48 y 11.77 Hz que corresponden a los protones ecuatoriales de las posiciones 8 y 12 del anillo de piperidina. A 2.81 ppm se encuentra un doblete que integra para 2 protones con *J* = 12.04 Hz que respecta a los protones axiales de las posiciones 8 y 12. A 3.46 se observa un singulete que integra para 2 protones, que corresponde a los protones del metileno. Entre 3.72 y 3.78 se encuentra un multiplete que integra para 1 que corresponde al protón de la posición 10 del anillo de piperidina. Entre 7.23 y 7.26 ppm se observa un multiplete que corresponde a la posición 4' del anillo aromático adyacente a la piperidina. Entre 7.29 y 7.33 se observa un multiplete que integra para 4 protones que corresponden para los protones de las posiciones 2', 3', 5' y 6' del anillo aromático adyacente a la piperidina. A 7.52 se puede observar un doblete que integra para 2 protones con J_o = 7.52 Hz correspondiente a las posiciones 2 y 6 del anillo, mientras que a 7.85 ppm se encuentra un doblete que corresponde a los protones de las posiciones 3 y 5 del anillo aromático con J_o = 8.49 Hz. Finalmente, a 8.33 ppm se puede un doblete que integra para 1 con *J* = 7.66 Hz. protón y que corresponde al protón del nitrógeno de la amida.

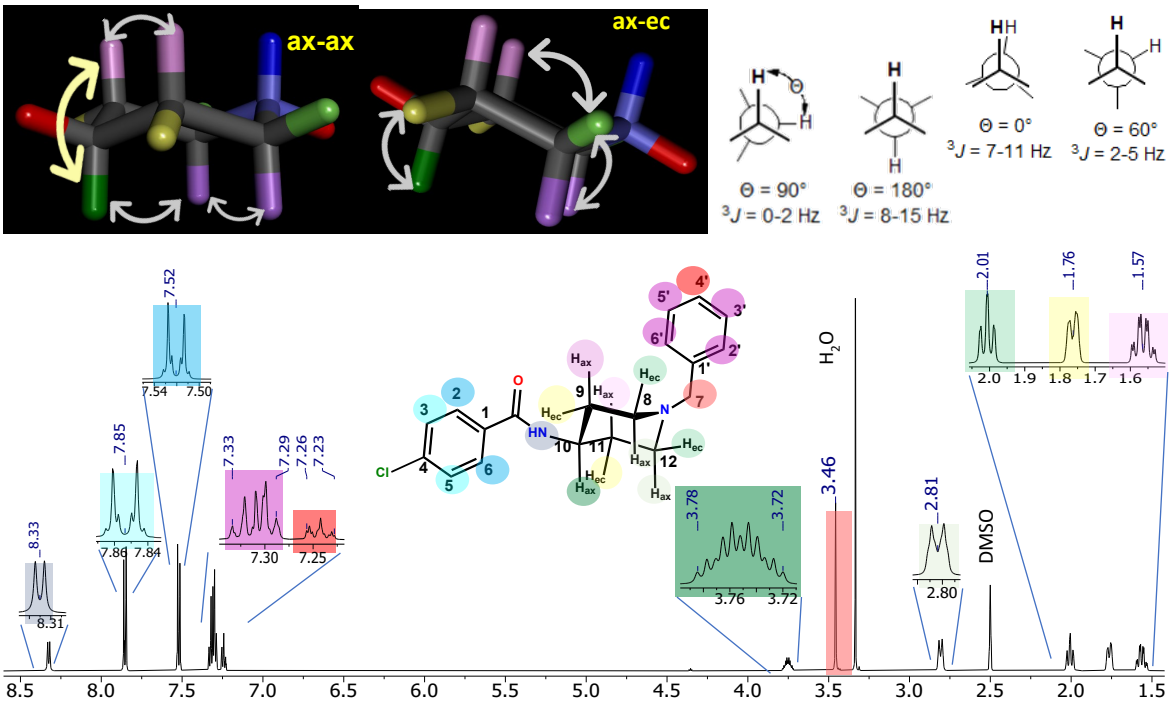


Figura 44. Espectro de ^{1}H del compuesto **WAD-1**.

En el espectro de ^{13}C (**Figura 45**) se observaron 13 señales de las 13 esperadas para el compuesto **WAD-1**. Se observó una señal a 32 ppm que corresponde a los carbonos de las posiciones 9 y 11 del anillo de piperidina, a 47.6ppm una señal que corresponde al carbono de la posición del anillo alifático, a 52.8 ppm una señal correspondiente a las posiciones 8 y 12 de la piperidina y a 62.7 la señal que corresponde al metileno del a posición. Entre 127.4 y 139.2 se observaron las señales que corresponden a los carbonos de la región aromática. Y finalmente a 165.1 se observa una señal que corresponde al carbono del carbonilo de la amida.

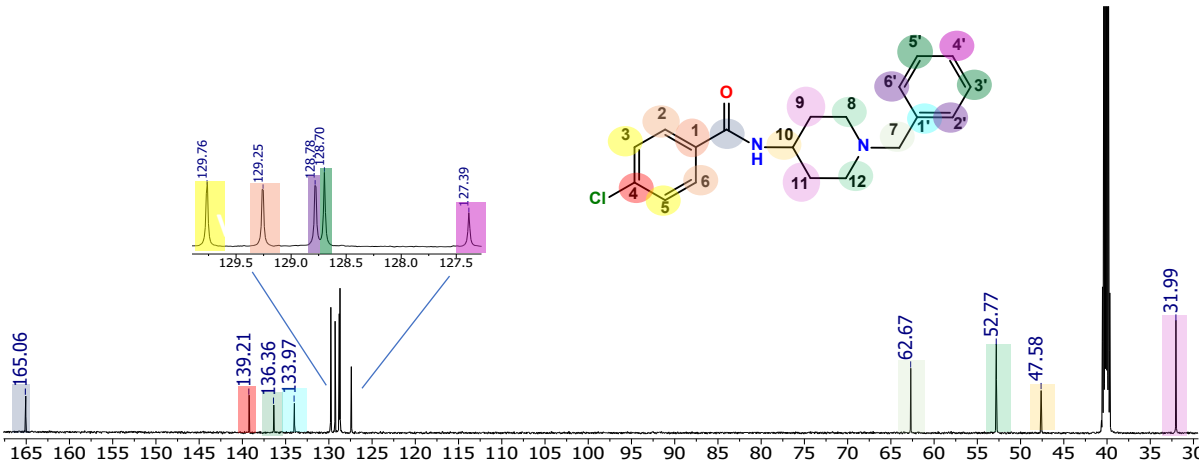


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-1**.

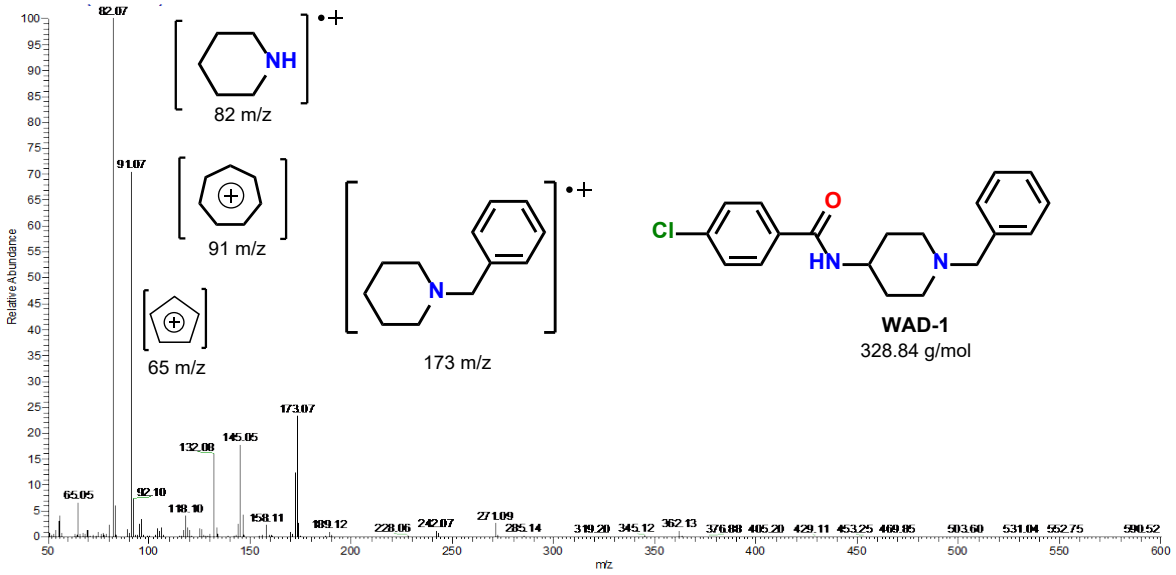


Figura 46.Espectro de masas IE del compuesto **WAD-1**.

Por otro lado, en la **Figura 46** se presenta el espectro de masas IE del compuesto **WAD-1** en el cual se observa el pico base a una relación m/z de 82 con una abundancia relativa de 100 % que corresponde al ión de la piperidina y un pico con una relación m/z 91 con una abundancia relativa de 70% que corresponde al ión tropilio. En una relación m/z de 173 con una abundancia de 25% se encuentra el pico que corresponde al fragmento de la bencilpiperidina, y finalmente en una relación m/z de 65 con una abundancia relativa de 7% un pico que corresponde al ión ciclopentadienilo.

2.2.2. Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-3,4-diclorobenzamida (WAD-2)

Como se observa en el **Diagrama 6**, Para obtener el compuesto **WAD-2** se hizo reaccionar la 4-aminobencilpiperidina (**10**) con cloruro de 3,4-diclorobenzoilo (**12**) en medio básico, usando diclorometano (CH_2Cl_2) como disolvente y trietilamina como base para generar la amida **WAD-2** con un rendimiento de 84.7%.

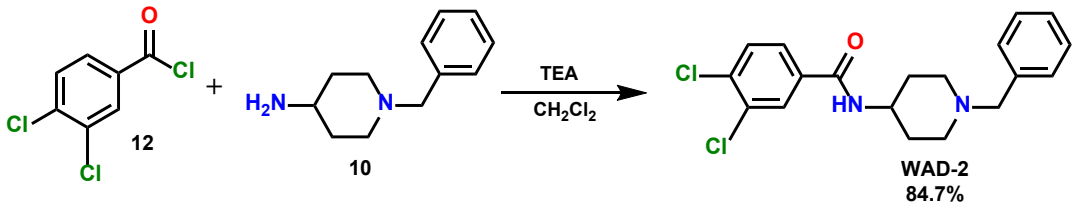
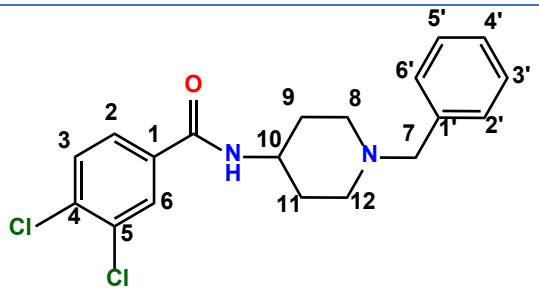


Diagrama 6. Síntesis del compuesto **WAD-2**.

Tabla 13. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y 13C del compuesto **WAD-2**.



	^{1}H	^{13}C
C=O	---	163.8
NH	8.40 (*d*, 1H, *J*=7.59 Hz)	---
1	---	135.1
2	7.78 (*d*, 2H, J_o = 8.34, J_m = 2.01 Hz)	128.2
3	---	129.7
4	---	131.7
5	7.70 (*d*, 2H, J_o = 8.52 Hz)	134.4
6	7.83 (*d*, 2H, J_o = 7.97 Hz)	131.1
1'	---	139.2
2'	7.25-7.29 (*m*, 4H)	129.3
3'	7.25-7.29 (*m*, 4H)	128.7
4'	7.19-7.21 (*m*, 1H)	127.4
5'	7.25-7.29 (*m*, 4H)	128.7
6'	7.25-7.29 (*m*, 4H)	129.3
7	3.42 (*s*, 1H)	62.6
8	1.97 (*dt*, $2H_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.72; $J_{ax\text{-}ec}$ = 2.45 Hz), 2.77 (*d*, $2H_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.03 Hz)	52.7
9	1.52 (*qd*, $2H_{ec}$ $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.05; $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.86 Hz), 1.73 (*d*, $2H_{ax}$ $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.69 Hz)	31.9
10	3.67-3.74 (*m*, 1H)	47.8
11	1.52 (*qd*, $2H_{ec}$ $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.05; $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.86 Hz), 1.73 (*d*, $2H_{ax}$ $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.69 Hz)	31.9
12	1.97 (*dt*, $2H_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.72; $J_{ax\text{-}ec}$ = 2.45 Hz), 2.77 (*d*, $2H_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.03 Hz)	52.7

En el espectro de ^{1}H (**Figura 47**) podemos observar un cuarteto de doblete que integra para dos protones con constantes de acoplamiento de 3.86 y 12.05 Hz que corresponde a los protones ecuatoriales de las posiciones 9 y 11 del anillo de piperidina. A 1.73 pm se observa un doblete que integra para 2 protones con constante de acoplamiento de 11.69 Hz que corresponden a los protones axiales de las posiciones 9 y 11. A 1.97 ppm se observa un triplete que integra para 2 protones con constantes de acoplamiento de 2.45 y 11.72 Hz que corresponden a los protones ecuatoriales de las posiciones 8 y 12 del anillo de piperidina. A 2.77 ppm se encuentra un doblete que integra para 2 protones con constante de acoplamiento de 12.03 Hz que respecta a los protones axiales de las posiciones 8 y 12. A 3.42 se observa un singulete que integra para 2 protones, que corresponde a los protones del metileno. Entre 3.67 y 3.74 se encuentra un multiplete que integra para 1 que corresponde al protón de la posición 10 del anillo de piperidina. Entre 7.19 y 7.21 ppm se observa un multiplete que integra para 1 corresponde a la posición 4' del anillo B. Entre 7.25 y 7.29 se observa un multiplete que integra para 4 protones que corresponden para los protones de las posiciones 2', 3', 5' y 6' del anillo aromático B. A 7.70 ppm se puede observar un doblete que integra para 1 protón con constante *orto* de 8.52 Hz correspondiente a la posición 3 del anillo, mientras que a 7.78 ppm se encuentra un doble de dobles que integra para 1 que corresponde al protón de la posición 2 del anillo aromático A con constante de acoplamiento *orto* de 8.34 y constante *meta* de 2.01 Hz. En 8.04 se observa un doblete que integra para 1 con constante de acoplamiento *meta* de 2.04 Hz que corresponde al protón de la posición 6 del anillo A. Finalmente, a 8.33 ppm se puede un doblete que integra para 1 con constante de acoplamiento de 7.66 Hz. protón y que corresponde al protón del nitrógeno de la amida.

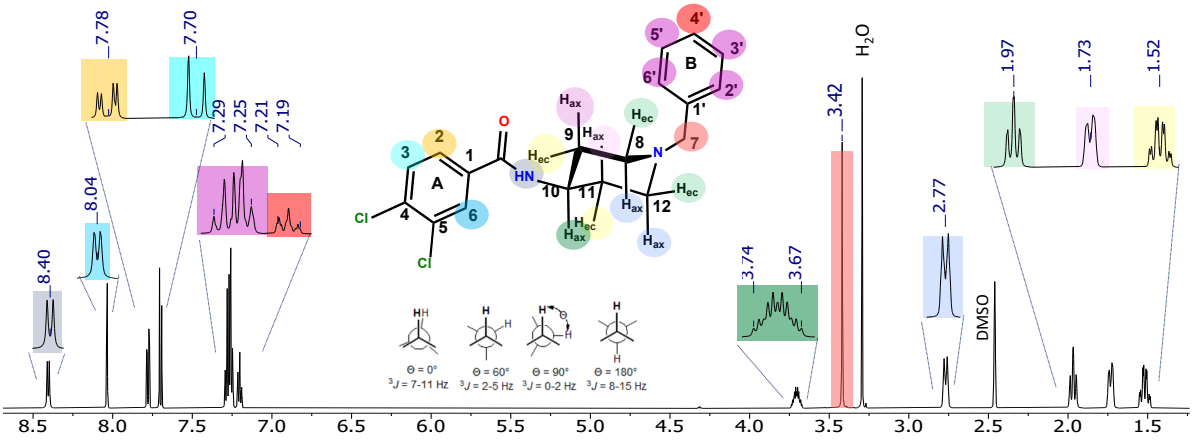


Figura 47. Espectro de ^{1}H del compuesto **WAD-2**.

En el espectro de ^{13}C podemos 15 señales de las 15 esperadas para el compuesto **WAD-2**. Se observa una señal a 31.9 ppm que corresponde a los carbonos de las posiciones 9 y 11 del anillo de piperidina, a 47.8 ppm una señal que corresponde al

carbono de la posición 10 del anillo alifático, a 52.7 ppm una señal correspondiente a las posiciones 8 y 12 de la piperidina y a 62.6 la señal que corresponde al metileno del a posición. Entre 127.4 y 139.2 podemos observar las señales que corresponden a los carbonos de la región aromática. Y finalmente a 163.8 ppm se observa una señal característica que corresponde al carbono del carbonilo de la amida (**Figura 48**).

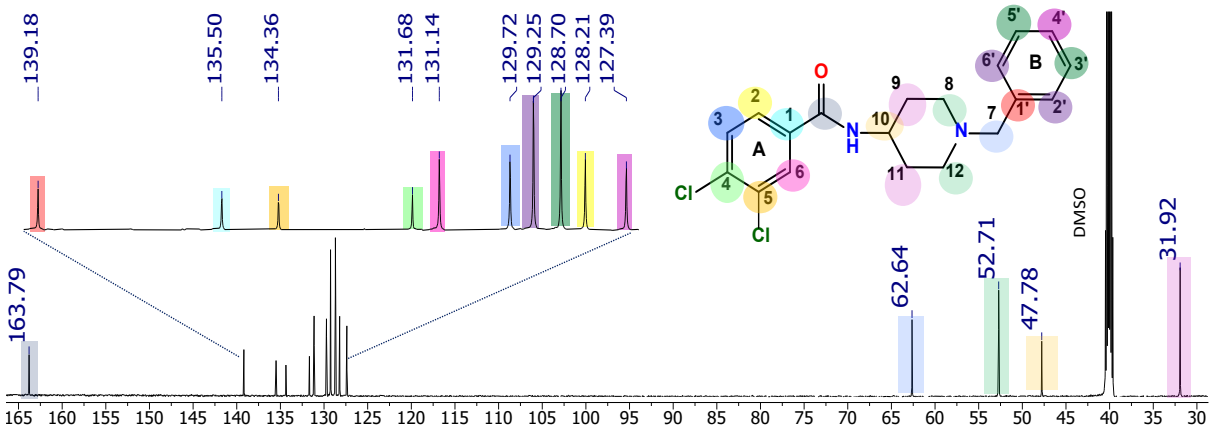


Figura 48. Espectro de ^{13}C del compuesto **WAD-2**.

Por otro lado, en la **Figura 49** se presenta el espectro de masas IE del compuesto WAD-5 en el cual se observa el pico base a una relación m/z de 91 con una abundancia relativa de 100 % que corresponde al ion tropilio. En una relación m/z de 172 con una abundancia de 75% se encuentra el pico que corresponde al fragmento ion diclorobenzoilo.

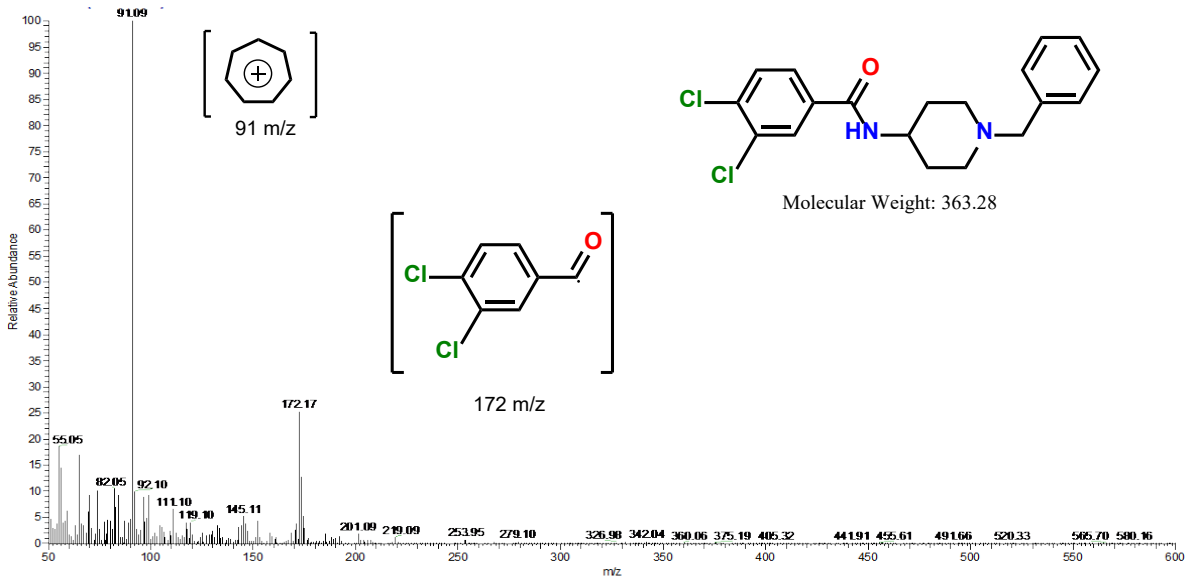


Figura 49. Espectro de masas IE del compuesto **WAD-2**.

2.2.3. Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-carbonitrilbenzamida (WAD-3)

Como se observa en el **Diagrama 7**, Para obtener el compuesto **WAD-3** se hizo reaccionar la 4-aminobencilpiperidina (**10**) con cloruro de 4-carbonitrilbenzoilo (**13**) en medio básico, usando diclorometano (CH_2Cl_2) y trietilamina como disolvente para generar la amida **WAD-3** con un rendimiento de 62.4%.

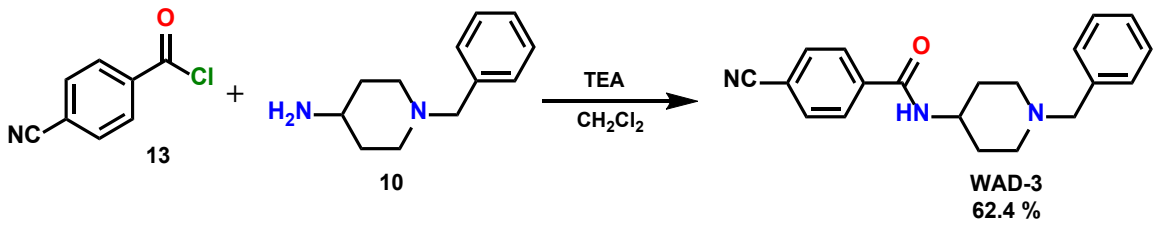
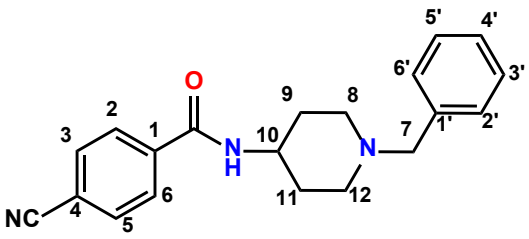


Diagrama 7. Síntesis del compuesto **WAD-3**.

Tabla 14. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-3**.



	^{1}H	^{13}C
C=O	---	164.7
NH	8.51 (*d*, 1H, *J* = 7.61 Hz)	---
CN	---	118.9
1	---	139.1
2	7.99 (*d*, 2H, J_o = 8.23 Hz)	128.6
3	7.95 (*d*, 2H, J_o = 8.67 Hz)	128.6
4	---	113.9
5	7.95 (*d*, 2H, J_o = 8.67 Hz)	128.6
6	7.99 (*d*, 2H, J_o = 8.23 Hz)	128.6
1'	---	139.2
2'	7.30-7.35 (*m*, 4H)	132.8
3'	7.30-7.35 (*m*, 4H)	129.2

4'	7.24-7.27 (*m*, 1H)	127.3
5'	7.30-7.35 (*m*, 4H)	129.2
6'	7.30-7.35 (*m*, 4H)	132.8
7	3.47 (*s*, 1H)	62.6
8	1.97 (*dt*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.72 Hz; $J_{ax\text{-}ec}$ = 2.45 Hz), 2.77 (*d*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.03 Hz)	52.6
9	1.58 (*qd*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.05 Hz; $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.86 Hz), 1.79 (*dd*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.86 Hz: $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.54 Hz)	31.8
10	3.74-3.82f (*m*, 1H)	47.7
11	1.58 (*qd*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.05 Hz; $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.86 Hz), 1.79 (*dd*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.86 Hz: $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.54 Hz)	31.8
12	2.02 (*t*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.60 Hz; $J_{ax\text{-}ec}$ = 2.45 Hz), 2.82 (*d*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.56 Hz)	52.6

2.2.4. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-(trifluorometil)fenil]urea (WAD-4)

Para obtener el compuesto **WAD-4** se hizo reaccionar la 4-aminobencilpiperidina (**10**) con el isocianato de 4-trifuorometilfenilo (**14**) usando acetonitrilo (CH_3CN) como disolvente para generar la urea **WAD-4** con un rendimiento de 95.0%. (**Diagrama 8**).

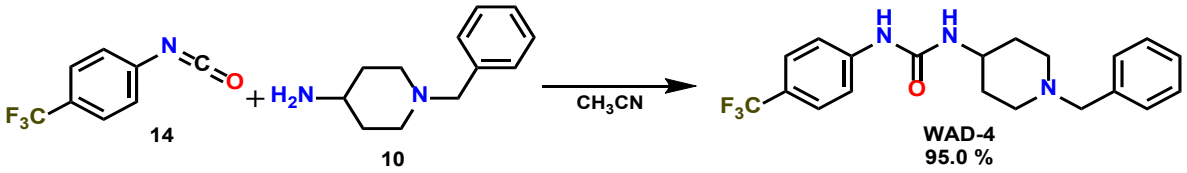
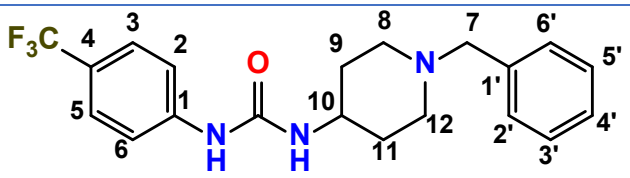


Diagrama 8. Síntesis del compuesto **WAD-4**.

Tabla 15. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-4**.



	^{1}H	^{13}C
C=O	---	155.1
NH	8.75 (s, 1H)	---

NH'	---	---
CF_3	---	124.2 (q, $^1J_{C-F}$ = 271.94 Hz)
1	---	142.3
2	7.45 (*d*, 2H, J_o = 8.31 Hz)	128.2
3	7.37 (*d*, 2H, J_o = 8.28)	126.2 (q, $^3J_{C-F}$ = 3.60 Hz)
4	---	124.5 (q, $^2J_{C-F}$ = 33.20 Hz)
5	7.37 (*d*, 2H, J_o = 8.28 Hz)	126.2 (q, $^3J_{C-F}$ = 3.60 Hz)
6	7.45 (*d*, 2H, J_o = 8.31 Hz)	128.2
1'	---	138.1
2'	7.23-7.31 (*m*, 5H)	129.1
3'	7.23-7.31 (*m*, 5H)	118.6
4'	7.23-7.31 (*m*, 5H)	127.1
5'	7.23-7.31 (*m*, 5H)	118.6
6'	7.23-7.31 (*m*, 5H)	129.1
7	3.42 (*s*, 1H)	63.0
8	2.02 (*t*, 2H_{ec}, J_{ax-ax} = 11.57 Hz) 2.75 (*d*, 2H_{ax}, J_{ax-axv}=11.44 Hz)	52.1
9	1.40 (*qd*, 2H_{ec} J_{ax-ax} = 12.23; J_{ax-ec} = 3.63 Hz) 1.88 (*d*, 2H_{ax} J_{ax-ax} = 12.63 Hz)	32.7
10	3.60-3.67 (*m*, 1H)	47.3
11	1.40 (*qd*, 2H_{ec} J_{ax-ax} = 12.23; J_{ax-ec} = 3.63 Hz) 1.88 (*d*, 2H_{ax} J_{ax-ax} = 12.63 Hz)	32.7
12	2.02 (*t*, 2H_{ec}, J_{ax-ax} = 11.57 Hz) 2.75 (*d*, 2H_{ax}, J_{ax-ax} =11.44 Hz)	52.1

2.2.5. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-clorofenil]urea (WAD-5)

Para obtener el compuesto **WAD-5** se hizo reaccionar la 4-aminobencilpiperidina (**10**) con el isocianato de 4-clorofenilo (**15**), usando acetonitrilo (CH_3CN) como disolvente con un rendimiento de 58.0%. (**Diagrama 9**).

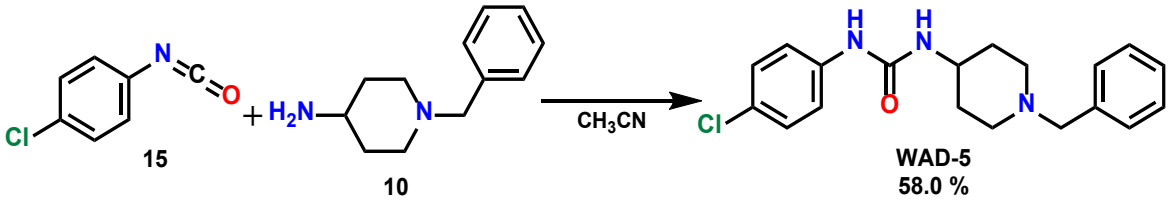
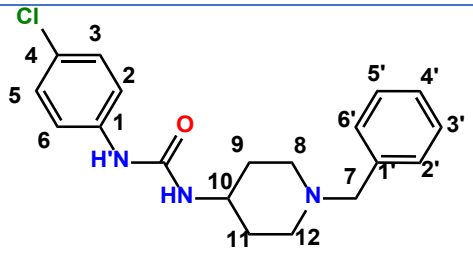


Diagrama 9. Síntesis del compuesto **WAD-5**.

Tabla 16. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-5**.



	^{1}H	^{13}C
C=O	---	154.9
NH	4.98 (*d*, 1H, *J* = 7.99 Hz)	---
NH'	6.92 (*s*, 1H)	---
1	---	137.5
2	7.26-7.31 (*m*, 4H)	121.2
3	7.26-7.31 (*m*, 4H)	129.1
4	---	125.1
5	7.26-7.31 (*m*, 4H)	129.1
6	7.26-7.31 (*m*, 4H)	121.2
1'	---	138.2
2'	7.19-7.25 (*m*, 5H)	129.1
3'	7.19-7.25 (*m*, 5H)	128.2
4'	7.19-7.25 (*m*, 5H)	127.1
5'	7.19-7.25 (*m*, 5H)	128.2
6'	7.19-7.25 (*m*, 5H)	129.1
7	3.46 (*s*, 1H)	63.0
8	2.07 (*t*, $2H_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.84 Hz) 2.77 (*d*, $2H_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ =11.61 Hz)	52.2
9	1.41 (*q*, $2H_{ec}$ $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.57 Hz) 1.90 (*d*, $2H_{ax}$ $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.34 Hz)	32.7

10	3.62-3.68 (*m*, 1H)	47.3
11	1.41 (*q*, 2H$_{ec}$ J_{ax-ax} = 11.57 Hz) 1.90 (*d*, 2H$_{ax}$ J_{ax-ax} = 12.34 Hz)	32.7
12	2.07 (*t*, 2H$_{ec}$, J_{ax-ax} = 11.84 Hz) 2.77 (*d*, 2H$_{ax}$, J_{ax-ax} =11.61 Hz)	52.2

2.2.6. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-fluorofenil]urea (WAD-6)

Para obtener el compuesto **WAD-6** se hizo reaccionar la 4-aminobencilpiperidina (**10**) con el isocianato de 4-fluorofenilo (**16**), la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente usando acetonitrilo (CH_3CN) como disolvente para generar la urea **WAD-6** con un rendimiento de 70.7%. (**Diagrama 10**).

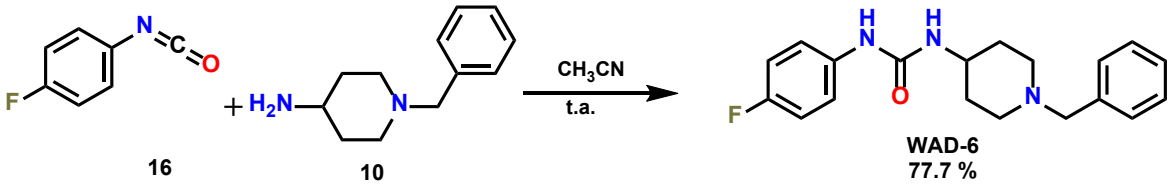
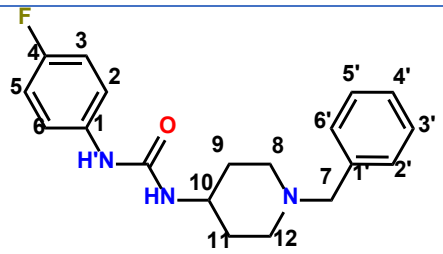


Diagrama 10.Síntesis del compuesto **WAD-6**

Tabla 17. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-6**.



	^{1}H	^{13}C
C=O	---	155.7
NH	4.98 (*d*, 1H, *J* = 7.99 Hz)	---
NH'	7.30 (*s*, 1H)	---
1	---	134.7 (*d*, $^{4}J_{C-F}$ = 2.71 Hz)
2	6.93 (t, 2H, J_o = 8.45)	122.4 (*d*, $^{3}J_{C-F}$ = 7.91 Hz)
3	7.18-7.20 (*m*, 2H)	115.7 (*d*, $^{2}J_{C-F}$ = 22.39 Hz)
4	---	159.1 (*d*, $^{1}J_{C-F}$ = 243.26 Hz)
5	7.18-7.20 (*m*, 2H)	115.7 (*d*, $^{2}J_{C-F}$ = 22.39 Hz)

6	6.93 (t, 2H, J_o = 8.45)	122.4 (*d*, $^3J_{C\text{-}F}$ = 7.91 Hz)
1'	---	138.1
2'	7.23-7.29 (*m*, 5H)	129.1
3'	7.23-7.29 (*m*, 5H)	128.2
4'	7.23-7.29 (*m*, 5H)	127.1
5'	7.23-7.29 (*m*, 5H)	128.2
6'	7.23-7.29 (*m*, 5H)	129.1
7	3.44 (*s*, 1H)	63.0
8	2.03 (*t*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$= 11.39 Hz) 2.75 (*d*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$=11.41 Hz)	52.2
9	1.39 (*qd*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.25 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 5.66 Hz) 1.87 (*dd*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 13.07 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 4.05 Hz)	32.7
10	3.59-3.66 (*m*, 1H)	47.2
11	1.39 (*qd*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.25 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 5.66 Hz) 1.87 (*dd*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 13.07 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 4.05 Hz)	32.7
12	2.03 (*t*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$= 11.39 Hz) 2.75 (*d*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$=11.41 Hz)	52.2

2.2.7. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-cloro-3-triflurometilfenil]urea (WAD-7)

Para la síntesis de **WAD-7** se hizo reaccionar la 4-aminobencilpiperidina (**10**) con el isocianato de 4-cloro-3-trifluorometilfenilo (**17**), usando CH_3CN como disolvente, se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento crudo de 80.6% (**Diagrama 11**). En espera de espectros.

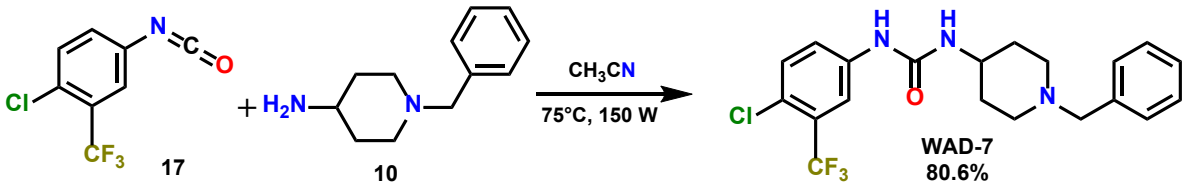
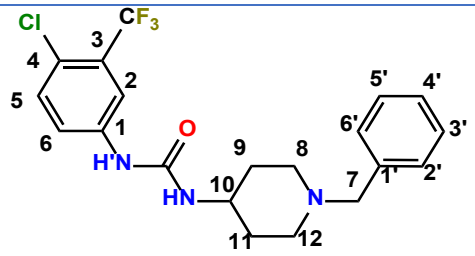


Diagrama 11. Síntesis del compuesto **WAD-7**.

Tabla 18. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-7**.



	^{1}H	^{13}C
C=O	---	154.6
NH	6.31 (*d*, 1H, *J* = *7.63* Hz)	---
NH'	8.84 (*s*, 1H)	---
CF_3	---	123.45 (*q*, $^{1}J_{C\text{-}F}$ = 247.5 Hz)
1	---	139.0
2	7.21-7.35 (*m*, 5H)	116.5 (*q*, $^{3}J_{C\text{-}F}$ = 3.25 Hz)
3	---	127.11 (*q*, $^{2}J_{C\text{-}F}$ = 31.65 Hz)
4	---	127.3 (*q*, $^{3}J_{C\text{-}F}$ = 3.0 Hz)
5	7.51-7-53 (*m*, 2H)	132.3
6	7.51-7-53 (*m*, 2H)	122.7
1'	---	140.5
2'	7.21-7.35 (*m*, 5H)	129.2
3'	7.21-7.35 (*m*, 5H)	128.6
4'	7.21-7.35 (*m*, 5H)	127.3
5'	7.21-7.35 (*m*, 5H)	128.6
6'	7.21-7.35 (*m*, 5H)	129.2
7	3.45 (*s*, 1H)	62.6
8	2.04 (*t*, $2H_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$= 11.02 Hz) 2.74 (*d*, $2H_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$=11.75 Hz)	52.2
9	1.42 (*qd*, $2H_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.47 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.49 Hz) 1.79 (*dd*, $2H_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.96 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.61 Hz)	32.4
10	3.46-3.52 (*m*, 1H)	46.9
11	1.42 (*qd*, $2H_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.47 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.49 Hz)	32.4

	1.79 (*dd*, 2H$_{ax}$, J_{ax-ax} = 12.96 Hz, J_{ax-ec} = 3.61 Hz)	
12	2.04 (*t*, 2H$_{ec}$, J_{ax-ax}= 11.02 Hz) 2.74 (*d*, 2H$_{ax}$, J_{ax-ax}=11.75 Hz)	52.2

2.2.8. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-fenilurea (WAD-8)

Para obtener el compuesto **WAD-8** se hizo reaccionar la 4-aminobencilpiperidina (**10**) con isocianato de fenilo (**18**), usando acetonitrilo (CH_3CN) como disolvente. En esta reacción se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento crudo de 85.0%. (**Diagrama 12**).

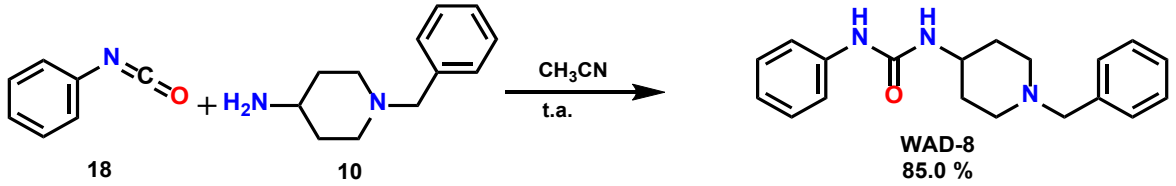
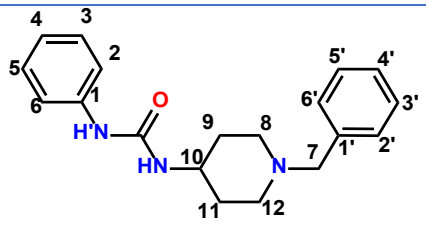


Diagrama 12. Síntesis del compuesto **WAD-8**.

Tabla 19. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-8**.



	^{1}H	^{13}C
C=O	---	155.6
NH	5.28 (*d*, 1H, *J* = *6.94* Hz)	---
NH'	---	---
1	---	138.8
2	7.22-7.30 (*m*, 8H)	120.5
3	7.22-7.30 (*m*, 8H)	129.2
4	7.01 (*td*, 1H, J_o = 7.07 Hz, J_m = 1.81 Hz)	123.4

5	7.22-7.30 (*m*, 8H)	129.2
6	7.22-7.30 (*m*, 8H)	120.5
1'	---	138.4
2'	7.22-7.30 (*m*, 8H)	129.1
3'	7.22-7.30 (*m*, 8H)	128.2
4'	7.19-7.20 (*m*, 1H)	127.0
5'	7.22-7.30 (*m*, 8H)	128.2
6'	7.22-7.30 (*m*, 8H)	129.1
7	3.44 (*s*, 1H)	63.0
8	2.04 (*t*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$= 11.47 Hz) 2.74 (*d*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$=11.40 Hz)	52.3
9	1.39 (*qd*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.25 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.73 Hz) 1.88 (*dd*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 13.57 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.91 Hz)	32.7
10	3.59-3.66 (*m*, 1H)	47.2
11	1.39 (*qd*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.25 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.73 Hz) 1.88 (*dd*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 13.57 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.91 Hz)	32.7
12	2.04 (*t*, 2H$_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$= 11.47 Hz) 2.74 (*d*, 2H$_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$=11.40 Hz)	52.3

2.2.9. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-fenilurea (WAD-9)

Para obtener el compuesto **WAD-9** se hizo reaccionar la 4-aminobencilpiperidina (**10**) con el isocianato de ciclohexilo (**19**), usando CH_3CN como disolvente. Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento crudo de 90.8% (**Diagrama 13**).

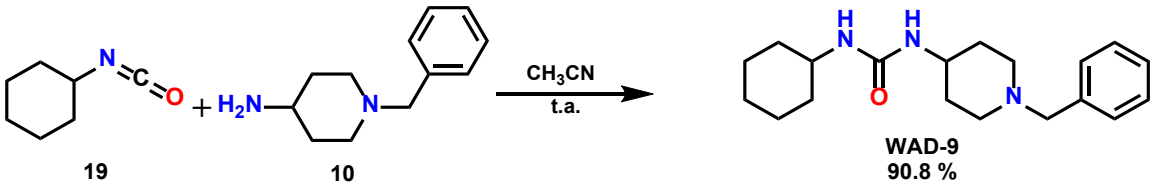
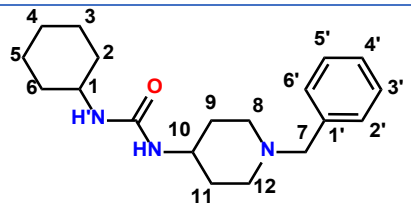


Diagrama 13. Síntesis del compuesto **WAD-9**.

Tabla 20. Desplazamientos químicos obtenidos de ^{1}H y ^{13}C del compuesto **WAD-9**.



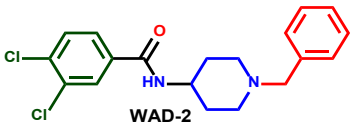
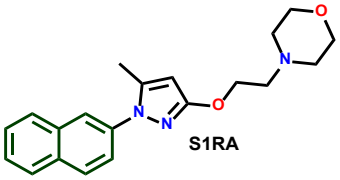
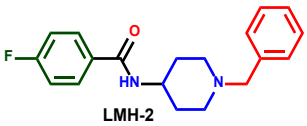
	^{1}H	^{13}C
C=O	---	157.0
NH	7.30 (*s*, 1H)	---
NH'	5.28 (*d*, 1H, *J* = *6.94* Hz)	---
1	3.47-3.52 (m, 1H)	48.9
2	1.90 (*d*, 4H, *J* = 11.43 Hz)	33.0
3	1.06 – 1.16 (*m*, 3H) 1.30-1.37 (m, 2H)	24.9
4	1.06 – 1.16 (*m*, 3H) 1.57-1.60 (*m*, 1H)	25.6
5	1.06 – 1.16 (*m*, 3H) 1.30-1.37 (m, 2H)	24.9
6	1.90 (*d*, 4H, *J* = 11.43 Hz)	33.0
1'	---	138.5
2'	7.29 (d, 4H)	129.1
3'	7.29 (d, 4H)	128.1
4'	7.22-7.26 (*m*, 1H)	127.0
5'	7.29 (d, 4H)	128.1
6'	7.29 (d, 4H)	129.1
7	3.47 (*s*, 1H)	63.1
8	1.90 (t, $2H_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.43z Hz) 2.79 (*d*, $2H_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.45 Hz)	52.4
9	1.42 (*qd*, $2H_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.53 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.58 Hz) 1.68 (*d*, $2H_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.6 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.93 Hz)	33.9
10	3.55-3.59 (*m*, 1H)	47.2
11	1.42 (*qd*, $2H_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.53 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.58 Hz) 1.68 (*d*, $2H_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 12.6 Hz, $J_{ax\text{-}ec}$ = 3.93 Hz)	33.9
12	2.10 (t, $2H_{ec}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.43 Hz) 2.79 (*d*, $2H_{ax}$, $J_{ax\text{-}ax}$ = 11.45 Hz)	52.4

2.3. Parte farmacológica

2.3.1. Ensayos *in vitro*

La evaluación *in vitro* se realizó en colaboración con el Profr. Dr. Bernard Wünsch y el Dr. Héctor Torres-Gómez del departamento de Química Farmacéutica en la Universidad de Münster Alemania. Para evaluación se realizó un radioinmunoensayo (binding) usando pentazocina tritiada como ligando radiomarcado y cerebro de cuyo como fuente de receptores sigma. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Evaluación *in vitro* del compuesto **WAD-2**.

Compuesto	Afinidad σ_1R (nM)	Afinidad σ_2R (nM)	Selectividad
 WAD-2	**4.2**±0.4	**246**±15	~58
 S1RA	**17**	**>1000**	---
 LMH-2	**6**	**190**	~31

X1.2

X4

Para la evaluación *in vitro* se decidió evaluar solo un compuesto debido a los problemas asociados al envío de las muestras químicas por mensajería internacional, para ello se seleccionó únicamente al compuesto **WAD-2** y ya que presentó una solubilidad experimental adecuada para realizar los estudios *in vitro*. En los estudios realizados, el compuesto **WAD-2** mostró valores de afinidad sobre σ_1R en el bajo orden nanomolar, catalogándose como líderes experimentales seguros. Adicionalmente el compuesto **WAD-2** mostró selectividad con σ_1R en comparación con σ_2R. El compuesto **WAD-2** mostró ser 4 veces más afín que el compuesto **S1RA** que se encuentra en ensayos clínicos de fase IIa para el tratamiento del dolor neuropático; además se observó que es 1.2 más afín que el compuesto **LMH-2**.[54,67]

Debido a los resultados observados, se decidió realizar las evaluaciones *in vivo* del compuesto **WAD-2** en un modelo de rata con ligaduras en los nervios espinales L_5 y L_6 para evaluar la actividad antialodínica de dicho compuesto.

2.3.2. Ensayos *in vivo*

La evaluación *in vivo* se realizó en colaboración con la Dra. Myrna Déciga Campos, la Q.I. Diana Karen Morales Galindo (Escuela Superior de Medicina del IPN), y el Dr. Vinicio Granados Soto (Departamento de Farmacobiología de CINVESTAV-SUR). Para la evaluación se utilizaron 6 grupos de ratas, las ratas **Naive** que no recibieron ningún tratamiento. Las ratas **Sham** que solo recibieron una cirugía falsa y las ratas de los grupos **WAD-2**, **PRE-084** y **WAD-2+PRE-084** a las que se le realizó la cirugía de ligaduras de nervios espinales (LNE).

Inicialmente se realizó una validación del método de cirugía de LNE, posteriormente se realizaron evaluaciones para la determinación de la concentración a la cual se presenta una respuesta alodínica en el caso del compuesto **PRE-084**, y una respuesta antialodínica en el caso del compuesto **WAD-2**., Finalmente, los grupos **WAD-2**, **PRE-084** y **WAD-2+PRE-084** fueron evaluados 15 días posteriores a la cirugía.

Para poder interpretar las gráficas de los resultados, es importante mencionar que cuando las ratas tienen un valor del 50% de umbral de retiro igual o menor a 4 g se considera que las ratas son alodínicas, y se considera un valor basal (sin alodinia) cuando se alcanzan los 12 g (**Figura 40**).

2.3.2.1. Validación del método de LNE

3. Para validar el método de la cirugía de ligaduras de nervios espinales L_5 y L_6 (LNE)[83,84] se ocuparon los grupos **Naive**, **Sham** y **LNE** a los que se realizaron evaluaciones en un curso de 21 días, la determinación de alodinia táctil se realizó en los días 3, 7,14 y 21 (**Figura 50**).

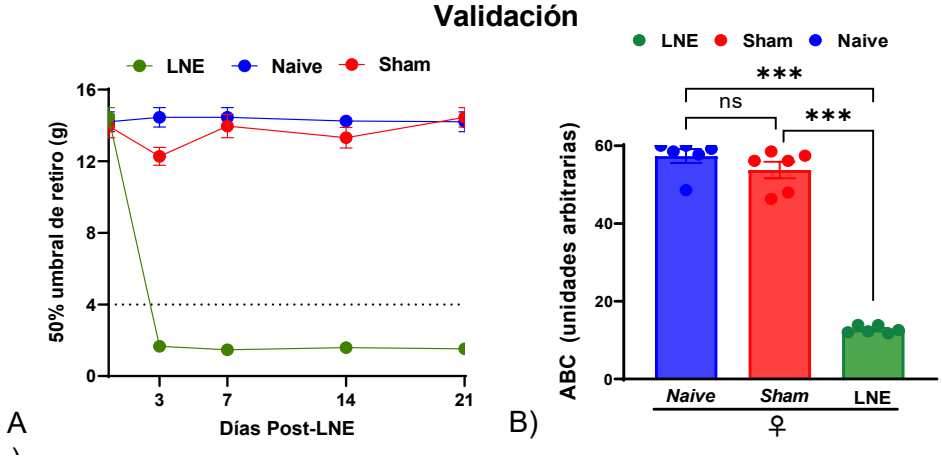


Figura 50. Validación LNE.A) Curso temporal del 50% del umbral de retiro de ratas con LNE, respecto a ratas Sham y Naive. B) ABC del curso temporal. Los datos se presentan como la media ± EEM (n=6). ***P<0.001, determinado por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey.

Como se puede observar en la gráfica A de la **Figura 50**, en las ratas con **LNE** se disminuyó drásticamente el umbral de retiro a valores por debajo de 4 g (línea punteada) a partir del día 3, estos valores se mantienen hasta el día 21, lo que nos indica que las ratas presentan alodinia mecánica en la prueba de Von Frey. En cuando a las ratas **Naive**, al no tener ningún tipo de tratamiento conservaron su umbral de retiro en valores basales de aproximadamente 15 g. Finalmente, las ratas del grupo **Sham** (con falsa cirugía) mostraron una ligera disminución del umbral del dolor en el día 3 debido al dolor inflamatorio causado por la lesión y una recuperación del umbral de dolor al día 7. En la gráfica B se muestra el área bajo la curva que nos indica la sumatoria de los promedios de los valores de umbral de dolor determinados en los días 3, 7, 14 y 21; se puede observar que no hay diferencia significativa entre el grupo **Sham** y **Naive**. Adicionalmente, se puede ver la drástica diferencia en los valores entre el grupo **LNE** y los grupos **Sham** y **Naive.** Por lo tanto, se validó en modelo de dolor neuropático.

3.1.1.1. Determinación de la concentración del compuesto PRE-084 para obtener un efecto alodínico

Para definir una concentración apropiada en la cual se muestre una respuesta alodínica inducida por el compuesto **PRE-084** (agonista σ_1R), se usaron 3 grupos de 6 ratas Wistar para evaluar las siguientes concentraciones: 0.3, 3 y 30 μg.

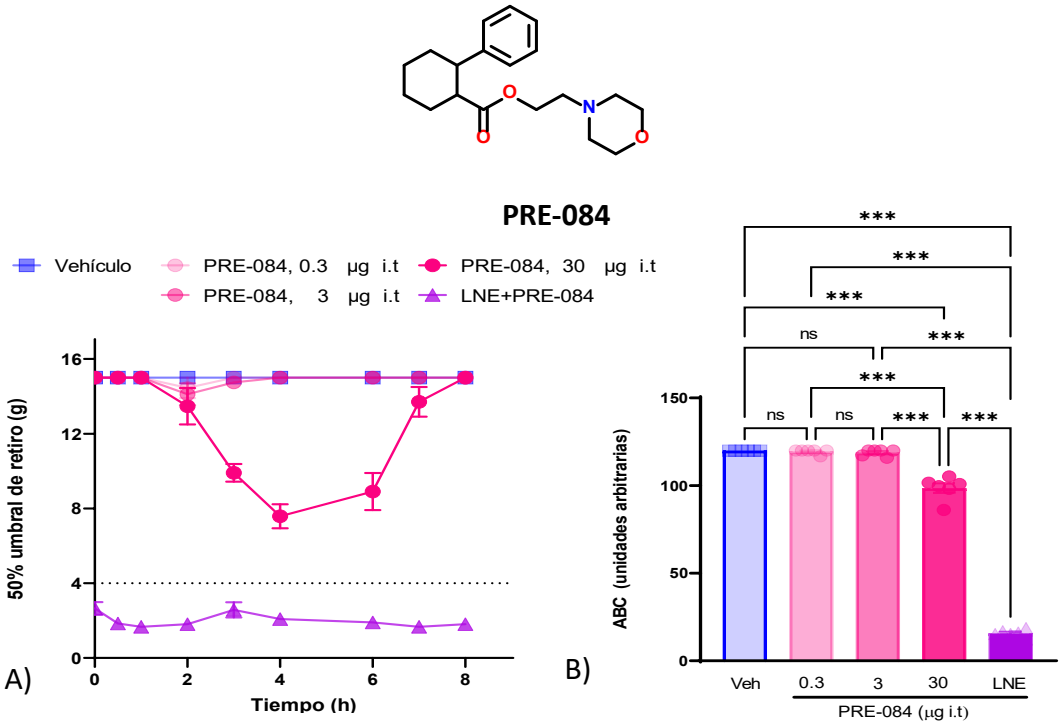


Figura 51. Efecto alodínico de **PRE-084.** A). Curso temporal del 50% del umbral de retiro de **PRE-084** B) Área bajo la curva (ABC) del curso temporal. Los datos se presentan como la media ± EEM (n=6). * P<0.05, ***P<0.001determinado por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey.

En la gráfica A de la **Figura 51** podemos observar que cuando se administraron concentraciones de 0.3 y 3 μg no hubo disminución del umbral de retiro estadísticamente significativa respecto al grupo que solo se administró el vehículo. Cuando se administró el agonista **PRE-084** a una concentración de 30 μg vía intratecal se observó un efecto alodínico, el umbral de retiro disminuyó gradualmente a partir de la hora 2 hasta la hora 4, y el efecto se pierde a la hora 8. Así mismo se observó que al administrar el compuesto **PRE-084** en ratas con LNE se presenta un aumento de la respuesta alodínica comparado con las ratas a las que se les administró **PRE-084** (30 μg it) pero que no se les realizó la cirugía.

En la gráfica B se presenta el área bajo la curva de los valores presentados en la gráfica A. En esa gráfica de barras se puede ver que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo al que se le administró vehículo y los grupos a los que se les administró **PRE-084** a concentraciones de 0.3 y 3 μg. Así mismo se puede observar que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo que se les administró PRE-084 a una concentración de 30 μg y el grupo Vehículo. Por lo tanto, se seleccionó la concentración de 30 μg para realizar la evaluación del afecto antialodínico mediado por el σ_1R del compuesto **WAD-2**.

3.1.1.2. Determinación del efecto antialodínico del compuesto WAD-2

La evaluación del compuesto **WAD-2** se realizó en un curso temporal de 8 horas para determinar la respuesta antialodínica presentada en ratas con LNE. Como se puede ver, en la hora 0 las ratas se encuentran en valores por debajo de 4 g indicando que las ratas se encuentran inicialmente alodínicas. Como se puede observar en la parte A de la **Figura 52**, al administrar 300 μg de compuesto **WAD-2** se logró observar una respuesta antialodínica desde las 0.5 h que continuó aumentando hasta alcanzar valores basales a las 3 h. El efecto comenzó a decaer a partir de la hora 3 llegó a valores alodínicos a la hora 7. En cuanto a las concentraciones de 100 y 150 μg no se alcanzaron los niveles basales, pero si se observó un efecto antialodínico significativo a las 3 y 4 h respectivamente.

De acuerdo con la **Figura 52**, se evaluaron 3 concentraciones del compuesto **WAD-2**. Cuando se evaluó una concentración de 300 μg vía intratecal, el efecto del compuesto alcanzó hasta un valor basal. En la gráfica que muestra el área bajo la curva podemos observar que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de 100 μg y 150 μg. Sin embargo, al aumentar la concentración a 300 μg se presenta una mejora en la respuesta antialodínica. Y finalmente, en la comparación de los grupos a los cuales se les administró el compuesto **WAD-2** y el grupo vehículo se observar diferencia significativa lo que demuestra que al administrar **WAD-5** efectivamente se genera una respuesta antialodínica.

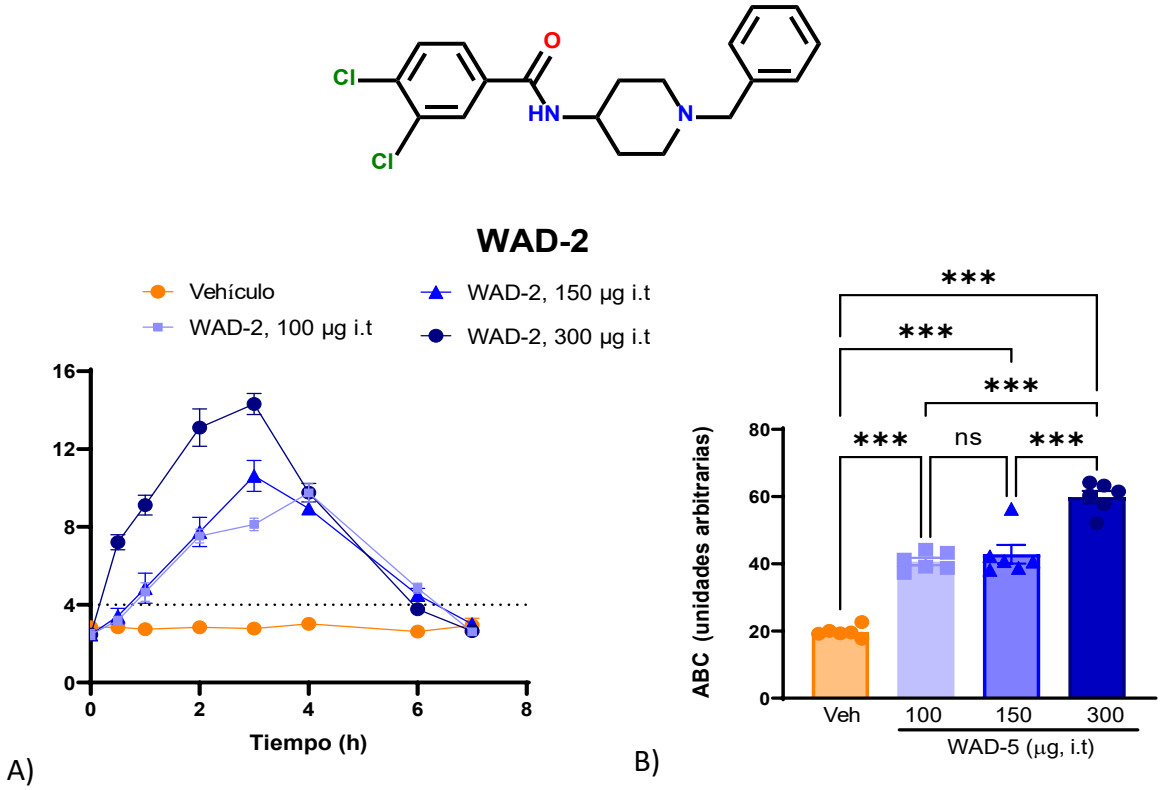


Figura 52. Efecto antialodínico de **WAD-2** en un modelo de LNE. A) Curso temporal del 50% del umbral de retiro de WAD-5. B) ABC del curso temporal A. Los datos se presentan como la media ± EEM (n=6). *P<0.05, ***P<0.001 determinado por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey.

Por lo tanto, basados en estos resultados podemos concluir que el compuesto **WAD-2** mostró una respuesta antialodínica dependiente de concentración al administrar concentraciones de 100, 150 y 300 µg por vía intratecal. Dados los resultados, se optó por usar la concentración de 300 µg para realizar la bioevaluación de la selectividad del compuesto sobre σ_1R.

3.1.1.3. Determinación del efecto antialodínico del compuesto WAD-2

Para la determinación del efecto antialodínico mediado por σ_1R, se realizó la evaluación con 3 grupos: el grupo al que se le administró el compuesto **WAD-2** (300 µg) solo, y dos grupos a los que se les administró el potencial antagonista **WAD-2** (300 µg) y el compuesto agonista **PRE-084** (3 y 30 mg) (**Figura *53***).

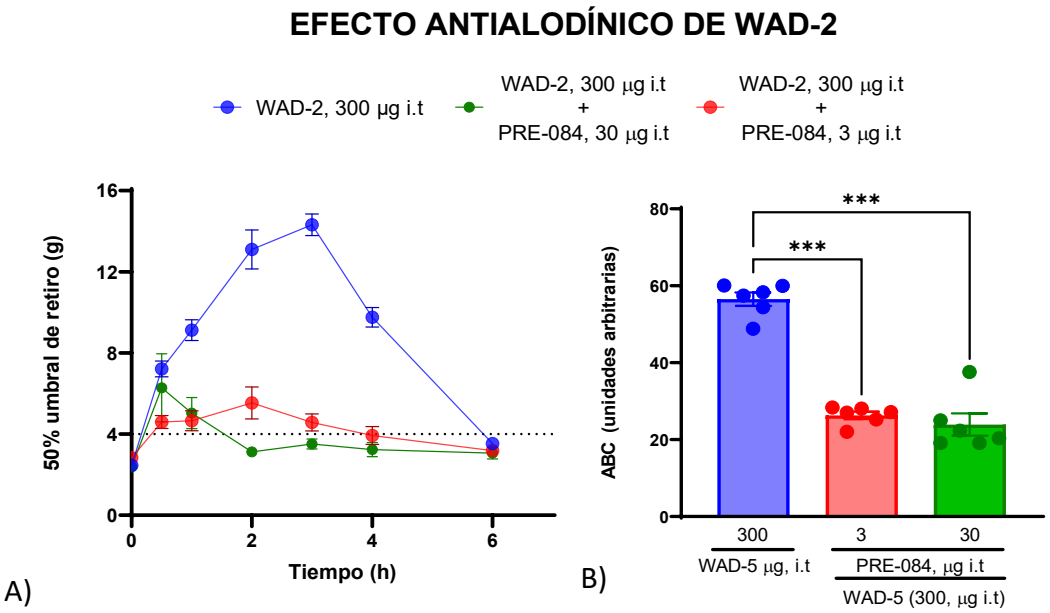


Figura 53. Determinación del efecto de **WAD-2** en presencia de **PRE-084** en ratas con LNE. Curso temporal del 50% del umbral de retiro de **WAD-2** (30 µg i.t.), **WAD-2** (30 µg i.t.) administrado individualmente o en presencia de **PRE-084**. B) ABC del curso temporal A. Los datos se presentan como la media ± EEM (n=6). ***P< 0.001, determinado por t-Student.

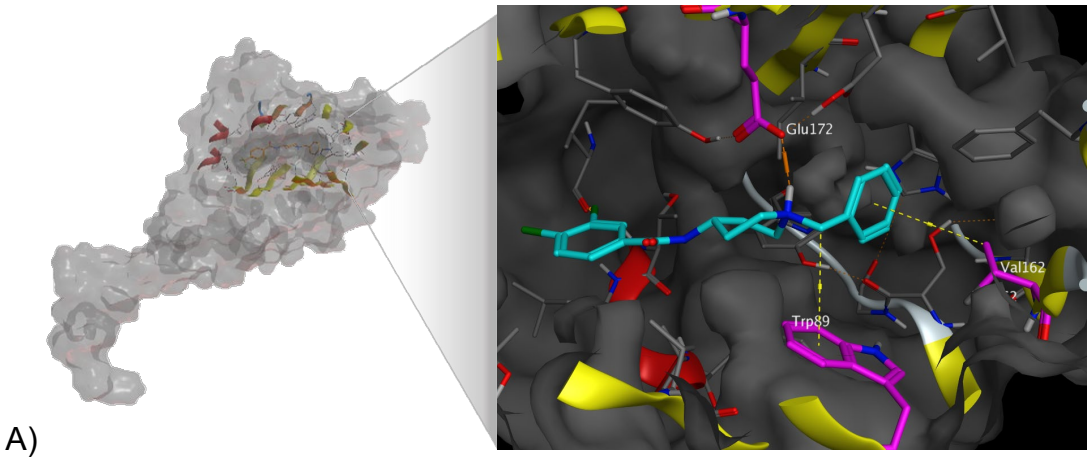
Como se presenta en la gráfica A **Figura 53**, al administrar el compuesto **WAD-2** hay un efecto antialodínico a partir de las 0.5 h, que continua en incremento y alcanza los niveles basales en la hora 3. Cuando se administra el compuesto **WAD-2** (300 µg i.t.) con el agonista **PRE-084** (30 µg i.t.) se observa un afecto antialodínico a las 0.5 h, sin embargo, este efecto se pierde a la hora 1. Finalmente, cuando se administra el compuesto **WAD-2** (300 µg i.t.) con el agonista **PRE-084** (3 µg i.t.), no se observa efecto antialodínico de **WAD-2.** En la gráfica del área bajo la curva se puede observar las diferencias significativas entre el compuesto antagonista **WAD-2** solo y cuando se administra en combinación con **PRE-084**. Además, se puede ver que no hay diferencias significativas al administrar **WAD-2** en presencia de **PRE-084** a concentraciones de 3 y 30 µg i.t., es decir que el efecto antinociceptivo de **WAD-2** se pierde cuando es coadministrado con el compuesto agonista de manera independiente de la concentración de **PRE-084.**

Con base en estos resultados se puede concluir que el agonista **PRE-084** revierte el efecto anticonceptivo de **WAD-5** de manera independiente de la concentración. En adición, el compuesto **WAD-5** efectivamente tiene un efecto antialodínico dado por la acción antagonista σ_1R.

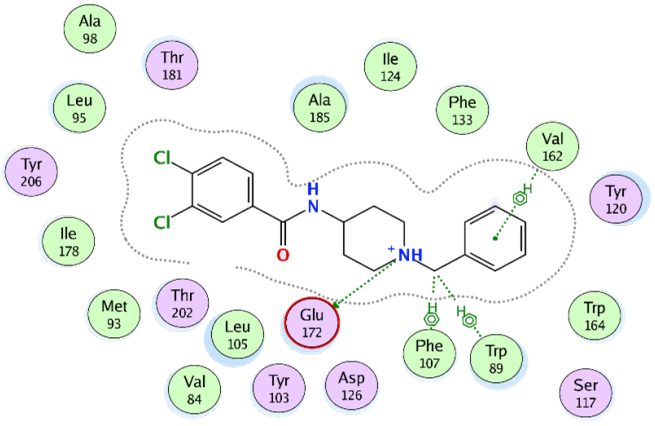
3.1.2. Acoplamiento molecular *a posteriori*

Debido a que en el ensayo *in vitro* que evaluó la afinidad del compuesto **WAD-2** con σ_1R y σ_2R se obtuvieron afinidades con ambos receptores en el bajo orden nanomolar, se decidió realizar un acoplamiento molecular para conocer el posible modo de unión. Como ejemplo, se muestran los resultados del acoplamiento molecular del compuesto **WAD-2**.

En la **Figura 54** se pueden observar las interacciones entre el compuesto **WAD-2** y σ_1R donde se obtuvo una energía de unión con un valor de -8.577±0.078 Kcal/mol. Se presentó una interacción electrostática entre la amina terciaria del compuesto **WAD-2** y el residuo de aminoácido Glu-172, similar a la observada anteriormente entre el compuesto **4-IBP** y σ_1R. Dicha interacción es característica de los ligandos σ_1R que ya se han reportado anteriormente en la literatura.[19] Así mismo, se observan interacciones hidrofóbicas con los residuos nos polares del sitio de unión e interacciones de tipo π-sp^3 con Val-162, Trp-89 y Phe-107.[45]



A)



B)

Figura 54. Interacciones del compuesto **WAD-2** con σ_1R. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D

Otra forma de representar las interacciones que se presentan entre los ligandos y la diana son los diagramas PLIF (Protein Ligand Interaction Fingerprints). En estos diagramas se puede hacer una comparativa de las interacciones presentes en los ligandos de interés con el receptor que se está estudiando. En la siguiente figura se muestra el diagrama PLIF de los compuestos 4-IBP y **WAD-2** con σ_1R.

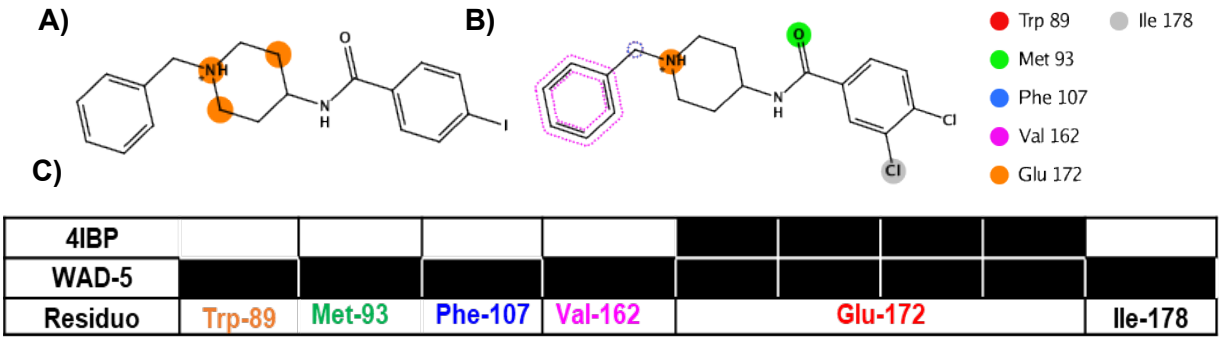


Figura 55. PLIF **4-IBP** vs **WAD-2**. A) Interacciones 2D entre **4-IBPI** y σ_1R; B) Interacciones 2D entre **WAD-2** y σ_1R; C) Diagrama PLIF de **4-IBP** y **WAD-2** con σ_1R.

Como se puede observar en la **Figura 55**, los compuestos **4-IBP** y **WAD-2** presentan las interacciones con Glu-172, y en el caso del compuesto **WAD-5** se observan interacciones adicionales con Trp-89, Met-93, Phe-107, Val-162 como se puede observar en el diagrama de interacciones 2D, en adición, se puede observar una interacción entre el átomo de cloro del compuesto y el residuo de Ile-178 que posiblemente sea una interacción tipo σ-hole.

3.1.2.1. Modelado por homología del σ_2R

Debido a que en el ensayo *in vitro* donde se determinó la afinidad del compuesto **WAD-2** sobre los receptores sigma se obtuvieron valores de afinidad con σ_2R en el bajo orden nanomolar (246 nM), se decidió realizar estudios de acoplamiento molecular con dicha diana para predecir el posible modo de unión dentro de la cavidad de reconocimiento molecular. Debido a que actualmente no se dispone de un archivo que contenga una estructura tridimensional de la proteína cocristalizada de σ_2R de humano en las bases de datos disponibles en la red (Uniprot, Protein Data Bank) se realizó un modelado por homología para posteriormente llevar a cabo los estudios de acoplamiento.

El modelado por homología se realizó en el programa MOE. Para el modelado se usó como modelo de referencia la estructura cristalizada del σ_2R bovino con el código PDB **7M93**, dicha proteína es un dímero con una secuencia de 174 aminoácidos y pertenece al organismo *Bos Taurus,* el cual es expresado en el organismo *Spodoptera fugiperda.* El modelo tridimensional posee una resolución de 2.94 Å y contiene unido al compuesto **PB28** dentro de la cavidad de reconocimiento molecular, el cual está directamente relacionado con los efectos farmacológicos de

los ligandos agonistas de este receptor. La secuencia primaria que corresponde a σ_2R humano con una secuencia de 176 aminoácidos que se usó en este experimento se obtuvo de Uniprot con el código **Q5BJF2.**

Para validar los resultados del modelo obtenido por homología se determinó el valor de RMSD (validación estructural), el valor QMEAN (evaluación de la calidad), el diagrama de Ramachandran, (validación geométrica) y finalmente realizó un reacoplamiento por triplicado entre la proteína obtenida mediante el modelado molecular y el ligando que estaba co-cristalizado con la proteína usada como estructura tridimensional de referencia del σ_2R.

3.1.2.1.1. Validación del modelado

En la validación estructural se obtuvo un valor de RMSD de 0.854 Å, el cual tiene un valor menor a 2 Å por lo que se considera que la estructura del modelo obtenido por homología es adecuado. En la **Figura 56** se presenta un Sobreposicionamiento de la estructura molde (color rojo) y el modelo obtenido por homología (color azul). Es dicha figura se puede ver como la estructura tridimensional del receptor se mantiene, por ello fue importante considerar una estructura modelo inicial de referencia que contuviera un ligando cocristalizado y de esta manera se conservara la cavidad del sitio de unión de σ_2R.

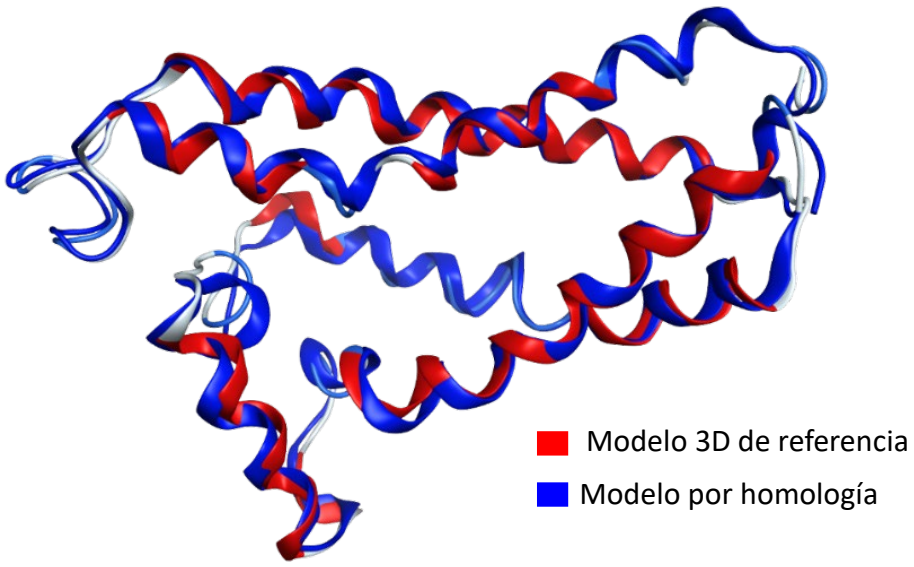


Figura 56. Sobreposicionamiento estructura molde vs modelo obtenido por homología.

Para la validación de la calidad del modelo obtenido por homología se realiza una comparación entre el modelo obtenido en este experimento y las estructuras obtenidas experimentalmente que se encuentran contenidas en la base de datos de Protein Data Bank. El valor numérico considerado en esta validación es la puntuación *Z*.

El 85% de los modelos con mala calidad que tienen una puntuación *Z* por encima de −2 son estructuras pequeñas por debajo de los 150 residuos y la varianza de la puntuación QMEAN aumenta con la disminución del tamaño. Para apreciar esta evaluación de manera visual se presenta un esquema donde el modelo a evaluar se muestra como una estrella roja, en color gris oscuro se muestran aquellas estructuras con potenciales de fuerza individual más cercanas a 1 (modelos con buena calidad) y en color gris claro se observan proteínas con valor Z de ~2 (modelos con calidad aceptable).

En este experimento, el modelo por homología obtuvo valor de QMEAN de -3.49. En la **Figura 57** se puede observar el valor QMEAN normalizado del modelo de σ_2R en una estrella roja. Se considera un modelado por homología con calidad aceptable si la estrella está cercana a los puntos grises oscuros.



Figura 57. QMEAN obtenido para la estructura obtenida mediante modelado por homología.

La validación geométrica del modelo se representa en un diagrama de Ramachandran (**Figura 58**). El diagrama de Ramachandran consta de 4 cuadrantes, en el cuadrante superior izquierdo se contienen aminoácidos de hojas beta, mientras que en el cuadrante superior derecho se contienen aminoácidos que se encuentran en α-hélices levógiras, en el cuadrante inferior izquierdo se encuentran aminoácidos de las α-hélices dextrógiras y finalmente en el cuadrante inferior derecho se presentan los aminoácidos que se encuentran en zonas no permitidas.

Los residuos que se encuentran en zonas permitidas (color amarillo) y los residuos que se encuentran en zonas favorecidas (color verde) se consideran como residuos que respetan los ángulos phi-psi.

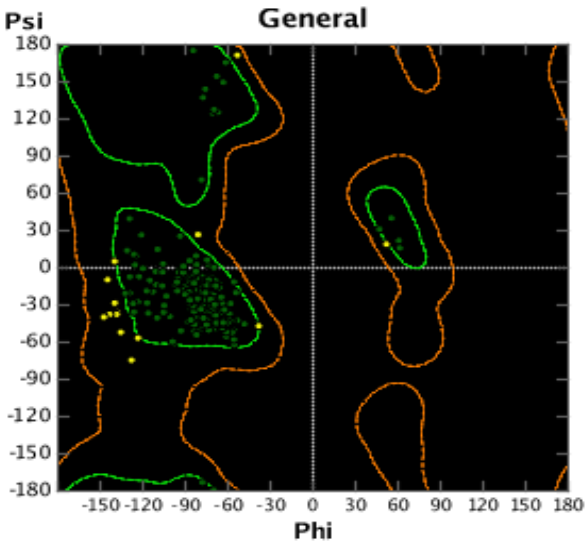


Figura 58. Diagrama de Ramachandran.

En la **Tabla 22** se puede observar el número de aminoácidos que se encuentran en las zonas permitidas y favorecidas. En este diagrama, no debe haber más del 5% de los residuos en zonas atípicas. En este caso, ninguno de los aminoácidos se encontraba en zonas atípicas, por lo tanto, el modelo obtenido por homología se considera adecuado para realizar los estudios de acoplamiento molecular.

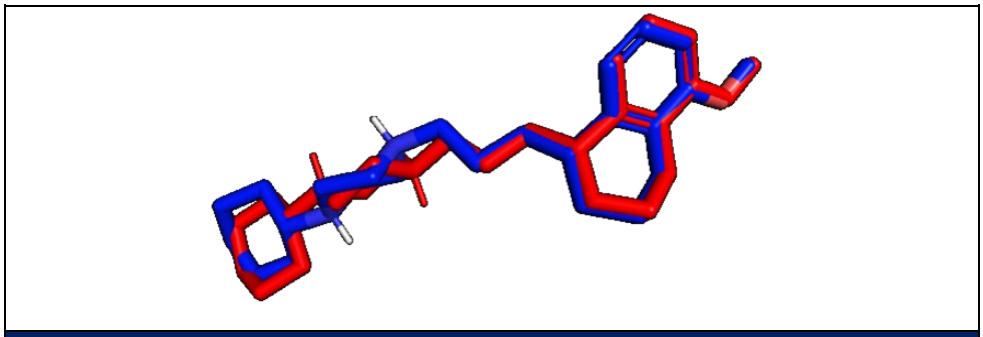
Tabla 22. Resultados cuantitativos del diagrama de Ramachandran.

	Número de aminoácidos	Porcentaje de aminoácidos
Zona favorecida	18	10.34
Zona permitida	156	89.66
Zona atípica	0	0

3.1.2.2. Acoplamiento molecular dirigido de los compuestos sobre σ_2R

Una vez validado el modelo obtenido por homología se realizó el acoplamiento molecular refinado del compuesto **WAD-2** que fue evaluado *in vitro* con el receptor σ_2 usando el programa MOE y el archivo pdb **7M93**. En el ensayo de acoplamiento molecular se realizaron 100 experimentos independientes por triplicado con la finalidad de validar el protocolo de acoplamiento molecular. En dicha validación del acoplamiento molecular se considera como criterio de aceptación un valor de la desviación estándar cuadrática media (RMSD) menor a 2 Å, lo que indica que los resultados son confiables y que la simulación es reproducible (**Tabla 23**).

Tabla 23. Validación del acoplamiento molecular dirigido sobre σ_2R.

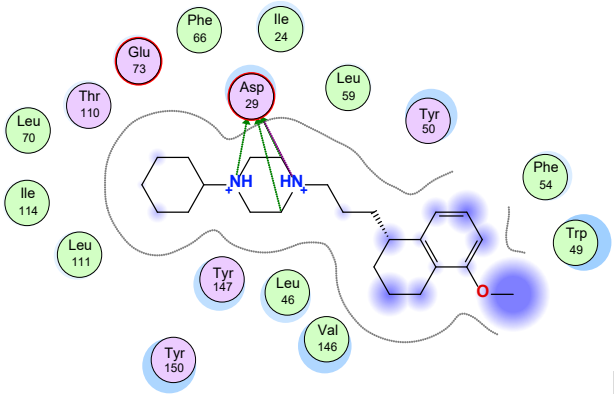


Acoplamiento molecular		
COMPUESTO	**SCORING (Kcal/mol)**	**RMSD**
PB28	-7.837±0.280	1.672±0.577

En la **Tabla 23** se puede observar los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular de validación. El compuesto cocristalizado (**PB28**) mostró una energía de afinidad de -7.837 Kcal/mol y un valor de RMSD de 1.672 Å, el cual es menor a 2 Å, por lo que se considera que el protocolo de acoplamiento molecular es el adecuado, y por ende un método validado. Para visualizar los datos de manera gráfica, se muestra que el compuesto **4-IBP** que se reacopló (color azul) adoptó una conformación espacial casi idéntica al compuesto cocristalizado (color rojo).

Respecto a las interacciones, en la **Figura 59** se puede observar la interacción electrostática clásica que se presentan entre la amina terciaria del compuesto **PB28** y el residuo de aminoácido Asp-29. Adicionalmente seb presentaron interacciones hidrofóbicas entre el ligando cocristalizado y el receptor σ_2. En dicho acoplamiento se observó una energía de unión de -7.83 Kcal/mol.

A)



B)

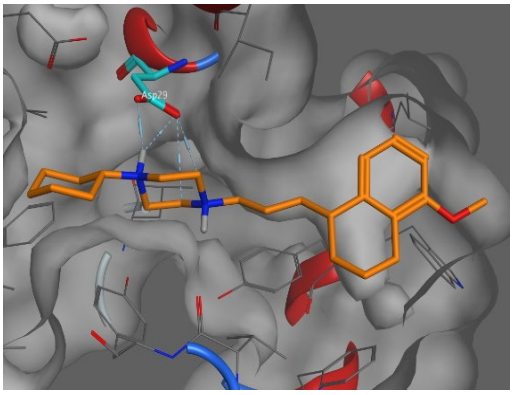


Figura 59. Interacciones entre el compuesto **PB28** con el σ_2R. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D

En el acoplamiento del compuesto **WAD-2** con el σ_2R se obtuvo una energía de afinidad de -6.448 Kcal/mol. En la **Figura 60** se puede observar que se presenta la misma interacción electrostática entre la amina terciaria del compuesto **WAD-2** y el residuo de aminoácido Asp-29, así mismo se observan interacciones hidrofóbicas entre **WAD-2** y el sitio de unión del σ_2R.

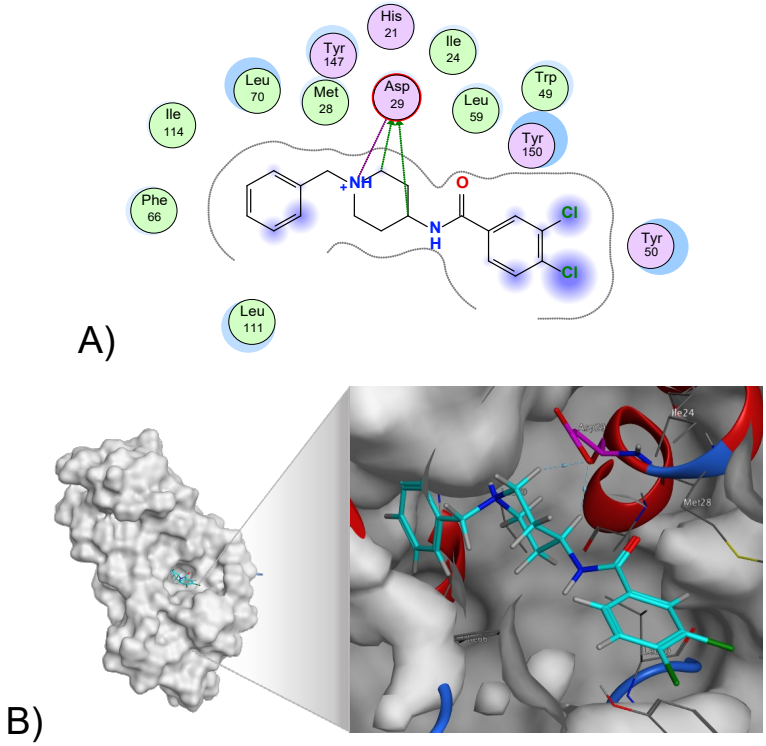
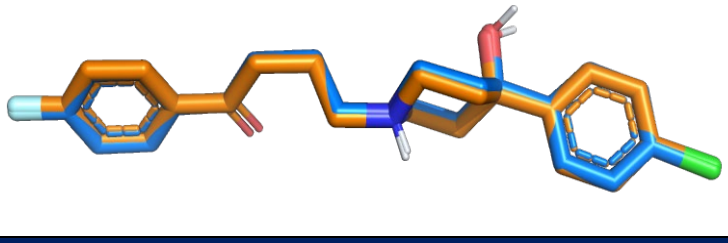


Figura 60. Interacciones entre el compuesto **WAD-5** con el σ_2R. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D.

3.1.2.3. Acoplamiento molecular dirigido de los compuestos sobre el receptor D_2 de dopamina

Se sabe que el fármaco haloperidol posee una afinidad a σ_1R en valores nanomolares, sin embargo, no es usado en el tratamiento del dolor neuropático ya que también es un potente antagonista del receptor D_2 de dopamina lo que genera numerosos efectos adversos característicos de los antagonistas dopaminérgicos como distonía, discinesia y parkinsonismo, entre otros.[90] Por lo tanto, en este proyecto consideramos interesante estudiar de manera *in silico* el posible modo de unión del compuesto **WAD-2** con el receptor D_2 de dopamina. Para ello se realizó el acoplamiento molecular refinado de los compuestos con el receptor D_2 de dopamina usando el programa MOE y el archivo **6-LUQ**[91] (estructura cristalizada del receptor D_2 de dopamina con el fármaco haloperidol) que fue obtenido de la base de datos Protein Data Bank. En el ensayo de acoplamiento molecular se corrieron 100 salidas con cada compuesto por triplicado para validar el método.

Tabla 24. Validación del acoplamiento molecular dirigido sobre el receptor D_2 de dopamina.



Acoplamiento molecular		
COMPUESTO	**SCORING (Kcal/mol)**	**RMSD**
Haloperidol	-8.358±0.079	1.738±0.693

En el acoplamiento molecular se obtuvo una energía de unión de -8.358±0.079, y una conformación similar al ligando cocristalizado con un valor de RMSD de 1.738±0.693, por lo tanto, se consideró validado el método de acoplamiento. Como se puede observar, la estructura del fármaco haloperidol que se reacopló (color azul) adoptó una conformación similar al compuesto cocristalizado (color naranja).

Al igual que σ_1R, el receptor D_2, contiene un aminoácido de carácter ácido al cual se unen los compuestos que contienen una amina básica en su estructura. En la **Figura 61** se muestra que el fármaco haloperidol se une al receptor D2 mediante una interacción electrostática entre la región ácida de Asp-114 y la amina básica del haloperidol, una interacción de tipo π-catión con Phe-410. Un puente de hidrógeno entre el grupo alcohólico del compuesto y el residuo Cys-118, y algunas interacciones de tipo π-sp^3 e hidrofóbicas entre las regiones hidrofóbicas del ligando y del receptor. [91]

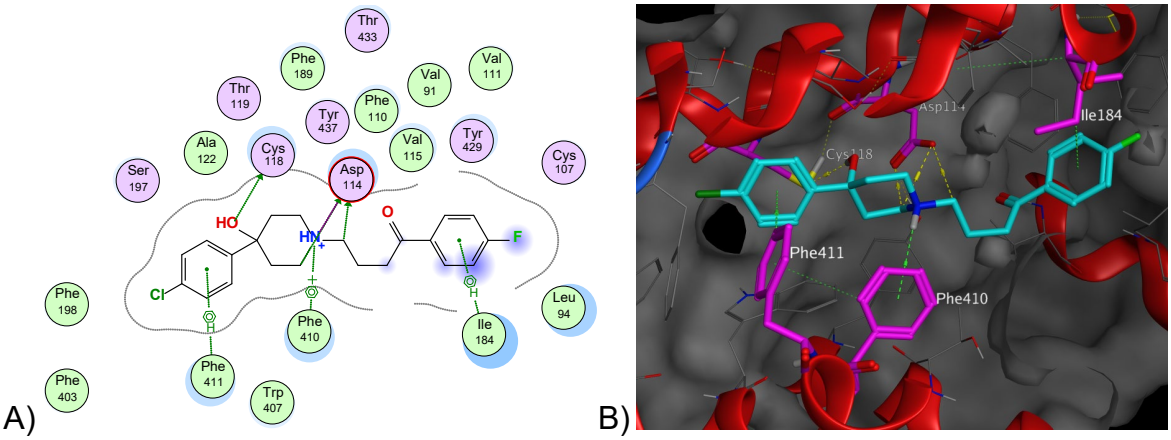


Figura 61. Interacciones del fármaco **haloperidol** con el receptor D_2 de dopamina. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D

Una vez validado el método, se procedió a realizar acoplamiento molecular del compuesto **WAD-5** con el receptor D_2 de dopamina donde se obtuvo una energía de unión de -7.557 Kcal/mol.

Como se puede observar en la **Figura 62**, se pierden la interacción electrostática clave con Asp-114 que se observaba entre la región básica de haloperidol y el receptor D_2. En este caso se cambia por una interacción de tipo puente de hidrógeno reforzado entre el nitrógeno de la amida de **WAD-5** y Asp-114. Otra interacción que se observa es de tipo π-sp^3 entre el anillo aromático adyacente a la piperidina y Trp-407 y algunas hidrofóbicas. De acuerdo con lo observado en los acoplamientos realizados anteriormente se puede decir que haloperidol tiene una energía de unión mayor que el compuesto **WAD-5** diseñado este proyecto.

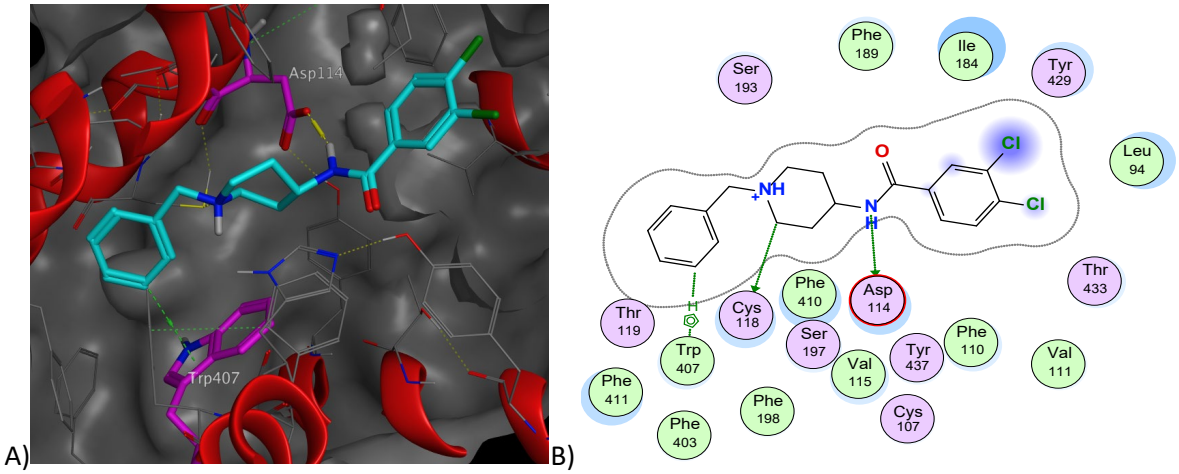


Figura 62. Interacciones del compuesto **WAD-5** con el receptor D_2 de dopamina. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D.

En la **Figura 63** se muestra como el anillo de piperidina de haloperidol (color cian) se encuentra ligeramente expuesto de manera que puede interaccionar con Asp-114, mientras que el anillo piperidina de **WAD-5** (color naranja) se encuentra internalizado. Esto podría deberse a que la molécula no puede internalizarse del lado de la amida y así favorecer la interacción electrostática debido al impedimento estérico que se está generando por el volumen de los átomos de cloro.

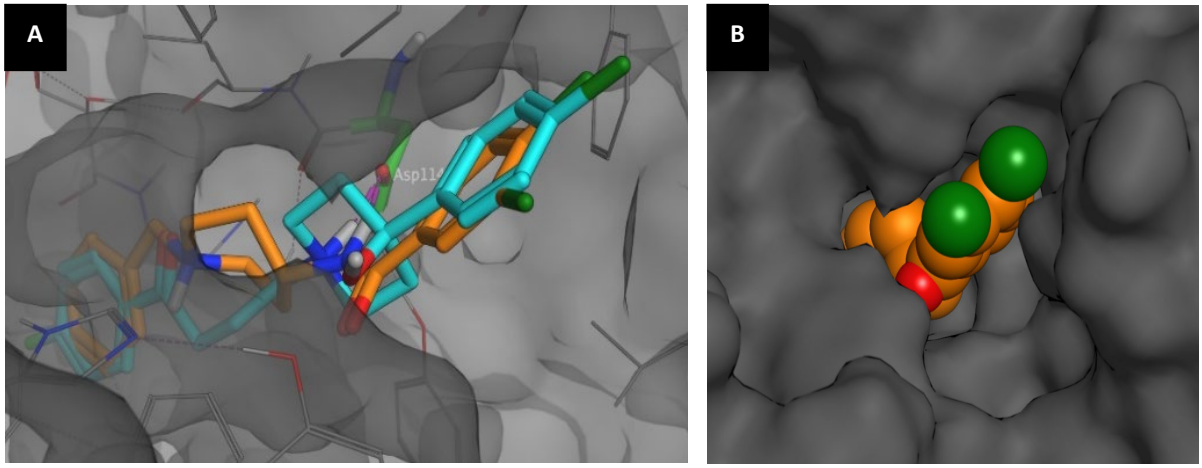


Figura 63. A) Haloperidol y **WAD-5** con el receptor D2; B) **WAD-5** con el receptor D_2.

En diagrama PLIF (**Figura 64**) se puede ver cómo se pierden interacciones entre el compuesto **WAD-5** con varios residuos del receptor D_2 de dopamina. Si bien se conservan algunas interacciones con Asp-114, estas ya no son de tipo electrostáticas. En adición se pierden interacciones hidrofóbicas con Trp-407 y Phe-411.

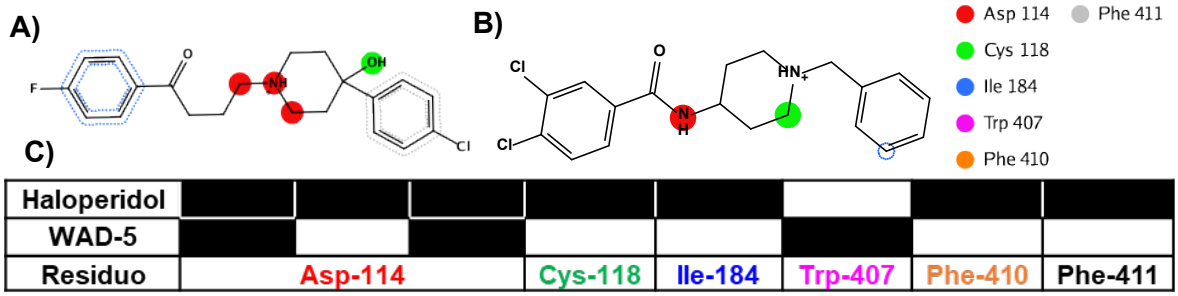


Figura 64. PLIF Haloperidol vs **WAD-5**. A) Interacciones 2D entre haloperidol y el receptor D_2 de dopamina; B) Interacciones 2D entre **WAD-5** y el receptor D_2 de dopamina; C) Diagrama PLIF de haloperidol y **WAD**-5 con el receptor D_2 de dopamina.

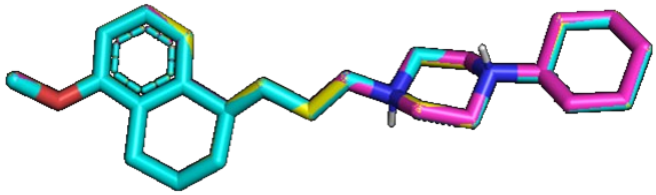
Dado que el compuesto **WAD-5** es menos afín que haloperidol, y no se observaron interacciones electrostáticas entre WAD-5 y el receptor D_2 de dopamina debido al impedimento estérico, se esperaría que el compuesto **WAD-5** no posea tantos efectos adversos extrapiramidales a nivel del SNC asociados al receptor D_2 de Dopamina.

3.1.2.4. Acoplamiento molecular dirigido de los compuestos sobre el canal hERG

Debido a que los compuestos presentaron altas probabilidades de ser bloqueadores de canales hERG a concentraciones de 10 μM se realizó un acoplamiento de los compuestos con el canal hERG para conocer el posible modo de unión del compuesto **WAD-2** con dicho canal. Para dicho acoplamiento en el programa MOE se ocupó la estructura cristalizada del canal hERG con código PDB 7CN1 obtenido de la base de datos Protein Data Bank.[92]

Debido a que la estructura cristalizada no contenía un ligando cocristalizado se realizó el acoplamiento dirigido en MOE seleccionando los residuos de Tyr-652 o Phe-656 de las 4 cadenas del canal hERG como sitio de unión de acuerdo con lo reportado en la literatura.[85] La validación se determinó a partir de los acoplamientos realizados por triplicado con Astemizol (un antihistamínico que ya tiene actividad reportada como bloqueador de estos canales). Se calculó el RMSD de las 3 poses representativas. En el caso del acoplamiento del compuesto Astemizol con el canal hERG, se observó una energía de unión de -7.73 kcal/mol, y un valor de RMSD de 0.314 Kcal/mol (**Tabla 25**). Como se puede, la estructura de Astemizol que se acopló por triplicado adoptó una conformación similar en los 3 ensayos (colores amarillo, cian y rosa).

Tabla 25. Validación del acoplamiento molecular con el canal hERG.



Acoplamiento molecular		
COMPUESTO	**SCORING (Kcal/mol)**	**RMSD**
Astemizol	-7.73±0.14	0.314±0.54

En la **Figura 65** se puede observar la interacción π-catión clásica de los bloqueadores de los canales hERG[85] que se presentan entre la amina terciaria del compuesto **Astemizol** y el residuo de aminoácido Tyr-652 del canal hERG. Así mismo se observaron interacciones hidrofóbicas y una interacción π-sp^3 entre el anillo de bencimidazol de Astemizol y el residuo Ala-653. En dicho acoplamiento se observó una energía de unión de -7.73±0.14 Kcal/mol.

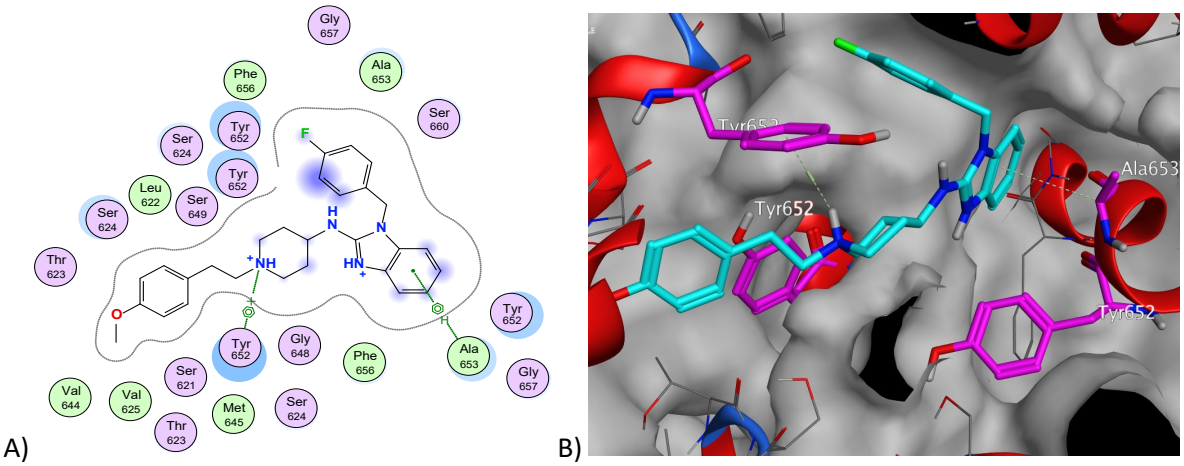


Figura 65. Interacciones del compuesto **Astemizol** con el canal hERG. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D.

Por otro lado, en el acoplamiento del compuesto **WAD-2** con el canal hERG (**Figura 66**), a pesar de la presencia de la amina terciaria no se observaron interacciones de tipo π-catión con los residuos de Tyr-652. Las interacciones que se presentaron fueron tipo π-sp^3 con Ala-653 y una interacción tipo σ-hole con Ser-614.

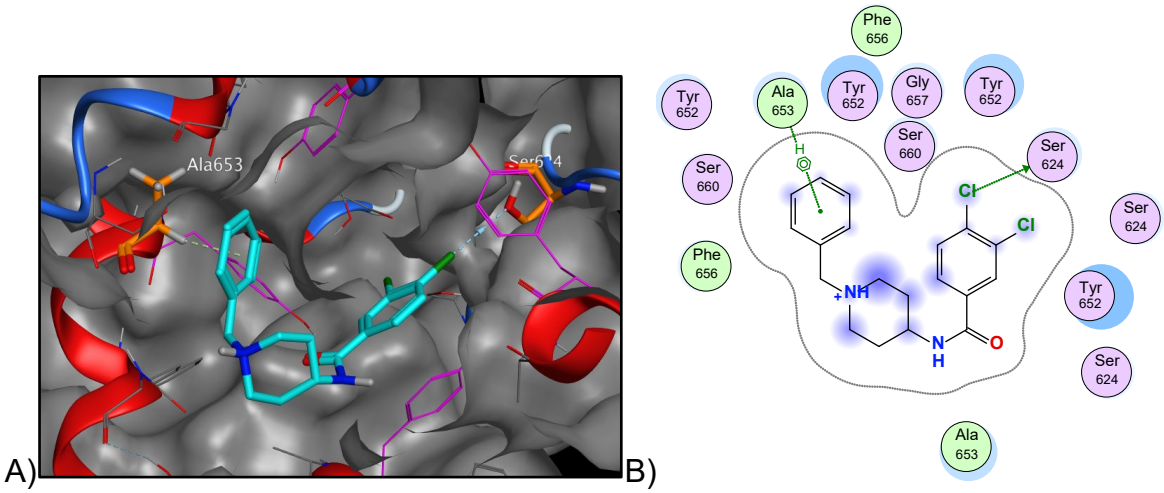


Figura 66. Interacciones del compuesto **WAD-2** con el canal hERG. A) Visualización 2D; B) Visualización 3D.

En el diagrama PLIF (**Figura 67**) se puede comparar visualmente las interacciones entre Astemizol con el canal hERG, y **WAD-2** con el canal hERG. En el caso de Astemizol se observa la interacción entre la amina básica y Tyr-652 de tipo electrostática, y en el caso de **WAD-2** se observa la interacción con Tyr-652 pero de tipo σ-hole.

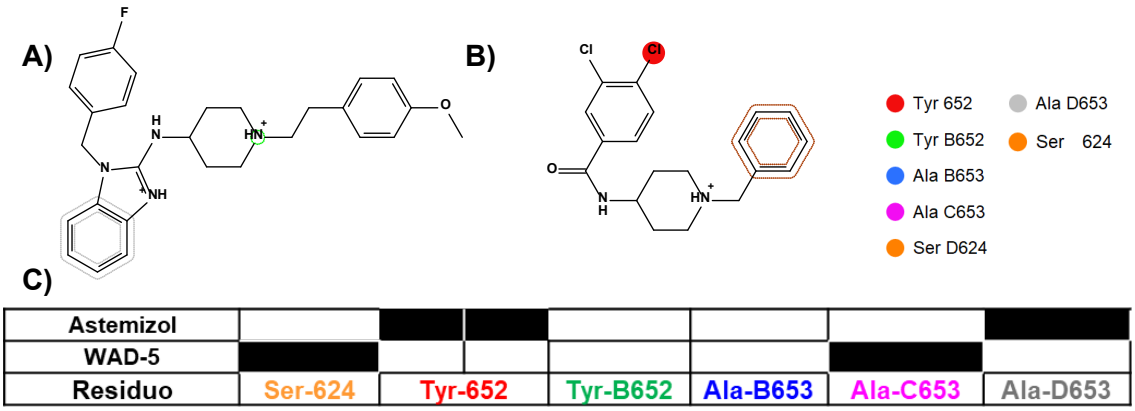


Figura 67. PLIF astemizol vs **WAD-2**. A) Interacciones 2D entre astemizol y el canal hERG; B) Interacciones 2D entre **WAD-2** y el canal hERG; C) Diagrama PLIF de astemizol y **WAD-2** con el canal hERG.

En los resultados de acoplamiento molecular pudimos observar que el compuesto **WAD-2** presentó menor energía de unión en comparación con el astemizol (bloqueador de canales hERG), así mismo se pudo ver que los compuestos **WAD-2** y astemizol tienen distintas formas de unión con el canal hERG y no se observaron las interacciones clásicas con los residuos de Tirosina que suelen presentar los bloqueadores de estos canales. Aunado a esto, cabe resaltar que la afinidad de **WAD-2** con σ_1R en los ensayos *in vitro* fue en el bajo orden nanomoral (4.2 nM) y las predicciones de los estudios *in silico* están dado en el orden micromolar, por lo tanto, se espera que los compuestos diseñados no presenten riesgos de cardiotoxicidad asociados a la unión con los canales hERG.

3.1.3. *Lead* optimization

En química farmacéutica, los compuestos con potencial actividad terapéutica son obtenidos a partir de productos naturales (plantas, animales), o bien por síntesis química. En la búsqueda de nuevas entidades químicas con actividad terapéutica que se obtienen por síntesis química se inicia con el diseño de los compuestos. Para ello, es importante mencionar que el diseño debe realizarse de manera racional, ya que pequeños cambios en el farmacóforo pueden ocasionar que se modifique o se pierda drásticamente la actividad deseada. Una de las estrategias para el desarrollo de fármacos suele considerar estructuras previamente reportadas con la actividad de interés y realizar modificaciones estructurales para mejorar sus propiedades farmacocinéticas y /o farmacodinámicas, de esta manera, a partir de millones de moléculas candidatas se suelen ir seleccionando las mejores para continuar con pruebas preclínicas y posteriormente pruebas clínicas. Se sabe que a partir de millones de moléculas solo pocas llegan al mercado.

En este proyecto, se llevaron a cabo modificaciones para obtener compuestos análogos del compuesto **LMH-2**, aunado a esto, para el caso particular del compuesto **WAD-2** se consideró al compuesto **AAO-1**. Basados en estas estructuras se realizó una hibridación de la parte acilpiperidina del compuesto **LMH-2** y la parte aromática sustituida con 2 átomos de cloro en las posiciones 3 y 4 del anillo de benceno para obtener al compuesto **WAD-2**. Con estas modificaciones se obtuvo una optimización de los compuestos *Líderes (Lead* optimization) con lo que se logró mejorar la afinidad experimental con σ_1R. El compuesto **WAD-2** mostró ser hasta 10 veces más afín a σ_1R respecto al compuesto **AAO-1**, y 1.2 veces más afín respecto al compuesto **LMH-2** (**Figura 68**).

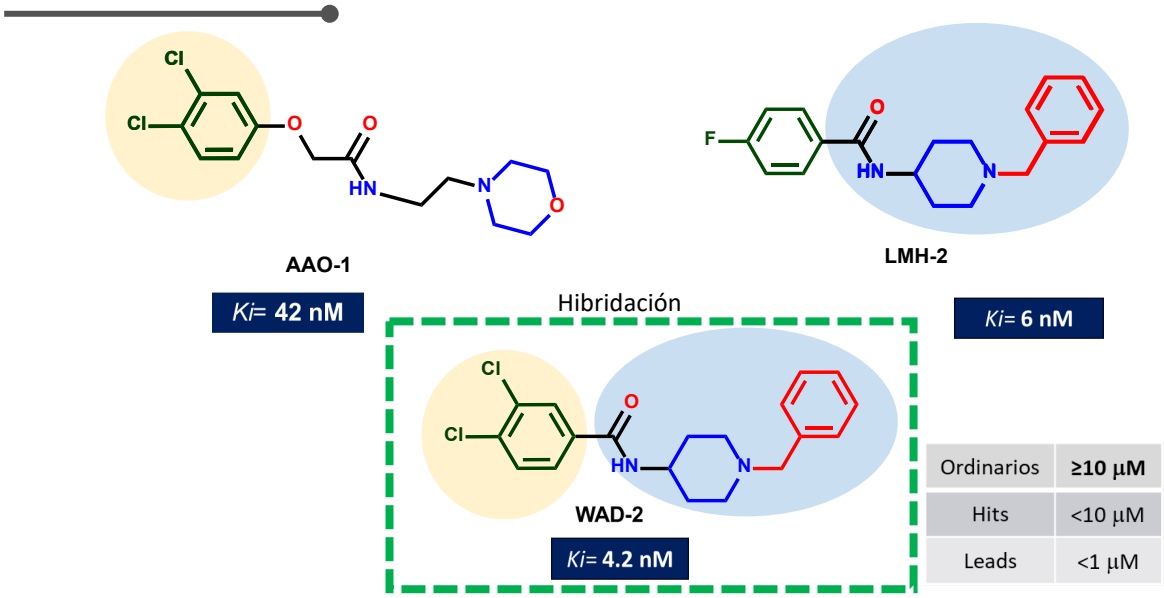


Figura 68. Hibridación de los compuestos **LMH-2** y **AAO-1** para la obtención del compuesto **WAD-2**.

Así mismo, comparado con el compuesto **S1RA** (*Ki= **17 nM)***, el compuesto **WAD-2** (*Ki= **4.2 nM)*** mostró ser 4 veces más afín al receptor σ_1. (**Figura 69**). Dado que el compuesto **WAD-2** mostró afinidad se decidió realizar las evaluaciones *in vivo*, de esta manera se reduce el uso de animales. En el ensayo in *vivo* donde se usó el modelo de ratas Wistar con ligaduras de nervios espinales (LNE), el compuesto **WAD-2** mostró efecto antialodínico.

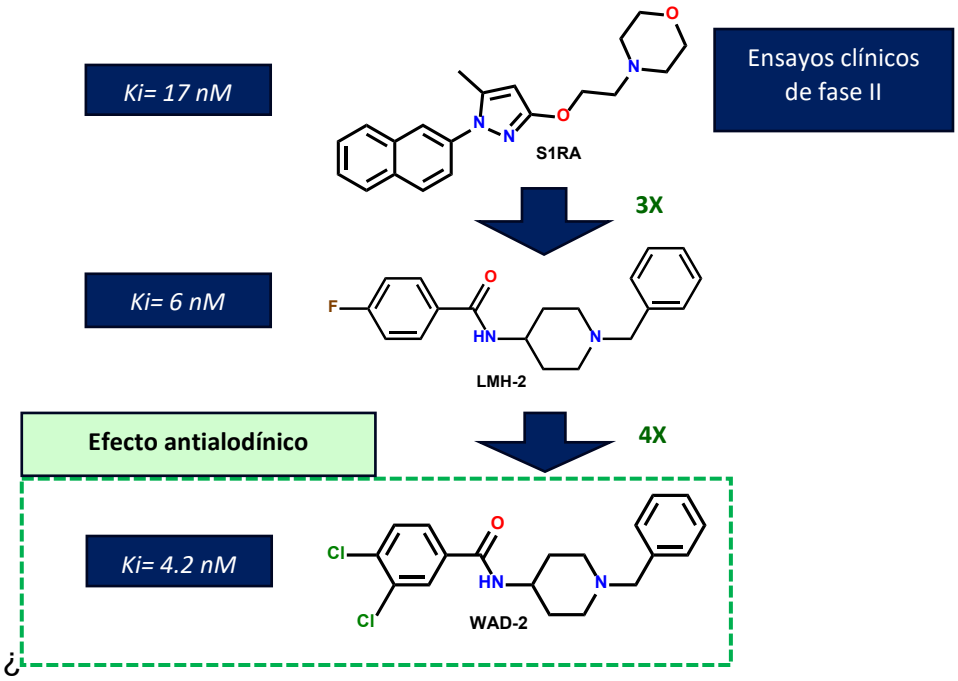


***Figura 69**. Lead optimization*

En resumen, basándonos en el análisis de consenso farmacológico, los compuestos presentaron buenas propiedades farmacológicas, sin embargo, debido a problemas de solubilidad solo se realizó la evaluación *in vitro* del compuesto **WAD-2**, el cual obtuvo valores de afinidad con σ_1R en el bajo orden nanomolar (*Ki*= 4.2 nM), catalogándose como Líderes experimentales. Finalmente, en la evaluación *in vivo,* el compuesto **WAD-2** fue capaz de reducir la alodinia en modelos de rata con dolor neuropático validando experimentalmente los resultados previamente descritos en la parte *in silico*.

4. CONCLUSIONES

- Los compuestos **WAD 1-9** presentaron propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas apropiadas en la evaluación *in silico*.
- Se seleccionaron a los compuestos **WAD 1-2**, **WAD 4-5** y **WAD 8-9** como *hits* computacionales seguros para priorizar su síntesis y su bioevaluación.
- Por su facilidad y disponibilidad, se sinterizaron todos los compuestos con rendimientos finales de discretos a intermedios.
- Se caracterizaron los compuestos mediante técnicas espectroscópicas (RMN de ^{1}H y ^{13}C) y espectrométricas (Masas-IE).
- Se seleccionó al compuesto **WAD-2** para realizar los estudios de afinidad *in vitro* debido a su solubilidad acuosa.
- El compuesto **WAD-2** mostró afinidad con el σ_1R en el bajo orden nanomolar, (Ki = 4.2 Nm), catalogándose como *líder* experimental.
- El compuesto **WAD-2,** antagonista de los receptores σ_1 mostró un efecto antialodínico en un modelo de ratas con LNE.

5. PERSPECTIVAS

- Evaluar *in vitro* la afinidad de los compuestos **WAD 3, WAD 5-6**, y **WAD 8-9** con los receptores σ_1 y σ_2.
- Evaluar la seguridad del compuesto **WAD-2** para considerarlo *lead* experimental seguro.
- Evaluar *in vivo* los efectos extrapiramidales del compuesto **WAD-2** asociados al antagonismo del receptor D_2 de dopamina.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Reactivos

Para la síntesis de la serie de compuestos **WAD 1-14** se utilizaron las materias primas adquiridas en la empresa SIGMA-ALDRICH® (**Tabla 26**):

Tabla 26. Costo de materias primas utilizadas.

Reactivo	Costo ($)
4-amino-1-bencilpiperidina (**10**)	3,665 MXN, 25 g
Cloruro de 4-clorobenzoilo (**11**)	1.571 MXN, 100 g
Cloruro de 3,4-diclorobenzoilo (**12**)	4,384 MXN, 100 g
Cloruro de 4-carbonitrilbenzoilo (**13**)	3,023 MXN, 25 g
Isocianato de 4-trifuorometilfenilo (**14**)	2,474 MXN, 5 g
Isocianato de 4-clorofenilo (**15**)	2,397 MXN, 100 g
Isocianato de 4-fluorofenilo (**16**)	1,200 MXN, 5 g
Isocianato de 4-cloro-3-trifluorometilfenilo (**17**)	2,650 MXN, 5 g
Isocianato de fenilo (**18**)	1,106 MXN, 100 g
Isocianato de ciclohexilo (**19**)	1, 046 MXN, 100 g

6.2. Instrumentación requerida para la síntesis de los compuestos

6.2.1. Síntesis convencional

Para la síntesis de los compuestos se utilizó una parrilla de calentamiento con agitación magnética marca Science Med. Se utilizaron matraces bola de 10 y 25 mL equipados con agitación magnética y embudo de adición de presiones igualadas. Para la síntesis de los compuestos de las series A y C, los matraces fueron equipados con una trampa de gases que conducía a una solución saturada de bicarbonato de sodio.

6.2.2. Síntesis asistida con microondas

Para la síntesis de compuesto **WAD-7** se llevó a cabo usando el reactor de microondas Discover® de la marca CEM. Para ello se ocuparon las condiciones designadas para el disolvente acetonitrilo: 150 Watts de potencia y una temperatura de 75°C. El matraz fue equipado con columna Vigreux y condensador.

Para evaporar los disolventes se ocupó un rotaevaporador de la marca Büchi acoplado con una bomba de vacío de la marca Felisa. Para la determinación del punto de fusión se empleó el aparto Stanford Research System, modelo EZ-Melt.

Los espectros de Resonancia magnética nuclear y de masas se obtuvieron en colaboración el Dr. Emanuel Hernández Núñez del Departamento de Posgrado e investigación, Instituto Tecnológico Superior de Calkiní.

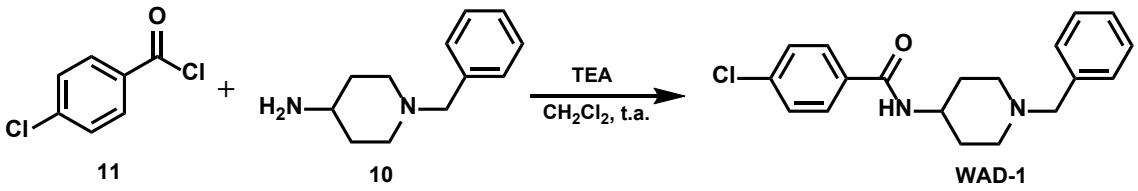
6.2.3. Cromatografía

El monitoreo de las reacciones se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas de aluminio de 2 x 4 cm cubiertas con una capa delgada de gel de sílice Alugam que fueron eluídas en una cámara de vidrio con las fases móviles presentados en la **Tabla 27**. Para observar las placas se usó una lámpara de UV marca ENTELA modelo UVGL-25. Para revelar los compuestos con grupos amino se utilizó yodo que forma complejos coloridos con tono amarillo-marrón.

Tabla 27. Fases móviles utilizadas para la elución de las placas CCF.

Sistema	Composición	Proporción
I	CH_2Cl_2:MeOH	95:05
II	CH_2Cl_2:MeOH	90:10
III	CH_2Cl_2:MeOH	93:07

6.3. Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-clorobenzamida (WAD-1)



En un matraz bola de 25 mL equipado con parrilla de agitación, embudo de adición de presiones igualadas y trampa de gases, se colocaron 0.214 mL (0.00105 mol) de 4-aminobencilpiperidina y 2 mL de diclorometano (CH_2Cl_2). Posteriormente con ayuda del embudo de adición, se añadieron 0.176 mL (1.1 equivalentes) de trietilamina (TEA) gota a gota con intervalos de 5 minutos y se dejó en agitación durante 20 minutos. Una vez pasado el tiempo se colocó un baño de hielo y se adicionaron 2 mL de CH_2Cl_2 y 0.162 mL (1.1 equivalentes) de Cloruro de 4-clorobenzoilo gota a gota con intervalos de 5 minutos. Una vez adicionado, se retiró el baño de hielo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada con CCF a los 30 minutos y posteriormente cada hora usando el **sistema I,** la duración de la reacción fue de 3 h. Posteriormente se rotaevaporó el disolvente, y una vez eliminado se procedió a añadir 5 mL de agua fría al matraz, se llevó la solución a un pH de 9 se dejó en agitación durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a filtrar con vacío el precipitado. Se obtuvo un sólido blanco con un peso de 0.4320 g y un rendimiento crudo de 88.9%. El compuesto fue purificado mediante una recristalización con EtOH con un rendimiento final de 49.1%. Se obtuvieron cristales con punto de fusión 195.8-197.9 °C.

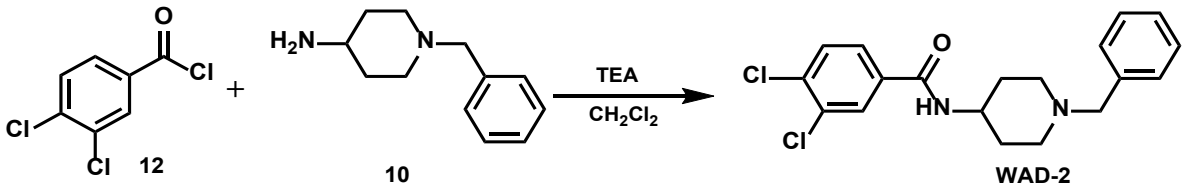
***N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-clorobenzamida**

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d6) δ: 32.0 (C-9, C-11), 47.6 (C-10), 52.8 (C-8, C-12), 62.7 (C-7), 127.4 (C-4´), 128.7 (C-3´, C-5´), 128.8 (C-2´, C-6´), 129.3 (C-3, C-5), 129.8 (C-2, C-6), 134.0 (C-1´), 136.4 (C-1), 139.2 (C-4), 165.1 (C=O) ppm.

RMN ^{1}H (600 MHz, DMSO-d6) δ: 1.57 (*cd*, 2H, H-9, H-11, J = 12.05 y J = 3.86 Hz), 1.76 (*d*, 2H, H-9, H-11, J = 12.36 Hz), 2.01 (*t*, 2H, H-8, H-12, J = 11.72 y J =2.45 Hz), 2.81 (*d*, 2H, H-8, H-12, J = 12.04 Hz), 3.46 (*s*, 2H, 7-CH_2), 3.72-3.78 (*m*, 1H, H-10), 7.25 (*t*, 1H, H-4´, J_o = 6.84 Hz), 7.29-7.33 (*m,* 4H, H-2', H-3´, H-5´, H-6´), 7.52 (*d,* 2H, H-2, H-6, J_O = 7.52 Hz), 7.85 (*d*, 2H, H-3, H-5, J_O = 8.49 Hz), 8.33 (*d*, 1H, NH, J = 7.66) ppm.

EM (IE): m/z (% int. rel.) 328 (M^+ 1%) 173 (24%), 145 (18%), 132 (17%), 91(70%), 82 (100%)

6.4. Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-3, 4-diclorobenzamida (WAD-2)



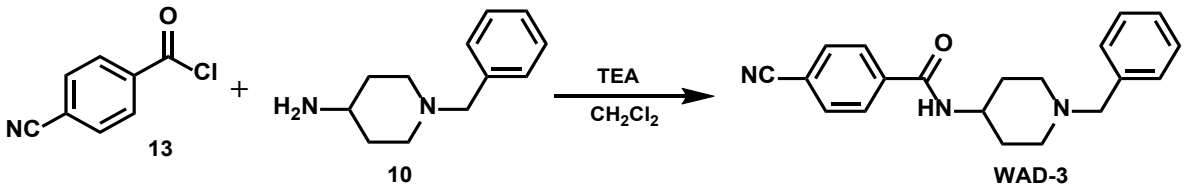
En un matraz bola de 25 mL equipado con parrilla de agitación, embudo de adición de presiones igualadas y trampa de gases, se colocaron 2 mL de CH2Cl2 y 0.268 mL (0.001313 mol) de 4-aminobencilpiperidina. Posteriormente con ayuda del embudo de adición, se añadieron 0.201 mL (1.1 equivalentes) de TEA con 2 mL de CH2Cl2 gota a gota con intervalos de 5 minutos y se dejó en agitación durante 20 minutos. Una vez pasado el tiempo se colocó un baño de hielo y se adicionaron 2 mL de CH_2Cl_2 con 0.202 mL (1.1 equivalentes) de Cloruro de 3,4-diclorobenzoilo gota a gota con intervalos de 5 minutos. Una vez adicionado, se retiró el baño de hielo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada con CCF a los 30 minutos y posteriormente cada hora usando el **sistema I,** la duración de la reacción fue de 6 h. Posteriormente se rotaevaporó el disolvente, y una vez eliminado se procedió a añadir 5 mL de agua fría al matraz, se llevó la solución a un pH de 9 se dejó en agitación durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a filtrar con vacío el precipitado. Se obtuvo un sólido blanco con un peso de 0.4045 g y un rendimiento crudo de 84.7%. El compuesto fue purificado mediante una recristalización con EtOH con un rendimiento final de 47.5%. Se obtuvieron cristales con punto de fusión 179.2-182.0 °C.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d6) δ: 31.9 (C-9, C-11), 47.8 (C-10), 52.7 (C-8, C-12), 62.6 (C-7), 127.4 (C-4´), 128.2 (C-2), 128.7 (C-3´, C-5´), 129.3 (C-2´, C-6´), 129.7 (C-3), 129.1 (C-2´, C-6´), 131.1 (C-6),131.7 (C-4), 134.4 (C-5), 135.1 (C-1), 139.2 (C-1´) 163.8 (C=O) ppm.

RMN ^{1}H (600 MHz, DMSO-d6) δ: 1.52 (*cd*, 2H, H-9, H-11, *J* = 12.05 y *J* = 3.86 Hz), 1.73 (*d*, 2H, H-9, H-11, *J* = 11.69 Hz), 1.97 (*t*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.72 y *J* = 2.45 Hz), 2.77 (*d*, 2H, H-8, H-12, *J* = 12.03 Hz), 3.42 (*s*, 2H, 7-CH_2), 3.67-3.74 (*m*, 1H, H-10), 7.19 – 7.21 (*m*, 1H, C-4´), 7.25-7.29 (*m,* 4H, H-2', H-3´, H-5´, H-6´), 7.70 (*d,* 1H, H-3, J_O = 8.52 Hz), 7.78 (*dd*, 1H, H-2, J_O = 8.34 y J_m = 2.01 Hz), 8.04 (*d,* 1H, H-6, J_m = 2.04 Hz) 8.40 (*d,* 1H, NH, J_O = 7.59 Hz) ppm.

EM (IE): m/z (% int. rel.) 363 (M^+, 1%), 172 (25%), 91 (100%), 55 (18%)

6.5. Síntesis de *N*-(1-bencilpiperidin-4-il)-4-cianobenzamida (WAD-3)



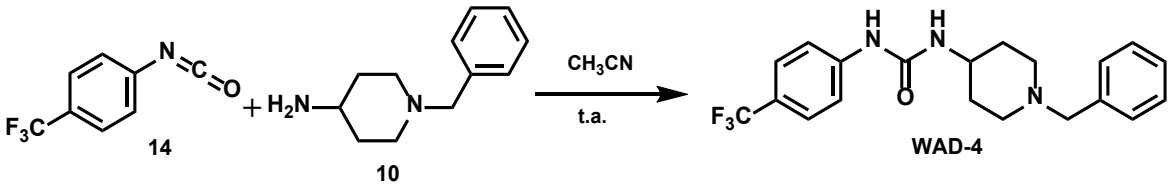
En un matraz bola de 25 mL equipado con parrilla de agitación, embudo de adición de presiones igualadas y trampa de gases, se colocaron 2 mL de CH_2Cl_2 y 0.214 mL (0.001051 mol) de 4-aminobencilpiperidina. Posteriormente con ayuda del embudo de adición, se añadieron 0.161 mL (1.1 equivalentes) de TEA con 2 mL de CH_2Cl_2 gota a gota con intervalos de 5 minutos y se dejó en agitación durante 20 minutos. Una vez pasado el tiempo se colocó un baño de hielo y se adicionaron 2 mL de CH_2Cl_2 con 0.1914 g (1.1 equivalentes) de Cloruro de 4-cianobenzoilo gota a gota con intervalos de 5 minutos. Una vez adicionado, se retiró el baño de hielo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada con CCF a los 30 minutos y posteriormente cada hora usando el **sistema I,** la duración de la reacción fue de 48 h. Posteriormente se rotaevaporó el disolvente, y una vez eliminado se procedió a añadir 5 mL de agua fría al matraz, se llevó la solución a un pH de 9 se dejó en agitación durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a filtrar con vacío el precipitado. Se obtuvo un sólido amarillo con un peso de 0.1761 g y un rendimiento crudo de 52.4%. El compuesto fue purificado mediante una recristalización con EtOH con un rendimiento final de 36.8%. Se obtuvieron cristales con punto de fusión 168.3-169.9 °C.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d6) δ: 31.8 (C-9, C-11), 47.7 (C-10), 52.6 (C-8, C-12), 62.6 (C-7), 113.9 (C-4), 118.9 (CN), 127.3 (C-4´), 128.6 (C-2, C-3, C-5, C-6), 129.2 (C-3', C-5´), 132.8 (C-2´, C-6´), 139.1 (C-1), 139.2 (C-1´), 164.7 (C=O) ppm.

RMN ^{1}H (600 MHz, DMSO-d6) δ: 1.58 (*cd*, 2H, H-9, H-11, *J* = 12.05 y *J* = 3.86 Hz), 1.79 (*dd* 2H, H-9, H-11, *J* = 12.86 *J* = 3.54 Hz), 2.02 (*t*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.60 y *J* =2.45 Hz), 2.82 (*d*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.56 Hz), 3.47 (*s*, 2H, 7-CH_2), 3.74-3.82 (*m*, 1H, H-10), 7.24-7.27 (*m*, 1H, H-4´), 7.30-7.35 (*m,* 4H, H-2', H-3´, H-5´, H-6´), 7.95 (*d,* 2H, H-3, H-5, J_O = 8.67 Hz), 7.99 (*d*, 2H, H-2, H-6, J_O = 8.23 Hz), 8.51 (*d*, 1H, NH, *J* = 7.61) ppm.

EM (IE): m/z (% int. rel.) 319 ($1M^+$ 1%) 219 (83%), 187 (39%),174 (100), 59 (67%)

6.6. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-(trifluorometil)fenil]urea (WAD-4)



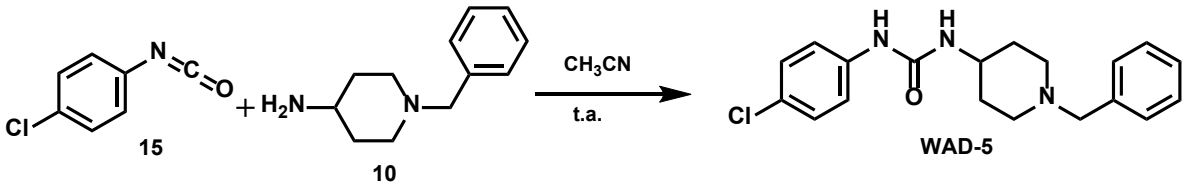
En un matraz bola de 25 mL equipado con parrilla de agitación, embudo de adición de presiones igualadas y trampa de gases, se colocaron 2 mL de CH_3CN y 0.268 mL (0.001313 mol) de 4-aminobencilpiperidina y se dejó en agitación durante 10 minutos. Una vez pasado el tiempo se adicionaron 2 mL de CH_3CN con 0.225 mL (1.1 equivalentes) de isocianato de 4-fluorofenilo gota a gota con intervalos de 5 minutos. Una vez adicionado, se dejó reaccionar a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada con CCF a los 30 minutos y posteriormente cada hora usando el **sistema I,** la duración de la reacción fue de 6 h. Posteriormente se rotaevaporó el disolvente, y una vez eliminado se procedió a añadir 5 mL de agua fría al matraz, se llevó la solución a un pH de 9 se dejó en agitación durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a filtrar con vacío el precipitado. Se obtuvo un sólido amarillo con un peso de 0.4291 g y un rendimiento crudo de 95.0%. El compuesto fue purificado mediante columna cromatográfica con sistema descendente, 100% CH_2Cl_2. Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento final de 40.5% punto de fusión 163.4-165.5 °C.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d6) δ: 32.7 (C-9, C-11), 47.3 (C-10), 52.1 (C-8, C-12), 63.0 (C-7), 118.6 (C-2, C-6), 124.2 (CF_3, *c, J* = 271.94), 124.5 (C-4, *c, J* = 33.20), 126.2 (C-3, C-5, *c*, *J* = 3.60), 127.1 (C-4´), 128.2 (C-3´, C-5´), 129.1 (C-2´, C-6´), 138.1 (C-1´), 142.3 (1), 155.1 (C=O) ppm.

RMN ^{1}H (600 MHz, DMSO-d6) δ: 1.40 (*cd*, 2H, H-9, H-11, *J* = 12.23 y *J* = 3.63 Hz), 1.88 (*d*, 2H, H-9, H-11, *J* = 12.63), 2.02 (*t*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.57), 2.75 (*d*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.45 Hz), 3.42 (*s*, 2H, 7-CH_2), 7.23-7.31 (*m*, 5H, H-2', H-3´, H-4´, H-5´, H-6´), 7.37 (*d,* 2H, H-3, H-5, J_O = 8.28 Hz), 7.45 (*d*, 2H, H-2, H-6, J_O = 8.31 Hz), 8.75 (*s,* 1H, NH) ppm.

EM (IE): m/z (% int. rel.) 377 (M^+ 1%), 157 (20%), 91 (100%), 82 (87%), 65 (12%)

6.7. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[-4-clorofenil]urea (WAD-5)



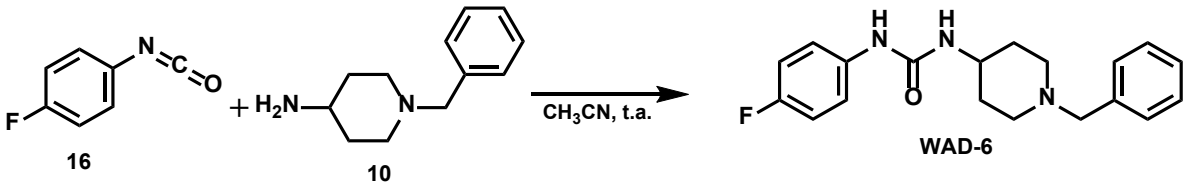
En un matraz bola de 25 mL equipado con parrilla de agitación, embudo de adición de presiones igualadas y trampa de gases, se colocaron 2 mL de CH_3CN y 0.268 mL (0.001313 mol) de 4-aminobencilpiperidina y se dejó en agitación durante 10 minutos. Una vez pasado el tiempo se adicionaron 2 mL de CH_3CN con 0.164 mL (1.2 equivalentes) de isocianato de 4-clorofenilo gota a gota con intervalos de 5 minutos. Una vez adicionado, se dejó reaccionar a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada con CCF a los 30 minutos y posteriormente cada hora usando el **sistema I,** la duración de la reacción fue de 25 h. Posteriormente se rotaevaporó el disolvente, y una vez eliminado se procedió a añadir 5 mL de agua fría al matraz, se llevó la solución a un pH de 9 se dejó en agitación durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a filtrar con vacío el precipitado. Se obtuvo un sólido amarillo con un peso de 0.2386 g y un rendimiento crudo de 58.0%. El compuesto fue purificado mediante una extracción ácido-base triple donde se usó 10 mL de acetato y 3 fracciones de 10 mL de agua con pH de 4. Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento final de 40.5 % punto de fusión 185.8-188.2°C.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d6) δ: 32.7 (C-9, C-11), 47.3 (C-10), 52.2 (C-8, C-12), 63.0 (C-7), 121.2 (C-2, C-6), 125.1 (C-4), 127.1 (C-4´), 128.2 (C-3´, C-5´), 129.1 (C-3, C-5), 129.1 (C-2´, C-6´), 137.5 (C-1), 138.2 (C-1´), 154.9 (C=O) ppm.

RMN ^{1}H (600 MHz, DMSO-d6) δ: 1.41 (*c*, 2H, H-9, H-11, *J* = 11.57), 1.90 (*d*, 2H, H-9, H-11, *J* = 12.34), 2.07 (*t*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.85), 2.77 (*d*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.61 Hz), 3.47 (*s*, 2H, 7-CH_2), 3.62-3.68 (*m*, 1H, H-10), 4.98 (*d,* 1H, NH *J* = 7.99 Hz), 6.92 (*s,* 1H, NH´), 7.19-7.25 (*m*, 5H, H-2', H-3´, H-4´, H-5´, H-6´), 7.26-7.31 (*m*, 4H, H-2, H-3, H-5, H-6) ppm.

EM (IE): m/z (% int. rel.) 343 (M^+ 1%), 173 (27%), 99 (30%), 91 /100%), 70 (24%)

6.8. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[4-fluorofenil]urea (WAD-6)



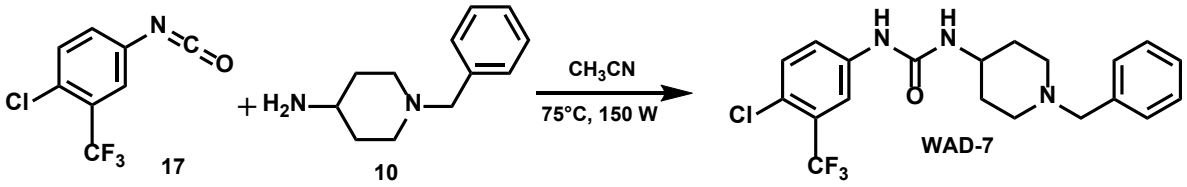
En un matraz bola de 25 mL equipado con parrilla de agitación, embudo de adición de presiones igualadas y trampa de gases, se colocaron 2 mL de CH_3CN y 0.268 mL (0.001313 mol) de 4-aminobencilpiperidina y se dejó en agitación durante 10 minutos. Una vez pasado el tiempo se adicionaron 2 mL de CH_3CN con 0.164 mL (1.1 equivalentes) de isocianato de 4-fluorofenilo gota a gota con intervalos de 5 minutos. Una vez adicionado, se dejó reaccionar a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada con CCF a los 30 minutos y posteriormente cada hora usando el **sistema I,** la duración de la reacción fue de 5 h. Posteriormente se rotaevaporó el disolvente, y una vez eliminado se procedió a añadir 5 mL de agua fría al matraz, se llevó la solución a un pH de 9 se dejó en agitación durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a filtrar con vacío el precipitado. Se obtuvo un sólido amarillo con un peso de 0.3050 g y un rendimiento crudo de 70.7%. El compuesto fue purificado mediante una extracción ácido-base triple donde se usó 10 mL de acetato y 3 fracciones de 10 mL de agua con pH de 4. Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento final de 56.2% y punto de fusión de 163.0-166.1 °C.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d6) δ: 32.7 (C-9, C-11), 47.2 (C-10), 52.2 (C-8, C-12), 63.0 (C-7), 115.7 (C-3, C-5, *d*, *J* = 22.39 Hz), 122.4 (C-3, C-5, *d*, *J* = 7.91 Hz), 127.1 (C-4´), 128.2 (C-3´, C-5´), 129.1 (C-2´, C-6´), 134.7 (C-1, *d*, *J* = 2.71 Hz),138.1 (C-1´), 159.1 (C-4, *d, J* = 243.26), 155.4 (C=O) ppm.

RMN ^{1}H (600 MHz, DMSO-d6) δ: 1.39 (*cd*, 2H, H-9, H-11, *J* = 11.25 y *J* = 5.66 Hz), 1.87 (*dd*, 2H, H-9, H-11, *J* = 13.07 Hz y *J* = 4.05), 2.03 (*t*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.39 Hz), 2.75 (*d*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.41 Hz), 3.44 (*s*, 2H, 7-CH_2), 3.59-3.66 (*m*, 1H, H-10), 4.98 (*d*, 1H, NH, *J* = 7.99), 6.93 (*t,* 2H, H-2 y H-6, J_o = 8.45), 7.18-7.20 (m, 2H, H-3 y H-5), 7.23-7.29 (*m,* 5H, H-2', H-3´, H-4´, H-5´, H-6´), 7.30 (*s*, 1H, NH´) ppm.

EM (IE): m/z (% int. rel.) 327 (M^+ 1%), 173 (25%), 91 (100%), 56 (19%)

6.9. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[(4-cloro-3-trifluorometil)fenil]urea (**WAD-7**)



En un matraz bola equipado con agitador magnético se colocaron 0.250 g de 4-amino-1-bencilpiperidina (0.001313 mol), 5 mL de CH_3CN y 0. (1.1 equivalentes) de isocianato de 4-cloro-3-trifluorometilfenilo. Posteriormente se colocó el matraz en el reactor de microondas y se programó a 150 Watts y 75°C con agitación media y un ciclo de reacción de 50 minutos. La reacción fue monitoreada con CCF con el sistema de elución **II**.

Posteriormente se rotaevaporó el disolvente, y una vez eliminado se procedió a añadir 4 mL de agua fría al matraz, se llevó la solución a un pH de 9 se dejó en agitación durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a filtrar con vacío el precipitado. Se obtuvo un sólido amarillo con un peso de 0.4356 g y un rendimiento crudo de 80.6%. El compuesto fue purificado mediante una extracción ácido-base triple donde se usó 10 mL de acetato y 3 fracciones de 10 mL de agua con pH de 4. Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento final de 22.6% y punto de fusión de 164.4-169.5 °C.

1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[(4-cloro-3-trifluorometil)fenil]urea

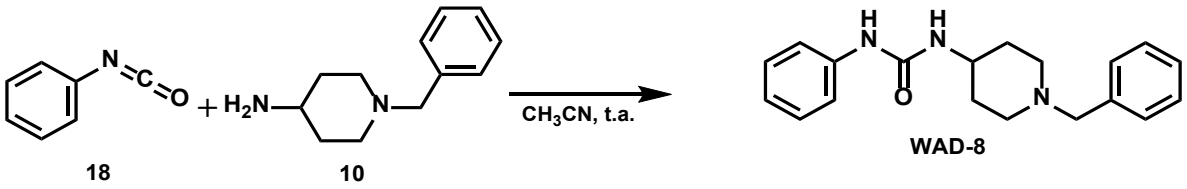
En espera de espectros de RMN

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d6) δ: 32.4 (C-9, C-11), 46.9 (C-10), 52.2 (C-8, C-12), 62.6 (C-7), 116.5 (C-62, *q*, *J* = 3.25), 122.7 (C-6), 123.4 (CF_3, *J* = 247.5 Hz), 127.1 (C-3, *J* = 31.65 Hz), 127.3 (C-4, *J* = 3.0 Hz), 128.6 (C-5´), 129.2 (C-2´), 132.3 (C-5),139.0 (C-1), 154.6 (C=O) ppm.

RMN ^{1}H (600 MHz, DMSO-d6) δ: 1.42 (*qd*, 2H, H-9, H-11, *J* = 11.25 y *J* = 12.47 Hz, *J* = 3.49 Hz), 1.79 (*dd*, 2H, H-9, H-11, *J* = 12.96 Hz y *J* = 3.61), 2.04 (*t*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.02 Hz), 2.74 (*d*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.75 Hz), 3.45 (*s*, 2H, 7-CH_2), 3.46-3.52 (*m*, 1H, H-10), 6.31 (*d*, 1H, NH, *J* = 7.63), 7.21-7.35 (*m,* 5H, H-2´, H-3´, H-4´, H-5´ y H-6´), 7.51-7.53 (*m,* 2H, H-5 y H-6, 8.84 (*s*, 1H, NH´) ppm.

EM (IE): N.D.

6.10. Síntesis de 1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[3-(fenil]urea (WAD-8)



18 10

En un matraz bola de 25 mL equipado con parrilla de agitación, embudo de adición de presiones igualadas y trampa de gases, se colocaron 2 mL de CH_3CN y 0.268 mL (0.001313 mol) de 4-aminobencilpiperidina y se dejó en agitación durante 10 minutos. Una vez pasado el tiempo se adicionaron 2 mL de CH_3CN con 0.157 mL (1.1 equivalentes) de isocianato de fenilo gota a gota con intervalos de 5 minutos. Una vez adicionado, se dejó reaccionar a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada con CCF a los 30 minutos y posteriormente cada hora usando el **sistema I,** la duración de la reacción fue de 48 h. Posteriormente se rotaevaporó el disolvente, y una vez eliminado se procedió a añadir 5 mL de agua fría al matraz, se llevó la solución a un pH de 9 se dejó en agitación durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a filtrar con vacío el precipitado. Se obtuvo un sólido amarillo con un peso de 0.3454 g y un rendimiento crudo de 84.9 %. El compuesto fue purificado mediante una extracción ácido-base triple donde se usó 10 mL de acetato y 3 fracciones de 10 mL de agua con pH de 4. Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento final 61.6 % y punto de fusión 167.1-168.4 °C.

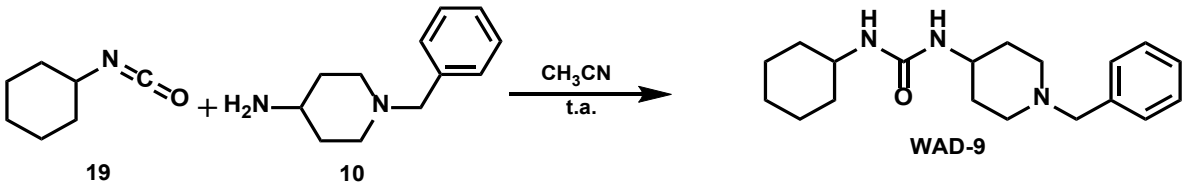
1-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[3-(fenil]urea

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d6) δ: 32.7 (C-9, C-11), 47.2 (C-10), 52.3 (C-8, C-12), 63.0 (C-7), 120.5 (C-2, C-6), 123.4 (C-4), 127.1 (C-4´), 128.2 (C-3´, C-5´), 129.1 (C-2´, C-6´), 129.2 (C-3 y C-5),138.4 (C-1´), 138.8 (C-1), 155.6 (C=O) ppm.

RMN ^{1}H (600 MHz, DMSO-d6) δ: 1.39 (*cd*, 2H, H-9, H-11, *J* = 11.25 y *J* = 3.73 Hz), 1.88 (*dd*, 2H, H-9, H-11, *J* = 13.57 Hz y *J* = 3.91), 2.03 (*t*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.47 Hz), 2.74 (*d*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.40 Hz), 3.44 (*s*, 2H, 7-CH_2), 3.59-3.66 (*m*, 1H, H-10), 5.28 (*d*, 1H, NH, *J* = 6.94), 7.01 (*td,* 1H, H-4, J_o = 7.07 Hz, J_m = 1.81 Hz), 7.19-7.20 (m, 1H, H-4´), 7.22-7.30 (*m,* 8H, H-2, H-3, H-5, H-6, H-2', H-3´, H-5´, H-6´) ppm.

EM (IE): m/z (% int. rel.) 309 (M^+ 1%), 173 (23%), 99 (26%), 91 (100%), 56 (19%)

6.11. Síntesis de *1*-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[3-ciclohexil]urea (**WAD-9**)



En un matraz bola de 25 mL equipado con parrilla de agitación, embudo de adición de presiones igualadas y trampa de gases, se colocaron 2 mL de acetonitrilo (CH_3CN) y 0.250 g (0.001313 mol) de 4-aminobencilpiperidina y se dejó en agitación durante 10 minutos. Una vez pasado el tiempo se adicionaron 2 mL de CH_3CN con (1.1 equivalentes) de isocianato de fenilo gota a gota con intervalos de 5 minutos. Una vez adicionado, se dejó reaccionar a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada con CCF a los 30 minutos y posteriormente cada hora usando el **sistema I,** la duración de la reacción fue de 48 h. Posteriormente se rotaevaporó el disolvente, y una vez eliminado se procedió a añadir 5 mL de agua fría al matraz, se llevó la solución a un pH de 9 se dejó en agitación durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a filtrar con vacío el precipitado. Se obtuvo un sólido amarillo con un peso de 0.3765 g y un rendimiento crudo de 90.8 %. El compuesto fue purificado mediante una extracción ácido-base triple donde se usó 10 mL de acetato y 3 fracciones de 10 mL de agua con pH de 4. Se obtuvo un sólido blanco con rendimiento final de 68.6% y punto de fusión 172.1-174.2 °C.

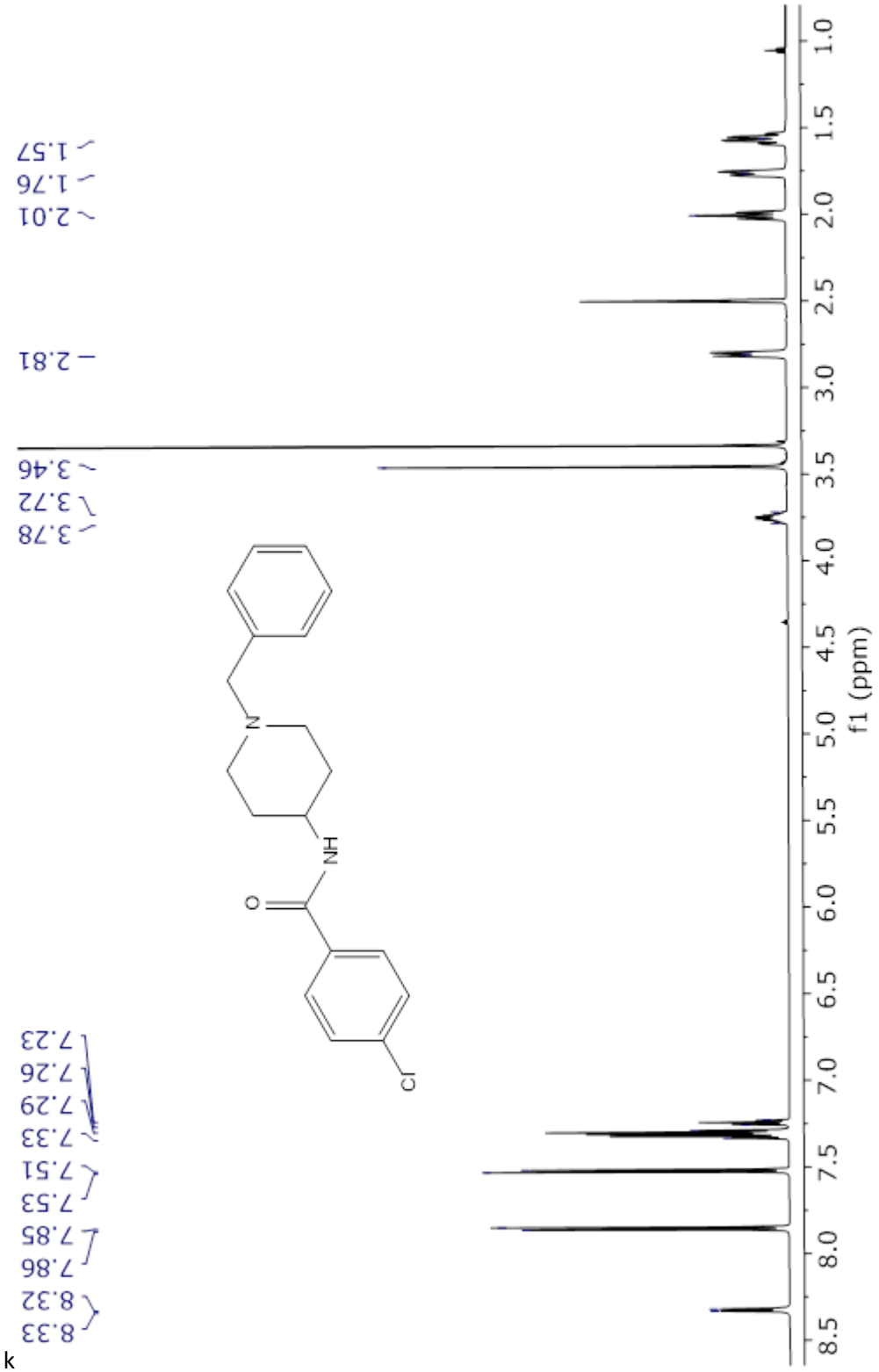
***1*-(1-Bencilpiperidin-4-il)-3-[3-ciclohexil]urea**

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d6) δ: 24.9 (C-3 y C-5), 25.6 (C-4), 33.0 (C-2 y C-6), 33.9 (C-9, C-11), 47.2 (C-10), 52.4 (C-8, C-12), 63.1 (C-7), 127.0 (C-4´), 128.1 (C-3´, C-5´), 129.1 (C-2´, C-6´),138.5 (C-1´), 157.0 (C=O) ppm.

RMN ^{1}H (600 MHz, DMSO-d6) δ: 1.05-1.17 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 1.30-1.37 (m, 2H, H-2, H-6), 1.41 (*cd*, 2H, H-9, H-11, *J* = 11.42 y *J* = 3.58 Hz), 1.59 (*dt*, 1H, H-1, *J* = 12.9 Hz y *J* = 4.01) 1.68 (*dt*, 2H, H-9, H-11, *J* = 13.69 Hz y *J* = 4.01 Hz), 1.90 (*dt*, 2H, H-8, H-12, *J* = 13.19 Hz y *J* = 4.32 Hz), 2.10 (*t*, 2H, H-8, H-12, *J* = 11.58 Hz), 2.79 (*d*, 2H, H-8 y H-12, *J* = 11.43), 3.47 (*s*, 3H, 7-CH_2,), 3.55-3.59 (*m*, 1H, H-10), 4.52 (*t*, 1H, NH, *J* = 6.65), 4.60 (*t*, 1H, NH´, *J* = 4.17), 7.22-7.26 (*m,* 1H, H-4), 7.29 (*d*, 4H, H-2, H-3, H-5, H-6) ppm.

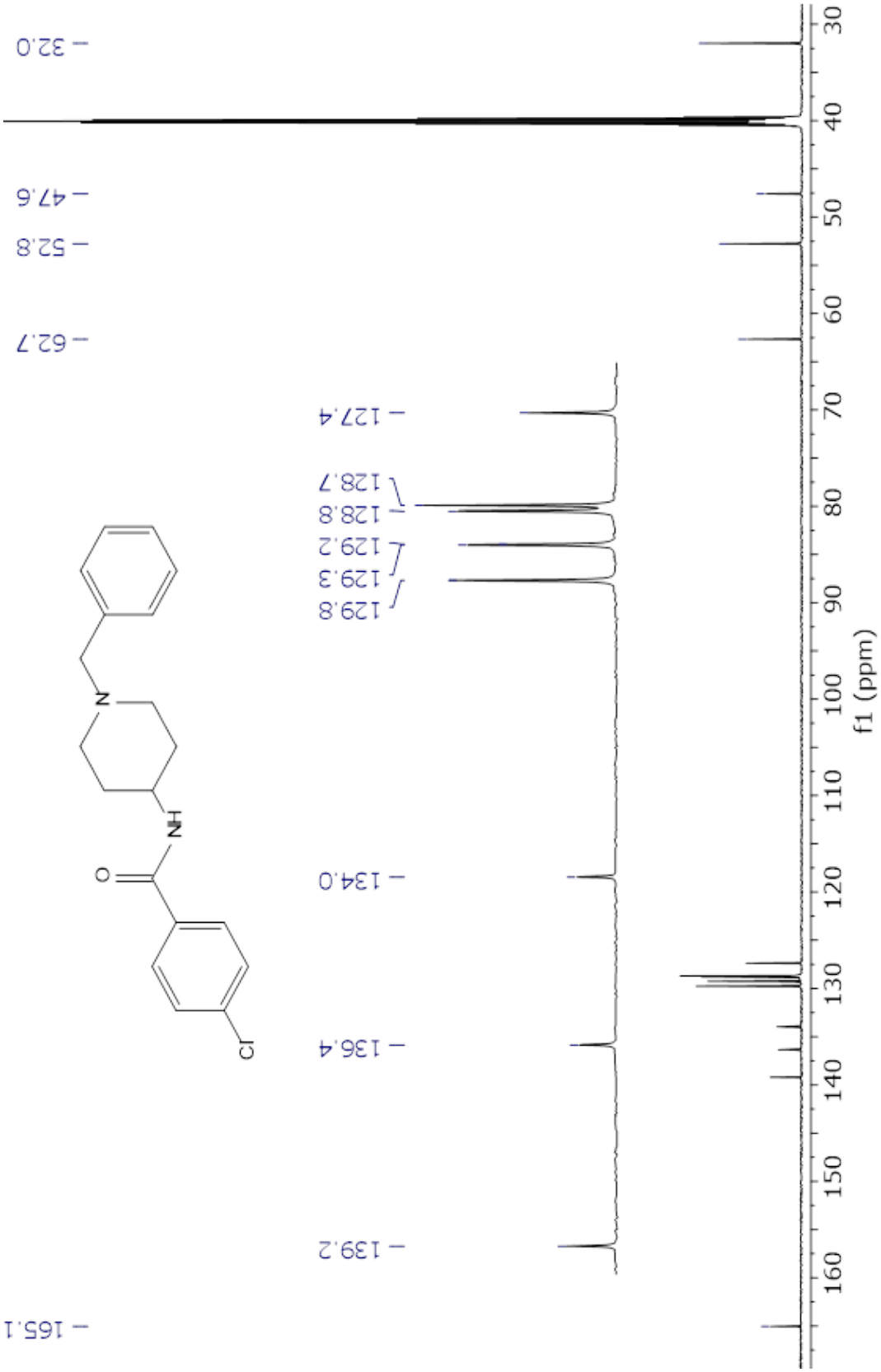
EM (IE): m/z (% int. rel.) 315 (M^+ 1%), 157 (30%), 91 (99%), 82 (100%), 65 (12%)

ESPECTROS

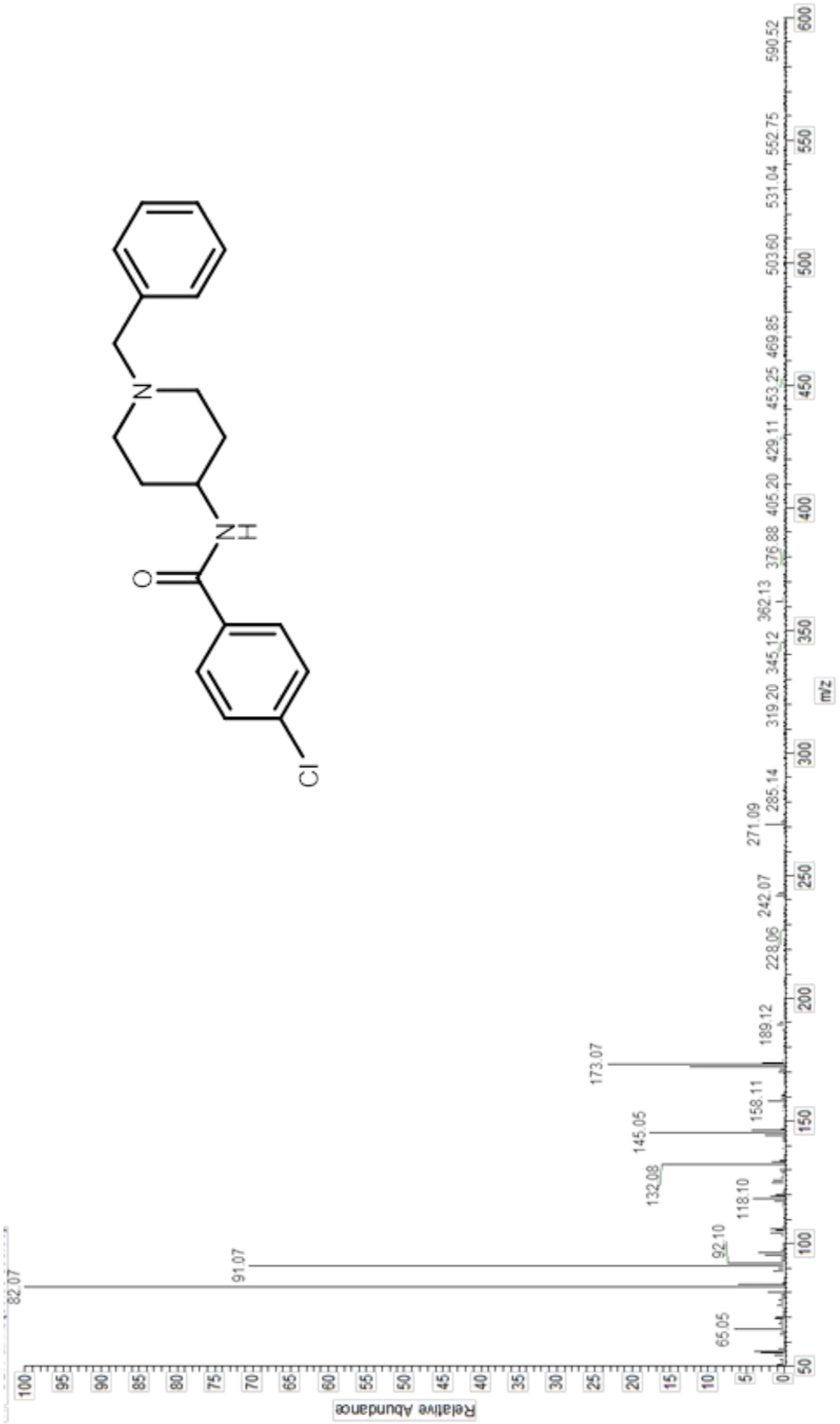


k

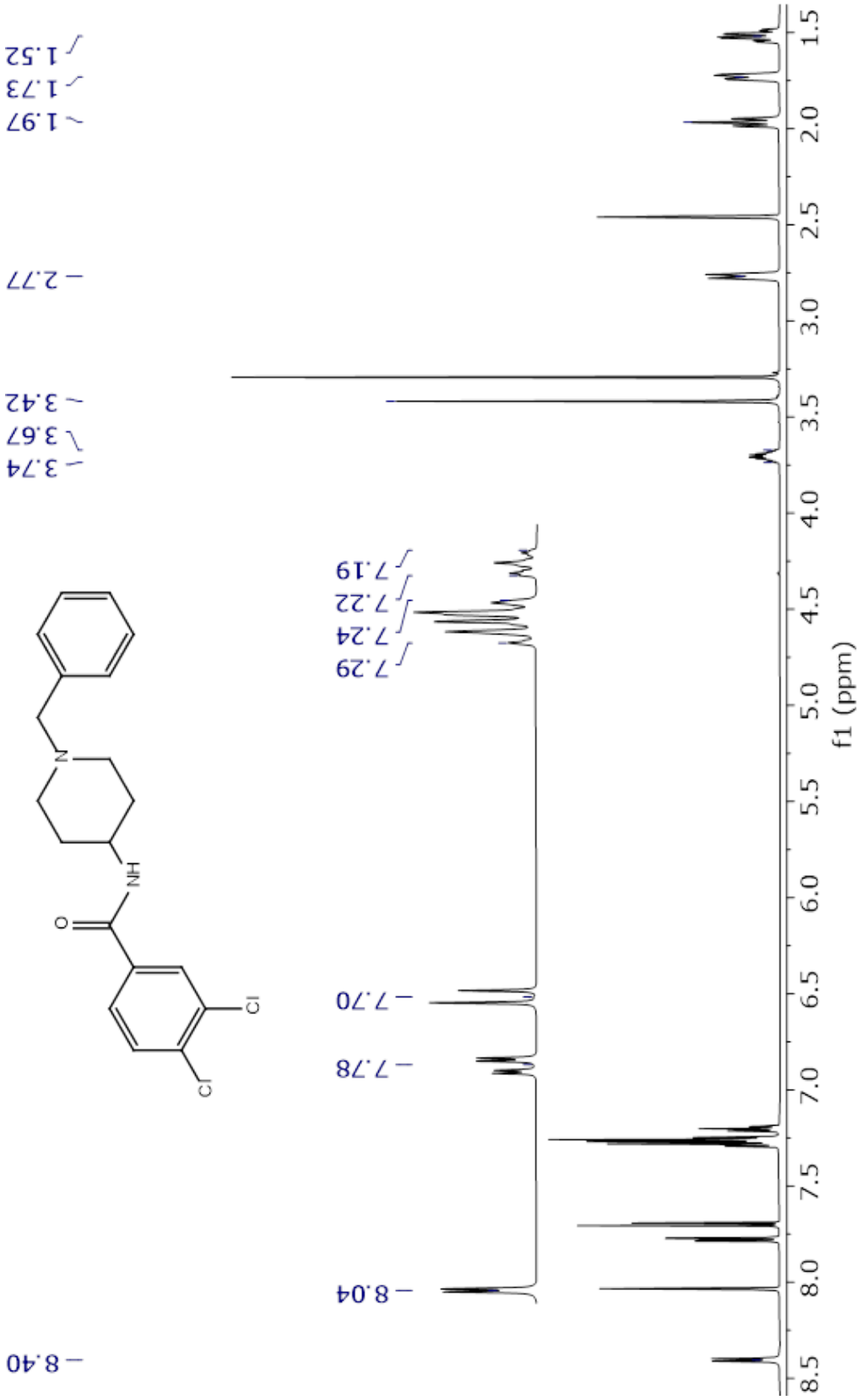
Espectro 1.Espectro de RMN ^{1}H del compuesto **WAD-1**.



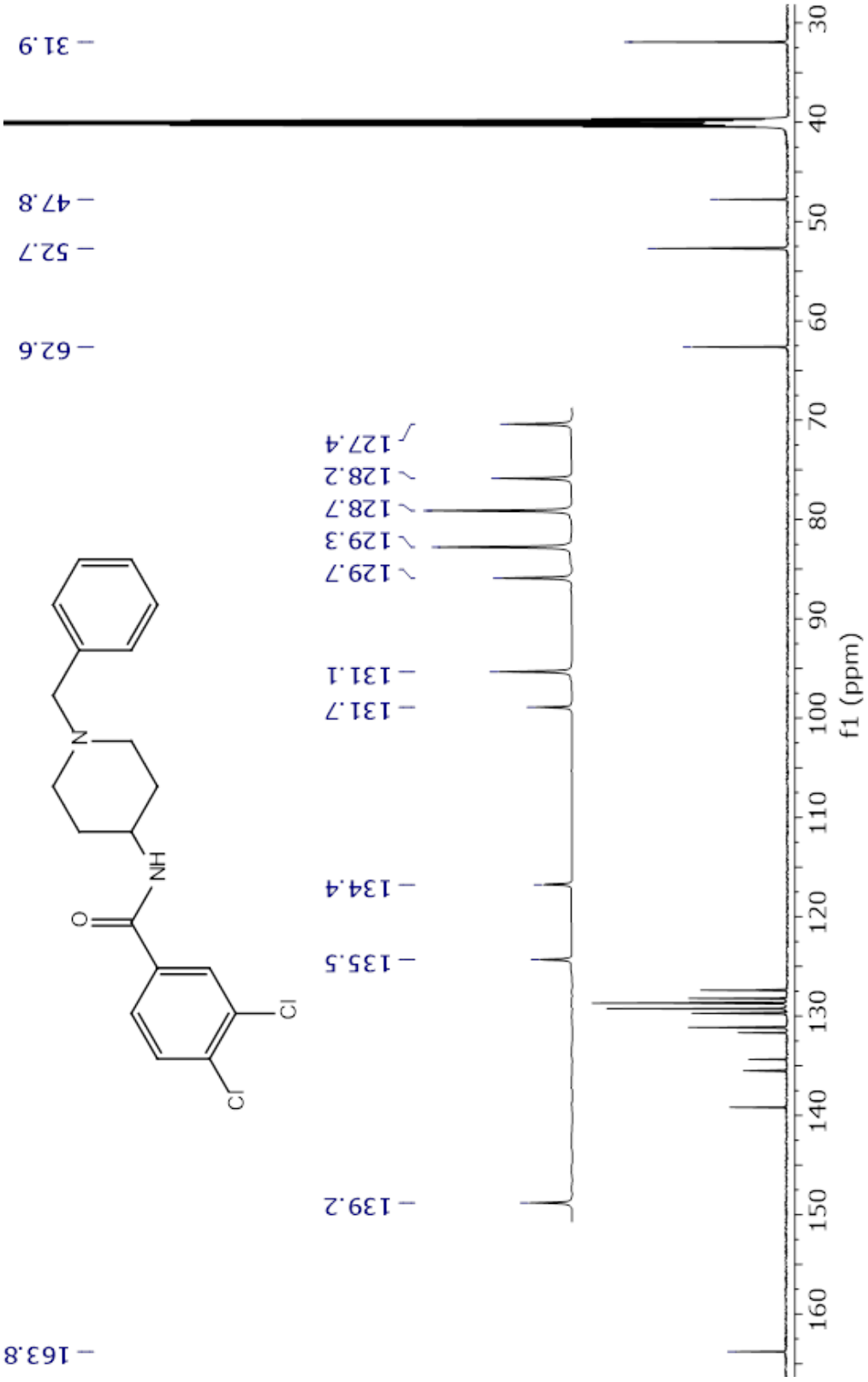
Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **WAD-1**.



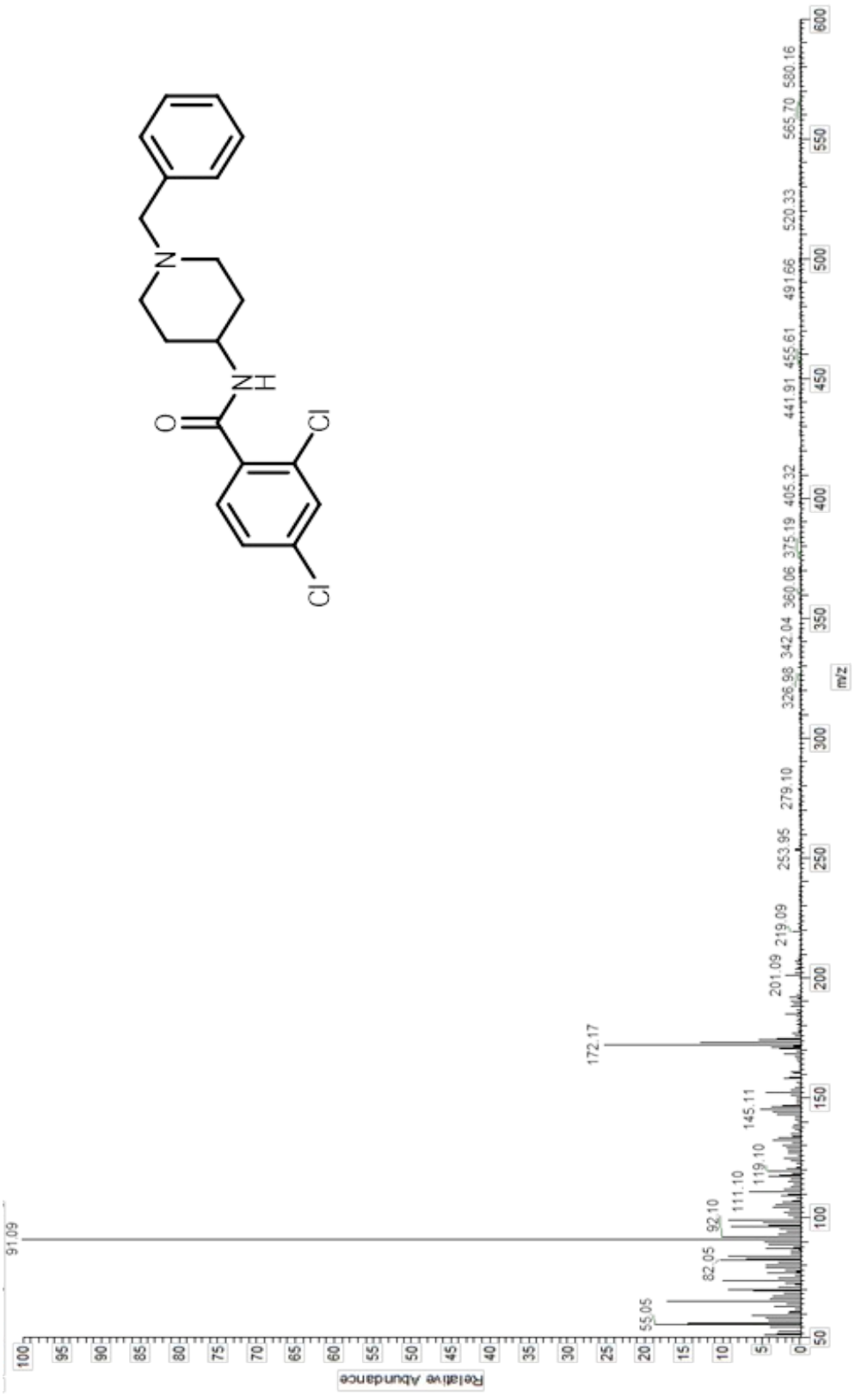
Espectro 3. Espectro de masas (IE) del compuesto **WAD-1**.



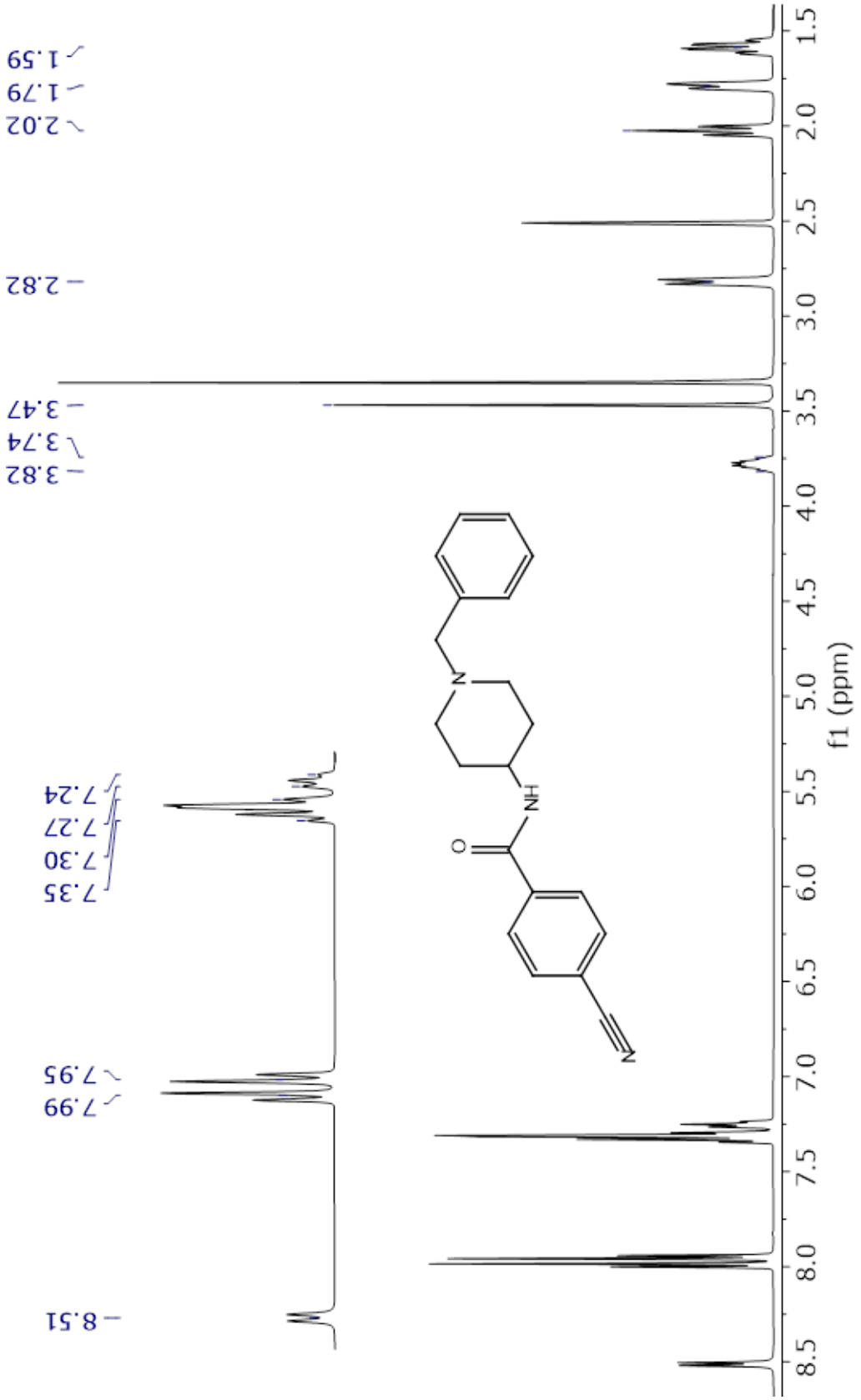
Espectro 4. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-2**.



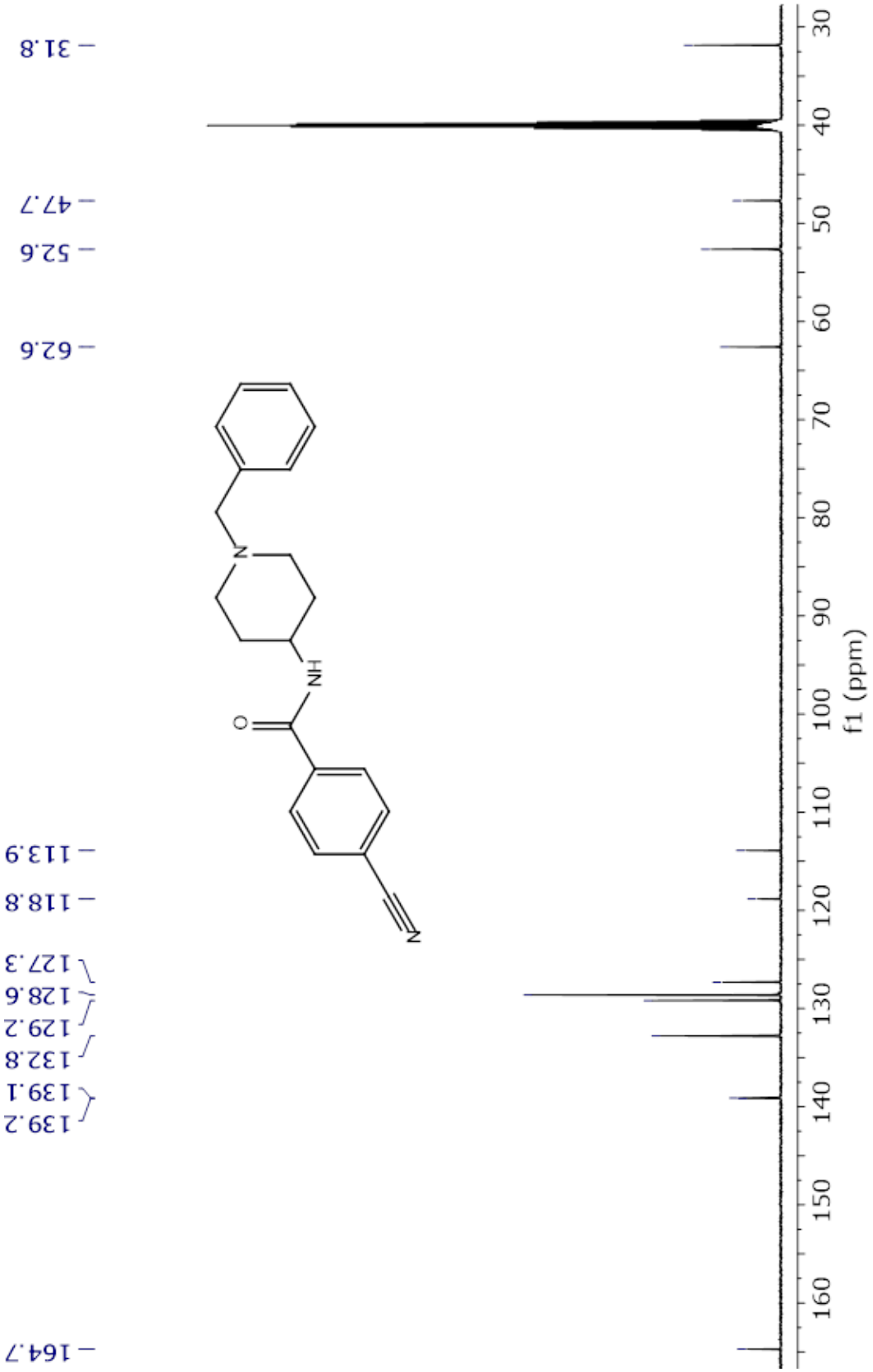
Espectro 5. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-2**.



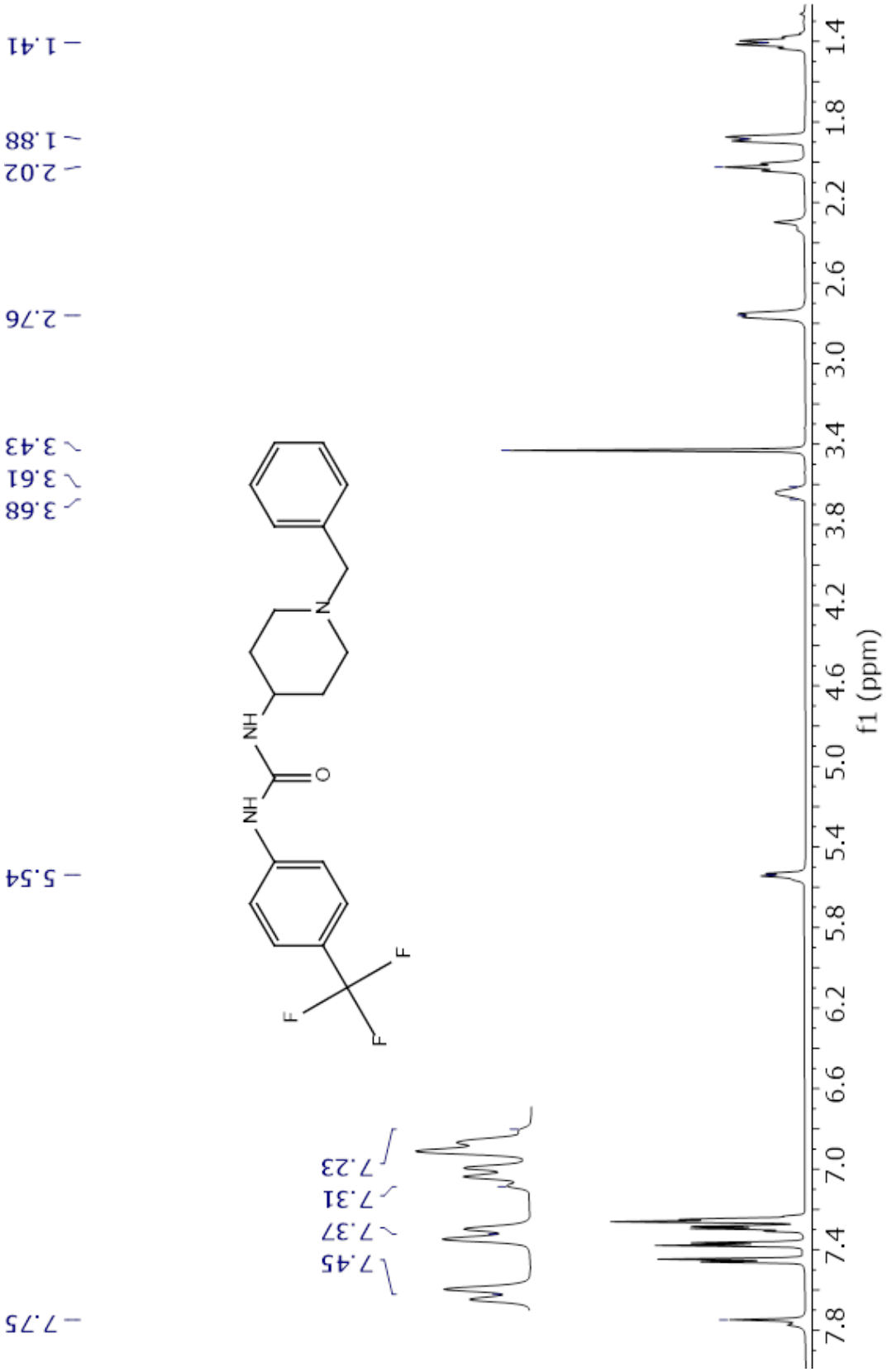
Espectro 6. Espectro de masas (IE) del compuesto **WAD-2**.



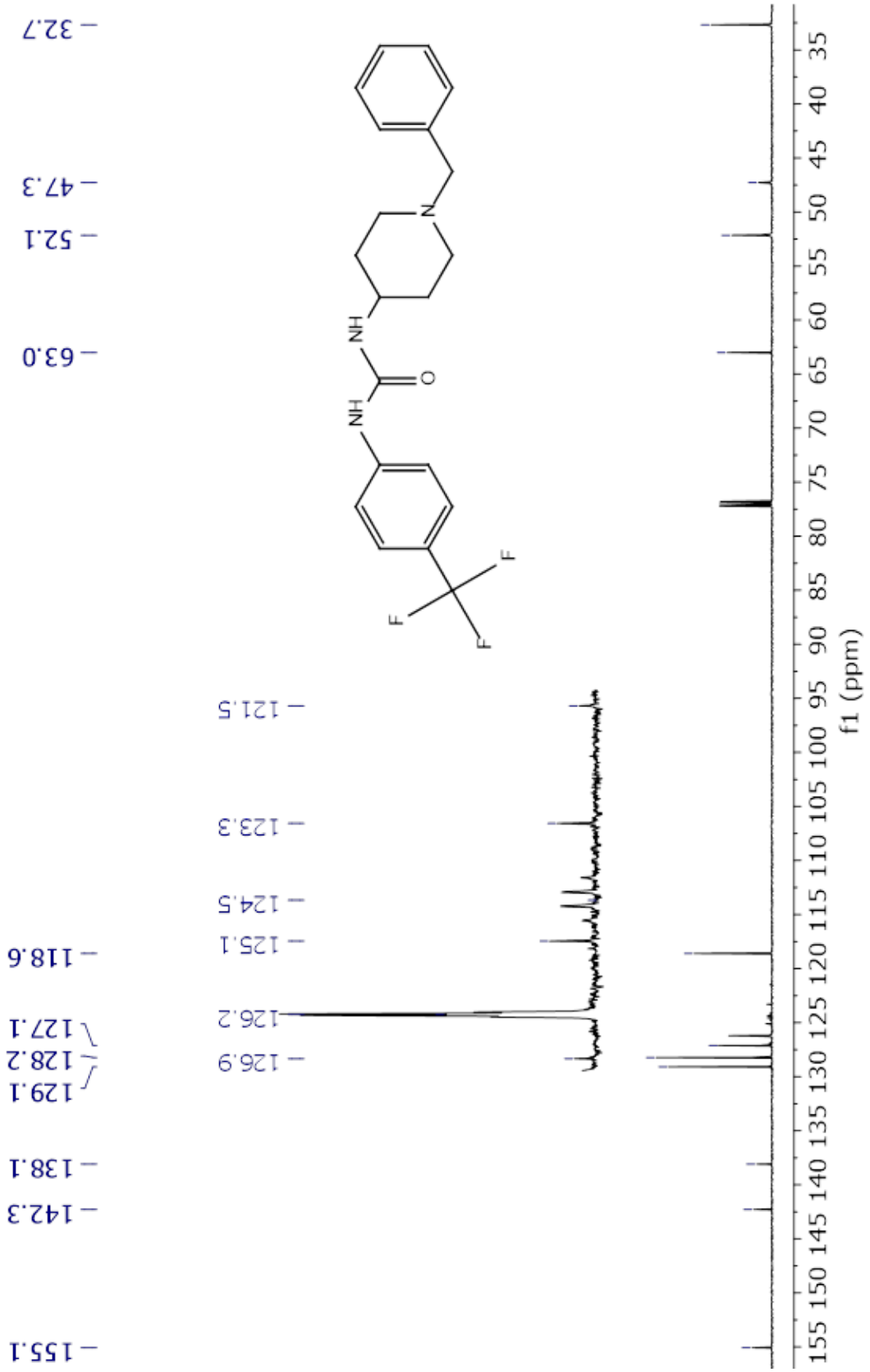
Espectro 7. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-3**.



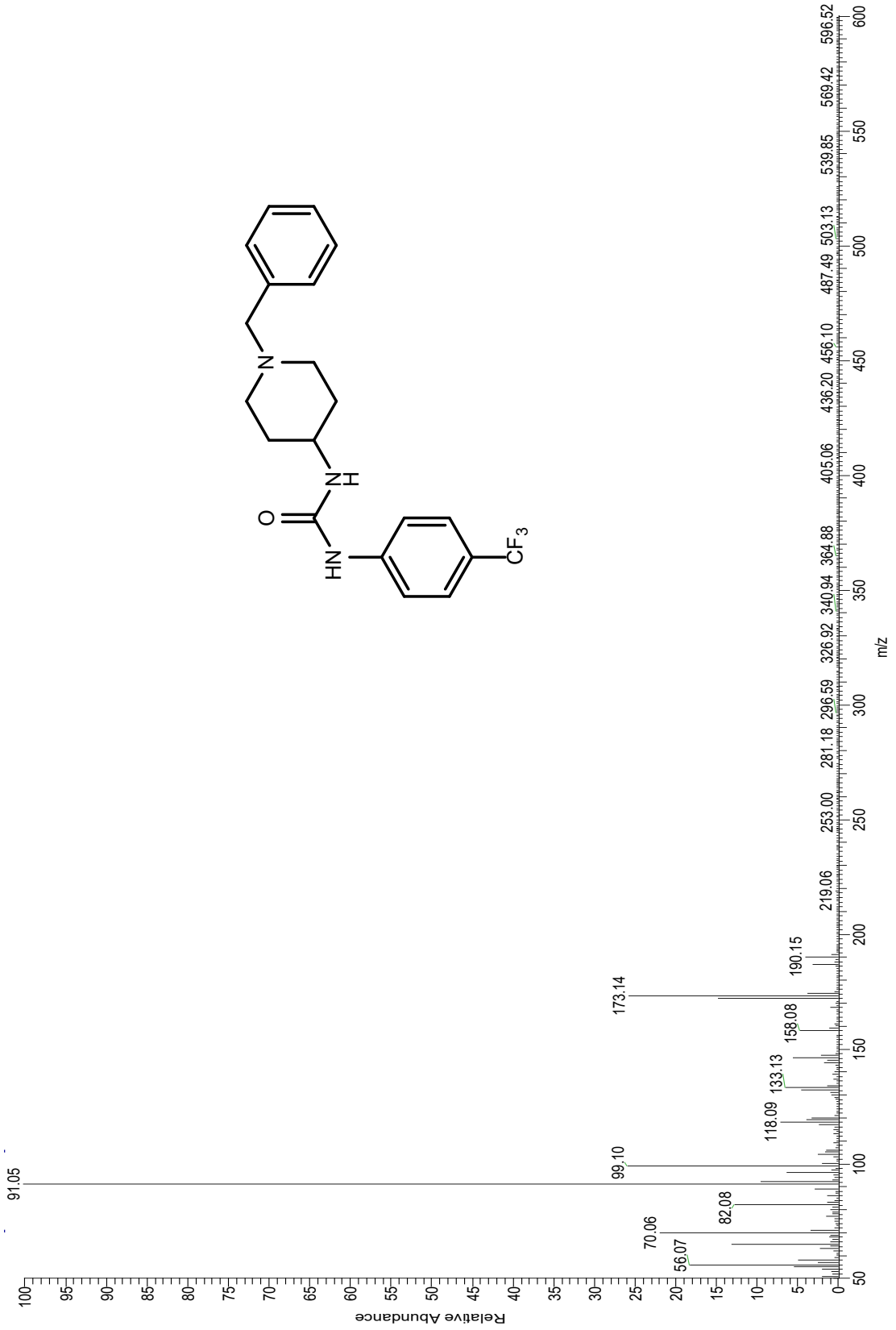
Espectro 8. Espectro de RMN de 13C del compuesto **WAD-3**.



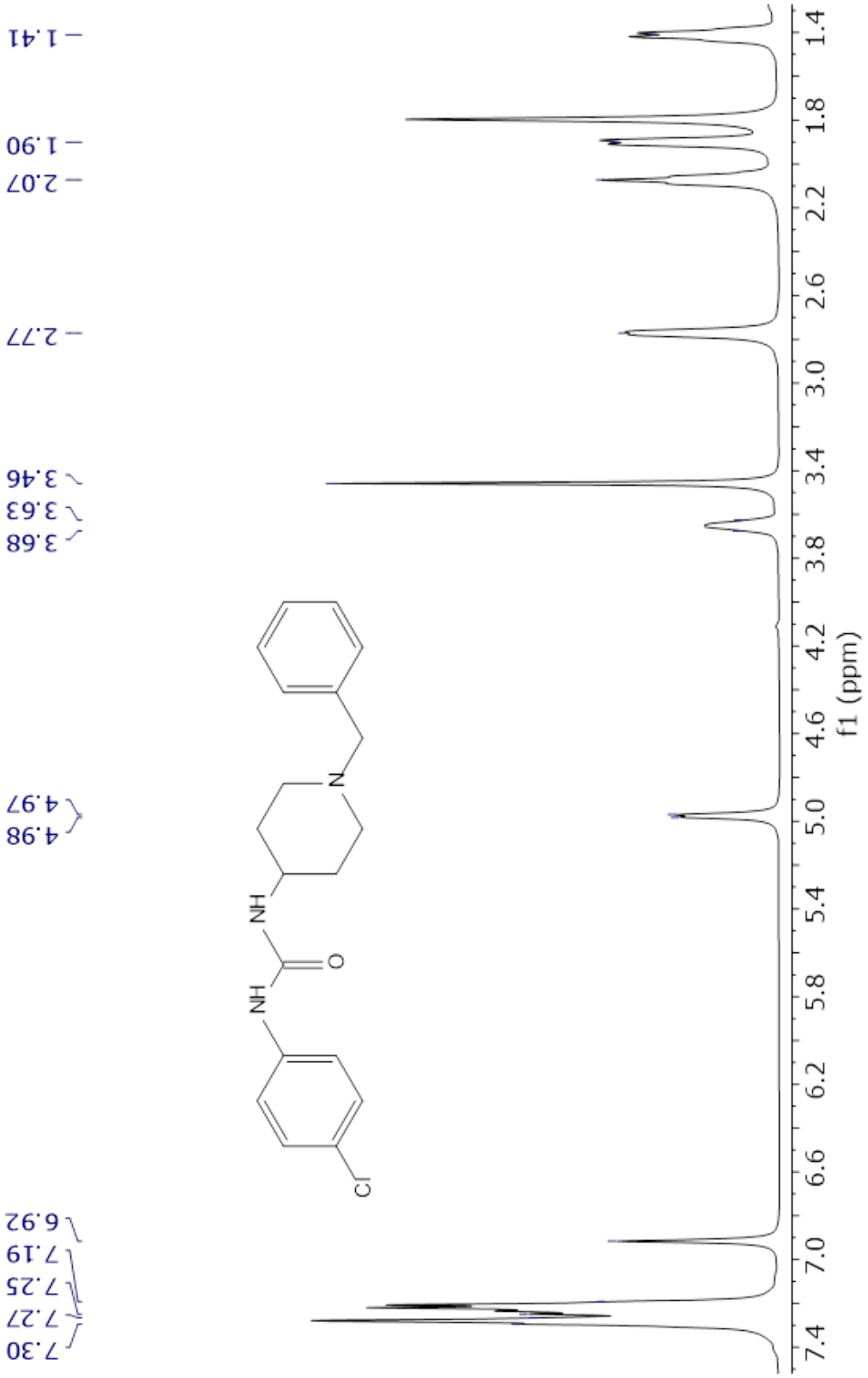
Espectro 9. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-4**.



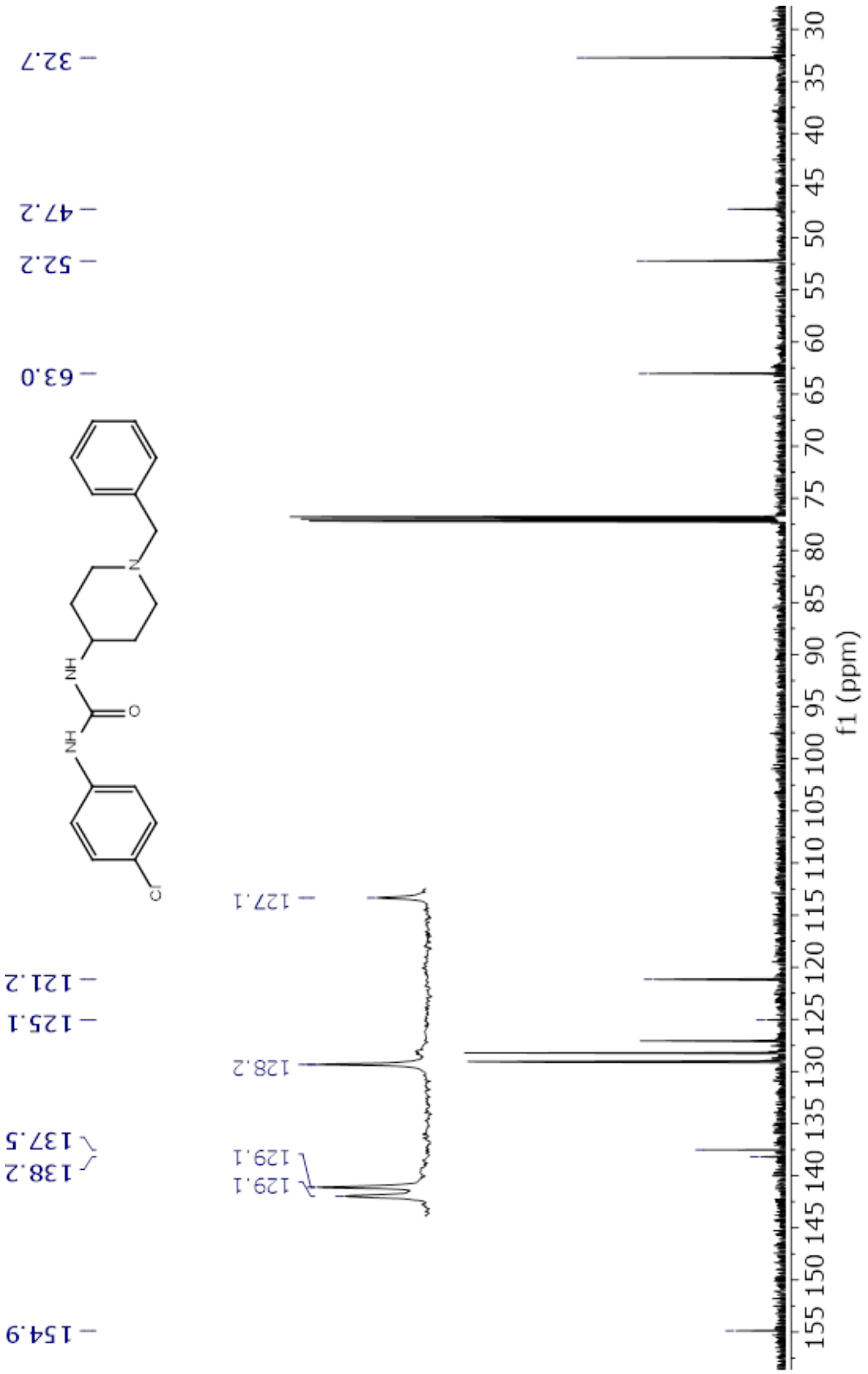
Espectro 10. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-4**.



Espectro 11. Espectro de masas (IE) del compuesto **WAD-4**.

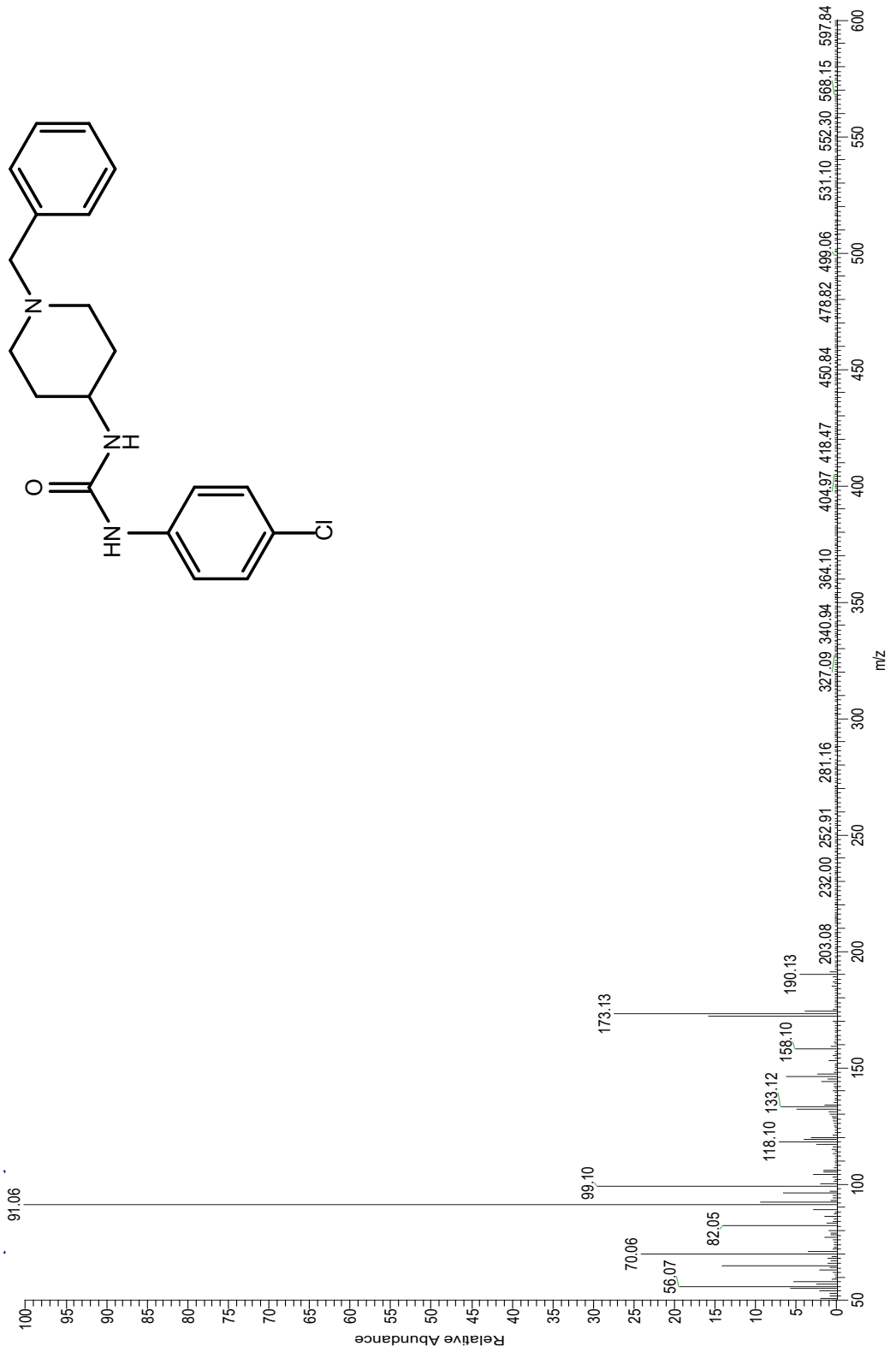


Espectro 12. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-5**.

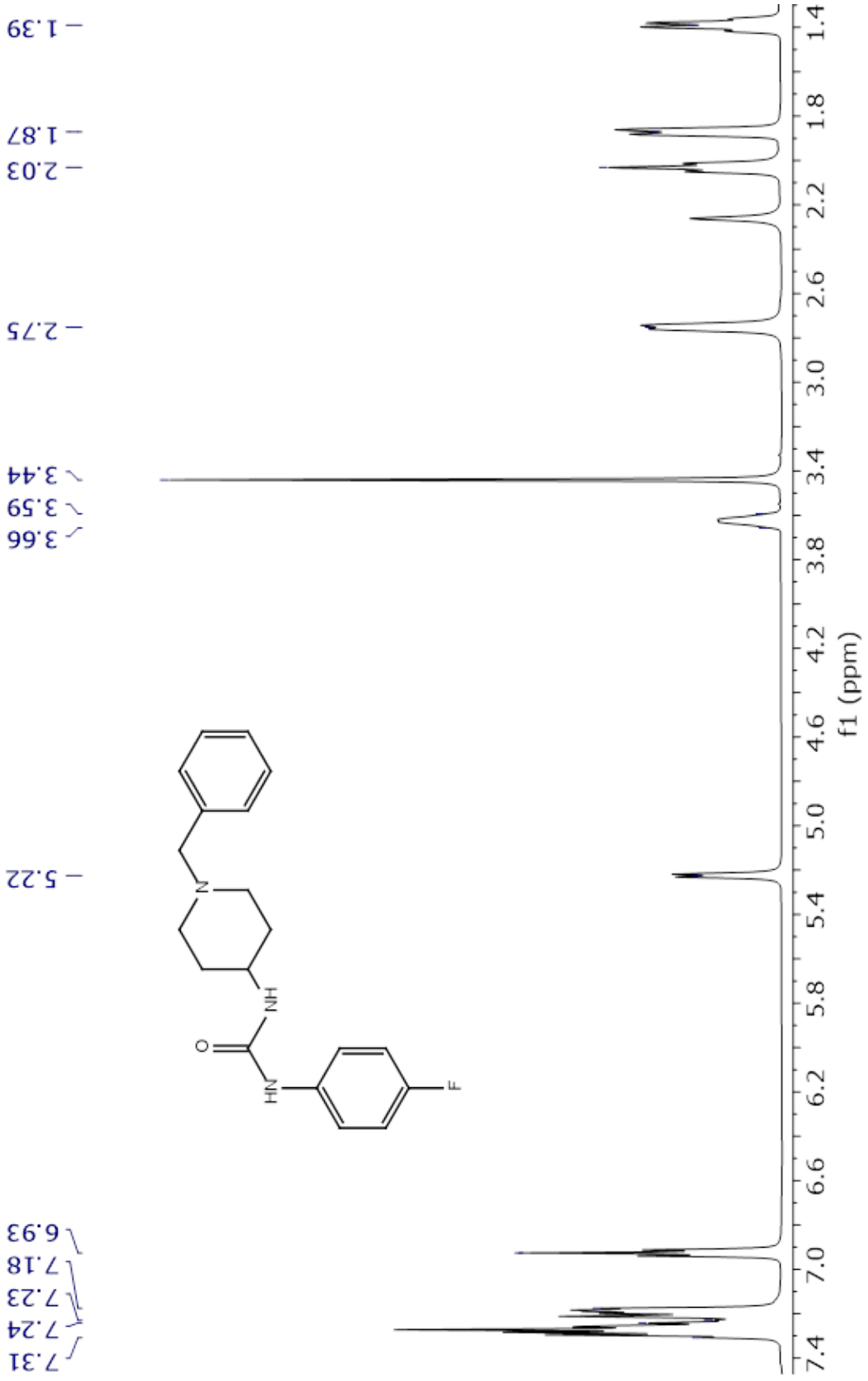


Espectro 13. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-5.**

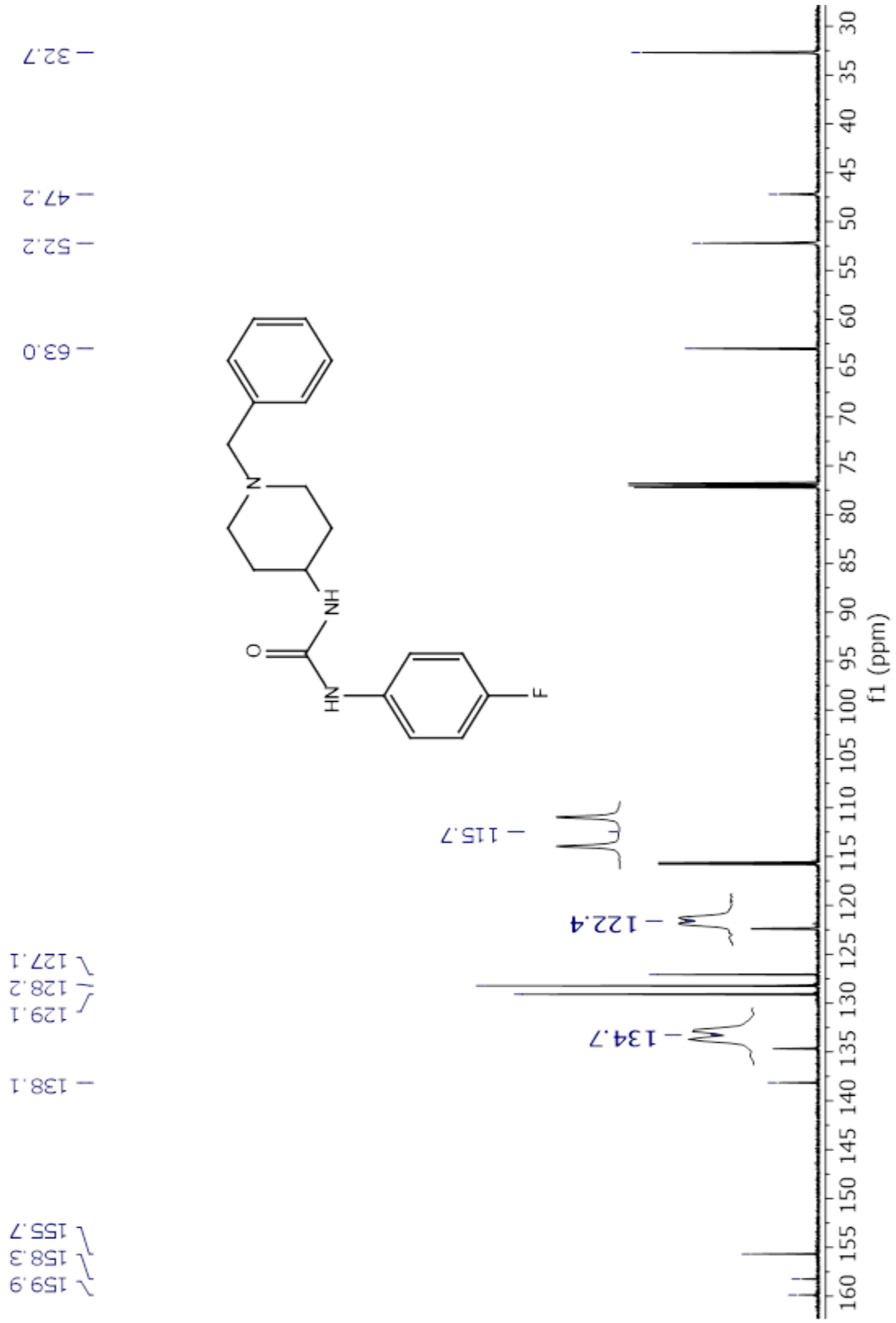
.



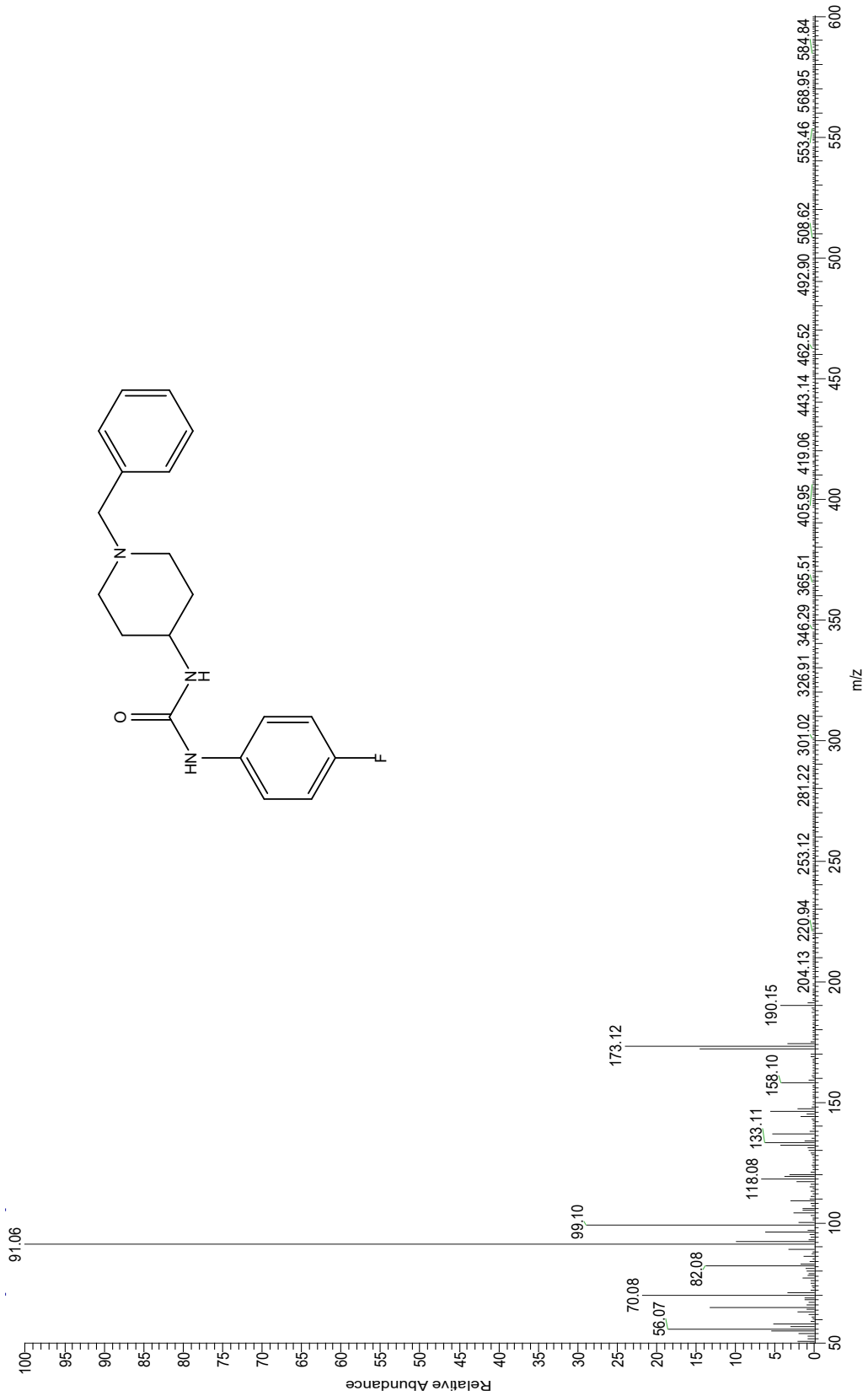
Espectro 14. Espectro de masas (IE) del compuesto **WAD-5**



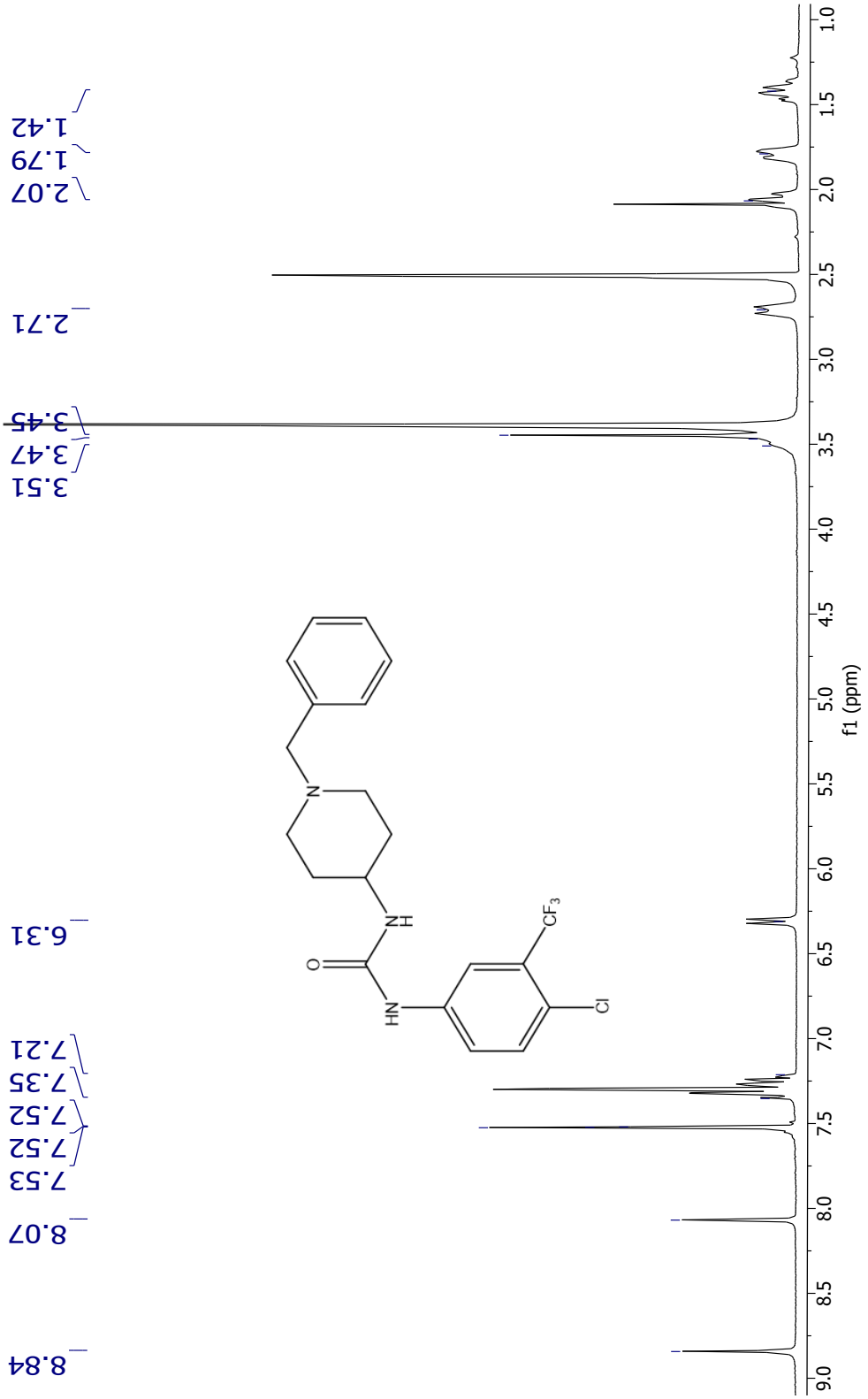
Espectro 15. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-6**.



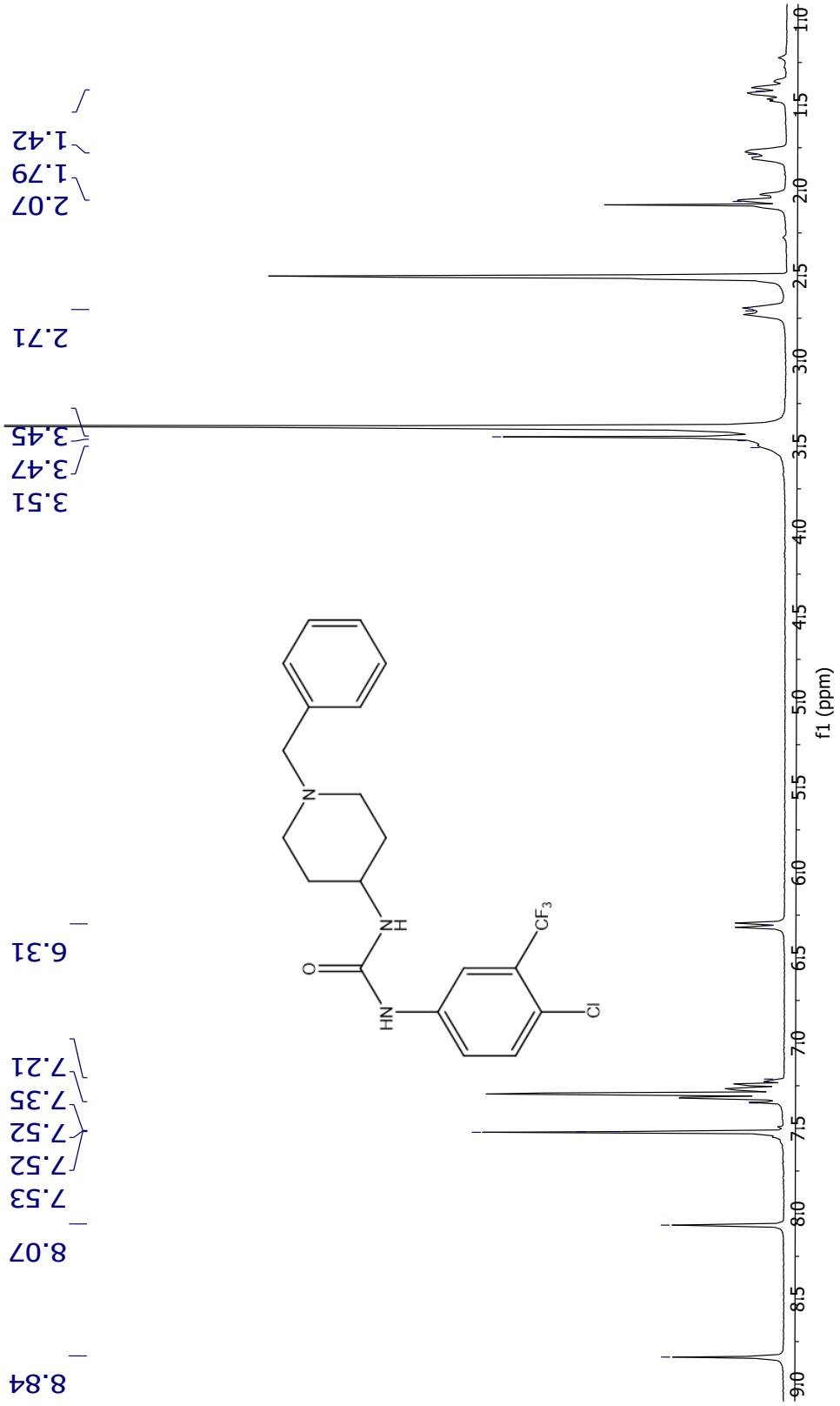
Espectro 16. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-6**.



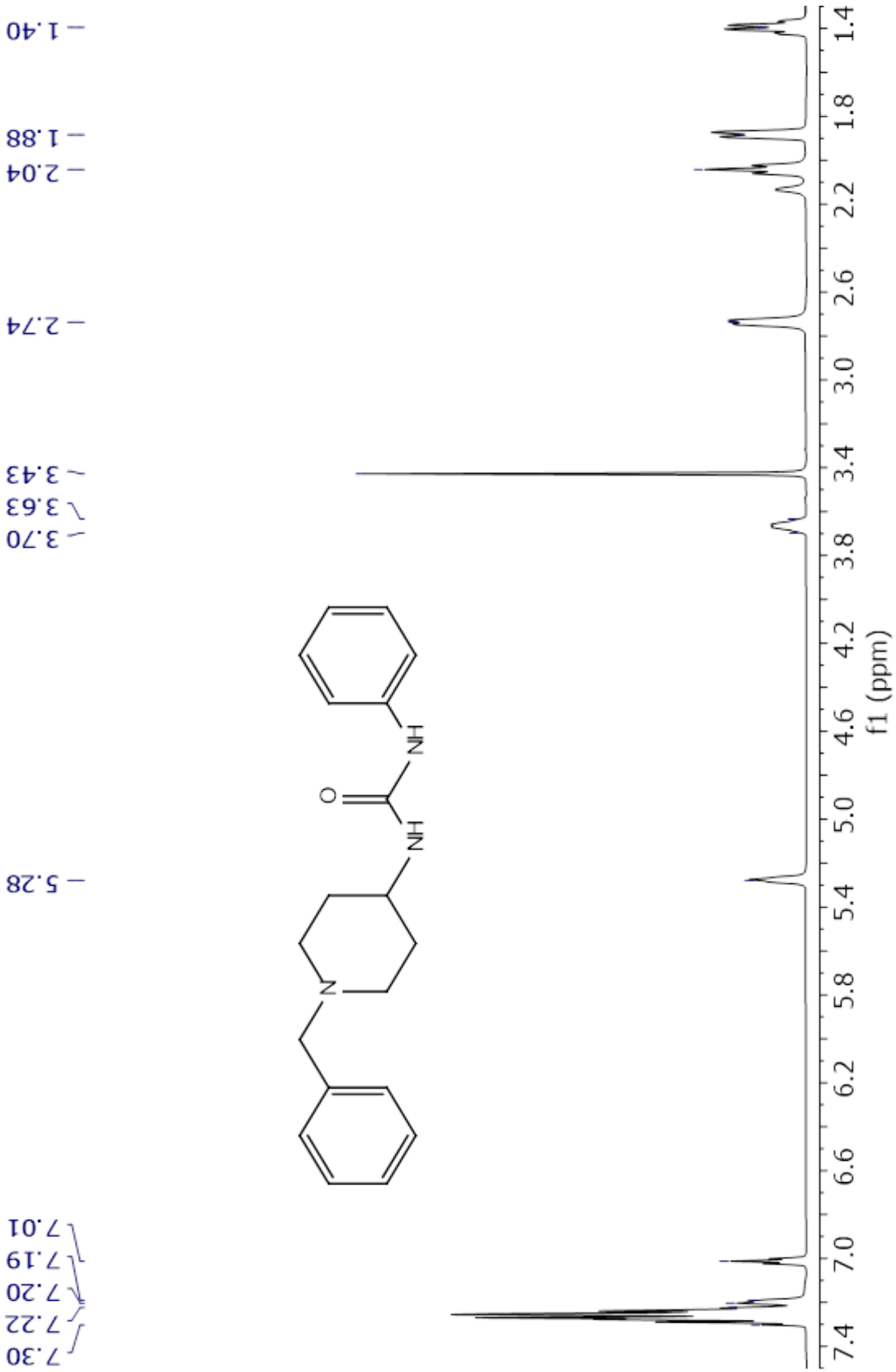
Espectro 17. Espectro de masas (IE) del compuesto **WAD-6**.



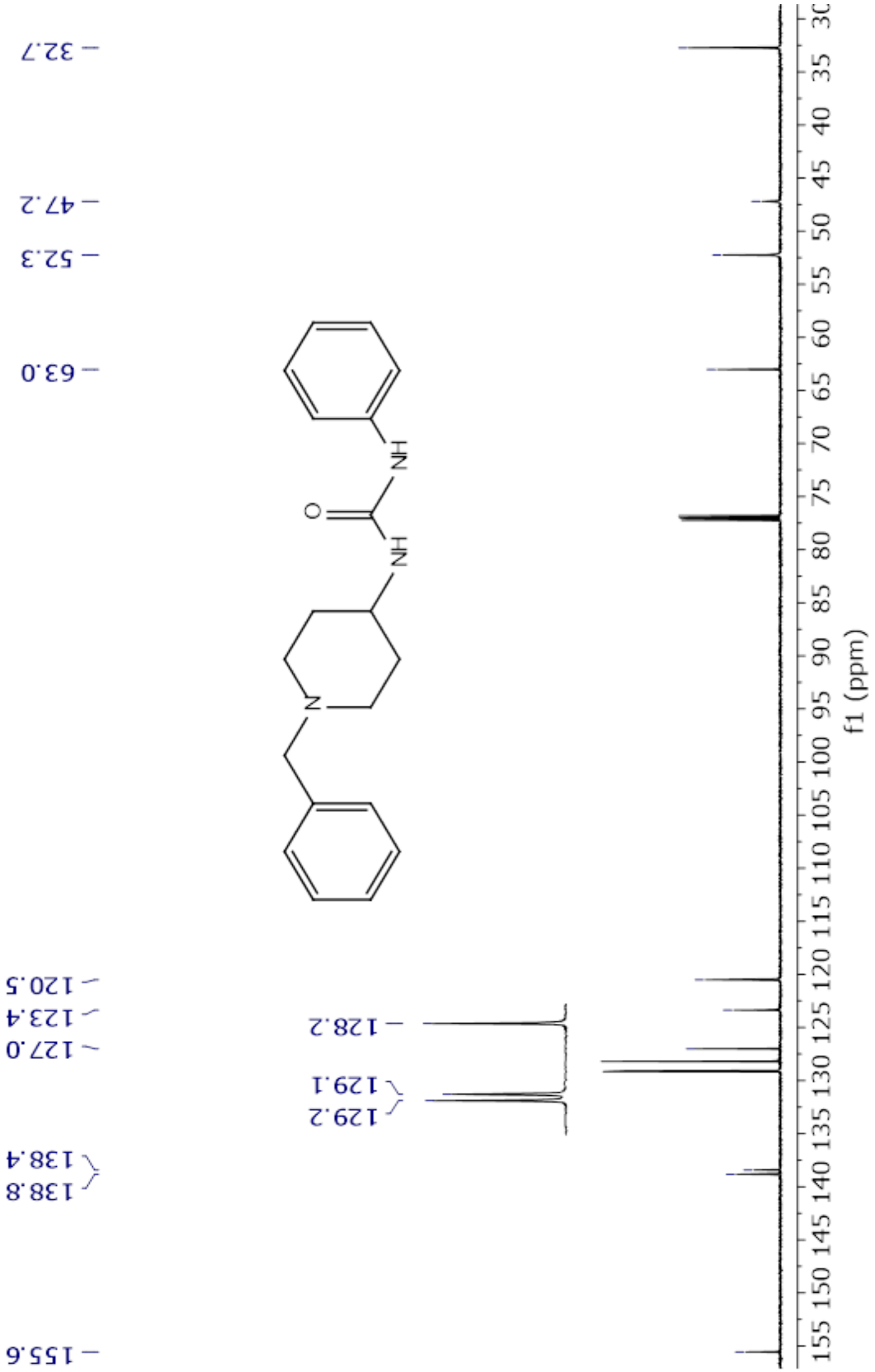
Espectro 18. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-7**.



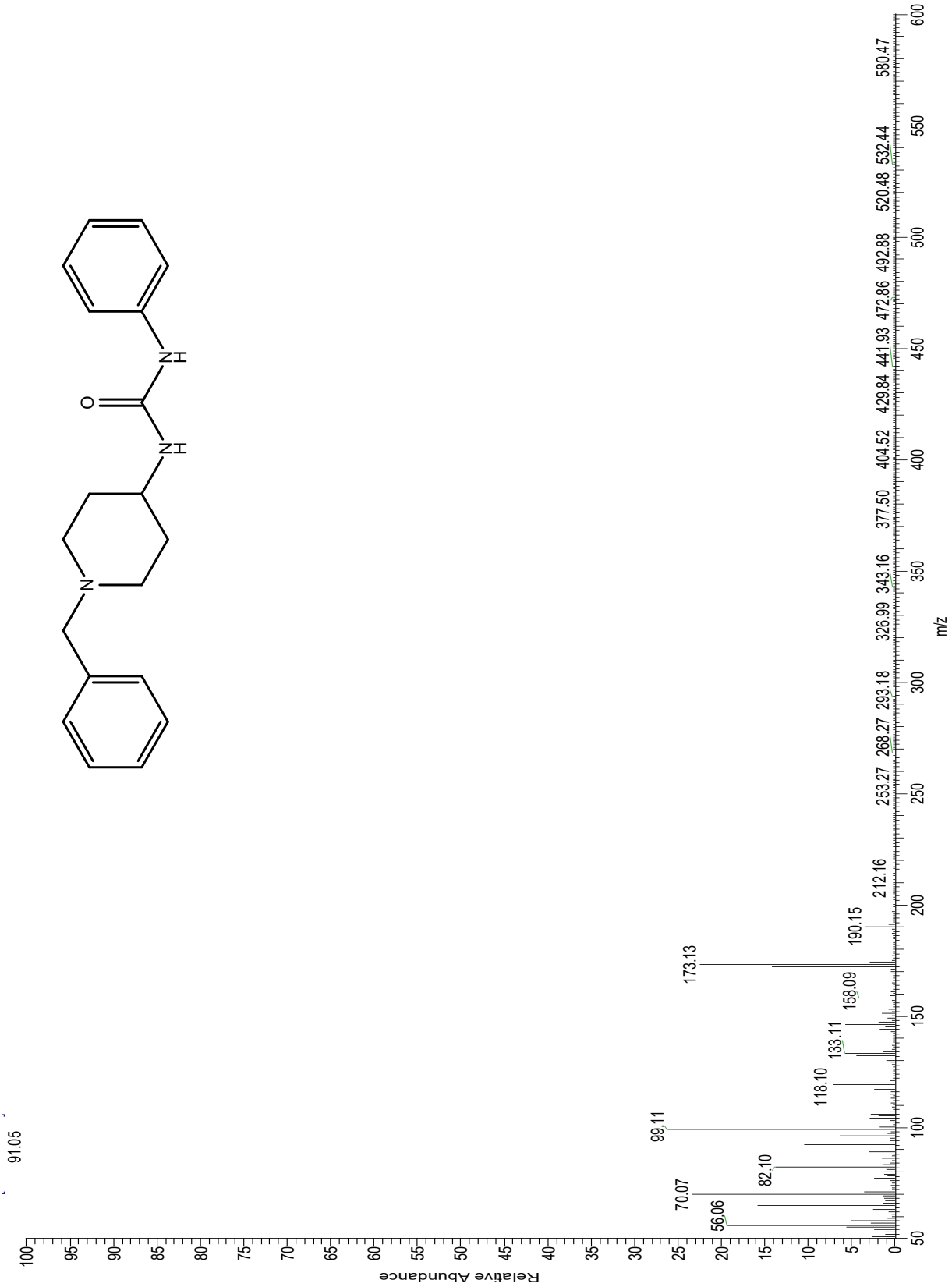
Espectro 19. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-7**.



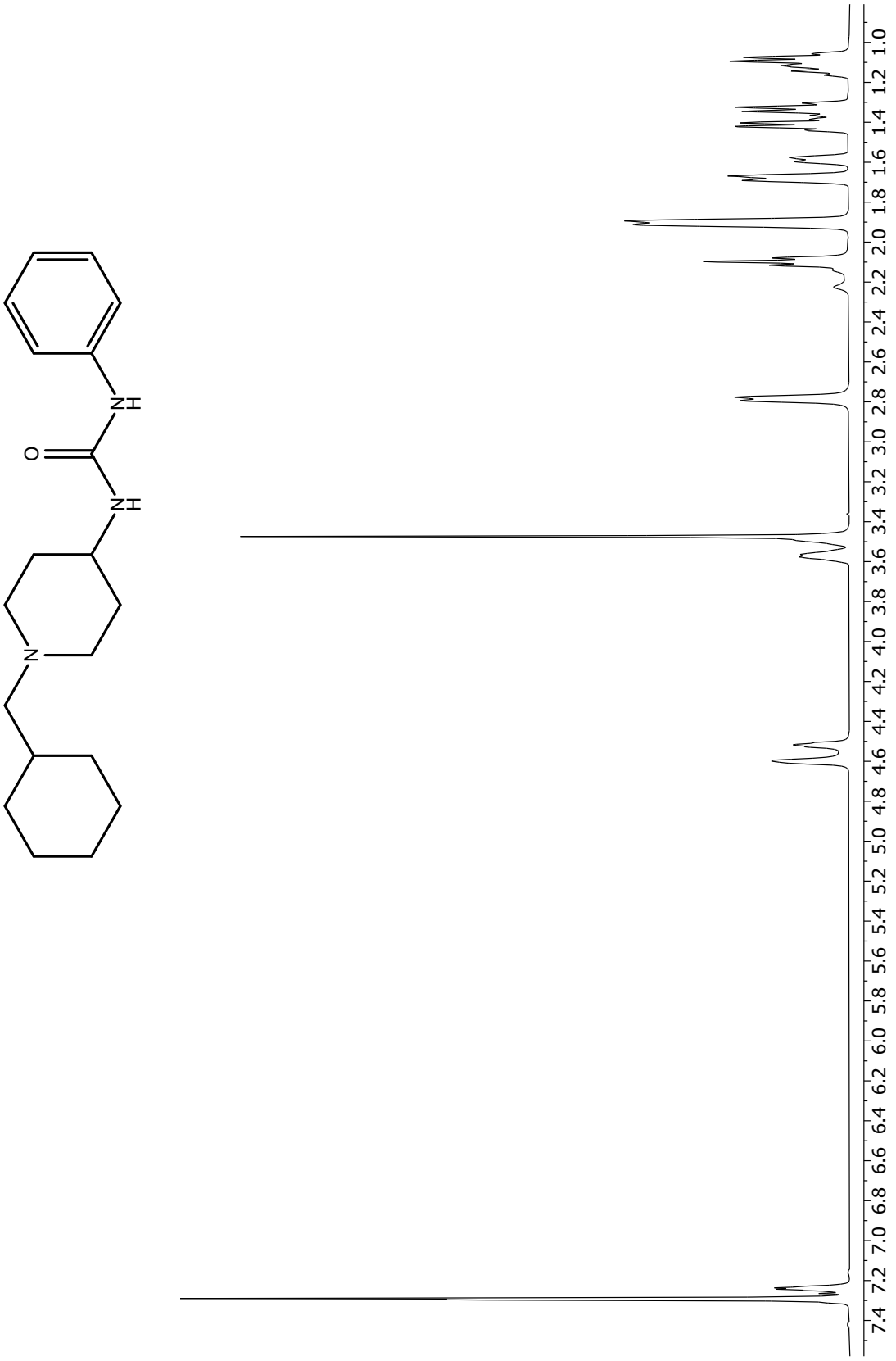
Espectro 20. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-8**.



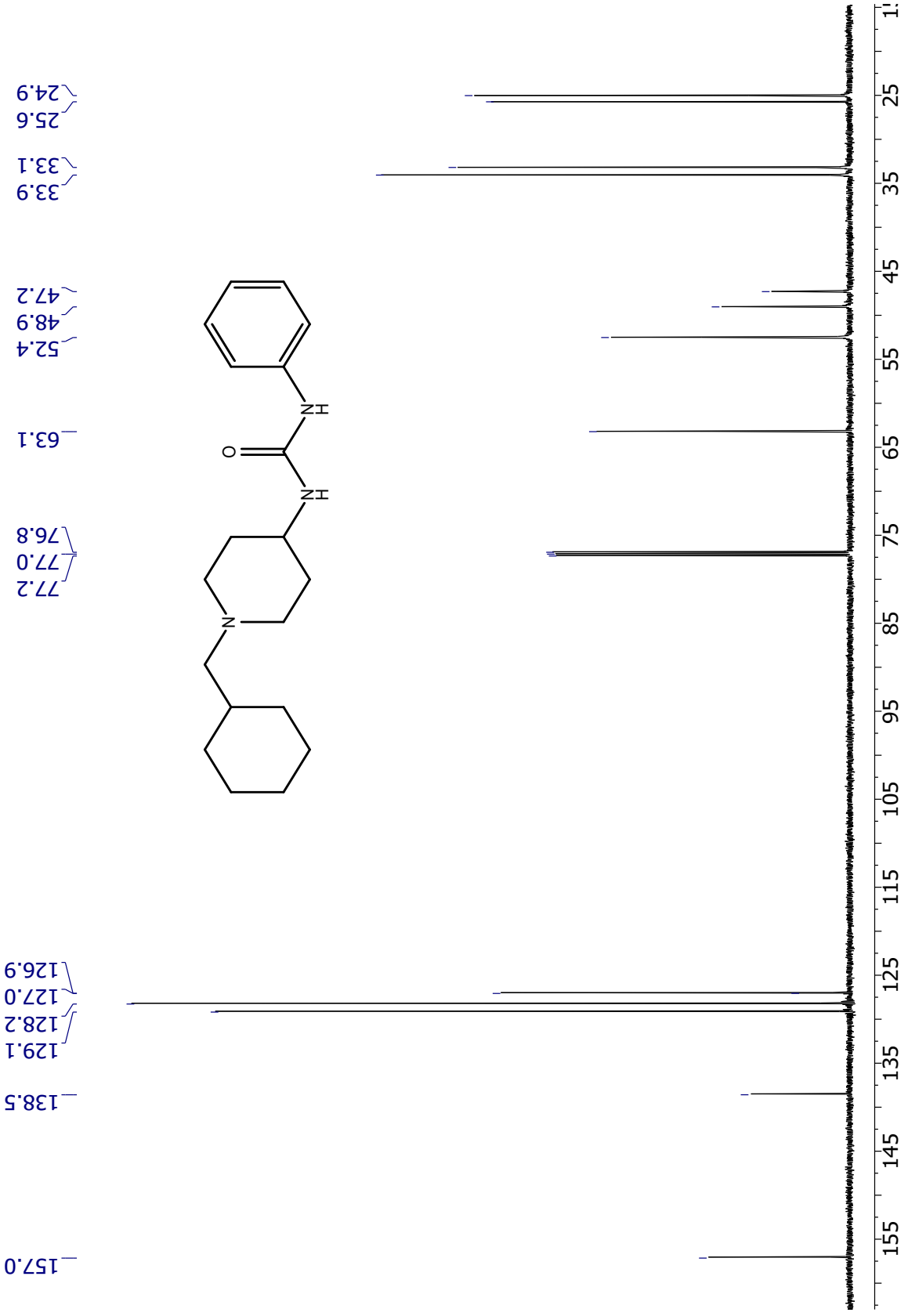
Espectro 21. Espectro de RMN de 13C del compuesto **WAD-8**



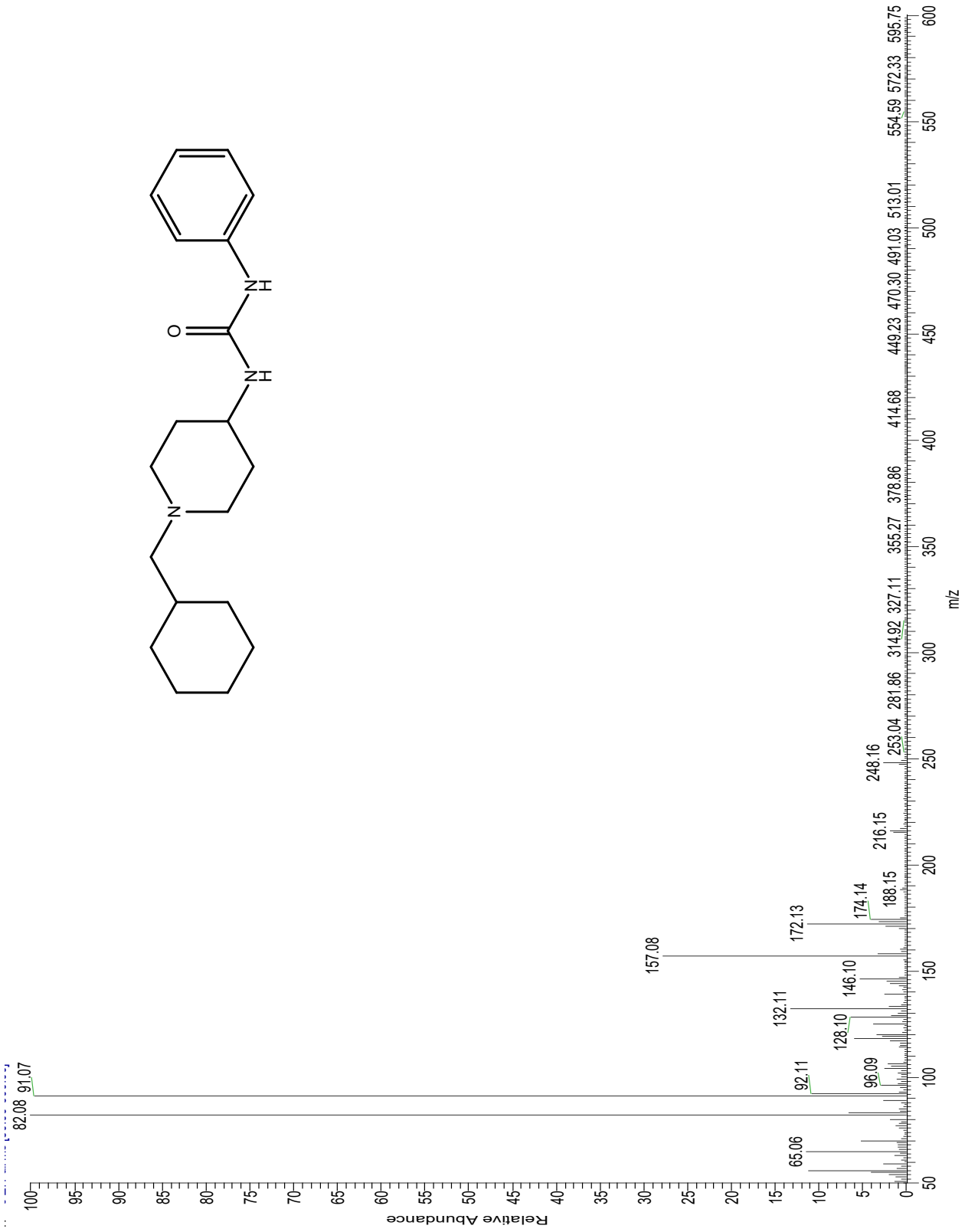
Espectro 22. Espectro de MASAS (IE) del compuesto **WAD-8**



Espectro 23. Espectro de RMN de ^{1}H del compuesto **WAD-9.**



Espectro 24. Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **WAD-9**.



Espectro 25.Espectro de MASAS (IE) del compuesto **WAD-9**.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Terminology | International Association for the Study of Pain. Accessed March 20, 2023. https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/
2. Yam MF, Loh YC, Tan CS, Adam SK, Manan NA, Basir R. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *Int J Mol Sci*. **2018**;19(8).
3. Sur S, en Erick Josué Rodríguez Palma MC. Participación del receptor gabaa-α6 en el dolor neuropático inducido por el daño a los nervios espinales. Centro De Investigación Y De Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional Sede Sur; 2022.
4. Woolf CJ. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Ann Intern Med*; **2004**;140(6):441-451.
5. Vardeh D, Mannion RJ, Woolf CJ. Toward a Mechanism-Based Approach to Pain Diagnosis. *J Pain*.. **2016**;17(9):T50-T69.
6. Sneddon LU. Comparative physiology of nociception and pain. *Physiol*. **2018**;33(1):63-73.
7. Finnerup NB, Kuner R, Jensen TS. Neuropathic pain: From mechanisms to treatment. *Physiol Rev*. **2021**;101(1):259-301.
8. Martin, E. Pathophysiology of pain. *Pain Management in Older Adults: A Nursing Perspective*, **2018**, p. 7-29.
9. St. John Smith E. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *J Neurol*. **2018**;265(2):231-238. doi:10.1007/S00415-017-8641-6
10. Armstrong SA, Herr MJ. Physiology, Nociception. *StatPearls.* **2022**. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551562/
11. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. *J Clin Invest.* **2010**;120(11):3760-3772. doi:10.1172/JCI42843
12. Benarroch EE. Ion channels in nociceptors: recent developments. *Neurology*. 2015;84(11):1153-1164.
13. Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov*. **2014**;13(7):533-548.
14. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci*. **2009**;32:1-32.
15. Van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain*. **2014**;155(4):654-662.
16. Bates D, Carsten Schultheis B, Hanes MC, et al. A Comprehensive Algorithm for Management of Neuropathic Pain. *Pain Med*. **2019**;20:S2-S12.
17. Kankowski S, Grothe C, Haastert-Talini K. Neuropathic pain: Spotlighting anatomy, experimental models, mechanisms, and therapeutic aspects. *Eur J Neurosci*. 2021;54(2):4475-4496
18. St. John Smith E. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *J Neurol*. **2018**;265(2):231-238.
19. Smith SB, Su TP, eds. Sigma Receptors: Their Role in Disease and as Therapeutic Targets. **2017**;964.

20. Ji, RR., Xu, ZZ. & Gao, YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain.*Nat. Rev. Drug Discov.*, **2014**, 13, (7); 533-548.

21. Pressey JC, Mahadevan V, Woodin MA. KCC2 is a hub protein that balances excitation and inhibition. Neuronal Chloride Transporters in Health and Disease. **2020**:159-179.

22. Price TJ, Prescott SA. Inhibitory regulation of the pain gate and how its failure causes pathological pain. *Pain*. **2015**;156(5):789.

23. Escoto Rosales, M. J., Granados Soto V. *Estudio de la participación de la vía BDNF-TrkB-KCC2 en la hipersensibilidad nociceptiva inducida por estrés crónico en ratas hembra y macho*. Tesis de Maestría. Centro De Investigación Y De Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional. **2024**

24. Bendaña JE. Dolor neuropático: actualización en definiciones y su tratamiento farmacológico. *Rev Med Hondur*. **2020**;88(1):48-51.

25. Weng TY, Tsai SYA, Su TP. Roles of sigma-1 receptors on mitochondrial functions relevant to neurodegenerative diseases. *J Biomed Sci*. **2017**;24(1).

26. Szok D, Tajti J, Nyári A, Vécsei L. Therapeutic Approaches for Peripheral and Central Neuropathic Pain. *Pain. Behav Neurol*. **2019**

27. 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.

28. Manville RW, Abbott GW. Gabapentin is a potent activator of KCNQ3 and KCNQ5 potassium channels. *Mol Pharmacol*. **2018**;94(4):1155-1163.

29. Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. *Pain*. **2007**;132(3):237-251.

30. Takahashi Y, Nishimura T, Higuchi K, et al. Transport of Pregabalin Via L-Type Amino Acid Transporter 1 (SLC7A5) in Human Brain Capillary Endothelial Cell Line. *Pharm Res*. **2018**;35(12).

31. Chincholkar M. Analgesic mechanisms of gabapentinoids and effects in experimental pain models: a narrative review. *Br J Anaesth.* **2018**;120(6):1315-1334.

32. Bryson HM, Wilde MI. Amitriptyline. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in chronic pain states. *Drugs Aging*. **1996**;8(6):459-476

33. Pliego, L. Inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina en el manejo del dolor de la neuropatía diabética. *Neurol Arg*. **2010**;2(3): 180-188

34. Li L, Chen J, Li YQ. The Downregulation of Opioid Receptors and Neuropathic Pain. *Int J Mol Sci*. **2023**;24(6).

35. Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. **2005**;96(6):399-409.

36. Alcántara Montero A, Ibor Vidal PJ, Alonso Verdugo A, Trillo Calvo E. Update in the pharmacological treatment of neuropathic pain. *Semergen*. **2019**;45(8):535-545.

37. Vinces-Zambrano MI, Espinel-Zambrano PM, Pico-tagle AN, Del Castillo Pavón SE, Chávez De La Torre GE, Betancourth-Justicia ED. Tratamiento farmacológico para pacientes con diabetes. *Dom Cien*. **2019**;5(2477-8818):69-90.

38. Pickering G, Lucchini C. Topical Treatment of Localized Neuropathic Pain in the Elderly. *Drugs Aging*. **2020**;37(2):83-89.

39. Park JH, Park HJ. Botulinum Toxin for the Treatment of Neuropathic Pain. *Toxins (Basel).* **2017**;9(9).
40. Spagna A, Attal N. Botulinum toxin A and neuropathic pain: An update. *Toxicon*. **2023**;232:107208.
41. Crystal structure of botulinum neurotoxin type B at pH 4.0. **2004**.
42. Arena E, Dichiara M, Floresta G, et al. Novel Sigma-1 receptor antagonists: From opioids to small molecules: What is new? Future *Med Chem*. **2018**;10(2):231-256.
43. Malik M, Rangel-Barajas C, Sumien N, et al. The effects of sigma (σ1) receptor-selective ligands on muscarinic receptor antagonist-induced cognitive deficits in mice. *Br J Pharmacol*. **2015**;172(10):2519-2531.
44. Nguyen L, Lucke-Wold BP, Mookerjee SA, et al. Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci*. **2015**;127(1):17-29.
45. Ye N, Qin W, Tian S, et al. Small Molecules Selectively Targeting Sigma-1 Receptor for the Treatment of Neurological Diseases. *J Med Chem*. **2020**;63(24):15187-15217.
46. Ryskamp DA, Korban S, Zhemkov V, Kraskovskaya N, Bezprozvanny I. Neuronal sigma-1 receptors: Signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases. *Front Neurosci*. **2019**;13(AUG):862.
47. Ruiz-Cantero MC, González-Cano R, Tejada M, et al. Sigma-1 receptor: A drug target for the modulation of neuroimmune and neuroglial interactions during chronic pain. *Pharmacol Res*. **2021**;163:105339.
48. Tejada M, Montilla-García Á, González-Cano R, et al. Targeting immune-driven opioid analgesia by sigma-1 receptors: Opening the door to novel perspectives for the analgesic use of sigma-1 antagonists. *Pharmacol Res*. **2018**;131:224-230.
49. Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Garzón J. Fenfluramine Diminishes NMDA Receptor-Mediated Seizures via Its Mixed Activity at Serotonin 5HT2A and Type 1 Sigma Receptors. *Oncotarget*. **2018**;9(34):23373-23389.
50. Munguia-Galaviz FJ, Miranda-Diaz AG, Cardenas-Sosa MA, Echavarria R. Sigma-1 Receptor Signaling: In Search of New Therapeutic Alternatives for Cardiovascular and Renal Diseases. *Int J Mol Sci*. **2023**;24(3).
51. Fu C, Xiao Y, Zhou X, Sun Z. Insight into binding of endogenous neurosteroid ligands to the sigma-1 receptor. *Nat Commun*. **2024**;15(1):1-12.
52. Li J, Satyshur KA, Guo LW, Ruoho AE. Sphingoid Bases Regulate the Sigma-1 Receptor—Sphingosine and *N,N'*-Dimethylsphingosine Are Endogenous Agonists. Int *J Mol Sci*. **2023**;24(4):3103.
53. Glennon, R. A. Pharmacophore identification for sigma-1 (sigma1) receptor binding: application of the "deconstruction-reconstruction-elaboration" approach. *Mini Rev Med Chem.* **2005**;5(10):927-940.
54. Déciga-Campos M, Melo-Hernández LA, Torres-Gómez H, et al. Design and synthesis of N (benzylpiperidinyl) 4 fluorobenzamide: A haloperidol analog that reduces neuropathic nociception via σ1 receptor antagonism. *Life Sci*. **2020**;245.
55. Schmidt HR, Betz RM, Dror RO, Kruse AC. Structural basis for σ1 receptor ligand recognition. *Nat Struct Mol Biol*. **2018**;25(10):981-987.

56. Castany S, Gris G, Vela JM, Verdú E, Boadas-Vaello P. Critical role of sigma-1 receptors in central neuropathic pain-related behaviours after mild spinal cord injury in mice. *Sci Rep.* **2018**; 8(1):3873

57. Entrena, J. M., Cobos, E. J., Nieto, F. R., Cendán, C. M., Gris, G., Del Pozo, E., et al. Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: Studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice. *Pain*, **2009**;143(3): 252–261

58. Cendán, C. M., Pujalte, J. M., Portillo-Salido, E., Montoliu, L., & Baeyens, J. M. Formalin-induced pain is reduced in σ1 receptor knockout mice*. Eur J Pharmacol.* **2005**; *511(1), 73–74.*

59. Gómez-Soler M, Fernández-Dueñas V, Portillo-Salido E, et al. Predicting the antinociceptive efficacy of σ1 receptor ligands by a novel receptor fluorescence resonance energy transfer (FRET) based biosensor. *J Med Chem*. **2014**;57(1):238-242.

60. Katz JL, Su TP, Hiranita T, et al. A role for sigma receptors in stimulant self administration and addiction. *Pharmaceuticals*. **2011**;4(6):880-914.

61. Espinosa-Juárez JV, Jaramillo-Morales OA, López-Muñoz FJ. Haloperidol Decreases Hyperalgesia and Allodynia Induced by Chronic Constriction Injury. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **2017**;121(6):471-479.

62. López-Muñoz F, Alamo C. The consolidation of neuroleptic therapy: Janssen, the discovery of haloperidol and its introduction into clinical practice. *Brain Res Bull*. **2009**;79(2):130-141.

63. Navarrete-Vázquez G, Austrich-Olivares A, Godínez-Chaparro B, et al. Discovery of 2-(3,4-dichlorophenoxy)-N-(2-morpholin-4-ylethyl)acetamide: A selective σ1 receptor ligand with antinociceptive effect. *Biomed Pharmacother*. **2016**;79:284-293.

64. Espinosa-Juárez JV, Jaramillo-Morales OA, Navarrete-Vázquez G, Melo-Hernández LA, Déciga-Campos M, López-Muñoz FJ. N-(2-morpholin-4-yl-ethyl)-2-(1naphthyloxy)acetamide inhibits the chronic constriction injury-generated hyperalgesia via the antagonism of sigma-1 receptors. *Eur J Pharmacol*. **2017**;812:1-8.

65. Melo-Hernandez L. Síntesis y evaluación del efecto antinociceptivo de benzamidas piperidínicas y morfolínicas.Tesis de Maestría. **2016**.

66. Ventura-Martínez, R., Ángeles-López, G. E., González-Ugalde, D., Domínguez-Páez, T., Navarrete-Vázquez, G., Jaimez, R., & Déciga-Campos, M. Antinociceptive effect of LMH-2, a new sigma-1 receptor antagonist analog of haloperidol, on the neuropathic pain of diabetic mice. *Biomed Pharmacother*, **2024.** 174, 116524.

67. Romero L, Zamanillo D, Nadal X, et al. Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *Br J Pharmacol*. **2012**;166(8):2289-2306.

68. Chiodi D, Ishihara Y. "Magic Chloro": Profound Effects of the Chlorine Atom in Drug Discovery. *J Med Chem*. **2023**;66(8):5305-5331.

69. Gillis EP, Eastman KJ, Hill MD, Donnelly DJ, Meanwell NA. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J Med Chem*. **2015**;58(21):8315-8359.

70. Kumari S, Carmona AV, Tiwari AK, Trippier PC. Amide Bond Bioisosteres: Strategies, Synthesis, and Successes. *J Med Chem*. **2020**;63(21):12290-12358.

71. Gu Y, Yu Z, Wang Y, et al. admetSAR3.0: a comprehensive platform for exploration, prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Nucleic Acids Res*. **2024**;52(W1):W432-W438.
72. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. **2017**;7(1):1-13.
73. Fu L, Shi S, Yi J, et al. ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. *Nucleic Acids Res*. *2024*;52(W1):W422-W431.
74. Swanson K, Walther P, Leitz J, et al. ADMET-AI: a machine learning ADMET platform for evaluation of large-scale chemical libraries. *Bioinformatics*. **2024**;40(7):btae416.
75. Wishart DS, Tian S, Allen D, et al. BioTransformer 3.0—a web server for accurately predicting metabolic transformation products. Nucleic Acids Res. 2022;50(W1):W115-W123. Sander T, Freyss J, Von Korff M, Rufener C. DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J Chem Inf Model*. **2015**;55(2):460-473.
76. Sander T, Freyss J, Von Korff M, Rufener C. DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. J Chem Inf Model. **2015**;55(2):460-473.
77. ACD/ToxSuite versión 15.0, Advanced Chemistry Development Inc., Toront ON, Canada, www.acdlabs.com, **2015**
78. Lomuscio, M. C., Corriero, N., Nanna, V., Piccinno, A., Saviano, M., Lanzilotti, R., ... & Mangiatordi, G. F. (2025). SIGMAP: an explainable artificial intelligence tool for SIGMA-1 receptor affinity prediction. *RSC Med. Chem. **2024**. 16, 835-848.*
79. Torres PHM, Sodero ACR, Jofily P, Silva-Jr FP. Key topics in molecular docking for drug design. *Int J Mol Sci*. **2019**;20(18):4574.
80. Lin X, Li X, Lin X. A review on applications of computational methods in drug screening and design. Molecules. **2020**;25(6):1375.
81. Pinzi L, Rastelli G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4331.
82. Hasebein, P., Frehland, B., Lehmkuhl, K., Fröhlich, R., Schepmann, D., & Wünsch, B. Synthesis and pharmacological evaluation of like-and unlike-configured tetrahydro-2-benzazepines with the α-substituted benzyl moiety in the 5-position. *Org. Biomol. Chem*, **2014**;12(29): 5407-5426.
83. Ho Kim S, Mo Chung J. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat.*Pain*. **1992**;50(3):355-363
84. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. **1994**;53(1):55-63.
85. Di L, Kerns E. Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization. Published online January 13, **2016**:1-560.
86. Perry M, Sanguinetti M, Mitcheson J. Revealing the structural basis of action of hERG potassium channel activators and blockers. *J Physiol*. **2010**;588(Pt 17):3157-3167.
87. Garrido A, Lepailleur A, Mignani SM, Dallemagne P, Rochais C. hERG toxicity assessment: Useful guidelines for drug design. *Eur J Med Chem*. **2020**;195:112290.

88. Schmidt HR, Zheng S, Gurpinar E, Koehl A, Manglik A, Kruse AC. Crystal structure of the human σ1 receptor. *Nature*. **2016**;532(7600):527-530.

89. Domínguez-Mendoza EA, Galván-Ciprés Y, Martínez-Miranda J, et al. Design, Synthesis, and In Silico Multitarget Pharmacological Simulations of Acid Bioisosteres with a Validated In Vivo Antihyperglycemic Effect. *Molecules*. **2021**;26(4):799.

90. Ferrando SJ, Eisendrath SJ. Adverse neuropsychiatric effects of dopamine antagonist medications. Misdiagnosis in the medical setting. *Psychosomatics*. **1991**;32(4):426-432.

91. Fan L, Tan L, Chen Z, et al. Haloperidol bound D_2 dopamine receptor structure inspired the discovery of subtype selective ligands. *Nat Commun*. **2020**;11(1):1074.

92. Asai, T., Adachi, N., Moriya, T., Oki, H., Maru, T., Kawasaki, M.,and Murata, T Cryo-EM structure of K+-bound hERG channel complexed with the blocker astemizole.*Structure*, **2021.** *29*(3), 203-212.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Wendy Yasmin Arratia Damian

Título de la tesis: "Diseño, síntesis y bioevaluación de *N*-acil-4-aminobencilpiperidinas como ligandos del receptor sigma-1"

Grado a obtener:

__X__ Maestría en Farmacia
____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Samuel Enoch Estrada Soto**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

__X__ Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

12 de mayo de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO | Fecha:2025-05-12 14:14:24 | FIRMANTE

VlNXaSpcSA/lO65taolTr4qrmnuJZaWOvdPWxTVGPKvRrf2lvIOm9UDpR3GRf37AHJb3Iru0DwkgKOYBGScW7gkSpM7f9spoDZzMiEs7K+q1dVV85xCMt7eee34uZ3U43Ga8uwNiX2zoFkRXs0Pu7XtGWNMbc690qtDzOTTDM23w6+n3fmmZRIXECj5xRFOosu+A5RCBlOxsXnecRZ0ulG7+O13Vt7/wxZh5TgAHNkLaO6nvw2Ks98CRC5soBl2sFYMCb/vozmGIIIxCTn5l+lAXHW2CHZmYAtbGoVx7btQy6l6wn0R6vu19+eFH/ji/WvREVXmfNjbIK2UPtlKlzA==

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

Tv8CdMR2k

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/AE1Cnn7LcIxuhTH1A2eKcxitGizKVyS1

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Wendy Yasmin Arratia Damian

Título de la tesis: "Diseño, síntesis y bioevaluación de *N*-acil-4-aminobencilpiperidinas como ligandos del receptor sigma-1"

Grado a obtener:

X Maestría en Farmacia
____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Judith González Christen**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dra Judith González Christen

12 de mayo de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2025-05-12 12:01:59 | FIRMANTE

EYO4mfWcL1U44/MRNTw6E8ipqdYAO0ONNLrW6gk+iS7nXNhULI0ELLEoNMZvPSQWHSLj2NamNbOO9psDilLO6jNXoRI75gkQb90023L0840b9LcuriPgewbRJnxmIl9QovGsd
Sq5c6P1zaa86qBBmLVMV1H66++88v7VpPLJ3v/HWvzB+rZIkgtKCMs0EK8yRvtbFMoc0NE2TcPuYyiCpKeQNNC8c2sAhQ/SjVXLq2c/XiSXGDQyFobqZcQAipLm/QSbRnakRsE
NbILARAGkvyZhM1MbLr4Cu3/v5oTz4wp9nLYe4ipR0Wy1kydw/at6lGbtat2/PDXc//7BgcbUTA==

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

PIZrwu8oA

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JkA8m8gUQYxAY7vMIY7Ue0zeD47czuGM

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Wendy Yasmin Arratia Damian

Título de la tesis: "Diseño, síntesis y bioevaluación de *N*-acil-4-aminobencilpiperidinas como ligandos del receptor sigma-1"

Grado a obtener:

X Maestría en Farmacia
____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Myrna Déciga Campos**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dra. Myrna Déciga Campos

12 de mayo de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

MYRNA DECIGA CAMPOS | Fecha:2025-05-30 13:41:19 | FIRMANTE

VRjBxuC03RrI9/BE15fnu4llK9BxT5TgKSw4cXpoZ2veOauwrQgtSfTphZvOHURLJRfMkg6j1ehlV9uPdjCLDj/R8LGJIcE57q1/CUzor+TPDF+4JU5AxriHd2RPnblxaO+Hsr6fx9Tun73a70FFJLkG7ZO3YqIda5+Cgd1fyQTFk2rz8sY5yYjzrP5ljzMAXtBDt7PvsWiZVNRRC9BiQXZXTST76jLgoZXsaF/ItRhjA8/YbsxErYYxS14vGixNNFCg2EWWAir5nD9XCyLH7376gTDMNC5BXL5JaF5mBnf321jfoSbdLD8sObhFBX0ohRDFgFrrF/MXY9szA4Ee2w==

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

Bv5FgwpXi

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EULStHL8zaRfA96s57qTAZoxeB3QUIcU

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Wendy Yasmin Arratia Damian

Título de la tesis: "Diseño, síntesis y bioevaluación de *N*-acil-4-aminobencilpiperidinas como ligandos del receptor sigma-1"

Grado a obtener:

__X__ Maestría en Farmacia
____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Juan Gabriel Navarrete Vazquez**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

__X__ Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dr. Juan Gabriel Navarrete Vazquez

12 de mayo de 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2025-05-12 18:02:20 | FIRMANTE

gAX3HtjSx9mBoinxwEefldbrKRCGuRhpV7KVfsTxJGs8Y6deqPzB2yEOfDV7ladmlOnayDpr39MhVG3bQsEwT0DgWEmIYrKVh5txaQgNHDZxDI6CaeVz/eoTgiSB/B+oVRJn2ih4c4KQXGgujtCCNNknpWrjh0ZU/nPsoy+L3i8wK0SW/NTnJ52D9AjiJJIa5Msybo8ZSR0Y0kbu0Hrbw0Lrz+PRsamjyikRnpd6c3imj+xf+T08MSC9m+azMX0TXEDkO0JvzPJXHydbslA1Qwn16v/LvCAoGypJncG6nN4XXdvT03GbihrloOQZFJ6DVhetghkoCheISotbJHj/WA==

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

z3sMCJUaT

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/icLtT9bGR2umocuLJhbZ0dxVUKr8mkYF

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia

XVOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Wendy Yasmin Arratia Damian

Título de la tesis: "Diseño, síntesis y bioevaluación de *N*-acil-4-aminobencilpiperidinas como ligandos del receptor sigma-1"

Grado a obtener:

X Maestría en Farmacia
____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Yoshajandith Aguirre Vidal**

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

12 de mayo de 2025

Dra. Yoshajandith Aguirre Vidal — Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

YOSHAJANDITH AGUIRRE VIDAL | Fecha:2025-05-29 12:04:51 | FIRMANTE

CEubIgt0+bpgPqN/dAQgNOGTwJoWIEMGviFzhTSaUwkAmT21JKsXNlV4TS5oIPPmlc6X4KuaXPl5/OkqLBQZu6uaKB+vLhWsl4yyJZin9+rysyA02ncVGgwdnpw3bL3ec/t2RMkd0uhyuOabBYyLQXTbbECmvVNRn0opJyS2x8kkEEWRfCLN0yMr8G4Tx/W7PWWsD5ir66NZiJkrWhgMz6ZKThlTAM07rVMxudNUJWCIXphXk69hdMAMohzf+dPPDNGAQjkeOWNMtAvrq1e+z44V9e68fe+budrLmJtK7ZGi/8LWvb23Ikv0C7rcgBjCcfJvS2BZZLQcdBp4jAPv/g==

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

RJBo0i3c1

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ZVERozpILU8nz8REYZSFzAW3ia2bLEaz