



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Diseño molecular y obtención de compuestos  
multifuncionales para el tratamiento experimental  
de la diabetes tipo II**

Tesis que presenta

**Ana Teresa Rodríguez Luévano**

Para obtener el grado de

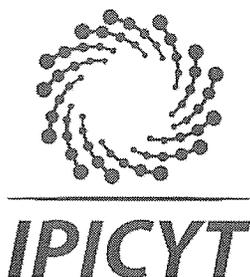
**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Directores de la Tesis:

**Dr. Carlos Barajas López<sup>†</sup>**

**Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa**

San Luis Potosí, S.L.P. 8 de Julio de 2019



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “*Diseño molecular y obtención de compuestos multifuncionales para el tratamiento experimental de la diabetes tipo II*” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ana Teresa Rodríguez Luévano** y aprobada el ocho de julio del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

**Dr. Carlos Barajas López**  
Codirector de la tesis

---

**Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa**  
Codirector de la tesis

---

**Dra. Martha Leticia Santos Martínez**  
Miembro del Comité Tutorial

---

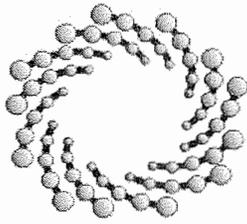
**Dr. Braulio Gutiérrez Medina**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. y en el Laboratorio de Microbiología de Productos Naturales del Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas bajo la dirección Dr. Carlos Barajas López<sup>†</sup>.y el Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa. El trabajo fue financiado por proyecto de Atención a Problemas Nacionales 2001/convocatoria 2016.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. de registro 636061 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 190 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 8 días del mes de julio del año 2019, se reunió a las 09:10 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Martha Leticia Santos Martínez</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Braulio Gutiérrez Medina</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Ana Teresa Rodríguez Luévano**

sobre la Tesis intitulada:

*Diseño molecular y obtención de compuestos multifuncionales para el tratamiento experimental de la diabetes tipo II*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Carlos Barajas López**  
**Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa**

El Jurado, después de deliberar, determinó

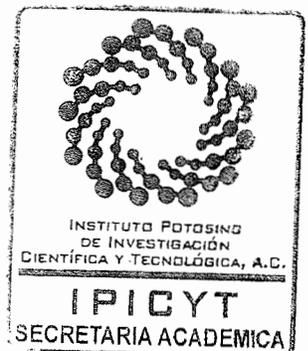
**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 11:05 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 8 días del mes de julio de 2019.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## **Dedicatorias**

**A Dios** porque 'tanto si procede de un laboratorio científico o de la revelación, toda verdad emana de él' (Russell M. Nelson) y porqué me permitió coincidir en este momento y lugar para continuar con mi progreso personal y profesional.

**A mi familia** que siempre ha estado para apoyarme y creer en mí. En especial a mi madre, porque es mi ejemplo de perseverancia para alcanzar sueños y metas sin importar las circunstancias en las que esté.

**A todos aquellos** que han estado en este camino y han contribuido a este proyecto, con sus enseñanzas, con su apoyo y su cariño. Gracias.

## Agradecimientos

Al **Dr. Carlos Barajas López<sup>†</sup>** director de esta tesis, por creer en este proyecto y brindarme su apoyo para la realización del mismo.

Al **Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa** co-director de tesis, por las ideas, proyectos y esfuerzos previos para la realización de este trabajo, por la confianza y apoyo que me ha brindado.

Al **Dr. Julio C. Almanza Pérez**, del Laboratorio de Farmacología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, por permitirme realizar la estancia al realizar algunos experimentos, por su mentoría y por su amistad.

A la **Dra. Leticia Santos Martínez** y al **Dr. Braulio Gutiérrez Medina** por formar parte de mi Comité Tutoral y por su mentoría en la realización de este trabajo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada durante la realización de la maestría y al **Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.** por permitirme alcanzar una de mis metas al ser parte de la comunidad de estudiantes de maestría.

A los **investigadores de la División de Biología Molecular** del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. por sus enseñanzas e instrucción durante estos dos años.

A los investigadores, compañeros y amigos del **Consortio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas**, por su ayuda, su amistad y por hacer amena mi estancia.

A la **Tec. Rosa Espinosa Luna** del Laboratorio de Neurobiología del IPICYT, A.C., gracias por tu apoyo, por estar en momentos difíciles y el gran cariño incondicional que tienes para todos los del grupo.

Al **M. en B.E. Abraham Giacoman Martínez** y a la **Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera**, del Laboratorio de Farmacología de la UAM-I, por su paciencia al

enseñarme las técnicas de cultivo celular, por su ayuda en el laboratorio, y por su amistad.

A la **Dra. María Elizabeth Miranda Pérez** de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Lerma, por capacitarme para realizar la cuantificación de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Al **M. en C. Roberto Lazzarini Lechuga** del Laboratorio Divisional de Microscopia Confocal en UAM-I, por su ayuda con el uso del microscopio confocal.

Al **Dr. Fausto Sánchez Muñoz** y al **M. en C. Adrián Hernández Díaz Couder** del Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, por su apoyo al permitirme utilizar el cuarto de cultivo celular.

A **Jacobo Albores** y **Samantha Huerta** de la Academia para la Creación de Empresas, por permitirme tener un lugar a donde llegar cada vez que fui a la Ciudad de México, y por todas las enseñanzas que recibí de ustedes que me animaron a cumplir mis sueños y metas.

A **mis compañeros de generación**, reinitos muchas gracias por sus enseñanzas, su cariño y por las fiestas que compartimos festejando este camino llamado vida.

A mis compañeros y amigos del **Laboratorio de Farmacología** de la UAM-I, Iván, Erandi, Luz, Wendy, Betty, Jaquie, los doctores profesores, por su apoyo, por enseñarme a andar en Iztapalapa y sobre todo por su amistad.

A **mis amigos de la ACE**, Ray, Dave, Deira, Jaquie, Victor, Gio, Lalo, Montse, Anita, por su amistad y apoyo.

A **Javi** por tu amistad, por tus consejos, por siempre estar ahí cuando algo no anda bien, también por celebrar conmigo nuestros triunfos. ¡Gracias por tu amistad!

A **las reinas**, gracias por su amistad y por todos los momentos que hemos disfrutado juntas.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Lista de esquemas	xii
Abreviaturas	xiii
Resumen	xvi
Abstract	xvii
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Materiales y Métodos</b>	<b>4</b>
2.1 Síntesis química	4
2.1.1 Síntesis de (4-nitrofenoxi) acetato de etilo (7)	4
2.1.2 Síntesis de (4-aminofenoxi) acetato de etilo (6)	5
2.1.3 Síntesis de 2-[4-(2-cloroacetamido) fenoxi] acetato de etilo (5)	5
2.1.4 Obtención de paracetamol	6
2.1.5 Síntesis de {4-[2-(4-acetamidofenoxi)acetamido]fenoxi} acetato de etilo (LAT-1')	7
2.1.6 Síntesis de ácido {4-[2-(4-acetamidofenoxi)acetamido]fenoxi} acético (LAT-1)	8
2.1.7 Síntesis de {4-[2-(4-acetilfenoxi)acetamido]fenoxi} acetato de etilo (LAT-2')	9
2.1.8 Síntesis de ácido {4-[2-(4-acetilfenoxi)acetamido]fenoxi} acético (LAT-2)	10
2.1.9 Purificación de los compuestos sintetizados	11
2.2+ Ensayos <i>in vitro</i>	11
2.2.1 Cultivo de células de la línea 3T3-L1	11
2.2.2 Cultivo de células de la línea RIN-m5F	12
2.2.3 Evaluación <i>in vitro</i> sobre la expresión de PPAR $\gamma$ , GLUT4 y GPR40	13
2.2.4 Cuantificación de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	14
2.2.5 Cuantificación de la secreción de insulina por el método de ELISA	15
2.3 Ensayos <i>in silico</i>	15
2.3.1 Acoplamiento molecular con receptores PPAR $\gamma$ y GPR40	15
2.3.2 Análisis de consenso farmacológico	16
2.4 Análisis estadístico	17
<b>3. Resultados</b>	<b>18</b>
3.1 Síntesis química	18
3.2 Ensayos <i>in vitro</i>	19

3.2.1 Prueba de funcionalidad celular por reducción de MTT	19
3.2.2 Evaluación <i>in vitro</i> sobre la expresión de PPAR $\gamma$ , GLUT4 y GPR40	20
3.2.3 Cuantificación de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	21
3.2.4 Cuantificación de la secreción de insulina por el método de ELISA	22
<b>3.3 Ensayos <i>in silico</i></b>	
3.3.1 Acoplamiento molecular con receptores PPAR $\gamma$ y GPR40	23
3.3.2 Análisis de consenso farmacológico	24
<b>4. Conclusiones</b>	27
<b>5. Referencias</b>	28

## Lista de tablas

Tabla 1. Propiedades ADMET calculadas para los compuestos LAT-1 y LAT-2.	25
Tabla 2. Regla de Lipinski aplicada a los compuestos LAT-1 y LAT-2.	26
Tabla 3. Predicción del espectro de actividad biológica de los compuestos sintetizados.	26

## Lista de figuras

Figura 1. Grupos farmacofóricos de agonistas de los receptores GPR40 y PPAR $\gamma$ .	2
Figura 2. Cultivo de la línea celular 3T3-L1.	12
Figura 3. Cultivo de la línea celular RIN-m5F.	12
Figura 4. Prueba de funcionalidad celular por reducción de MTT en células 3T3-L1.	19
Figura 5. Prueba de funcionalidad celular por reducción de MTT en células RIN-m5F.	20
Figura 6. Efecto de los compuestos LAT-1', LAT-1, LAT-2', LAT-2, pioglitazona y glibenclamida sobre los niveles de expresión de ARNm de los genes de interés.	21
Figura 7. Efecto de los compuestos LAT-1 (1 $\mu$ M), LAT-2 (1 $\mu$ M) y glibenclamida (400 $\mu$ M) en la $[Ca^{2+}]_i$ .	22
Figura 8. Efecto de los compuestos LAT-1 (1 $\mu$ M), LAT-2 (1 $\mu$ M) y glibenclamida (400 $\mu$ M) en la liberación de insulina.	23
Figura 9. Acoplamiento molecular del compuesto LAT-1 en PPAR $\gamma$ y GPR40.	26

## Lista de esquemas

Esquema 1. Síntesis de (4-nitrofenoxi)acetato de etilo.	4
Esquema 2. Síntesis de (4-aminofenoxi)acetato de etilo.	5
Esquema 3. Síntesis de 2-[a-(2-cloroacetamido)fenoxi]acetato de etilo.	6
Esquema 4. Síntesis del compuesto LAT-1'.	7
Esquema 5. Síntesis del compuesto LAT-1.	8
Esquema 6. Síntesis del compuesto LAT-2'.	9
Esquema 7. Síntesis del compuesto LAT-2.	11
Esquema 8. Síntesis de derivados de ácido fenoxiacético.	19

## Abreviaturas

<b>μg.</b>	Microgramo(s)
<b>μL.</b>	Microlitro(S)
<b>μM.</b>	Micromolar
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.</b>	Concentración de calcio intracelular
<b>°C.</b>	Grados Celsius
<b>Å.</b>	Ángstrom
<b>AGL.</b>	Ácidos grasos libres
<b>ARNm.</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATCC.</b>	American Tissue Culture
<b>BSA.</b>	Albúmina de suero Bovino
<b>c., q.</b>	Cuádruple
<b>C.</b>	Carbono
<b>CCF.</b>	Cromatografía de capa fina
<b>CDCl<sub>3</sub>.</b>	Cloroformo deuterado
<b>cDNA.</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.</b>	Diclorometano
<b>CO<sub>2</sub>.</b>	Dióxido de carbono
<b>Ct.</b>	Ciclo de umbral
<b>CYP450.</b>	Citocromo P450
<b>d.</b>	Doble
<b>dd.</b>	Doble del doble
<b>DM.</b>	Diabetes mellitus
<b>DM1.</b>	Diabetes mellitus tipo 1
<b>DM2.</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>DMEM.</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium
<b>DMSO.</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ELISA.</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>eq.</b>	Equivalente

<b>Et<sub>3</sub>N.</b>	Trietilamina
<b>EtOH.</b>	Etanol
<b>EUA.</b>	Estados Unidos de América
<b>F.</b>	Primer Foward
<b>FDI.</b>	Federación Internacional de Diabetes
<b>FMD.</b>	Federación Mexicana de Diabetes, A.C.
<b>g.</b>	Gramo(s)
<b>GLUT4.</b>	Transportador de glucosa tipo 4
<b>GPR40.</b>	Receptor acoplado a proteína G 40
<b>H.</b>	Hidrógeno
<b>h.</b>	Hora(s)
<b>H<sub>2</sub>O.</b>	Agua
<b>HBSS.</b>	Solución salina equilibrada de Hank
<b>HCl.</b>	Ácido clorhídrico
<b>hERG.</b>	Human Ether-á-go-go Related Gene
<b>Hz.</b>	Hercio o Hertz
<b>in<sup>2</sup>.</b>	Pulgada(s) cuadrada(s)
<b>J.</b>	Constante de acoplamiento
<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.</b>	Carbonato de Potasio
<b>kg.</b>	Kilogramo(s)
<b>KOH.</b>	Hidróxido de potasio
<b>lb.</b>	Libra(s)
<b>LogP.</b>	Coeficiente de partición
<b>Me<sub>4</sub>Si.</b>	Tetrametilsilano
<b>mg.</b>	Miligramo(s)
<b>MHz.</b>	Megahercio o megahertz
<b>min.</b>	Minuto(s)
<b>mL.</b>	Mililitro(s)
<b>mM.</b>	Milimolar
<b>MTT.</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltretazolio

<b>NIH.</b>	National Institutes of Health
<b>nm.</b>	Nanómetro(s)
<b>No.</b>	Número
<b>OD.</b>	Densidad óptica
<b>OECD.</b>	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
<b>PBS.</b>	Buffer fosfato salino
<b>Pd.</b>	Paladio
<b>Pf.</b>	Punto de fusión
<b>pg.</b>	Picogramo(s)
<b>PPAR<math>\gamma</math>.</b>	Receptor activado por el proliferador de peroxisoma gamma
<b>PPAR<math>\alpha</math>.</b>	Receptor activado por el proliferador de peroxisoma alfa
<b>PPAR<math>\beta/\delta</math>.</b>	Receptor activado por el proliferador de peroxisoma beta/delta
<b>PPARs.</b>	Receptores activados por el proliferados de peroximas
<b>ppm.</b>	Partes por millón
<b>R.</b>	Primer Reverse
<b>RMN.</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RMSD.</b>	Coefficiente de variación. Desviación de la raíz cuadrada media de las poblaciones atómicas
<b>RPMI 1640.</b>	Medio Roswell Park Memorial Institute 1640
<b>s.</b>	Sencilla
<b>SFB.</b>	Suero fetal bovino
<b>SiO<math>_2</math>.</b>	Óxido de silicio (IV)
<b>SNT.</b>	Suero de neonato de ternera
<b>t.</b>	Triple
<b>TPSA.</b>	Área de superficie polar topológica
<b>UV.</b>	Ultravioleta

## Resumen

### **Diseño molecular y obtención de compuesto multifuncionales para el tratamiento experimental de la diabetes tipo II**

La diabetes mellitus es una enfermedad multifactorial que resulta de defectos en la secreción y la acción de insulina. La prevalencia de esta enfermedad ha aumentado drásticamente en todo el mundo durante las últimas décadas. Se han propuesto dos blancos terapéuticos importantes para el tratamiento de la diabetes. Se diseñaron dos moléculas con actividad biológica sobre las dianas farmacológicas PPAR $\gamma$  y GPR40. La síntesis de los compuestos se llevó a cabo siguiendo una ruta sintética de múltiples pasos. Posteriormente, fueron evaluados en líneas celulares de adipocitos y células  $\beta$ -pancreáticas y se cuantificaron los niveles de expresión de ARNm de PPAR $\gamma$ , GLUT4 y GPR40 en cultivos celulares. El compuesto sintetizado LAT-1 mostró un aumento en la expresión del ARNm de PPAR $\gamma$ , incrementando casi cuatro veces el nivel de expresión con respecto al control, con una efectividad similar a la pioglitazona. Además, aumentó los niveles de expresión de GLUT4 (siete veces respecto al control y dos veces respecto a pioglitazona). Considerando la vía de señalización de PPAR $\gamma$  y los genes que regula, se puede inferir que el compuesto LAT-1 generó una acción agonista sobre el receptor PPAR $\gamma$ . Los compuestos sintetizados también fueron evaluados sobre el efecto de los niveles de expresión de GPR40. El compuesto LAT-1 mostró un aumento de tres veces en la expresión de ARNm de GPR40 con respecto al control. Finalmente, basado en los estudios farmacológicos, LAT-1 aumentó significativamente la expresión del ARNm de dos dianas terapéuticas, PPAR $\gamma$  y GPR40, por lo que este compuesto actúa como un agonista dual de PPAR $\gamma$  y GPR40. Concluimos que, LAT-1 puede ofrecer un mejor control de la glucemia que los medicamentos que se encuentran disponibles en la actualidad, ya que, 1) ayuda a disminuir la resistencia a la insulina y, 2) permite la secreción de insulina en su segunda fase, evitando la hipoglucemia que producen los medicamentos insulinoscretagogos.

**PALABRAS CLAVE.** Agonista dual, acoplamiento molecular, acción antidiabética.

## Abstract

### **Molecular design and synthesis of multitarget compounds for experimental type II diabetes treatment**

Diabetes mellitus is a multifactorial disease that results from defects in the secretion and action of insulin. The prevalence of this disease has increased dramatically worldwide during the last decades. Two important therapeutic targets have been included for the treatment of diabetes. Two molecules with biological activity were designed on the PPAR $\gamma$  and GPR40 drug targets. Synthesis of the compounds was done following a synthetic multi-step pathway. Subsequently, they were evaluated in cell lines of adipocytes and  $\beta$ -pancreatic cells and the mRNA expression levels of PPAR $\gamma$ , GLUT4 and GPR40 were quantified in cell cultures. The synthesized compound LAT-1 showed an increase in the expression of PPAR $\gamma$  mRNA, increasing almost four times the expression level with respect to the control with response similar to pioglitazone. In addition, it increased GLUT4 expression levels (seven times compared to the control and two times with respect to pioglitazone). Considering the signaling pathway of PPAR $\gamma$  and the genes it regulates, it can be inferred the compound LAT-1 generated an agonist action on PPAR $\gamma$ . Synthesized compounds were also evaluated on the effect of GPR40 expression levels. Compound LAT-1 showed an expression of the GPR40 mRNA, increasing three times with respect to the control. Finally, based on pharmacological studies, LAT-1 significantly increased mRNA expression of two therapeutic targets, PPAR $\gamma$  and GPR40, so this compound acts as a dual agonist of PPAR $\gamma$  and GPR40, which may offer better glycemic control than drugs currently available, because, 1) it decreases the insulin resistance and 2) it allows the secretion of insulin in its second phase, avoiding the hypoglycemia produced by the drugs.

KEY WORDS. Dual agonist, molecular docking, antidiabetic action.

# 1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad caracterizada por hiperglucemia crónica, con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas (Rincón y Carvajal, 2016). De acuerdo con datos obtenidos por la Federación Internacional de Diabetes (FDI), en 2017 se reportaron 425 millones de personas afectadas por diabetes a nivel global y se estima que para el 2045 serán 629 millones. En México, tiene una prevalencia del 15.8% de la población y es la segunda causa de muerte (OECD, 2017; FMD, 2018).

En la diabetes, la hiperglucemia puede ser resultado de una deficiencia en la secreción de insulina, una resistencia a la acción de la insulina o una combinación de ambas características (López-Stewart, 2009). La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) se asocia con la falta de insulina (total o parcial); que ocurre debido a la destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas mediada por un mecanismo autoinmunitario (Li, Huang y Gao, 2017). Por otro lado, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está relacionada con la resistencia a la insulina y la secreción desequilibrada de esta hormona, la apoptosis de células  $\beta$ -pancreáticas y el aumento de la producción de glucosa hepática (Rincón y Carvajal, 2016).

Para el control de la DM2 existen dos tipos de tratamiento: 1) no farmacológico, que consiste en un cambio de estilo de vida, una alimentación saludable e incrementar la actividad física; 2) farmacológico, que implica el uso de fármacos para el control de la hiperglucemia (Flórez, 2014; Rincon y Carvajal, 2016). Este inicia con monoterapia y posteriormente continúa con la administración de una polifarmacia (uso con comitante de dos o más fármacos). Existen cinco grupos principales de fármacos para el tratamiento de la DM2: secretagogos de insulina, inhibidores de DPP-4, agonistas GPL-1, inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa y sensibilizadores a la insulina (Rodríguez-Rivera et al., 2017).

Unos de los blancos más atractivos para el tratamiento de la diabetes, son los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs), que son factores de transcripción activados por ligandos endógenos y son miembros de una

superfamilia de receptores nucleares. Existen tres isoformas PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ . Cada uno de estos receptores regula genes específicos de tejidos involucrados en diferentes procesos biológicos (Mansour, 2014; Derosa, Sahebkar y Maffioli, 2017).

En los adipocitos, hay una alta expresión de PPAR $\gamma$ , que al activarse mediante un ligando regula el metabolismo de carbohidratos y disminuye los niveles de lípidos en sangre (Gao et al., 2015; Hidalgo-Figueroa et al., 2017). El aumento de la expresión de PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo ayuda a reducir la resistencia a la insulina ya que aumenta la expresión del transportador de glucosa, GLUT4, el cual es responsable de la absorción de glucosa (Parimala et al., 2015). Por lo tanto, PPAR $\gamma$  es un blanco terapéutico como regulador de insulina para el tratamiento de la DM.

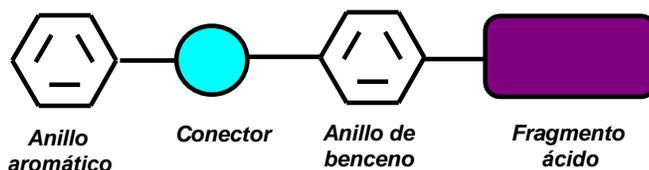
Otra de las características de la diabetes es la disminución de la secreción de insulina, por lo que se han estudiado blancos como el receptor acoplado a proteína G 40 (GPR40), que estimula la secreción de insulina mediante sus ligandos naturales que son los ácidos grasos libres (AGL) (Ghislain y Poitout, 2016; Chen, Li y Long, 2016). Este mecanismo presenta un bajo riesgo de hipoglucemia debido a que GPR40 tiene sus efectos sobre la segunda fase de la secreción de insulina (Burant, 2013).

El grupo farmacofórico para los agonistas de GPR40 consta de cuatro partes: un fragmento ácido, seguido de un anillo de benceno, un conector y en la parte final un anillo aromático. (Chen, Li y Long, 2016). Por otra parte, los agonistas de PPAR $\gamma$  tienen las siguientes características: un fragmento ácido, un anillo de benceno, un espaciador y al final un fragmento hidrofóbico (Figura 1) (Adeghate et al., 2011; Lewis et al., 2015).

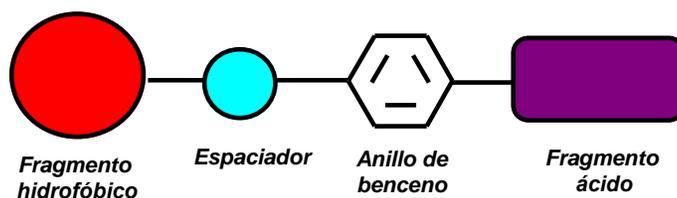
Por tanto, GPR40 y PPAR $\gamma$  comparten características químicas similares y se ha informado que algunos agonistas PPAR $\gamma$  activan GPR40 (Wang et al., 2015; Darwish et al., 2016; Nanjan et al., 2018), por lo que ambos receptores pueden

funcionar como una vía integrada de transducción de señales. Es por eso que el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de nuevas moléculas híbridas que posean un agonismo dual equilibrado en los receptores PPAR $\gamma$  y GPR40, al diseñar, sintetizar y seleccionar *in vitro* e *in silico*, una serie de dos compuestos derivados de ácidos fenoxiacéticos para el tratamiento experimental de la DM2.

### Grupo farmacofórico de agonistas GPR40



### Grupo farmacofórico de agonistas PPAR $\gamma$



**Figura 1.** Grupos farmacofóricos de agonistas de los receptores GPR40 y PPAR $\gamma$ .

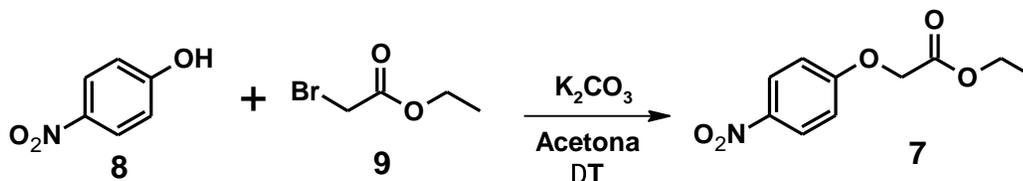
## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 SÍNTESIS QUÍMICA

Todos los materiales y reactivos de partida se obtuvieron comercialmente y se usaron sin purificación adicional. Las reacciones se monitorearon por cromatografía de capa fina (CCF) en placas precubiertas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (E. Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Para la elución se prepararon dos sistemas: (I) diclorometano-etanol (98:2); (II) cloroformo-etanol (98:2). El revelado se realizó con una lámpara de luz ultravioleta (UV) a 254 nm. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de punto de fusión automatizado Stuart SMP10 de Cole-Parmer. Los espectros de RMN se registraron en el aparato Bruker Avance III HD de RMN (<sup>1</sup>H 400 y 500 MHz y <sup>13</sup>C 100 y 125 MHz). Los desplazamientos químicos se reportan en ppm con relación al tetrametilsilano (Me<sub>4</sub>Si) en DMSO-d<sub>6</sub> o CDCl<sub>3</sub>; la unidad de J es Hz.

#### 2.1.1 Síntesis de (4-nitrofenoxi)acetato de etilo (7)

Una solución de p-nitrofenol (1 g, 0.0072 mol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.49 g, 0.0108 mol, 1.5 eq) se mezcló en acetona (30 mL). La mezcla se agitó durante 15 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió gota a gota bromoacetato de etilo (0.83 mL, 0.0075 mol, 1.05 eq). La mezcla se sometió a reflujo en y se controló por CCF con los sistemas de elución I y II y visualizado bajo lámpara de UV de 254 nm, hasta la conversión total de la materia prima (2.5 h) (Esquema 1). Al concluir la reacción, el disolvente se removió a presión reducida. Al producto obtenido, se le añadió agua fría (10 mL) y 10 gotas de acetona; esta mezcla se agitó durante 30 min. (Hidalgo-Figueroa et al., 2017). El precipitado resultante se filtró al vacío y se repitió el proceso anterior dos veces.



Esquema 1. Síntesis de (4-nitrofenoxi)acetato de etilo.

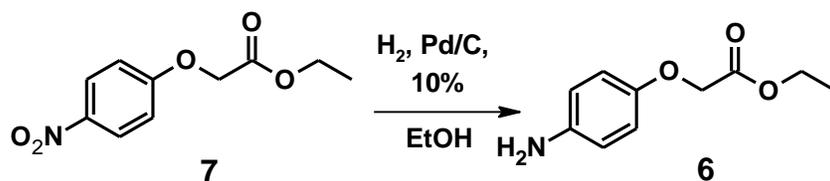
Se obtuvo un compuesto amarillo sólido y se dejó secar durante 24 h a temperatura ambiente. Se pulverizó en mortero para su almacenamiento. Punto de fusión (Pf) de 71.5-72.6°C, rendimiento 1.42 g (88%), peso molecular 225.2 g/mol (C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>).

RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.3 (t, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.29 (c, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.72 (s, 2H, H-2), 6.97 (dd, 2H, H-20, H-60, J = 7.1 Hz), 8.21 (d, 2H, H-30, H-50, J = 6.8 Hz) ppm.

RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.14 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 61.82 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 65.45 (C-2), 114.72 (C-20, C-60), 125.93 (C-30, C-50), 162.66 (C-1) ppm.

### 2.1.2 Síntesis de (4-aminofenoxi)acetato de etilo (6)

Para esta reacción, se utilizaron 2.5 g (0.0111 mol) del compuesto nitrado [(4-nitrofenoxi)acetato de etilo] y 0.18 g de Pd/C al 10% en 150 mL de etanol. Esta suspensión se redujo con hidrógeno a 4 lb/in<sup>2</sup> en un reactor de hidrogenación Parr (500 mL). Después de 10 minutos, la reacción consumió 32 lb/in<sup>2</sup> de hidrógeno (Esquema 2). Posteriormente, el filtrado se concentró a presión reducida hasta que hubo presencia de un líquido amarillo. Este líquido no se purificó porque se usó de inmediato para la siguiente reacción de acilación (Hidalgo-Figueroa, 2017).

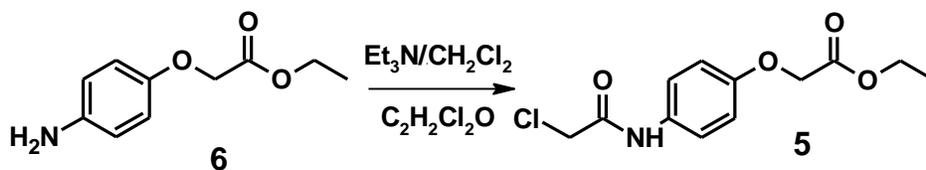


Esquema 2. Síntesis de (4-aminofenoxi) acetato de etilo.

### 2.1.3 Síntesis de 2-[4-(2-cloroacetamido) fenoxi]acetato de etilo (5)

La anilina obtenida de la reacción anterior (2.5 g, 0.0128 mol) y 2.14 mL de Et<sub>3</sub>N (0.0128 mol, 1.2 eq) se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL). La mezcla se enfrió con un baño de hielo. Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>O (1.04 mL, 0.0129 mol, 1.01 eq) gota a gota a la mezcla enfriada. Se retiró el baño de hielo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h (Esquema 3). La mezcla fue monitoreada cada hora por

CCF con el sistema de elución I y visualizado bajo lámpara de UV de 254 nm, hasta la conversión total de la materia prima (5 h). Al concluir la reacción, el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fue removido a presión reducida y al producto obtenido se añadieron 10 mL de agua fría y esta mezcla se agitó durante 20 min (Hidalgo-Figueroa, 2017). Se obtuvo un precipitado color blanco, el cual se filtró y se lavó con agua fría (3 x 10 mL) y después se dejó secar por 24 h y se pulverizó en mortero para su almacenamiento. Pf de 99.3-100.4°C, rendimiento 2.65 g (76%), peso molecular 271.7 g/mol (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>4</sub>).



**Esquema 3.** Síntesis de 2-[a-(2-cloroacetamido)fenoxi]acetato de etilo.

RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.29 (t, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.16 (s, 2H, H-20'), 4.26 (c, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.60 (s, 2H, H-2), 6.88 (d, 2H, H-20, H-60, J = 9.05 Hz), 7.45 (d, 2H, H-30, H-50, J = 8.95 Hz), 8.29 (s, 1H, NH) ppm.

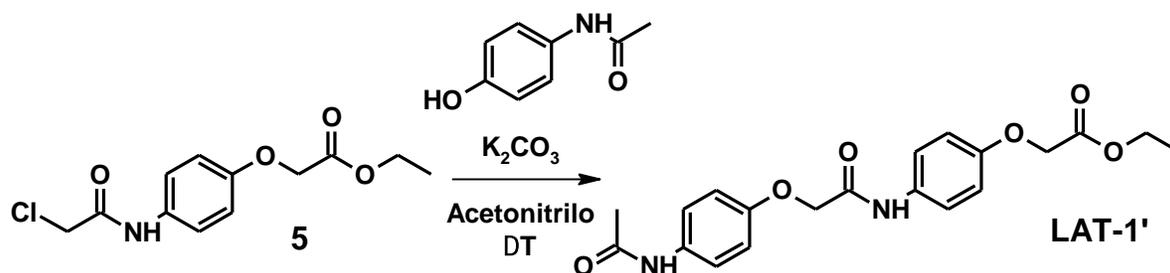
RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14.16 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 42.85 (C-20'), 61.45 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 65.66 (C-2), 115.13 (C-20, C-60), 121.95 (C-30, C-50), 130.75 (C-40), 155.14 (C-10), 163.80 (C-10'), 168.83 (C-1) ppm.

#### 2.1.4 Obtención de paracetamol

Diez tabletas comerciales (paracetamol, 500 mg, Lab Perrigo, GI) con lote 17G102 y fecha de caducidad junio 2019, fueron trituradas en mortero y el polvo fue disuelto en 20 mL de etanol (99.5%) durante 5 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se filtró al vacío y el líquido obtenido se sometió a presión reducida hasta obtener un sólido cristalino, el cual se dejó secar (4.7 g, 94%). El paracetamol fue monitoreado por CCF con el sistema de elución II y visualizado bajo lámpara de UV de 254 nm.

### 2.1.5 Síntesis de {4-[2-(4-acetamidofenoxy)acetamido]fenoxi} acetato de etilo (LAT-1')

Una solución de paracetamol (0.1685 g, 0.0011 mol, 1.01 eq) y  $K_2CO_3$  (0.2289 g, 0.0016 mol, 1.5 eq) se disolvió en acetonitrilo (30 mL). La mezcla se agitó durante 30 min. a temperatura ambiente y después se sometió a reflujo y se mantuvo en agitación por 30 minutos. Posteriormente se agregó, poco a poco, el compuesto acilado (5; 0.3 g, 0.0001 mol). La reacción se monitoreó por CCF con el sistema de elución I y visualizado bajo lámpara de UV de 254 nm, hasta la conversión total de la materia prima (17 h) (Esquema 4). Al finalizar la reacción, el acetonitrilo se retiró a presión reducida y al sólido obtenido se añadieron 5 mL de agua fría y esta mezcla se agitó durante 20 min. Posteriormente, se obtuvo un precipitado color blanco, el cual se filtró y se lavó con agua fría (3 x 5 mL) y después se dejó secar por 24 h y se pulverizó en mortero para su almacenamiento. Pf de 163-165°C, rendimiento 0.309 g (72%), peso molecular 386.4 g/mol ( $C_{20}H_{22}N_2O_6$ ).



Esquema 4. Síntesis del compuesto LAT-1'.

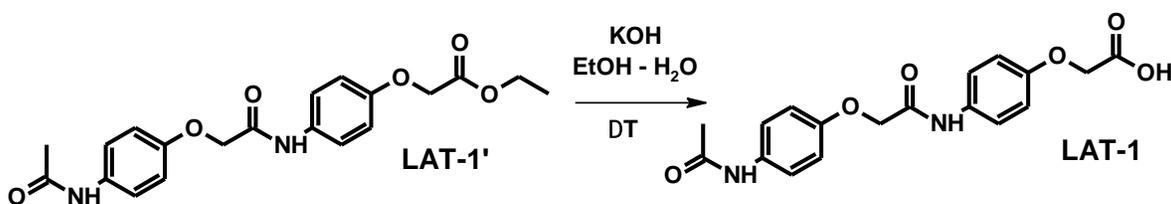
RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.2 (t, 3H, H-16, J = 8 Hz), 2.0 (s, 3H, H-14), 4.16 (q, 2H, H-15, J = 8 Hz), 4.60 (s, 2H, H-11), 4.70 (s, 2H, H-8), 6.89 (d, 2H, H-2, H-6, J = 5 Hz), 6.93 (d, 2H, H-2', H-6', J = 5 Hz), 7.49 (d, 2H, H-3, H-5, J = 5 Hz), 7.55 (d, 2H, H-3', H-5', J = 5 Hz), 9.88 (s, 1H, H-12), 9.95 (s, 1H, H-9) ppm.

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 14.05 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, C-16), 23.81 (O=C-CH, C-14), 60.6 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O, C-15), 65.0 (O-CH<sub>2</sub>-C=O, C-8), 67.50 (O-CH<sub>2</sub>-C=O, C-11), 114.37 (=CH-CH=, C-2, C-6), 114.76 (=CH-CH=, C-2', C-6'), 120.6 (=CH-CH=, C-3, C-5), 121.3 (=CH-CH=, C-3', C-5'), 132.17 (=C-N, C-4), 133.27 (=C-N, C-4'),

153.58 (=C-O, C-1), 153.94 (=C-O, C-1'), 166.12 (O=C-(CH<sub>3</sub>)N-H, C-10), 167.85 (O=C-(CH<sub>2</sub>)N-H, C-13), 170.73 (O=C-O-CH<sub>2</sub>, C-7) ppm.

### 2.1.6 Síntesis de ácido {4-[2-(4-acetamidofenoxi)acetamido]fenoxi} acético (LAT-1)

A una solución del compuesto 4 (0.2 g, 0.0005 mol) en una mezcla de H<sub>2</sub>O/EtOH (1:3) se agregaron 0.058 g de KOH (0.0010 mol, 2 eq) y se mantuvo en agitación. La reacción se controló por CCF con el sistema de elución I y se visualizó bajo lámpara de UV de 254 nm, hasta que se obtuvo una conversión completa de la materia prima (2.5 h). Posteriormente, la mezcla se acidificó con HCl (1%), agregándose gota a gota, hasta la obtención de un precipitado color blanco (Esquema 5), el cual se filtró al vacío y se dejó secar por 24 h y después se pulverizó en mortero para su almacenamiento. Rendimiento 0.138 g (74%), peso molecular 358.3 g/mol (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>).



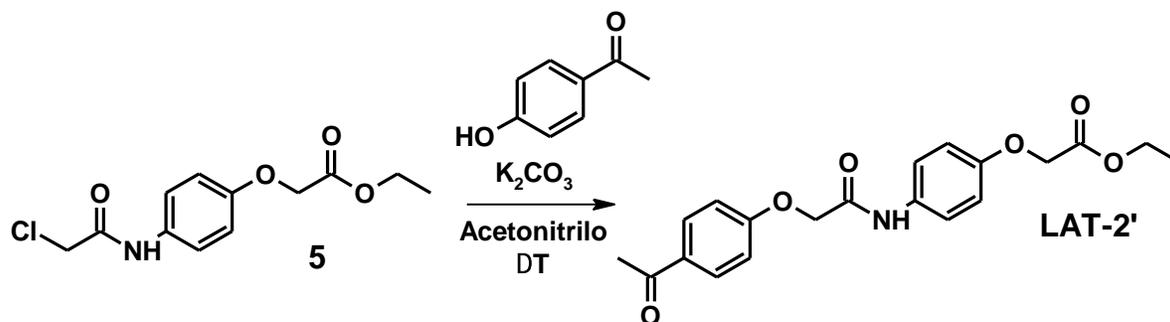
Esquema 5. Síntesis del compuesto LAT-1.

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 2.0 (s, 3H, H-14), 4.29 (s, 2H, H-8), 4.70 (s, 2H, H-11), 6.79 (d, 2H, H-2, H-6, J = 7 Hz), 6.91 (d, 2H, H-2', H-6', J = 7 Hz), 7.47 (d, 2H, H-3, H-5, J = 7 Hz), 7.49 (d, 2H, H-3', H-5', J = 7 Hz), 9.85 (s, 1H, NH-12), 9.95 (s, 1H, NH-9) ppm.

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 23.81 (O=C-CH<sub>3</sub>, C-14), 65.0 (O-CH<sub>2</sub>-C=O, C-8), 66.85 (O-CH<sub>2</sub>-C=O, C-11), 114.37 (=CH-CH=, C-2, C-6), 114.76 (=CH-CH=, C-2', C-6'), 120.48 (=CH-CH=, C-3, C-5), 121.23 (=CH-CH=, C-3', C-5'), 132.11 (=C-N, C-4), 133.17 (=C-N, C-4'), 153.58 (=C-O, C-1), 154.94 (=C-O, C-1'), 166.12 (O=C-(CH<sub>3</sub>)N-H, C-13), 167.85 (O=C-(CH<sub>2</sub>)N-H, C-10), 170.73 (O=C-O-CH<sub>2</sub>, C-7) ppm.

### 2.1.7 Síntesis de {4-[2-(4-acetilfenoxi)acetamido]fenoxi}acetato de etilo (LAT-2')

Una solución de 4-hidroxiacetofenona (0.1518 g, 0.0011 mol, 1.01 eq) y  $K_2CO_3$  (0.2288 g, 0.0016 mol, 1.5 eq) se disolvió en acetonitrilo (30 mL). La mezcla se agitó durante 30 min. a temperatura ambiente y después se sometió a reflujo y se mantuvo en agitación por 30 minutos. Posteriormente se agregó, poco a poco, el compuesto acilado (5; 0.3 g, 0.0001 mol). La reacción se monitoreó por CCF con el sistema de elución I y visualizado bajo lámpara de UV de 254 nm, hasta la conversión total de la materia prima (17 h) (Esquema 6). Al finalizar la reacción, el acetonitrilo se retiró a presión reducida y al sólido obtenido se añadieron 5 mL de agua fría y esta mezcla se agitó durante 20 min. Se obtuvo un precipitado color blanco, el cual se filtró y se lavó con agua fría (3 x 5 mL) y después se dejó secar por 24 h y se pulverizó en mortero para su almacenamiento. Rendimiento 0.305 g (74%), peso molecular 371.4 g/mol ( $C_{20}H_{21}NO_6$ ).



Esquema 6. Síntesis del compuesto LAT-2'.

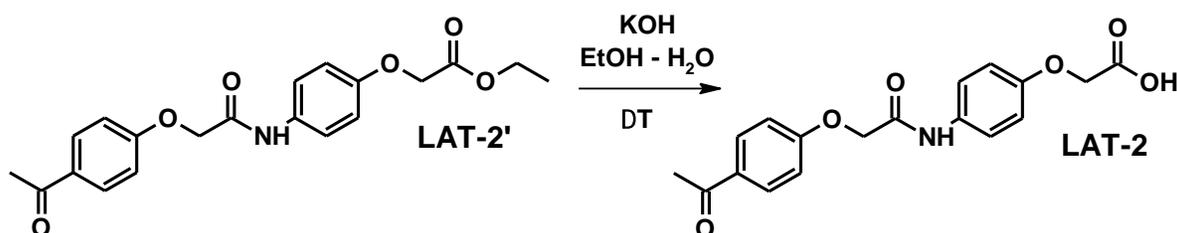
RMN  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1.21 (t, 3H, O- $CH_2$ - $CH_3$ , H-15, J = 8 Hz), 2.51 (s, 3H, O=C- $CH_3$ , H-13), 4.16 (q, 2H, O- $CH_2$ - $CH_3$ , H-14, J = 8 Hz), 4.73 (s, 2H, O- $CH_2$ -C=O, H-11), 4.78 (s, 2H, O- $CH_2$ -C=O, H-8), 6.90 (d, 2H, =CH-CH=, H-2, H-6, J = 9.08 Hz), 7.10 (d, 2H, =CH-CH=, H-2', H-6', J = 8.94 Hz), 7.52 (d, 2H, =CH-CH=, H-3, H-5, J = 9.07 Hz), 7.95 (d, 2H, =CH-CH=, H-3', H-5', J = 9.01 Hz), 10.1 (s, 1H, O=C-N-H, H-9) ppm.

RMN  $^{13}C$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 14.30 (O- $CH_2$ - $CH_3$ , C-15), 26.75 (O=C- $CH_3$ , C-13), 60.9 (O- $CH_2$ - $CH_3$ , C-14), 65.1 (O- $CH_2$ -C=O, C-8), 67.3 (O- $CH_2$ -C=O, C-11),

114.9 (=CH-CH=, C-2, C-6), 115.1 (=CH-CH=, C-2',C-6'), 121.6 (=CH-CH=, C-3, C-5), 130.7 (=CH-CH=, C-3', C-5'), 131.8 (=C-N, C-4), 154.1 (=C-O, C-1), 161.5 (=C-O, C-1'), 166.2 (O=C-O-H, C-7), 169.3 (O=C-N-H, C-10), 196.2 (CH<sub>3</sub>-C=O, C-12) ppm.

### 2.1.8 Síntesis de ácido {4-[2-(4-acetilfenoxi)acetamido]fenoxi}acético (LAT-2)

A una solución del compuesto 5 (0.2 g, 0.0005 mol) en una mezcla de H<sub>2</sub>O/EtOH (1:3) se agregaron 0.060 g de KOH (0.0010 mol, 2 eq) y se mantuvo en agitación. La reacción se controló por CCF con el sistema de elución I y se visualizó bajo lámpara de UV de 254 nm, hasta que se obtuvo una conversión completa de la materia prima (2.5 h). Posteriormente, la mezcla se acidificó con HCl (1%), agregándose gota a gota, hasta la obtención de un precipitado color blanco (Esquema 7), el cual se filtró al vacío y se dejó secar por 24 h y después se pulverizó en mortero para su almacenamiento. Rendimiento 0.106 g (57%), peso molecular 343.3 g/mol (C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub>).



Esquema 7. Síntesis del compuesto LAT-2.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO -d<sub>6</sub>) δ: 2.5 (s, 3H, O=C-CH<sub>3</sub>, H-13), 3.4 (b, 1H, O=C-O-H, H-7), 4.62 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-C=O, H-8), 4.77 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-C=O, H-11), 6.87 (d, 2H, =CH-CH=, H-2, H-6, J = 9.08 Hz), 7.08 (d, 2H, =CH-CH=, H-2', H-6', J = 8.94 Hz), 7.51 (d, 2H, =CH-CH=, H-3, H-5, J = 9.07 Hz), 7.93 (d, 2H, =CH-CH=, H-3', H-5', J = 9.01 Hz), 10.0 (s, 1H, O=C-N-H, NH-9) ppm.

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 26.52 (O=C-CH<sub>3</sub>, C-13), 64.7 (O-CH<sub>2</sub>-C=O, C-8), 67.1 (O-CH<sub>2</sub>-C=O, C-11), 114.6 (=CH-CH=, C-2, C-6), 114.6 (=CH-CH=, C-2', C-6'), 121.3 (=CH-CH=, C-3, C-5), 130.2 (=C-C=O, C-4') 130.5 (=CH-CH=, C-3', C-

5'), 131.8 (=C-N, C-4), 154.1 (=C-O, C-1), 161.7 (=C-O, C-1'), 165.6 (O=C-O-H, C-7), 170.3 (O=C-N-H, C-10), 196.4 (CH<sub>3</sub>-C=O, C-12) ppm.

### **2.1.9 Purificación de los compuestos sintetizados**

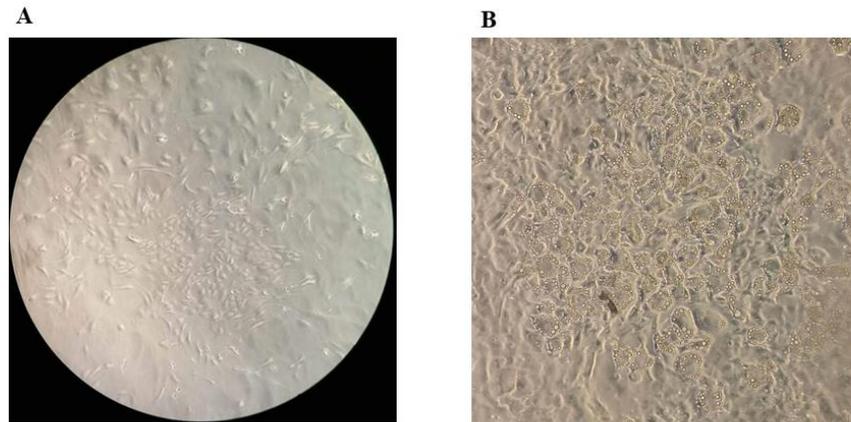
Se empaquetó una columna de cromatografía de adsorción con óxido de silicio (IV) (SiO<sub>2</sub>) y se utilizaron diferentes sistemas de elución para purificar los compuestos: 1) diclorometano-etanol (98:2); 2) diclorometano-etanol (96:4); 3) diclorometano-etanol (90:10); 4) diclorometano-etanol (70:30); 5) diclorometano-acetato de etilo (90:10); 6) etanol (100%). Cada 15 mL de la fase móvil, se concentraron a presión reducida y se tomó una muestra para monitorear el proceso por CCF con el sistema de elución correspondiente y se visualizó bajo lámpara de UV a 254 nm, hasta que se obtuvo el compuesto puro. Después, se agregaron 5 mL de etanol (96%) al sólido obtenido y se filtró al vacío. Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 h, se pulverizó y se almacenó.

## **2.2 ENSAYOS *in vitro***

### **2.2.1 Cultivo de células de la línea 3T3-L1**

Los fibroblastos de ratón 3T3-L1 se adquirieron de American Tissue Culture Collection (ATCC, no. de catálogo CL-173). Las células fueron propagadas en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> en medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO™ Thermo Fisher Scientific, USA) suplementado con 25 mM de glucosa, 10% de suero de neonato de ternera (SNT), 1mM de piruvato de sodio, 2mM de L-glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y 0.01 mg/L de gentamicina, en una atmósfera humificada de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Una vez teniendo células suficientes, estas fueron sembradas en placas de 6 pozos (8 x 10<sup>5</sup> células por pozo) bajo las mismas condiciones de cultivo. Después de llegar a confluencia, las células se dejaron crecer durante 24 h adicionales (Figura 2A). Posteriormente, se inició la diferenciación a adipocitos. Para ello se agregaron 10mg/L de insulina murina, 0.5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y 0.25 μM de dexametasona, en medio DMEM suplementado con 25 mM de glucosa, 10% de suero fetal de bovino (SFB). El medio fue remplazado después de 48 h con DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 10mg/L de insulina. El medio de

cultivo se cambió cada dos días durante ocho días de diferenciación (Figura 2B) (Giacoman-Martínez et al., 2019).



**Figura 2.** Cultivo de la línea celular 3T3-L1. (A) Fibroblastos de ratón 3T3-L1. (B) Pre-adipocitos bajo proceso de diferenciación. Observación en microscopio invertido a 40x.

### 2.2.2 Cultivo de células de la línea RIN-m5F

Las células de insulinoma pancreático (RIN-m5F) se adquirieron de ATCC (no. de catálogo CRL-11605) y se sembraron en botellas de 75 cm<sup>2</sup> hasta llegar a confluencia. Posteriormente se cultivaron en placas de 6 pozos ( $8 \times 10^5$  células por pozo) en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, 0.5 mM de piruvato de sodio, 1mM de L-glutamina, 0.05 mM de aminoácidos no esenciales y 0.1 mg/L de gentamicina, en una atmósfera humificada de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. El medio de cultivo se cambió cada dos días (Figura 3) (Miranda-Pérez et al., 2016).



**Figura 3.** Cultivo de la línea celular RIN-m5F. Células de insulinoma pancreático de rata. Observación en microscopio invertido a 40x.

### 2.2.3 Evaluación *in vitro* sobre la expresión de PPAR $\gamma$ , GLUT4 y GPR40

Para determinar la concentración adecuada de los compuestos a evaluar sin afectar la funcionalidad celular, se realizó la prueba de reducción de MTT descrita por Mosmann, 1983. Los fibroblastos 3T3-L1 y las células RIN-m5F se trataron durante 24 h a una concentración de una concentración de 100, 50, 5 y 0.5  $\mu$ M de los compuestos LAT-1', LAT-1, LAT-2' y LAT-2. El cultivo que fungió como testigo fue tratado solo con medio y como control negativo se utilizó peróxido de hidrógeno.

Una vez identificada la concentración óptima, se sembraron células en placa de 6 pozos ( $8 \times 10^4$  células por pozo) y se distribuyeron los siguientes grupos: sin tratamiento, con tratamiento (LAT-1', LAT-1, LAT-2' y LAT-2, a una concentración de 1  $\mu$ M); y control positivo (en adipocitos se usó pioglitazona a 10  $\mu$ M y en RIN-m5f glibenclamida a 400  $\mu$ M), todos los tratamientos fueron administrados por 24h. El ARN total se aisló de las células cultivadas empleando TRIzol. Para cada muestra de ARN se cuantificó la absorbancia a 260 y 280 nm, la proporción de OD (260/280) fue de  $1.9 \pm 0.2$ , consistente con la ausencia de contaminación. Se transcribieron 2  $\mu$ g de ARNm de manera inversa utilizando el sistema de transcripción inversa ImProm II (Promega, Wisconsin, EUA). La reacción (20  $\mu$ L) se incubó en un termociclador Select Cycler (BioProducts, West Palm Beach, FL, EE. UU.) siguiendo el programa de ciclos: incubación a 25 ° C durante 5 min, extensión a 42 ° C durante 55 min. La enzima se inactivó a 70 ° C, durante 15 min, y finalmente, las muestras se enfriaron a 4 ° C, durante 5 min. El cDNA obtenido fue amplificado con la mezcla maestra de SYBR Green (thermoScientific, EUA) que contiene 0.5 mM de cebadores personalizados para PPAR- $\gamma$  (F-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG; R-GCCACCTCTTTGCTCTGCTC; GenBank: NM\_011146.1), GPR40 (F-GCTATTCCTGGGGTGTGTGT; R-GGGCAGAAAGAAGAGCAGAA; GenBank: NM\_153304.2), GLUT-4 (F-GATTCTGCTGCCCTTCTGTC; R-ATTGGACGCTCTCTCTCCAA; GenBank: NM\_009204.2) y como un control interno, los genes constitutivos 36B4 (F-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT; R-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT; GenBank:

NM\_007475.4) y  $\beta$ -actina (F-CCAGGGTGTGATGGTGGGAATG; R-CGCACGATTTCCCTATCAGCTG; GenBank: NM\_007393.5), enzima Fast Star, buffer de PCR y 3.5 mM MgCl<sub>2</sub> en un volumen final de 10  $\mu$ L. Las reacciones se midieron en un sistema de rotor-gen (Corbett Life Science, Concorde, NSW, Australia) bajo las condiciones descritas por Almanza-Pérez et al., 2010. Los valores  $\Delta$ Ct se calcularon para todas las muestras en cada gen de interés como sigue: Ct diana - Ct de referencia. Los cambios relativos en el nivel de expresión de un gen específico ( $\Delta\Delta$ Ct) se calcularon como  $\Delta$ Ct del grupo de prueba -  $\Delta$ Ct del grupo de control y luego se presentaron como  $2^{-\Delta\Delta \text{Ct}}$  (García-Macedo et al., 2008).

#### **2.2.4 Cuantificación de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**

La concentración de calcio libre intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) fue medida con un indicador fluorescente de calcio, Fluo-4 AM (Molecular probes). Se cultivaron células RIN-m5F en placas Chamber Slide System (Lab Tek II) de ocho pocillos (8 x 10<sup>3</sup> células por pozo). Después de 24 h de cultivo, las células se permeabilizaron durante 30 min. con 1  $\mu$ M del indicador Fluo-4 AM en HBSS suplementado con gentamicina a 10  $\mu$ L/mL y BSA al 0.1%. Posteriormente, se retiró el Fluo-4 AM y se hizo un lavado con PBS y se dejaron equilibrar las células. La fluorescencia se detectó con una excitación de 488 nm y una emisión de 535 nm utilizando un microscopio confocal (Zeiss Zen-Sp1) con escaneo láser. Las imágenes se adquirieron cada segundo con un tiempo de exposición de 20 ms por 10 min a 23°C. La glibenclamida (400  $\mu$ M), el compuesto LAT-1 (1  $\mu$ M) y el compuesto LAT-2 (1  $\mu$ M) se aplicaron después de tomar cinco imágenes de cada secuencia. Los archivos de secuencias se analizaron utilizando el software analizador de imágenes ImageJ de NIH, EUA (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Las regiones de interés fueron seleccionadas en el citoplasma de las células, y se midió la intensidad media de píxeles. Los cambios de fluorescencia relativa ( $\Delta F/F_0$ ) se representaron como una función del tiempo y se integraron para determinar el área bajo la curva siguiendo la técnica descrita por Miranda-Pérez et al., 2016.

### **2.2.5 Cuantificación de la secreción de Insulina por el método de ELISA**

Para cuantificar la secreción de insulina se sembraron células RIN-m5F en placas de 6 pozos ( $8 \times 10^4$  células por pozo) hasta llegar a una confluencia de 70-80%. Después se lavaron con PBS y la solución se reemplazó con medio RPMI 1640 que contenía los compuestos a evaluar. Las células se estimularon con glibenclamida (400  $\mu\text{M}$ ), y los compuestos LAT-1' (1  $\mu\text{M}$ ), LAT-1 (1  $\mu\text{M}$ ), LAT-2' (1  $\mu\text{M}$ ) y LAT-2 (1  $\mu\text{M}$ ), durante 24 h. Se colectó el medio de incubación para cuantificar los niveles de insulina con un kit de ELISA (ALPCO, USA). Esta técnica se basa en un inmunoensayo tipo sándwich, con anticuerpos monoclonales de rata específicos para insulina, inmovilizados en una microplaca de 96 pozos. Posteriormente, se cuantificó la densidad óptica mediante un espectrofotómetro de microplacas a 450 nm. La intensidad del color generado fue directamente proporcional a la cantidad de insulina en la muestra (Miranda-Pérez et al., 2016).

## **2.3 ENSAYOS *in silico***

### **2.3.1 Acoplamiento molecular con receptores PPAR $\gamma$ y GPR40**

Para estudiar el posible modo de unión de los compuestos con sus respectivos blancos, las moléculas se acoplaron con las estructuras cristalográficas de PPAR $\gamma$  y GPR40 obtenidas de la base de datos Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) con códigos de identificación 5Y2O y 4PHU respectivamente, mediante la técnica de acoplamiento molecular automatizado. Los cálculos se realizaron con AutoDock 4.2 (Morris et al., 2009). Todas las moléculas de agua y los ligandos de las proteínas se eliminaron de las estructuras cristalográficas, y se agregaron átomos de hidrógeno. Para los ligandos y proteínas, se asignaron las cargas de Gasteiger y los átomos no polares fueron escondidos. Todas las torsiones fueron consideradas para moverse durante el acoplamiento. Cada grid se centró en las coordenadas cristalográficas del ligando cristalográfico. Las dimensiones de la cuadrícula fueron  $40 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$  con un espacio de grid de  $0.375 \text{ \AA}$  para PPAR $\gamma$  y  $54 \times 54 \times 54 \text{ \AA}$  separados por  $0.375 \text{ \AA}$  para GPR40. Se aplicó el algoritmo genético lamarckiano, utilizando parámetros predeterminados. El número de corridas de acoplamiento

fue de 100. Después del acoplamiento, los resultados se agruparon en grupos de con RMSD inferior a 2.0 Å. Se usaron Discovery Studio (DS 4.0, Accelrys Inc.) y PyMol 1.0 para la visualización (Hidalgo-Figueroa et al., 2017).

Todos los protocolos se validaron mediante el re-acoplamiento de las moléculas co-cristalizadas en el sitio del ligando de cada isoforma de la siguiente manera: PPAR $\gamma$  con (5S)-5-[[4-[2-(5-etilpiridin-2-il)etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidin-2,4-diona (Pioglitazona) y para GRP40 con ácido [(3S)-6-({2',6'-dimetil-4'-[3-(metilsulfonil)propoxi]bifenil-3-il)metoxi)-2,3-dihidro-1-benzofuran-3-il] acético (Tak-875). El RMSD entre las moléculas co-cristalizadas y los experimentos realizados fue <2.0 Å. Esta validación se realizó en base a las interacciones esenciales formadas por el ligando unido a los residuos del sitio activo, lo que indica que los parámetros para simulaciones de acoplamiento pueden reproducir de manera eficiente las interacciones entre las estructuras cristalinas de rayos X de los compuestos y ambos receptores (Navarrete-Vázquez et al., 2014).

### **2.3.2 Análisis del perfil farmacocinético**

El análisis de consenso farmacológico para la selección de un líder computacional seguro, combina los resultados de diferentes cálculos realizados *in silico*. Los resultados de este análisis consisten en que cuanto más coinciden los cálculos de que un compuesto es activo, con baja toxicidad y perfil farmacocinético adecuado, más confiable será la selección/discriminación de dicho compuesto (Melo-Hernández, 2018).

Las propiedades ADMET (absorción, metabolismo y toxicidad) tienen un papel importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, ya que sólo algunas moléculas de cientos de candidatos alcanzan el mercado debido a la alta tasa de fracasos en la etapa clínica. Las principales causas de estos fracasos son la falta de eficacia debida a las pobres propiedades farmacocinéticas y a la toxicidad relacionadas con sus efectos adversos. Por esta razón, se empleó una fuente de información abierta y electrónica utilizada para filtrar y predecir propiedades farmacocinéticas y toxicológicas de diversas moléculas, por el

servidor admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1>) (Hidalgo-Figueroa, 2013).

Otra de las herramientas utilizadas para sustentar el desarrollo de nuevos fármacos es la aplicación de las reglas de Lipinski. Estas reglas evalúan si un compuesto químico, con una determinada actividad farmacológica, tiene propiedades que lo convierten en un probable medicamento activo por vía oral en los seres humanos. Para estas reglas, la molécula no debe presentar más de dos violaciones de los siguientes criterios, ya que podría presentar problemas de absorción, permeabilidad y biodisponibilidad: peso molecular <500 g/mol, número de donadores de puentes de hidrógeno <5, número de aceptores de puente de hidrógeno <10 y coeficiente de partición (LogP) <5 (Kerns y Li, 2008; Nogara et al., 2015). Para obtener estos datos, se utilizó el servidor SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>).

Para el análisis de las estructuras de los compuestos desde el punto de vista farmacológico, se realizó la predicción básica del espectro de actividad biológica utilizando el programa PASS (<http://www.way2drug.com>) (Hidalgo-Figueroa, 2013).

#### **2.4 Análisis Estadístico**

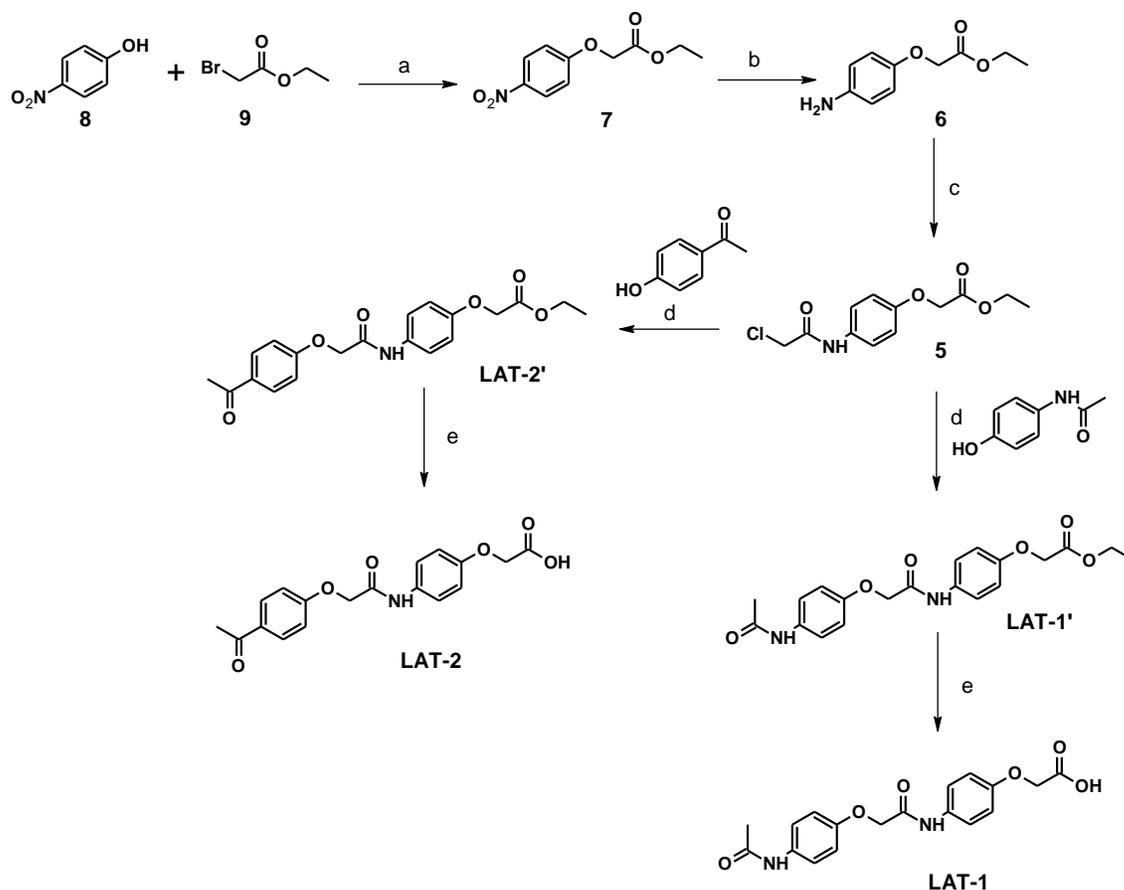
El análisis estadístico de los resultados obtenidos fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, seguido por la prueba de Tukey-Kramer. Se utilizó el programa GraphPad Prism 6 y el nivel de significancia fue del 95%.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 SÍNTESIS QUÍMICA

Se sintetizaron dos compuestos siguiendo una ruta sintética de cinco pasos, partiendo de una mezcla de p-nitrofenol y carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ) en acetona.

Los compuestos LAT-1', LAT-1, LAT-2' Y LAT-2 fueron recuperados con un rendimiento moderado (57-74%) y se purificaron por cromatografía en columna. Las estructuras químicas de los compuestos sintetizados se validaron en función de sus datos espectrométricos.



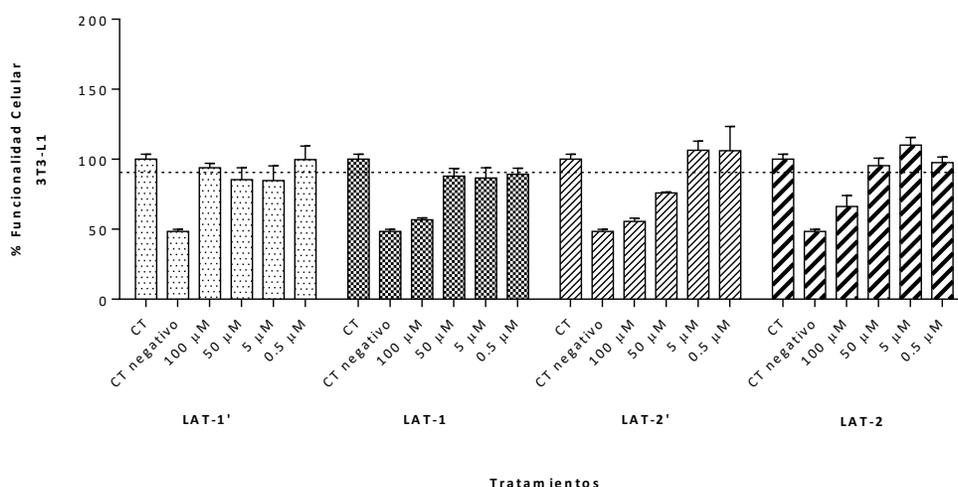
**Esquema 8.** Síntesis de derivados de ácido fenoxiacético.

Condiciones y reactivos: a)  $K_2CO_3$ , acetona, reflujo; b)  $H_2$  Pd/C 10% EtOH; c) cloruro de cloroacetilo,  $Et_3N$ ,  $CH_2Cl_2$ ; d)  $K_2CO_3$ , acetonitrilo, reflujo; e) KOH, EtOH- $H_2O$ , reflujo.

## 3.2 ENSAYOS *in vitro*

### 3.2.1 Prueba de funcionalidad celular por reducción de MTT

Para determinar la concentración óptima de los compuestos a evaluar, se realizó un ensayo de funcionalidad celular por reducción de MTT. En la Figura 4 se muestran los compuestos LAT-1', LAT-1, LAT-2' y LAT-2 evaluados a diferentes concentraciones, en células 3T3-L1. El objetivo de este ensayo fue determinar que las concentraciones empleadas no provoquen cambios en la funcionalidad metabólica y con ello descartar que los cambios en la expresión de los genes evaluados se deban a un cambio en la funcionalidad y quizás la viabilidad celular. Para los cuatro compuestos se evaluaron las concentraciones de 50, 5 y 0.5  $\mu\text{M}$ . Los resultados muestran que no existe ninguna diferencia significativa respecto al control, es decir no se ve afectada su funcionalidad. Mientras que la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , para los compuestos LAT-1, LAT-2' y LAT-2 tiene una diferencia significativa respecto a control disminuyendo la funcionalidad de las células.

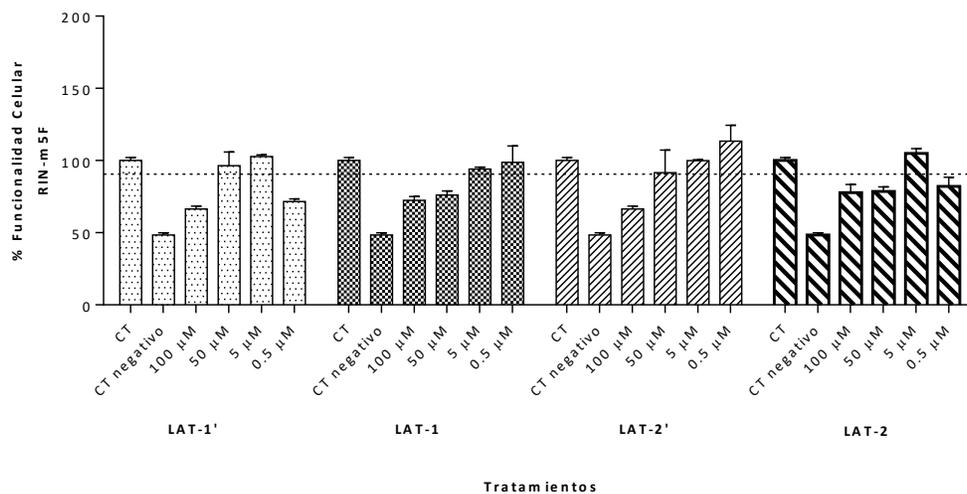


**Figura 4.** Prueba de funcionalidad celular por reducción de MTT en células 3T3-L1. Se muestran los compuestos LAT-1', LAT-1, LAT-2' y LAT-2 en diferentes concentraciones probados en células 3T3-L1 para determinar la posible alteración que pudieran ocasionar los compuestos en las células y afectar su funcionalidad.

Por otro lado, en la figura 5 se presentan los resultados de la prueba de funcionalidad en cultivo de células RIN-m5F. Se observa que para los cuatro compuestos en las diferentes concentraciones no existe una diferencia

significativa respecto al control, lo que significa que el compuesto no altera la funcionalidad de las células.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se consideró apropiado utilizar una concentración de 1  $\mu\text{M}$  para continuar con los experimentos de expresión de PPAR $\gamma$ , GLUT-4 y GPR40.

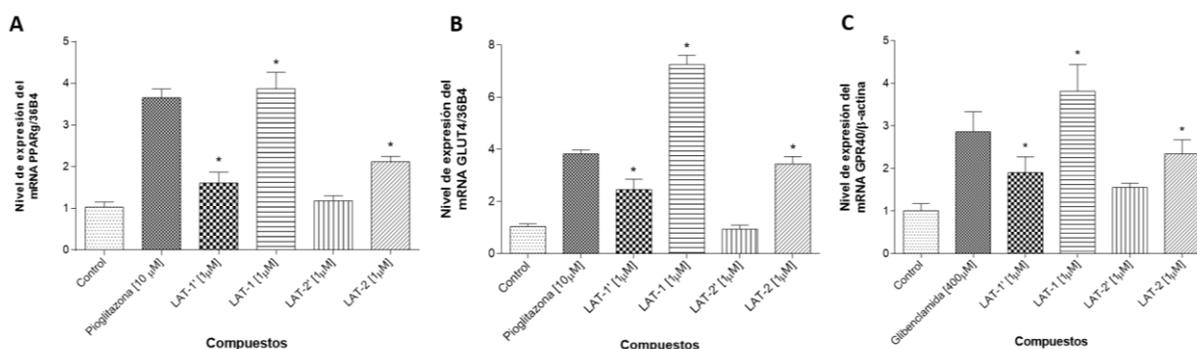


**Figura 5.** Prueba de funcionalidad celular por reducción de MTT en células RIN-m5F. Se muestran los compuestos LAT-1', LAT-1, LAT-2' y LAT-2 en diferentes concentraciones probados en células RIN-m5F para determinar la posible alteración que pudieran ocasionar.

### 3.2.2 Evaluación *in vitro* sobre la expresión de PPAR $\gamma$ , GLUT4 y GPR40

La Figura 6 muestra el análisis de la expresión de los genes PPAR $\gamma$ , GLUT4 y GPR40. Los resultados muestran que el compuesto LAT-1 genera un aumento en la expresión de PPAR $\gamma$ , aumentando casi 4 veces con respecto al control en adipocitos (línea celular 3T3-L1, Figura 6A). El compuesto LAT-1 mostró la misma eficacia que pioglitazona, mientras que los compuestos LAT-1', LAT-2' y LAT-2 no indujeron ningún cambio en la expresión génica. Asimismo, el compuesto LAT-1 aumentó los niveles de expresión de GLUT4 (7 veces respecto al control y 2 veces respecto a pioglitazona, Figura 6B). Se puede inferir que el compuesto LAT-1 activó directamente el receptor PPAR $\gamma$ , ya que es un factor de transcripción que regula la expresión de GLUT4.

Los compuestos anteriores también se utilizaron para evaluar su efecto en los niveles de expresión de GPR40 en células RINm5F (Figura 6C). El compuesto LAT-1 mostró un aumento de 3 veces en la expresión de ARNm de GPR40 contra el control, mientras que los otros compuestos aumentaron el doble la expresión con respecto al control. La glibenclamida mostró un aumento similar al compuesto LAT-1, esto se puede deber a que las sulfonilureas han demostrado tener cierta capacidad de fungir como agonista de PPAR $\gamma$ , y se ha observado que algunos agonistas de PPAR $\gamma$  son capaces activar GPR40, ya que sus grupos farmacofóricos comparten características químicas similares.

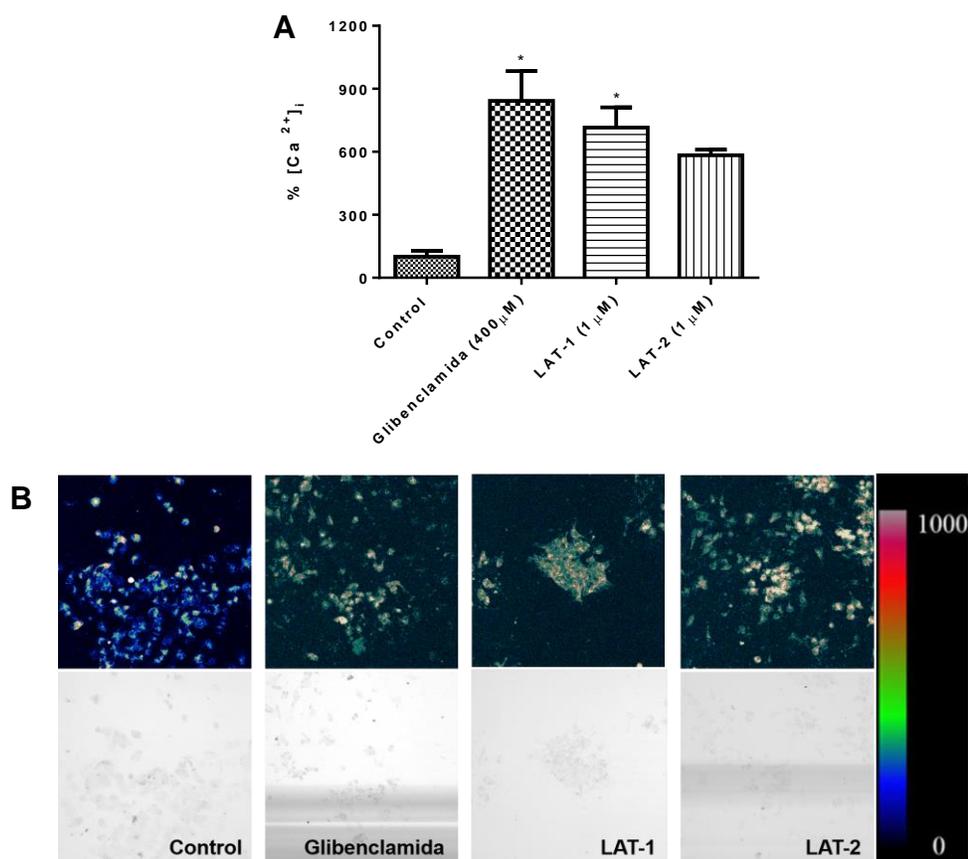


**Figura 6.** Efecto de los compuestos LAT-1', LAT-1, LAT-2', LAT-2, pioglitazona y glibenclamida sobre los niveles de expresión de ARNm de los genes de interés. (A) PPAR $\gamma$ , (B) GLUT4 y (C) GPR40 (C). Los resultados se presentan como una expresión relativa de ARNm. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  E.E.M. (n=4) \*p<0.05 comparado con el control.

### 3.2.3 Cuantificación de [Ca $^{2+}$ ]<sub>i</sub>

Los compuestos LAT-1 y LAT-2 fueron evaluados en células RIN-m5F, para determinar la concentración de calcio intracelular, mediante un indicador fluorescente (Figura 7). El compuesto LAT-1 mostró un aumento de siete veces en [Ca $^{2+}$ ]<sub>i</sub> respecto al control, con concentraciones similares a la de glibenclamida. Por otro lado, el compuesto LAT-2 tuvo un incremento de cinco veces en [Ca $^{2+}$ ]<sub>i</sub> respecto al control (Figura 7A). La intensidad de fluorescencia se presenta en la figura 7B. En las imágenes se monitorearon las fluctuaciones de Ca $^{2+}$  intracelular en células RIN-m5F, las cuales se obtuvieron utilizando microscopía láser confocal e indicaron el aumento de fluorescencia en las células cuando se agregaron los

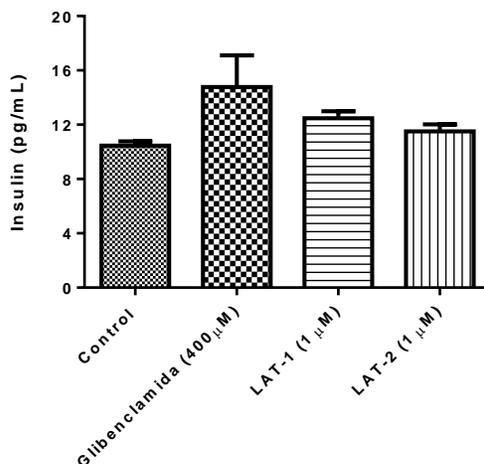
compuestos. Una alta  $[Ca^{2+}]_i$  induce el movimiento de vesículas de insulina, lo que provoca un incremento en la liberación de insulina. Estos resultados infieren que los compuestos LAT-1 y LAT-2 promueven la liberación de insulina como resultado de la posible activación de GPR40.



**Figura 7.** Efecto de los compuestos LAT-1 (1  $\mu$ M), LAT-2 (1  $\mu$ M) y glibenclamide (400  $\mu$ M) en la  $[Ca^{2+}]_i$ . (A) Porcentaje de  $[Ca^{2+}]_i$  en células RIN-m5F. (B) Imágenes de microscopia confocal (Fluo-4 AM) de células con tratamiento. La barra de escala indica el aumento en  $[Ca^{2+}]_i$ . Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  E.E.M. (n=3) \*p<0.05 comparado con el control.

### 3.2.4 Cuantificación de la secreción de Insulina por el método de ELISA

Los compuestos LAT-1 y LAT-2 incrementaron la secreción de insulina un 20% respecto al control, mientras que glibenclamide aumentó la secreción de insulina en un 41%. Este hecho explica el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en el experimento anterior por la activación de GPR40 que desencadena una cascada de señalización mediada por  $[Ca^{2+}]_i$  que provoca la liberación de insulina.



**Figura 8.** Efecto de los compuestos LAT-1 (1 μM), LAT-2 (1 μM) y glibenclamida (400 μM) en la liberación de insulina. Los resultados se expresan como el promedio ± E.E.M. (n=4) \*p<0.05 comparado con el control.

### 3.3 ENSAYOS *in silico*

#### 3.3.1 Acoplamiento molecular con receptores PPAR $\gamma$ y GPR40

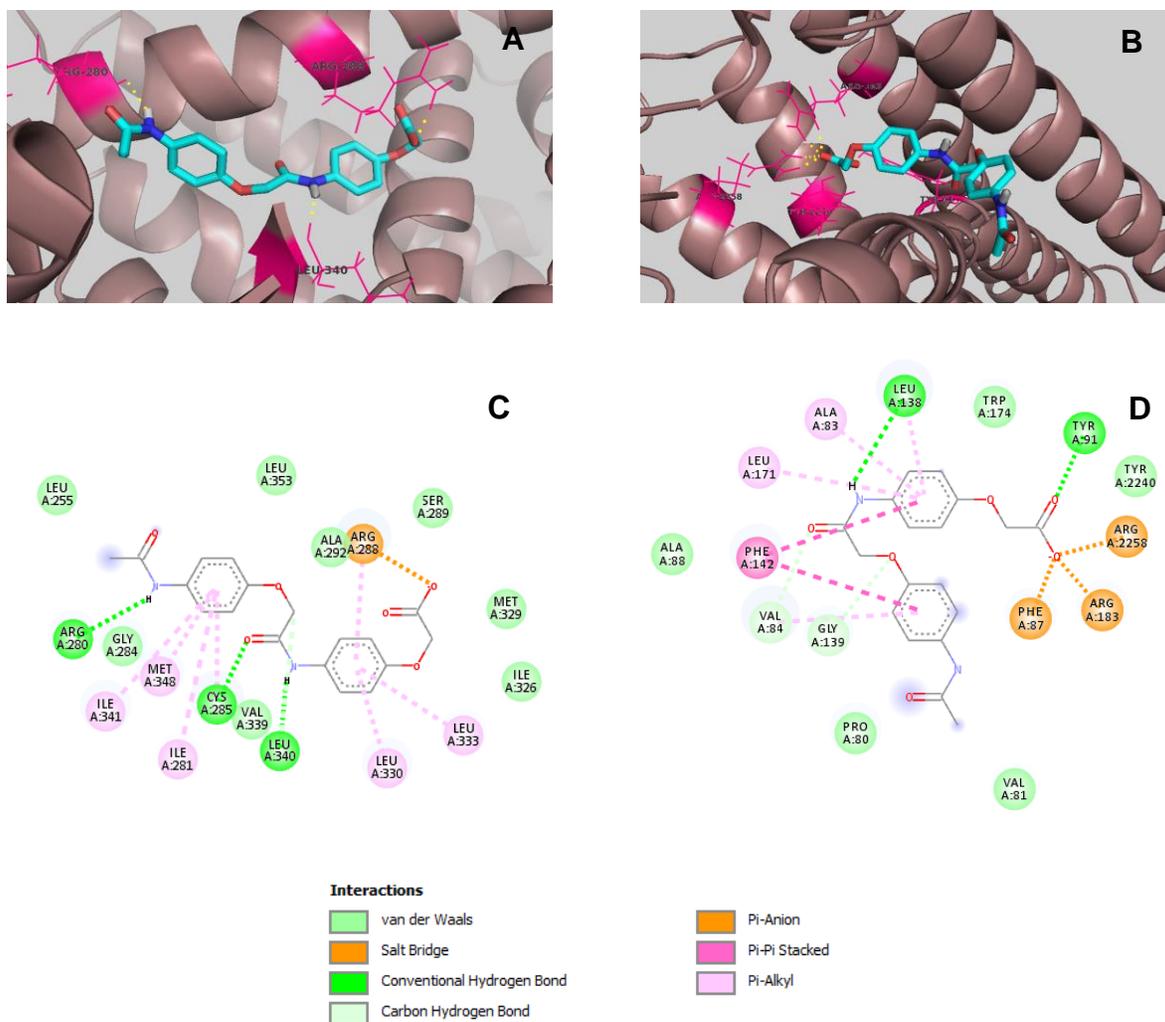
El compuesto LAT-1 fue seleccionado para realizar los estudios de acoplamiento y para predecir su modo de unión sobre los receptores PPAR $\gamma$  y GPR40, ya que fue el compuesto que mostró una mayor potencia en los ensayos *in vitro*.

El compuesto LAT-1 se acopló a los receptores, mostrando buenas afinidades con una energía de unión de -8.53 kcal/mol en PPAR $\gamma$  y -10.37 kcal/mol en GPR40. Las figuras 9A y 9C muestran el modo de enlace de LAT-1 con PPAR $\gamma$ , con líneas punteadas se observan los puentes de hidrógeno con los residuos Arg280, Cys285, Arg288 y Leu340, los cuales están involucrados en la unión a ligandos.

Asimismo, el compuesto LAT-1 también tiene interacciones significativas con GPR40 al mostrar interacciones con puentes de hidrógeno en los residuos Leu138 y Tyr91 (Figuras 9B y 9D).

Para el receptor PPAR $\gamma$ , los residuos Cys285 y Leu340, conservan la misma interacción que el ligando co-cristalizado con la proteína. De igual manera, en GPR40, los residuos Leu138 y Tyr91. Lo que quiere decir, que el compuesto LAT-1 mantiene un acomodo similar a los ligandos co-cristalizados de ambos

receptores, por lo que es posible que actúen y mantengan la misma actividad farmacológica.



**Figura 9.** Acoplamiento molecular del compuesto LAT-1 en PPAR $\gamma$  y GPR40. Acoplamiento molecular tridimensional del compuesto LAT-1 en (A) PPAR $\gamma$  y (B) GPR40. Mapa de interacción bidimensional de LAT-1 en (C) PPAR $\gamma$  y (D) GPR40.

### 3.3.2 Análisis de consenso farmacológico

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de absorción, metabolismo y toxicidad calculados para LAT-1 y LAT-2, basados en un modelo QSAR por el servidor admetSAR (<http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetSar1>). En los resultados se refleja una buena absorción por vía oral para ambos compuestos. También se observa que ambos compuestos tienen una alta probabilidad de no inhibir la

familia de citocromos P450, lo que permite una buena biotransformación de los compuestos y un fácil metabolismo. En cuanto a la toxicidad, no hay una baja probabilidad de ser bloqueador de los canales hERG (relacionados con cardiotoxicidad), toxicidad AMES (índice de mutagénesis) y carcinogénesis.

**Tabla 1.** Propiedades ADMET calculadas para los compuestos LAT-1 y LAT-2

Modelo	Resultado	Probabilidad	
		LAT-1	LAT-2
<b>Absorción</b>			
Barrera hematoencefálica	BBB-	0.5574	0.5353
Absorción intestinal humana	HIA+	0.5782	0.7512
Permeabilidad Caco-2	Caco2-	0.7345	0.6957
Sustrato de glicoproteína-P	Sustrato	0.5052	
	No sustrato		0.5431
Inhibidor de glicoproteína-P	No inhibidor	0.8283	0.8403
Transportador renal de cationes orgánicos	No inhibidor	0.8966	0.8888
<b>Metabolismo</b>			
CYP450 2C9 sustrato	No sustrato	0.7126	0.7158
CYP450 2D6 sustrato	No sustrato	0.8190	0.7955
CYP450 3A4 sustrato	No sustrato	0.5191	
	Sustrato		0.5186
CYP450 1A2 inhibidor	No inhibidor	0.8788	0.8484
CYP450 2C9 inhibidor	No inhibidor	0.5671	0.6197
CYP450 2D6 inhibidor	No inhibidor	0.8935	0.9225
CYP450 2C19 inhibidor	No inhibidor	0.7478	0.7758
CYP450 3A4 inhibidor	No inhibidor	0.9629	0.9757
Inhibición promiscua de CYP	Baja inhibición promiscua de CYP	0.6478	0.6556
<b>Toxicidad</b>			
Inhibición del gen relacionado con hERG	Inhibidor débil	0.9893	0.9846
	No inhibidor	0.8717	0.8608
Toxicidad de AMES	No tóxico	0.7767	0.7723
Carcinogénesis	No carcinogénico	0.8463	0.8679
Cacinogenicidad	No requerido	0.6325	0.6399
Toxicidad oral aguda	III	0.6596	0.7064

En la Tabla 2 se representan los valores obtenidos por el servidor SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) para cada regla de Lipinski por cada uno de los compuestos. Se observa que ambos compuestos, LAT-1 y LAT-2, no presentan violaciones a las reglas de Lipinski, por lo que es probable que no muestren problemas de absorción en un futuro.

**Tabla 2.** Regla de Lipinski aplicada a los compuestos LAT-1 y LAT-2

	LAT-1	LAT-2
<b>Fórmula</b>	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>6</sub>
<b>Peso Molecular (&lt;500)</b>	358.35 g/mol	343.33 g/mol
<b>cLogP (&lt;5)</b>	1.45	1.85
<b>No. de aceptores de puentes de hidrógeno (&lt;10)</b>	6	6
<b>No. de donadores de puente de hidrógeno(&lt;5)</b>	3	2
<b>TPSA (&lt;140)</b>	113.96 Å <sup>2</sup>	101.93 Å <sup>2</sup>
<b>Violaciones a la regla</b>	0	0

La Tabla 3 muestra los resultados de predicción de actividad biológica para los compuestos LAT-1 y LAT-2. Se observa que el compuesto LAT-1 tiene una alta probabilidad de actividad antidiabética, mientras que LAT-2 presenta una baja probabilidad de actividad antidiabética y como agonista de PPAR $\gamma$ , pero con los resultados experimentales se podrá alimentar la base de datos para mejorar la calidad de las predicciones en un futuro, ya que las estructuras de los compuestos que se sintetizaron ampliaran la gamma de subestructuras con esta actividad.

**Tabla 3.** Predicción del espectro de actividad biológica de los compuestos sintetizados

	Antidiabético		Antidiabético tipo 2		Agonista PPAR $\gamma$	
	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
<b>LAT-1</b>	0.492	0.024	0.245	0.044	-	-
<b>LAT-2</b>	0.477	0.027	-	-	0.054	0.045

Pa = probabilidad de ser activo; Pi = probabilidad de ser inactivo;  
- = sin probabilidad encontrada

## 4. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar dos compuestos por síntesis lineal con rendimientos de 74% para el compuesto LAT-1, y 53% para el compuesto LAT-2.

Los compuestos LAT-1, LAT-1', LAT-2 y LAT-2' mostraron en los ensayos de MTT que a concentraciones por debajo de 50  $\mu\text{M}$  no alteran la funcionalidad celular, por lo cual los compuestos pueden ser evaluados a menores concentraciones para explorar su efecto farmacológico sin alteración.

El compuesto LAT-1 aumentó significativamente el nivel de expresión del ARNm de PPAR $\gamma$  y GLUT4, GPR40, con respecto al control basal, a pioglitazona y a glibenclamida. Por otro lado, aumentó la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que provocó la liberación de insulina al activarse GPR40, por lo que se puede inferir que LAT-1 actúa como un agonista dual de PPAR $\gamma$  y GPR40.

Las energías de unión encontradas para los compuestos en el acoplamiento molecular pronostican afinidad hacia sus blancos terapéuticos, lo cual correlaciona en su posible acción farmacológica. Donde la energía de unión para LAT-1 sobre PPAR $\gamma$  fue de -8.53 kcal/mol y para LAT-2 de -7.88 kcal/mol. Mientras que la energía de unión de LAT-1 sobre GPR40 fue de -10.37 kcal/mol y para LAT-2 de -10.28 kcal/mol.

El compuesto LAT-1 es el mejor candidato para pruebas posteriores de optimización sus propiedades farmacocinéticas.

Por último, el compuesto LAT1 es considerado un compuesto líder el cual será cabeza de serie de nuevos y mejores compuestos con actividad dual.

## 5. REFERENCIAS

- Adeghate, E., Adem, A., Hasan, M., Tekes, K. & Kalsz, H., 'Medicinal Chemistry and Actions of Dual and Pan PPAR Modulators. *Open Medicinal Chemistry Journal*, 5(1):93-98. doi:10.2174/1874104501105010093
- Almanza-Perez, J. C., Alarcon-Aguilar, F. J., Blancas-Flores, G., Campos-Sepulveda, A. E., Roman-Ramos, R., Garcia-Macedo, R., & Cruz, M. (2010). 'Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2'. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(8), 534-540. doi: 10.1016/j.biopha.2009.04.047
- Buran, C. (2013) Activation of GPR40 as a therapeutic target for the treatment of type 2. *Diabetes Care*. 36 Suppl 2:S175-9. doi: 10.2337/dcS13-2037.
- Chen, C., Li, H., & Long, Y. (2016) 'GPR40 agonists for the treatment of type 2 diabetes mellitus: The biological characteristics and the chemical space' *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 26(23):5603-5612. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.10.074
- Darwish, K. M., Salama, I., Mostafa, S., Gomaa, M. S., & Helal, M. A. (2016). 'Design, synthesis, and biological evaluation of novel thiazolidinediones as PPAR $\gamma$ /FFAR1 dual agonists'. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 109:157-172. doi:10.1016/j.ejmech.2015.12.049
- Derosa, G., Sahebkar, A. & Maffioli, P. (2017). 'The role of the various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice'. *Journal of Cellular Physiology*, 233(1):153-161. doi:10.1002/jcp.25804

Federación Internacional de Diabetes (2017) 'Atlas de Diabetes' 8ª Ed. Online version of IDF Diabetes Atlas: [www.diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org).

Federación Mexicana de Diabetes, A.C. (23 de abril de 2018). 'Principales causas de mortalidad en México'. Recuperado de: <http://fmdiabetes.org/estadisticas-en-mexico/>

Flórez, J.C. (2014) en Flórez, J., Armijo, J. A., & Mediavilla. 'Capítulo 54. Insulina y fármacos antidiabéticos. Glucagón'. *Farmacología Humana*. 6ª ed. Ámsterdam: Elsevier Masson. España pp. 846-863

Fukuen, S., Iwaki, M., Yasui, A., Makishima, M., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2005). 'Sulfonylurea agents exhibit peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonistic activity'. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23653-23659.

Gao, Q., Hanh, J., Váradi, L., Cairns, R., Sjöström, H., Liao, V., Wood, P., Balaban, S., Ong, J., Lin, H., Lai, F., Hoy, A., Grewal, T., Groundwater, P. & Hibbs, D. (2015) 'Identification of dual PPAR  $\alpha/\gamma$  agonists and their effects on lipid metabolism', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 23(24):7676–7684. doi: 10.1016/j.bmc.2015.11.013.

Garcia-Macedo, R., Sanchez-Muñoz, F., Almanza-Perez, J. C., Duran-Reyes, G., Alarcon-Aguilar, F., & Cruz, M. (2008). 'Glycine increases mRNA adiponectin and diminishes pro-inflammatory adipokines expression in 3T3-L1 cells'. *European Journal of Pharmacology*, 587(1-3):317-321. doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.051

- Ghislain, J. & Poitout, V. (2016). 'The Role and Future of FFA1 as a Therapeutic Target'. In: Milligan G., Kimura I. (eds) Free Fatty Acid Receptors. Handbook of Experimental Pharmacology, vol 236. Springer, Cham
- Giacoman-Martínez, A., Alarcón-Aguilar, F., Zamilpa, A., Hidalgo-Figueroa, S., Navarrete-Vázquez, G., García-Macedo, R., Román-Ramos, R. & Almanza-Pérez, J. (2019). 'Triterpenoids from Hibiscus sabdariffa L. with PPAR $\delta$ / $\gamma$  Dual Agonist Action: In Vivo, In Vitro and In Silico Studies'. *Planta Medica*, 85(05):412-423. doi:10.1055/a-0824-1316
- Hidalgo-Figuero, S. (2013). 'Diseño, síntesis, bioevaluación y estudios de acoplamiento molecular de aza y tiazaheterociclos para el tratamiento experimental de la diabetes e hipertensión'. (Tesis de doctorado, Universidad Autónoma del Estado de Morelos) Cuernavaca, Morelos, México.
- Hidalgo-Figueroa, S., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S., Giles-Rivas, D., Alarcón-Aguilar, F., León-Rivera, I., Giacoman-Martínez, A., Miranda-Pérez, E. & Almanza-Pérez, J. (2017) 'Discovery of new dual PPAR $\gamma$ -GPR40 agonists with robust antidiabetic activity: Design, synthesis and in combo drug evaluation', *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 24(3):53–61, doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.033.
- Kerns, E. H., & Di, L. (2008). Rules for Rapid Property Profiling from Structure. *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*, 37–42. doi:10.1016/b978-012369520-8.50005-x

- Lewis, S. N., Garcia, Z., Hontecillas, R., Bassaganya-Riera, J., & Bevan, D. R. (2015). Pharmacophore modeling improves virtual screening for novel peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 29(5), 421-439. doi:10.1007/s10822-015-9831-x
- Li, W., Huang, E. & Gao, S., (2017) 'Type 1 Diabetes mellitus and Cognitive Impairments: A Sistematic Review', *J Alzheimers Dis*, 57(1):29-36, doi: 10.3233/JAD-161250
- López-Stewart, G., (2009) 'Diabetes mellitus: clasificación, fisiopatología y diagnóstico', *Medwave*, 9(12), doi: 10.5867/medwave.2009.12.4315
- Mansour, M. (2014) The roles of peroxisome proliferator-activated receptors in the metabolic syndrome. 1st edn, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-800101-1.00007-7.
- Melo Hernández, L. A. (2018). 'Síntesis y evaluación del efecto antinociceptivo de benzamidas piperidínicas y morfólicas' (Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Morelos). Cuernavaca, Morelos, México.
- Miranda-Perez, M. E., Ortega-Camarillo, C., Escobar-Villanueva, M. D., Blancas-Flores, G., & Alarcon-Aguilar, F. J. (2016). 'Cucurbita ficifolia Bouché increases insulin secretion in RINm5F cells through an influx of Ca<sup>2</sup> from the endoplasmic reticulum'. *Journal of Ethnopharmacology*, 188:159-166. doi:10.1016/j.jep.2016.04.061

- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). 'AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility'. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16):2785-2791. doi:10.1002/jcc.21256
- Mosmann, T. (1983). 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays'. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nanjan, M., Mohammed, M., Kumar, B. P., & Chandrasekar, M. (2018). 'Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review'. *Bioorganic Chemistry*, 77, 548-567. doi:10.1016/j.bioorg.2018.02.009
- Navarrete-Vázquez, G., Torres-Gómez, H., Hidalgo-Figueroa, S., Ramírez-Espinosa, J. J., Estrada-Soto, S., Medina-Franco, J. L., León-Rivera, I., Alarcón-Aguilar, F.J. & Almanza-Pérez, J. C. (2014). Synthesis, in vitro and in silico studies of a PPAR $\gamma$  and GLUT-4 modulator with hypoglycemic effect. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(18), 4575-4579. doi:10.1016/j.bmcl.2014.07.068
- Nogara, P. A., Saraiva, R. D., Bueno, D. C., Lissner, L. J., Corte, C. L., Braga, M. M., Rosemberg, D.B. & Rocha, J. B. (2015). Virtual Screening of Acetylcholinesterase Inhibitors Using the Lipinski's Rule of Five and ZINC Databank. *BioMed Research International*, 2015, 1-8. doi:10.1155/2015/870389

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (2017), Health at a Glance 2017: OECD Indicators, OECD Publishing, Paris. [http://dx.doi.org/10.1787/health\\_glance-2017-en](http://dx.doi.org/10.1787/health_glance-2017-en)

Parimala, M., Debjani, M., Vasanthi, H. & Shoba, F. (2015) 'Nymphaea nouchali Burm . f . hydroalcoholic seed extract increases glucose consumption in 3T3-L1 adipocytes through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and insulin sensitization', *J. Adv. Pharm. Technol Res.* 6(4):183–189. doi: 10.4103/2231-4040.165013.

Rincón, A. R. y Carvajal, C. I. (2016) 'Capítulo 22. Bases Moleculares de la Diabetes Mellitus', en Salazar Montes, Adriana María Sandoval Rodríguez, Ana Soledad Armendáriz Borunda, J. (ed.) *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud.* 2 edición. México, pp. 204–2017.

García, A. G., Paniagua, J. S., & Aguilar, C. Á. (2005). Uso de hipoglucemiantes orales en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Atención Primaria*, 35(7), 348-352. doi:10.1157/13074292

Wang, S., Awad, K. S., Elinoff, J. M., Dougherty, E. J., Ferreyra, G. A., Wang, J. Y., Cai, R., Sun, J., Ptasinska, A. & Danner, R. L. (2015). 'G Protein-coupled Receptor 40 (GPR40) and Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ): An integrated two-receptor signaling pathway'. *Journal of Biological Chemistry*, 290(32), 19544-19557. doi:10.1074/jbc.m115.638924