



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Síntesis y Evaluación de Compuestos Quiméricos
Derivados de Donepezilo y Vilazodona Dirigidos a
Blancos Importantes en el Alzheimer y la Depresión**

Tesis que presenta

Jazmín Contreras Sánchez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa

San Luis Potosí, S.L.P., marzo de 2026



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Síntesis y evaluación de compuestos quiméricos derivados de donepezilo y vilazodona dirigidos a blancos importantes en el alzheimer y la depresión**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Jazmín Contreras Sánchez** y aprobada el **23 de octubre de 2025** 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. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa
Director de la tesis

Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Lucia Mendoza Viveros
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Farmacología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No.1001046 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Dedicatorias

Este trabajo de tesis está dedicado a mis padres por su amor y apoyo incondicional y aquellos seres que me han ayudado a crecer y evolucionar en la vida.

Agradecimientos

Agradezco sinceramente al Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa, quien me recibió en su laboratorio y me brindó su orientación, confianza y apoyo durante todo este proceso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por el apoyo y la oportunidad de estudiar la maestría.

A mi comité tutorial, Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda y Dra. Lucia Mendoza Viveros, por todas sus aportaciones al trabajo.

Al Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda por su apoyo en la parte de Espectrometría de masas y RMN.

A la Dra. Genessis Montalvo Guevara por su apoyo durante el desarrollo de mi tesis en el laboratorio, en específico en la parte del ensayo sobre AchE.

A mis maestros, por compartir su conocimiento y formar parte de mi camino académico.

A mi familia, por su amor incondicional y por ser siempre mi mayor apoyo.

A Dios por ser mi guía en el camino.

Contenido

| | |
|--|--------------------------------------|
| Constancia de aprobación de la tesis | Error! Bookmark not defined. |
| Créditos Institucionales | Error! Bookmark not defined. |
| Acta de examen | Error! Bookmark not defined. |
| Dedicatorias | Error! Bookmark not defined. |
| Agradecimientos | Error! Bookmark not defined. |
| Lista de figuras | iError! Bookmark not defined. |
| Anexos | xi |
| Abreviaturas | Error! Bookmark not defined. |
| Glosario | Error! Bookmark not defined. |
| Resumen | Error! Bookmark not defined. |
| Abstract | Error! Bookmark not defined. |
| | |
| Introducción | 1 |
| Antecedentes | 4 |
| Enfermedad de alzheimer | 4 |
| Definición y epidemiología del alzheimer | 4 |
| Tipos de EA | 4 |
| Histopatología de la EA | 5 |
| Diagnóstico de la EA | 5 |
| Depresión | 6 |
| Definición y epidemiología de la depresión | 6 |
| Asociación entre el alzheimer y la depresión | 6 |
| Epidemiología de la ea con espectro depresivo | 7 |
| Fisiopatología que relaciona la depresión con el alzheimer | 7 |
| Tratamiento farmacológico actual | 10 |
| Tratamiento del alzheimer | 10 |
| Tratamiento de la depresión | 12 |
| Fármacos quiméricos | 13 |
| Estrategias de diseño de los fármacos quiméricos | 15 |
| Estudios actuales con vilazodona-tacrina y vilazodona-donepezilo | 16 |
| Planteamiento del problema | 18 |
| Justificación | 19 |
| Objetivos | 21 |
| Objetivo general | 21 |
| Objetivos específicos | 21 |
| Material y métodos | 22 |

| | |
|--|----|
| Diseño molecular de compuestos quiméricos basados en farmacoforos dirigidos a acetilcolinesterasa y al receptor serotoninérgico 5-ht1a | 22 |
| Parte química: síntesis de los compuestos quiméricos 1 y 2 | 23 |
| Metodología general de la síntesis del compuesto quimérico 1 | 23 |
| Metodología general de la síntesis del compuesto quimérico 2 | 24 |
| Parte de purificación: purificación del compuesto 1 y 2 | 25 |
| Purificación del compuesto 1 mediante columna cromatográfica | 26 |
| Purificación del compuesto 2 mediante lavado con disolvente | 26 |
| Evaluación biológica: determinación del perfil de toxicidad y la actividad inhibitoria | 26 |
| fundamento del ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa | 27 |
| Ensayo de toxicidad utilizando <i>artemia salina</i> de los compuestos 1 y 2 | 27 |
| Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa de los compuestos 1 y 2 | 28 |
| Parte computacional: acoplamiento molecular de los compuestos 1 y 2 | 29 |
| Estudios de acoplamiento molecular de compuesto 1 y 2 | 29 |
| Resultados y discusión | 31 |
| Propiedades fisicoquímicas de los compuestos sintetizados 1 y 2 | 31 |
| Parte química: | 32 |
| Síntesis de los compuestos 1 y 2: | 32 |
| Parte de purificación | 33 |
| Purificación de los compuestos 1 y 2 | 33 |
| Parte de caracterización | 34 |
| Caracterización estructural por resonancia magnética nuclear del compuesto 1 | 34 |
| Identificación por espectrometría de masas del compuesto 1 | 38 |
| Caracterización estructural por resonancia magnética nuclear del compuesto 2 | 40 |
| Identificación por espectrometría de masas del compuesto 2 | 44 |
| Evaluación biológica | 45 |
| Ensayo de toxicidad con <i>artemia salina</i> de los compuestos 1 y 2 | 45 |
| Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa de los compuestos 1 y 2 | 47 |
| Comparación y propuesta de modificación estructural | 50 |
| Parte computacional | 51 |
| Protocolo de acoplamiento molecular del compuesto 1 y 2 sobre el receptor AChE humana y 5HT1A | 51 |
| Acoplamiento molecular e interacciones moleculares del compuesto 1 y 2 sobre el receptor AChE humana | 55 |
| Acoplamiento molecular e interacciones moleculares del compuesto 1 y 2 sobre el receptor 5ht1a | 57 |
| Conclusiones | 60 |
| Referencias | 62 |
| Anexos | 65 |

Lista de figuras

1. Posible mecanismo dependiente de SKC que vincula la EA y la depresión (Hasan et al., 2023). **Error! Bookmark not defined.**
2. Estructura 2D del Donepezilo (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2024). **Error! Bookmark not defined.**
3. Estructura 2D de Vilazodona (National Center for Biotechnology Information, 2024). **Error! Bookmark not defined.**
4. Descripción general de compuestos quiméricos con diversidad de estructuras: (a) ejemplos de quimeras analizadas en la Perspectiva, donde la fracción enlazadora está resaltada en azul; (b) estructuras generales de compuestos quiméricos (Borsari et., 2020). **Error! Bookmark not defined.**
5. Estrategias de diseño utilizadas en el enfoque de combinación de marcos: híbrido enlazado (A); el enlazador está coloreado en naranja), híbrido fusionado (B); híbrido combinado (C). Los elementos en diferentes colores representan diferentes fragmentos estructurales dentro de cada farmacóforo (Sampietro et al., 2022). **Error! Bookmark not defined.**
6. Reaccion de sustitucion nucleofilica para la obtencion del compuesto 1 **Error! Bookmark not defined.**
7. Reacción de sustitución nucleofilica para la obtención del compuesto 2. **Error! Bookmark not defined.**
8. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 1 adquirido en CDCl_3 . Espectro completo con sus asignaciones correspondientes. **Error! Bookmark not defined.**
9. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 1 adquirido en CDCl_3 . Espectro completo. **Error! Bookmark not defined.**
10. A. Espectro de masas en modo de ionización electrospray positivo (ESI^+), mostrando el ion cuasimolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 293.17594. **Error! Bookmark not defined.**
11. Espectro de ^1H -RMN del compuesto 2, adquirido en DMSO-d_6 , mostrando el espectro completo con sus asignaciones correspondientes. 43

| | |
|---|-------------------------------------|
| 12. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 2, adquirido en DMSO- d_6 . Espectro completo. | 44 |
| 1. A. Espectro de masas en modo de ionización electrospray positivo (ESI $^+$), mostrando el ion cuasimolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 293.17594. | 46 |
| 14. Ensayo de toxicidad con el modelo de Artemia (compuesto 1). | Error! |
| Bookmark not defined. | |
| 15 Ensayo de toxicidad con el modelo de Artemia (compuesto 2). | Error! |
| Bookmark not defined. | |
| 16. Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (compuesto 1). | 50 |
| 17. Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (compuesto 2). | Error! Bookmark not defined. |
| 18. Comparación del ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (compuesto 1 y 2). | Error! Bookmark not defined. |
| 19. Sobreposición (overlay) del confórmero del acoplamiento molecular del ligando donepezilo (color rosa) en el sitio catalítico de AChE, con la referencia del ligando co-cristalizado original (color azul) | Error! Bookmark not defined. |
| 20. Sobreposición (overlay) del confórmero del acoplamiento molecular del ligando vilazodona (color naranja) en el sitio catalítico de AChE, con la referencia del ligando co-cristalizado original (color azul). | Error! Bookmark not defined. |
| 21 A. 3D del compuesto 1 en la cavidad catalítica de AChE (transparente). B. 2D del compuesto 1 y sus interacciones polares. | Error! Bookmark not defined. |
| 22. A. 3D del compuesto 2 en la cavidad catalítica de AChE (transparente). B. 2D del compuesto 1 y sus interacciones polares. | Error! Bookmark not defined. |
| 23. A. 3D del compuesto 1 en la cavidad catalítica de 5HT1A (transparente). B. 2D del compuesto 1 y sus interacciones polares. | 59 |
| 24. A. 3D del compuesto 2 en la cavidad catalítica de 5HT1A (transparente). B. 2D del compuesto 1 y sus interacciones polares. | 60 |

Anexos

1. Condiciones de reacción para la síntesis de los compuestos quiméricos 1 y 2
Error! Bookmark not defined.
2. Representación esquemática detallada de la reacción de síntesis empleada para la obtención del compuesto quimérico 1 derivado de benzimidazol y piperazina. 66
3. Representación esquemática detallada de la reacción de síntesis empleada para la obtención del compuesto quimérico 2 derivado de benzimidazol y piperazina. 66

Abreviaturas

| | |
|-----------------------------------|---|
| EA. | Enfermedad de Alzheimer |
| OMS. | Organización Mundial de la Salud |
| MAO. | Monoaminoxidasa |
| 5-HT. | 5-hidroxitriptamina (serotonina) |
| NE. | Noradrenalina |
| AChE. | Acetilcolinesterasa |
| CREB. | Proteína del elemento de respuesta al AMPc |
| TDM. | Trastorno depresivo mayor |
| ISRS. | Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina |
| SKC. | Canales de potasio activados por calcio |
| DRN. | Núcleo del rafe dorsal |
| APP. | Proteína precursora amiloide |
| Aβ. | Beta amiloide |
| IL-1β, 6. | Citocinas proinflamatorias |
| BDNF. | Factor neurotrófico derivado del cerebro |
| TST. | Ensayo de suspensión de cola |
| NMDA. | <i>N</i> -metil-D-aspartato |
| TNF-α. | Factor de necrosis tumoral alfa |

Glosario

Serotonina. Neurotransmisor implicado en la regulación del estado de ánimo, el apetito y el sueño.

Acetilcolinesterasa. Enzima encargada de descomponer la acetilcolina en la sinapsis.

Proteína precursora amiloide. Proteína transmembrana que, al ser procesada anormalmente, puede generar péptidos beta amiloide.

Beta amiloide. Péptido resultante del procesamiento anormal de la APP, relacionado con procesos neurodegenerativos.

Factor neurotrófico derivado del cerebro. Proteína que favorece la supervivencia y el crecimiento de neuronas.

Proteína del elemento de respuesta al AMPc. Factor de transcripción implicado en plasticidad sináptica y memoria.

Núcleo del rafe dorsal. Región del tronco encefálico rica en neuronas serotoninérgicas.

Interleucinas. Moléculas señalizadoras involucradas en procesos inflamatorios cerebrales.

Monoaminoxidasa. Enzima encargada del metabolismo de neurotransmisores como la serotonina y la dopamina.

Noradrenalina. Neurotransmisor que participa en funciones como la atención, el estrés y el estado de ánimo.

N-metil-D-aspartato. Receptor glutamatérgico implicado en la plasticidad sináptica y el aprendizaje.

Canales de potasio activados por calcio. Tipo de canal iónico que regula la excitabilidad neuronal.

Factor de necrosis tumoral alfa. Citocina proinflamatoria implicada en la neuroinflamación.

Ensayo de suspensión de cola. Prueba conductual utilizada para evaluar comportamientos depresivos en roedores.

Resumen

Síntesis y evaluación de compuestos quiméricos derivados de donepezilo y vilazodona dirigidos a blancos importantes en el Alzheimer y la depresión

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que afecta principalmente a personas mayores. Estudios recientes han demostrado una alta comorbilidad entre la EA y depresión, además una posible interacción entre ambos padecimientos a nivel neuroquímico. La terapia tradicional ha estado enfocada en un solo blanco terapéutico, como la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en EA y el receptor 5-HT1A en depresión. Sin embargo, esta estrategia presenta limitaciones en cuanto a eficacia clínica y efectos secundarios. Por ello, se han desarrollado enfoques que combinan múltiples blancos terapéuticos, como la inhibición de AChE y la inhibición de la recaptura de serotonina en la hendidura sináptica, los cuales están implicados en la regulación del estado de ánimo y en procesos cognitivos. Por ello existe la necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos multifuncionales que actúen simultáneamente sobre blancos claves involucrados en la EA y en los síntomas depresivos asociados, con el fin de mejorar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos adversos. Nuestro objetivo fue desarrollar y evaluar un nuevo prototipo farmacológico quimérico dirigido a la AChE en la EA y 5-HT1A en la depresión. Para llevar a cabo esto, se utilizaron estrategias de síntesis orgánica para la obtención de los compuestos híbridos, tomando como estructuras base de fármacos conocidos como Donepezilo (inhibidor de AChE) y Vilazodona (agonista parcial 5-HT1A). Se realizó la caracterización de los compuestos a través de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (RMN). La evaluación biológica incluyó ensayos de toxicidad con el modelo de *Artemia salina* y ensayos *in vitro* para determinar la inhibición de la AChE. Como resultados se logró la síntesis de dos compuestos híbridos con diferentes perfiles estructurales. El compuesto **1** mostró una baja toxicidad a diferencia del compuesto **2** que fue alta. Además, el compuesto **1** mostró una inhibición mayor de la enzima AChE en comparación con el compuesto **2** que fue menor. La caracterización del compuesto **1** se confirmó tras la correcta asignación de sus señales de protón y carbono presentes en la estructura. En conclusión, ambos compuestos mostraron niveles bajos de inhibición de AChE, sin embargo, el compuesto **1** destacó por presentar una menor toxicidad y una inhibición ligeramente superior, lo que sugiere que podría ser una mejor base estructural para futuras optimizaciones.

PALABRAS CLAVE. Inhibidores multitarget, diseño racional de fármacos, neuropsicofarmacología, acetilcolinesterasa, serotonina, evaluación farmacológica *in vitro*.

Abstract

Synthesis and evaluation of donepezil-vilazodone chimeric compounds targeting important targets in Alzheimer's disease and depression

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that mainly affects older people. Recent studies have shown a high comorbidity between Alzheimer's disease and depression, as well as a possible interaction between the two conditions at the neurochemical level. Traditional therapy has focused on a single therapeutic target, such as the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in AD and the 5-HT_{1A} receptor in depression. However, this strategy has limitations in terms of clinical efficacy and side effects. Therefore, approaches have been developed that combine multiple therapeutic targets, such as AChE inhibition and serotonin reuptake inhibition in the synaptic cleft, which are involved in mood regulation and cognitive processes. Therefore, there is a need to develop new multifunctional therapeutic agents that act simultaneously on key targets involved in Alzheimer's disease and associated depressive symptoms, to improve treatment efficacy and reduce adverse effects. Thus, our objective is to develop and evaluate a new chimerical pharmacological prototype targeting AChE in AD and 5-HT_{1A} in depression. To achieve this, organic synthesis strategies were used to obtain the hybrid compounds, taking as base structures known drugs such as Donepezil (AChE inhibitor) and Vilazodone (5-HT_{1A} partial agonist). The compounds were characterized by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR). Biological evaluation included toxicity assays with the *Artemia salina* model and *in vitro* assays to determine AChE inhibition. As a result, the synthesis of two hybrid compounds with different structural profiles was achieved. Compound 1 showed a low toxicity in contrast to compound 2, which was high, and compound 1 showed a higher inhibition of the AChE enzyme compared to compound 2, which was lower. The characterization of compound 1 was confirmed after the correct assignment of the protons and carbons present in the structure, using ¹H and ¹³C NMR spectra. In conclusion, both compounds showed low levels of AChE inhibition, however, compound 1 stood out as having lower toxicity and slightly higher inhibition, suggesting that it could be a better structural basis for future optimizations.

KEY WORDS. Multitarget inhibitors, rational drug design, neuropsychopharmacology, acetylcholinesterase, serotonin, *in vitro* pharmacological evaluation.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia, en la que están involucrados aspectos genéticos, de salud, ambientales y de estilo de vida (National Institute on Aging, 2024). Se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo que afecta la memoria, el pensamiento y el comportamiento, atañendo principalmente a la población adulta mayor con una alta prevalencia. Según la OMS, la EA representa entre el 60% y 70% de los casos de demencia en el mundo, con proyecciones de un incremento significativo en las próximas décadas, particularmente en países de América Latina como México, Chile y Brasil (World Health Organization, 2023). Entre las causas de aparición y progresión de la EA se destaca la depresión como un componente relevante en esta relación, definida como una enfermedad común y grave que afecta negativamente la manera de sentir, pensar y actuar (American Psychiatric Association, 2024).

La depresión es un trastorno de la salud mental común que afecta alrededor de 280 millones de personas en el mundo, presenta una comorbilidad significativa con la EA, especialmente en las personas de edad avanzada (World Health Organization, 2023). La depresión de inicio tardío no solo es un síntoma frecuente en pacientes con EA, sino que también se ha identificado como un factor de riesgo para su desarrollo. Estudios recientes sugieren una relación bidireccional entre ambas condiciones, donde la depresión no solo puede desencadenar el deterioro cognitivo asociados al Alzheimer, sino también exacerbar su progresión en cualquier etapa de la enfermedad (Huang et al., 2024; Yin et al., 2024).

Dado que tanto la EA como la depresión comparten procesos fisiopatológicos como la neuroinflamación crónica y las alteraciones en el sistema serotoninérgico, es importante comprender los mecanismos subyacentes que las conectan. En particular, la depresión en humanos ha sido vinculada con procesos neuroinflamatorios (Sălcudean et al., 2025). Hay estudios en modelos animales que muestran que ratas tratadas con lipopolisacáridos (LPS) para inducir

neuroinflamación, tienen conductas similares a las depresivas. Además, estos estudios han revelado un aumento significativo en los niveles de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β) y un deterioro en los procesos de autofagia (Ali et al., 2020; W. Li et al., 2021). En otro estudio con un modelo animal de ratas Wistar mixto de trastorno depresivo mayor (TDM) y EA se observó que al someterse a un protocolo de estrés crónico leve (CMS) durante 40 días y a una cirugía estereotáxica para la administración intrahipocámpal de péptido amiloide-beta (A β) o líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) induce un deterioro cognitivo y conducta anhedónica, además de aumentar los niveles de TNF- α e IL-1 β en la corteza frontal y reducir los niveles de IL-10 en el hipocampo (Zabot et al., 2024).

Además de la neuroinflamación, la disfunción colinérgica es otro factor importante que conecta la depresión con la EA. Estudios con ratones hembra 3 \times Tg-AD envejecidos mostraron un comportamiento similar a la depresión y una función cognitiva deteriorada. También mostraron disminuciones significativas en los niveles de acetilcolina en el hipocampo. Además, la expresión del receptor adrenérgico alfa 1a (ADRA1A), el receptor de serotonina 1A (5HT1A) y la subunidad alfa-2 del receptor de ácido γ -aminobutírico A (GABRA2) se reguló significativamente a la baja en el hipocampo (Zhang et al., 2023). Por lo tanto, es esencial considerar tanto las estrategias terapéuticas actuales como las posibles innovaciones para tratar ambas patologías de manera efectiva. Los tratamientos actuales para cada patología en particular son medios eficientes para ciertos síntomas. Además, se ha documentado que los medicamentos para la EA no surten efecto en todos los casos y pueden perder su eficacia con el tiempo (MAYO CLINIC, 2024), por ello se requieren nuevas estrategias farmacológicas que puedan aliviar los síntomas depresivos y de la EA simultáneamente. En este aspecto, el desarrollo de fármacos quiméricos se ha utilizado por su enfoque donde a través de la combinación de dos o más entidades farmacológicas activas en una sola molécula, puede mejorar la eficacia, reducir efectos secundarios, alcanzar propiedades sinérgicas, etc. Se ha documentado que las quimeras derivadas de vilazodona y donepezilo, mostraron un buen potencial para ser

desarrolladas como un tratamiento prospectivo para la comorbilidad de la EA y la depresión (X. Li et al., 2022). Vilazodona es un antidepresivo que actúa como un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS) y un agonista parcial del receptor 5HT1A, lo que mejora los niveles de serotonina en el cerebro (Lucena MI et al., 2020). Por otro lado, donepezilo es un inhibidor de la acetilcolinesterasa que se utiliza principalmente para tratar los síntomas cognitivos de la EA al aumentar los niveles de acetilcolina en el cerebro (Kumar et al., 2024). Al combinar las propiedades de ambos, estas quimeras podrían abordar tanto los síntomas neuropsiquiátricos como los cognitivos. En otro estudio se demostró que los híbridos de vilazodona-tacrina aportaron una idea novedosa para el descubrimiento de fármacos para la depresión con deterioro cognitivo (Liu et al., 2018).

ANTECEDENTES

Enfermedad de Alzheimer

Definición y epidemiología del Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es el tipo más común de demencia y más frecuente en las personas adultas mayores, es una enfermedad neurodegenerativa notoria caracterizada por pérdida de memoria y disfunción cognitiva que causa una disminución progresiva de las habilidades cognitivas, conductuales y sociales de una persona y afecta su capacidad para funcionar de forma independiente (X. Li et al., 2022; Raheja & Girdhar, 2023).

Según la OMS, más de 55 millones de personas tienen demencia en todo el mundo, donde el EA representa entre 60% y un 70% de los casos. Cada año, hay casi diez millones de casos nuevos (World Health Organization, 2023). Se prevé que casi se triplique para 2050 en los países latinoamericanos Chile, Brasil, Colombia y México (Mena, 2022; World Health Organization, 2023).

Tipos de EA

La EA tiene una clasificación de acuerdo a la edad de aparición. Estos tipos no solo están determinados por la edad, sino también en su progresión clínica y los cambios en la calidad de vida. Son clasificados de la siguiente forma:

- Alzheimer de aparición temprana. Este tipo es poco frecuente (5%), se presenta en personas menores de 65 años, por lo general se les diagnostica la enfermedad entre 40 y 50 años. En esta etapa se presentan cambios cerebrales como el desarrollo de placas y ovillos, pérdida del volumen cerebral y relación con defectos genéticos.
- Alzheimer de aparición tardía. Es el tipo más común de la enfermedad y afecta a personas mayores de 65 años o más y puede ser hereditaria (Asociación de Alzheimer, 2022).

Histopatología de la EA

La enfermedad de Alzheimer es una de las principales causas de demencia. Se han identificado alteraciones histológicas distintivas en el encéfalo que permiten su diagnóstico. A nivel macroscópico, se nota el adelgazamiento de las circunvoluciones (atrofia cerebral), particularmente en los lóbulos parietales y temporales. Microscópicamente, las neuronas afectadas presentan acumulaciones de filamentos anormales, que forman madejas con forma de llama conocidas como ovillos neurofibrilares, compuestos principalmente por la proteína tau, la cual está asociada a los microtúbulos neuronales. Además, se observa la deposición extracelular de amiloide, que se agrupa junto a dendritas distorsionadas, generando las llamadas placas seniles. Estas placas son depósitos de proteína amiloide, derivados de la escisión de la proteína precursora beta-amiloide (APP), cuya acumulación es característica de las lesiones maduras en la enfermedad (Stevens et al., 2003).

Diagnóstico de la EA

Anteriormente la única forma concluyente de diagnosticar el Alzheimer era realizando una autopsia del tejido cerebral del paciente y determinando si el sujeto tenía Alzheimer o cualquier otra forma de demencia (López et al., 2004). Actualmente, el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer se basa principalmente en la tomografía por emisión de positrones (PET) y el análisis de proteínas en el líquido cefalorraquídeo (LCR). La tau fosforilada (P-tau181) se utiliza como biomarcador confirmatorio, ya que se acumula en el cerebro y se secreta al LCR, pudiendo detectarse también en sangre. Las exploraciones PET, con ligandos como florbetapir, florbetaben y flutemetamol, muestran una alta precisión diagnóstica, con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 96%, aunque su alto coste limita su uso generalizado. El análisis del LCR, que evalúa los niveles de P-tau, A β 42 y tau total, es más accesible, aunque invasivo, con una precisión del 85-90%. Ambos métodos sugieren que el diagnóstico temprano,

previo a la aparición de los síntomas, es clave, ya que los cambios patológicos se inician décadas antes del deterioro cognitivo (Khan et al., 2020).

Depresión

Definición y epidemiología de la depresión

La depresión es un trastorno mental común que se caracteriza principalmente por alteraciones del estado de ánimo, disminución de la atención y concentración y sentimientos de baja autoestima o la pérdida del placer o el interés por actividades durante largos períodos de tiempo (Huang et al., 2024; World Health Organization, 2023)

Se estima que el 3,8% de la población experimenta depresión, incluido el 5% de los adultos (4% entre los hombres y el 6% entre las mujeres) y el 5,7% de los adultos mayores de 60 años. A escala mundial, aproximadamente 280 millones de personas sufren depresión. La depresión es aproximadamente un 50% más frecuente entre las mujeres que entre los hombres (World Health Organization, 2023).

Asociación entre el Alzheimer y la depresión

Se reconoce que la depresión, especialmente la de aparición tardía, se asocia con un mayor riesgo de desarrollo de EA, como uno de los síntomas psiquiátricos comórbidos más frecuentes que lleva consigo a un deterioro cognitivo, como deficiencia de concentración, procesamiento de información, memoria y disfunción ejecutiva (X. Li et al., 2022; Liu et al., 2018). Un estudio reciente encontró que la depresión y el deterioro cognitivo exhiben una relación bidireccional (Yin et al., 2024). En concreto, la depresión en la mediana edad o en la vejez aumenta el riesgo de padecer EA, y los pacientes con EA son más propensos a desarrollar depresión, los pacientes con EA de inicio temprano son más susceptibles a niveles elevados de depresión, lo que puede atribuirse a alteraciones significativas del

estilo de vida, dificultades en la adaptación social y una progresión más rápida de la enfermedad. Por el contrario, los pacientes con EA de inicio tardío pueden experimentar una depresión más persistente, que probablemente esté influenciada por factores contextuales como la discapacidad física. Mientras tanto, la depresión puede acelerar la progresión de la EA en cualquier etapa (Huang et al., 2024).

Epidemiología de la EA con espectro depresivo

La prevalencia global del espectro depresivo en los pacientes con EA se encuentra entre el 38% (Huang et al., 2024). La prevalencia general agrupada de síntomas depresivos en la demencia es de aproximadamente el 38% al 40% y varía según la gravedad de la demencia.

Fisiopatología que relaciona la depresión con el Alzheimer

La disminución de serotonina, un neurotransmisor fundamental en la regulación del estado de ánimo ha sido implicada tanto a la depresión como a la EA. En particular, la reducción de la actividad serotoninérgica 5-HT conduce a la sobreexpresión de los canales de potasio activados por calcio (SKC) en el núcleo serotoninérgico principal, el núcleo del rafe dorsal (DRN), que es importante para la producción de serotonina y que está asociada con un aumento en el procesamiento amiloidogénico de la proteína precursora amiloide (APP), lo que conduce a la acumulación de beta-amiloide, un sello distintivo de la EA (**Figura 1**). La acumulación de placas de beta-amiloide interfiere con la comunicación neuronal y contribuye a la neurodegeneración. Además, la serotonina tiene influencia sobre la fosforilación de la proteína tau, que es crucial para la estabilidad de los microtúbulos neuronales. Cuando la proteína tau se fosforila de manera excesiva, se forman ovillos neurofibrilares que alteran las funciones neuronales, lo que también es característico de la EA (Babulal et al., 2020; Kawakami et al., 2022).

Tanto la depresión como la EA comparten una etiología inflamatoria cercana. Se ha observado que la inflamación crónica disminuye la producción de serotonina en el cerebro y reduce su disponibilidad en el espacio sináptico. Estos hallazgos se han demostrado en estudios en un modelo de ratón con enfermedad de Alzheimer que mostró una liberación deficiente de serotonina en el hipocampo debido a una relación de la interleucina-1 β con alteraciones en las proteínas de fusión/fisión mitocondrial y el deterioro de la memoria inducido por oligómeros de β -amiloide, (Batista et al., 2021; Tian et al., 2023). En general sugiere que el déficit de serotonina, especialmente en las áreas corticales, contribuye de manera significativa al desarrollo de la EA y la depresión. Además, en otro estudio con ratas que recibieron una inyección intraventricular (ICV) de anti-beta amiloide (A β 1–42), aumentó el comportamiento relacionado con la depresión y elevó significativamente los niveles de IL-1 β y TNF- α en el hipocampo. Se relaciona que las citocinas inflamatorias pueden afectar a los neurotransmisores monoaminérgicos y la respuesta inflamatoria puede causar alteraciones en la neurogénesis (Zhan et al., 2024). Por otro lado, la acumulación de beta-amiloide juega un papel clave en la exacerbación del proceso inflamatorio en la EA. Cuando la microglía entra en contacto con los agregados de A β , se produce una liberación de citoquinas proinflamatorias como la interleucina-1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), lo que perpetúa la inflamación y agrava el daño neuronal (Han & Ham, 2021). Además, los SKC podrían estar involucrados en el aumento del estado neuroinflamatorio al favorecer la activación de la microglía (**Figura 1**).

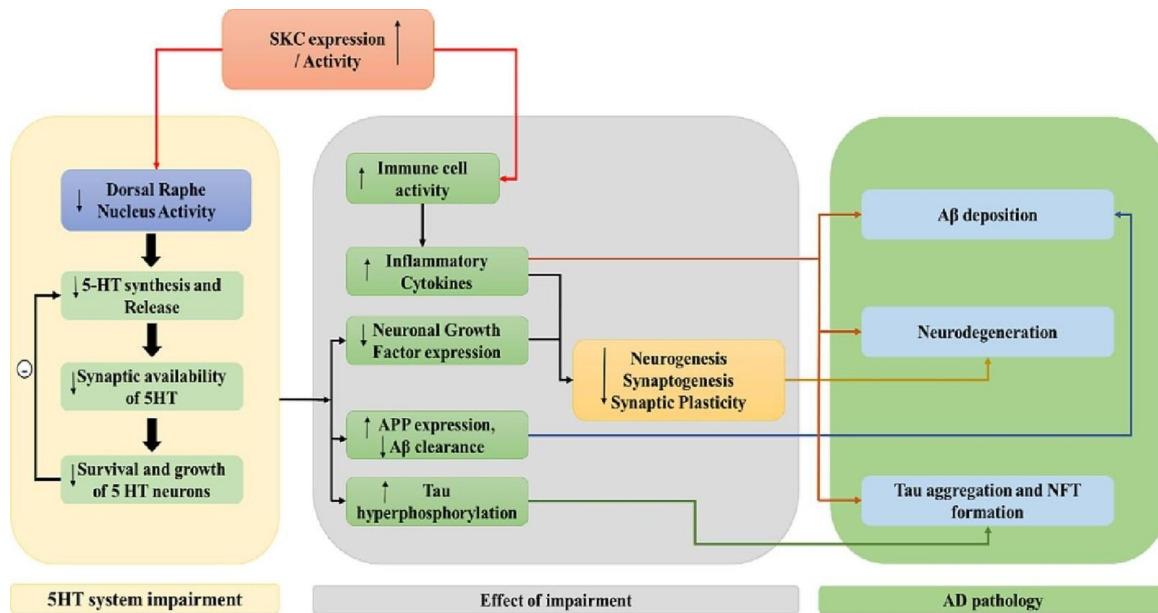


Fig. 2. Posible mecanismo dependiente de SKC que vincula la EA y la depresión (Hasan et al., 2023).

La neuroinflamación mediada por la activación de la microglía disminuye los factores de crecimiento como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Este factor es crucial para el proceso de neurogénesis y juega un rol importante en la plasticidad sináptica, que a su vez es vital para la protección neuronal (Khawagi et al., 2024). Adicionalmente, se ha identificado una notable relación entre el sistema serotoninérgico y el BDNF, la expresión del BDNF es estimulada a través de la vía de la proteína del elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB). A su vez, el BDNF promueve la supervivencia y el crecimiento de las neuronas que utilizan serotonina. Por lo tanto, una disminución de 5-HT mediada por SKC, en combinación con un estado inflamatorio persistente, puede resultar en una reducción de BDNF, lo que puede contribuir a procesos neurodegenerativos (**Figura 1**) (Hasan et al., 2023).

Algunos de estos efectos se han demostrado en modelos de ratones tratados con cepas bacterianas aisladas de la microbiota intestinal humana, entre ellas *Enterococcus mundtii* NK1516 que mostraban conductas similares a la depresión/ansiedad y mostraron una disminución de los niveles de BDNF y

serotonina en el hipocampo, además, hubo un aumento del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β e IL-6 (Joo et al., 2023).

Tratamiento farmacológico actual

Tratamiento del Alzheimer

El tratamiento de la EA tiene como objetivo ralentizar la progresión de los síntomas, ayudar a proporcionar a las personas comodidad, dignidad e independencia, así como mejorar su calidad de vida y también ayudar a sus cuidadores. Aunque no existe cura definitiva, los tratamientos actuales se centran principalmente en controlar el deterioro cognitivo y los síntomas conductuales. Las terapias farmacológicas actuales son:

Inhibidores de la acetilcolinesterasa como el donepezilo (**Figura 2**), rivastigmina y galantamina, constituyen la primera línea del tratamiento en las etapas de leve a moderadas. Estos medicamentos actúan inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa para evitar la descomposición de la acetilcolina, un neurotransmisor que ayuda a las células nerviosas a comunicarse entre sí y es clave en la memoria y el aprendizaje, su uso ha demostrado retrasar temporalmente el empeoramiento de los síntomas cognitivos y mejorar el funcionamiento diario de los pacientes (National Institute on Aging, 2023).

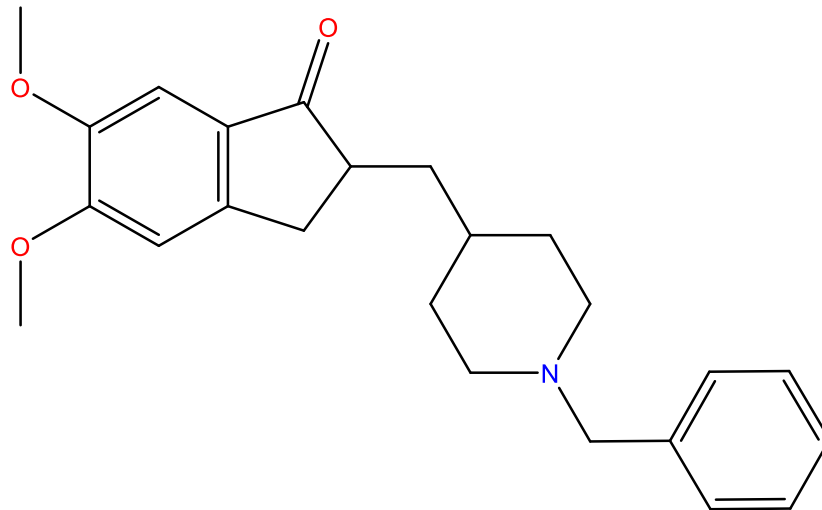


Fig. 3. Estructura 2D del Donepezilo (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2024).

Agonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), la memantina es otra opción para la etapa de moderada a severa. Este fármaco regula la actividad del glutamato, un neurotransmisor excitador que, en exceso puede contribuir a la neurodegeneración. La memantina ayuda a preservar algunas funciones cognitivas y a retrasar el avance de los síntomas en etapas avanzadas (National Institute on Aging, 2023; NHS, 2024)

Una opción de tratamiento centrada en inmunoterapia, en etapas tempranas, considera el uso del lecanemab y el donanemab, que son anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido beta-amiloide. Estos fármacos se unen selectivamente a las formas agregadas de A β en el cerebro, favoreciendo su eliminación y reduciendo la acumulación de placas que interfieren en la comunicación neuronal. Ambos han mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos de fase avanzada y recientemente fueron aprobados por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en etapas iniciales. Su mecanismo de acción está orientado a ralentizar la progresión de la enfermedad mediante la reducción de la carga amiloide, aunque continúan bajo evaluación para determinar la magnitud real de su beneficio clínico y los posibles efectos secundarios (Alzheimer's Association, 2024; National Institute on Aging, 2023).

Tratamiento de la depresión

Actualmente, la mayoría de los antidepresivos actúan mediante sistemas transmisores noradrenérgicos-serotonérgicos o inhibiendo la monoaminoxidasa (MAO) para reducir la degradación de la serotonina (5-HT) y la norepinefrina (NE) (Liu et al., 2018).

Los ISRS son una clase de medicamentos que se recetan con mayor frecuencia para tratar la depresión. A menudo se utilizan como farmacoterapia de primera línea para la depresión y otros numerosos trastornos psiquiátricos debido a su seguridad, eficacia y tolerabilidad (Chu & Wadhwa, 2024).

La vilazodona (**Figura 3**) es un ISRS y un agonista del receptor 5-HT_{1A}, que puede aumentar la concentración de serotonina en la hendidura sináptica. La serotonina, por su parte, es un neurotransmisor importante que existe ampliamente en el cerebro, desempeña un papel fundamental en la función cerebral normal. De esta manera, los agonistas del receptor 5-HT_{1A} desempeñan un papel importante en la terapéutica del TDM. Además, los ISRS, que pueden aumentar la cantidad de 5-HT disponible en el espacio sináptico, por lo que es una característica notable de los antidepresivos (X. Li et al., 2022).

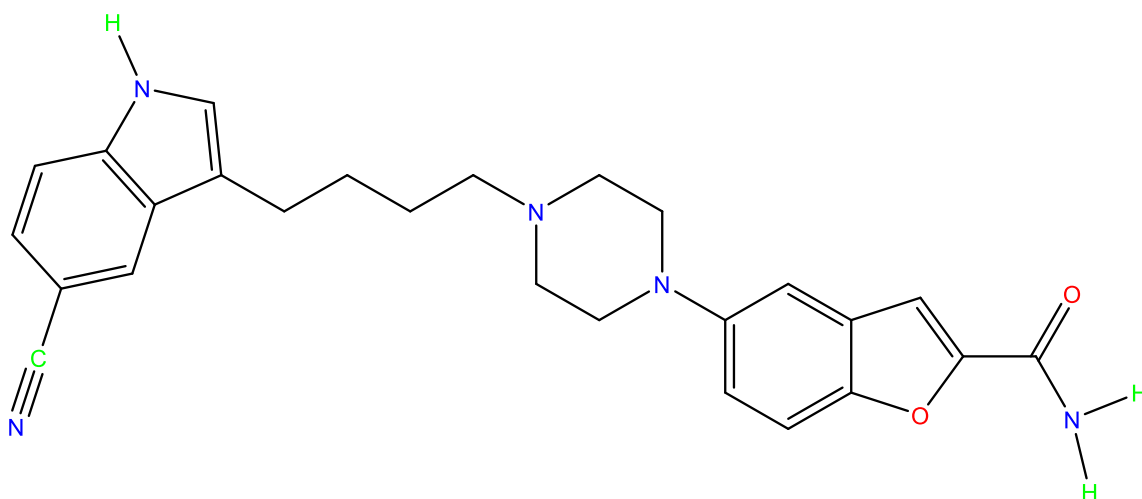


Fig. 4. Estructura 2D de Vilazodona (National Center for Biotechnology Information, 2024).

Fármacos quiméricos

Una molécula quimérica es una construcción diseñada en la que dos o más componentes se unen para formar un nuevo agente biológico. Las moléculas quiméricas pueden considerarse como variantes de una idea propuesta por Paul Ehrlich a fines del siglo XIX. Este concepto describe una molécula bifuncional en la que un componente dirige la molécula a una célula específica y el segundo componente ejerce una actividad farmacológica. Diferentes disciplinas han atribuido múltiples nombres a las moléculas de doble función (quimeras, híbridos, bioconjugados, compuestos bifuncionales, moléculas multidiana, compuestos diseñados) dependiendo del campo de aplicación, pero la estructura general se conserva.

Estas entidades muestran (i) una fracción de orientación y (ii) una molécula efectora dentro de la misma construcción química, y su función individual pueden modularse en gran medida con estrategias de química de conjugación apropiadas donde un enlazador es el elemento puente (**Figura 4**) (Borsari et al., 2020).

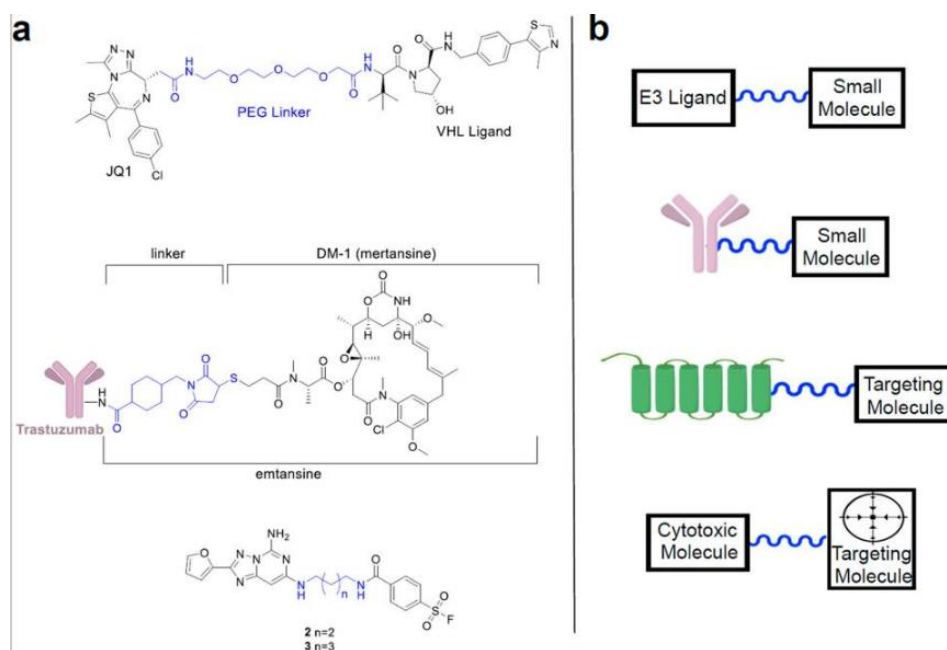


Fig. 5. Descripción general de compuestos quiméricos con diversidad de estructuras: (a) ejemplos de quimeras analizadas en la Perspectiva, donde la fracción enlazadora está resaltada en azul; (b) estructuras generales de compuestos quiméricos (Borsari et., 2020).

Actualmente, existen fármacos quiméricos en el mercado que han demostrado un éxito significativo en el tratamiento de diversas enfermedades. Un ejemplo destacado es sacubitrilo/valsartán, utilizado en el manejo de la insuficiencia cardíaca y la hipertensión. Este fármaco combina las actividades de bloqueo del receptor de angiotensina II (por valsartán) y la inhibición de la neprilisina (por sacubitrilo), ofreciendo un enfoque dual en la reducción de la carga cardiovascular.

En estudios clínicos de fase III, realizados para comparar la eficacia y seguridad del tratamiento frente a las opciones estándar, el uso de sacubitrilo/valsartán ha demostrado ser bien tolerado y seguro en pacientes con hipertensión leve a moderada. Además, los resultados mostraron una reducción más significativa de la presión arterial en comparación con otros tratamientos antihipertensivos, como el olmesartán (Rakugi et al., 2022). Este éxito clínico subraya la efectividad de los fármacos quiméricos en el tratamiento de enfermedades complejas mediante la acción sobre múltiples dianas terapéuticas.

Estrategias de diseño de los fármacos quiméricos

Los enlazadores o linkers

Los enlazadores son elementos clave en la química de fármacos quiméricos, ya que permiten la unión de diferentes fracciones moleculares o la conjugación de moléculas pequeñas con proteínas. Los diferentes tipos de enlazadores se eligen según el objetivo terapéutico, considerando si el blanco es intracelular o extracelular, y el tipo de célula o tejido que se busca alcanzar. Por ejemplo, para objetivos intracelulares, los enlazadores suelen incluir una fracción que puede escindirse una vez dentro de la célula, liberando el fármaco de manera controlada.

Un enlazador comúnmente utilizado es la hidrazona, que es estable a pH fisiológico y se rompe en condiciones ácidas. Ha sido ampliamente usada en síntesis de péptidos y en experimentos de proteómica debido a sus condiciones suaves de liberación. Además, el enlace disulfuro, reversible en condiciones fisiológicas, es otra opción frecuente, sobre todo en la ciclización de péptidos para mejorar su estabilidad y capacidad de unión a proteínas diana. Este enlace se utiliza en terapias peptídicas como la insulina y en la conjugación de fármacos con anticuerpos, lo que permite la liberación selectiva de agentes citotóxicos en células tumorales (Borsari et al., 2020).

Estrategia de combinación de farmacóforos

Los fármacos multidiana se desarrollan comúnmente mediante la estrategia de combinación de farmacóforos, que implica integrar dos o más fracciones farmacofóricas en una sola molécula. Esta combinación permite que el compuesto resultante interactúe eficazmente con objetivos biológicos específicos. Las uniones entre los farmacóforos pueden realizarse a través de un enlace, utilizando una cadena (**Figura 5 A**), o mediante la fusión de los farmacóforos sin elementos adicionales (**Figura 5 B**), o superponiendo motivos estructurales comunes (Sampietro et al., 2022).

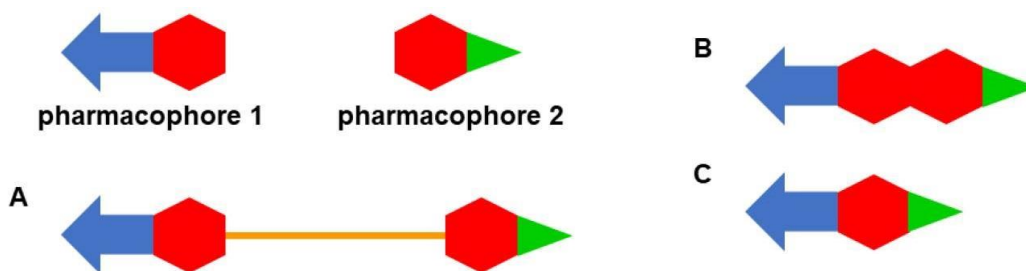


Fig. 6. Estrategias de diseño utilizadas en el enfoque de combinación de marcos: híbrido enlazado ((A); el enlazador está coloreado en naranja), híbrido fusionado (B); híbrido combinado (C). Los elementos en diferentes colores representan diferentes fragmentos estructurales dentro de cada farmacóforo (Sampietro et al., 2022).

La estrategia de farmacóforos enlazados a menudo produce moléculas más grandes y lipofílicas, pero su aplicación es sencilla y resulta particularmente útil para objetivos donde las regiones de unión están ocultas dentro de la proteína. En estos casos, un farmacóforo puede interactuar con el sitio de unión principal, mientras que un enlazador de geometría y longitud adecuadas posiciona el segundo farmacóforo en un sitio de unión secundario, lo que permite una unión dual y generalmente incrementa la potencia del fármaco. Al optar por híbridos fusionados o combinados, se eliminan elementos estructurales adicionales (enlazadores) o algunos componentes comunes, lo que resulta en un menor peso molecular y, potencialmente, propiedades fisicoquímicas más favorables y mayor similitud con fármacos existentes (Sampietro et al., 2022).

Estudios actuales con vilazodona-tacrina y vilazodona-donepezilo

Mediante una estrategia de diseño racional, se diseñaron, sintetizaron y evaluaron *in vitro* una serie de híbridos multifuncionales de vilazodona-tacrina contra la depresión y el deterioro cognitivo. La mayoría de los derivados exhibieron actividades inhibitorias considerables hacia AChE y BuChE. Además, la mayoría de ellos mostraron una gran actividad agonista de 5-HT, actividad inhibidora de la recaptación de 5-HT y una excelente permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Liu et al., 2018).

En otro estudio se mostró que a través del diseño de moléculas quiméricas con la estrategia de fusión de los farmacóforos clave del antidepresivo vilazodona y el fármaco de la EA donepezilo, fue bueno, ya que atenuó significativamente el comportamiento depresivo en el ensayo de suspensión de cola (TST) y mejoró el deterioro cognitivo en el ensayo de laberinto en Y en ratones (X. Li et al., 2022)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo crónico caracterizado por pérdida progresiva de memoria, deterioro cognitivo y limitación de las actividades cotidianas. Representa entre el 60 y 70% de los casos de demencia, y se estima que en el año 2050 la cifra de pacientes se triplicará, alcanzando los 152 millones a nivel mundial.

Uno de los síntomas comórbidos más relevantes asociados a la EA es la depresión, un trastorno mental común que afecta el estado de ánimo, la atención, la concentración y la autoestima. La prevalencia global de depresión en pacientes con EA se ha estimado en alrededor del 38 %. La relación entre ambas patologías es bidireccional: la depresión incrementa el riesgo de desarrollar EA en la mediana edad o en la vejez, y, a su vez, los pacientes con EA presentan mayor susceptibilidad a la depresión. Esta relación puede explicarse por mecanismos fisiopatológicos compartidos, incluyendo disfunción en el sistema serotoninérgico y procesos neuroinflamatorios.

A pesar de la relevancia de esta comorbilidad, los tratamientos disponibles continúan orientados principalmente a blancos individuales. Esta estrategia de "un fármaco – una diana" ha mostrado eficacia limitada y se asocia con efectos secundarios. En este contexto, surge el interés por el desarrollo de fármacos quiméricos, diseñados para actuar simultáneamente en múltiples blancos terapéuticos. Estos compuestos híbridos buscan modular tanto la actividad colinérgica (relacionada con la EA) como la serotoninérgica (implicada en la depresión), ofreciendo un enfoque integral frente a enfermedades de origen multifactorial.

De esta manera, el problema radica en que no existen aún terapias aprobadas que aborden de manera conjunta la EA y la depresión como comorbilidad, lo que limita la eficacia clínica y deja sin cubrir una necesidad terapéutica creciente en la población mundial.

JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de comorbilidades psiquiátricas afecta gravemente el progreso de la enfermedad, se suma a la carga médica y conduce a una mayor morbilidad y discapacidad en comparación con los pacientes sin comorbilidades.

Actualmente el tratamiento del Alzheimer tiene como propósito controlar el deterioro cognitivo y los síntomas conductuales, los medicamentos de primera línea son los Inhibidores de la acetilcolinesterasa (donepezilo, rivastigmina y galantamina). Estos medicamentos actúan inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa para evitar la descomposición de la acetilcolina, un neurotransmisor que ayuda a las células nerviosas a comunicarse entre sí y es clave en la memoria y el aprendizaje. Otra opción es el Agonista del receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA), (memantina) que regula la actividad del glutamato, un neurotransmisor excitador que, en exceso puede contribuir a la neurodegeneración.

En el tratamiento de la depresión la mayoría de los antidepresivos actúan mediante sistemas transmisores noradrenérgicos-serotonérgicos o inhibiendo la monoaminoxidasa (MAO) para reducir la degradación de la serotonina (5-HT) y la norepinefrina. Los medicamentos de primera línea son los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), (fluoxetina, fluvoxamina, sertralina y paroxetina). La vilazodona es un ISRS atípico ya que actúa como un ISRS y como un agonista del receptor 5HT1A que puede aumentar la concentración de serotonina en la hendidura sináptica.

Dado que actualmente no se han aprobado medicamentos específicamente para el tratamiento de la EA con comorbilidad de depresión para aliviar los síntomas y la progresión de la enfermedad, es importante buscar nuevas alternativas para abordar los síntomas comórbidos asociados a la EA. Una de ellas es la investigación sobre fármacos quiméricos que se basa en que un fármaco puede actuar en múltiples blancos terapéuticos, lo que podría mejorar la eficacia y reducir

la necesidad de usar múltiples medicamentos. Un ejemplo de ello es el diseño de moléculas quiméricas de Li y colaboradores con los farmacóforos del antidepresivo vilazodona y el medicamento de la EA donepezilo, que mostró una buena respuesta, para atenuar el comportamiento depresivo en el ensayo de suspensión de cola (TST) y mejorar el deterioro cognitivo en el ensayo de laberinto en Y en ratones.

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar y evaluar un nuevo prototipo farmacológico quimérico dirigido a los blancos acetilcolinesterasa en EA y serotonina en la depresión, así como evaluar el efecto de la actividad farmacológica en la inhibición de la acetilcolinesterasa.

Objetivos específicos

- Diseñar compuestos quiméricos con base en la estructura de donepezilo y vilazodona.
- Sintetizar compuestos quiméricos a través de reacciones químicas de sustitución nucleofílica bimolecular.
- Purificar compuestos quiméricos por cromatografía en columna.
- Caracterizar compuestos quiméricos mediante técnicas de espectroscopia de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.
- Evaluar la toxicidad de los compuestos quiméricos con el Ensayo de Toxicidad con *Artemia salina*.
- Evaluar la inhibición de los compuestos quiméricos para determinar el efecto inhibitorio sobre acetilcolinesterasa.
- Realizar el acoplamiento molecular de los compuestos para predecir la afinidad y el modo de interacción de los compuestos quiméricos con sus blancos terapéuticos (acetilcolinesterasa y receptores serotoninérgicos).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos de síntesis, purificación, evaluación biológica y simulaciones computacionales de los compuestos quiméricos fueron realizados en el laboratorio de Química Farmacéutica de la División de Biología Molecular en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., ubicado en San Luis Potosí, durante el periodo de abril de 2024 a abril de 2025. La caracterización estructural de los compuestos mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C (RMN) se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda.

Diseño molecular de compuestos quiméricos basados en farmacoforos dirigidos a acetilcolinesterasa y al receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}

La estrategia empleada para el diseño molecular se basó en la combinación de farmacoforos vinculados, seleccionados por su interacción específica con blancos terapéuticos clave en el tratamiento de la depresión y el Alzheimer. Se eligieron los siguientes elementos estructurales:

1. Farmacóforo de Donepezilo: Se seleccionó el grupo *N*-bencil piperidina, conocido por su contribución a la especificidad y afinidad del fármaco hacia la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Este grupo permite una interacción con el sitio activo de la enzima.
2. Farmacóforo de Vilazodona: Se seleccionó el grupo indol, responsable de la interacción con el transportador de serotonina (SERT) y el receptor 5-HT_{1A}, aumentando la disponibilidad sináptica de serotonina y actuando como agonista parcial. Para el diseño, este fragmento fue sustituido por un núcleo bencimidazólico utilizando la estrategia de *scaffold hopping*. También el grupo piperazina, fue conservado para mejorar la afinidad y selectividad hacia el receptor 5-HT_{1A}, así como para estabilizar la interacción y modular la actividad agonista parcial.

El diseño de las moléculas buscó la interacción simultánea de los compuestos quiméricos tanto con AChE como con 5-HT_{1A}.

PARTE QUIMICA: Síntesis de los compuestos quiméricos 1 y 2

Material y equipo:

- **Reactivos y disolventes:** Se emplearon los siguientes compuestos sin purificación adicional, a excepción del 2-clorometilbencimidazol empleado en la síntesis del compuesto **2**, el cual fue purificado previamente: 1-2 metilbencilpiperazina (Sigma-Aldrich, 97%, China), 2-clorometilbencimidazol (Sigma-Aldrich, 96%, China), 1-fenilpiperazina (Sigma-Aldrich, 97%, China). Como disolventes se utilizaron: diclorometano (DCM), tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo (CH₃CN), acetona, etanol y dimetilsulfóxido (DMSO), todos de calidad analítica. Además, se empleó trietilamina (TEA) como base y yoduro de potasio (KI) como aditivo para favorecer las reacciones.
- **Instrumentos y equipo:** Se utilizaron una balanza analítica (EQUIPAR, Sartorius, México); una plancha de calentamiento (EQUIPAR, StableTemp, México), un rotavapor (BUCHI, V-100, México); placas de cromatografía en capa fina (TLC) (Analytical Chromatography, TLC silica gel 60 F254, Alemania); una lámpara de luz ultravioleta (AnalytikJena, UVP UVGL-25, EE. UU.); matraces de fondo redondo de borosilicato (Pyrex, Staffordshire, Reino Unido); y un termómetro digital (Digi-Sense, EU); Determinador de punto de fusión (Stuart, SMO10, Reino Unido), ; Bomba de vacío (GAST, OCA-P704-AA, Michigan, EU).

Metodología general de la síntesis del compuesto quimérico 1

La obtención del compuesto **1** se llevó a cabo mediante una reacción de sustitución nucleofílica tipo SN₂ (**Figura 6**), utilizando como materias primas el 2-clorometilbenzimidazol y la 1-2-metilbencilpiperazina. Para ello, se pesaron 0.2 g del primer reactivo, y posteriormente se añadió 1.1 eq del segundo reactivo. Ambos compuestos se disolvieron en 2 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) y se mezclaron con trietilamina (TEA, 1.1 eq respecto al segundo reactivo) como base.

La mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación constante y en reflujo, a una temperatura controlada entre 38 y 40 °C, durante 8 h con 35 min.

El progreso de la reacción fue monitoreado mediante cromatografía en capa fina, utilizando placas de sílica gel y una fase móvil diclorometano-etanol (CH₂Cl₂-EtOH), 90:10. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta 254/365 nm para identificar la formación del producto deseado. Al finalizar la reacción, se eliminó el disolvente mediante rotavaporación, y el producto crudo se precipitó por adición de agua. Posteriormente, el sólido obtenido fue purificado, logrando una masa final de 0.163 g, lo que corresponde a un rendimiento del 37.21% en base al producto purificado. El desarrollo completo de la reacción de síntesis del compuesto **1** se presenta en anexos (**Diagrama 2**).

Las condiciones detalladas de la reacción, incluyendo cantidades, temperatura, disolvente y tiempo de reacción, se resumen en la **Tabla 1**, ubicada en el apartado de anexos.

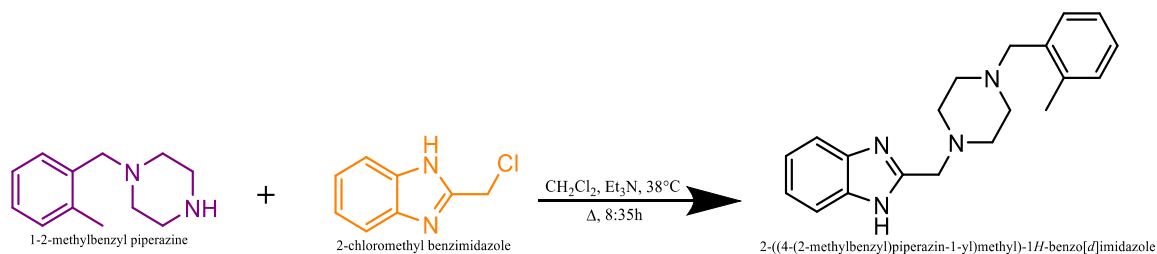


Fig. 7. Reaccion de sustitucion nucleofilica para la obtencion del compuesto **1**

Metodologia general de la sintesis del compuesto quimerico 2

Se empleó la reacción de sustitución nucleofílica SN₂ (**Figura 7**) utilizando como materias primas el 2-clorometilbenzimidazol y la 1-fenilpiperazina. Para ello, se pesaron 0.2 g del primer reactivo, y posteriormente se añadió 1.1 eq del segundo reactivo. Ambos compuestos se disolvieron en 2 mL de CH₃CN y se mezclaron con trietilamina (TEA, 1.1 eq respecto al segundo reactivo) como base. Previamente, se evaluaron otros disolventes como diclorometano, acetona, etanol y DMSO, los cuales no dieron lugar a la formación del producto. El desarrollo completo de la reacción de síntesis del compuesto **2** se presenta en anexos (**Diagrama 3**).

La reacción se mantuvo en reflujo a una temperatura controlada de 70 °C durante 13 h con 40 min. Se monitoreó mediante TLC utilizando una fase móvil acetato de etilo-acetona (EtOAc-Me₂CO) 90:10. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta 254/365 nm para identificar la presencia del producto final. Durante el desarrollo de la reacción, se formó un precipitado blanquecino que fue recuperado por filtración utilizando papel de filtro.

Las condiciones experimentales completas, como las proporciones molares, temperatura y elección del disolvente, se presentan en la **Tabla 1** del apartado de anexos.

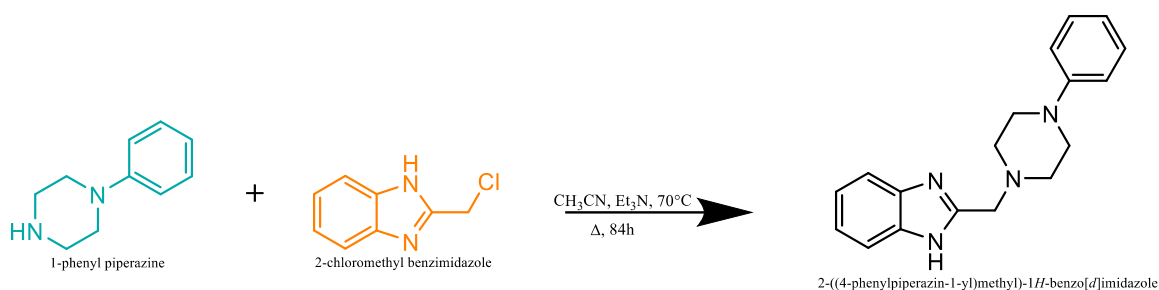


Fig. 8. Reacción de sustitución nucleofílica para la obtención del compuesto 2.

PARTE DE PURIFICACIÓN: Purificación del compuesto 1 y 2

Material y equipo:

- Para la purificación de los compuestos se utilizó una columna de vidrio para cromatografía en columna (30 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro), un rotavapor (BUCHI, V-100, México), placas de TLC (Analytical Chromatography, TLC silica gel 60 F254, Alemania), vasos de precipitado (DWK Life Sciences, KIMAX, EU.), embudos y material de vidrio estándar.

Purificación del compuesto 1 mediante columna cromatográfica

El compuesto **1**, obtenido tras la síntesis, fue purificado mediante cromatografía en columna con sílica gel como fase estacionaria. Se empleó un sistema de elución en gradiente, comenzando con una mezcla de diclorometano:etanol 98:2, la cual se ajustó progresivamente a 95:5 y finalmente a 90:10, con el fin de optimizar la separación del producto de posibles impurezas.

Las fracciones recolectadas fueron de entre 5 a 10 mL y posteriormente concentradas mediante rotavaporación para eliminar los disolventes. A lo largo del proceso, se monitoreó la separación mediante TLC utilizando placas de sílica, con detección bajo luz UV (254/365 nm), lo que permitió verificar la recuperación del producto purificado.

Purificación del compuesto 2 mediante lavado con disolvente

El compuesto **2**, obtenido como un sólido tras la filtración. Este se sometió a un proceso de purificación basado en lavados sucesivos con disolventes orgánicos para eliminar impurezas residuales. Se emplearon disolventes como acetato de etilo, etanol, diclorometano, acetonitrilo, acetona y cloroformo. Durante cada etapa del lavado, se monitoreó la limpieza del compuesto mediante TLC, utilizando placas de sílica y visualización bajo luz UV (254/365 nm).

Finalmente, se determinó que el lavado con cloroformo fue el más eficaz para la purificación del sólido, lo cual fue confirmado por el análisis por TLC. Además, se observó una leve formación de cristales durante este proceso. El sistema de elución empleado para el monitoreo cromatográfico fue cloroformo:acetona 90:10.

EVALUACION BIOLÓGICA: Determinación del perfil de toxicidad y la actividad inhibitoria

Material y equipo:

- Para la **evaluación de toxicidad** de los compuestos **1** y **2** se emplearon: un vaso de precipitado de 2 L para la incubación de los huevos de *Artemia salina*, una solución de NaCl al 3% para simular el ambiente marino, nauplios de *Artemia salina* (obtenidos tras incubación), una lupa con luz

incorporada (VERDEN, MO-022, China), micropipetas (10–1000 μL , ecopipette, NH10225, Suiza), y placas multipocillo (Costar, de 12 o 24 pocillos, según el ensayo). También se utilizó DMSO como vehículo para disolver los compuestos.

- Para la **evaluación de la actividad inhibitoria** sobre la enzima acetilcolinesterasa (AChE), se utilizó un kit comercial de *Acetylcholinesterase Assay* acetylcholinesterase inhibitor screening kit (MAK324, Sigma-Aldrich), con la enzima acetylcholinesterase from *E. electricus* (C3389, Sigma-Aldrich). El ensayo se realizó en microplacas de pocillos (96 pocillos, Costar, Suiza) con lectura en un espectrofotómetro de placa (ByoTek, Synergy HTX, USA.). También se utilizó equipo de cómputo con el programa Gen5® para el análisis de datos, un agitador vortex (CTR SCIENTIFIC, Mexico) para homogenizar las soluciones, multipipetas (JOANLAB, rango 50–300 μL , China), y DMSO al 10% como vehículo para la disolución de los compuestos.

Fundamento del ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa

El ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa se basa en la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina yoduro (ATCI) por acción de la enzima acetilcolinesterasa, generando tiocolina como producto. La tiocolina reacciona con el reactivo 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenceno-sulfónico) (DTNB), también conocido como reactivo de Ellman, produciendo un compuesto amarillo que absorbe a 412 nm. La intensidad de la absorbancia es directamente proporcional a la actividad enzimática.

Cuando se añade un inhibidor de la AChE (como los compuestos evaluados en este estudio), la reacción se ve disminuida o suprimida, reflejándose en una menor absorbancia. Esta disminución permite calcular el porcentaje de inhibición enzimática comparando con controles sin inhibidor.

Ensayo de toxicidad utilizando *Artemia salina* de los compuestos 1 y 2

Para llevar a cabo el ensayo de toxicidad, se incubaron huevos de *Artemia salina* en una solución salina (NaCl al 3%) durante 48 h, permitiendo la eclosión de los nauplios. Una vez obtenidos, se prepararon soluciones stock de los compuestos **1** y **2** a diferentes concentraciones: 1, 10, 25, 50, 70, 85 y 100 ppm. Los nauplios fueron distribuidos en placas multipocillo, colocando 10 organismos por pocillo en triplicado para cada concentración.

A cada pocillo se le añadió la solución correspondiente del compuesto en evaluación. Se mantuvieron en exposición durante 48 h a temperatura ambiente y bajo condiciones constantes de iluminación. Al finalizar el periodo, se contabilizaron los nauplios vivos y muertos con ayuda de una lupa, permitiendo determinar la toxicidad relativa de los compuestos y la concentración letal media (CL₅₀).

Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa de los compuestos 1 y 2

Se prepararon dos soluciones stock de los compuestos **1** y **2**, con concentraciones de 40 μ M y 200 μ M, disueltas en DMSO al 10%. A continuación, se dispusieron los pozos de una placa de ensayo de 96 pocillos con las soluciones de los compuestos, junto con los controles positivos (AChE con Donepezilo, usado como inhibidor de referencia a concentraciones de 1 μ M y 5 μ M) y negativos (AChE sin inhibidor). Las muestras fueron agitadas suavemente durante 15 min para favorecer la interacción entre los compuestos y la enzima. Las concentraciones de 1 μ M y 5 μ M se seleccionaron porque representan el rango micromolar comúnmente empleado en ensayos enzimáticos *in vitro* para evaluar la potencia inhibitoria inicial de nuevos compuestos, evitando la saturación del sitio activo de la enzima y posibles efectos inespecíficos. Este rango permite determinar si los compuestos poseen una afinidad inhibitoria real, comparable a los controles positivos, y distinguir aquellos con potencial para considerarse moléculas *hit* o *lead* en etapas tempranas de desarrollo farmacológico.

Mientras se agitaban las muestras, se preparó la mezcla de reacción en condiciones adecuadas según las instrucciones del kit. Finalmente, la placa fue transferida al espectrofotómetro y se añadió la mezcla reactiva a cada pocillo. La absorbancia fue registrada a 412 nm, a una temperatura constante de 27 °C,

permitiendo evaluar la actividad enzimática residual y calcular el porcentaje de inhibición inducido por los compuestos.

PARTE COMPUTACIONAL: Acoplamiento molecular de los compuestos 1 y 2

Estudios de acoplamiento molecular de compuesto 1 y 2

El acoplamiento molecular es una técnica ampliamente utilizada en estudios de diseño racional de fármacos, especialmente cuando se dispone de la estructura tridimensional del receptor, ya sea determinada por cristalografía de rayos X, espectroscopía de RMN o modelado por homología. Esta metodología permite predecir la estructura y la energía de unión aproximada de un complejo formado entre dos o más moléculas, dado un conjunto de coordenadas espaciales para los átomos involucrados.

El objetivo del acoplamiento molecular es estimar la conformación adoptada por una molécula (ligando) al interactuar con un sitio específico de una macromolécula (receptor), así como la orientación o "binding pose" que adopta dentro del sitio activo o cavidad. La energía libre de unión (ΔG) estimada durante este proceso considera diversos factores fisicoquímicos, como interacciones estéricas, electrostáticas, rigidez conformacional del receptor, formación de enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, efectos de desolvatación y factores entrópicos (rotacionales y traslacionales).

El procedimiento de acoplamiento molecular consta, en términos generales, de tres etapas principales:

1. Representación espacial del sistema (grid): se construye una malla tridimensional que almacena la contribución energética del receptor en diferentes regiones del espacio, facilitando la predicción de la interacción con el ligando.
2. Sampling: se realiza una búsqueda exhaustiva del espacio conformacional disponible para el ligando, permitiendo explorar diferentes orientaciones y conformaciones posibles en el sitio de unión.

3. Scoring: se evalúan las posibles soluciones obtenidas en el paso anterior mediante funciones de puntuación, las cuales estiman la energía libre de unión del complejo. Cuanto menor sea el valor de esta energía, mayor será la afinidad del ligando por el receptor.

Para el presente estudio, se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular con los compuestos **1** y **2**, con el fin de predecir su afinidad por los blancos terapéuticos de interés. Las estructuras de los compuestos fueron construidas y optimizadas energéticamente utilizando software de modelado molecular. Las proteínas blanco se descargaron del Protein Data Bank (PDB) en formato .pdb, seleccionando aquellas con buena resolución estructural. Para la acetilcolinesterasa humana (hAChE) se utilizó el complejo binario de la enzima nativa con donepezilo (código 6O4W, resolución: 2.35 Å). Para el receptor 5-HT1A, se empleó el complejo proteico Gi1 del receptor de serotonina 1A unido a vilazodona (código 8FYL, resolución: 2.94 Å). Posteriormente, las proteínas fueron preparadas eliminando moléculas de agua y ligandos co-cristalizados no deseados, y se añadieron los hidrógenos requeridos para mantener condiciones fisiológicas.

Se definieron los sitios activos basándose en la posición de ligandos co-cristalizados o regiones funcionales previamente reportadas. El proceso de acoplamiento fue ejecutado utilizando los programas AutoDock y MOE (Molecular Operating Environment). AutoDock permitió realizar el acoplamiento automatizado de estas moléculas con sus respectivos receptores, considerando interacciones flexibles. Por su parte, MOE facilitó tanto la preparación y visualización de los ligandos y proteínas, como el análisis detallado de los complejos proteína-ligando generados, evaluando interacciones clave como enlaces de hidrógeno, contactos hidrofóbicos y apilamientos π - π .

Finalmente, los resultados del acoplamiento permitieron estimar la energía de unión de cada compuesto con los blancos seleccionados, así como visualizar las principales interacciones que podrían explicar su afinidad y posible actividad biológica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades fisicoquímicas de los compuestos sintetizados 1 y 2



Una vez sintetizados los compuestos **1** y **2**, se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas con el fin de caracterizar los productos obtenidos y establecer comparaciones relevantes. La **Tabla 1** muestra los valores obtenidos para cada compuesto.

El compuesto **1** se obtuvo como un sólido de apariencia amarillo claro, con un rendimiento del 37.21%, un punto de fusión de 166 °C y un peso molecular de 320.44 g/mol. Su tiempo de reacción fue de 8 h con 35 min, lo que indica una reacción relativamente más rápida que la del segundo compuesto. Esta diferencia podría deberse a una mayor accesibilidad estérica entre los grupos reactivos o a una mejor solubilidad del sistema durante la reacción.

En contraste, el compuesto **2** mostró un rendimiento más alto del 56%, una apariencia blanquecina, un punto de fusión significativamente mayor de 237 °C y un peso molecular de 292.39 g/mol. Su tiempo de reacción fue de 13 h con 40 min, lo cual indica una cinética más lenta que podría atribuirse a la rigidez estructural del grupo bencilo unido a la piperazina, que limita la flexibilidad y dificulta la orientación efectiva de los reactivos durante la reacción.

Además, se observó que el compuesto **2** presentaba una solubilidad muy limitada en la mayoría de los disolventes utilizados. Apenas se disolvía en acetato de etilo, y su mejor solubilidad se obtuvo en cloroformo, lo que sugiere una naturaleza poco polar o una fuerte tendencia a la agregación debido a interacciones intermoleculares robustas. Esta baja solubilidad también está en concordancia con su elevado punto de fusión, lo que indica un empaquetamiento molecular más ordenado y una estructura sólida más estable. Estas propiedades fisicoquímicas refuerzan la hipótesis de que el compuesto posee una estructura rígida y densamente empaquetada, con escasa movilidad conformacional.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos **1** y **2**

| Compuesto | Estructura | Rendimiento (%) | P.f. | P.M (g/mol) | Apariencia Física | Tiempo de reacción (h) |
|-----------|------------|-----------------|------|-------------|---|------------------------|
| 1 | | 37.21 | 166 | 320.44 | Sólido amarillo  | 8:35 |
| 2 | | 56 | 237 | 292.39 | Sólido blanco  | 13:40 |

PARTE QUIMICA:

Síntesis de los compuestos 1 y 2:

Los compuestos sintetizados fueron obtenidos a partir de la reacción entre 2-clorometilbenzimidazol y diferentes derivados de piperazina, mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica. En la reacción **1** se utilizó como nucleófilo la 1-2-metilencilopiperazina, dando lugar al compuesto **2**-((4-(2-methylbenzyl)piperazin-1-yl)methyl)-1H-benzo[d]imidazole. Para la reacción **2**, el nucleófilo empleado fue la 1-fenilpiperazina, obteniéndose el compuesto **2**-((4-phenylpiperazin-1-yl)methyl)-1H-benzo[d]imidazole.

Durante la primera síntesis, la reacción procedió de forma relativamente limpia, permitiendo la obtención del producto tras un proceso de cromatografía en

columna. Sin embargo, en la síntesis del segundo compuesto se presentaron desafíos significativos, principalmente por la presencia de subproductos y material de partida sin reaccionar, lo cual dificultó la purificación del producto principal.

Ante estos inconvenientes, se decidió implementar una etapa de purificación previa del reactivo 2-clorometilbenzimidazol antes de su empleo en la reacción. Para ello, dicho intermediario fue sometido a cromatografía en columna utilizando un sistema de elución constituido por acetonitrilo/acetona 98:2. Esta etapa fue fundamental para eliminar impurezas arrastradas desde su síntesis o almacenaje, mejorando notablemente la calidad del producto final obtenido en la reacción **2**.

El desarrollo de ambas reacciones fue monitoreado mediante TLC, lo que permitió confirmar la formación de los productos y evaluar el avance de la conversión.

PARTE DE PURIFICACIÓN

Purificación de los compuestos 1 y 2

La purificación final de los compuestos sintetizados se llevó a cabo mediante cromatografía en columna y extracción con disolventes para una eliminación cuidadosa de impurezas orgánicas. En particular, el compuesto **2** presentó una solubilidad limitada en la mayoría de los disolventes evaluados, siendo el cloroformo uno de los pocos en los que mostró una disolución parcial, lo cual fue aprovechado para su aislamiento. Este comportamiento puede estar relacionado con su estructura más rígida y la presencia de interacciones intermoleculares más fuertes que dificultan su disolución.

En conjunto, estos resultados evidencian cómo la elección del nucleófilo y la calidad de los reactivos influye directamente en la eficiencia de la síntesis y en la complejidad del proceso de purificación, siendo crucial implementar estrategias previas de limpieza cuando se busca obtener productos con alta pureza estructural.

PARTE DE CARACTERIZACIÓN

Caracterización estructural por Resonancia magnética nuclear del compuesto 1

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) del compuesto **1** confirma la estructura propuesta al mostrar señales características consistentes con los núcleos de hidrógeno presentes en la molécula. A continuación, se detallan e interpretan los desplazamientos químicos observados:

Se observa una señal sencilla a $\delta=1.26$ ppm, que se atribuye al grupo metilo ubicado en la posición 2 del anillo bencénico, el cual se encuentra ligeramente apantallado debido a la influencia electrónica del sistema aromático. Esta posición metílica es típica en compuestos con sustituyentes en anillos aromáticos y aparece en la región esperada para protones alifáticos cercanos a sistemas conjugados.

Una señal sencilla bien definida a $\delta=2.36$ ppm corresponde a los protones metilénicos H-8, H-9, H-10 y H-11, pertenecientes al anillo de piperazina, el cual, al estar saturado y simétrico, da lugar a señales simplificadas en el espectro. Otro parámetro del espectro que sustenta esta asignación es la integración, que corresponde a 8 protones, exactamente el número esperado para los cuatro grupos metilénicos de la piperazina. Además, la señal aparece como un singulete con constante de acoplamiento $J\approx 0$ Hz, lo cual refleja la ausencia de acoplamientos vicinales resolubles y confirma que los protones se encuentran en entornos magnéticamente equivalentes.

Otra señal sencilla a $\delta=3.47$ ppm se asigna al metileno H-7, que conecta el grupo aromático con la piperazina. Su desplazamiento más desprotegido sugiere la proximidad tanto de un sistema aromático como de un grupo nitrogenado.

A $\delta=3.82$ ppm aparece otra señal sencilla, correspondiente al grupo metileno H-12, el cual probablemente se encuentra adyacente al anillo benzimidazólico, experimentando desprotección adicional por el efecto de deslocalización electrónica del heterociclo.

En el intervalo $\delta=7.14 - 7.26$ ppm se presenta un conjunto de señales dobles, integrando el total esperado de protones aromáticos. Las señales específicas son:

$\delta=7.14$ ppm (H-4), $\delta=7.15$ ppm (H-5', H-6'), $\delta=7.16$ ppm (H-5), $\delta=7.22$ ppm (H-3), $\delta=7.23$ ppm (H-6) y $\delta=7.26$ ppm (H-4', H-7'). Estos desplazamientos son característicos de protones en sistemas aromáticos bencénicos y heterocíclicos, y reflejan la simetría relativa y los efectos de acoplamiento débil entre ellos.

Finalmente, se identifica una señal muy débil a $\delta=9.78$ ppm, atribuida al protón H-1' del grupo NH presente en el sistema benzimidazólico. La alta desprotección de este protón es consistente con su participación en puentes de hidrógeno intramoleculares o con la deslocalización electrónica sobre el sistema heterocíclico.

Estos datos, en conjunto, confirman la presencia de los fragmentos estructurales esperados en el compuesto **1**: un núcleo de piperazina, un sistema bencénico sustituido y un anillo benzimidazólico. No obstante, la presencia de dos señales no esperadas sugiere una leve presencia de impurezas, estas señales posiblemente se deban a impurezas residuales de la síntesis o a subproductos menores, lo cual será considerado en futuras etapas de purificación. Aun así, estas señales son menores en intensidad y no afectan la asignación general de los protones del producto principal (**Figura 8**).

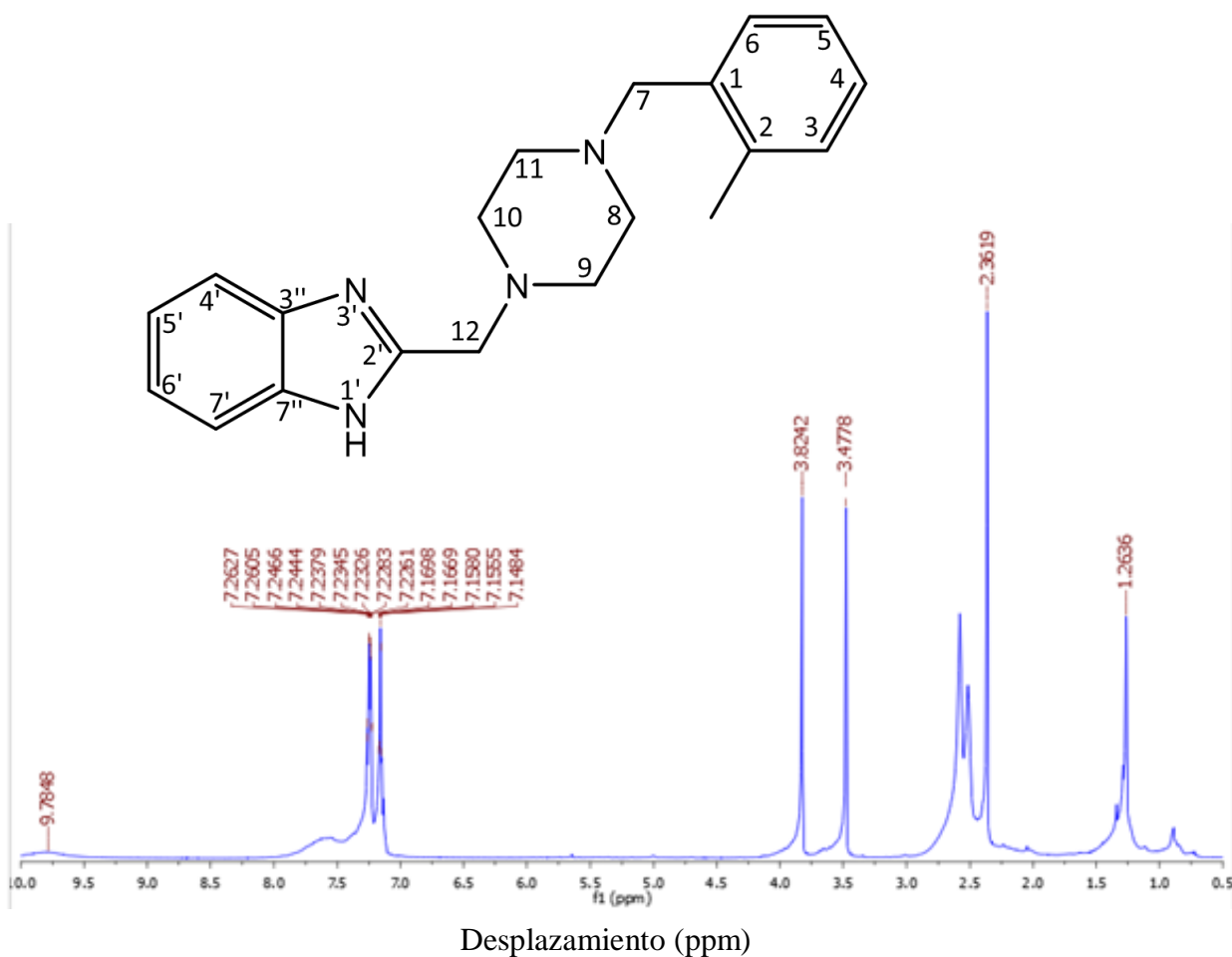


Fig. 8. Espectro de ¹H-RMN del compuesto **1** adquirido en CDCl₃. Espectro completo con sus asignaciones correspondientes.

El espectro de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (¹³C-RMN) del compuesto **1** confirmó la presencia de los grupos funcionales esperados, coherentes con la estructura propuesta del derivado benzimidazólico con núcleo piperazínico.

Se observó una señal a $\delta=19.36$ ppm, correspondiente al carbono del grupo metilo unido directamente al anillo bencénico C-13, en la posición orto, valor típico para este tipo de sustituyentes aromáticos.

Dos señales en $\delta=53.22$ y 53.84 ppm fueron asignadas a los carbonos metilénicos de la piperazina (C-8, C-9, C-10 y C-11). Las ligeras diferencias en sus desplazamientos pueden atribuirse a entornos magnéticamente no equivalentes generados por la proximidad a diferentes grupos vecinos. El carbono del metileno

que enlaza a la piperazina con el anillo bencénico C-7 aparece a $\delta=56.59$ ppm, mientras que el carbono metilénico que conecta la piperazina con el anillo benzimidazólico C-12 muestra una señal a $\delta=60.92$ ppm, ambos dentro del rango esperado para carbonos alifáticos adyacentes a heteroátomos.

En la región aromática, las señales observadas incluyen:

- $\delta=125.62$ ppm, correspondientes a los carbonos simétricos C-4' y C-7' del anillo benzimidazólico.
- $\delta=127.26$ ppm para los carbonos C-5' y C-6' del mismo sistema.
- $\delta=129.95$ y 130.44 ppm para C-5 y C-4 del anillo bencénico.
- $\delta=136.32$ ppm para el carbono C-6 del anillo bencénico.
- $\delta=137.69$ ppm para los carbonos fusionados del sistema benzimidazólico (C-3'' y C-7'').
- y finalmente, una señal a $\delta=152.48$ ppm correspondiente al carbono C-2', un carbono imínico del anillo benzimidazol.

Adicionalmente, se observó una señal débil en $\delta=29.85$ ppm, que no corresponde a ninguno de los carbonos esperados en la estructura del compuesto objetivo (**Figura 9**). Esta señal podría atribuirse a una traza de impureza residual, posiblemente derivada de un subproducto secundario de la reacción o a contaminantes orgánicos, como grasa ("grease", CH_2 , $\delta\approx 29.76$ ppm) en CDCl_3 , el disolvente utilizado para adquirir el espectro de ^{13}C (J. Org. Chem. 1997, 62, 7512–7515). Esta señal no necesariamente refleja subproductos de la reacción.

En conjunto, los datos del espectro de ^{13}C -RMN son consistentes con la estructura propuesta del compuesto **1** y apoyan su identidad como una molécula híbrida entre fragmentos de benzimidazol y piperazina, esencial en el desarrollo de potenciales inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa.

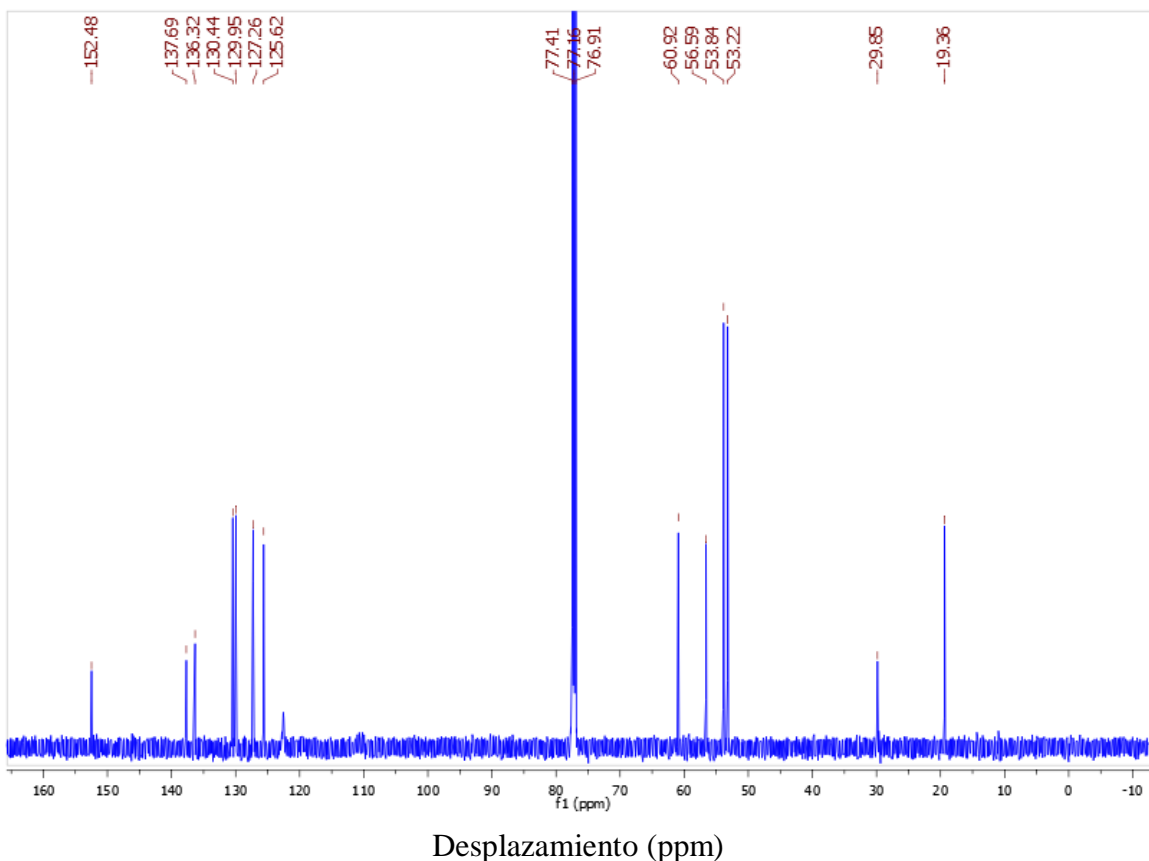


Fig. 9. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto 1 adquirido en CDCl_3 . Espectro completo.

Identificación por Espectrometría de masas del compuesto 1

Para confirmar la estructura molecular del compuesto **1**, se realizó un análisis mediante espectrometría de masas por tiempo de vuelo acoplada a una fuente de ionización por electrospray en modo positivo (ESI⁺-TOF-MS). En el espectro de masas se identificó un pico en m/z **321.20889**, con una **intensidad relativa de 2.55×10^6** , que corresponde al **ion cuasimolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$** del compuesto **1**, cuyo peso molecular teórico es **320.43496 g/mol**. El error asociado a esta

determinación se calcula como aproximadamente 2416 ppm. Tras un análisis detallado, se determinó que este pico no corresponde a un aducto, sino al ion molecular esperado, lo que respalda la identidad de la molécula sintetizada, aunque la alta desviación sugiere que podrían influir factores instrumentales o de preparación de la muestra.

Además del pico principal, se observó un segundo pico menos intenso en m/z **322.20751**, con una intensidad cercana a 5×10^5 , atribuible probablemente al **isótopo natural del ^{13}C** , el cual aparece como un pico satélite debido a la presencia de un solo carbono 13 en la molécula ($\sim 1.1\%$ por cada átomo de carbono). La presencia de picos adicionales de muy baja intensidad que no muestran valores de m/z asignados, probablemente corresponden a fragmentos menores, ruido o trazas residuales, y no se consideran representativos del compuesto mayoritario, (**Figura 10**).

Este resultado confirma que el compuesto **1** fue detectado de forma **específica, con alta pureza y sin señales significativas de impurezas cercanas**, lo que se refleja en la forma simétrica y bien definida del ión molecular.

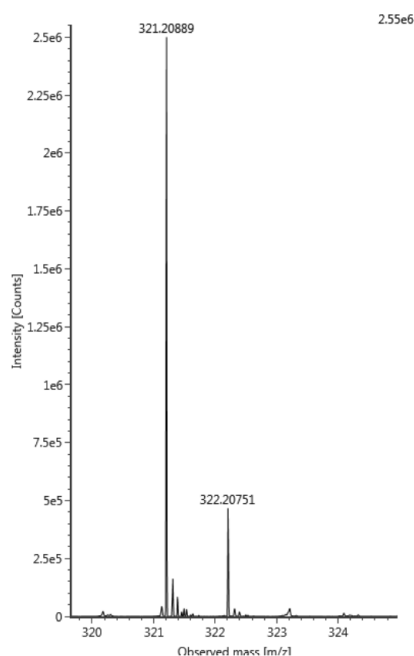


Fig. 10. Espectro de masas en modo de ionización electrospray positivo (ESI⁺), mostrando el ion cuasimolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 321.20889, valor que concuerda con la masa teórica calculada de 320.43496 g/mol para el compuesto **1**.

Caracterización estructural por Resonancia magnetica nuclear del compuesto 2

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón del compuesto **2** confirma la estructura propuesta al mostrar señales características consistentes con los núcleos de hidrógeno presentes en la molécula. A continuación, se detallan e interpretan los desplazamientos químicos observados:

Se observa una señal sencilla a $\delta=4.22$ ppm, correspondiente al protón del grupo NH (H-1') del sistema benzimidazólico. Este desplazamiento altamente desprotegido es indicativo de una posible participación en interacciones por puente de hidrógeno o de la deslocalización electrónica del sistema heterocíclico.

Una señal sencilla a $\delta=3.50$ ppm se asigna al metileno H-11, que enlaza la piperazina con el anillo benzimidazólico. Su posición ligeramente desprotegida sugiere la influencia electrónica tanto del nitrógeno de la piperazina como del sistema conjugado del anillo.

Se identifican también señales correspondientes a los protones metilénicos del anillo de piperazina. A $\delta=2.58$ ppm se encuentran los protones H-8 y H-9, mientras que a $\delta=2.74$ ppm se ubican los protones H-7 y H-10. La diferencia en los desplazamientos se debe a su entorno químico ligeramente distinto, derivado de su proximidad con diferentes grupos funcionales.

En la región aromática se observan múltiples señales distribuidas de acuerdo con la simetría del sistema bencénico y benzimidazólico. Los protones H-2 y H-6 del anillo bencilo aparecen como un doblete centrado en $\delta = 6.99$ ppm, debido a su acoplamiento con los protones vecinos H-3 y H-5 en posición orto. La constante de acoplamiento determinada a partir del espectro de $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) es $J=8.67$ Hz, lo cual coincide con los valores reportados para acoplamientos orto en sistemas aromáticos (6–9 Hz), confirmando la asignación de estas señales. Mientras que H-4 muestra un desplazamiento a $\delta=6.85$ ppm, apareciendo como un triplete debido a su acoplamiento con los protones vecinos H-3 y H-5 en posición orto. La constante de acoplamiento determinada a partir del espectro de $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) es $J=7.2$ Hz, valor que concuerda con los acoplamientos

típicos orto en sistemas aromáticos (6–9 Hz). Estas señales son características de un anillo aromático con sustituyentes, en este caso un grupo bencilo unido directamente a la piperazina. Adicionalmente, los protones del sistema benzimidazólico se reflejan en señales dobles en la región de $\delta=7.24$ ppm H-5' y H-6' y $\delta=7.59$ ppm H-4' y H-7'. La multiplicidad de estas señales corresponde a dobletes de dobles (dd), con constantes de acoplamiento orto de aproximadamente $J=8.1$ Hz y constantes de acoplamiento meta más pequeñas de alrededor de $J=2.0$ Hz, lo cual es característico de protones aromáticos en posiciones orto y meta en sistemas benzimidazólicos.

Estos datos en conjunto confirman la presencia de los fragmentos estructurales propuestos para el compuesto **2**: un núcleo de piperazina, un grupo bencilo unido directamente a esta, y un sistema benzimidazólico (**Figura 11**). La distribución de señales aromáticas bien definidas y la aparición de señales correspondientes a los grupos metilénicos indican la estructura de un compuesto con buena pureza.

No obstante, al igual que en el compuesto **1**, se observaron señales menores adicionales en la región alifática que no se asignan a los hidrógenos del compuesto esperado. Estas señales podrían corresponder a impurezas residuales o subproductos de la reacción, aunque su baja intensidad sugiere que no afectan de manera significativa la interpretación estructural general.

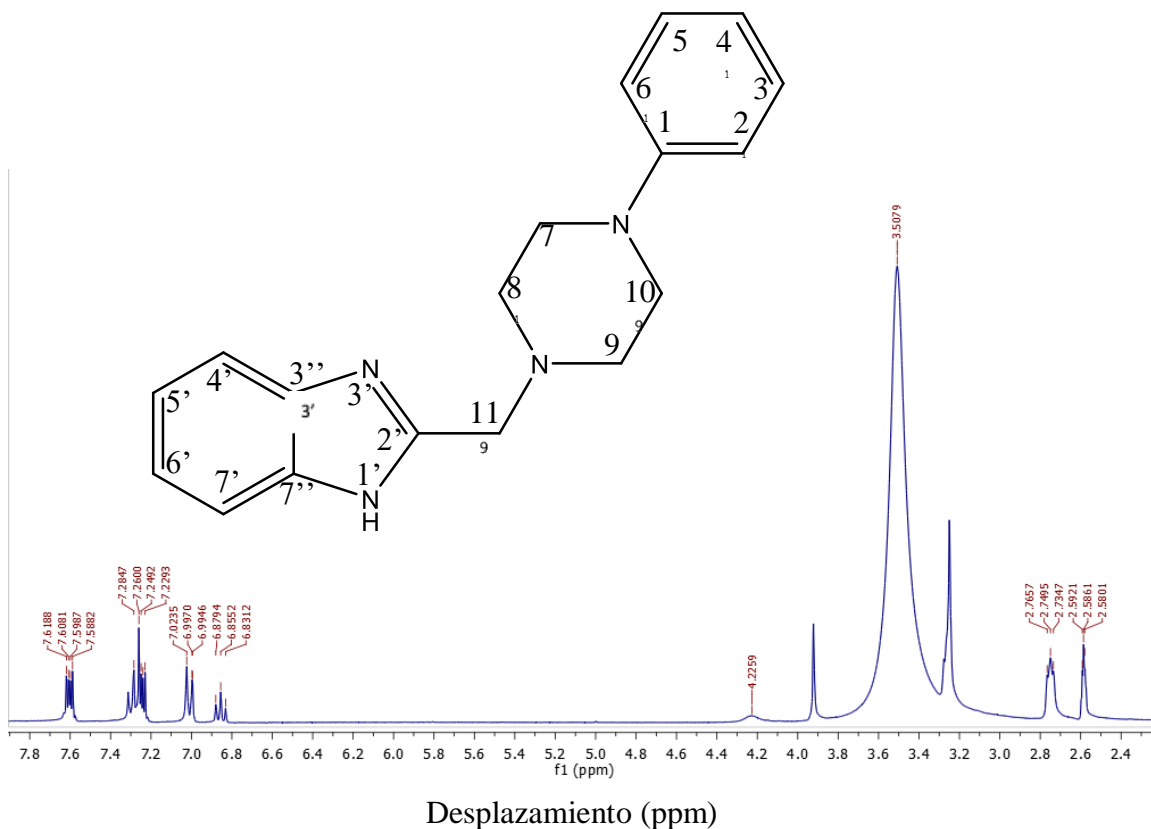


Fig. 11. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **2**, adquirido en DMSO-d_6 , mostrando el espectro completo con sus asignaciones correspondientes.

El espectro de resonancia magnética nuclear de carbono-13 del compuesto **2** confirmó la presencia de los grupos funcionales esperados, coherentes con la estructura propuesta del derivado benzimidazólico con núcleo piperazínico.

En la región alifática, se observó una señal a $\delta=48.32$ ppm, correspondiente a los carbonos C-7 y C-10 de la piperazina, situados en las posiciones cercanas al nitrógeno unido directamente al anillo bencénico. Una segunda señal, a $\delta=49.00$ ppm, fue asignada a los carbonos C-8 y C-9 de la piperazina, ubicados en el lado opuesto y próximos al nitrógeno enlazado al anillo benzimidazólico. El carbono metilénico que enlaza la piperazina con el sistema benzimidazólico C-11 aparece a $\delta=55.68$ ppm, valor característico de carbonos alifáticos adyacentes a heteroátomos.

En la región aromática, las señales observadas incluyen:

- $\delta=115.86$ ppm, correspondientes a los carbonos C-2 y C-6 del anillo bencénico,
- $\delta=119.36$ ppm para los carbonos C-3 y C-5 del anillo bencénico, ubicados en posiciones meta respecto al nitrógeno.
- $\delta=122.09$ ppm para los carbonos C-3'' y C-7'', que forman parte del sistema fusionado del anillo benzimidazólico.
- $\delta=129.35$ ppm correspondiente al carbono C-2', situado en el anillo benzimidazólico y localizado entre los dos átomos de nitrógeno, enlazando con la piperazina.
- y finalmente, una señal a $\delta=151.27$ ppm atribuida al carbono C-1 del anillo bencénico, directamente conectado al nitrógeno de la piperazina.

En conjunto, los desplazamientos químicos obtenidos en el espectro de ^{13}C -RMN son consistentes con la estructura propuesta para el compuesto **2** y respaldan su identidad como una molécula híbrida entre fragmentos de benzimidazol y piperazina, reforzando su potencial como inhibidor multitarget en el marco de la investigación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y trastornos del estado de ánimo (**Figura 12**).

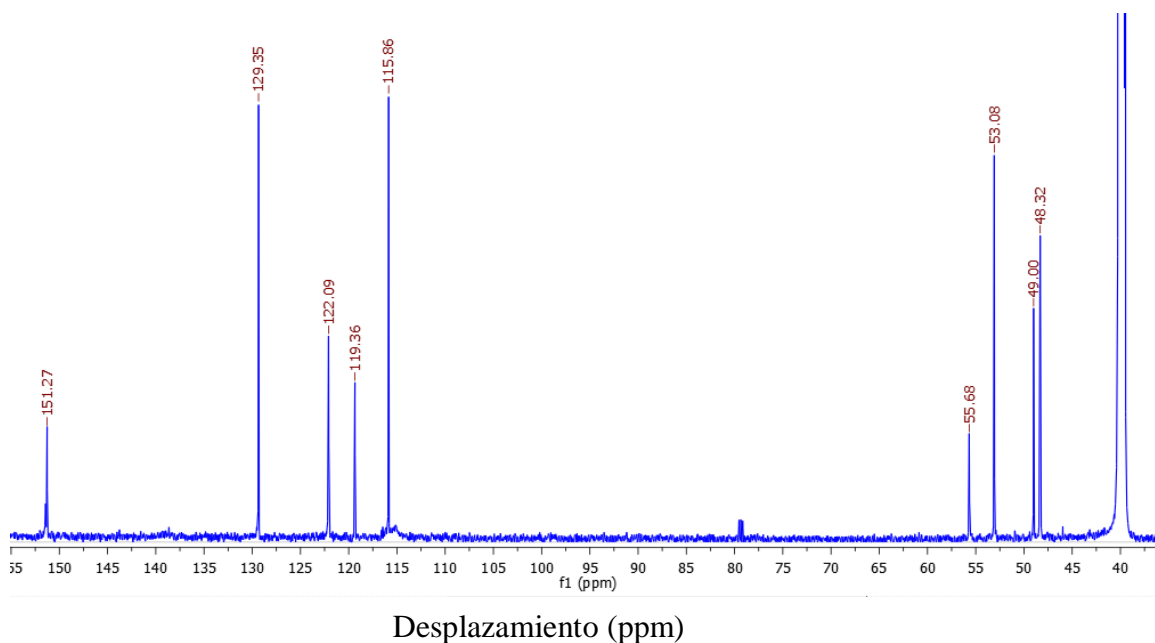


Fig. 12. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **2**, adquirido en DMSO-d_6 . Espectro completo.

Identificación por Espectrometría de masas del compuesto 2

Para confirmar la estructura molecular del compuesto **2**, se realizó un análisis mediante espectrometría de masas por tiempo de vuelo acoplada a una fuente de ionización por electrospray en modo positivo (ESI⁺-TOF-MS). En el espectro de masas se identificó un pico principal en m/z 293.17594, con una intensidad relativa de aproximadamente 3.81×10^6 , que corresponde al ion cuasimolecular $[M+H]^+$ del compuesto **2**, cuyo peso molecular teórico es 292.384 g/mol. Este valor experimental concuerda estrechamente con el peso molecular calculado, lo que respalda la identidad de la molécula sintetizada.

Además del pico principal, se observó un segundo pico menos intenso en m/z 294.17903, con una intensidad menor, atribuible probablemente al isótopo natural del carbono ¹³C, el cual aparece como un pico satélite debido a la presencia de un solo carbono 13 en la molécula (~1.1% por cada átomo de carbono). También se observaron picos adicionales en m/z 295.18384 y 296.14810, cuya baja intensidad sugiere que corresponde a la firma isotópica característica de un compuesto orgánico. Estos picos son esperables en espectrometría de masas de compuestos orgánicos y no corresponden a especies diferentes, por lo que no se consideran representativos del compuesto mayoritario (**Figura 13**).

Este resultado confirma que el compuesto **2** fue detectado de forma específica, con buena pureza y sin señales significativas de impurezas cercanas.

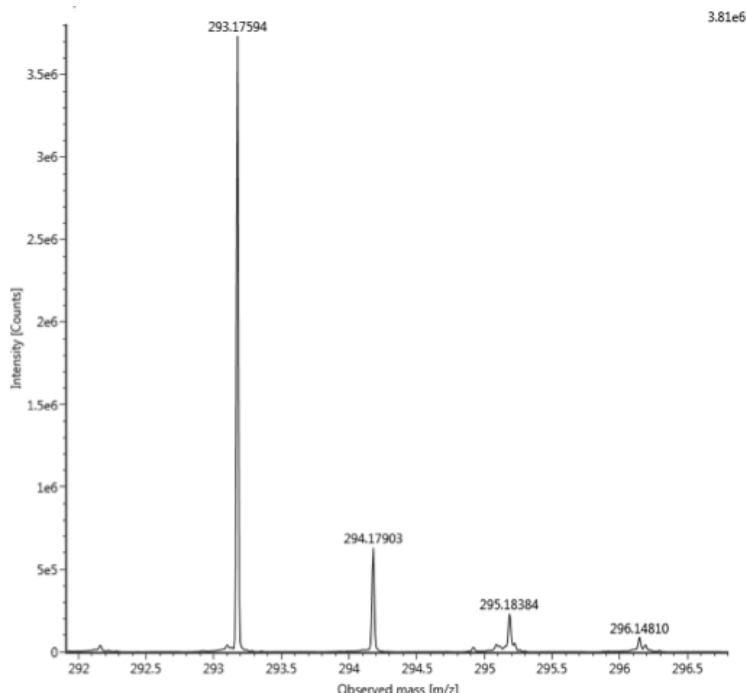


Fig. 10. A. Espectro de masas en modo de ionización electrospray positivo (ESI⁺), mostrando el ion cuasimolecular [M+H]⁺ a m/z 293.17594.

EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Ensayo de toxicidad con *Artemia salina* de los compuestos 1 y 2

El ensayo de toxicidad aguda utilizando nauplios de *Artemia salina* permitió comparar el potencial tóxico preliminar de los compuestos sintetizados **1** y **2**, mediante la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) y la unidad de toxicidad (UT), parámetros empleados comúnmente como indicadores bioquímicos de seguridad en etapas tempranas de desarrollo farmacológico.

Compuesto 1

El compuesto **1** fue evaluado a concentraciones de 1, 10, 25, 50, 70, 85 y 100 µM. No se observó mortalidad en concentraciones iguales o menores a 50 µM, y la mortalidad a concentraciones más altas fue baja: 6.66% a 70 µM, 3.33% a 85 µM y 10% a 100 µM. El valor calculado de CL₅₀ fue de 3442.96 µM y la UT correspondiente fue de 0.0290, lo que según la clasificación de toxicidad (UT < 1)

indica que este compuesto no presenta toxicidad aguda (*non-toxic*, NT) (**Figura 14**).

La baja toxicidad del compuesto **1** puede atribuirse a varias características fisicoquímicas. Su bajo peso molecular, la ausencia de grupos funcionales electrofílicos reactivos y una posible menor lipofilia podrían limitar su capacidad de atravesar membranas celulares, disminuyendo así su interacción con estructuras biológicas sensibles. Estudios recientes han demostrado que compuestos con bajo coeficiente de partición logP tienden a mostrar menor acumulación en organismos acuáticos como *Artemia salina*, reduciendo su toxicidad aparente. Además, su rigidez estructural y la presencia de grupos aromáticos menos polares pueden contribuir a una distribución desfavorable para efectos tóxicos intracelulares.

Ensayo de toxicidad con el modelo de *Artemia Salina* del compuesto **1**

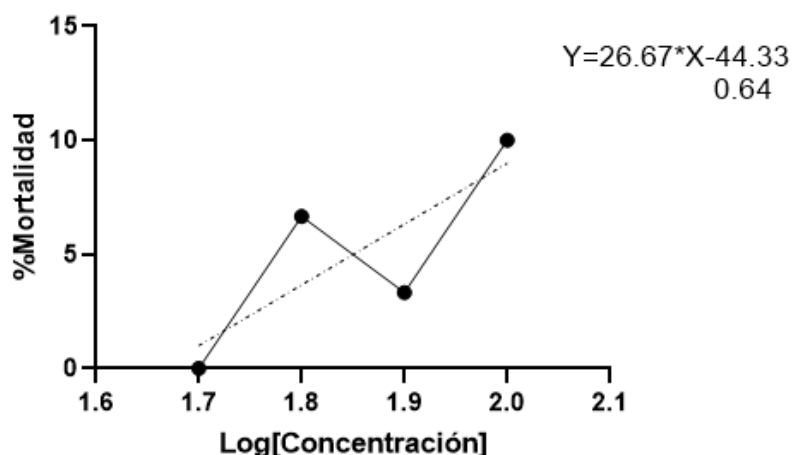


Fig. 11. Ensayo de toxicidad con el modelo de *Artemia* (compuesto **1**).

Compuesto **2**

En contraste, el compuesto **2** mostró un perfil toxicológico notablemente más agresivo. No hubo mortalidad a 1 y 10 $\mu\text{M/L}$, pero a partir de 25 $\mu\text{M/L}$ la mortalidad fue del 13.33%, y aumentó de forma abrupta a 70% a 50 $\mu\text{M/L}$, 93.33% a 70 $\mu\text{M/L}$, y 100% a 85 y 100 $\mu\text{M/L}$. La CL_{50} obtenida fue de 29.9354 $\mu\text{M/L}$, con una UT de 3.3405, lo que lo clasifica como un compuesto con toxicidad aguda (*acute toxicity*, AT) según los criterios internacionales ($1 \leq UT < 10$) (**Figura 15**).

Esta elevada toxicidad podría explicarse por una mayor afinidad del compuesto **2** por las membranas lipídicas de los nauplios, facilitando su internalización y

posterior acumulación intracelular. La rigidez del enlace bencilo-piperazina, que se comporta como una unidad estructural más plana y menos flexible, podría favorecer un empaquetamiento molecular más ordenado y una mayor tendencia a agregarse en membranas celulares, promoviendo efectos desestabilizantes. Además, una posible mayor lipofilia (no cuantificada en este ensayo, pero inferida por su menor solubilidad en solventes polares) sugeriría un coeficiente logP más alto, característica asociada con mayor toxicidad en sistemas acuáticos.

Este contraste entre los compuestos **1** y **2** subraya la importancia de considerar no solo la estructura química, sino también las propiedades fisicoquímicas como solubilidad, lipofilia y rigidez estructural en la predicción de toxicidad. Si bien ambos compuestos comparten un núcleo estructural relacionado, pequeñas modificaciones pueden inducir diferencias significativas en la interacción con organismos vivos.

Ensayo de toxicidad con el modelo de *Artemia Salina* del compuesto **2**

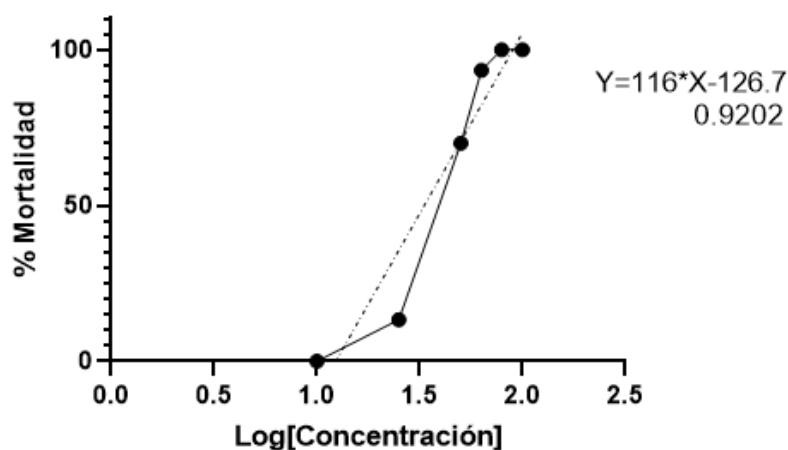


Fig. 12. Ensayo de toxicidad con el modelo de *Artemia* (compuesto **2**).

Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa de los compuestos **1** y **2**

Se evaluó la capacidad inhibidora del compuesto **1** sobre la enzima AChE utilizando dos concentraciones: $1 \mu\text{M}$ y $5 \mu\text{M}$. Los porcentajes de inhibición obtenidos fueron de 2.72% y 3.86%, respectivamente. Como control positivo, se

utilizó Donepezilo, que mostró una inhibición del 46.99% bajo las mismas condiciones experimentales (**Figura 16**).

El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, reveló que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas del compuesto **1** ($p > 0.05$). Dicho análisis se realizó utilizando el software GraphPad Prism (versión 8.0.2, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Estos resultados indican que el compuesto **1** presenta una baja afinidad por el sitio activo de la AChE, lo que sugiere una interacción débil o inespecífica. A diferencia del Donepezilo, que actúa como inhibidor competitivo al establecer múltiples interacciones con los sitios catalíticos y aniónicos periféricos de la enzima, la estructura del compuesto **1** no favorece tales interacciones.

La baja actividad inhibidora observada puede atribuirse a una geometría molecular poco adecuada, falta de grupos funcionales relevantes para el reconocimiento enzimático o una orientación desfavorable al interactuar con la enzima. Estudios recientes han demostrado que modificaciones estructurales, como la incorporación de anillos heterocíclicos o grupos funcionales adicionales, pueden mejorar significativamente la actividad inhibidora de compuestos similares.

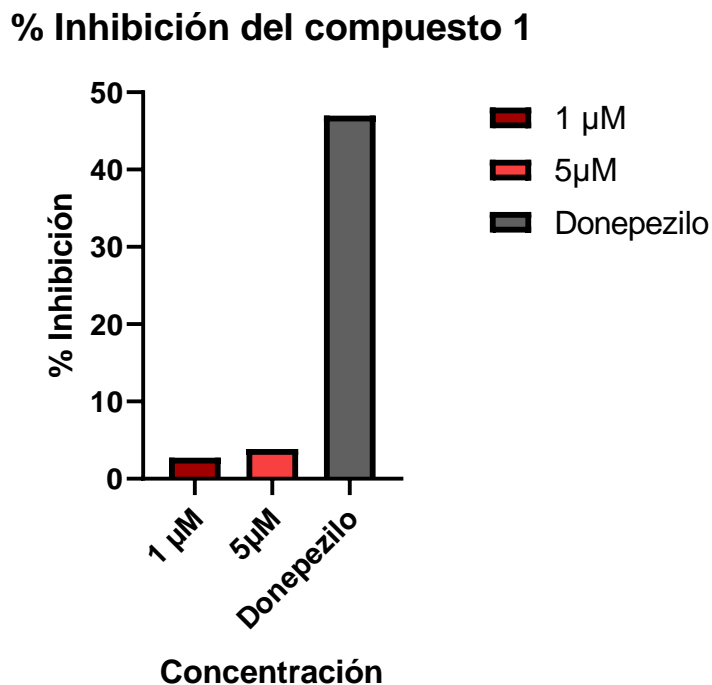


Fig. 13. Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (compuesto 1).

El **compuesto 2** fue evaluado bajo las mismas condiciones experimentales. Los porcentajes de inhibición obtenidos fueron de **0.79%** para 1 μM y **2.63%** para 5 μM , mientras que el Donepezilo mantuvo una inhibición del **46.99%** (**Figura 17**).

Al igual que con el compuesto 1, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas del compuesto 2 ($p > 0.05$).

La escasa inhibición observada sugiere que el compuesto 2 también carece de una interacción efectiva con el sitio activo de la AChE. Es posible que la rigidez estructural del grupo bencílico presente en el compuesto 2 limite su flexibilidad conformacional, impidiendo una orientación favorable dentro del sitio activo enzimático. Investigaciones recientes han destacado la importancia de la flexibilidad molecular y la presencia de grupos funcionales específicos, como grupos carbonílicos, aminas terciarias y anillos aromáticos con sustituyentes donadores o aceptores de electrones, que facilitan la formación de interacciones clave (puentes de hidrógeno, interacciones π - π y catión- π) dentro del sitio activo

de la enzima. La ausencia o disposición desfavorable de estos grupos en el compuesto 2 podría explicar su baja actividad inhibitoria..

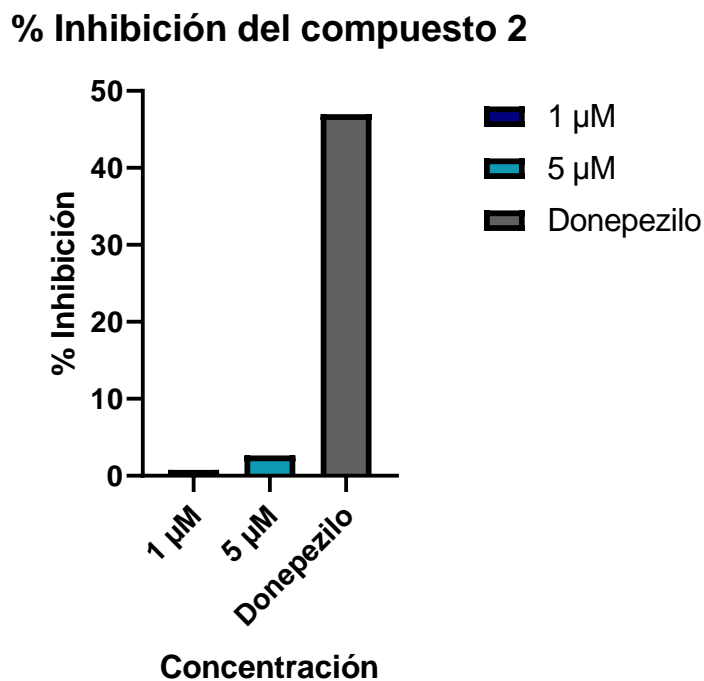


Fig. 14. Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (compuesto 2).

Comparación y propuesta de modificación estructural

Al comparar ambos compuestos, se observa que el compuesto 1 exhibe una inhibición ligeramente superior a la del compuesto 2 (**Figura 18**). Aunque ambos muestran una actividad inhibitoria baja en comparación con el control positivo, el compuesto 1 podría considerarse una base más prometedora para futuras modificaciones estructurales.

Para mejorar la actividad inhibitoria del compuesto 1, se sugiere la incorporación de grupos funcionales adicionales que puedan interactuar eficazmente con los sitios catalíticos y aniónicos periféricos de la AChE. Por ejemplo, la adición de anillos heterocíclicos o grupos metoxi en posiciones estratégicas podría aumentar la afinidad del compuesto por la enzima. Estudios recientes han demostrado que

tales modificaciones en la estructura del Donepezilo y compuestos relacionados pueden mejorar significativamente su actividad inhibitoria.

Además, la introducción de fragmentos que permitan interacciones π - π con residuos aromáticos en la cavidad activa de la enzima podría ser beneficiosa. La flexibilidad molecular también es un factor crucial; por lo tanto, ajustar la longitud y la conformación de los enlaces entre los diferentes grupos funcionales podría facilitar una mejor adaptación al sitio activo de la AChE.

En resumen, aunque los compuestos **1** y **2** muestran una actividad inhibitoria limitada, el compuesto **1** ofrece una base estructural más adecuada para futuras modificaciones dirigidas a mejorar su eficacia como inhibidor de la acetilcolinesterasa.

% Inhibición de los compuestos 1 & 2

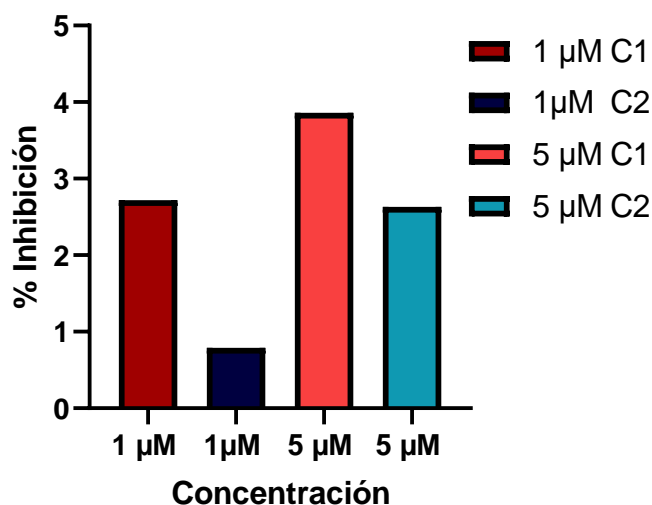


Fig. 15. Comparación del ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (compuesto **1** y **2**).

PARTE COMPUTACIONAL

Protocolo de acoplamiento molecular del compuesto **1** y **2** sobre el receptor AChE humana y 5HT1A

Para verificar la predicción del modo de unión de los nuevos ligandos con la acetilcolinesterasa humana (AChE) y serotonina (5HT1A), se realizó la validación del acoplamiento molecular. En el caso de la AChE humana, se utilizó el complejo

de la estructura cristalina con código 6O4W, en la que el donepezilo se encuentra co-cristalizado. El proceso consistió en reacoplar el ligando original (donepezilo) en su receptor AChE humana y comparar su disposición espacial con la de los confórmeros, evaluando la similitud conformacional y la precisión del acoplamiento mediante el cálculo del RMSD (Root Mean Square Deviation).

Para el receptor 5HT1A se empleó el complejo de la estructura cristalina con código 8FYL en la que la vilazodona está co-cristalizado. Se siguió el mismo procedimiento para la validación del acoplamiento molecular, como se muestra en la (Figura 19 y 20). Las visualizaciones 3D se efectuaron en el programa PyMol Molecular Visualization.

Los programas utilizados para este estudio fueron:

- **MOE (Molecular Operating Environment)**: se empleó para optimizar y protonar las estructuras de los ligandos en condiciones fisiológicas.
- **AutoDock Tools 1.5.6rc3**: Se utilizó para preparar los archivos necesarios de los receptores (formato pdbqt), así como para definir el sitio activo mediante la creación del grid box. Para el acoplamiento molecular como tal, se estimó las energías libres de unión y genero los posibles modos de interacción (binding poses).
- **PyMol Molecular Visualization**: se utilizó para las visualizaciones tridimensionales (3D) de los complejos ligando-receptor.
- **Discovery Studio Visualizer 4.0**: se empleó para representar gráficamente las interacciones moleculares en dos dimensiones (2D).

Las características del **grid box** utilizadas para los estudios de acoplamiento molecular fueron definidas a partir de los sitios activos de los receptores seleccionados, considerando las coordenadas espaciales de los ligandos co-cristalizados en las estructuras cristalinas respectivas. Para la **acetilcolinesterasa humana (AChE)**. El centro del grid se estableció en las coordenadas **x = 88.991, y = 85.361, z = -5.291**, con un tamaño de **40 × 40 × 40 puntos** y un espaciado de **0.375 Å**. Esta configuración permitió cubrir

completamente la cavidad catalítica y ofreció la flexibilidad necesaria para explorar adecuadamente las posibles conformaciones del ligando durante el proceso de acoplamiento.

Por otro lado, para el receptor **5HT1A**, que presenta a la vilazodona como ligando co-cristalizado. El centro del grid fue definido en las coordenadas $x = 138.699$, $y = 139.517$, $z = 98.793$, también con un tamaño de **40 × 40 × 40 puntos** y un espaciado de **0.375 Å**. Esta parametrización fue suficiente para abarcar completamente la cavidad de unión del receptor serotoninérgico, asegurando un análisis confiable de las posibles interacciones moleculares con los compuestos **1** y **2**.

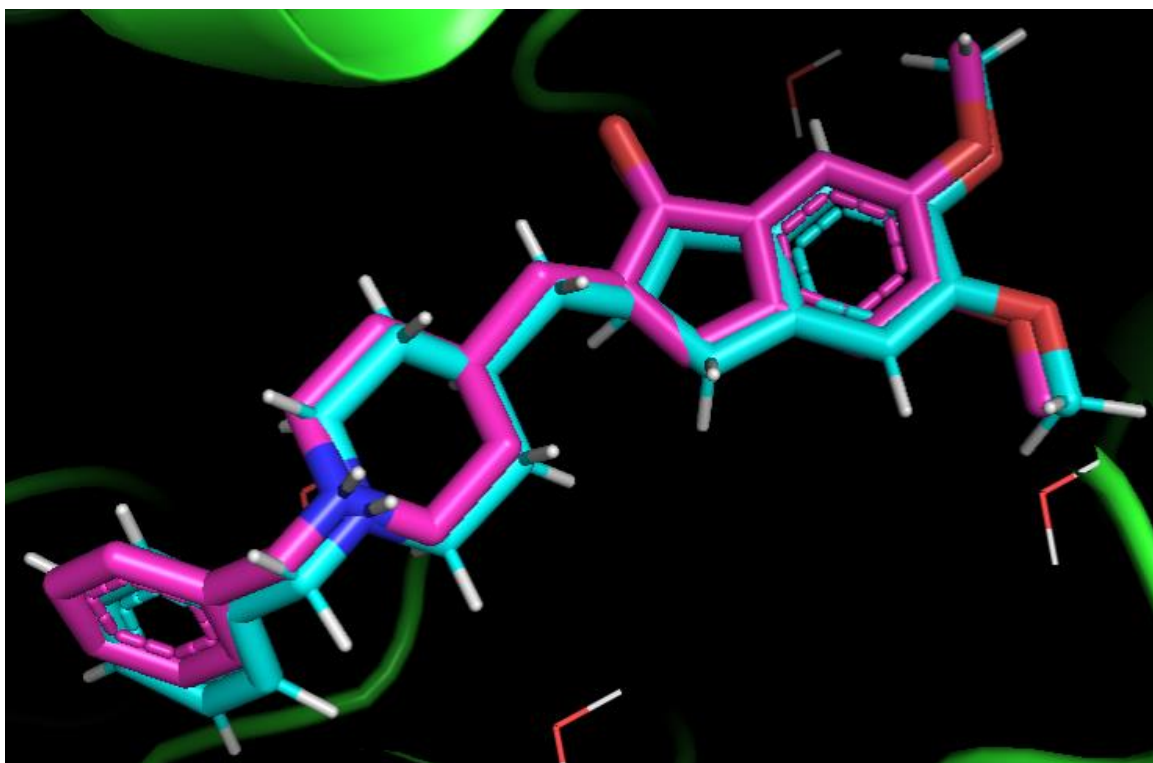


Fig. 16. Sobreposición (overlay) del confórmero del acoplamiento molecular del ligando donepezilo (color rosa) en el sitio catalítico de AChE, con la referencia del ligando co-cristalizado original (color azul)

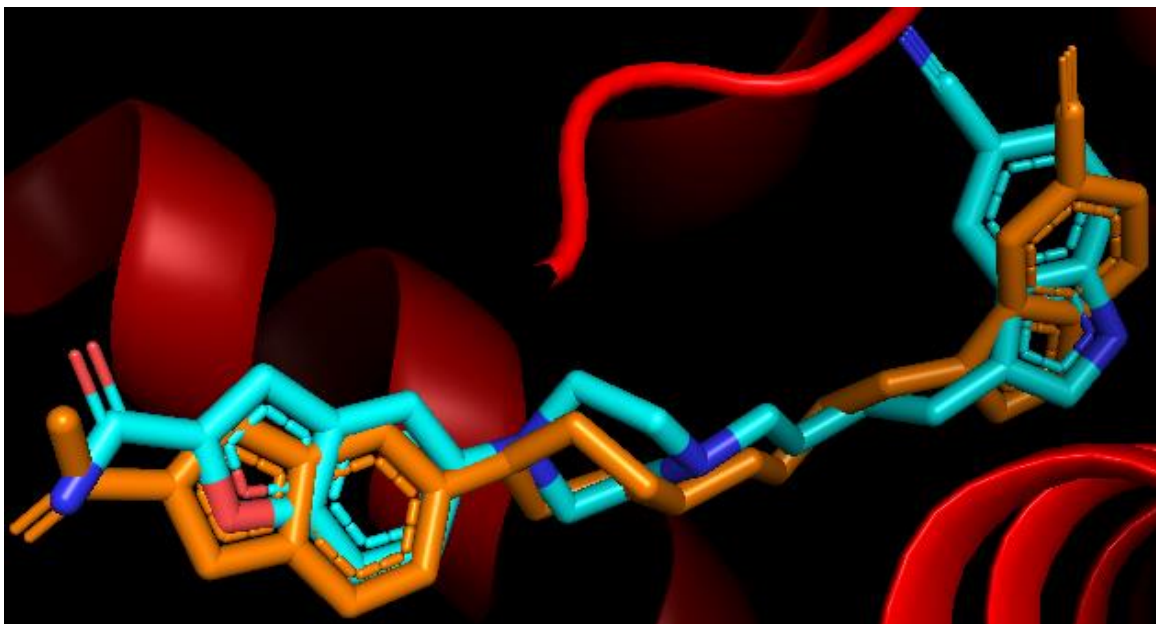


Fig. 17. Sobreposición (overlay) del conformero del acoplamiento molecular del ligando vilazodona (color naranja) en el sitio catalítico de serotonina, con la referencia del ligando co-cristalizado original (color azul).

Los resultados mostraron que los conformeros obtenidos presentan una alta similitud con la disposición espacial del Donepezilo y vilazodona con su receptor en ambos casos, teniendo para el receptor AChE un RMSD de 0.199 Å y para el 5HT1A de 0.935 Å. Dado que un RMSD menor a 2 Å es considerado un indicador confiable en la reproducibilidad de la pose, estos valores confirman la validez del modelo de acoplamiento por separado respecto al ligando co-cristalizado. Con base en esta validación exitosa, se procedió a realizar el acoplamiento molecular de los compuestos **1** y **2** con el receptor AChE y 5HT1A para analizar y posteriormente evaluar su posible actividad biológica.

Un concepto clave es la eficiencia del ligando (LE) que es un parámetro clave en el diseño de fármacos, ya que permite evaluar la relación entre la potencia de un compuesto y su tamaño molecular. Se calcula dividiendo la energía libre de unión (ΔG) entre el número de átomos pesados (HA) del ligando (es decir, aquellos distintos al hidrógeno), $LE = \Delta G / HA$. Este valor ayuda a identificar compuestos con alta afinidad y menor riesgo de efectos adversos asociados a la "obesidad molecular". A través del acoplamiento molecular, se obtiene la energía libre de

unión mide la estabilidad de la interacción entre un ligando y su receptor donde un valor más negativo indica una unión más fuerte y estable ($\Delta G < -9 \text{ kcal/mol}$) y un valor menos negativo o positivo sugiere una interacción débil o inestable ($> -7 \text{ kcal/mol}$), mientras que el número de átomos pesados se determina a partir de la estructura química del compuesto. Un $LE > 0.3$ se considera un buen valor, ya que indica que el ligando es eficiente en su unión, un $LE \sim 0.4-0.5$ se considera muy bueno y típico en fármacos optimizados, un $LE < 0.3$ indica que el ligando no es muy eficiente en su interacción. Así un LE óptimo sugiere una buena interacción con el receptor sin un aumento excesivo en el tamaño del ligando, lo que facilita su optimización en futuras modificaciones estructurales.

Acoplamiento molecular e interacciones moleculares del compuesto 1 y 2 sobre el receptor AChE humana

El acoplamiento molecular del compuesto **1** sobre la acetilcolinesterasa humana permitió obtener un único conformero, el más estable, la energía libre de unión (ΔG) = -10.25 kcal/mol , que refleja una buena afinidad del compuesto por el receptor, aunque menor que la del donepezilo (-12.65 Kcal/mol). Además, la eficiencia del ligando (LE) = 0.43 , un valor ligeramente menor que el de donepezilo (0.45), lo que indica que, aunque tiene buena afinidad, su optimización estructural podría mejorarse para alcanzar una mayor eficiencia. La visualización del conformero más estable se muestra en la (**Figura 21**), así como su diagrama 2D en la cavidad de AChE. La figura muestra un análisis de las interacciones moleculares entre nuestro compuesto y la enzima acetilcolinesterasa (AChE), destacando diversas fuerzas estabilizadoras en el sitio activo. Se identifican interacciones π - π stacked con residuos aromáticos clave con Tyr337, Phe338, Trp86 y doble interacción de Tyr341 con bencimidazol, similares a las que presenta el donepezilo, lo que sugiere un anclaje estable mediante apilamiento aromático. Además, se observa un puente de hidrógeno con la molécula de agua HOH827, lo que podría contribuir a la fijación del compuesto dentro de la cavidad enzimática. También se destaca dos interacciones π -catión con Trp86 y Tyr337, que podría reforzar la unión a través de fuerzas electrostáticas. Además, se observan puentes

de hidrogeno donadores (π -donor hydrogen bond) con Phe295 y Phe338. También se destaca una interacción π -alquilo de Val294 con bencimidazol que puede favorecer la afinidad hidrofóbica de la unión. Estas interacciones en conjunto podrían influir en la eficacia del compuesto como inhibidor de AChE.

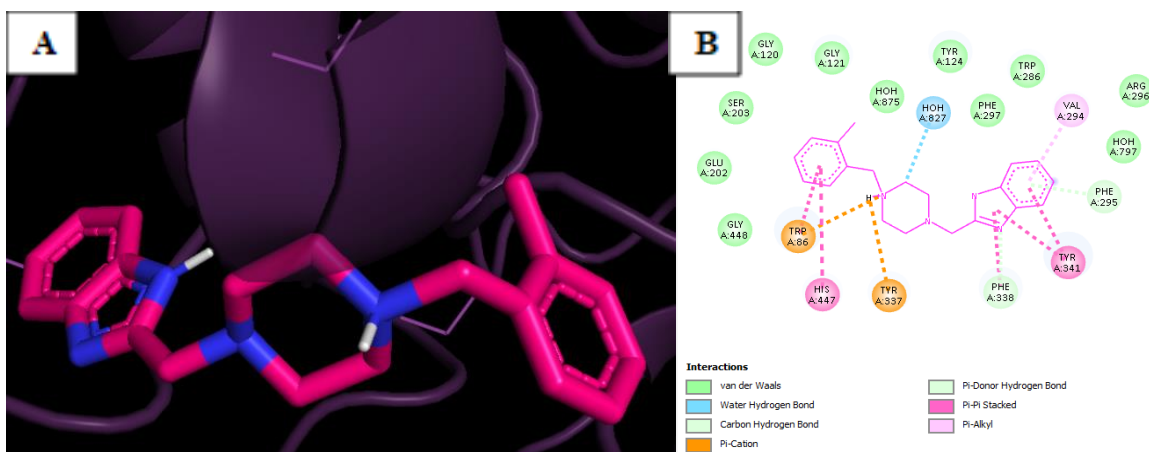


Fig. 18. A. 3D del compuesto **1** en la cavidad catalítica de AChE (transparente). B. 2D del compuesto **1** y sus interacciones polares.

El acoplamiento molecular del compuesto **2** sobre la acetilcolinesterasa humana permitió obtener un único conformero el más estable, la energía libre de unión (ΔG) = -9.69 kcal/mol y la eficiencia del ligando (LE) = 0.44, un valor menor que el de donepezilo, pero con un LE ligeramente mayor que el compuesto **1**. La visualización del conformero más estable se muestra en la (**Figura 22**), así como su diagrama 2D en la cavidad de AChE. La figura muestra diversas interacciones clave que tal vez contribuyen a su estabilización. Se observan interacciones π - π stacked entre el anillo bencimidazol y los residuos Trp86 y His447, mientras que el anillo bencilo forma una interacción similar con Tyr341, lo que sugiere un anclaje aromático relevante para la afinidad del compuesto. Además, se identifica una interacción π -sigma con el grupo piperazina, lo que podría reforzar la estabilidad dentro del sitio activo. También se evidencia la presencia de un puente de hidrógeno mediado por agua (HOH827), indicando un posible papel del entorno

acuoso en la fijación del ligando. Por otro lado, Tyr337 participa en dos interacciones distintas: una interacción π -alquilo con la piperazina y un enlace de hidrógeno tipo carbono (carbon hydrogen bond), lo que podría contribuir a la orientación y estabilidad del compuesto en la cavidad enzimática. Estas interacciones presentan similitudes y diferencias con las del Donepezilo, lo que sugiere que la molécula 2 podría tener un perfil de unión distinto.

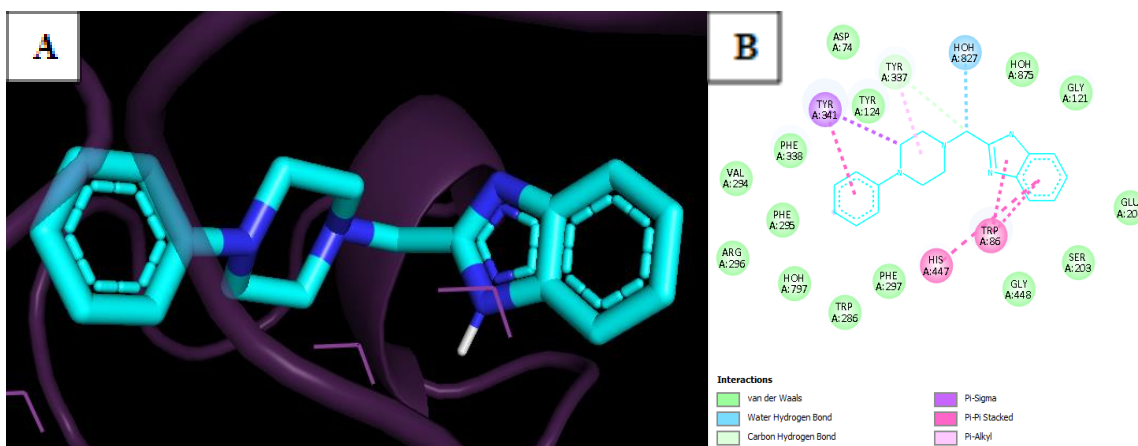


Fig. 19. A. 3D del compuesto **2** en la cavidad catalítica de AChE (transparente). B. 2D del compuesto **2** y sus interacciones polares.

El compuesto **1** muestra la red de interacciones más compleja y diversa, con un alto número de interacciones π - π stacked y una fuerte estabilización electrostática con Tyr337 (π -catión). El compuesto **2**, aunque también presenta múltiples interacciones aromáticas, destaca por su interacción π -sigma con Tyr341 en la piperazina, lo que podría influir en su orientación dentro del sitio activo.

Acoplamiento molecular e interacciones moleculares del compuesto 1 y 2 sobre el receptor 5HT1A

El acoplamiento molecular del compuesto **1** sobre serotonina (5HT1A) permitió obtener un único conformero, el más estable, con una energía libre de unión $\Delta G = -10.25$ kcal/mol que refleja una buena afinidad del compuesto por el receptor, aunque menor que la de la vilazodona (-11.94), y una eficiencia del ligando (LE) = 0.45, siendo este último un valor mayor que el de la vilazodona (0.43), lo que

sugiere una interacción favorable con el receptor. La visualización del conformero más estable se muestra en la (**Figura 23**), así como su diagrama 2D en la cavidad de 5HT1A. La figura reveló diversas interacciones clave que podrían estabilizar el complejo ligando-receptor. Se identificaron interacciones π -alquil, incluyendo una doble interacción con Ala93 en el anillo bencimidazol, así como interacciones con Val117 y Cys120 en el anillo bencilo. Además, se observó una interacción π - π stacked doble con Trp387 en el anillo bencimidazol, lo que podría indicar una contribución significativa a la estabilidad del complejo. La Tyr390 mostró tres tipos de interacciones: un enlace de hidrógeno convencional (conventional hydrogen bond), una interacción π -sigma y una interacción Van der Waals entre el bencimidazol y la piperazina. Por último, se identificó una interacción de puente salino (salt bridge) entre Asp116 y un nitrógeno de la piperazina, lo que sugiere un papel clave en la estabilización del ligando dentro del sitio de unión del receptor.

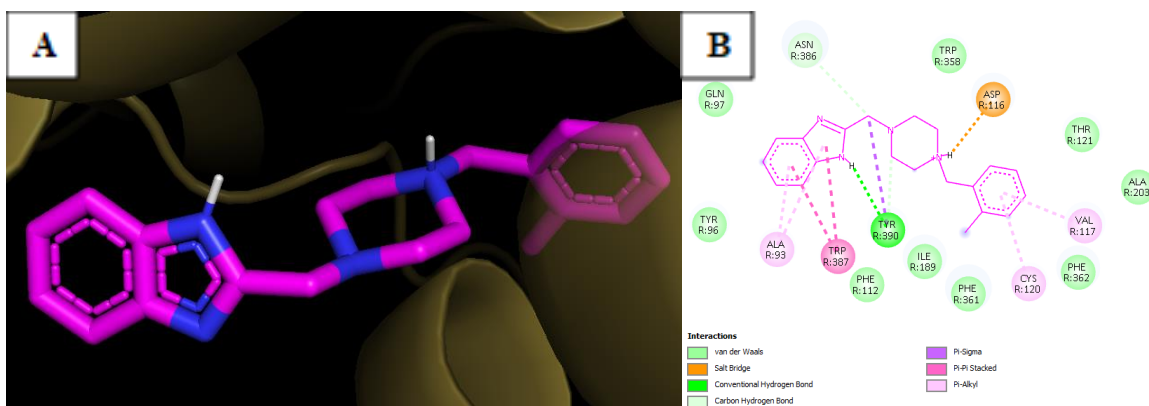


Fig. 20. A. 3D del compuesto **1** en la cavidad catalítica de 5HT1A (transparente). B. 2D del compuesto **1** y sus interacciones polares.

El acoplamiento molecular del compuesto **2** sobre serotonina (5HT1A) permitió obtener un único conformero, el más estable, con una energía libre de unión $\Delta G = -9.5$ kcal/mol y una eficiencia del ligando (LE) = 0.43, siendo este último un valor igual que el de la vilazodona lo que sugiere una eficiencia de ligando equivalente, sin embargo, su energía libre exhibe una menor afinidad de unión. La visualización del conformero más estable se muestra en la (**Figura 24**), así como su diagrama

2D en la cavidad de 5HT1A. Se observa interacciones π - π en forma de T con Trp358 y Phe362 en el anillo bencilo, así como con Trp387 en el anillo bencimidazol. Además, se observaron interacciones π -alquilo: una doble con Ala93 en el bencimidazol, y otras con Ala203 y Cys120 en el bencilo, además de Phe361 en la piperazina. Por otro lado, el compuesto estableció una interacción de puente de hidrógeno tipo π -donador con Tyr390 en el bencimidazol, y una interacción de puente de hidrógeno convencional con Asp116, a través de un nitrógeno del bencimidazol. Estas interacciones sugieren un anclaje del ligando en la cavidad catalítica del receptor.

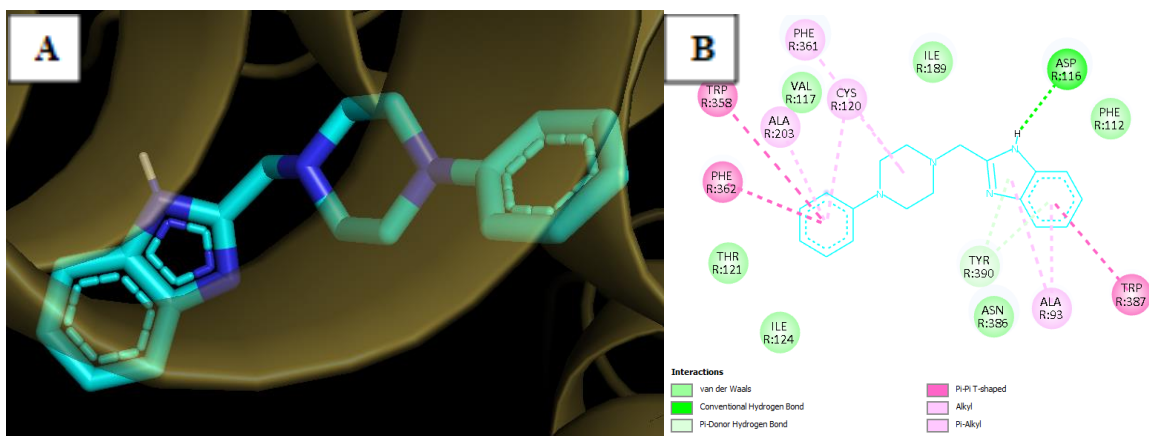


Fig. 21. A. 3D del compuesto **2** en la cavidad catalítica de 5HT1A (transparente). B. 2D del compuesto **1** y sus interacciones polares.

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró la síntesis y caracterización de dos compuestos quiméricos híbridos derivados de benzimidazol y piperazina, diseñados con base en los farmacóforos estructurales de Vilazodona y Donepezilo, con el objetivo de obtener prototipos farmacológicos inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y serotonina, relevante en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y la depresión como enfermedad comórbida.

La caracterización estructural de los compuestos mediante espectroscopía de RMN de protón (^1H) y carbono (^{13}C) confirmó la presencia de los grupos funcionales esperados y la correcta formación de los enlaces C-C entre los fragmentos moleculares. Se identificaron todos los protones aromáticos, alifáticos y los grupos metilo y metileno, tanto por su número como por sus desplazamientos químicos, y se observaron señales adicionales menores que pueden asociarse a impurezas residuales, sin comprometer la asignación estructural principal.

Los ensayos de inhibición de AChE indicaron que el compuesto **1** presentó un mayor efecto inhibitorio comparado con el compuesto **2**., con porcentajes de inhibición de 2.71% y 3.86% a concentraciones de 1 μM y 5 μM , respectivamente, mientras que el compuesto **2** mostró una inhibición menor (0.78% y 2.63% a las mismas concentraciones). En contraste, el control positivo (Donepezilo) alcanzó un 46.99% de inhibición, como era esperado para un inhibidor clínicamente aprobado. La elección de las concentraciones de 1 y 5 μM se basó en criterios propios de los ensayos enzimáticos iniciales, donde se emplean concentraciones micromolares bajas para determinar la potencia inhibitoria de nuevos compuestos sin saturar la enzima. Estas concentraciones permiten identificar si las moléculas poseen un efecto biológico observable dentro del rango en el que típicamente se evalúan compuestos candidatos (hits) en la etapa temprana del descubrimiento de fármacos. De esta manera, es posible comparar la eficiencia relativa entre compuestos y establecer cuáles pueden avanzar hacia una posible optimización como moléculas líder (leads). Aunque los compuestos mostraron baja inhibición, el

compuesto **1** fue consistentemente superior, de esta manera, el diseño estructural presenta un punto de partida valioso para futuras modificaciones.

Estos resultados fueron congruentes con el análisis de acoplamiento molecular, el cual indicó una interacción favorable del compuesto **1** con residuos clave del sitio activo de la AChE (como Trp84, Phe330 y His440), pero con una afinidad significativamente menor que la del Donepezilo, posiblemente debido a la ausencia de grupos funcionales adicionales que potencien la interacción π - π o enlaces de hidrógeno directos con el centro catalítico.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de toxicidad con *Artemia salina* para evaluar la seguridad preliminar de los compuestos sintetizados. El compuesto **1** mostró baja toxicidad en concentraciones evaluadas, lo cual resulta favorable desde el punto de vista farmacológico, ya que sugiere un margen de seguridad aceptable para futuros estudios biológicos.

En conjunto, se concluye que el compuesto **1** presenta un mejor perfil de inhibición enzimática, mayor seguridad preliminar y un mejor acoplamiento molecular en comparación con el compuesto **2**, por lo que estos resultados sugieren que el compuesto **1** es el candidato más prometedor para continuar con modificaciones estructurales que mejoren su actividad inhibidora. Como propuesta, se recomienda incorporar sustituyentes polares como grupos carbonilo, metoxi o amino en posiciones clave del anillo bencénico o del núcleo benzimidazólico. Estas modificaciones podrían aumentar las interacciones no covalentes con el sitio activo de la AChE y mejorar la orientación del ligando en el complejo enzima-ligando o favorecer la formación de interacciones adicionales con residuos del sitio activo y mejorar la orientación del ligando en el centro catalítico.

Finalmente, este trabajo demuestra el valor del diseño racional de fármacos quiméricos para generar nuevos compuestos con actividad biológica. A pesar de la actividad moderada observada, el compuesto **1** representa una base estructural útil para el desarrollo de derivados más activos y seguros, con potencial terapéutico en enfermedades neurológicas y depresión.

REFERENCIAS

- Sălcudean, A., Bodo, C. R., Popovici, R. A., Cozma, M. M., Păcurar, M., Crăciun, R. E., Crisan, A. I., Enatescu, V. R., Marinescu, I., Cimpian, D. M., Nan, A. G., Sasu, A. B., Anculia, R. C., & Strete, E. G. (2025). Neuroinflammation—A Crucial Factor in the Pathophysiology of Depression—A Comprehensive Review. In *Biomolecules* (Vol. 15, Issue 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biom15040502>
- Ali T, Rahman, S. U., Hao, Q., Li, W., Liu, Z., Ali Shah, F., Murtaza, I., Zhang, Z., Yang, X., Liu, G., & Li, S. (2020). Melatonin prevents neuroinflammation and relieves depression by attenuating autophagy impairment through FOXO3a regulation. *Journal of Pineal Research*, 69(2). <https://doi.org/10.1111/jpi.12667>
- Alzheimer's Association. (2024). *El Alzheimer y la demencia Tratamientos*.
- American Psychiatric Association. (2024). *¿Qué es la depresión?* <https://www.psychiatry.org/patients-families/la-salud-mental/depresion/que-es-la-depresion>.
- Asociación de Alzheimer. (2022, agosto 6). *Tipos de enfermedad de Alzheimer*. <https://www.webmd.com/alzheimers/alzheimers-types>.
- Babulal, G. M., Roe, C. M., Stout, S. H., Rajasekar, G., Wisch, J. K., Benzinger, T. L. S., Morris, J. C., & Ances, B. M. (2020). Depression is Associated with Tau and Not Amyloid Positron Emission Tomography in Cognitively Normal Adults. *Journal of Alzheimer's Disease*, 74(4), 1045–1055. <https://doi.org/10.3233/JAD-191078>
- Batista, A. F., Rody, T., Forny-Germano, L., Cerdeiro, S., Bellio, M., Ferreira, S. T., Munoz, D. P., & De Felice, F. G. (2021). Interleukin-1 β mediates alterations in mitochondrial fusion/fission proteins and memory impairment induced by amyloid- β oligomers. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02099-x>
- Borsari, C., Trader, D. J., Tait, A., & Costi, M. P. (2020). Designing Chimeric Molecules for Drug Discovery by Leveraging Chemical Biology. En *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 63, Número 5, pp. 1908–1928). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01456>
- Centro Nacional de Información Biotecnológica. (2024). *Resumen de compuestos de PubChem para CID 3152, Donepezil*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Donepezil>
- Chu, A., & Wadhwa, R. (2024). *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12884999/>.
- Han, K. M., & Ham, B. J. (2021). How inflammation affects the brain in depression: A review of functional and structural MRI studies. *Journal of Clinical Neurology (Korea)*, 17(4), 503–515. <https://doi.org/10.3988/jcn.2021.17.4.503>
- Hasan, S. M. N., Clarke, C., Strand, T., & Bambico, F. R. (2023). Putative pathological mechanisms of late-life depression and Alzheimer's disease. En *Brain Research* (Vol. 1813). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148423>
- Huang, Y. Y., Gan, Y. H., Yang, L., Cheng, W., & Yu, J. T. (2024). Depression in Alzheimer's Disease: Epidemiology, Mechanisms, and Treatment. En *Biological Psychiatry* (Vol. 95, Número 11, pp. 992–1005). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2023.10.008>
- Joo, M. K., Ma, X., Yoo, J. W., Shin, Y. J., Kim, H. J., & Kim, D. H. (2023). Patient-derived *Enterococcus mundtii* and its capsular polysaccharides cause depression through the

downregulation of NF- κ B-involved serotonin and BDNF expression. *Microbes and Infection*, 25(6). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2023.105116>

Kawakami, I., Iga, J.-I., Takahashi, S., Lin, Y.-T., & Fujishiro, H. (2022). *PCN FRONTIER REVIEW PCN Towards an understanding of the pathological basis of senile depression and incident dementia: Implications for treatment*. <https://doi.org/10.1111/pcn.13485/full>

Khan, S., Barve, K. H., & Kumar, M. S. (2020). Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, 18(11), 1106–1125. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200528142429>

Khawagi, W. Y., Al-kuraishy, H. M., Hussein, N. R., Al-Gareeb, A. I., Atef, E., Elhussieny, O., Alexiou, A., Papadakis, M., Jabir, M. S., Alshehri, A. A., Saad, H. M., & Batiha, G. E. S. (2024). Depression and type 2 diabetes: A causal relationship and mechanistic pathway. En *Diabetes, Obesity and Metabolism* (Vol. 26, Número 8, pp. 3031–3044). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/dom.15630>

Kumar, A., Gupta, V., & Sharma, S. (2024). *Donepezil*.

Li, W., Ali, T., He, K., Liu, Z., Shah, F. A., Ren, Q., Liu, Y., Jiang, A., & Li, S. (2021). Ibrutinib alleviates LPS-induced neuroinflammation and synaptic defects in a mouse model of depression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 92, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.008>

Li, X., Li, J., Huang, Y., Gong, Q., Fu, Y., Xu, Y., Huang, J., You, H., Zhang, D., Zhang, D., Mao, F., Zhu, J., Wang, H., Zhang, H., & Li, J. (2022). The novel therapeutic strategy of vilazodone-donepezil chimeras as potent triple-target ligands for the potential treatment of Alzheimer's disease with comorbid depression. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 229, 114045. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.114045>

Liu, W., Wang, H., Li, X., Xu, Y., Zhang, J., Wang, W., Gong, Q., Qiu, X., Zhu, J., Mao, F., Zhang, H., & Li, J. (2018). Design, synthesis and evaluation of vilazodone-tacrine hybrids as multitarget-directed ligands against depression with cognitive impairment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(12), 3117–3125. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2018.04.037>

Lucena MI, Carvajal A, Andrade RJ, & Velasco A. (2020). *Mechanism of Injury CHEMICAL FORMULA AND STRUCTURE DRUG CAS REGISTRY NO. MOLECULAR FORMULA STRUCTURE 2 LiverTox*.

MAYO CLINIC. (2024, junio 12). *Enfermedad de Alzheimer: los medicamentos ayudan a controlar los síntomas y frenar el deterioro*.

Mena López, R., & Luna Muñoz Francisco García Sierra Mario Hernández Alejandro, J. (s/f). *HISTOPATOLOGÍA MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER*.

Mónica Mena Roa. (2022). *Los casos de demencia podrían ser más frecuentes en el futuro*.

National Center for Biotechnology Information. (2024). *PubChem Compound Summary for CID 6918314, Vilazodone*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vilazodone>

National Institute on Aging. (2023, septiembre 12). *How Is Alzheimer's Disease Treated?* <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-treatment/how-alzheimers-disease-treated>.

National Institute on Aging. (2024, julio 24). *¿Qué causa la enfermedad de Alzheimer?* <https://www.nia.nih.gov/espanol/enfermedad-alzheimer/causa-enfermedad-alzheimer>.

NHS. (2024, julio 12). *Tratamiento -Enfermedad de Alzheimer*. <https://www.nhs.uk/conditions/alzheimers-disease/treatment/>.

Raheja, S., & Girdhar, A. (2023). Neuroinflammation and alzheimer's disease. En *Inflammation and Chronic Disorders: The Secret Connection* (pp. 211–232). Nova Science Publishers, Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-13205-6.00003-0>

Rakugi, H., Kario, K., Yamaguchi, M., Sasajima, T., Gotou, H., & Zhang, J. (2022). Efficacy of sacubitril/valsartan versus olmesartan in Japanese patients with essential hypertension: a randomized, double-blind, multicenter study. *Hypertension Research*, 45(5), 824–833. <https://doi.org/10.1038/s41440-021-00819-7>

Sampietro, A., Pérez-Areales, F. J., Martínez, P., Arce, E. M., Galdeano, C., & Muñoz-Torrero, D. (2022). Unveiling the Multitarget Anti-Alzheimer Drug Discovery Landscape: A Bibliometric Analysis. *Pharmaceuticals*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/ph15050545>

Stevens, A., Lowe, J. S., & Young, B. (2003). *Histopatología Básica Atlas y texto en color* (4a ed.).

Tian, J., Stucky, C. S., Wang, T., Muma, N. A., Johnson, M., & Du, H. (2023). Mitochondrial Dysfunction Links to Impaired Hippocampal Serotonin Release in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 93(2), 605–619. <https://doi.org/10.3233/JAD-230072>

World Health Organization. (2023a, marzo 15). *Dementia*. Retrieved on March 15, 2023 from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.

World Health Organization. (2023b, marzo 31). *Depression*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>.

Yin, J., John, A., & Cadar, D. (2024). Bidirectional Associations of Depressive Symptoms and Cognitive Function Over Time. *JAMA Network Open*, E2416305. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2024.16305>

Zabot, G. C., Medeiros, E. B., Macarini, B. M. N., Peruchi, B. B., Keller, G. S., Lídio, A. V., Boaventura, A., de Jesus, L. C., de Bem Silveira, G., Silveira, P. C. L., Chede, B. C., Réus, G. Z., & Budni, J. (2024). The involvement of neuroinflammation in an animal model of dementia and depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2024.110999>

Zhan, Q., Kong, F., Shao, S., Zhang, B., & Huang, S. (2024). Pathogenesis of Depression in Alzheimer's Disease. En *Neurochemical Research* (Vol. 49, Número 3, pp. 548–556). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11064-023-04061-0>

Zhang, M., Liu, L. yuan, Xu, Y., Wang, W. zhi, Qiu, N. zhuang, Zhang, F. fang, Zhang, F., Wang, X. dan, Chen, W., Xu, X. yan, Gao, Y. feng, Chen, M. hua, Li, Y. qin, Zhang, H. ting, & Wang, H. (2023). Imbalance of multiple neurotransmitter pathways leading to depression-like behavior and cognitive dysfunction in the triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Metabolic Brain Disease*, 38(7), 2465–2476. <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01242-2>

ANEXOS

Tabla 1. Condiciones de reacción para la síntesis de los compuestos químicos

| Solvente | T °C | Base | Reactivo 1 (g) | Tiempo (hr.) | Síntesis |
|---------------------------------|-------|---------|---|--------------|----------|
| Reacción 1 | | | Reactivo 1 1-2-metilbenzilpiperazina | | |
| CH ₂ Cl ₂ | 40 | TEA | 0.2g | 4:30h-8.35h | ✓ |
| Reacción 2 | | | Reactivo 1 1-fenilpiperazina | | |
| CH ₂ Cl ₂ | 40 | TEA | 0.2g | 21h | ✗ |
| Acetona | 50 | TEA, KI | 0.2g | 46.34h | ✗ |
| Etanol | 70 | TEA, KI | 0.2g | 126.84h | ✗ |
| DMSO | 80-90 | TEA | 0.2g | 80.5h | ✗ |
| CH ₃ CN | 70 | TEA, KI | 0.2g | 84h | ✓ |

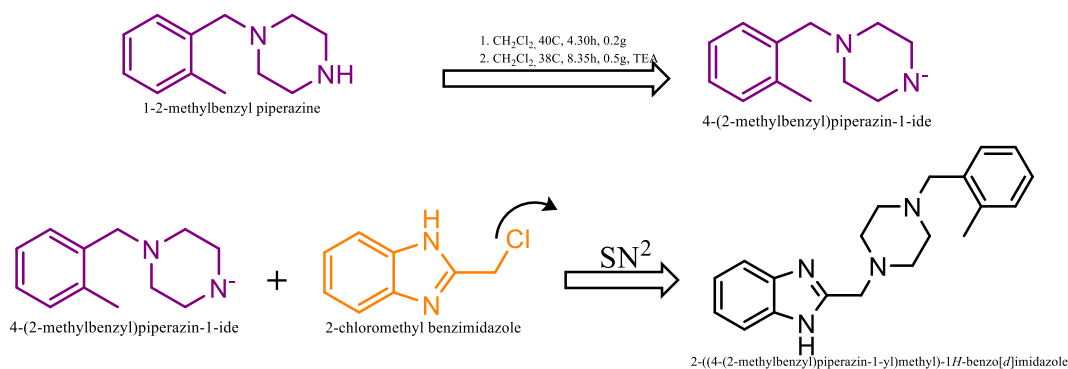


Diagrama 1. Representación esquemática detallada de la reacción de síntesis empleada para la obtención del compuesto químico **1** derivado de benzimidazol y piperazina.

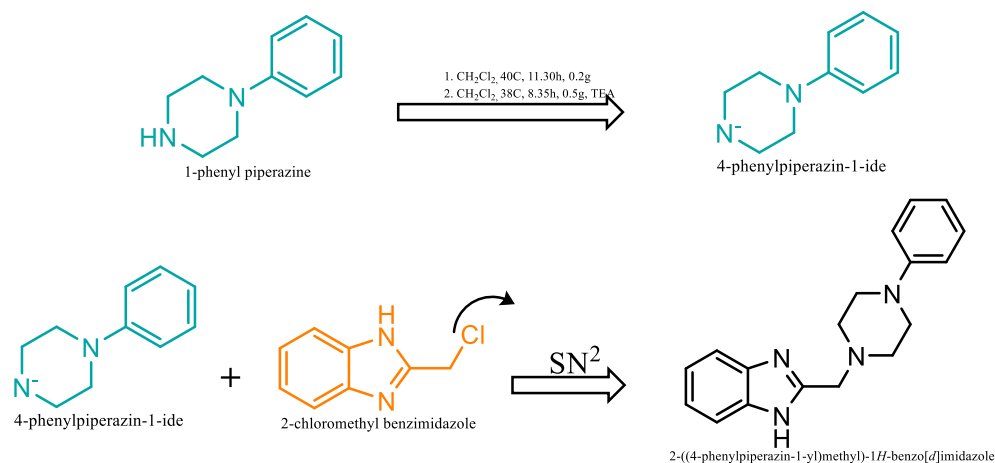


Diagrama 2. Representación esquemática detallada de la reacción de síntesis empleada para la obtención del compuesto químico **2** derivado de benzimidazol y piperazina.