



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Diseño molecular, síntesis y enfoque
bioinformático de *twin drugs* sobre los blancos
farmacológicos PPAR γ /AT1 para el tratamiento de
diabetes e hipertensión**

Tesis que presenta

Kate Sagarminaga Calderón

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., Junio de 2026



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Diseño molecular, síntesis y enfoque bioinformático de twin drugs sobre los blancos farmacológicos PPAR γ /AT1 para el tratamiento de diabetes e hipertensión**” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Kate Sagarminaga Calderón** y aprobada el **08 de junio de 2026** 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. Rubén López Revilla
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Ricardo Espinosa Tanguma
Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Química Farmacéutica 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 la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (No. 2060336) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Dedicatorias

A mis padres, Carlos Sagarminaga y Adriana Calderón, por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida para seguir con mis sueños, darme la libertad y la confianza para seguir creyendo en mí misma. Agradezco todo el amor que me brindan para poder seguirme desarrollando en la vida, tanto personal como académicamente. Ellos son mi más grande pilar en la vida. Los amo mucho.

A mi hermana, Ludwika, por ser mi más grande inspiración para continuar por el camino de la ciencia y confiar en que siempre puede una mejorar en este camino, aun si ese camino sea confuso o cambiante, pero ser siempre fiel a la esencia que cada una tenemos. Por recordarme que no todo en la vida es el trabajo y que las personas podemos ser multifacéticas y tenemos una vida más allá del laboratorio.

A mi hermana Judith, que le prometí que sería una gran científica y seguiría mis sueños costara lo que costará, porque sé que donde quiera que esté, ella podrá verme y sentirse orgullosa de su hermana pequeña.

A mis gatos, Pista, Haru y Gordo, son mi más grande motivación.

A mis amigas Sam y Lupe, quienes han sido mis amigas por más de 20 años y con su amor hacia mí, me han salvado en más de una ocasión, han visto mi desarrollo tanto académico como personal y son una parte fundamental de mi vida, más que mis amigas, las considero mis hermanas.

A mis amigos del IPICYT, Manuel, Genessis, Sam, Anel, Lucero y Gabo; por siempre estar aquí conmigo, por ayudarme siempre que lo necesitaba, no solo en lo académico sino también en lo personal. Gracias a ellos mi estadía como estudiante de maestría fue placentera y llena de risas y buenos momentos. Son de las amistades más reales que pude haber hecho en toda mi vida. Gracias por siempre estar para mí.

A mi novio Carlos Enrique, por siempre estar para mí en todo momento y volverse mi más grande apoyo y confidente en este proceso. Su compañía diaria fue lo que más me calmaba e impulsaba para continuar cada proceso de la maestría.

A mi doctor Sergio Nemorio, que me estuvo apoyando durante todo mi proceso, formándome como una futura maestra y desarrollando ese criterio propio para ser una futura doctora. Agradezco todas sus enseñanzas y los momentos divertidos que pudimos compartir con todos mis compañeros de laboratorio

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por darme el apoyo académico durante mi estancia en el instituto.

Al SECIHTI, por la beca otorgada para la realización de mi maestría.

Al laboratorio de Química Farmacéutica, por permitirme ser parte de él y dejarme desarrollarme como profesionista.

A mi comité tutorial de tesis, Dr. Rubén Hipólito López Revilla, Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva y Dr. Ricardo Espinosa Tanguma por el apoyo y consejos que me dieron a lo largo de la realización de mi tesis.

Al Dr. Francisco Elihu Bautista Redonda, por ser como un segundo tutor en este camino de ciencia y por su apoyo con los espectros de RMN de las muestras utilizadas en este trabajo.

A la M.C. Genessis Montalvo Guevara, por su invaluable apoyo para mejorar mis técnicas de laboratorio.

A Ana Karen Barajas Pacheco del Laboratorio de química de productos naturales, por todo sus consejos y ayuda con los experimentos de *Artemia salina*.

A Gabriela Pérez Assaf, por todo el apoyo administrativo que me ha brindado.
A la División de Biología Molecular, por su apoyo en mi formación.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Lista de esquemas	xii
Lista de Espectros	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
Introducción	1
Justificación	2
Hipótesis	2
Objetivo general	2
PARTE I Diseño, síntesis orgánica, caracterización estructural de intermediarios y <i>twins</i> <i>drugs</i> con potencial acción sobre los blancos PPAR γ y AT1 para el tratamiento de diabetes e hipertensión	3
I.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
I.2 ANTECEDENTES	4
I.2.1 Consideraciones para el diseño de los compuestos KSC 1-4	4
I.2.2 Hibridación Molecular	6
I.2.3 Diseño de los compuestos KSC 1-4	7
I.3 METODOLOGÍA	8
I.3.1. Metodología general para la síntesis de los compuestos finales KSC 1-4	8
I.4 RESULTADOS	9
I.4.1 Síntesis Química	9
I.4.1.1 Síntesis de intermediarios (KSC 5-8)	10
I.4.1.2 Síntesis de compuestos finales (KSC1-4)	16
I.5 CONCLUSIONES	18
I.6 PARTE EXPERIMENTAL	18
I.6.1 Instrumentación	18
I.6.2 Cromatografía	19
I.6.3 Metodología general para síntesis de los compuestos intermediarios KSC5-8	19
I.6.3.1 3-(4-((2'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-il)metoxi)fenil)propanoato de metilo (KSC 5)	20
I.6.3.2 (E)-3-(4-((2'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-il)metoxi)-3-metoxifenil)acrilato de etilo (KSC 6)	21
I.6.3.3 (R)-2-(4-((2'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-il)metoxi)fenoxi)propanoato de metilo (KSC 7)	22
I.6.3.4 2-(4-((2'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-il)metoxi)fenoxi)acetato de metilo (KSC 8)	23
I.6.4 Metodología general para síntesis de los compuestos finales KSC 1-4	24
I.6.4.1 Ácido 4'-((4-(2-carboxietil)fenoxi)metil)-[1,1'-bifenil]-2-carboxílico (KSC 1)	25
I.6.4.2 Ácido (E)-4'-((4-(2-carboxivinil)-2-metoxifenoxi)metil)-[1,1'-bifenil]-2-carboxílico (KSC2)	25

1.6.4.3	Ácido (R)-4'-((4-(1-carboxietoxi)fenoxi)metil)-[1,1'-bifenil]-2-carboxílico	26
(KSC3)		
1.6.4.4	Ácido (E)-4'-((4-(2-carboxivinil)fenoxi)metil)-[1,1'-bifenil]-2-carboxílico	26
(KSC4)		
PARTE II		28
Estudio de acoplamiento molecular de ligandos duales (KSC 1-4) en los sitios activos de los blancos terapéuticos PPAR γ y AT1.		28
II.1 OBJETIVOS PARTICULARES		29
II.2 ANTECEDENTES		29
II.2.1. Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas tipo gamma (PPAR γ)		29
II.2.2. Receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT1)		31
II.2.3. La relevancia del acoplamiento molecular en el diseño dual		34
II.3 METODOLOGÍA		35
II.3.1 Parte Computacional		35
II.3.1.1 Acoplamiento molecular sobre PPAR γ y AT1		35
II.3.3.2 Validación de acoplamiento molecular.		35
II.4 RESULTADOS		35
II.4.1 Acoplamiento molecular de los compuestos finales KSC 1-4 con PPAR γ y AT1		35
II.4.2 Validación del acoplamiento molecular de los compuestos finales KSC 1-4 con PPAR γ y AT1		38
II.4.3 Mapas de interacción de dos dimensiones para los compuestos finales KSC (1-4) en PPAR γ y AT1		41
II.5 CONCLUSIONES		46
II.6 PROGRAMAS Y EQUIPOS UTILIZADOS		46
PARTE III		47
Determinación de la toxicidad aguda (CL ₅₀) de los compuestos finales (KSC 1-4) en <i>Artemia salina</i> .		47
III.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS		48
III.2 ANTECEDENTES		48
III.3 METODOLOGÍA		49
III.3.1 Preparación del Medio y Eclosión de <i>Artemia salina</i>		49
III.3.2 Exposición y Determinación de Mortalidad		49
III.3.3 Criterios de Validación (Control Negativo)		49
III.4 RESULTADOS		49
III.4.1 Ensayos de supervivencia y recuento de nauplios		49
III.4.2. Análisis de regresión lineal y determinación de la CL ₅₀		52
III.4.3. Clasificación cualitativa de la toxicidad		52
III.5 CONCLUSIONES		54
III.6 PARTE EXPERIMENTAL		54
Conclusiones generales		55
Perspectivas		57
Referencias		58
ANEXOS		60
Espectros		61

Lista de tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de intermediarios KSC 5-8.	15
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de compuestos finales KSC 1-4.	17
Tabla 3. Determinación de la toxicidad del compuesto KSC 1 en el bioensayo con A. salina a diferentes concentraciones	50
Tabla 4. Determinación de la toxicidad del compuesto KSC 2 en el bioensayo con A. salina a diferentes concentraciones.	50
Tabla 5. Determinación de la toxicidad del compuesto KSC 3 en el bioensayo con A. salina a diferentes concentraciones.	51
Tabla 6. Determinación de la toxicidad del compuesto KSC 4 en el bioensayo con A. salina a diferentes concentraciones.	51
Tabla 7. Sistema de clasificación de toxicidad basada en unidades de toxicidad.	53
Tabla 8. Parámetros toxicológicos (CL_{50} y UT) de los compuestos finales KSC 1-4 evaluados en el modelo de Artemia salina.	53

Lista de figuras

- Figura 1. Estructuras de Tiazolindionas, remarcando en azul el fragmento éter aromático utilizado en el diseño racional de fármacos. 5
- Figura 2. Estructuras de derivados fenólicos utilizados en el laboratorio de química farmacéutica para el diseño racional de fármacos. 5
- Figura 3. Estructura química del telmisartán señalando en rojo, la estructura del bifenilo, el cual es la parte que se busca utilizar en el diseño racional de fármacos. 6
- Figura 4. Estrategias de hibridación molecular para la obtención de nuevas entidades químicas llamadas fármacos gemelos. Donde A= compuesto activo en diana biológica 1, B= compuesto activo en diana farmacológica 2, R1=diana 1, R2= diana 2, R3= diana 3. 7
- Figura 5. Diseño de estructuras KSC1-4 basados en los farmacóforos de los fenoles previamente utilizados en el laboratorio (azul) y del telmisartán (rojo). 8
- Figura 6. Espectro de RMN ^1H del intermediario KSC 5. Se logran observar los picos correspondientes a la estructura del bifenilcarbonitrilo (rojo) y los correspondientes del fenol (azul), así como los metilos (verde) y metileno (amarillo). 11
- Figura 7. Espectro de RMN ^1H del intermediario KSC 6. Se logran observar los picos correspondientes a la estructura del bifenilcarbonitrilo (rojo) y los correspondientes del fenol (azul), así como los metilos (verde) y metileno (amarillo). 12
- Figura 8. Espectro de RMN ^1H del intermediario KSC 7. Se logran observar los picos correspondientes a la estructura del bifenilcarbonitrilo (rojo) y los correspondientes del fenol (azul), así como los metilos (verde) y metileno (amarillo). 13
- Figura 9. Espectro de RMN ^1H del intermediario KSC 8. Se logran observar los picos correspondientes a la estructura del bifenilcarbonitrilo (rojo) y los correspondientes del fenol (azul), así como los metilos (verde) y metileno (amarillo). 14
- Figura 10. Dominios funcionales del PPAR γ humano. El dominio N-terminal se denomina dominio de activación (dominio A/B) o función de activación-1 (AF-1). El componente del dominio C es el dominio de unión al ADN (DBD). El dominio bisagra (región D) es una región de enlace y confiere flexibilidad a la proteína. El extremo carboxilo se denomina región E/F o dominio de función de activación-2 (AF-2) y es el dominio de unión al ligando (LBD). Los números indican la cantidad de residuos desde el extremo N-terminal. 30
- Figura 11. Representación tridimensional del heterodímero PPAR γ /RXR unido a su ligando y al elemento de respuesta a PPRE en el ADN. 31
- Figura 12. Estructura tridimensional de la proteína AT1, unida al ligando Angiotensina II. 32
- Figura 13. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA). 33
- Figura 14. Vías para la transmisión de señales y los efectos fisiológicos de los receptores AT1. Abreviaturas: PLA2– fosfolipasa A2; PLD– fosfolipasa D; PLC– fosfolipasa C; AC– adenilato ciclasa; AA– ácido araquidónico; IP3– inositol-1,4,5-trifosfato; DAG– diacilglicerol; PKC– proteína quinasa C. 34
- Figura 15. Modo de unión de KSC1 en el sitio activo de (A) PPAR γ y (B) AT1. Los aminoácidos del sitio activo se encuentran en color rosa y las interacciones polares se muestran con líneas punteadas amarillas. 36

- Figura 16. Modo de unión de KSC2 en el sitio activo de (A) PPAR γ y (B) AT1. Los aminoácidos del sitio activo se encuentran en color rosa y las interacciones polares se muestran con líneas punteadas amarillas. 36
- Figura 17. Modo de unión de KSC3 en el sitio activo de (A) PPAR γ y (B) AT1. Los aminoácidos del sitio activo se encuentran en color rosa y las interacciones polares se muestran con líneas punteadas amarillas. 36
- Figura 18. Modo de unión de KSC4 en el sitio activo de (A) PPAR γ y (B) AT1. Los aminoácidos del sitio activo se encuentran en color rosa y las interacciones polares se muestran con líneas punteadas amarillas. 37
- Figura 19. Comparación de los compuestos finales KSC1(rosa), KSC 2 (magenta), KSC3 (verde), KSC4 (amarillo), con el ligando co-cristalizado (azul) en el sitio de unión de la proteína PPAR γ . 38
- Figura 20. Comparación de la pioglitazona Co-Cristalizada (Verde) con la pioglitazona re-acoplada (azul), en el bolsillo drogable de la proteína PPAR γ . 39
- Figura 21. Comparación de los intermediarios KSC 5 (magenta), KSC6 (amarillo), KSC7(rosa), KSC8 (verde), con el ligando co-cristalizado, olmesartán (azul) en el sitio de unión de la proteína AT1. 40
- Figura 22. Comparación de olmesartán co-cristalizado (rosa) y olmesartán re-acoplado (azul), en el bolsillo drogable de la proteína AT1. 40
- Figura 23. Diagramas de interacciones bidimensionales del modo de unión predicho del receptor PPAR γ con los compuestos (A) KSC 1, (B) KSC2, (C) KSC3, (D)KSC4. También se muestra como referencia el correspondiente mapa de interacción 2-D del ligando co-cristalizado pioglitazona (E) en PPAR γ . 42
- Figura 24. Diagramas de interacciones bidimensionales del modo de unión predicho del receptor AT1 con los compuestos (A) KSC 1, (B) KSC2, (C) KSC3, (D)KSC4. También se muestra como referencia el correspondiente mapa de interacción 2-D del ligando co-cristalizado olmesartán (E) de AT1. 44
- Figura 25. Curvas de citotoxicidad (% Mortalidad vs. Concentración) para los cuatro compuestos finales de KSC. Los paneles del A-D corresponden a KSC 1-4, respectivamente. Las líneas discontinuas representan las regresiones lineales; las ecuaciones de la recta y los valores de R2 se muestran en cada panel. 52

Lista de esquemas

Esquema 1. Síntesis general propuesta para la obtención de los compuestos finales KSC 1-4.	9
Esquema 2. Síntesis de los intermediarios KSC 5-8.	10
Esquema 3. Síntesis de compuestos finales KSC 1-4.	16

Lista de Espectros

Espectro 1. Espectro de RMN ^1H 300 MHz del intermediario KSC5.	61
Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C 700MHz del intermediario KSC5.	61
Espectro 3. Espectro de RMN COSY de intermediario KSC5.	62
Espectro 4. Espectro de RMN HSQC de intermediario KSC5.	62
Espectro 5. Espectro de RMN HMBC del intermediario KSC5.	63
Espectro 6. Espectro de RMN ^1H 300MHz del intermediario KSC6.	63
Espectro 7. Espectro de RMN ^{13}C 700MHz del intermediario KSC6.	64
Espectro 8. Espectro de RMN COSY del intermediario KSC6.	64
Espectro 9. Espectro de RMN HSQC del intermediario KSC6.	65
Espectro 10. Espectro de RMN HMBC del intermediario KSC6	65
Espectro 11. Espectro de RMN de ^1H 300MHz del intermediario KSC7.	66
Espectro 12. Espectro de RMN ^{13}C 700MHz del intermediario KSC7.	66
Espectro 13. Espectro de RMN COSY del intermediario KSC7.	67
Espectro 14. Espectro de RMN HSQC del intermediario KSC7	67
Espectro 15. Espectro de RMN HMBC del intermediario KSC7.	68
Espectro 16. Espectro de RMN ^1H 300MHz del intermediario KSC8.	68
Espectro 17. Espectro de RMN ^{13}C 700MHz del intermediario KSC8.	69
Espectro 18. Espectro de RMN COSY del intermediario KSC8.	69
Espectro 19. Espectro de RMN HSQC del intermediario KSC8.	70
Espectro 20. Espectro de RMN HMBC del intermediario KSC8.	70

Resumen

Diseño molecular, síntesis y enfoque bioinformático de *twin drugs* sobre los blancos farmacológicos PPAR γ /AT1 para el tratamiento de diabetes e hipertensión

Contexto: La coexistencia de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e hipertensión arterial sistémica (HAS) presenta una estrecha relación fisiopatológica, donde factores como la resistencia a la insulina y la obesidad actúan como denominadores comunes. Su manejo clínico tradicional mediante polifarmacia reduce la adherencia al tratamiento debido a la complejidad posológica. Para abordar esta problemática, se propuso el diseño racional de una serie de cuatro compuestos híbridos moleculares (*twin drugs*) estructurados estratégicamente para actuar de manera dual y equilibrada sobre el receptor nuclear PPAR γ y el receptor de membrana AT1. **Métodos:** El proyecto se abordó en tres etapas interconectadas. En primer lugar, se consolidó una ruta sintética convergente de dos etapas: una alquilación de Williamson para acoplar el núcleo bifenilcarbonitrilo con diversos derivados fenólicos, seguida de una hidrólisis básica simultánea de los grupos éster y nitrilo con KOH y una posterior acidificación con HCl. La identidad de los intermediarios se confirmó por RMN (1D y 2D). En segundo lugar, se realizaron estudios bioinformáticos de acoplamiento molecular (*docking*) con AutoDock 4.2.3 para determinar las energías libres de Gibbs y mapear las interacciones bidimensionales en los sitios activos de PPAR γ y AT1. Finalmente, se evaluó la toxicidad aguda *in vitro* mediante un bioensayo dependiente de la dosis con nauplios de *Artemia salina* expuestos a un gradiente de concentraciones durante 24 horas. **Resultados:** La síntesis química arrojó la obtención exitosa de los intermediarios KSC 5-8 con rendimientos del 68.61% al 89.55%, y de los productos finales KSC 1-4 con rendimientos de hasta 74.77% e incrementos notables en su estabilidad térmica (temperaturas de descomposición de 237 °C a >300 °C). Los ensayos de *docking* (validados con valores de RMSD de 0.458 Å en PPAR γ y 0.205 Å en AT1) demostraron que todos los compuestos interactúan de forma espontánea en ambos bolsillos terapéuticos. En PPAR γ se reveló un anclaje polar con la tríada esencial Ser289, His323 y Tyr473, mientras que en AT1 se observó un puente salino con el residuo Arg167. El compuesto KSC 4 destacó como el líder de la serie con la mejor afinidad teórica ($\Delta G = -10.32$ kcal/mol en PPAR γ y -9.21 kcal/mol en AT1). En la evaluación toxicológica, todos los compuestos mostraron CL₅₀ superiores al límite de citotoxicidad inespecífica; KSC 1 exhibió toxicidad moderada (CL₅₀ = 56.28 μ M), mientras que KSC 2, 3 y 4 se clasificaron como "Ligeramente tóxicos", presentando KSC 4 el perfil más seguro y el mayor margen de seguridad (CL₅₀ = 131.98 μ M; UT = 0.757). **Conclusiones:** La integración del modelado computacional y las pruebas en el laboratorio demostraron la viabilidad y alta eficiencia de la metodología sintética desarrollada. Los resultados posicionan formalmente a KSC 4 como un candidato prometedor. De este modo, se cumplen los objetivos planteados al sentar las bases analíticas y biológicas indispensables para el futuro desarrollo de las evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de estos compuestos.

PALABRAS CLAVE: PPAR γ , Receptor AT1, hipertensión, diabetes, Twin Drugs, RMN, acoplamiento molecular, toxicidad.

Abstract

Molecular design, synthesis and bioinformatics approach of twin drugs targeting PPAR γ /AT1 for the treatment of diabetes and hypertension

Context: The coexistence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and systemic arterial hypertension (SAH) it presents a close pathophysiological relationship, where factors such as insulin resistance and visceral obesity act as common denominators.. To address this issue, the rational design of a series of four molecular hybrid compounds (twin drugs, KSC 1-4) was proposed, strategically structured to act in a dual and balanced manner on the nuclear receptor PPAR (metabolic regulator) and the membrane receptor AT1 (blood pressure regulator). **Methods:** The project was approached through three interconnected stages. First, a two-step convergent synthetic route was consolidated: a Williamson alkylation to couple the biphenylcarbonitrile core with various optimized phenolic derivatives, followed by simultaneous basic hydrolysis of the ester and nitrile groups using KOH under reflux, with subsequent acidification using HCl. The identity of the intermediates was confirmed by NMR (1D and 2D). Second, bioinformatics molecular docking assays were performed using AutoDock 4.2.3 to determine Gibbs free energies and map two-dimensional interactions within the active sites of PPAR γ and AT1. Finally, acute *in vitro* toxicity was evaluated using a dose-dependent bioassay with *Artemia salina* nauplii (Instar II/III stages) exposed to a gradient of concentrations over 24 hours. **Results:** Chemical synthesis led to the successful acquisition of intermediates KSC 5-8 with yields ranging from 68.61% to 89.55%, and final carboxylic diacids KSC 1-4 with yields up to 74.77%, showing a sharp increase in thermal stability (decomposition temperatures from 237 °C to >300 °C). Docking assays (validated with RMSD values of 0.458 Å for PPAR γ and 0.205 Å for AT1) proved that all compounds interact spontaneously within both therapeutic pockets. In PPAR γ , efficient polar anchoring with the essential triad Ser289, His323, and Tyr473 was revealed, while in AT1, a critical salt bridge with the Arg167 residue was observed. Compound KSC 4 stood out as the series leader with the best theoretical affinity ($\Delta G = -10.32$ kcal/mol in PPAR γ and -9.21 kcal/mol in AT1). In the toxicological evaluation, all compounds showed LC₅₀ values above the non-specific cytotoxicity limit; KSC 1 exhibited moderate toxicity (LC₅₀ = 56.28 μ M), whereas KSC 2, 3, and 4 were classified as "Slightly toxic", with KSC 4 displaying the safest profile and the widest therapeutic window (LC₅₀ = 131.98 μ M; TU = 0.757). **Conclusions:** The integration of computational modeling and laboratory testing demonstrated the feasibility and high efficiency of the developed synthetic methodology. The results formally position KSC 4 as a highly promising, safe, and multifunctional lead candidate. This fulfills the objectives set by establishing the essential analytical and biological foundations for the future development of *in vitro* and *in vivo* evaluations of these compounds.

KEYWORDS: PPAR γ , AT1 receptor, hypertension, diabetes, twin drugs, RMN, docking, toxicity.

Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y la hipertensión arterial sistémica (HAS) representan dos de las afecciones crónicas de mayor prevalencia e impacto socioeconómico en la salud pública contemporánea. De acuerdo con datos de la Federación Internacional de Diabetes (FID) de 2025, aproximadamente el 11.1% de la población adulta a nivel mundial padece DMT2, una patología metabólica caracterizada por disfunción de las células beta pancreáticas y una marcada resistencia periférica a la insulina (Federación Internacional de Diabetes, 2022). De forma paralela, la HAS afecta a más del 31% de la población adulta global. En el contexto nacional, el panorama es igualmente crítico; en México se estiman alrededor de 15.2 millones de individuos con un diagnóstico establecido de HAS, lo que significa que uno de cada cuatro ciudadanos padece esta enfermedad endotelial (CENAPRED, 2025).

La coexistencia de ambas entidades patológicas en un mismo paciente es la consecuencia de una intrincada red de mecanismos fisiopatológicos compartidos. La obesidad central, el estrés oxidativo, los procesos de inflamación crónica de bajo grado y, fundamentalmente, la resistencia a la insulina actúa como denominadores comunes que aceleran el daño y la disfunción macro y microvascular (Šomlóová, 2011). Cuando la HAS y la DMT2 convergen, el riesgo de sufrir desenlaces cardiovasculares graves, nefropatías o infartos agudos al miocardio se potencia exponencialmente, elevando de forma drástica las tasas de mortalidad general (Jia & Sowers, 2021; Petrie et al., 2018).

A nivel molecular, el manejo clínico de estas enfermedades involucra sistemas biológicos muy distintos pero interconectados. Por un lado, el receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ) es un factor de transcripción nuclear expresado abundantemente en el tejido adiposo y esquelético que ejerce un papel sensor clave en la homeostasis de carbohidratos y lípidos; su activación promueve la captación de glucosa mediante la sobreexpresión del transportador GLUT4 (Hidalgo-Figueroa et al., 2021). Por otro lado, el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1) es un receptor acoplado a proteína G transmembrana que funge como el efector principal del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), mediando potentes respuestas de vasoconstricción, retención de sodio y remodelado vascular adverso (Simões et al., 2020).

Actualmente, el abordaje de estas enfermedades en pacientes con este doble desafío clínico exige esquemas de polifarmacia que combinan de forma independiente como las tiazolidindionas con agentes antihipertensivos, como los antagonistas de los receptores de angiotensina II o ARA II. Este régimen polifarmacéutico tradicional acarrea serias limitaciones, tales como un incremento en la tasa de efectos adversos, interacciones medicamentosas no deseadas y una drástica disminución en la adherencia terapéutica por parte del paciente debido a la complejidad posológica. Aunque fármacos como el telmisartán marcaron un hito al demostrar propiedades antihipertensivas junto con una acción secundaria como agonista parcial de PPAR γ , su afinidad desequilibrada limita su eficacia frente a cuadros clínicos donde la resistencia a la insulina es el factor metabólico dominante (Usui et al., 2007).

Frente a esta ventana de oportunidad, la ingeniería molecular moderna plantea el diseño racional de ligandos duales o *twin drugs*. Esta estrategia de vanguardia busca integrar en una sola entidad química los requerimientos farmacofóricos necesarios para interactuar simultáneamente y de manera equilibrada con el dominio de unión al ligando de PPAR γ y el bolsillo profundo transmembranal del receptor AT1. El presente trabajo de investigación se

inserta en este eje de frontera con el desarrollo de la serie de compuestos, híbridos moleculares diseñados convergentemente a partir de la funcionalización del núcleo bifenilo con diversos derivados fenólicos de actividad antidiabética. A través de este enfoque interdisciplinario, que abarca la síntesis orgánica (Parte I), la simulación bioinformática (Parte II) y el tamizaje toxicológico *en Artemia salina* (Parte III), se pretende aportar nuevas alternativas terapéuticas capaces de mitigar ambas enfermedades desde sus bases biomoleculares críticas, optimizando la eficacia clínica y simplificando el tratamiento en favor de la seguridad del paciente.

Justificación

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y la hipertensión arterial sistémica (HAS) son enfermedades crónicas que comparten mecanismos fisiopatológicos complejos, teniendo una tasa de mortalidad de más de 300,000 personas anualmente en México. El tratamiento clínico convencional se basa en la polifarmacia, administrando de forma independiente fármacos para el control glucémico y de la presión arterial. Este enfoque incrementa el riesgo de interacciones medicamentosas y efectos adversos, además de reducir drásticamente la adherencia del paciente al tratamiento debido a la complejidad del régimen posológico. Frente a esta problemática, el desarrollo de ligandos duales o *twin drugs* surge como una estrategia farmacológica superior para simplificar el esquema terapéutico. Por lo tanto, este trabajo se justifica en el diseño y la síntesis orgánica de nuevas entidades químicas basadas en una ingeniería molecular convergente. Mediante este enfoque, se busca optimizar de forma equilibrada la afinidad por los blancos PPAR γ y AT1 con una sola entidad química, atacando ambas enfermedades simultáneamente desde dos frentes biológicos críticos y ofreciendo una alternativa terapéutica potencialmente más eficiente y segura.

Hipótesis

La hibridación molecular del núcleo del 4'-bromometil-2-bifenilcarbonitrilo con derivados fenólicos, seguida de una acidificación, permitirá la obtención de fármacos híbridos (*twin drugs*) que mantendrán la actividad dual como antagonistas del receptor AT1 y agonistas del receptor PPAR γ , para el control simultáneo de la hipertensión arterial y la diabetes tipo 2.

Objetivo general

Sintetizar, caracterizar estructuralmente y evaluar mediante herramientas bioinformáticas de acoplamiento molecular una serie de cuatro compuestos híbridos con potencial acción dual sobre los blancos farmacológicos PPAR γ y AT1 para el tratamiento simultáneo de la diabetes y la hipertensión.

PARTE I

Diseño, síntesis orgánica, caracterización estructural de intermediarios y *twin drugs* con potencial acción sobre los blancos PPAR γ y AT1 para el tratamiento de diabetes e hipertensión

I.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar y sintetizar cuatro compuestos finales con ácidos carboxílicos utilizando métodos de síntesis orgánica aplicados a la obtención de moléculas bioactivas.
- Caracterizar estructuralmente los compuestos mediante la técnica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

I.2 ANTECEDENTES

La estrecha relación fisiopatológica entre la DMT2 y la HAS donde factores como la obesidad visceral y la resistencia a la insulina actúan como denominadores comunes exige enfoques terapéuticos más integrales (Petrie et al., 2018). Actualmente, el tratamiento estándar implica la administración por separado de fármacos como las tiazolidindionas (TZDs) para el control glucémico (Heikkinen et al., 2007) y los antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II) para el control de la presión (Cheung, 2006). Sin embargo, este esquema de polifarmacia no solo aumenta el riesgo de interacciones medicamentosas, sino que reduce drásticamente la adherencia del paciente al tratamiento.

En este contexto, el desarrollo de ligandos duales o *twin drugs* surge como una estrategia farmacológica superior. Estos compuestos están diseñados para interactuar simultáneamente con el receptor PPAR γ y el AT1. Al modular ambas dianas con una sola entidad química, es posible obtener un efecto sinérgico que mejore la sensibilidad a la insulina y promueva la vasodilatación, simplificando el régimen terapéutico y atacando ambas enfermedades desde dos frentes biológicos críticos.

Dentro de las estrategias actuales para el manejo de las comorbilidades cardiometabólicas, el telmisartán destaca como un referente clave. Aunque fue diseñado originalmente como un antagonista potente y selectivo de los ARA II para el tratamiento de la HAS, se ha demostrado que posee la capacidad única de actuar como un agonista parcial de PPAR γ . Esta actividad dual le permite no solo reducir la presión arterial, sino también mejorar moderadamente la sensibilidad a la insulina.

Sin embargo, a pesar de sus beneficios, el telmisartán presenta una limitación crítica: su acción sobre PPAR γ es secundaria y sustancialmente más débil en comparación con su afinidad por AT1. Esta dualidad parcial y desequilibrada restringe su eficacia clínica en pacientes donde la resistencia a la insulina es el factor dominante de ambas enfermedades (Usui et al., 2007).

Por lo tanto, existe una necesidad importante de diseñar nuevas entidades químicas, como las propuestas en este trabajo de investigación, que busquen optimizar esta interacción. A diferencia del telmisartán, el diseño de estas *twin drugs* se fundamenta en una ingeniería molecular que busca una afinidad robusta y equilibrada por ambos blancos farmacológicos. Al mejorar la potencia sobre PPAR γ sin sacrificar la eficacia sobre AT1, se pretende lograr una modulación integral que supere los efectos parciales de los fármacos existentes, ofreciendo una alternativa terapéutica más potente y específica para el tratamiento simultáneo de la diabetes y la hipertensión.

I.2.1 Consideraciones para el diseño de los compuestos KSC 1-4

Con el propósito de desarrollar moléculas híbridas capaces de ejercer una acción dual simultánea sobre los blancos terapéuticos PPAR γ y AT1 se optó por una estrategia de diseño racional basada en la combinación de grupos farmacofóricos conocidos que confieren actividad

biológica específica en ambos receptores. Esta aproximación se fundamentó en las relaciones estructura-actividad de fármacos ya establecidos y disponibles en el mercado farmacéutico.

Para conferir y optimizar la propiedad antidiabética dirigida a la modulación de PPAR γ , se tomó como modelo de referencia la familia de las tiazolidindionas (TZDs), tales como la pioglitazona (**Figura 1**).

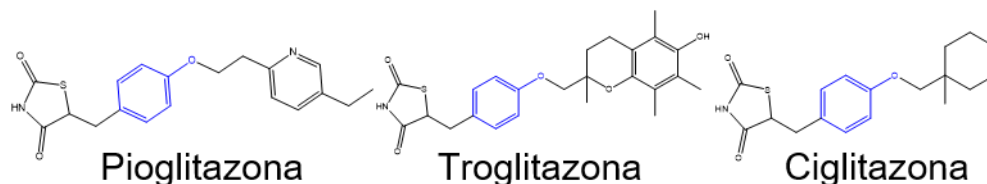


Figura 1. Estructuras de Tiazolidindionas, remarcando en azul el fragmento éter aromático utilizado en el diseño racional de fármacos.

Estructuralmente, se identificó que el fragmento de éter aromático (representado en azul) juega un papel crucial en la orientación y estabilización dentro del bolsillo de unión al ligando del receptor nuclear. Con base en este antecedente, en este trabajo de investigación se buscó utilizar el anillo heterocíclico convencional de las TZDs mediante la incorporación selectiva de una serie de derivados fenólicos alifáticos e insaturados que fueron previamente trabajados y optimizados en nuestro laboratorio, los cuales ya han demostrado poseer una actividad antidiabética inherente y un perfil biológico favorable (**Figura 2**) (Rodríguez-Luévano et al., 2024). De este modo, se conservó la conectividad del puente de oxígeno aromático esencial para el reconocimiento molecular en el brazo de activación de PPAR γ .

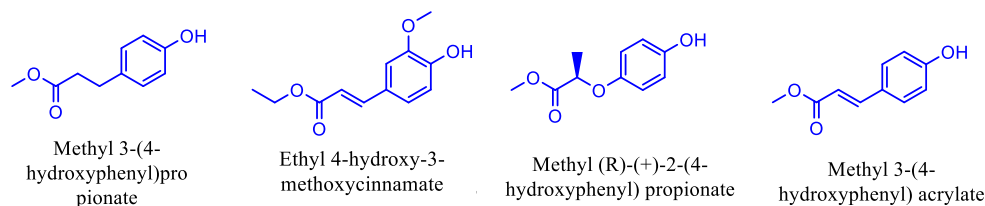
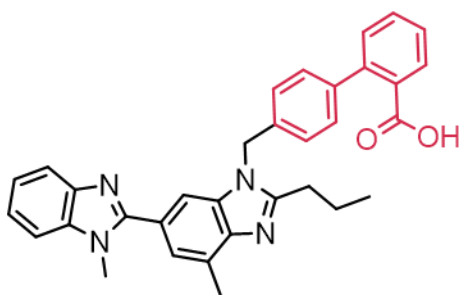


Figura 2. Estructuras de derivados fenólicos utilizados en el laboratorio de química farmacéutica para el diseño racional de fármacos.

Por otra parte, para conferir la actividad antihipertensiva complementaria a la estructura híbrida, el diseño molecular se basó en los antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II), tomando como referente principal al telmisartán (**Figura 3**). En este tipo de fármacos, la presencia de un sistema aromático es un requerimiento clave para insertarse eficientemente en la cavidad transmembranal profunda del receptor de membrana AT1. Para emular esta interacción lipofílica crítica, se introdujo en el extremo opuesto de la molécula el núcleo bifenilo a través del empleo de 4'-bromometil-2-bifenilcarbonitrilo (BFC) como bloque de construcción. El andamio bifenilo proveniente del BFC proporciona la rigidez estructural, la densidad electrónica y la geometría tridimensional requeridas para mimetizar los contactos hidrofóbicos clave del telmisartán en el receptor AT1, consolidando así una arquitectura molecular bivalente y equilibrada para la acción dual planteada.



Telmisartán

Figura 3. Estructura química del telmisartán señalando en rojo, la estructura del bifénilo, el cual es la parte que se busca utilizar en el diseño racional de fármacos.

I.2.2 Hibridación Molecular

La estrategia de diseño implementada en la serie KSC (1-4) se rige bajo el concepto de hibridación molecular, una aproximación innovadora en la química farmacéutica moderna que consiste en la fusión o combinación covalente de dos o más fragmentos farmacofóricos pertenecientes a moléculas biológicamente activas distintas, en una única entidad química estructurada. El objetivo primordial de esta metodología es generar un agente multifuncional o ligandos duales (twin drugs) capaces de interactuar simultáneamente con diferentes blancos terapéuticos. Esta aproximación supera de manera formal las limitaciones asociadas a las terapias de combinación convencionales (co-administración de dos fármacos independientes), tales como la variabilidad en los perfiles farmacocinéticos individuales, el riesgo incrementado de interacciones medicamentosas adversas y las complicaciones biotransformationales en el aclaramiento metabólico.

Desde una perspectiva estructural, la hibridación molecular puede clasificarse en diferentes categorías dependiendo de la conectividad espacial de sus componentes: híbridos fusionados, conjugados (unidos a través de un espaciador o linker) o híbridos superpuestos (**Figura 4**). En el caso específico de las twin drugs sintetizadas en este proyecto, se optó por un diseño de hibridación por superposición farmacofórica. En este enfoque, las estructuras requeridas para el reconocimiento de ambos receptores se encuentran integrados en un núcleo compacto, compartiendo el puente de oxígeno central y minimizando el peso molecular global, un parámetro crítico para preservar una buena biodisponibilidad y propiedades fisicoquímicas farmacológicas adecuadas (Claudio Viegas-Junior et al., 2007; Do Couto Maia & Alberto Manssour Fraga, 2010).

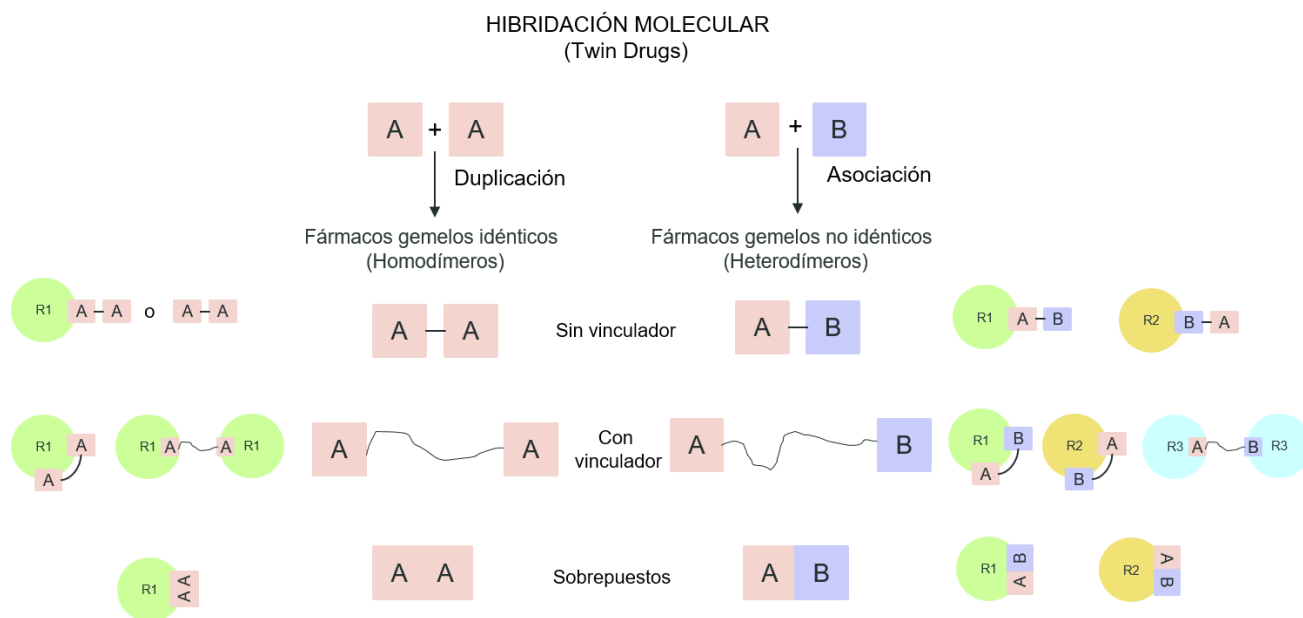


Figura 4. Estrategias de hibridación molecular para la obtención de nuevas entidades químicas llamadas fármacos gemelos. Donde A= compuesto activo en diana biológica 1, B= compuesto activo en diana farmacológica 2, R1=diana 1, R2= diana 2, R3= diana 3.

1.2.3 Diseño de los compuestos KSC 1-4

Al unificar el núcleo bifenilo con las estructuras fenólicas bioactivas previamente optimizadas en nuestro laboratorio. Esto le permite a la molécula plegarse o acomodarse tridimensionalmente de formas diferenciadas según el entorno donde se encuentre: adoptando una conformación extendida y lipofílica para insertarse en el canal transmembranal profundo de AT1, o bien, una conformación coordinada mediante anclajes polares específicos para estabilizar la tríada de aminoácidos esenciales en el brazo de activación del bolsillo del receptor PPAR γ , (**Figura 5**).

Una de las modificaciones estructurales críticas realizadas en el diseño de la serie de compuestos consistió en una hidrólisis básica de los grupos éster y nitrilo para la formación de ácidos carboxílicos. Esta decisión de diseño se fundamentó en la necesidad de optimizar la afinidad y especificidad hacia los sitios de unión de los blancos biológicos de interés, dado que este grupo funcional actúa como un farmacóforo esencial para la activación y anclaje en el receptor. Esto es fundamental, ya que permite la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas con residuos de aminoácidos básicos o polares (como argininas, lisinas o histidinas) ubicados en el bolsillo catalítico o de unión de las proteínas blanco. En consecuencia, la inclusión del fragmento carboxílico no solo imita las características estructurales de los ligandos endógenos, sino que estabiliza la conformación activa del complejo fármaco-receptor.

De este modo, la hibridación molecular aplicada a la serie KSC no representa una simple suma de fragmentos, sino una sinergia molecular planificada. Esta arquitectura bivalente dota a las moléculas de la versatilidad electrónica e intermolecular requerida para ejercer un control simultáneo sobre la cascada hipertensiva y el desbalance metabólico de la resistencia a la insulina con una sola dosis farmacológica, abriendo un camino robusto hacia terapias más eficientes y seguras frente a ambas enfermedades.

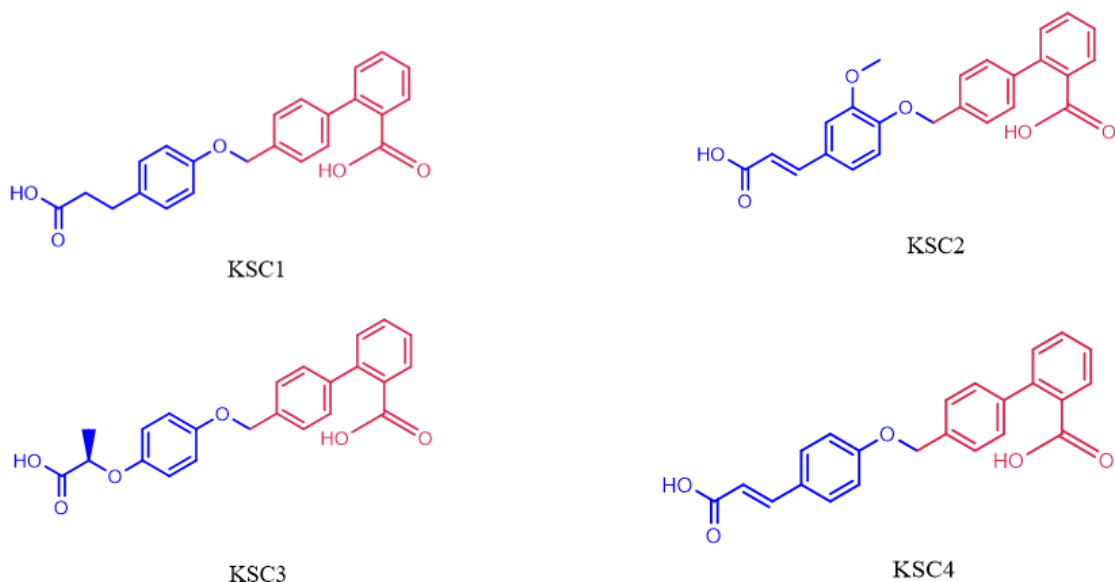


Figura 5. Diseño de estructuras KSC1-4 basados en los farmacóforos de los fenoles previamente utilizados en el laboratorio (azul) y del telmisartán (rojo).

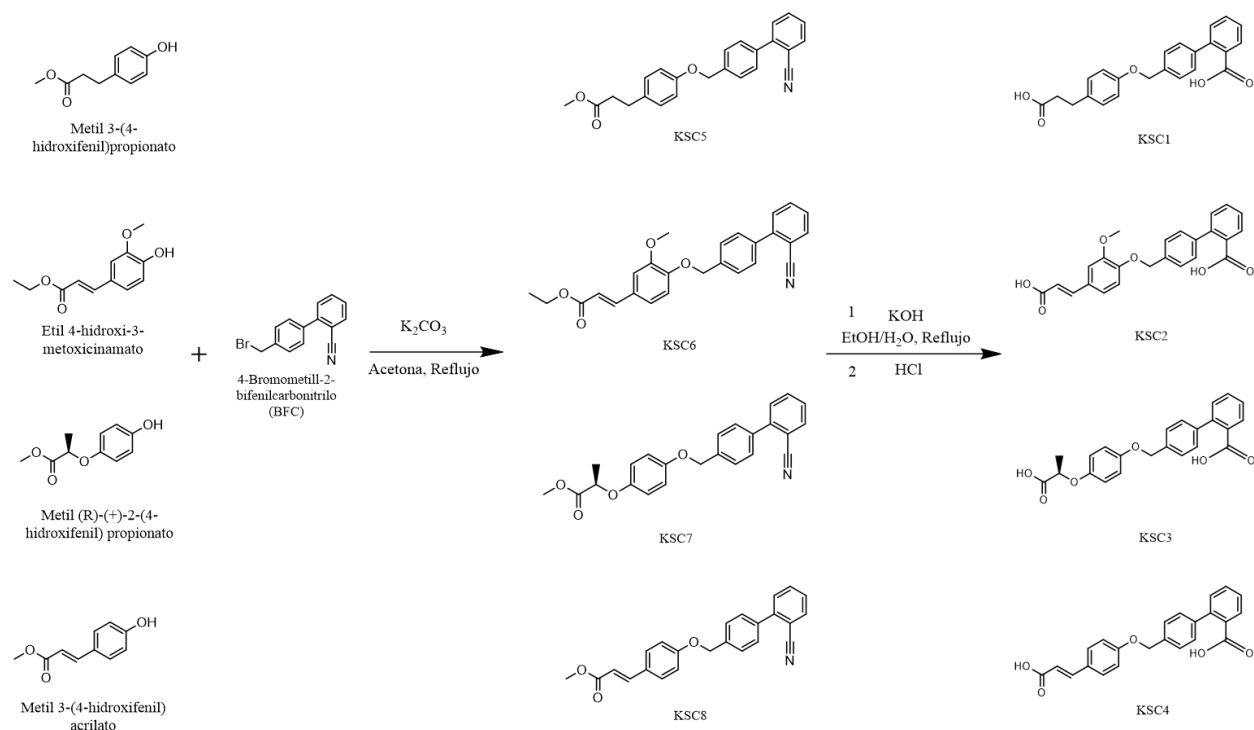
I.3 METODOLOGÍA

Los métodos de síntesis orgánica aplicados para la obtención de los compuestos finales, realizada en el laboratorio de Química Farmacéutica del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), bajo la tutoría del Dr. Sergio N. Hidalgo Figueroa.

La obtención de espectros de RMN (^1H , ^{13}C , 2D) fueron facilitados por el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el Dr. José Rivera Chavez y la Dra. Beatriz Quiroz García. La interpretación de los datos se realizó en el grupo de investigación.

I.3.1. Metodología general para la síntesis de los compuestos finales KSC 1-4

Para la síntesis de los compuestos **KSC 1-4** se planeó la ruta sintética en dos etapas principales: primero, una reacción de alquilación de Williamson empleando K_2CO_3 mediante una reacción sustitución nucleofílica bimolecular (S_N^2) para acoplar el núcleo de BFC con diversos derivados fenólicos. Posteriormente, se realizó una hidrólisis básica de los grupos éster y nitrilo utilizando KOH en una mezcla $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ a reflujo, seguida de una acidificación con HCl para obtener los compuestos finales (KSC1-KSC4) en su forma de diácidos carboxílicos, como se observa en el **Esquema 1**.



Esquema 1. Síntesis general propuesta para la obtención de los compuestos finales KSC 1-4.

La síntesis de los ligandos duales mostrada en el **Esquema 1** se llevó a cabo mediante una estrategia convergente de dos etapas, partiendo de la funcionalización de diversos derivados fenólicos previamente trabajados en el grupo de investigación. En la primera etapa, se realizó una **alquilación de Williamson** mediante el acoplamiento del BFC con los correspondientes fenoles, empleando K_2CO_3 para obtener los intermediarios **KSC5-KSC8**. Posteriormente, los grupos éster y nitrilo de estos intermediarios se sometieron a una **hidrólisis básica** con KOH en una mezcla de etanol y agua a reflujo. La ruta finalizó con una acidificación controlada mediante ácido clorhídrico HCl para precipitar los compuestos finales **KSC1-KSC4** en forma de diácidos libres.

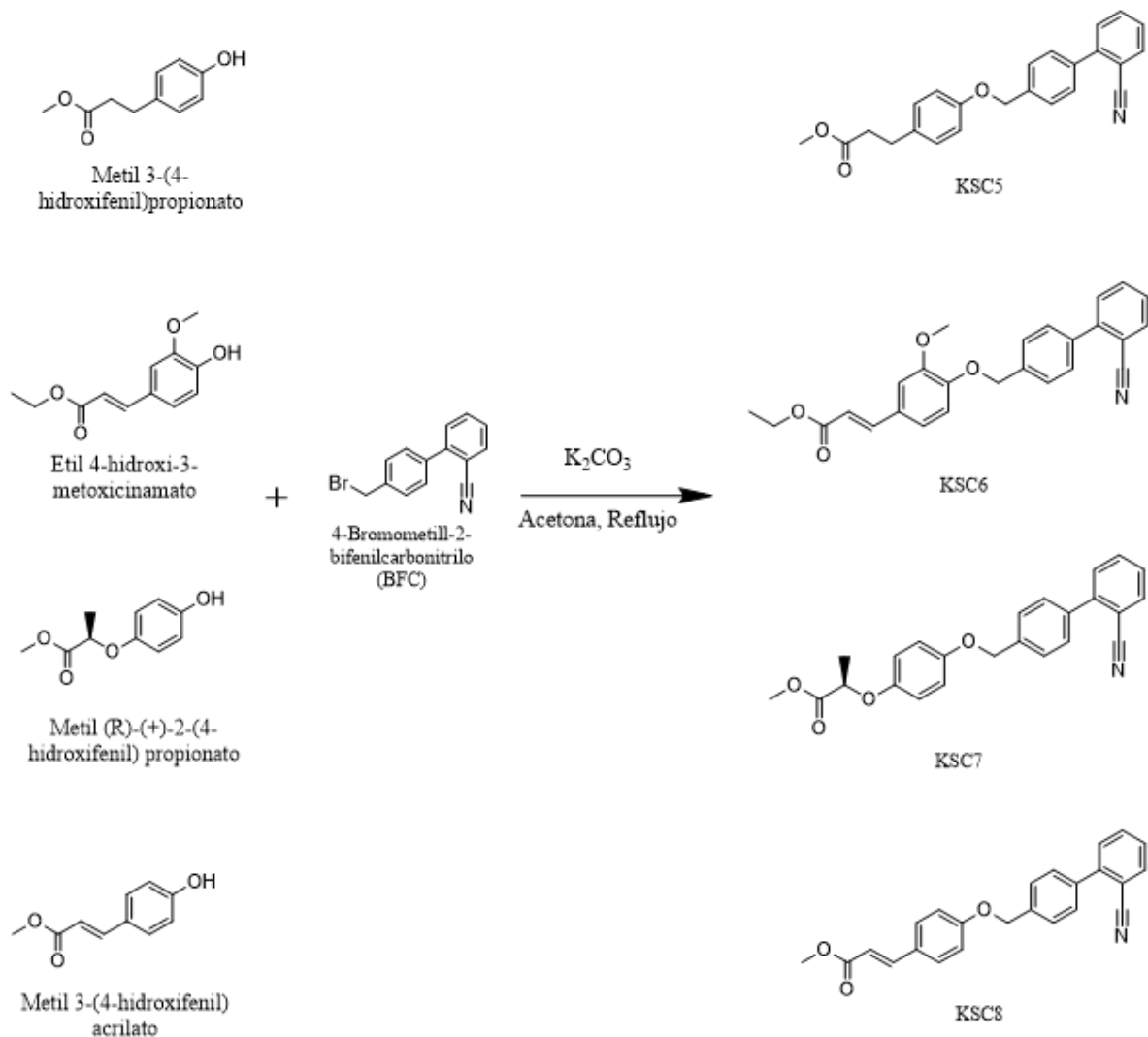
I.4 RESULTADOS

I.4.1 Síntesis Química

Se sintetizaron 8 compuestos, los cuales están divididos en intermediarios (KSC 5-8) y compuestos finales (KSC 1-4).

I.4.1.1 Síntesis de intermediarios (KSC 5-8)

Se inicio la síntesis utilizando diferentes fenoles, que previamente en el grupo de trabajo se trabajó con ellos, mostrando que tienen una actividad biológica para la DMT2, los cuales se hicieron reaccionar con el BFC mediante una sustitución nucleofílica bimolecular. El K_2CO_3 actúa mediante una reacción SN^2 para desprotonar el grupo hidroxilo fenólico, generando un ion altamente nucleofílico. Este oxígeno ataca el carbono bencílico del BFC, desplazando al bromo como grupo saliente y estableciendo un enlace éter, dando lugar a los intermediarios **KSC5-KSC8**, los cuales se obtuvieron como sólidos blancos, con un rendimiento de KSC5 de 80%, KSC6 de 74.72%, KSC7 de 68.61%, KSC8 de 79.72%. Estas reacciones fueron monitoreadas a través de cromatografía en capa fina (TLC).



Esquema 2. Síntesis de los intermediarios KSC 5-8.

Se analizaron por RMN 1H los intermediarios KSC 5-8 para la caracterización de los compuestos.

En el espectro de RMN 1H (**Figura 6**) para KSC 5 mostró una señal con desplazamiento químico a 5.12 ppm del metileno donde se unen ambas estructuras, tanto del BFC como del fenol, un desplazamiento químico a 3.53 ppm del metilo inicial del fenol (estructura azul), una señal multiple de 7.53-7.61 ppm correspondiente a la parte del BFC (estructura roja).

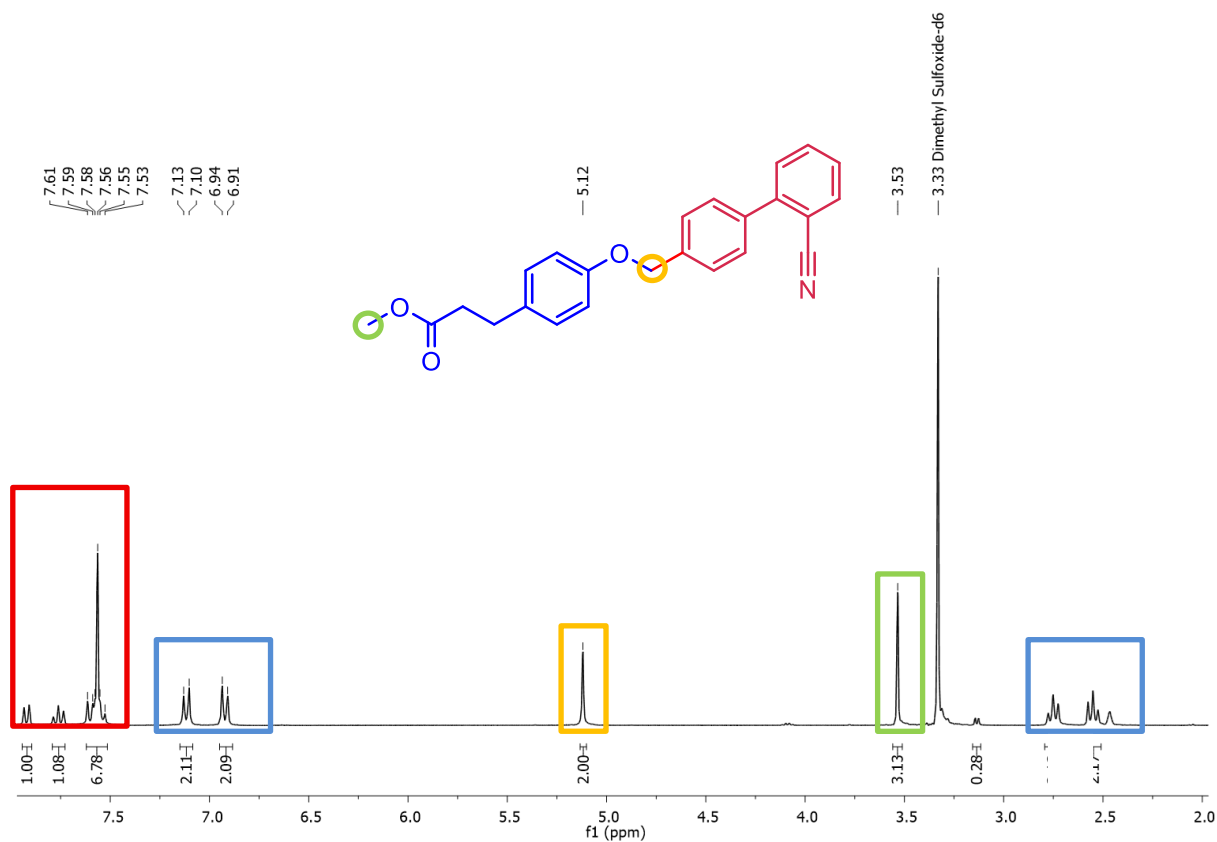


Figura 6 Espectro de RMN ^1H del intermediario KSC 5. Se logran observar los picos correspondientes a la estructura del bifencilcarbonitrilo (rojo) y los correspondientes del fenol (azul), así como los metilos (verde) y metileno (amarillo).

El espectro de RMN ^1H (**Figura 7**) para KSC 6 mostró una señal con desplazamiento químico a 5.21 ppm del metileno donde se unen ambas estructuras, tanto del BFC como del fenol, un desplazamiento químico a 3.82 ppm del metilo unió al oxígeno del fenol (estructura azul), una señal múltiple de 1.21-1.25 del metilo del fenol (estructura azul). Además, señales múltiples a partir del 7.08-7.54 ppm correspondiente a la parte del fenol (estructura azul) y señales múltiples de 7.57- 7.95 ppm correspondientes a la estructura del BFC (estructura roja).

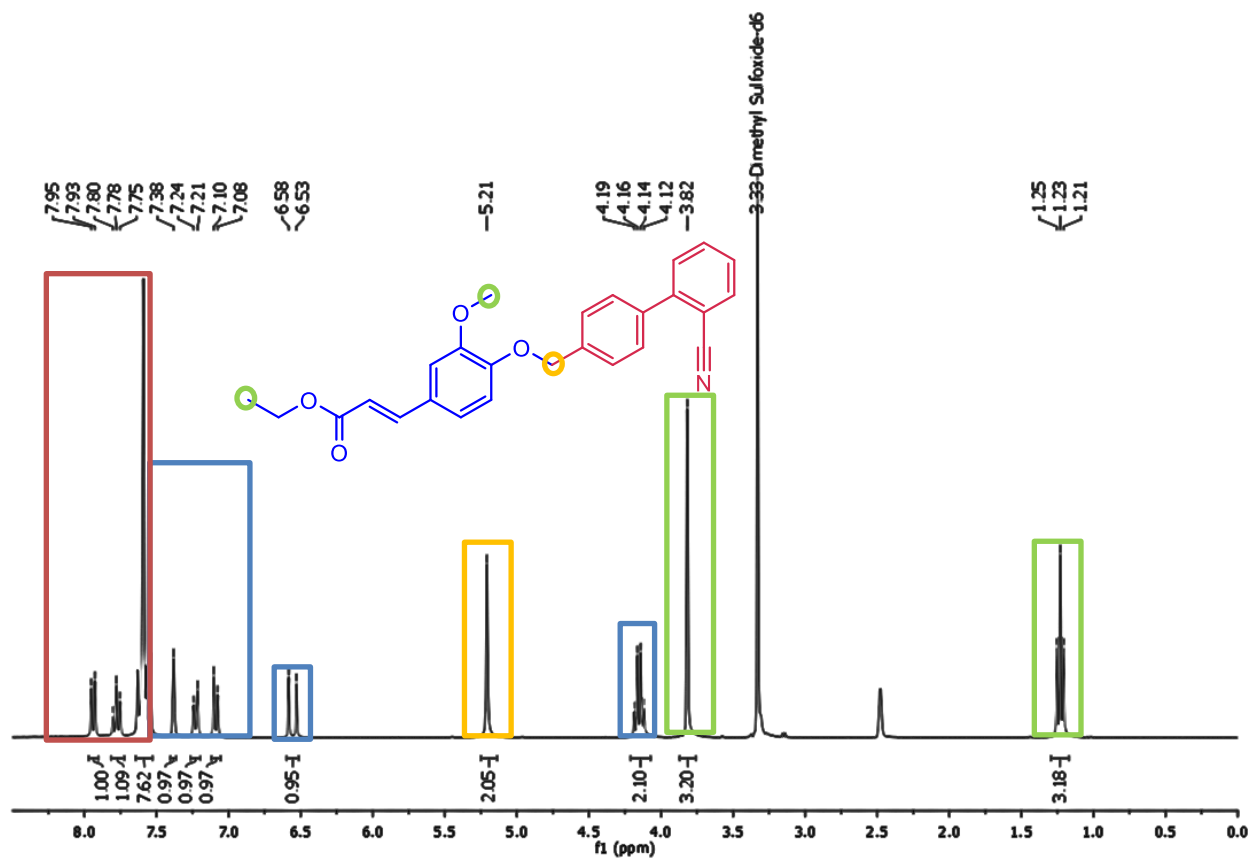


Figura 7. Espectro de RMN ^1H del intermediario KSC 6. Se logran observar los picos correspondientes a la estructura del bifencilcarbonitrilo (rojo) y los correspondientes del fenol (azul), así como los metilos (verde) y metileno (amarillo).

El espectro de RMN ^1H (**Figura 8**) para KSC 7 mostró una señal con desplazamiento químico a 5.08 ppm del metileno donde se unen ambas estructuras, tanto del BFC como del fenol, una señal múltiple de desplazamiento químico de 1.42-1.44 ppm del metilo del fenol (estructura azul). Además, señales múltiples a partir del 6.79-6.94 ppm correspondiente a la parte del fenol (estructura azul) y señales múltiples de 7.73- 7.92 ppm correspondientes a la estructura del BFC (estructura roja).

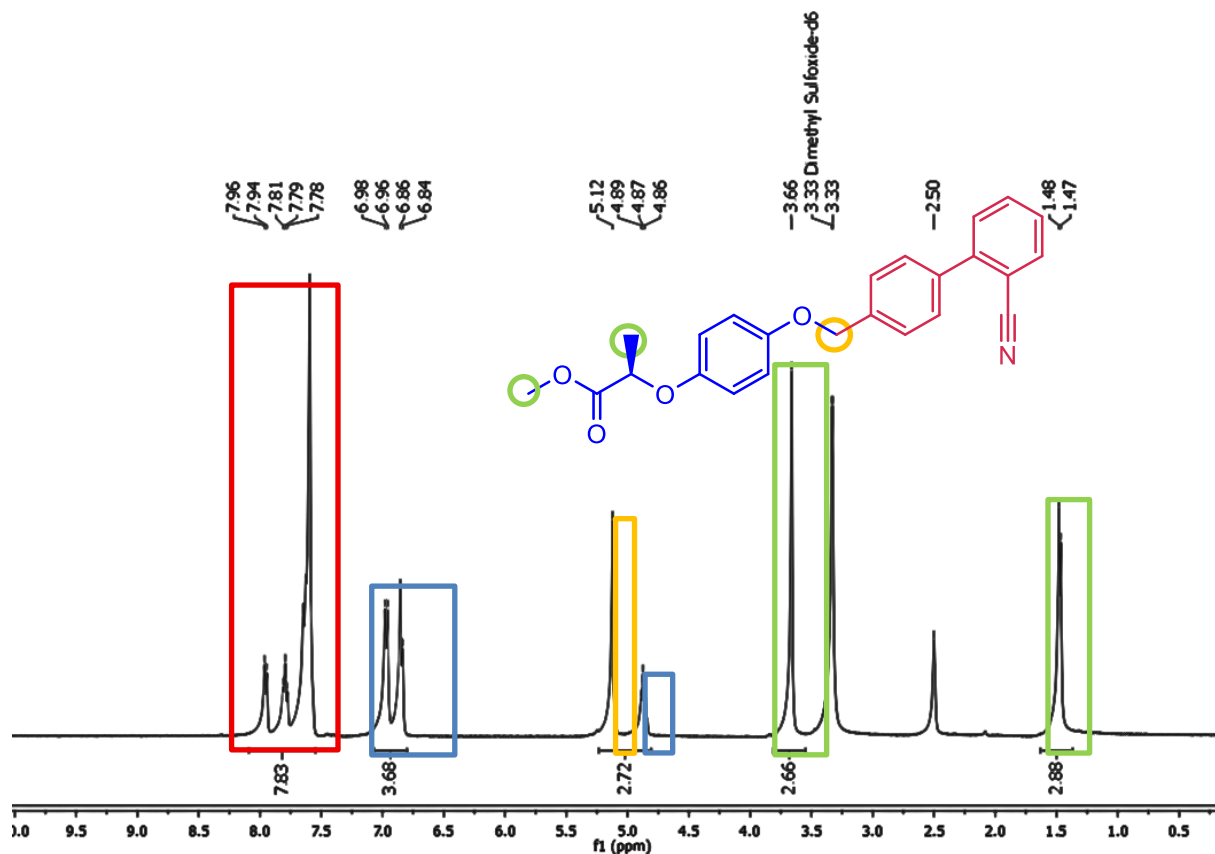


Figura 8. Espectro de RMN ^1H del intermediario KSC 7. Se logran observar los picos correspondientes a la estructura del bifencilcarbonitrilo (rojo) y los correspondientes del fenol (azul), así como los metilos (verde) y metileno (amarillo).

El espectro de RMN ^1H (**Figura 9**) para KSC 8 mostró una señal con desplazamiento químico múltiple a 5.24-5.25 ppm del metileno donde se unen ambas estructuras, tanto del BFC como del fenol, una señal múltiple de desplazamiento químico de 3.69-3.70 ppm del metilo del fenol (estructura azul). Además, señales múltiples a partir del 6.47-7.10 ppm correspondiente a la parte del fenol (estructura azul) y señales múltiples de 7.8- 7.96 ppm correspondientes a la estructura del BFC (estructura roja).

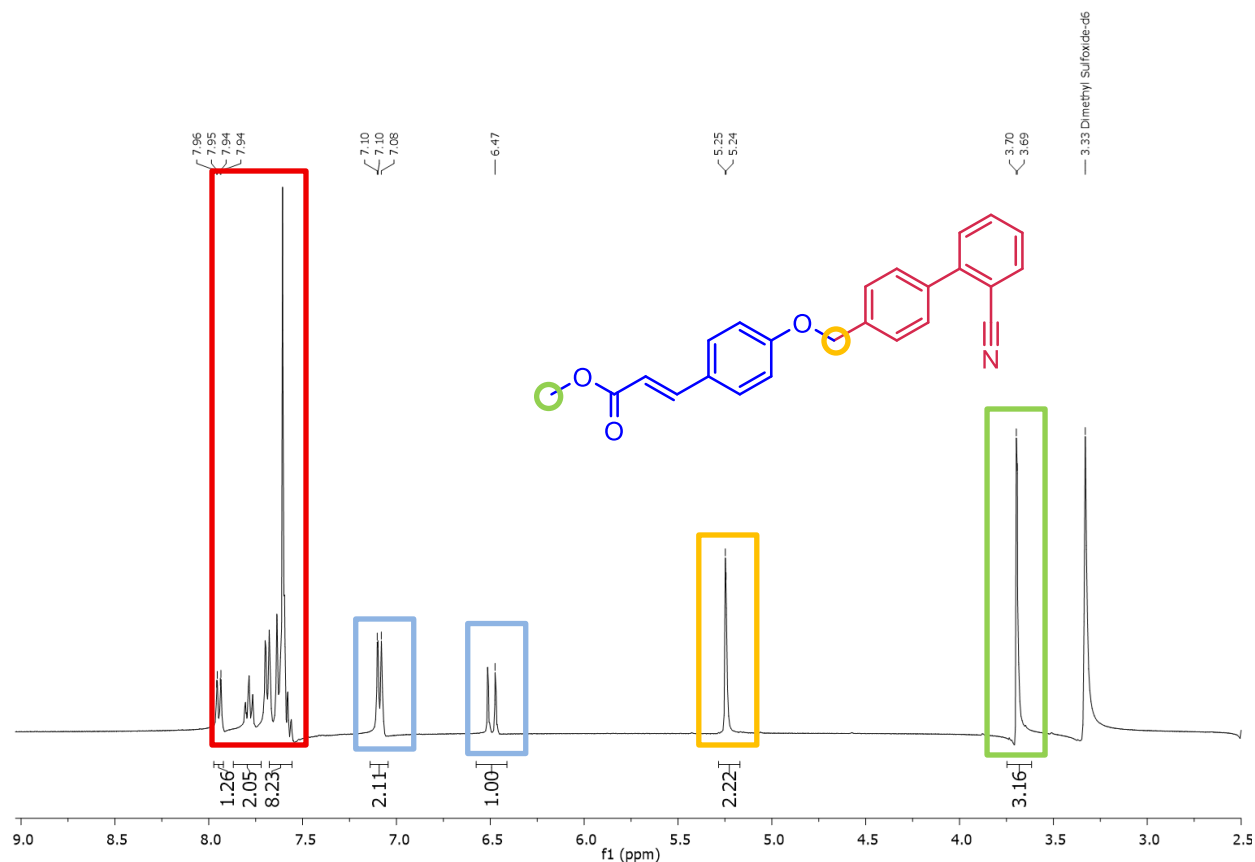


Figura 9. Espectro de RMN ^1H del intermediario KSC 8. Se logran observar los picos correspondientes a la estructura del bifenilcarbonitrilo (rojo) y los correspondientes del fenol (azul), así como los metilos (verde) y metileno (amarillo).

El análisis comparativo de los espectros de RMN de ^1H para la serie de intermediarios (KSC 5-8) permitió confirmar de manera inequívoca el éxito de la reacción de O-alkilación. El indicador espectroscópico más relevante de la conectividad molecular fue la aparición constante de una señal sencilla agudo integrado para dos protones en la región de δ 5.08 a 5.25 ppm, asignado al grupo metileno ($\text{CH}_2\text{-O}$) que sirve de puente entre ambas subestructuras. Asimismo, el perfil espectral permitió diferenciar claramente los dos entornos aromáticos del sistema híbrido: por un lado, las señales múltiples observadas a campos más bajos (δ 7.53–7.96 ppm) corresponden a los protones del núcleo BFC, cuya señal está acentuada por la naturaleza electro atrayente del grupo funcional nitrilo. Por otro lado, los protones pertenecientes al anillo fenólico se manifestaron a campos más protegidos (δ 6.47–7.24 ppm), exhibiendo los patrones de acoplamiento esperados según sus sustituyentes específicos. Finalmente, la permanencia de las señales sencillas correspondientes a los ésteres metílicos (δ 3.53–3.70 ppm) e hidrógenos alifáticos propios de cada fenol de partida corroboró que la integridad del esqueleto estructural se mantuvo intacta durante las condiciones de reflujo, validando la pureza de los intermediarios aislados para su posterior uso en la etapa de hidrólisis.

Las constantes físicas y los rendimientos obtenidos para los compuestos finales KSC 5-8, como se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de intermediarios KSC 5-8.

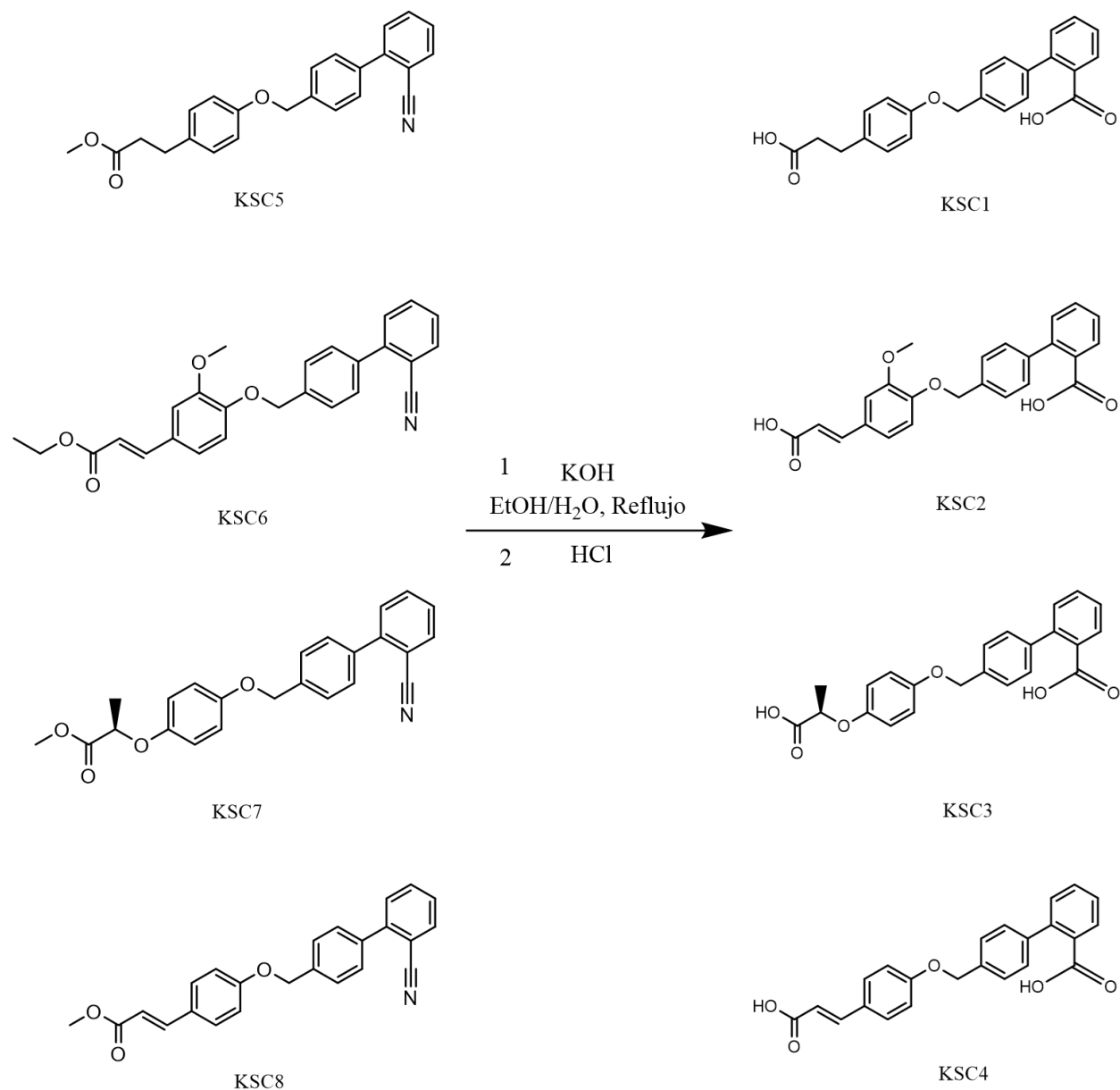
Comp.	Formula molecular	Rendimiento Puro	PM (g/mol)	P.f (°C)	Apariencia física	Tiempo de Reacción (h)	Temp Rx'n (°C)
KSC5	C ₂₄ H ₂₁ NO ₃	80.82%	371.4231	75-77	Sólido blanco	24	Reflujo
KSC6	C ₂₆ H ₂₃ NO ₄	74.72%	413.4631	143-144	Sólido blanco	11	Reflujo
KSC7	C ₂₄ H ₂₁ NO ₄	68.61%	387.4231	122-124	Sólido blanco	110	Reflujo
KSC8	C ₂₄ H ₁₉ NO ₃	89.55%	369.4031	144-146	Sólido blanco	12	Reflujo

El análisis de las propiedades fisicoquímicas recopiladas para la serie de intermediarios (KSC 5-8) ofrece información valiosa sobre el comportamiento cinético de la reacción de O-alkilación de Williamson. Como se observa en la **Tabla 1**, los rendimientos puros obtenidos se sitúan en un rango altamente competitivo y homogéneo, oscilando entre el 68.61% y el 89.55%. Estos rendimientos demuestran que la metodología es óptima para obtener los diferentes intermediarios que se utilizarán para la formación de los productos finales.

Un hallazgo crítico en esta etapa radica en la notable variabilidad de los tiempos de reacción, evidenciando cómo el entorno estructural del fenol precursor afecta directamente la cinética química. Mientras que los intermediarios KSC 5, 6 y 8 completaron su conversión en periodos relativamente cortos (de 11 a 24 horas), el compuesto KSC 7 requirió un tiempo excepcionalmente prolongado de 110 horas a reflujo. Este fenómeno está plenamente justificado por el impedimento estérico inducido por el sustituyente metilo ramificado en la cadena alifática de su fenol de partida. Este bloqueo espacial restringe la trayectoria de aproximación del oxígeno nucleofílico hacia el carbono bencílico del BFC, disminuyendo drásticamente la velocidad de la SN². No obstante, el hecho de que todos los compuestos se aislaran como sólidos blancos con puntos de fusión definidos y estables (75–146 °C) confirma que los métodos de purificación por lavados sucesivos con disolventes fueron altamente selectivos, eliminando eficientemente los reactivos remanentes sin comprometer el rendimiento global.

I.4.1.2 Síntesis de compuestos finales (KSC1-4)

Una vez obtenidos los intermediarios por una O-alkilación, se prosiguen a una hidrólisis básica, esto debido a que se busca romper los enlaces éster y formar ácidos carboxílicos. Se utilizó KOH en una mezcla de EtOH/H₂O a reflujo en baño de aceite. Durante este proceso, ocurre un ataque nucleofílico del ion hidroxilo tanto sobre los grupos éster, como sobre el grupo nitrilo. Finalmente, mediante la adición de HCl, se protonan estos grupos para obtener los ácidos carboxílicos finales esperados. Las reacciones fueron monitoreadas por TLC hasta observar un solo producto y con rendimientos para KSC5 de 74.74%, para KSC6 de 74.77%, para KSC7 68.51% de y para KSC8 de 69.51%.



Esquema 3. Síntesis de compuestos finales KSC 1-4.

Las constantes físicas y los rendimientos obtenidos para los compuestos finales KSC 1-4 se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de compuestos finales KSC 1-4.

Comp	Formula molecular	Rendimiento Puro	PM (g/mol)	P.Desc.(°C)	Apariencia física	Tiempo de Reacción (h)	Temp Rx'n (°C)
KSC1	C ₂₃ H ₂₀ O ₅	68.51%	376.41	237	Sólido blanco	99	Reflujo
KSC2	C ₂₄ H ₂₀ O ₆	74.74%	404.42	260	Sólido blanco	110	Reflujo
KSC3	C ₂₃ H ₂₀ O ₆	69.51%	392.41	>300	Sólido blanco	136	Reflujo
KSC4	C ₂₃ H ₁₈ O ₅	74.77%	374.39	255	Sólido blanco	110	Reflujo

Los parámetros fisicoquímicos de las *twin drugs* finales (KSC 1-4), presentados en la **Tabla 2**, revelan transformaciones macroscópicas contundentes que confirman el éxito de la reacción de hidrólisis básica simultánea. En términos de rendimiento puro, la serie mantuvo un perfil consistente entre el 68.51% y el 74.77%. Estos valores demuestran la viabilidad metodológica de emplear un exceso de KOH en una mezcla EtOH/H₂O a reflujo, logrando la ruptura concertada tanto de los grupos éster como del grupo funcional nitrilo presentes en los intermediarios precursores, seguido de un aislamiento eficiente mediante precipitación controlada a pH 3 con HCl.

El indicador fisicoquímico más relevante se manifiesta en las propiedades térmicas de los productos aislados. A diferencia de los intermediarios, los compuestos finales KSC 1-4 no exhiben puntos de fusión convencionales, sino temperaturas de descomposición térmica marcadamente elevadas que van desde los 237 °C hasta superar los 300 °C. Este incremento drástico en la estabilidad térmica está directamente relacionado con la conversión de los grupos éster y nitrilo hacia sus formas de ácidos carboxílicos. La magnitud de la fuerza de cohesión en estos sistemas requiere un aporte energético tan elevado para su ruptura que induce la termólisis o degradación del esqueleto carbonado de manera previa a la fusión del compuesto. Asimismo, se comprobó con TLC que el protocolo de purificación por lavado con disolventes específicos logró remover de manera óptima los intermediarios y subproductos de la hidrólisis, asegurando la obtención de las entidades químicas puras que avanzaron a los ensayos computacionales y toxicológicos. Sin embargo, los compuestos serán enviados para corroborar su estructura química, por RMN y espectrometría de masas.

I.5 CONCLUSIONES

Eficiencia de la metodología sintética: Se demostró experimentalmente la ruta sintética convergente de dos etapas para la obtención de las *twin drugs* de la serie KSC (1-4). Las condiciones de reacción optimizadas en el Laboratorio de Química Farmacéutica demostraron ser altamente eficientes, reproducibles y metodológicamente viables.

Éxito en la O-alkilación (Etapa 1): La síntesis de los intermediarios (KSC 5-8) se consolidó de manera efectiva a través de la reacción de O-alkilación de Williamson. El uso de K_2CO_3 mediante una reacción SN^2 permitió desprotonar selectivamente los diversos derivados fenólicos, obteniendo sólidos blancos puros con rendimientos sobresalientes que oscilaron entre el 68.61% y el 89.55%.

Hidrolisis básica simultánea (Etapa 2): Se logró la transformación cuantitativa de los intermediarios en los compuestos finales (KSC 1-4) mediante una hidrólisis básica vigorosa utilizando KOH en una mezcla EtOH/H₂O a reflujo. Esta estrategia permitió la ruptura concertada y simultánea de los enlaces éster y el grupo funcional nitrilo, facilitando el aislamiento de los diácidos carboxílicos libres mediante una precipitación por acidificación controlada con HCl (pH 3) registrando rendimientos puros finales de hasta el 74.77%.

Certeza analítica por RMN: La identidad química, la pureza y la conectividad molecular de los intermediarios sintéticos sólidos (KSC 5-8) fueron plenamente corroboradas mediante espectroscopía de RMN (¹H y ¹³C) y espectros de dos dimensiones (COSY, HSQC y HMBC). La asignación inequívoca de las señales de RMN confirmó el éxito de la O-alkilación y el ensamblaje correcto de los núcleos bifenilo y fenol, garantizando la pureza estructural de los precursores necesarios para la posterior obtención de las *twin drugs* finales.

I.6 PARTE EXPERIMENTAL

I.6.1 Instrumentación

Todos los materiales y reactivos de partida fueron obtenidos comercialmente y fueron usados sin purificación adicional. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de punto de fusión BioCote. Los estudios de RMN se llevaron a cabo en un equipo Bruker AVANCE III HD 700MHz. Los desplazamientos químicos (δ) y los valores de las constantes de acoplamiento (J) están expresados en ppm y Hz, respectivamente.

I.6.2 Cromatografía

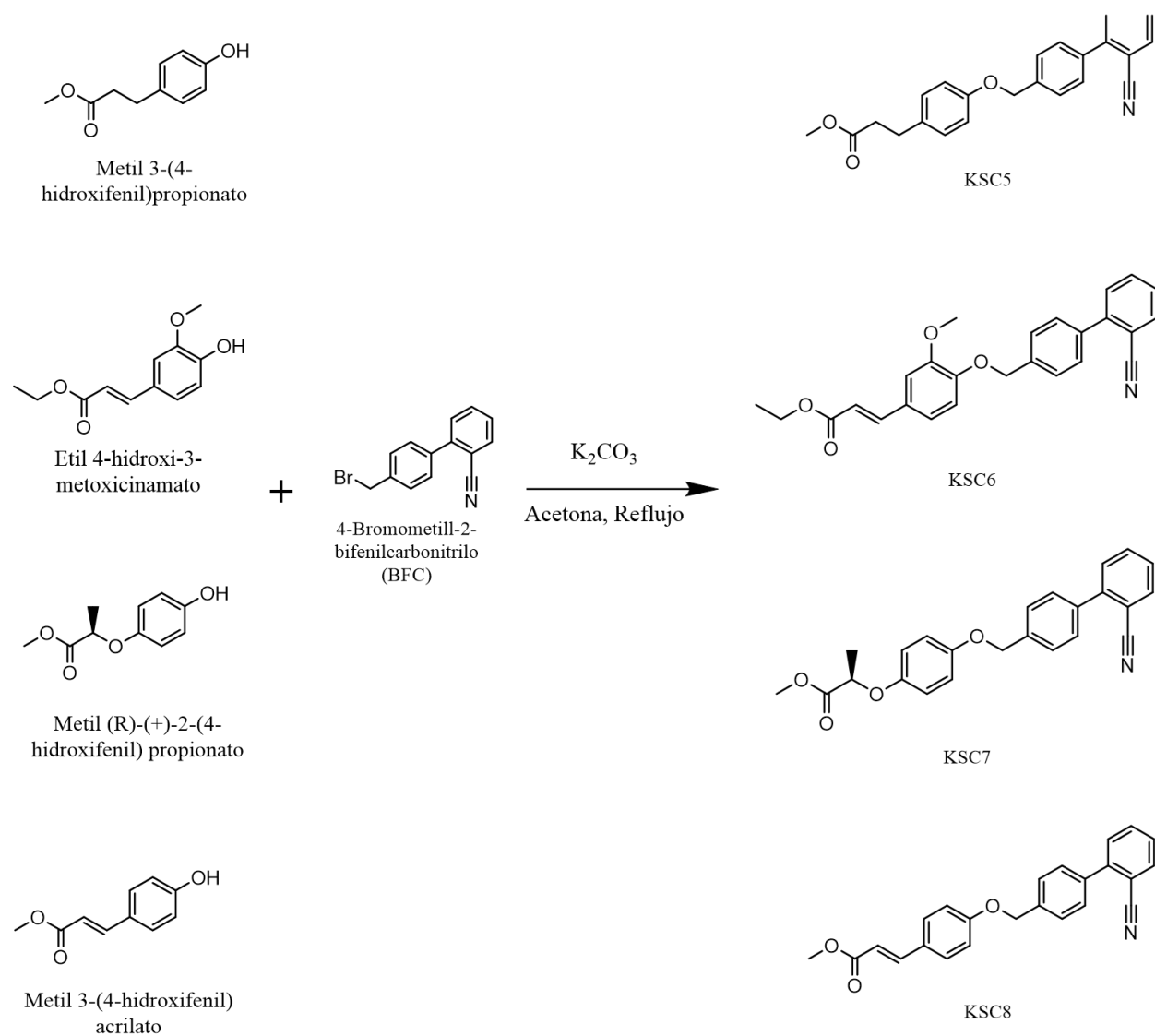
Las reacciones se monitoreaban por TLC en placas recubiertas de gel de sílice (Alugram SILG/UV254) con un grosor de 0.2mm 60 F254 (E.Merck). La revelación de los compuestos orgánicos se realizó con una lámpara de luz ultravioleta (analytikjena UVP UVGL-25). Para la elusión de las placas se utilizaron los sistemas mostrados a continuación:

Sistema I: Tolueno

Sistema II: Diclorometano-Etanol 98:2

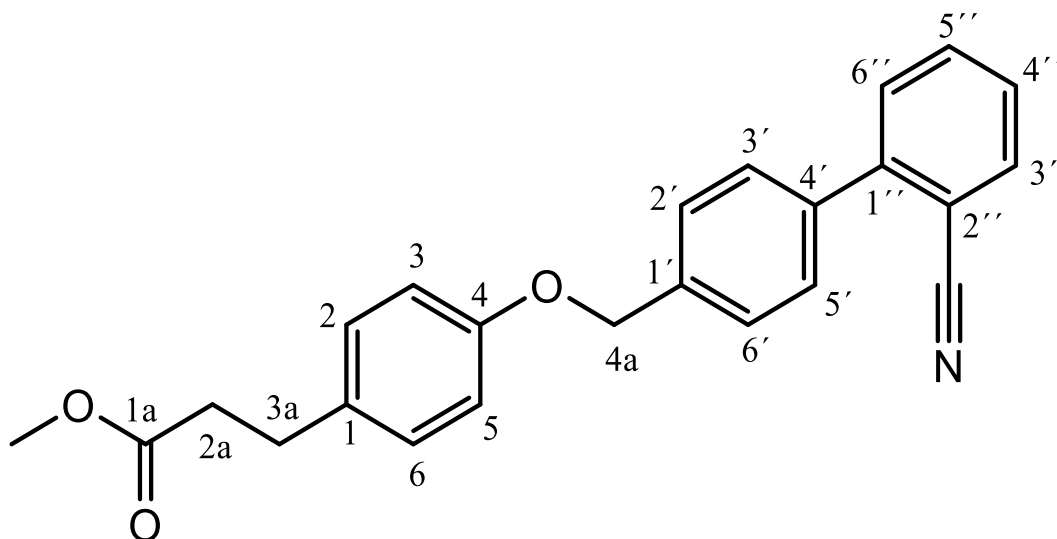
Sistema III: Diclorometano-Etanol 88:12

I.6.3 Metodología general para síntesis de los compuestos intermediarios KSC5-8



En un matraz bola de 25 mL, acondicionado con agitación magnética y baño de agua, se disolvieron 200 mg de los diferentes fenoles junto con 1.1 eq de K_2CO_3 en 5mL de acetona. La mezcla se agito por 15 minutos y se le agregó 1.01eq de BFC y se agito a temperatura de ebullición (50°C), a reflujo. Las reacciones fueron monitoreadas por TLC cada hora con el sistema I (Tolueno). Se le añadió 5% más de BFC a cada reacción. Se evaporo por completo el acetona en un rotaevaporador, y enseguida se hizo el repulpado del sólido con agua fría. El producto se secó a temperatura ambiente.

I.6.3.1 3-(4-((2'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-il)metoxi)fenil)propanoato de metilo (KSC 5)



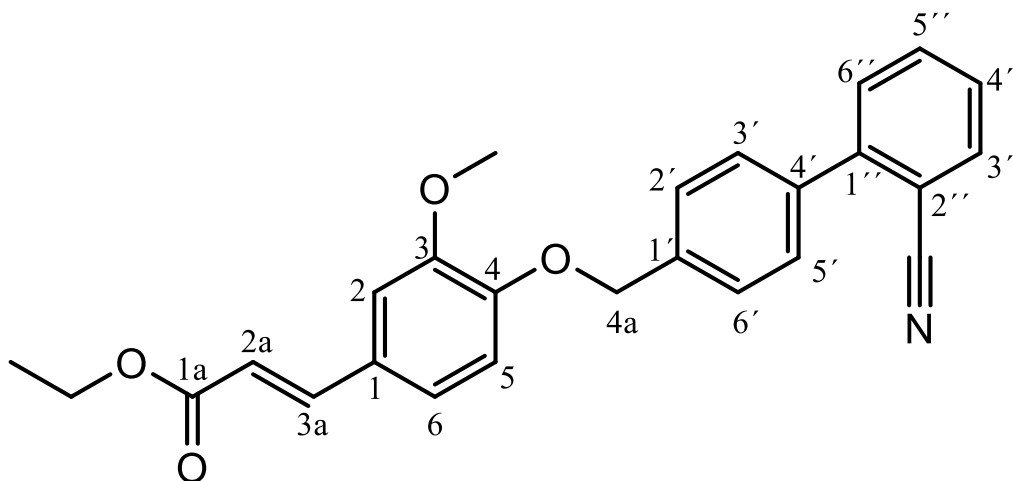
KSC 5

Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se hizo reaccionar 200mg de Metil 3-(4- hidroxifenil) propionato con BFC, dando 0.3579 g del compuesto KSC5 (80.82% de rendimiento). La reacción estuvo con agitación y temperatura durante 24 horas. Se obtuvo un sólido blanco que mostró ser un solo producto por ccf con Pf: 75-77°C.

RMN 1H (300MHz, DMSO- d_6) δ : 2.56-2.61(t, 2H, C- CH_2 , $J_m=2.55Hz$), 2.76-2.81(t, 2H, CH_2 -C, $J_m=2.75Hz$), 3.53(s, 3H, CH_3 -O), 5.12(s, 2H, O- CH_2), 6.91-6.94(d, 2H, H-3, H-5, $J_o=6.92Hz$), 7.10-7.13(d, 2H, H-2, H-6, $J_o=7.12Hz$), 7.53-7.61(m, 6H, Ar-BFC), 7.77-7.82(t, 1H, H-6'', $J_o=7.76$), 7.94-7.97(d, 1H, H-5'', $J_o=7.92$) ppm.

RMN ^{13}C (700MHz, DMSO- d_6) δ : 29.42 (CH_2), 35.18 (CH_2), 51.24 (CH_3), 68.71 (O- CH_2), 110.17 (C-2''), 114.65 (C-3, C-5), 118.57 (C-N), 129.27 (C-3'), 127.9 (C-2', C-6'), 128.5 (C-5'), 128.80 (C-4'', C-6''), 130.12 (C-2, C-6), 132.77 (C-3''), 133.56 (C-5''), 133.86 (C-1), 137.25 (C-1'), 137.90 (C-4'), 144.23 (C-1''), 156.72 (C-4), 172.72 (COO) ppm.

I.6.3.2 (E)-3-(4-((2'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-il)metoxi)-3-metoxifenil)acrilato de etilo (KSC 6)



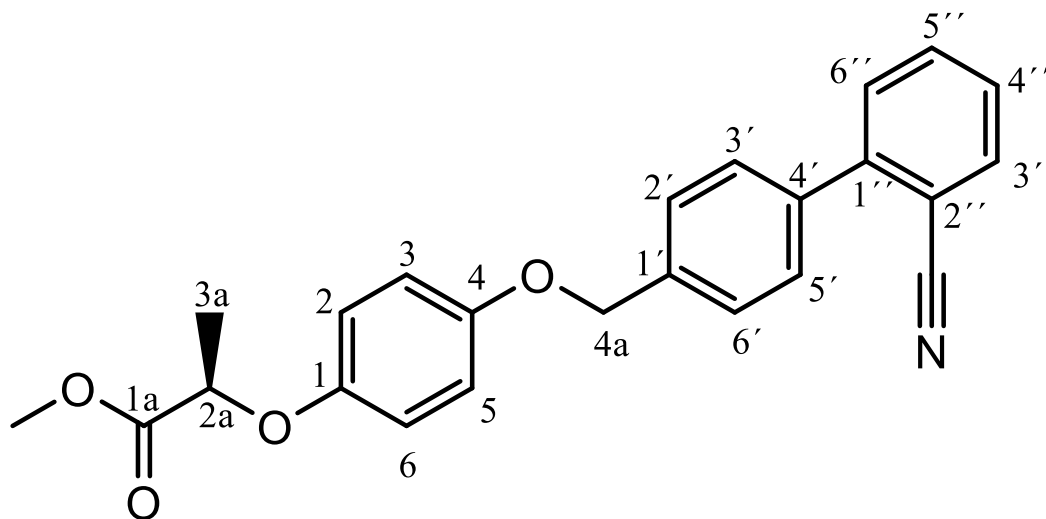
KSC 6

Si siguiendo la metodología descrita anteriormente, se hizo reaccionar 200mg de Etil 4-hidroxi-3-metoxicinamato con BFC, dando 0.2779 g del compuesto KSC6 (74.72% de rendimiento). La reacción estuvo con agitación y temperatura durante 11 horas. Se obtuvo un sólido blanco que mostró ser un solo producto por ccf con Pf: 143-144°C.

RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) δ : 1.21-1.25(t, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}$, $J_m=1.23\text{Hz}$), 3.82(s, 3H, O- CH_3), 4.12-4.19(dd, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$, $J_o=4.13\text{Hz}$, $J_o=4.18\text{Hz}$), 5.21(s, 2H, O- CH_2), 6.53-6.58(d, 1H, H-5, $J_o=7.09\text{Hz}$), 7.08-7.10(d, 1H, H-5, $J_o=7.09\text{Hz}$), 7.21-7.24(d, 1H, H-6, $J_o=7.23\text{Hz}$), 7.38(s, 1H, H-2), 7.54-7.63(m, 7H, H-3a, Ar-BFC, $J_o=7.58\text{Hz}$), 7.75-7.80(t, 1H, H-6'', $J_o=7.78\text{Hz}$), 7.93-7.85(d, 1H, H-5'', $J_o=7.94\text{Hz}$) ppm.

RMN ^{13}C (700MHz, DMSO- d_6) δ : 14.58 (CH_3), 50.06 (CH_3), 60.14 (CH_2), 69.72 (CH_2), 110.52 (C-2''), 111.10 (C-2), 113.43 (C-5), 116.2 (C-H), 118.90 (C-N), 123.07 (C-6), 127.65 (C-1), 128.43 (C-6'), 128.62 (C-2''), 129.18 (C-6''), 130.46 (C-4''), 132.20 (C-5'), 133.90 (C-3'), 137.76 (C-3''), 143.06 (C-5''), 144.55 (C-1'), 144.82 (C-4'), 148.63 (C-H), 149.27 (C-4), 149.65 (C-1''), 150.23 (C-3), 166.85 (COO) ppm.

I.6.3.3 (R)-2-(4-((2'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-il)metoxi)fenoxi)propanoato de metilo (KSC 7)



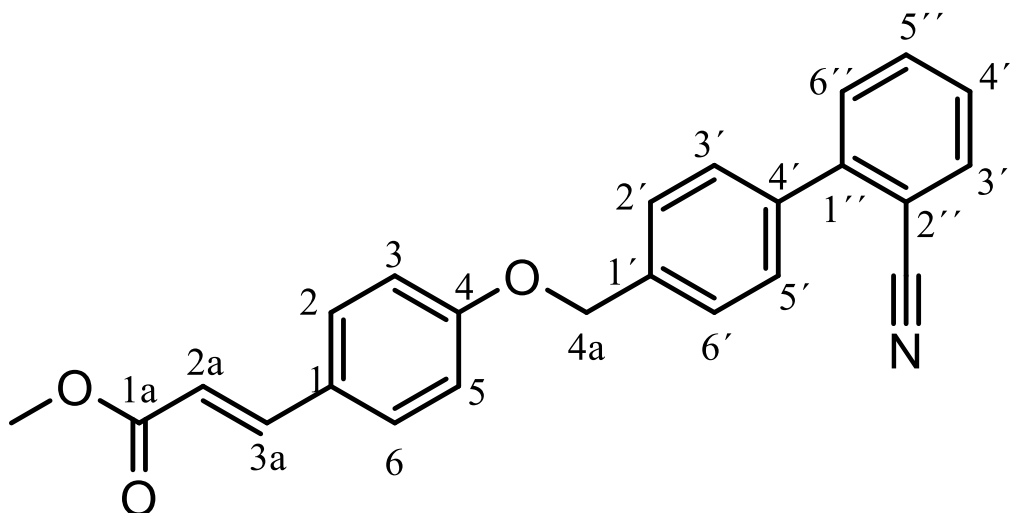
KSC 7

Seguindo la metodología descrita anteriormente, se hizo reaccionar 200mg de Metil (R)-(+)-2-(4-hidroxifenil) propionato con BFC, dando 0.2710 g del compuesto KSC 7 (68.61% de rendimiento). La reacción estuvo con agitación y temperatura durante 110 horas. Se obtuvo un sólido blanco que mostró ser un solo producto por ccf con Pf: 122-124°C.

RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) δ : 1.47-1.48(d, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}$, $J_m=1.48\text{Hz}$) 3.66(s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 4.86-4.87(m, 1H, H-2a, $J_o=4.83\text{Hz}$), 5.12(s, 2H, O- CH_2), 6.84-6.98(dd, 4H, H-2, H-3, H-5, H-6, $J_o=6.85\text{Hz}$, $J_o=6.97\text{Hz}$), 7.78-7.83(m, 7H, H-5'', Ar-BFC $J_o=7.80\text{Hz}$), 7.94-7.96(d, 1H, H-6'', $J_o=7.91\text{Hz}$) ppm.

RMN ^{13}C (700MHz, DMSO- d_6) δ : 17.94 (CH_3), 51.61 (CH_3), 68.80 (CH_2), 71.94 (C-O), 109.80 (C-2''), 115.26 (C-3, C-5), 115.79 (C-2, C-6), 118.18 (C-N), 127.54 (C-2', C-6'), 127.87 (C-4'), 128.42 (C-3', C-5'), 129.75 (C-6''), 133.18 (C-3''), 133.48 (C-5''), 136.87 (C-1'), 137.56 (C-4'), 143.86 (C-1''), 151.05 (C-1), 152.53 (C-4), 171.80 (COO) ppm.

I.6.3.4 2-(4-((2'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-il)metoxi)fenoxi)acetato de metilo (KSC 8)



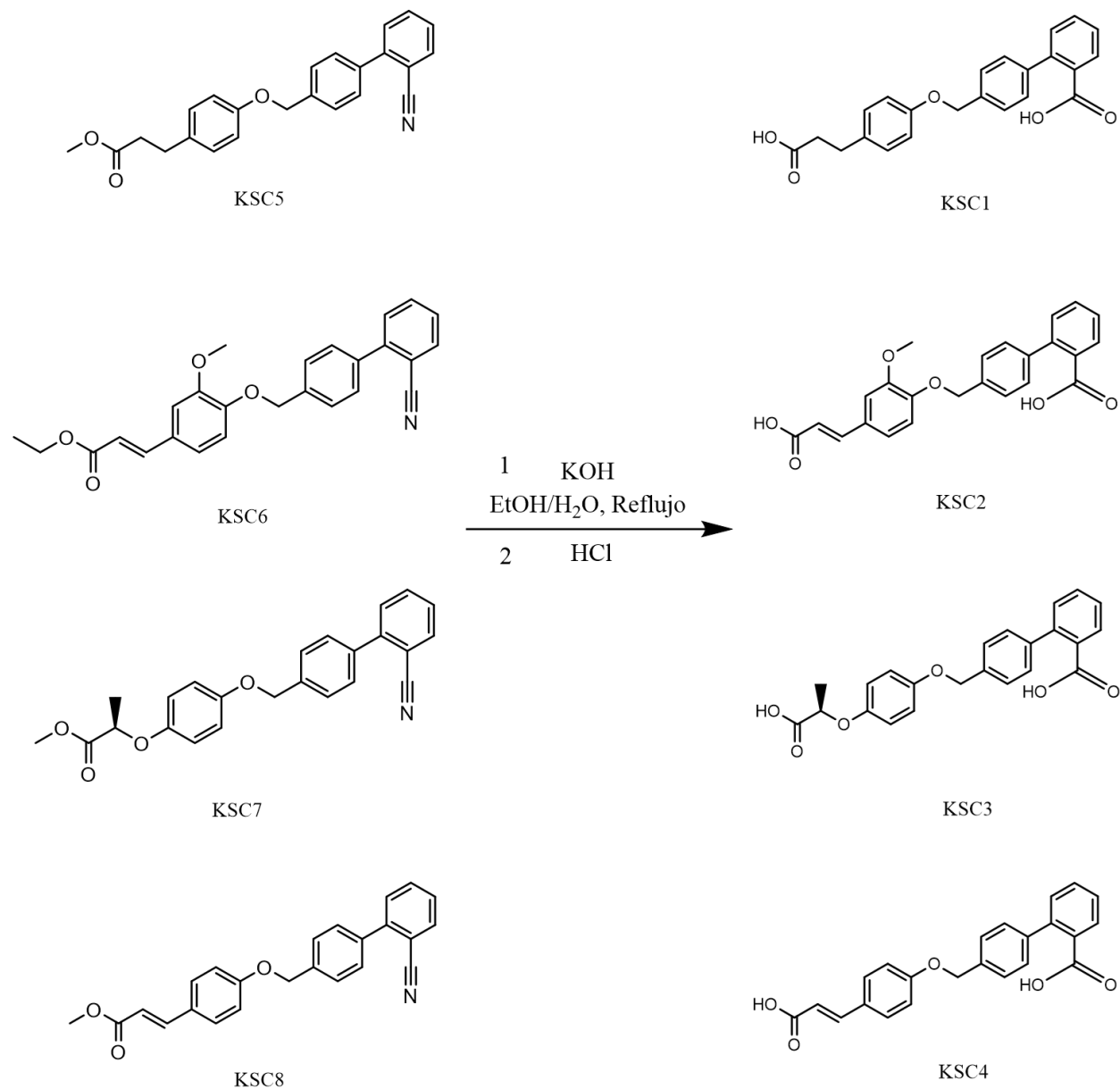
KSC 8

Seguindo la metodología descrita anteriormente, se hizo reaccionar 200mg de Metil 3-(4-hidroxifenil) acrilato con BFC, dando 0.3711 g del compuesto KSC 8 (89.55% de rendimiento). La reacción estuvo con agitación y temperatura durante 12 horas. Se obtuvo un sólido blanco que mostró ser un solo producto por ccf con Pf: 144-146°C.

RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) δ: 3.69-3.70(d, 3H, CH₃-O, J_o=3.69Hz), 5.24-5.25(d, 2H, O-CH₂, J_o=5.25Hz), 6.47-6.51(dd, 1H, H-2a, J_o=6.47Hz, J_o=6.51Hz), 7.08-7.10(t, 2H, H-3, H-5, J_o=7.09Hz), 7.60-7.76 (m, 8H, H-3a, H-5'', Ar-BFC, J_o=7.68), 7.94-7.96(dd, 3H, H-2, H-6, H-6'', J_o=7.94Hz, J_o=7.96Hz) ppm.

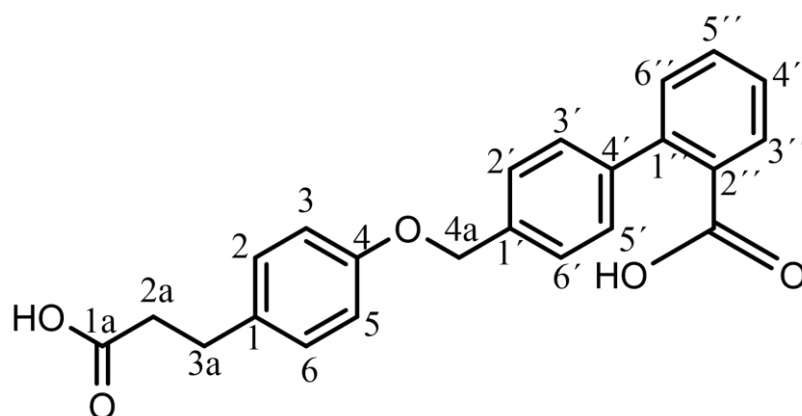
RMN ¹³C (700MHz, DMSO-d₆) δ: 51.7 (CH₃), 69.4 (O-CH₂), 110.65 (C-2''), 115.68 (C-3, C-5), 115.76 (CH), 119.02 (C-N), 127.4 (C-2', C-5'), 128.50(C-4'', C-6''), 128.75 (C-5), 129.33 (C-3', C-6'), 130.59 (C-6), 130.67 (C-2), 134.03 (C-3''), 134.33 (C-5''), 137.82 (C-1'), 137.89 (C-4'), 144.65 (C-1''), 144.73 (CH), 160.67 (C-4), 167.39 (COO) ppm.

I.6.4 Metodología general para síntesis de los compuestos finales KSC 1-4



En un matraz bola de 25 mL, acondicionando con agitación magnética y baño de aceite, se disolvieron 200 mg de los diferentes intermediarios (KSC 5-8) junto con 8 eq de KOH en 5mL de mezcla 1:1 etanol y agua. La mezcla se agito por más de 90 h y se mantuvo una temperatura de ebullición alrededor de 80°C, a reflujo. Las reacciones fueron monitoreadas por TLC cada hora con el sistema II. Se evaporo casi por completo la mezcla de etanol/agua en un rotaevaporador. Se adiciono un poco de agua fría para proceder a la acidificación del producto con HCl al 5%, hasta obtener un pH 3. El precipitado formado se filtró con agua fría y se dejó secar a temperatura ambiente, obteniendo un sólido blanco.

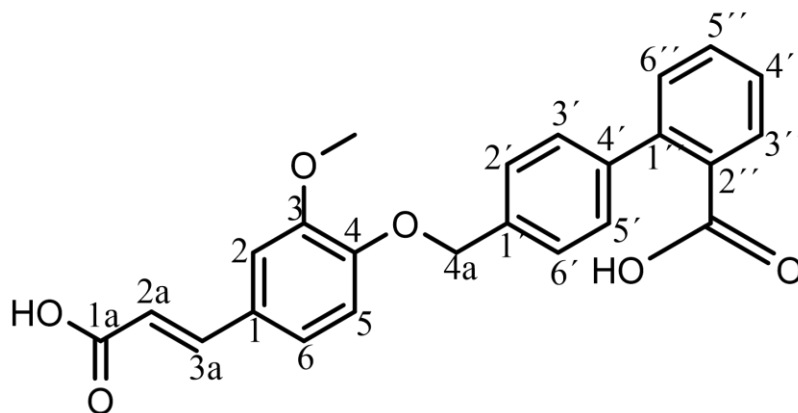
I.6.4.1 Ácido 4'-((4-(2-carboxietil)fenoxi)metil)-[1,1'-bifenil]-2-carboxílico (KSC 1)



KSC 1

Seguindo la metodología descrita anteriormente, se hizo reaccionar 200mg de **KSC5** con KOH, dando 0.138 g del compuesto KSC 1 (68.51% de rendimiento). La reacción estuvo con agitación y reflujo durante 96 horas. Se obtuvo un sólido blanco que mostró ser un solo producto por ccf con P.Descomposición:237°C.

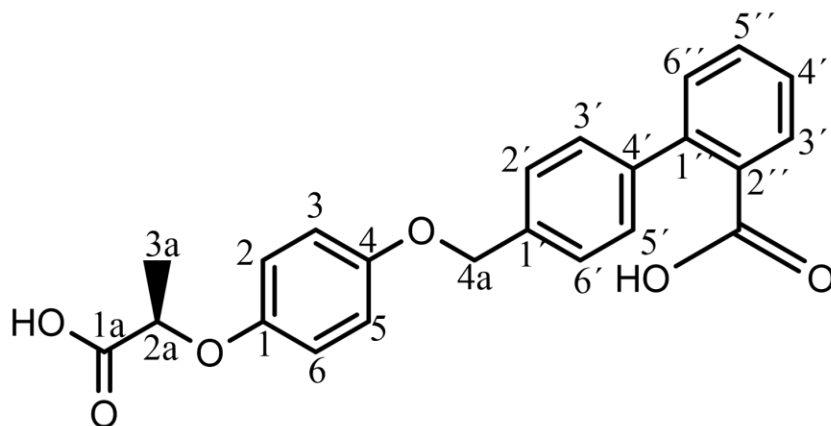
I.6.4.2 Ácido (E)-4'-((4-(2-carboxivinil)-2-metoxifenoxi)metil)-[1,1'-bifenil]-2-carboxílico (KSC2)



KSC 2

Seguindo la metodología descrita anteriormente, se hizo reaccionar 200mg de **KSC6** con KOH, dando 0.1462 g del compuesto KSC 2 (74.74% de rendimiento). La reacción estuvo con agitación y reflujo durante 110 horas. Se obtuvo un sólido blanco que mostró ser un solo producto por ccf con P.Descomposición: 206°C.

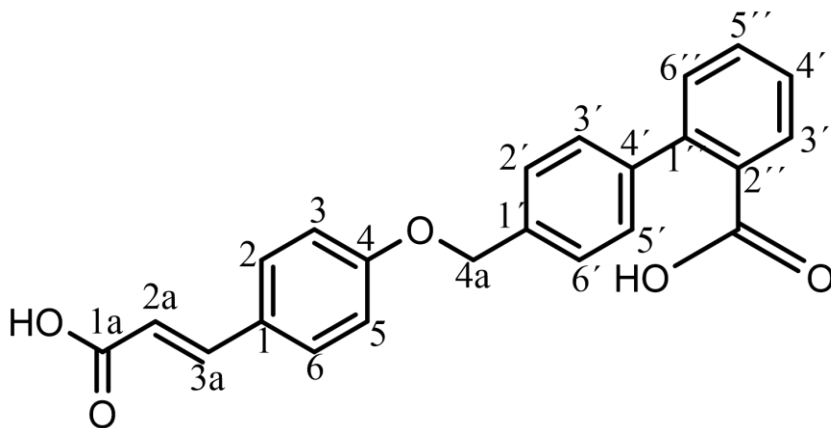
I.6.4.3 Ácido (R)-4'-((4-(1-carboxietoxi)fenoxi)metil)-[1,1'-bifenil]-2-carboxílico (KSC3)



KSC 3

Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se hizo reaccionar 200mg de **KSC7** con KOH, dando 0.1408 g del compuesto KSC 3 (69.51% de rendimiento). La reacción estuvo con agitación y reflujo durante 140 horas. Se obtuvo un sólido blanco que mostró ser un solo producto por ccf con P.Descomposición:>300°C.

I.6.4.4 Ácido (E)-4'-((4-(2-carboxivinil)fenoxi)metil)-[1,1'-bifenil]-2-carboxílico (KSC4)



KSC 4

Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se hizo reaccionar 200mg de **KSC8** con KOH, dando 0.1515 g del compuesto KSC 4 (74.77% de rendimiento). La reacción estuvo con agitación y reflujo durante 100 horas. Se obtuvo un sólido blanco que mostró ser un solo producto por ccf con P.Descomposición: 255°C.

Es importante señalar que, debido a contratiempos técnicos e instrumentales ajenos al grupo de investigación, no fue posible recabar oportunamente los espectros de RMN ni de espectrometría de masas para los compuestos finales de la serie KSC 1-4. No obstante, la obtención de dichos espectros analíticos se programó para realizarse a la brevedad posible con el fin de completar el expediente de caracterización estructural. Pese a esta limitación temporal, el flujo metodológico del proyecto continuó conforme a lo planificado, procediéndose a la ejecución de los estudios de acoplamiento molecular y los bioensayos de toxicidad programados, sin embargo, los compuestos serán enviados para corroborar las estructuras químicas, cuyos resultados analíticos complementarios se integrarán al expediente de la serie una vez que los equipos instrumentales reanuden su operación óptima.

PARTE II

Estudio de acoplamiento molecular de ligandos duales (KSC 1-4) en los sitios activos de los blancos terapéuticos PPAR γ y AT1.

II.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar estudios de acoplamiento molecular con los cuatro compuestos finales (KSC 1-4) en los sitios activos de los blancos terapéuticos PPAR γ y AT1 con el fin de determinar sus energías de afinidad y predecir su potencial como ligandos duales.

II.2 ANTECEDENTES

El éxito del diseño de ligandos multifuncionales depende de la capacidad de una sola molécula para reconocer y estabilizarse dentro de dominios de unión química muy distintos. Para los compuestos de la serie KSC, los blancos seleccionados representan dos de las proteínas más relevantes en la regulación de la HAS y DMT2: el receptor nuclear PPAR γ y el receptor de membrana AT1.

II.2.1. Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas tipo gamma (PPAR γ)

El PPAR γ es un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares. Su estructura se caracteriza por un dominio de unión al ligando (LBD) inusualmente grande y en forma de 'Y', lo que le permite albergar una gran diversidad de moléculas lipofílicas. En el contexto de la DMT2, la activación de este receptor promueve la transcripción de genes que mejoran la sensibilidad a la insulina y el almacenamiento de ácidos grasos. Estructuralmente, el acoplamiento molecular busca estabilizar el LBD, lo cual es crítico para el reclutamiento de coactivadores y la posterior respuesta transcripcional (Shang & Kojetin, 2021).

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas son factores de transcripción activados por ligando que regulan genes importantes en la diferenciación celular y diversos procesos metabólicos, especialmente la homeostasis de lípidos y glucosa. En términos moleculares, los PPAR γ representan una familia de receptores nucleares de hormonas activados por ligando (Nicol et al., 2005).

Este receptor se expresa abundantemente en el tejido adiposo, donde desempeña un papel central en la adipogénesis y parece estar principalmente involucrado en la regulación del metabolismo de los lípidos. Debido a que el gen PPAR γ tiene promotores separados y 50 exones, da lugar a tres ARNm: PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3. Las proteínas producidas a partir de los ARNm PPAR γ 1 y PPAR γ 3 son idénticas, mientras que el producto de PPAR γ 2 contiene una región adicional en el extremo NH₂-terminal compuesta por 30 aminoácidos. Todas las isoformas de PPAR γ juegan un papel importante en la diferenciación de adipocitos y el metabolismo de la glucosa; sin embargo, su expresión es diferente. La isoforma PPAR γ 1 se expresa en casi todas las células, mientras que PPAR γ 2 se limita principalmente al tejido adiposo. No obstante, PPAR γ 2 es un activador de transcripción más potente (Heikkinen et al., 2007).

PPAR γ es un regulador del metabolismo de lípidos y glucosa y, por lo tanto, sus ligandos sintéticos, como las glitazonas, los derivados de las tiazolidindionas (por ejemplo, troglitazona, ciglitazona y pioglitazona), mejoran los parámetros de insulina y glucosa y aumentan la sensibilidad a la insulina en todo el cuerpo. Por lo tanto, se les llama medicamentos sensibilizadores a la insulina utilizados en el tratamiento de la diabetes. La mejora de la sensibilidad a la insulina mediada por tiazolidindionas en la DMT2 se produce a través de múltiples mecanismos: activación de PPAR γ , mejora de la señalización de la insulina, aumento del transporte de glucosa, aumento de la síntesis de glucógeno y mejor función mitocondrial y movilización de grasas fuera del músculo/hígado, es decir, reversión de la lipotoxicidad (Janani & Ranjitha Kumari, 2015).

La proteína PPAR γ puede dividirse en cuatro dominios distintos para su funcionalidad. El dominio N-terminal se denomina dominio de activación (dominio A/B) o función de activación-1 (AF-1). La fosforilación de este dominio en el residuo de serina 82 conduce a la inhibición de la transactivación de PPAR γ . El componente del dominio C de PPAR γ interactúa con las regiones promotoras de genes objetivos sensibles. A continuación, se encuentra el dominio bisagra (D), que confiere flexibilidad a la proteína para los dominios de unión al ADN (DBD). El extremo carboxilo, denominado región E/F o dominio de función de activación-2 (AF-2), es responsable de la unión de ligandos (LBD) y de la heterodimerización (**Figura 10**) (Zingarelli & Cook, 2005).

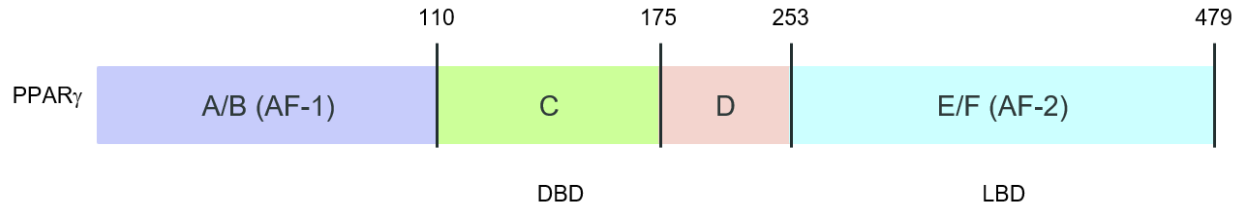


Figura 10. Dominios funcionales del PPAR γ humano. El dominio N-terminal se denomina dominio de activación (dominio A/B) o función de activación-1 (AF-1). El componente del dominio C es el dominio de unión al ADN (DBD). El dominio bisagra (región D) es una región de enlace y confiere flexibilidad a la proteína. El extremo carboxilo se denomina región E/F o dominio de función de activación-2 (AF-2) y es el dominio de unión al ligando (LBD). Los números indican la cantidad de residuos desde el extremo N-terminal.

Debido a la naturaleza anfipática de su sitio activo, PPAR γ posee la notable capacidad de albergar y ser modulado por una amplia diversidad de estructuras químicas, las cuales se dividen en dos grandes familias reguladoras:

A) Ligandos Endógenos o Naturales

- Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI): Como el ácido linoleico, el ácido araquidónico, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA).
- Derivados eicosanoides y prostanoides: Particularmente la 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂), identificada como uno de los ligandos naturales de mayor afinidad, así como diversos ácidos hidroxeicosatetraenoicos y componentes oxidados de las lipoproteínas de baja densidad. Estos ligandos interactúan de manera flexible en las ramificaciones hidrofóbicas del bolsillo (Zingarelli & Cook, 2005).

B) Ligandos Sintéticos o Exógenos

- Agonistas Completos (Tiazolidindionas): Fármacos comerciales como la pioglitazona, y troglitazona. Estas moléculas cuentan con una cabeza ácida heterocíclica (el anillo TZD) acoplada a un core aromático lipofílico. Su mecanismo se basa en un anclaje rígido y de alta energía mediante puentes de hidrógeno directos con el residuo Tyr-473.
- Agonistas Parciales o Moduladores Selectivos (PPAR γ): Compuestos estructuralmente diversos (como algunos ácidos carboxílicos no tiazolidindiónicos y derivados fenólicos) que estabilizan regiones alternativas del LBD (como las hélices 3 y 7) a través de interacciones hidrofóbicas o puentes de hidrógeno secundarios con residuos como His449 o Ser342, sin necesariamente interactuar de forma rígida con Tyr-473 (Zingarelli & Cook, 2005).

Una vez que el ligando se une a PPAR γ , este cambia de forma y se asocia obligatoriamente con otro receptor nuclear llamado RXR (Receptor X Retinoide), formando un heterodímero PPAR γ /RXR. Esta unión es crucial, ya que el receptor no puede unirse eficazmente al ADN de forma aislada, como se muestra en la **Figura 11** (Zingarelli & Cook, 2005).

El complejo activado PPAR γ /RXR se desplaza y se une específicamente a secuencias de ADN diana conocidas como PPRE (*Peroxisome Proliferator Response Elements*), que consisten en repeticiones directas de la secuencia consenso AGGTCA separadas por un solo nucleótido (DR1). A partir de aquí, se inicia la maquinaria de transcripción de genes involucrados en:

- La diferenciación de adipocitos (adipogénesis).
- El metabolismo de lípidos (captación y almacenamiento de ácidos grasos).
- La homeostasis de la glucosa (mejorando la sensibilidad a la insulina).

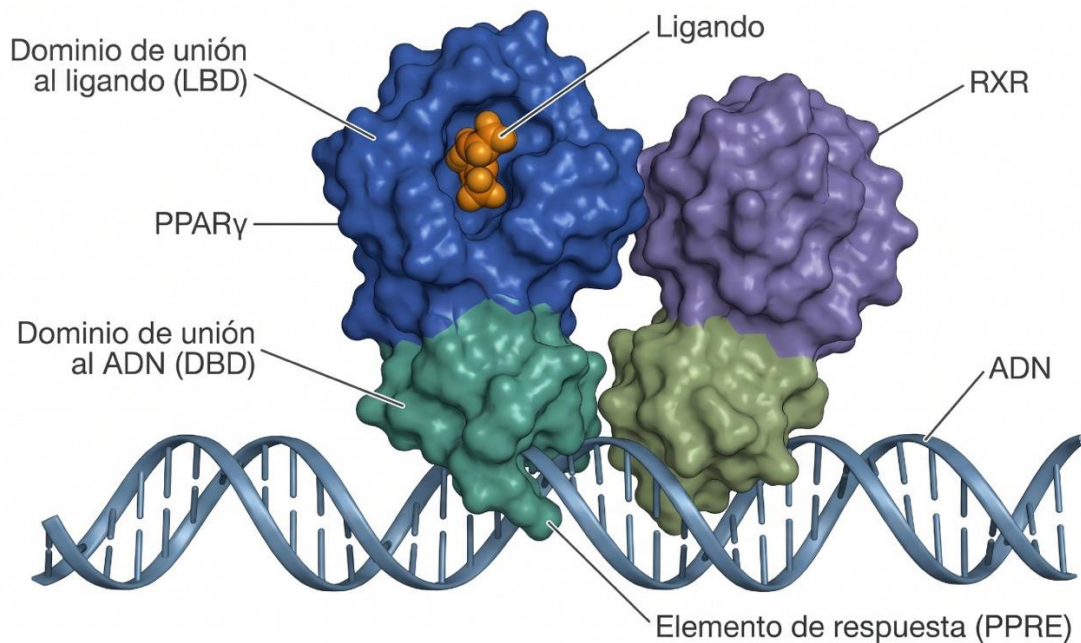


Figura 11. Representación tridimensional del heterodímero PPAR γ /RXR unido a su ligando y al elemento de respuesta a PPRE en el ADN.

II.2.2. Receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT1)

A diferencia del anterior, el receptor AT1 es un receptor acoplado a proteína G transmembrana. Es el principal mediador de las acciones vasoconstrictoras, proliferativas y proinflamatorias de la Angiotensina II. Estructuralmente, el sitio de unión de los antagonistas (como los ARA II) se localiza en una cavidad profunda formada por los segmentos transmembranales (Simões et al., 2020). Es el mediador principal de los efectos biológicos del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) (**Figura13**), regulando de manera directa la vasoconstricción, la homeostasis hidroelectrolítica y la remodelación cardiovascular. Estructuralmente, la proteína está constituida por un paquete de siete hélices transmembranales (TM1-TM7), un dominio extracelular formado por la región N-terminal, tres bucles extracelulares y un dominio citoplasmático formado por tres bucles intracelulares y la parte C-terminal de la

molécula (**Figura 12**). La estructura del receptor incluye dos puentes disulfuro que, a través de cuatro residuos de cisteína, están unidos al dominio extracelular. Uno de los puentes se encuentra entre la parte N-terminal extracelular y el cuarto bucle extracelular, y el otro enlaza el segundo y el tercer bucle extracelular (Spasov et al., 2017).

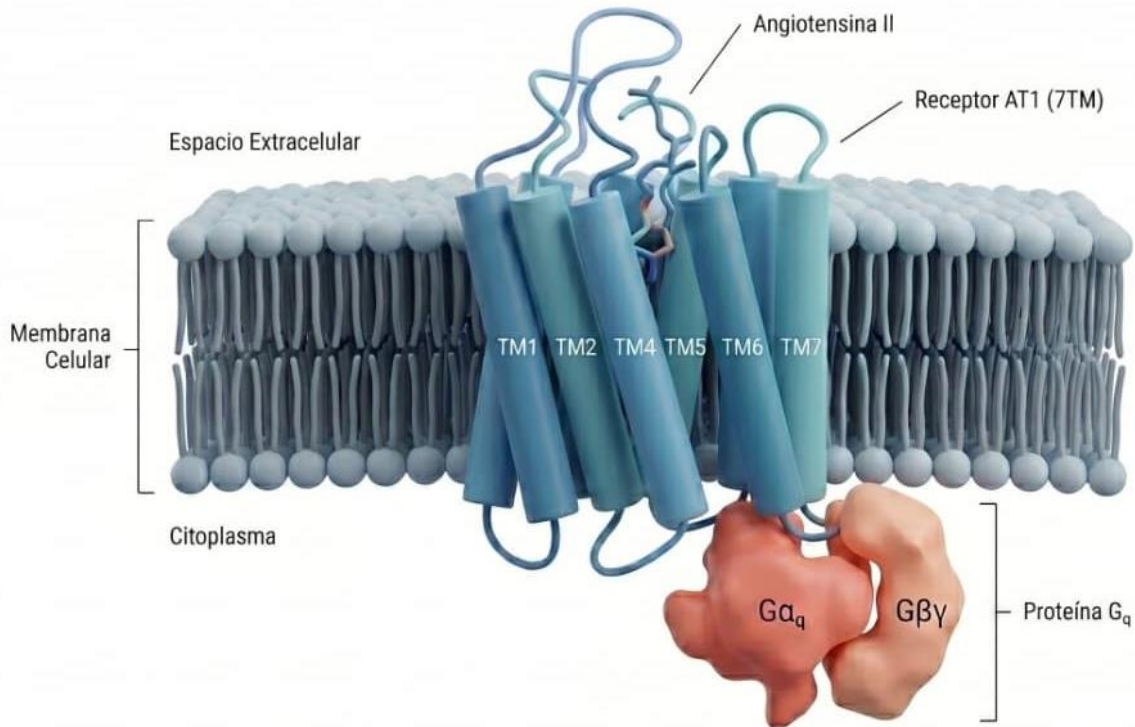


Figura 12. Estructura tridimensional de la proteína AT1, unida al ligando Angiotensina II.

Los receptores AT1 están ampliamente distribuidos en varios tejidos del cuerpo humano adulto, incluyendo el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales, el cerebro, los pulmones, el corazón y los vasos, donde median no solo los efectos ampliamente conocidos sobre el tono vascular, sino también los muchos efectos de la angiotensina II (Spasov et al., 2017).

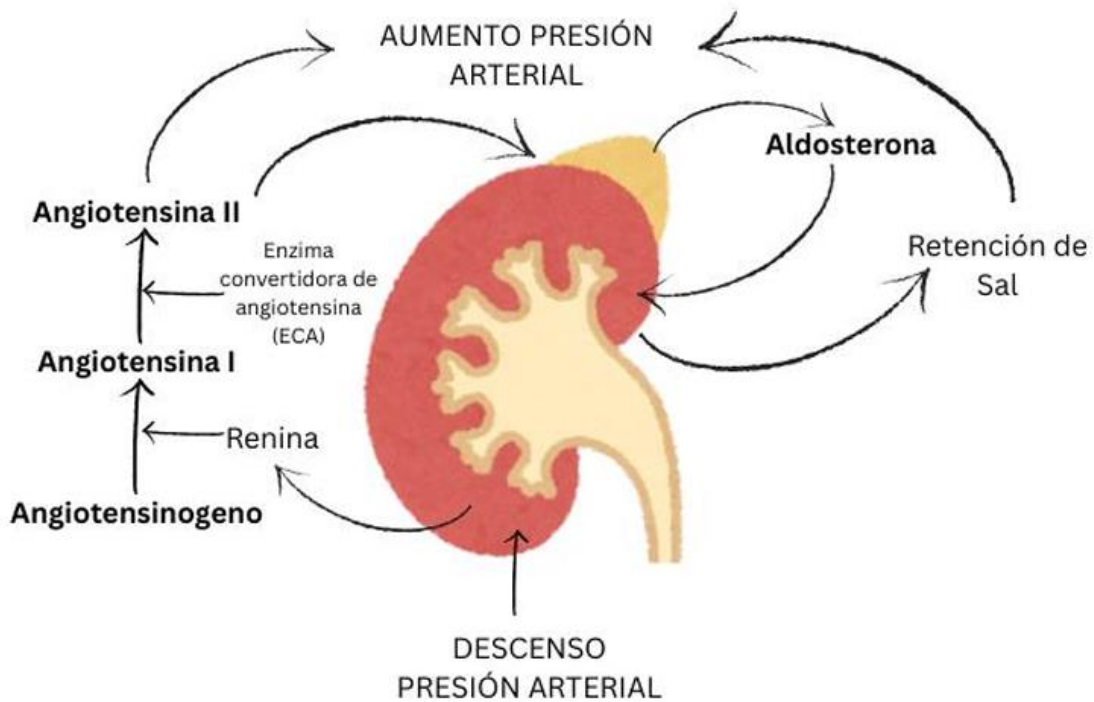


Figura 13. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA).

La unión de AT II con los receptores AT1 activa una serie de cascadas de señalización que median la regulación de las diversas acciones fisiológicas de la angiotensina II (**Figura 14**). Tradicionalmente, las vías para la transmisión de la señal dependiente de la angiotensina II se separan en dos clases: las vías de señalización dependientes de proteína G e independientes de proteína G. Los receptores AT1 interactúan con muchas proteínas G heterotriméricas, incluyendo Gq/11, Gi/0 y G12/13, y producen segundos mensajeros como inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG) y AMP cíclico (cAMP) (Spasov et al., 2017).

Cuando el agonista natural endotelial (Angiotensina II) se une al receptor, induce un movimiento de rotación y rotura en las hélices TM-3 y TM-6 permitiendo que el receptor reclute a la proteína $G\alpha_q$ e inicie la cascada de señalización hipertensiva mediada por calcio intracelular. El diseño farmacofórico de los ARA II introduce grupos voluminosos y rígidos dirigidos a contrarrestar mecánicamente este cambio conformacional.

Este grupo de fármacos bloquea selectivamente los receptores AT1 en el tejido muscular liso vascular, evitando así la unión de la angiotensina II, inhibiendo el SRAA y disminuyendo la presión arterial. La acción principal de esta clase de fármacos, es decir, el efecto hipotensor, es producida por el anillo imidazol o el grupo bifeniltetrazólico, que están presentes en las estructuras de prácticamente todos los antagonistas AT1.

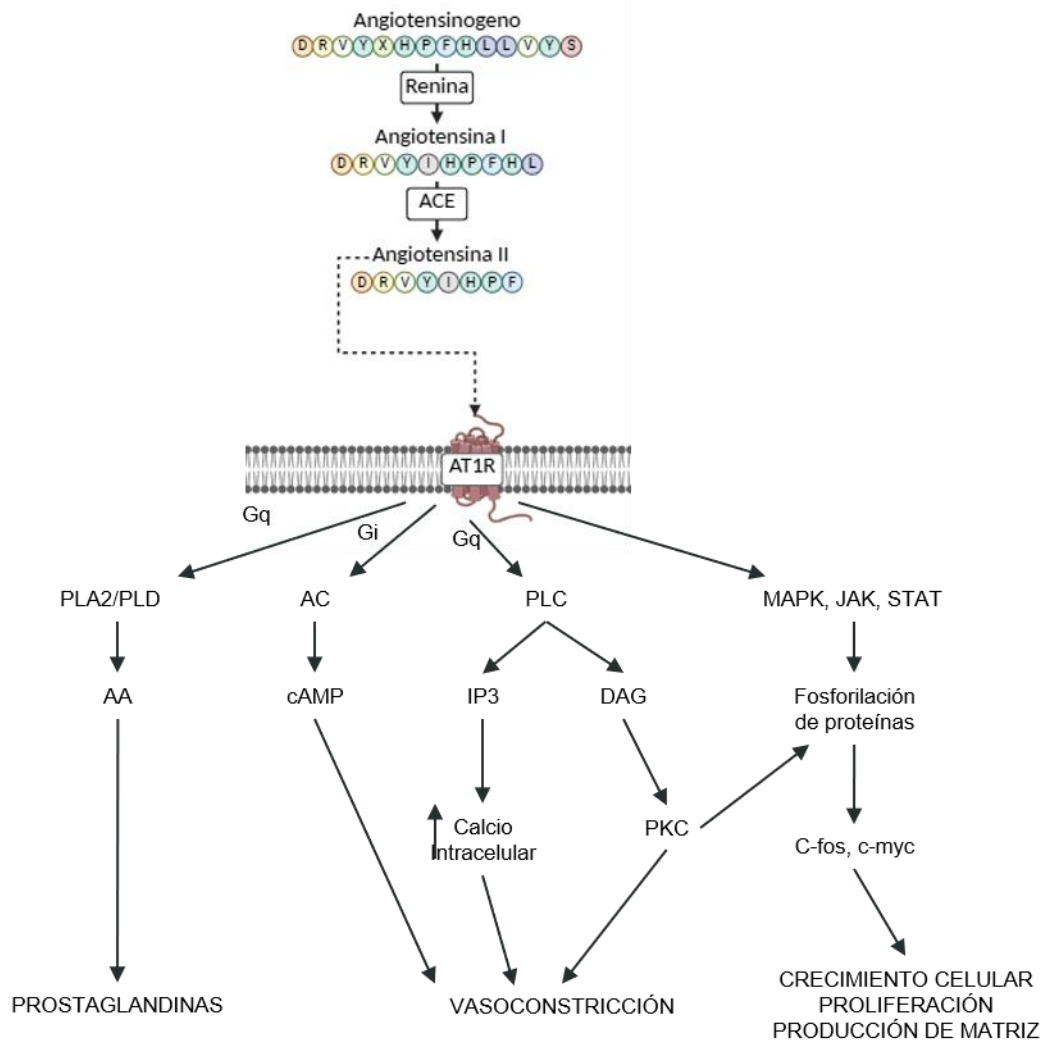


Figura 14. Vías para la transmisión de señales y los efectos fisiológicos de los receptores AT1. Abreviaturas: PLA2– fosfolipasa A2; PLD– fosfolipasa D; PLC– fosfolipasa C; AC– adenilato ciclasa; AA– ácido araquidónico; IP3– inositol-1,4,5-trifosfato; DAG– diacilglicerol; PKC– proteína quinasa C.

II.2.3. La relevancia del acoplamiento molecular en el diseño dual

Dado que estos receptores pertenecen a familias estructurales completamente diferentes (uno nuclear y otro de membrana), la simulación por docking es una herramienta predictiva indispensable. Esta técnica permite evaluar si las modificaciones químicas realizadas en los intermediarios y *twin drugs* permiten un ajuste preciso en ambos sitios activos. El objetivo en esta fase es identificar las interacciones moleculares específicas como puentes de hidrógeno, interacciones π - π y fuerzas de Van der Waals para que otorguen a las moléculas KSC una afinidad equilibrada, superando así las limitaciones de selectividad observadas en fármacos convencionales. El diseño de los compuestos KSC 1-4 toma como referencia farmacofórica el núcleo bifénilo, una estructura clásica que ha demostrado una excelente complementariedad electrostática y de forma con los residuos clave del receptor AT1, permitiendo el bloqueo de la cascada de señalización hipertensiva.

II.3 METODOLOGÍA

Parte computacional- Se abarcarán los estudios de acoplamiento molecular en los dos blancos farmacológicos PPAR γ y AT1, para la evaluación de afinidad y predicción de su potencial como ligandos duales para ambos receptores.

II.3.1 Parte Computacional

II.3.1.1 Acoplamiento molecular sobre PPAR γ y AT1

Las estructuras cristalizadas de los receptores PPAR γ y AT1 fueron obtenidas de la base de datos de Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), con el código de identificación 5Y2O y 4YAY, respectivamente. Los cálculos de acoplamiento fueron realizados con AutoDock, versión 4.2.3 AutoDock realiza un acoplamiento automático del ligando semiflexible con el sitio de unión rígido de la proteína dando 100 corridas del experimento. Cada corrida proporciona una predicción de modo de unión, buscando siempre la que tenga una menor energía libre de Gibbs, para predecir que la unión sea espontánea. Todas las moléculas de agua y el ligando cristalizado fueron removidas de la estructura cristalográfica y todos los átomos de hidrógeno fueron añadidos. Para todos los ligando y la proteína fueron asignadas

II.3.3.2 Validación de acoplamiento molecular.

La validación fue llevada a cabo en Auto Dock 4.2.3 usando las proteínas PDB 5Y2O (PPAR γ) y 4YAY (AT1). Las estructuras cristalográficas de rayos X que venían junto con las proteínas, fueron separadas y acopladas nuevamente con sus regiones de sitio activo pertinentes para cada una. En el caso de PPAR γ el ligando co-cristalizado con la proteína era (5S)-5-[[4-[2-(5-etilpiridin-2-il)etoxi]fenil]metil]-1,3-tiazolidina-2,4-diona (pioglitazona), y en el caso de la proteína AT1, su ligando co-cristalizado era 5,7-dietil-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-3,4-dihidro-1,6-naftiridin-2(1H)-ona (olmesartán). Para PPAR γ los residuos del sitio activo están constituidos por: Cys-285, Ile-281, Ser-289, Phe-363, Glu-286, Tyr-327, Phe-282, Met-364, Leu-330, Tyr-339, His-323. Los residuos de AT1 se constituyen por: Arg-167, Val-108, Trp-84, Ile-288, Cys-289, Tyr-35. La validación fue llevada a cabo basado en las interacciones importantes hechas por el ligando unido a los aminoácidos del sitio activo, indicando que los parámetros de simulación de acoplamiento son buenos. Además, Auto Dock predijo con éxito el modo de unión de los ligandos cristalográficos sobre los receptores con el valor de desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) en 0.205 Å AT1 y el valor de RMSD 0.458Å en PPAR γ .

II.4 RESULTADOS

II.4.1 Acoplamiento molecular de los compuestos finales KSC 1-4 con PPAR γ y AT1

El objetivo principal del docking molecular es predecir la conformación y orientación más favorable (pose de unión) de un ligando dentro del sitio activo de un receptor específico. Los compuestos finales KSC 1-4 se acoplaron con los sitios catalíticos de PPAR γ y AT1 humanos utilizando el programa Auto Dock 4.2.3. El protocolo de acoplamiento fue validado por re-acoplamiento del ligando co-cristalizado de cada receptor.

En las **Figuras 15-18** se puede observar las interacciones polares de los compuestos finales (KSC 1-4). En las interacciones con PPAR γ se observan estas interacciones con el ácido carboxílico de la parte del fenol de la molécula y para las interacciones con el receptor AT1 se observan con el ácido carboxílico encontrado en el bifenilo. Las energías libres de unión se muestran en cada imagen.

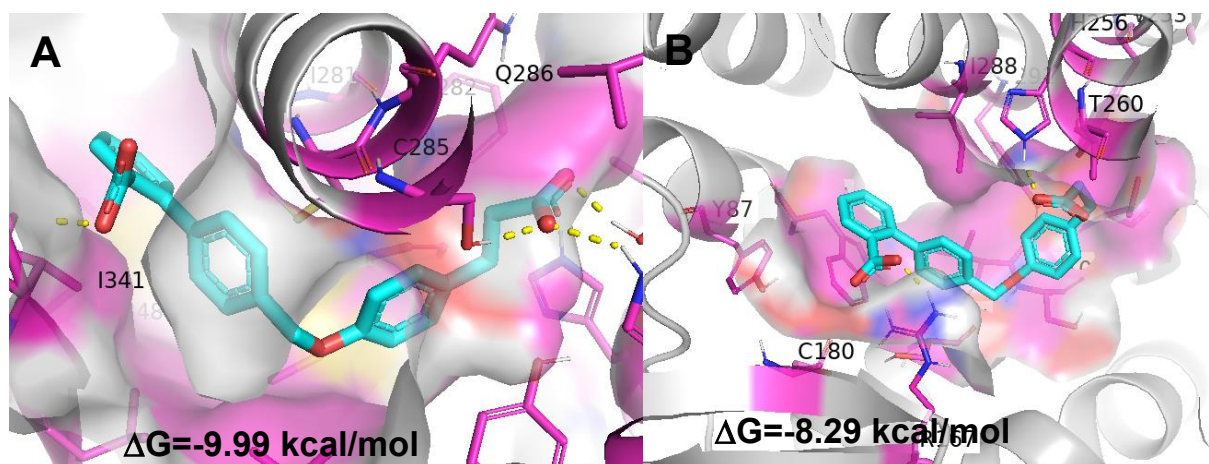


Figura 15. Modo de unión de KSC1 en el sitio activo de (A) PPAR γ y (B) AT1. Los aminoácidos del sitio activo se encuentran en color rosa y las interacciones polares se muestran con líneas punteadas amarillas.

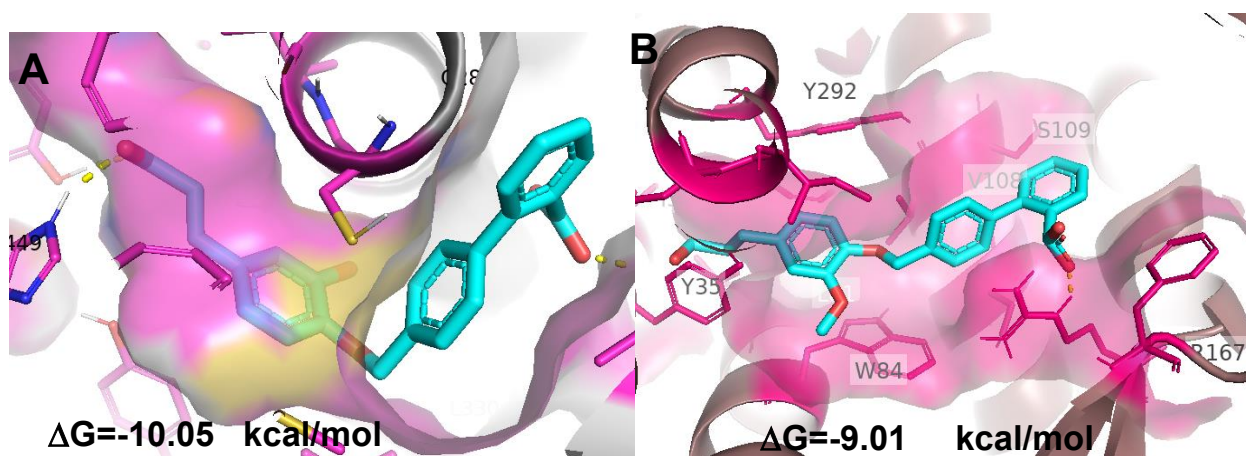


Figura 16. Modo de unión de KSC2 en el sitio activo de (A) PPAR γ y (B) AT1. Los aminoácidos del sitio activo se encuentran en color rosa y las interacciones polares se muestran con líneas punteadas amarillas.

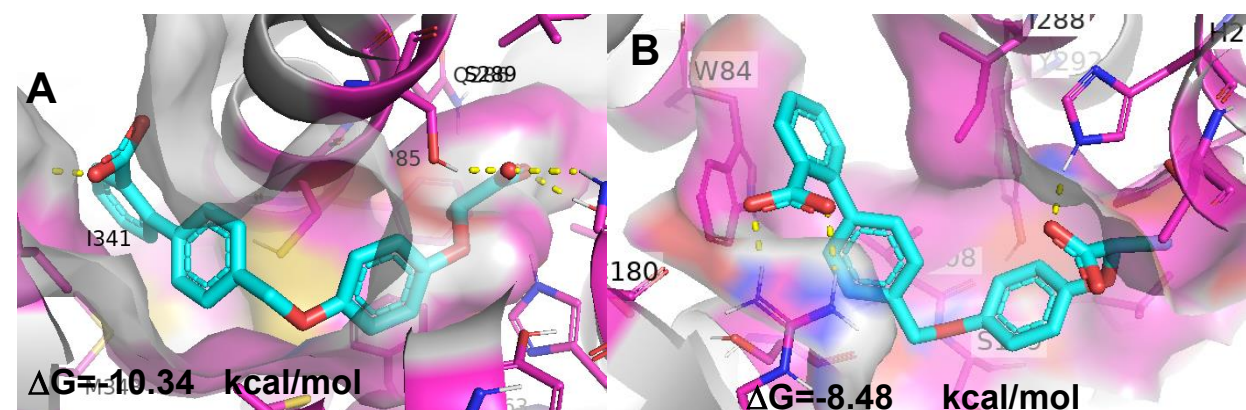


Figura 17. Modo de unión de KSC3 en el sitio activo de (A) PPAR γ y (B) AT1. Los aminoácidos del sitio activo se encuentran en color rosa y las interacciones polares se muestran con líneas punteadas amarillas.

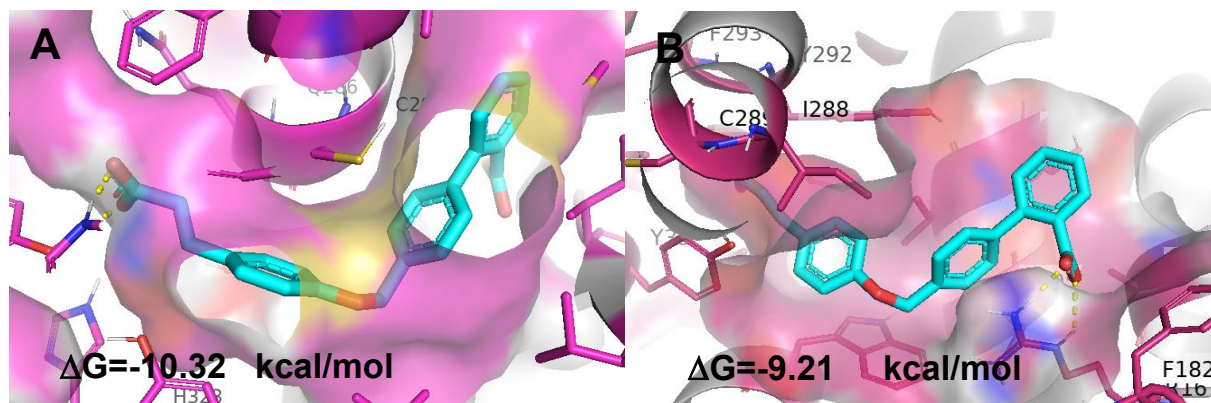


Figura 18. Modo de unión de KSC4 en el sitio activo de (A) PPAR γ y (B) AT1. Los aminoácidos del sitio activo se encuentran en color rosa y las interacciones polares se muestran con líneas punteadas amarillas.

A partir de los ensayos de acoplamiento molecular, se determinó que el compuesto KSC4 presenta el mejor perfil farmacofórico dual de la serie estudiada, al exhibir una afinidad excepcional por ambos blancos terapéuticos con valores de energía libre de Gibbs (ΔG) de -10.32 kcal/mol para PPAR γ y -9.21 kcal/mol para AT1. En la fisicoquímica de las interacciones biológicas, la magnitud de estos valores negativos es un indicador directo de la espontaneidad del proceso de asociación; entre más negativo es el valor de ΔG , mayor es la exergonicidad de la reacción y, por lo tanto, el equilibrio químico se desplaza fuertemente hacia la formación del complejo ligando-receptor de manera espontánea.

Esta marcada disminución en la energía libre del sistema está íntimamente ligada a la optimización de las contribuciones entálpicas y entrópicas durante el reconocimiento molecular. Fenómenos como la liberación de moléculas de agua altamente ordenadas desde el bolsillo hidrofóbico y la formación de interacciones no covalentes de corto alcance estabilizan termodinámicamente el complejo. En los mapas de interacción bidimensionales se puede constatar que estos valores tan favorables de ΔG en la serie KSC son el resultado neto de un anclaje polar eficiente mediante puentes de hidrógeno.

En el receptor PPAR γ , KSC4 logra emular el comportamiento de activación canónico del ligando co-cristalizado (pioglitazona) mediante la formación de puentes de hidrógeno clave con la tríada de aminoácidos esenciales del brazo de activación Ser-289, His-323 y Tyr-473. Por otra parte, en el receptor AT1, las modificaciones estructurales de este ligando permitieron un anclaje molecular superior respecto a los demás congéneres de la serie; esto se evidencia en una sólida interacción electrostática con el residuo crítico Arg-167 acoplada a una interacción de tipo π con Tyr-35 en el bolsillo profundo del receptor. Este doble reconocimiento estabiliza termodinámicamente el complejo receptor-ligando y compensa de manera formal los efectos de repulsión electrónica localizados en Cys-289. De este modo, los datos *in silico* posicionan a KSC4 como el candidato líder de la serie, logrando un balance óptimo de afinidad teórica en ambos sistemas sin comprometer la selectividad estructural requerida para un ligando dual.

II.4.2 Validación del acoplamiento molecular de los compuestos finales KSC 1-4 con PPAR γ y AT1

En la **Figura 19** se muestra una comparación del modo de unión de los compuestos finales KSC1-4 con el ligando co-cristalizado (pioglitazona) del receptor PPAR γ . Se puede observar cómo ciertos grupos farmacofóricos mantienen la misma unión. Se realizó un análisis de superposición estructural en PyMOL entre los compuestos sintetizados (KSC 1-4) y el ligando co-cristalizado (pioglitazona) de referencia.

Con la finalidad de validar el protocolo de acoplamiento molecular y asegurar la reproducibilidad de las interacciones predichas, se llevó a cabo un ensayo de re-acoplamiento (redocking) utilizando el ligando co-cristalizado del receptor PPAR γ , la pioglitazona. El ligando extraído fue acoplado nuevamente en el sitio activo bajo las mismas condiciones experimentales parametrizadas para la serie de compuestos evaluados (**Figura 20**). Se obtuvo un valor de RMSD de 0.458 Å entre la conformación predicha por el software y la pose cristatográfica experimental. Este valor, al encontrarse significativamente por debajo del umbral estándar aceptado en la literatura (< 2.0 Å), demuestra la alta robustez, precisión y validez del algoritmo de acoplamiento molecular empleado para este blanco biológico.

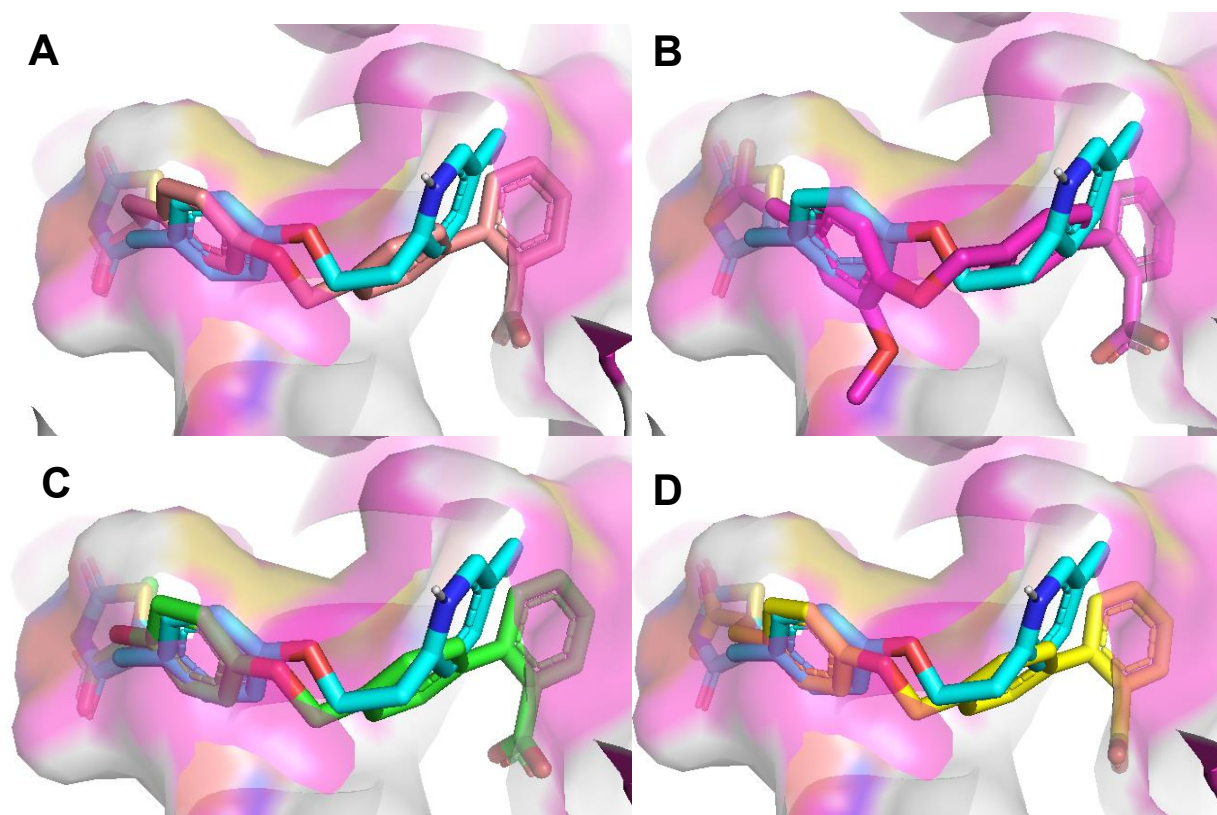


Figura 19. Comparación de los compuestos finales KSC1(rosa), KSC 2 (magenta), KSC3 (verde), KSC4 (amarillo), con el ligando co-cristalizado (azul) en el sitio de unión de la proteína PPAR γ .

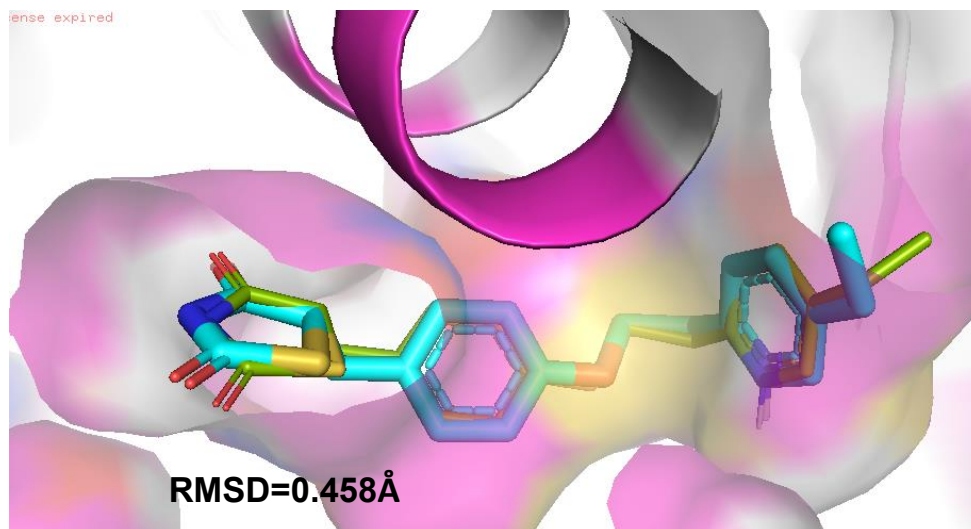


Figura 20. Comparación de la pioglitazona Co-Cristalizada (Verde) con la pioglitazona re-acoplada (azul), en el bolsillo drogable de la proteína PPAR γ .

En la **Figura 21** se muestra una comparación del modo de unión de los compuestos finales KSC1-4 con el ligando co-cristalizado (olmesartán) del receptor AT1. Se puede observar cómo ciertos grupos farmacofóricos mantienen el mismo patrón de unión, por lo tanto, comparten interacciones químicas.

Para validar el protocolo de docking en el receptor AT1, se realizó un ensayo de re-acoplamiento (redocking) utilizando su ligando co-cristalizado, el olmesartán. Tras remover y acoplar nuevamente el fármaco en el sitio activo bajo las condiciones experimentales previamente descritas, se obtuvo un valor de RMSD de 0.205 Å entre la pose predicha computacionalmente y la conformación cristatográfica original (**Figura 22**). Este resultado se ubica muy por debajo del límite crítico de aceptación establecido en la literatura (< 2.0 Å), confirmando la robustez y la excelente reproducibilidad del algoritmo para reproducir el modo de unión experimental en este blanco de membrana.

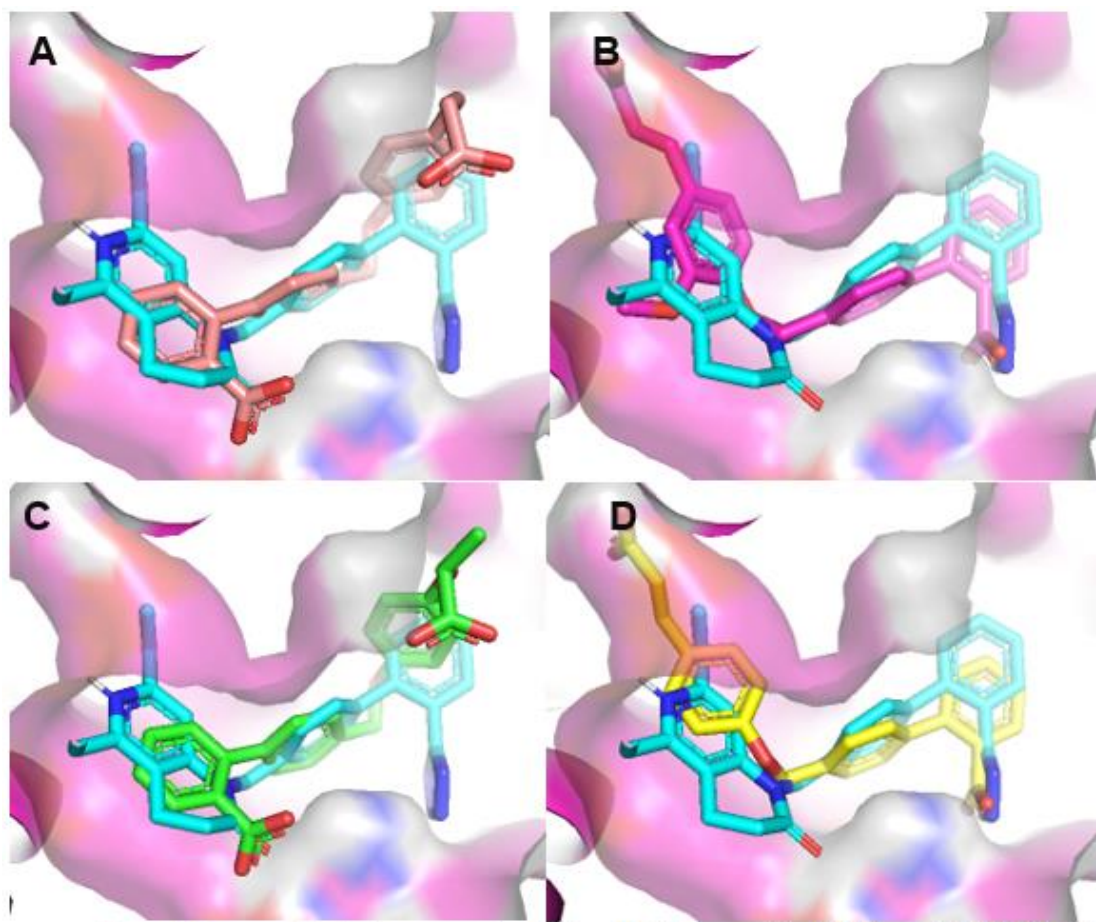


Figura 21. Comparación de los intermediarios KSC 5 (magenta), KSC6 (amarillo), KSC7(rosa), KSC8 (verde), con el ligando co-cristalizado, olmesartán (azul) en el sitio de unión de la proteína AT1.

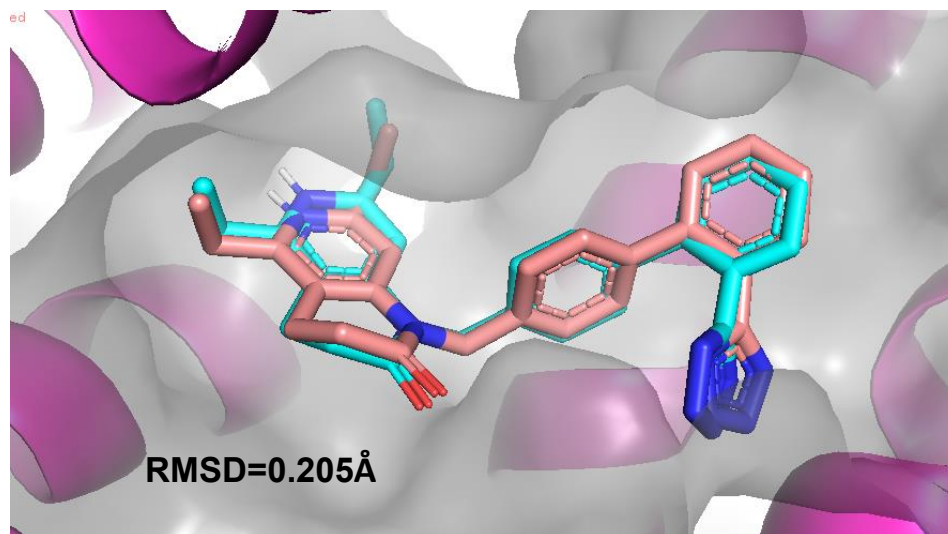


Figura 22. Comparación de olmesartán co-cristalizado (rosa) y olmesartán re-acoplado (azul), en el bolsillo drogable de la proteína AT1.

La obtención de un valor de RMSD bajo es de vital importancia en el diseño de fármacos asistido por computadora, ya que constituye el parámetro cuantitativo estándar para validar la precisión de un protocolo de acoplamiento molecular. En términos estructurales, el RMSD mide la desviación espacial entre los átomos del ligando predicho por el software y los de la conformación real determinada experimentalmente por cristalografía de rayos X. Un valor significativamente menor al umbral crítico de 2.0 Å, y particularmente los valores ultra bajos obtenidos en este estudio, demuestra que el algoritmo es capaz de reproducir con alta fidelidad geométrica el modo de unión biológico. Esto garantiza que la configuración de la caja de docking, las funciones de puntuación y las variables de flexibilidad molecular seleccionadas son metodológicamente robustas, eliminando artefactos computacionales y asegurando la reproducibilidad de los ensayos.

II.4.3 Mapas de interacción de dos dimensiones para los compuestos finales KSC (1-4) en PPAR γ y AT1

La **Figura 23** representa el mapa de interacción 2D de los compuestos finales KSC 1-4 (paneles A-D) y pioglitazona (E) con el sitio activo del receptor. Se observa que se generan interacciones de tipo π -anión, π -sulfur y de carga atractiva en los compuestos finales a través del anillo aromático central y su entorno, mediadas de manera consistente por los residuos Cys-285 y Met-364.

- **Anclaje Polar:** Se observa una conservación crítica de puentes de hidrógeno convencionales con residuos polares como His-449 y Tyr-473 (así como Ser-342 en el extremo opuesto). Estas interacciones son fundamentales para estabilizar la posición del ligando en el sitio activo debido a que forman una red electrostática muy fuerte que actúa como un "ancla". Sin este anclaje, el ligando podría perder afinidad o salirse del sitio activo.
- **Estabilidad del Core:** El núcleo aromático y el sistema bifenilo de los compuestos KSC se posicionan en una región densa en interacciones de tipo π - π Stacked, π - π T-shaped y π -Alkyl con residuos como Tyr-327, Phe-363 e Ile-341. Estas fuerzas no covalentes son determinantes para el reconocimiento molecular en el bolsillo hidrofóbico, asegurando que el farmacóforo se posicione de manera óptima para la modulación del receptor.

El análisis comparativo con la pioglitazona (E) demuestra variaciones estructurales y de acoplamiento críticas; aunque el fármaco de referencia comparte el reconocimiento hacia la región hidrofóbica e interactúa con His-323 y Ser-289, presenta una interacción de tipo aceptor-aceptor desfavorable directamente con el residuo clave Tyr-473. Esta repulsión electrostática/estérica en el ligando co-cristalizado contrasta con el perfil favorable de la serie KSC 1-4, lo cual demuestra que los compuestos diseñados no solo mantienen la complementariedad química necesaria, sino que optimizan las interacciones en esta región esencial del bolsillo receptor, sugiriendo una potencial mejora en la afinidad y el reconocimiento molecular planteado en este proyecto.

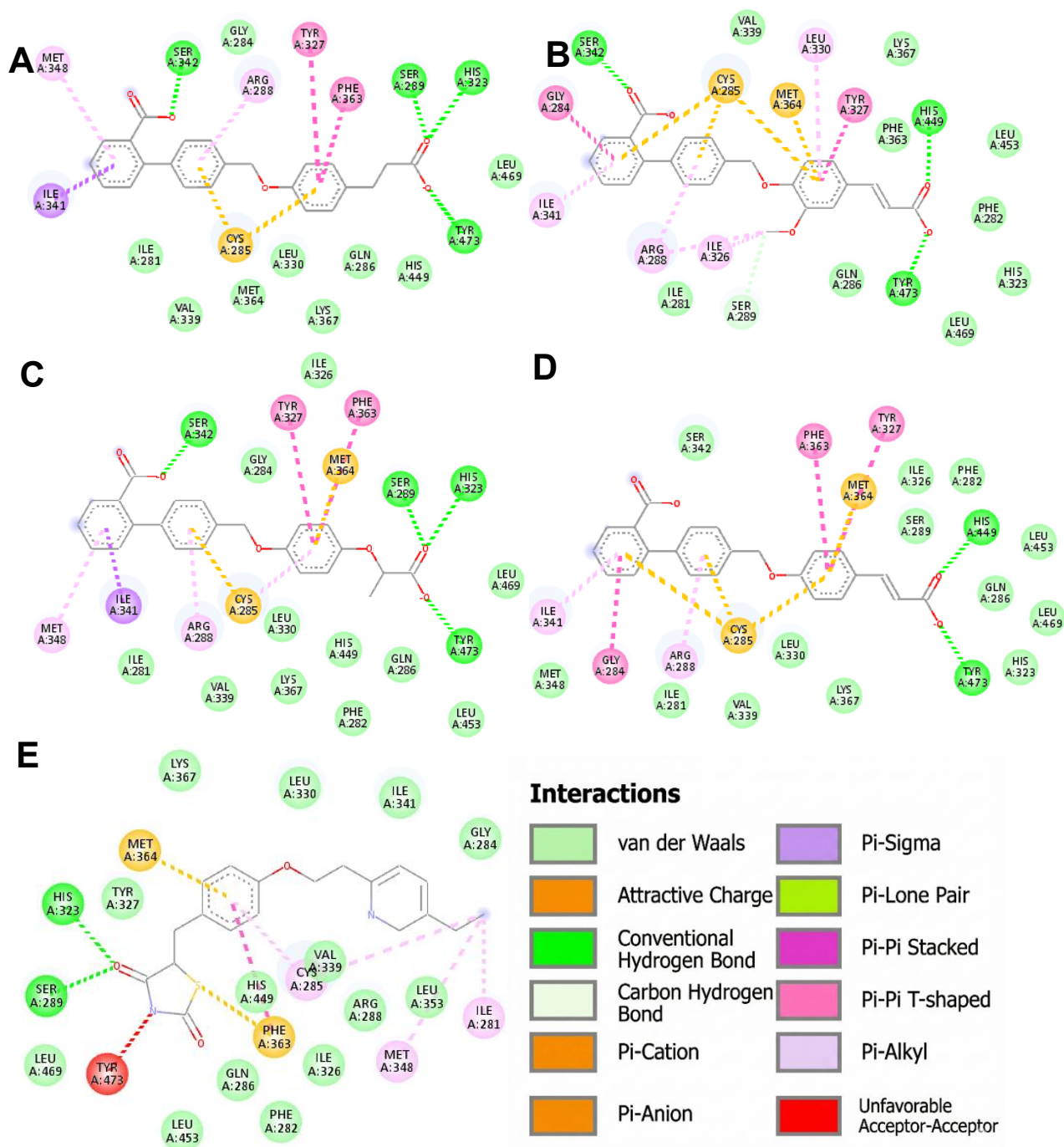


Figura 23. Diagramas de interacciones bidimensionales del modo de unión predicho del receptor PPAR γ con los compuestos (A) KSC 1, (B) KSC2, (C) KSC3, (D)KSC4. También se muestra como referencia el correspondiente mapa de interacción 2-D del ligando co-cristalizado pioglitazona (E) en PPAR γ .

La **Figura 24** representa el mapa de interacción 2D de los compuestos finales KSC 1-4 (paneles A-D) y el ligando co-cristalizado olmesartán (panel E) con el sitio activo del receptor AT1. Se observa que se generan interacciones de tipo π -catión, π -anión y de carga atractiva en los compuestos finales a través del ácido carboxílico y el núcleo aromático adyacente situado en el lado del fenol, mediadas de manera consistente y crucial por el residuo Arg-167.

- Anclaje Polar: Se observa una conservación crítica de puentes de hidrógeno convencionales y contactos electrostáticos con residuos polares como Arg-167 (y contactos específicos con His-256 o Tyr-35 según el derivado). Estas interacciones son fundamentales para estabilizar la posición del ligando en el sitio activo de AT1 debido a que forman una interacción electrostática sumamente fuerte que actúa como un "ancla". Sin este anclaje, el ligando podría perder afinidad de unión o salirse del sitio activo.
- Estabilidad del Core: El núcleo aromático y los anillos bifenilo de los compuestos KSC se posicionan en una región densa en interacciones de tipo π - π Stacked, π - π T-shaped, π -Sigma y π -Alkyl con residuos altamente conservados en el bolsillo hidrofóbico como Trp-84, Val-108, Leu-112 y Tyr-292. Estas fuerzas no covalentes son determinantes para el reconocimiento molecular en el canal hidrofóbico de AT1, asegurando que el farmacóforo se posicione de manera óptima para la modulación o bloqueo del receptor.

La similitud en el patrón de interacción entre los compuestos KSC (A-D) y el olmesartán (E) demuestra que la serie diseñada mantiene la complementariedad química y geométrica necesaria para el antagonismo del receptor AT1, compartiendo el anclaje central con Arg-167. Las ligeras variaciones observadas en los contactos de tipo alquilo y la presencia de una interacción desfavorable aceptor-aceptor en el compuesto KSC4 con Cys-289 sugieren que los sustituyentes específicos y las modificaciones en la longitud o insaturación de la cadena exploran regiones adicionales del bolsillo. Esto aporta información sumamente relevante para la optimización fina de la afinidad sin perder el anclaje fundamental requerido para la acción dual planteada en este proyecto.

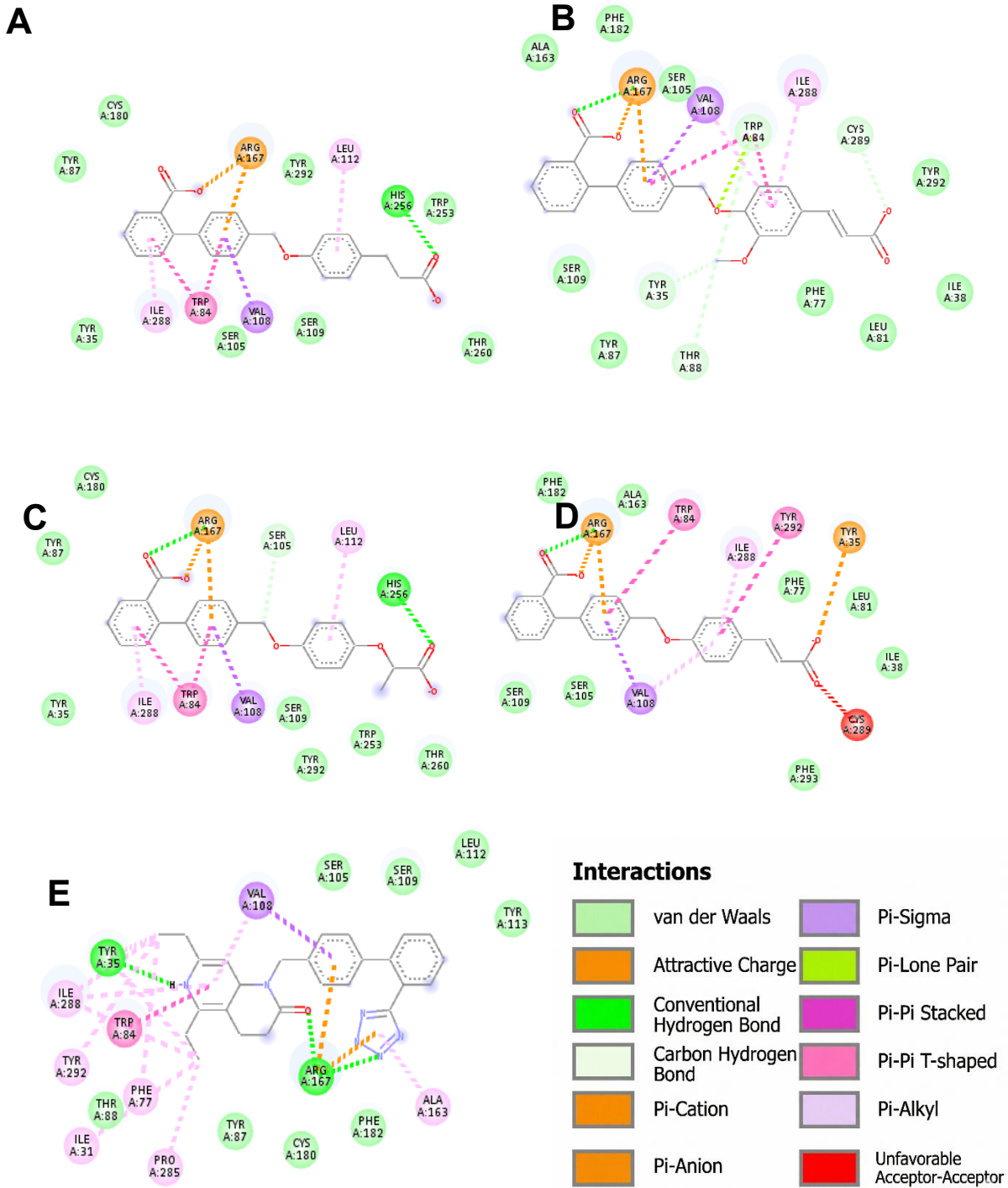


Figura 24. Diagramas de interacciones bidimensionales del modo de unión predicho del receptor AT1 con los compuestos (A) KSC 1, (B) KSC2, (C) KSC3, (D)KSC4. También se muestra como referencia el correspondiente mapa de interacción 2-D del ligando co-cristalizado olmesartán (E) de AT1.

El análisis de los mapas de interacción bidimensionales constituye una herramienta analítica fundamental en el diseño de fármacos asistido por computadora. Mientras que los valores de energía libre de Gibbs ofrecen un panorama puramente cuantitativo y macroscópico de la afinidad termodinámica, los diagramas 2D permiten diseccionar dicho valor a nivel microscópico y estructural. La importancia de evaluar estas representaciones radica en su capacidad para mapear con precisión nanométrica el espacio tridimensional del sitio activo, identificando de manera cualitativa y espacial qué grupos funcionales de la serie KSC participan directamente en el reconocimiento molecular, qué residuos aminoacídicos son críticos para el anclaje y si existen impedimentos estéricos o repulsiones electrostáticas que comprometan la estabilidad del complejo.

Estas interacciones moleculares son la manifestación de fuerzas intermoleculares no covalentes de corto alcance, las cuales se pueden categorizar en tres grandes grupos según su naturaleza fisicoquímica:

1. **Interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno:** Son interacciones de carácter direccional fuertemente atractivas. Los puentes de hidrógeno convencionales (como los observados de manera consistente con His-449 y Tyr-473 en PPAR γ) ocurren cuando un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un elemento electronegativo (donador) interactúa con los pares de electrones libres de otro átomo electronegativo (aceptor). Por otro lado, las interacciones de tipo ion-dipolo y los puentes salinos (como el anclaje electrostático con Arg-167 en el receptor AT1) representan interacciones de alta energía que estabilizan drásticamente el complejo mediante la atracción de cargas netas o parciales opuestas.

2. **Interacciones de apilamiento aromático e hidrofóbicas (π -system):** Estas fuerzas de dispersión de London juegan un rol crítico en la estabilización de los núcleos hidrofóbicos de las twin drugs. Las interacciones de tipo π - π stacked (apilamiento cara a cara o desplazado) y π -alkyl se originan por el solapamiento o la fluctuación concertada de las nubes electrónicas coordinadas entre los anillos aromáticos del ligando (como el sistema bifenilo de la serie KSC) y los residuos con cadenas laterales aromáticas o alifáticas del receptor (como Trp-84, Val108 o Tyr-292 en AT1). Estas fuerzas dirigen el correcto posicionamiento espacial de la molécula dentro de los bolsillos lipofílicos de los blancos.

3. **Fuerzas de Van der Waals:** Son interacciones intermoleculares débiles de naturaleza electrostática. Se producen por la atracción o repulsión entre moléculas neutras. Son atracciones débiles y transitorias no específicas inducidas por dipolos fluctuantes entre los átomos del ligando y los residuos que delimitan la superficie del bolsillo catalítico. Aunque individualmente su aporte energético es menor, la suma colectiva de decenas de contactos de Van der Waals genera un efecto de complementariedad de forma (ajuste inducido) esencial para el sellado óptimo del ligando.

II.5 CONCLUSIONES

Validación del protocolo computacional: Se demostró la alta confiabilidad geométrica y electrostática del algoritmo de acoplamiento molecular (*docking*) mediante el re-acoplamiento (*redocking*) de los ligandos co-cristalizados de referencia. Los valores de RMSD obtenidos, 0.458 Å para la pioglitazona en PPAR γ y 0.205 Å para el olmesartán en AT1, se ubicaron drásticamente por debajo del umbral estándar de aceptación (< 2.0 Å), validando la predictibilidad de las simulaciones de los productos finales.

Relación de espontaneidad de la unión: Los ensayos de acoplamiento molecular evidenciaron valores negativos de energía libre de Gibbs (ΔG) para todos los miembros de la serie KSC (1-4) en ambos blancos biológicos, lo que corrobora que la formación de los complejos ligando-receptor son procesos de unión espontánea.

KSC4 como el candidato líder dual: Al realizar el análisis comparativo de la serie KSC en ambos receptores, el compuesto KSC4 destacó por presentar el mejor perfil farmacofórico dual y el balance de afinidad teórica más competitivo. Exhibió las interacciones más estables y espontáneas de la serie, alcanzando valores sobresalientes de $\Delta G = -10.32$ kcal/mol para PPAR γ y $\Delta G = -9.21$ kcal/mol para AT1.

Mimetismo y anclaje en los mapas de interacción 2D (PPAR γ): El análisis tridimensional y bidimensional reveló que los compuestos KSC logran un anclaje polar eficiente mediante una red de puentes de hidrógeno convencionales con residuos clave como His449 y Tyr473. Notablemente, los compuestos optimizan el reconocimiento molecular hidrofóbico en el core aromático en comparación con la pioglitazona, la cual manifestó interacciones desfavorables de tipo aceptor-aceptor con Tyr473 que no se presentaron en la serie KSC.

Mimetismo y anclaje en los mapas de interacción 2D (AT1): En el receptor de membrana, los mapas de interacción de la serie KSC demostraron una conservación crítica del patrón de reconocimiento farmacofórico del olmesartán. A través del ácido carboxílico y el núcleo aromático del bifenilo, los compuestos KSC establecieron un anclaje electrostático fundamental de tipo π -catión y puentes salinos mediado de forma consistente por el residuo esencial Arg167, el cual es determinante para el antagonismo de este blanco terapéutico.

II.6 PROGRAMAS Y EQUIPOS UTILIZADOS

Todos los programas fueron instalados sobre Laptop ASUS modelo Vivo Book con SO: Windows 10 Home Single Language 22H2 X64, Procesador AMD Ryzen 3 3250U con tarjeta gráfica AMD Radeon Graphics 2.60 GHz, 8.00GB RAM

PARTE III

Determinación de la toxicidad aguda (CL₅₀) de los compuestos finales (KSC 1-4) en *Artemia salina*.

III.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la Concentración Letal Media (CL₅₀) de los cuatro compuestos finales mediante el bioensayo con *Artemia salina*, como parámetro de evaluación de la toxicidad aguda *in vitro*.

III.2 ANTECEDENTES

La evaluación de la toxicidad aguda constituye una etapa crítica en el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos, permitiendo establecer el margen de seguridad de los compuestos sintetizados antes de su validación en modelos *in vivo* más complejos. En este contexto, el bioensayo con el crustáceo *Artemia salina* ha sido ampliamente adoptado como un método de tamizaje preliminar debido a su alta sensibilidad y correlación con la actividad citotóxica en líneas celulares humanas (Sorgeloos et al., 1978).

La *Artemia salina* es un crustáceo que habita de manera natural en ecosistemas hipersalinos. En el ámbito de la toxicología y la farmacología experimental, este organismo se ha consolidado como uno de los modelos biológicos más valiosos para el tamizaje preliminar de compuestos con potencial actividad biológica (Valderrama Molina & Tinjacá Benítez, 2025). Su importancia radica en una combinación de factores biológicos, logísticos y éticos que lo posicionan como un paso intermedio ideal entre las pruebas puramente computacionales (como el *docking* molecular realizado previamente) y los ensayos en líneas celulares o modelos animales superiores.

Desde una perspectiva biológica, la *Artemia salina* presenta una fisiología compleja que incluye sistemas enzimáticos y mecanismos de transporte de membrana análogos a los encontrados en organismos superiores. Esto permite que el bioensayo detecte una amplia gama de efectos citotóxicos inespecíficos, proporcionando una estimación confiable de la seguridad de los compuestos KSC 1-4. Diversos estudios han demostrado una correlación significativa entre la toxicidad aguda en este crustáceo y la citotoxicidad en líneas celulares de mamíferos, lo que convierte al valor de CL₅₀ en un indicador predictivo del margen terapéutico de nuevos fármacos (Meyer et al., 1982).

En el bioensayo de toxicidad, la elección del estadio de desarrollo del organismo es crítica para garantizar la sensibilidad de la prueba. Se utilizan preferentemente los nauplios (larvas recién eclosionadas) en los estadios Instar II e Instar III (Okumu et al., 2021).

La importancia de utilizar este estadio radica en que, tras la eclosión (Instar I), el organismo experimenta una muda hacia el estadio Instar II, momento en el cual comienza a ingerir alimento del medio externo y su sistema digestivo se vuelve funcional. Esto permite que los compuestos KSC 1-4 no solo actúen por contacto cuticular, sino que también sean absorbidos sistémicamente. Además, en esta etapa larval, las tasas de división celular y los procesos metabólicos son sumamente elevados, lo que incrementa la susceptibilidad del organismo ante xenobióticos y permite detectar efectos citotóxicos que podrían pasar desapercibidos en individuos adultos con mecanismos de detoxificación más robustos (Okumu et al., 2021).

De acuerdo con los criterios establecidos por Arcos et al., la determinación de la CL₅₀ permite categorizar la peligrosidad de los compuestos finales (KSC 1-4), facilitando la identificación de aquellos candidatos con un perfil toxicológico favorable para su posterior estudio como moduladores de los receptores PPAR γ y AT1.

III.3 METODOLOGÍA

III.3.1 Preparación del Medio y Eclosión de *Artemia salina*

La obtención de los especímenes se realizó mediante la hidratación de 0.2 g de quistes secos de *Artemia salina* en 200 mL de agua destilada con aireación constante durante un periodo de pre-hidratación. Paralelamente, se preparó un medio salino artificial disolviendo 17 g de sal en 1 L de agua, manteniendo agitación mecánica constante en un matraz Erlenmeyer de 2 L hasta lograr la completa solubilización de los cristales.

Una vez acondicionado el medio, se transfirieron los quistes hidratados al matraz bajo condiciones controladas de oxigenación mediante una bomba de aire de flujo continuo. El sistema de incubación se mantuvo en una cámara con temperatura regulada entre 28-30 °C y bajo iluminación constante durante 48 horas, garantizando las condiciones óptimas para la eclosión y el desarrollo de los nauplios hasta alcanzar el estadio Instar II/III.

III.3.2 Exposición y Determinación de Mortalidad

Para la evaluación de los compuestos finales (KSC 1-4), se emplearon placas de 24 pocillos. En cada unidad experimental se depositaron 20 nauplios en un volumen final de 2 mL de solución salina. Se evaluó un gradiente de ocho concentraciones para cada compuesto (100, 85, 70, 50, 25, 20, 10 y 1 μM), ejecutando cada ensayo por triplicado para asegurar la reproducibilidad estadística.

Los organismos fueron expuestos a los agentes químicos durante un periodo de 24 horas bajo fotoperiodo constante. Tras la exposición, se realizó el conteo de sobrevivientes mediante observación con lupa. Se definió como espécimen vivo a aquel que manifestó movimiento apendicular o interno visible durante un intervalo de observación de 10 segundos.

III.3.3 Criterios de Validación (Control Negativo)

Como control de calidad del bioensayo, se incluyó un grupo de referencia consistente en 20 nauplios mantenidos exclusivamente en medio salino bajo las mismas condiciones experimentales. El experimento se consideró válido únicamente cuando la mortalidad en el grupo control fue inferior al 10% (máximo 2 individuos), asegurando que los efectos observados fueran atribuibles a la citotoxicidad de los compuestos y no a factores de estrés ambiental o calidad del agua.

III.4 RESULTADOS

III.4.1 Ensayos de supervivencia y recuento de nauplios

Inicialmente, se registraron los recuentos de nauplios sobrevivientes tras 24 horas de exposición a ocho concentraciones distintas para cada compuesto (1, 10, 20, 25, 50, 70, 85 y 100 μM). Los experimentos se realizaron por triplicado para garantizar la robustez de los datos. En las **Tabla 3-6** se detallan los conteos individuales por réplica y el promedio de supervivencia obtenido para cada concentración.

Como se observa en los registros, existe una disminución progresiva en el número de individuos vivos a medida que aumenta la concentración del compuesto, lo que confirma una respuesta biológica dependiente de la dosis. Asimismo, el grupo control mantuvo una supervivencia superior al 90%, validando el estado óptimo del sistema de prueba y la ausencia de factores de estrés externos.

Tabla 3. Determinación de la toxicidad del compuesto KSC 1 en el bioensayo con *A. salina* a diferentes concentraciones

Ensayo <i>A. salina</i>			
Compuesto KSC 1			
Concentración (μM)	Nauplios vivos antes de añadir compuesto KSC 1	Nauplios vivos 24 hrs después de añadir KSC 1	% mortalidad
Control	20	20	0
100	20	9	55
85	20	9	55
70	20	9	55
50	20	9	55
25	20	12	40
10	20	12	40
1	20	12	40

Tabla 4. Determinación de la toxicidad del compuesto KSC 2 en el bioensayo con *A. salina* a diferentes concentraciones.

Ensayo <i>A. salina</i>			
Compuesto KSC 2			
Concentración (μM)	Nauplios vivos antes de añadir compuesto KSC 2	Nauplios vivos 24 hrs después de añadir KSC 2	% mortalidad
Control	20	20	0
100	20	9	55
85	20	11	45
70	20	13	35
50	20	14	30
25	20	15	25
10	20	18	10
1	20	19	5

Tabla 5. Determinación de la toxicidad del compuesto KSC 3 en el bioensayo con *A. salina* a diferentes concentraciones.

Ensayo <i>A. salina</i>			
Compuesto KSC 3			
Concentración (μM)	Nauplios vivos antes de añadir compuesto KSC 3	Nauplios vivos 24 hrs después de añadir KSC 3	% mortalidad
Control	20	20	0
100	20	10	50
85	20	10	50
70	20	11	45
50	20	12	40
25	20	13	35
10	20	14	30
1	20	15	25

Tabla 6. Determinación de la toxicidad del compuesto KSC 4 en el bioensayo con *A. salina* a diferentes concentraciones.

Ensayo <i>A. salina</i>			
Compuesto KSC 4			
Concentración (μM)	Nauplios vivos antes de añadir compuesto KSC 4	Nauplios vivos 24 hrs después de añadir KSC 4	% mortalidad
Control	20	20	0
100	20	12	40
85	20	13	35
70	20	14	30
50	20	15	25
25	20	16	20
10	20	17	15
1	20	19	5

III.4.2. Análisis de regresión lineal y determinación de la CL₅₀

A partir de los promedios de supervivencia obtenidos, se procedió a realizar un análisis de regresión lineal para cada compuesto, correlacionando el logaritmo de la concentración con el porcentaje de mortalidad observado. En la **Figura 25** se presentan las curvas dosis-respuesta, las cuales permiten visualizar la sensibilidad del modelo biológico ante cada compuesto final de la línea KSC. La pendiente representa la potencia o velocidad de respuesta del tratamiento.

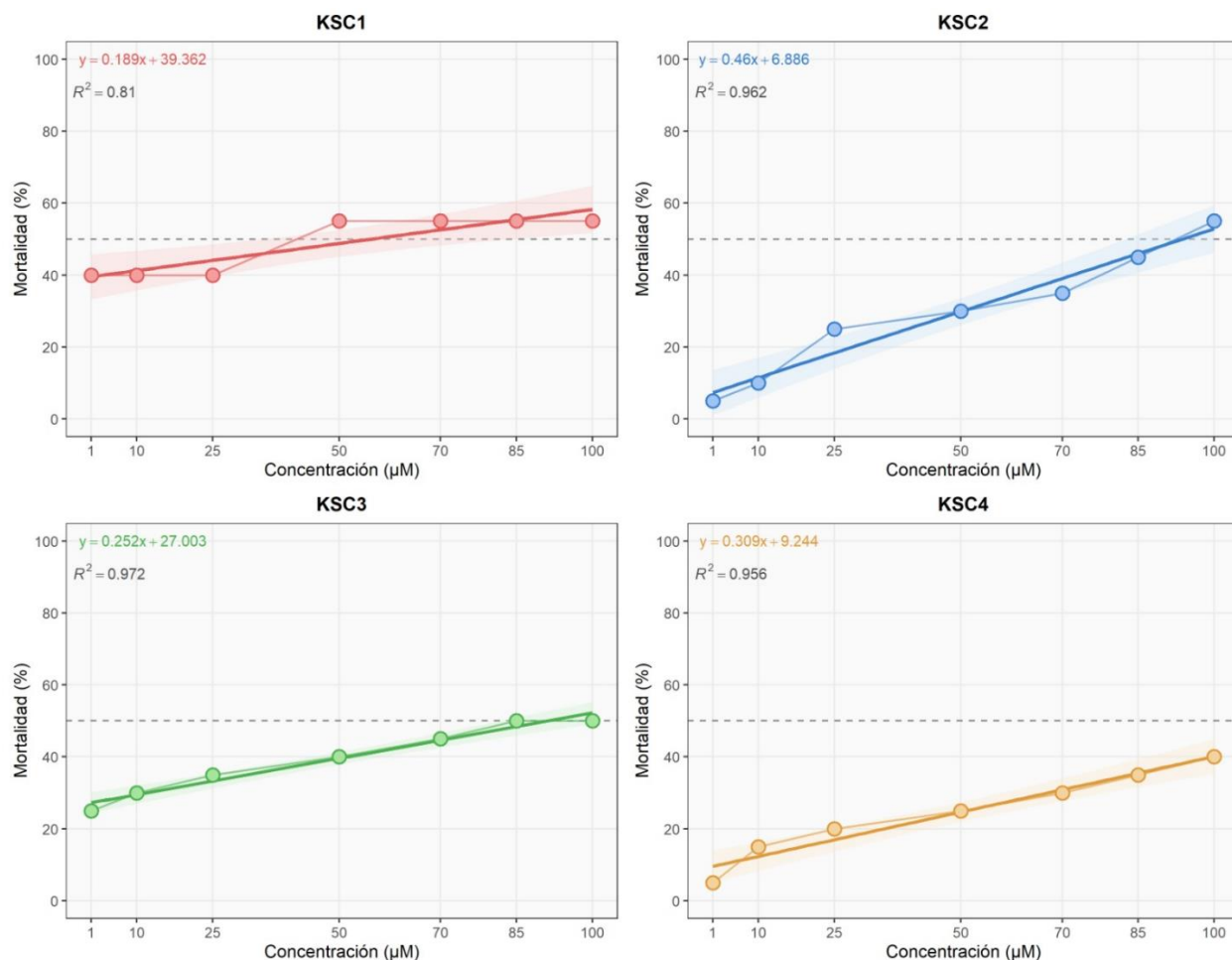


Figura 25. Curvas de citotoxicidad (% Mortalidad vs. Concentración) para los cuatro compuestos finales de KSC. Los paneles del A-D corresponden a KSC 1-4, respectivamente. Las líneas discontinuas representan las regresiones lineales; las ecuaciones de la recta y los valores de R² se muestran en cada panel.

III.4.3. Clasificación cualitativa de la toxicidad

Los valores de CL₅₀ se transformaron en Unidades de Toxicidad (UT) para facilitar su categorización cualitativa. Siguiendo el sistema de clasificación de (Arcos et al., 2024), se determinaron los niveles de riesgo biológico para la serie completa. Estos parámetros toxicológicos finales, que integran la potencia y el perfil de seguridad de los compuestos KSC 1-4, se resumen en la **Tabla 7**.

Se calcularon las UT para cada compuesto probado, cuyo valor se calcula a partir de la CL₅₀, con la siguiente formula:

$$UT = \left(\frac{1}{CL_{50}} \right) \times 100$$

Tabla 7. Sistema de clasificación de toxicidad basada en unidades de toxicidad.

Clasificación de la toxicidad en base a las unidades de toxicidad	
Clasificación	Unidades de toxicidad
Muy toxico	>4
Toxico	2-4
Moderadamente toxico	1.33-1.99
Ligeramente toxico	<1.33

De acuerdo con la tabla anterior, podemos clasificar los cuatro compuestos finales de acuerdo con su UT:

Tabla 8. Parámetros toxicológicos (CL₅₀ y UT) de los compuestos finales KSC 1-4 evaluados en el modelo de *Artemia salina*.

Clasificación de la toxicidad de los compuestos finales KSC 1-4.			
Compuesto final	CL ₅₀ (μM)	UT	Toxicidad
KSC 1	56.28	1.776	Moderadamente toxico
KSC 2	93.76	1.066	Ligeramente toxico
KSC 3	91.22	1.096	Ligeramente toxico
KSC 4	131.98	0.757	Ligeramente toxico

Como se observa en la **Tabla 8**, existe una relación inversamente proporcional entre el CL₅₀ y las unidades de toxicidad (UT). El compuesto KSC 4 destacó por presentar el perfil más seguro de la serie (CL₅₀ = 131.98μM; UT = 0.757), clasificándose como ligeramente tóxico. Por el contrario, el KSC 1 mostró una toxicidad moderada con el valor de CL₅₀ más bajo (56.28μM), lo que sugiere que las modificaciones estructurales en los compuestos 2, 3 y 4 favorecieron una disminución en la reactividad biológica no deseada en este modelo.

La implementación del bioensayo con *Artemia salina* en esta investigación es fundamental para establecer el perfil de seguridad preliminar de los compuestos KSC 1-4 debido a su alta sensibilidad a una amplia gama de sustancias químicas y su capacidad para ofrecer resultados reproducibles en periodos cortos de tiempo. La importancia de utilizar este modelo biológico radica en su capacidad para actuar como un sistema de tamizaje (*screening*) de bajo costo, alta rapidez y gran reproducibilidad, permitiendo evaluar la toxicidad aguda de nuevos candidatos a fármacos antes de proceder a ensayos *in vitro* o *in vivo* más complejos. Su uso está respaldado por estándares internacionales que destacan su precisión y su alineación con los principios bioéticos de reducción y reemplazo en la experimentación con vertebrados (Arcos et al., 2024).

En este estudio se utilizaron nauplios en estadios Instar II/III debido a que en esta etapa el organismo comienza a ingerir alimento del medio externo, lo que garantiza que los compuestos KSC sean absorbidos de manera sistémica y no solo por contacto cuticular. Además, su alta tasa metabólica los hace especialmente susceptibles a xenobióticos, permitiendo identificar incluso niveles de toxicidad ligera, como los observados en los compuestos KSC 2, 3 y 4.

III.5 CONCLUSIONES

La evaluación de la toxicidad aguda en el modelo biológico *Artemia salina* permitió determinar el perfil de seguridad de los compuestos sintetizados KSC 1-4, demostrando una relación dosis-respuesta clara en todos los casos. Los resultados revelan una variabilidad significativa en la biocompatibilidad de la serie:

- El compuesto KSC 4 se identifica como el candidato más prometedor desde la perspectiva toxicológica. Presentó la CL_{50} más alta (131.98 μM) y el valor de UT más bajo (0.757), lo que lo sitúa dentro de la categoría de "Ligeramente tóxico".
- Los compuestos KSC 2, 3 y 4 exhibieron niveles de toxicidad ligera.
- El KSC 1 resultó ser el agente con una citotoxicidad moderada con una CL_{50} de 56.28 μM , mientras que los compuestos KSC 2 y KSC 3 mostraron perfiles intermedios muy similares entre sí (93.76 μM y 91.22 μM , respectivamente).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que las modificaciones estructurales realizadas en el diseño del KSC 4 favorecieron una reducción en la toxicidad inespecífica, posicionándolo como el candidato con potencial para avanzar a ensayos de actividad biológica en modelos de receptores PPAR γ y AT1.

III.6 PARTE EXPERIMENTAL

Los huevecillos de *Artemia salina* se adquirieron de ALL AQUARIA, Bulk free supply #212246, y se incubaron en una solución de sal marina al 1.7% p/v declarada, durante 48 horas bajo condiciones de iluminación y temperatura (28°C) constante. Tras la eclosión, los nauplios se transfirieron a placas de 24 pocillos de 2 mL que contenían solución salina. Se añadieron alícuotas de los compuestos KSC 1-4 a partir de soluciones madre, obteniendo concentraciones finales de 1, 10, 25, 50, 70, 85 y 100 μM .

Los nauplios muertos se contabilizaron tras 24 h de exposición. Los experimentos se realizaron por triplicado con 20 nauplios por pocillo, utilizando un grupo control en condiciones idénticas, pero sin la presencia de los compuestos de estudio. El porcentaje de mortalidad se determinó para cada concentración y los datos fueron procesados mediante el software Microsoft Excel®. El valor de CL_{50} se calculó a partir de la ecuación de la recta obtenida por el análisis de regresión lineal de las curvas de dosis-respuesta (% Mortalidad vs. Concentración).

Conclusiones generales

Viabilidad de la ruta sintética convergente: Se demostró experimentalmente la eficiencia y reproducibilidad de la metodología sintética de dos etapas desarrollada en el laboratorio de Química Farmacéutica para la obtención de las *twin drugs* de la serie KSC (1-4). Esta metodología permitió optimizar los tiempos de reacción y aislar los productos intermedios y finales con un alto grado de pureza mediante protocolos basados en lavados sucesivos con disolventes específicos, evitando la necesidad de purificaciones cromatográficas complejas y manteniendo rendimientos globales altamente competitivos.

Éxito en la funcionalización nucleofílica (Etapa 1): La síntesis de los intermediarios (KSC 5-8) se consolidó de manera efectiva a través de la reacción de Williamson, empleando K_2CO_3 . Se obtuvieron sólidos blancos, con rendimientos puros que oscilaron entre el 68.61% y el 89.55%, donde el impedimento estérico del sustituyente metilo ramificado en el precursor de KSC 7 ralentizó significativamente la velocidad de la sustitución nucleofílica bimolecular, requiriendo un periodo prolongado de 110 horas para completar su conversión.

Eficacia de la hidrólisis básica simultánea (Etapa 2): Se logró la transformación de los intermediarios en las *twin drugs* finales (KSC 1-4) mediante una hidrólisis básica utilizando KOH en una mezcla EtOH/H₂O a reflujo, permitiendo la ruptura simultánea de los grupos éster y nitrilo. El aislamiento de los diácidos carboxílicos libres mediante precipitación por acidificación controlada con HCl (pH 3) generó rendimientos puros de hasta el 74.77%, manifestando un cambio macroscópico contundente en sus propiedades térmicas, al transicionar de puntos de fusión en los intermediarios, a temperaturas de descomposición elevadas (237 °C a >300 °C) en los productos finales debido a la formación de redes intermoleculares estables de puentes de hidrógeno en el cristal.

Certeza estructural alternativa y compromiso analítico: La conectividad molecular, identidad y pureza de los intermediarios sólidos (KSC 5-8) fueron corroboradas mediante espectroscopía de RMN (¹H y ¹³C) y experimentos bidimensionales avanzados (COSY, HSQC y HMBG) a 700MHz. Ante la imposibilidad técnica externa de obtener los espectros de RMN para los productos finales, se optó por continuar los experimentos de docking molecular con los resultados de TLC y puntos de descomposición de las moléculas.

Validación matemática del modelado computacional: El protocolo bioinformático de acoplamiento molecular fue validado con un alto grado de precisión matemática mediante el re-acoplamiento de los ligandos co-cristalizados de referencia en las estructuras de Protein Data Bank (5Y2O y 4YAY). Los valores ultra bajos de desviación de la raíz cuadrada media obtenidos (RMSD = 0.458 Å para pioglitazona en PPAR γ y RMSD = 0.205 Å para olmesartán en AT1) se ubicaron drásticamente por debajo del umbral estándar de aceptación (< 2.0 Å), confirmando la robustez de las funciones de puntuación y la configuración espacial de las cajas de inclusión empleadas.

Afinidad termodinámica y espontaneidad de los ligandos híbridos: Los ensayos computacionales demostraron que todos los miembros de la serie KSC (1-4) interactúan de forma termodinámicamente favorable con ambos blancos farmacológicos, devolviendo valores negativos de energía libre de Gibbs que respaldan la espontaneidad de la unión. Los diagramas bidimensionales diseccionaron el reconocimiento molecular a nivel microscópico, revelando un anclaje polar eficiente mediante puentes de hidrógeno con Ser-289, His-323 y Tyr-473 en el receptor nuclear PPAR γ , así como interacciones electrostáticas de tipo π -catión y puentes salinos

consistentes con el residuo crítico Arg-167 en el bolsillo hidrofóbico del receptor de membrana AT1.

KSC 4 como el candidato líder dual e idoneidad toxicológica: Al integrar de manera interdisciplinaria los resultados, el compuesto KSC 4 se consolidó como el candidato más prometedor de todo el proyecto de investigación. En el modelado bioinformático, exhibió la mayor afinidad teórica dual de la serie ($\Delta G = -10.32$ kcal/mol en PPAR γ y $\Delta G = -9.21$ kcal/mol en AT1), optimizando los contactos en la región esencial del bolsillo receptor y evitando interacciones repulsivas de tipo aceptor-aceptor presentes en fármacos de referencia.

Biocompatibilidad y amplio margen de seguridad biológica: El tamizaje de toxicidad aguda en el modelo biológico *Artemia salina* evidenció una respuesta biológica dependiente de la dosis y validó el perfil de seguridad de la serie KSC, arrojando valores de CL₅₀ significativamente superiores al límite crítico de citotoxicidad inespecífica (10 μ M). Mientras que KSC 1 mostró una toxicidad moderada (CL₅₀ = 56.28 μ M), el compuesto líder KSC 4 ratificó su excelente biocompatibilidad al registrar la menor reactividad de la serie, con una CL₅₀ sobresaliente de 131.98 μ M y una UT de 0.757, posicionándose firmemente dentro de la categoría de 'Ligeramente tóxico'. Estos hallazgos demuestran que las modificaciones estructurales de KSC 4 minimizan el riesgo biológico sistémico y otorgan una amplia ventana terapéutica, cumpliendo exitosamente con el objetivo general y sentando las bases científicas para su posterior evaluación biológica avanzada.

Perspectivas

Completar la caracterización estructural por RMN y espectrometría de masas: Como prioridad analítica a corto plazo, una vez que las condiciones instrumentales externas lo permitan, se gestionará la adquisición prioritaria de los espectros de RMN (^1H ^{13}C y espectros en 2D) para los productos finales KSC 1-4, de igual forma, obtener los pesos moleculares tanto de los intermediarios como de los productos finales.

Ensayos de afinidad y actividad biológica *in vitro* con blancos aislados: Con la finalidad de transicionar de las predicciones termodinámicas arrojadas por las simulaciones de acoplamiento molecular, hacia la validación biológica real, utilizando receptores PPAR γ y membranas celulares con expresión estable del receptor AT1. Esto permitirá cuantificar experimentalmente las constantes de afinidad e inhibición de la serie, confirmando el balance de potencia dual predicho computacionalmente.

Estudios preliminares de estabilidad metabólica y farmacocinética *in silico* e *in vitro*: Se tiene planificado evaluar el perfil ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción).

Escalamiento y validación *in vivo* en modelos biomédicos con ambas enfermedades: A largo plazo, los candidatos que ratifiquen un perfil dual equilibrado y una baja citotoxicidad avanzarán hacia fases de experimentación *in vivo* en modelos de roedores con comorbilidad de diabetes e hipertensión inducida. Esto permitirá medir simultáneamente la reducción de la presión arterial sistólica y la mejora en los índices de sensibilidad a la insulina, consolidando el valor terapéutico sinérgico de esta propuesta de diseño molecular.

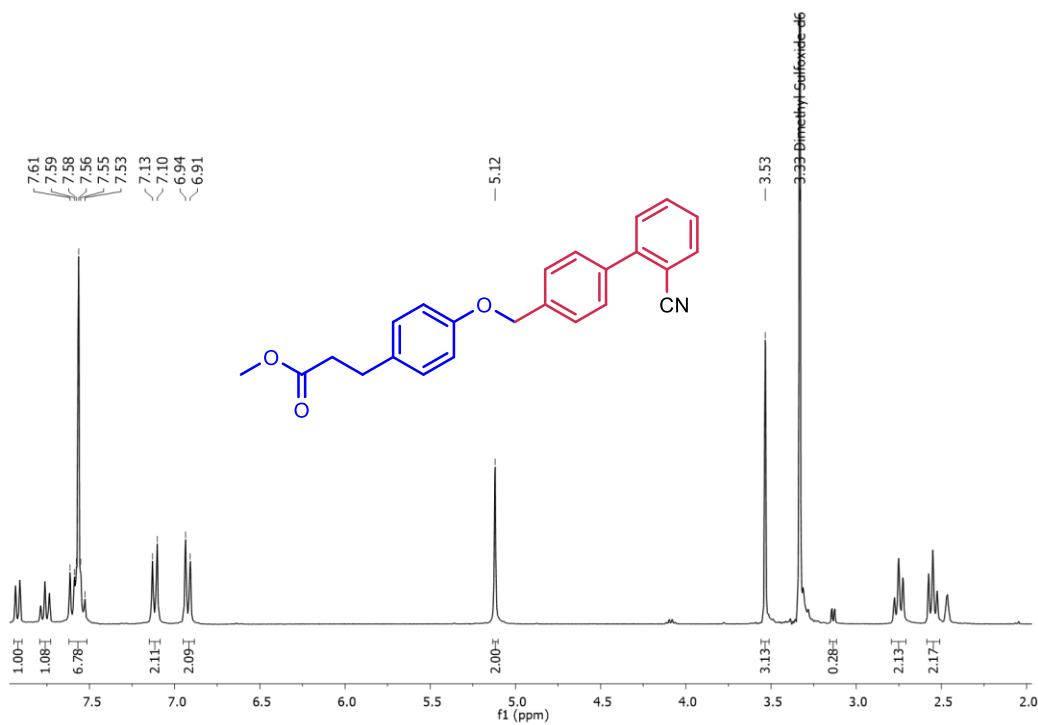
Referencias

- Cheung, B. M. (2006). Therapeutic potential of angiotensin receptor blockers in hypertension. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 15(6), 625-635. <https://doi.org/10.1517/13543784.15.6.625>
- Claudio Viegas-Junior, Eliezer J. Barreiro, & Carlos Alberto Manssour Fraga. (2007). Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, 14(17), 1829-1852. <https://doi.org/10.2174/092986707781058805>
- Do Couto Maia, R., & Alberto Manssour Fraga, C. (2010). Discovery of Dual Chemotherapy Drug Candidates Designed by Molecular Hybridization. *Current Enzyme Inhibition*, 6(4), 171-182. <https://doi.org/10.2174/157340810794578515>
- Guía práctica de tratamiento farmacológico en hipertensión arterial sistémica [Internet]. 1.^a ed. CENAPRECE; 2022 [citado 22 junio 2022]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/916018/Guia_Practica_de_HAS.pdf
- Heikkinen, S., Auwerx, J., & Argmann, C. (2007). PPAR γ in human and mouse physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(8), 999-1013. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2007.03.006>
- Hidalgo-Figueroa, S., Rodríguez-Luévano, A., Almanza-Pérez, J. C., Giacomán-Martínez, A., Ortiz-Andrade, R., León-Rivera, I., & Navarrete-Vázquez, G. (2021). Synthesis, molecular docking, dynamic simulation and pharmacological characterization of potent multifunctional agent (dual GPR40-PPAR γ agonist) for the treatment of experimental type 2 diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 907, 174244. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174244>
- Janani, C., & Ranjitha Kumari, B. D. (2015). PPAR gamma gene – A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 9(1), 46-50. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.015>
- Jia, G., & Sowers, J. R. (2021). Hypertension in Diabetes: An Update of Basic Mechanisms and Clinical Disease. *Hypertension*, 78(5), 1197-1205. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17981>
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., & McLaughlin, J. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45(05), 31-34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- Nicol, C., Adachi, M., Akiyama, T., & Gonzalez, F. (2005). PPAR γ In endothelial cells influences high fat diet-induced hypertension. *American Journal of Hypertension*, 18(4), 549-556. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2004.10.032>
- Okumu, M. O., Mbaria, J. M., Gikunju, J. K., Mbuthia, P. G., Madadi, V. O., Ochola, F. O., & Jepkorir, M. S. (2021). Artemia salina as an animal model for the preliminary evaluation of snake venom-induced toxicity. *Toxicon: X*, 12, 100082. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2021.100082>
- Petrie, J. R., Guzik, T. J., & Touyz, R. M. (2018). Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Canadian Journal of Cardiology*, 34(5), 575-584. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.12.005>

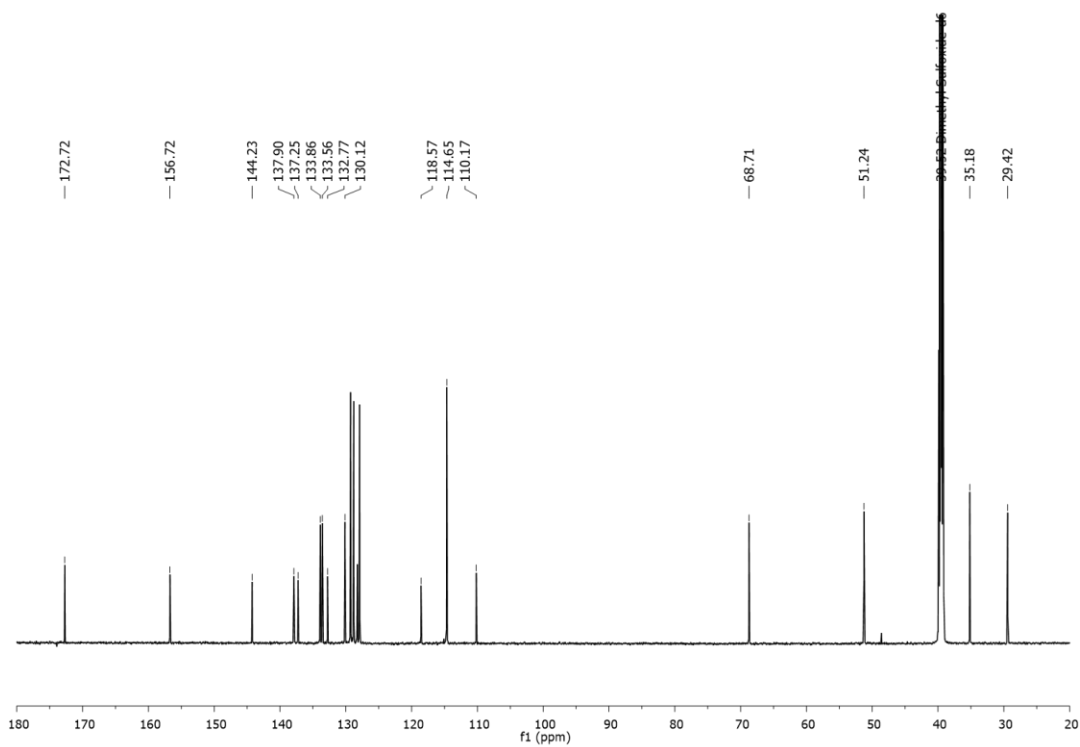
- Rodríguez-Luévano, A., Almanza-Pérez, J. C., Ortiz-Andrade, R., Lara-González, S., Santillán, R., Navarrete-Vázquez, G., Giacomán-Martínez, A., Lazzarini-Lechuga, R. C., Bautista, E., & Hidalgo-Figueroa, S. (2024). Discovery of Palindrome Dual PPAR γ -GPR40 Agonists for Treating Type 2 Diabetes. *ChemMedChem*, 19(24), e202400492. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202400492>
- Shang, J., & Kojetin, D. J. (2021). Structural mechanism underlying ligand binding and activation of PPAR γ . *Structure*, 29(9), 940-950.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2021.02.006>
- Simões, S. C., Balico-Silva, A. L., Parreiras-e-Silva, L. T., Bitencourt, A. L. B., Bouvier, M., & Costa-Neto, C. M. (2020). Signal Transduction Profiling of Angiotensin II Type 1 Receptor With Mutations Associated to Atrial Fibrillation in Humans. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 600132. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.600132>
- Šomlóová, Z. (2011). Secondary forms of hypertension, classification and common causes. *Cor et Vasa*, 53(8-9), 439-443. <https://doi.org/10.33678/cor.2011.111>
- Sorgeloos, P., Rémiche-Van Der Wielen, C., & Persoone, G. (1978). The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests—A critical analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2(3-4), 249-255. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(78\)80003-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(78)80003-7)
- Spasov, A. A., Yakovlev, D. S., & Brigadirova, A. A. (2017). Angiotensin AT1 Receptors and Their Ligands (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 51(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11094-017-1546-y>
- Usui, I., Fujisaka, S., Yamazaki, K., Takano, A., Murakami, S., Yamazaki, Y., Urakaze, M., Hachiya, H., Takata, M., Senda, S., Iwata, M., Satoh, A., Sasaoka, T., Ak, N. D., Temaru, R., & Kobayashi, M. (2007). Telmisartan reduced blood pressure and HOMA-IR with increasing plasma leptin level in hypertensive and type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77(2), 210-214. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2006.11.014>
- Valderrama Molina, M. A., & Tinjacá Benítez, D. A. (2025). *Artemia salina* bioassay as tool for determination of preliminary *Thunbergia alata* toxicity. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 54(2), 490-508. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n2.121161>
- Zingarelli, B., & Cook, J. A. (2005). PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR-?? IS A NEW THERAPEUTIC TARGET IN SEPSIS AND INFLAMMATION: *Shock*, 23(5), 393-399. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000160521.91363.88>

ANEXOS

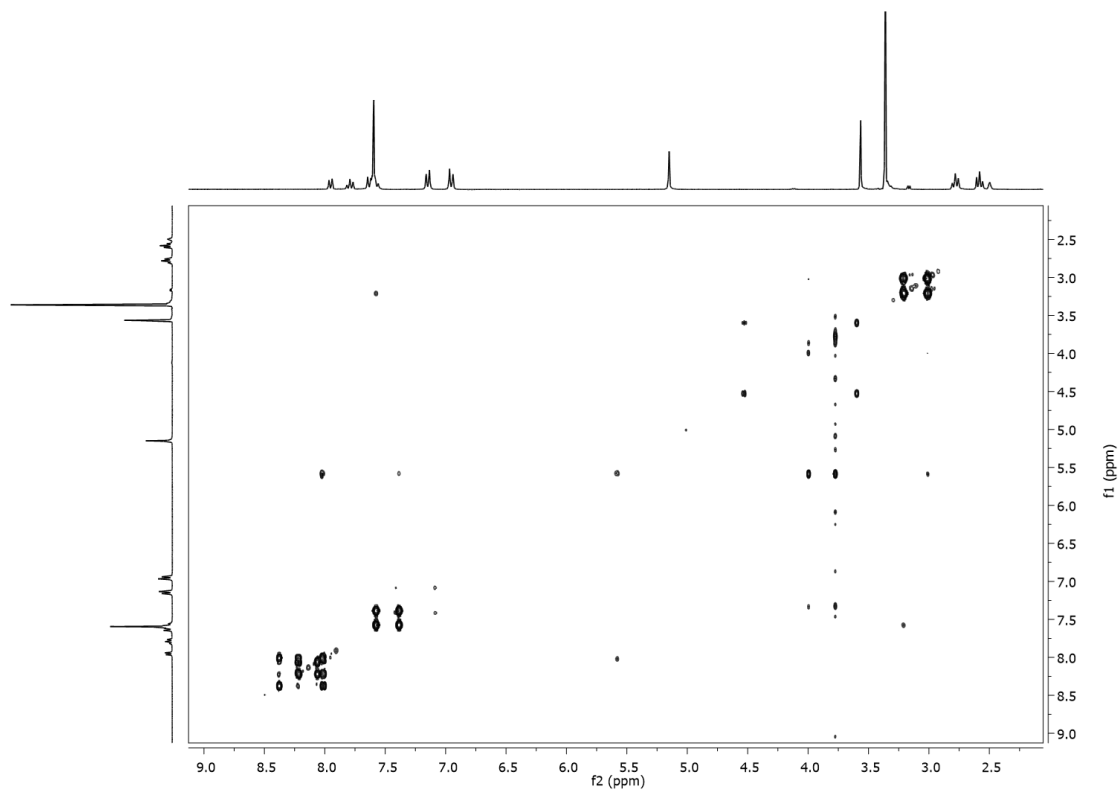
Espectros



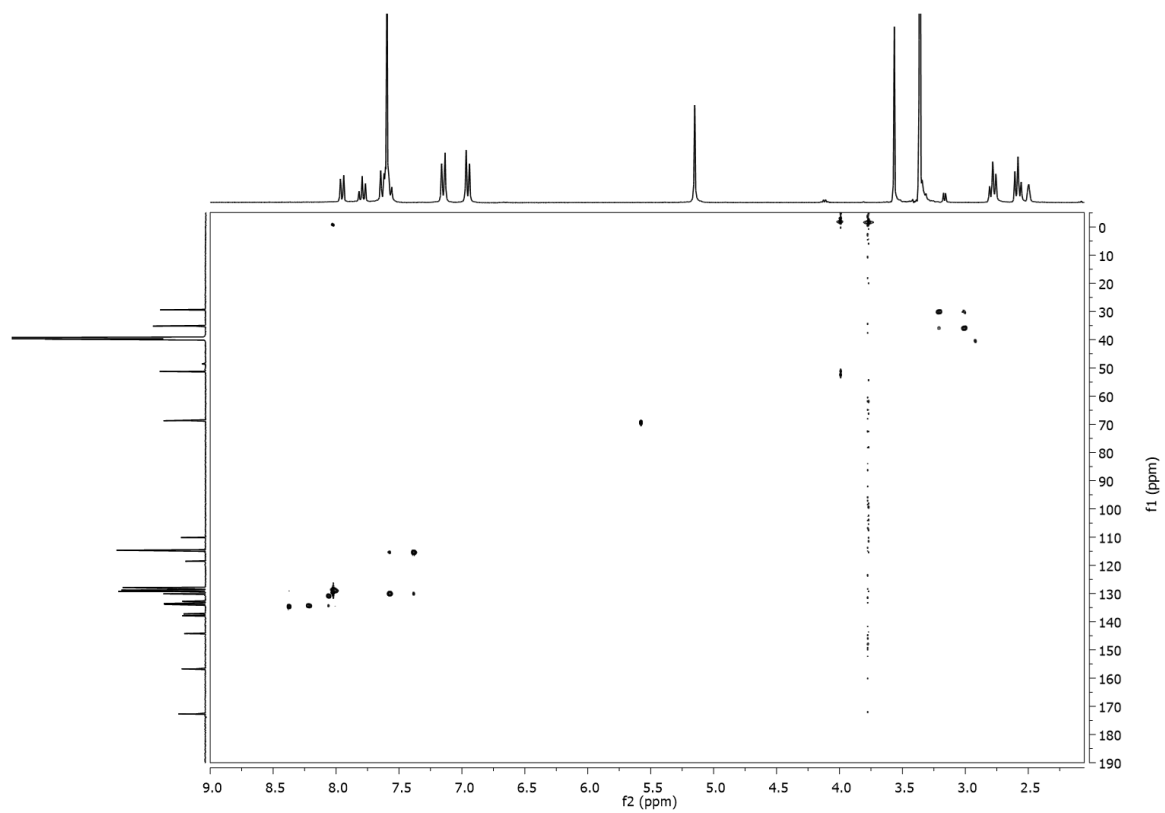
Espectro 1. Espectro de RMN ¹H 300 MHz del intermediario KSC5.



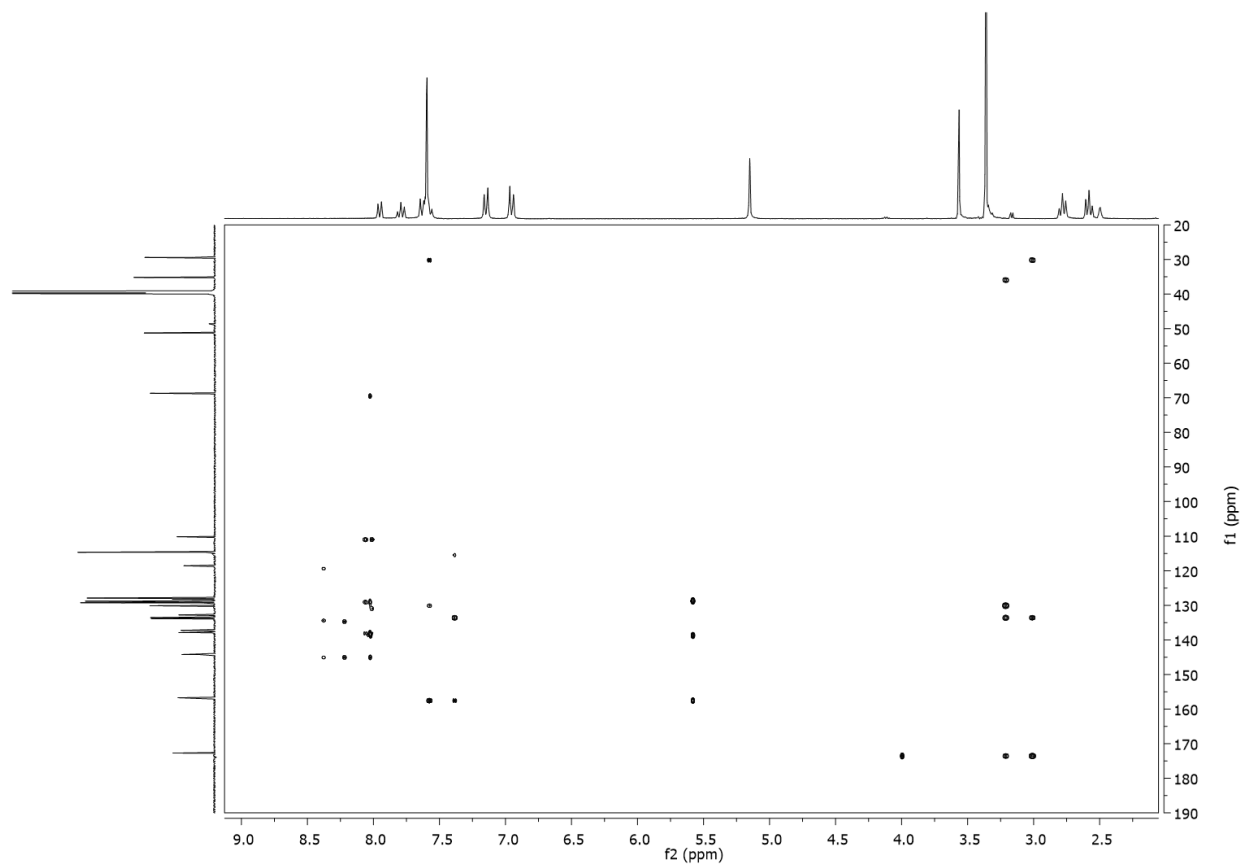
Espectro 2. Espectro de RMN ¹³C 700MHz del intermediario KSC5.



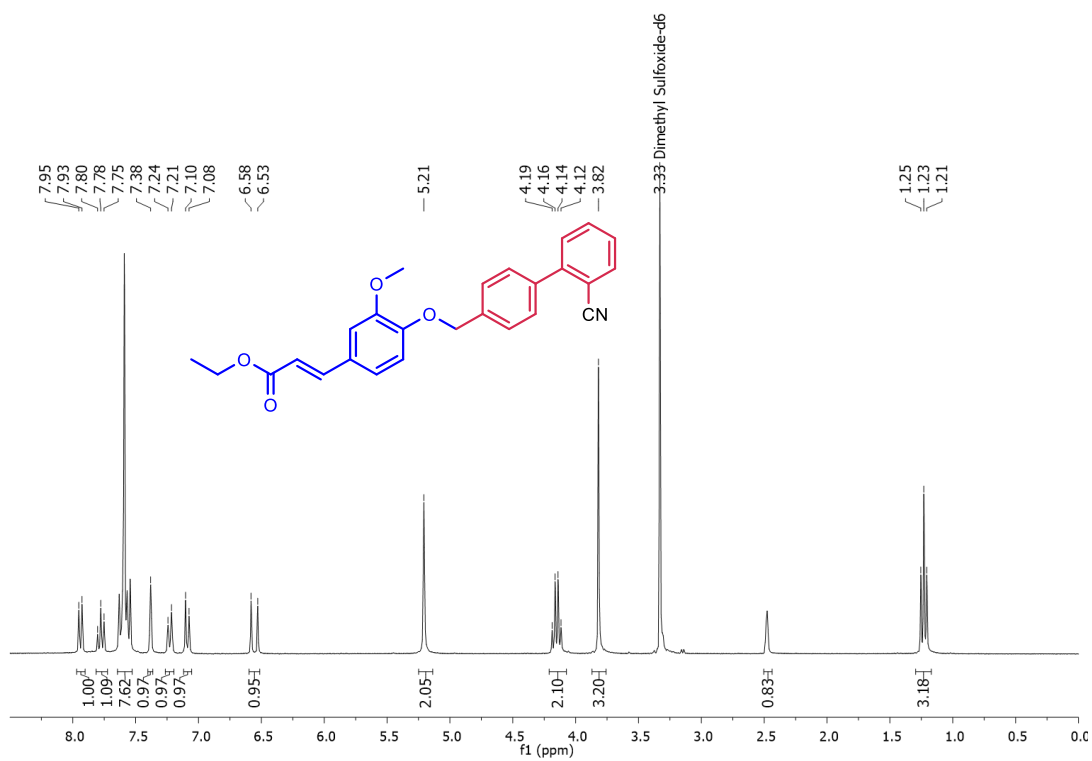
Espectro 3. Espectro de RMN COSY de intermediario KSC5.



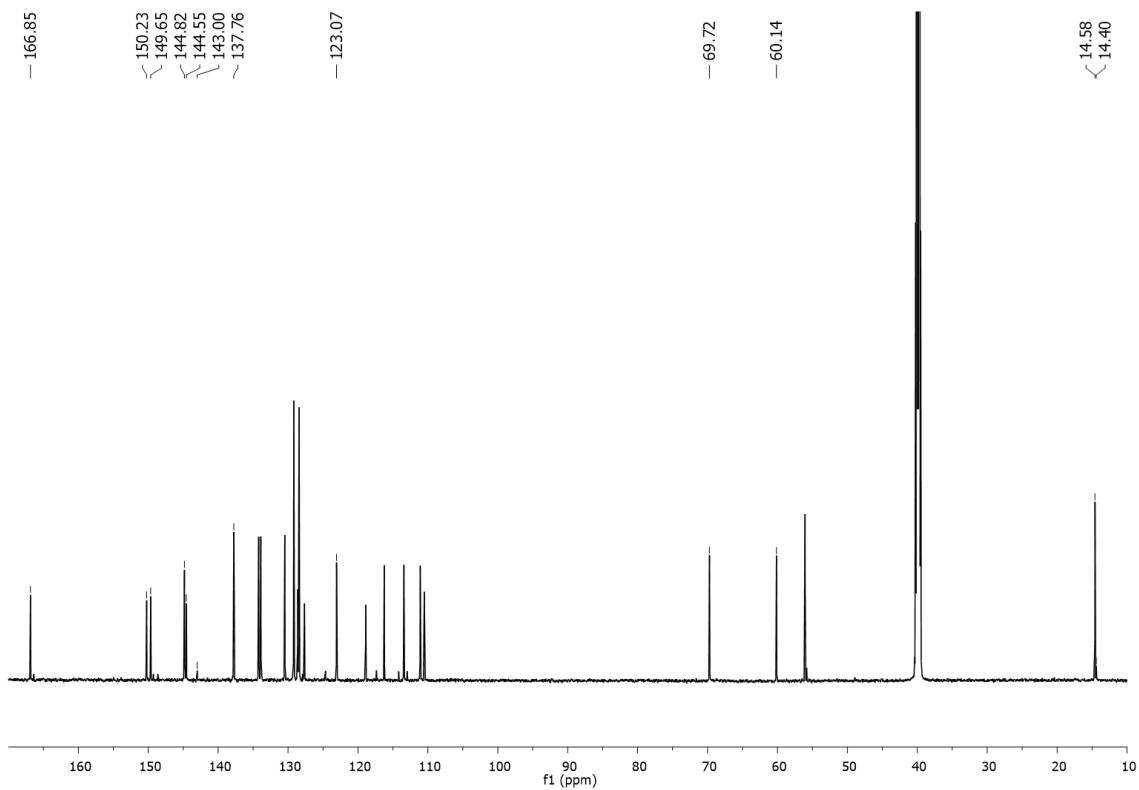
Espectro 4. Espectro de RMN HSQC de intermediario KSC5.



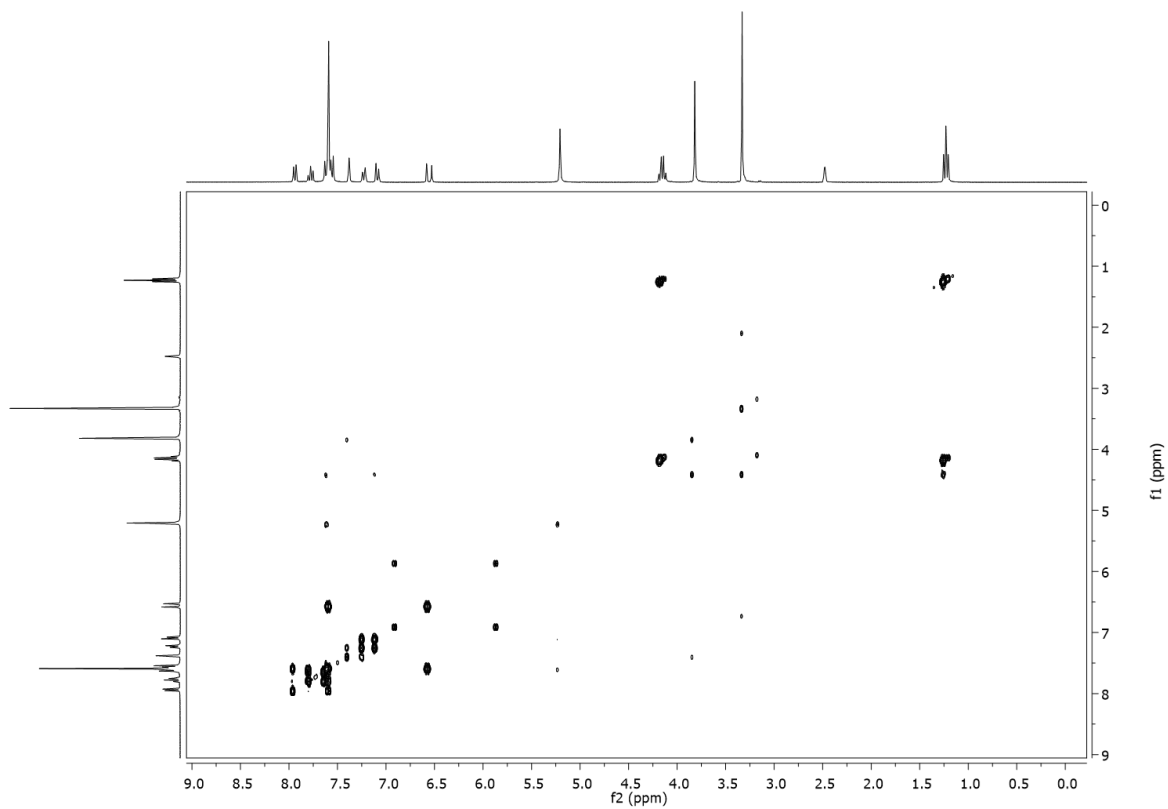
Espectro 5. Espectro de RMN HMBC del intermediario KSC5.



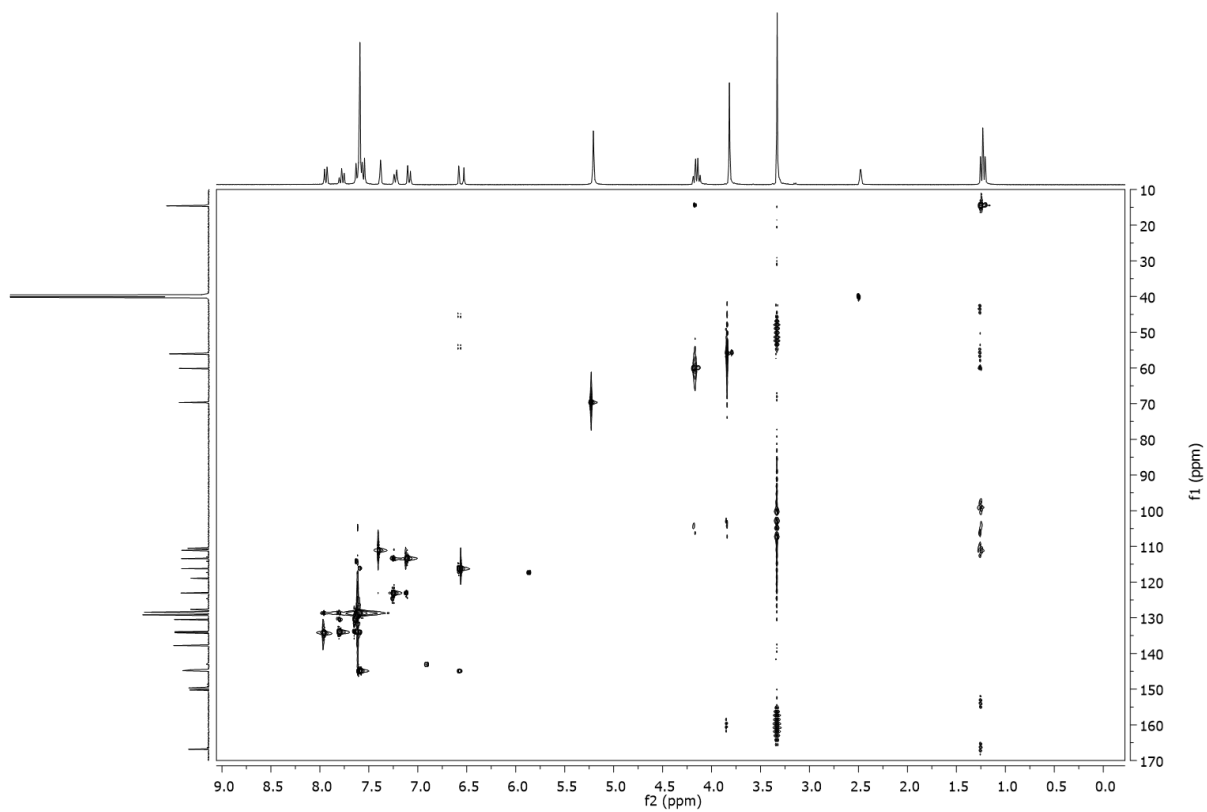
Espectro 6. Espectro de RMN ^1H 300MHz del intermediario KSC6.



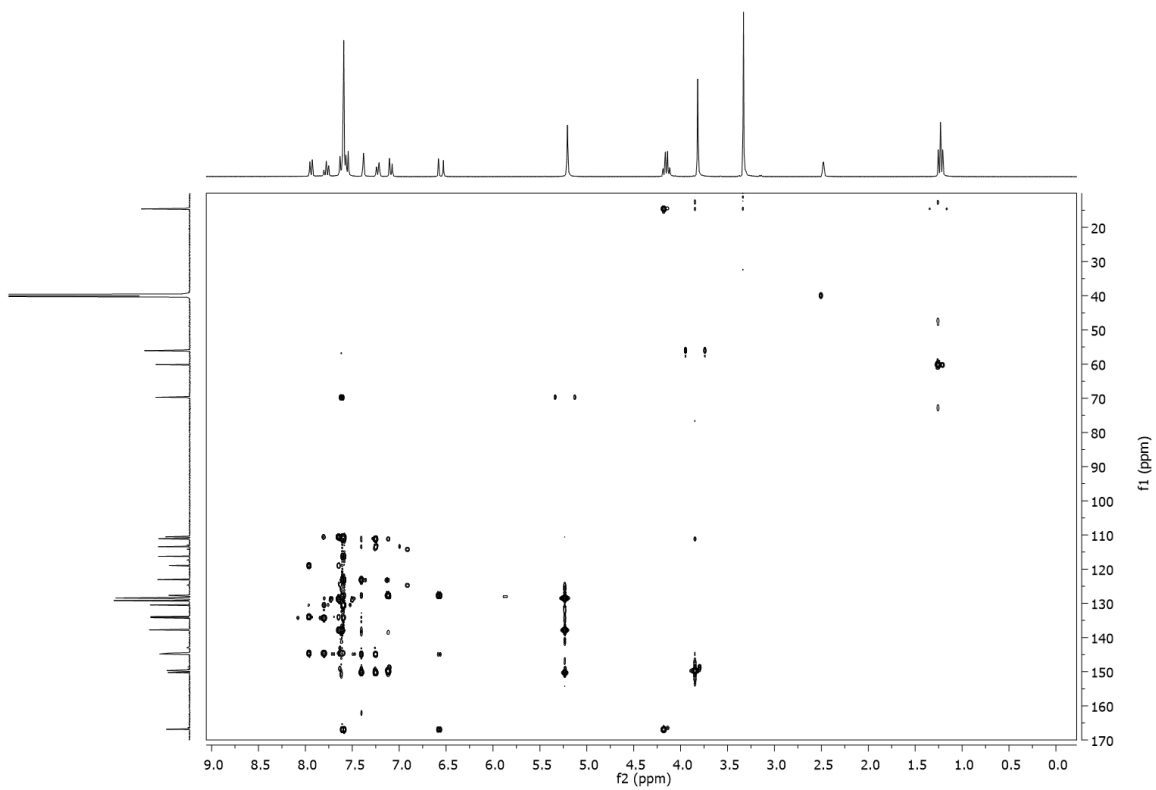
Espectro 7. Espectro de RMN ^{13}C 700MHz del intermediario KSC6.



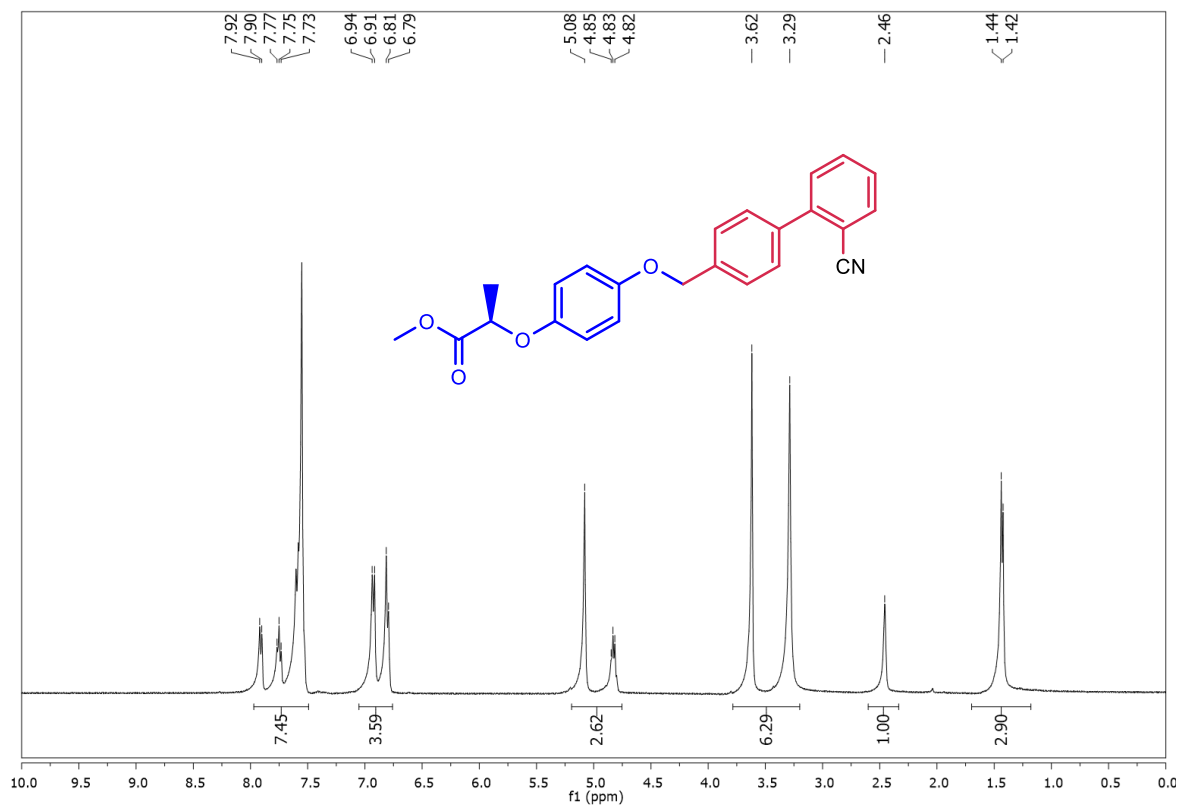
Espectro 8. Espectro de RMN COSY del intermediario KSC6.



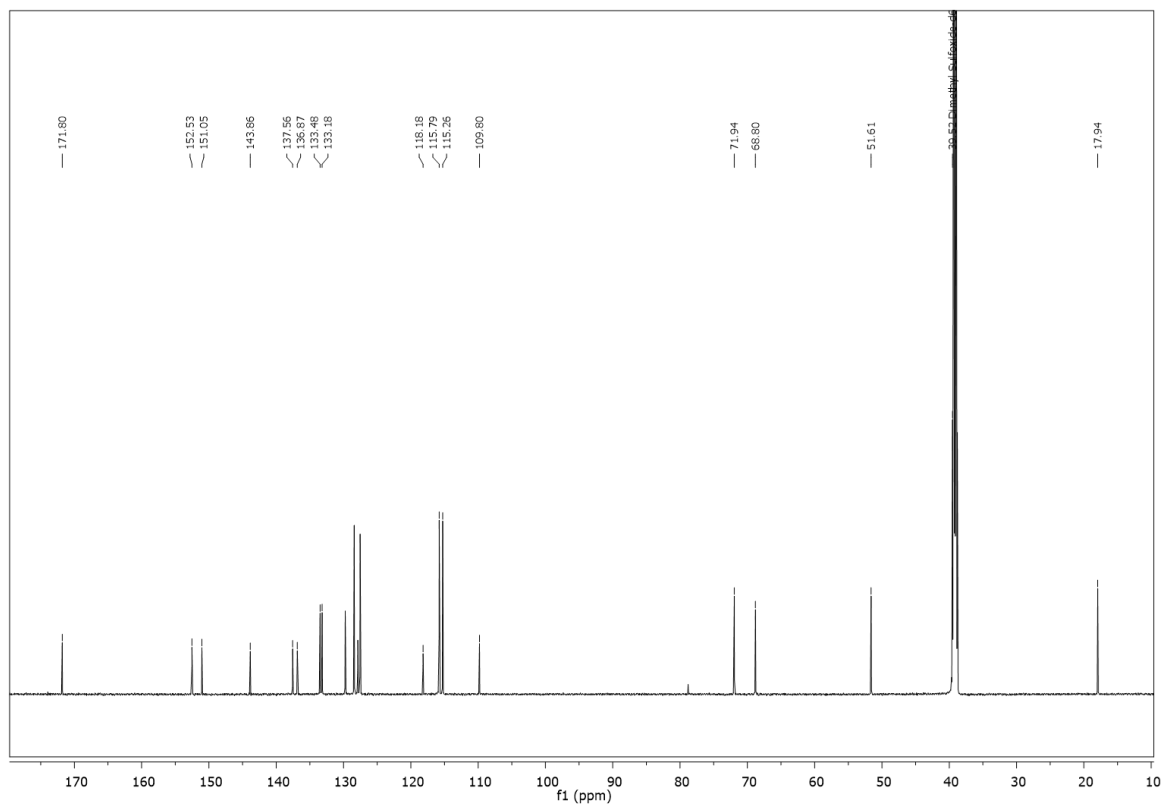
Espectro 9. Espectro de RMN HSQC del intermediario KSC6.



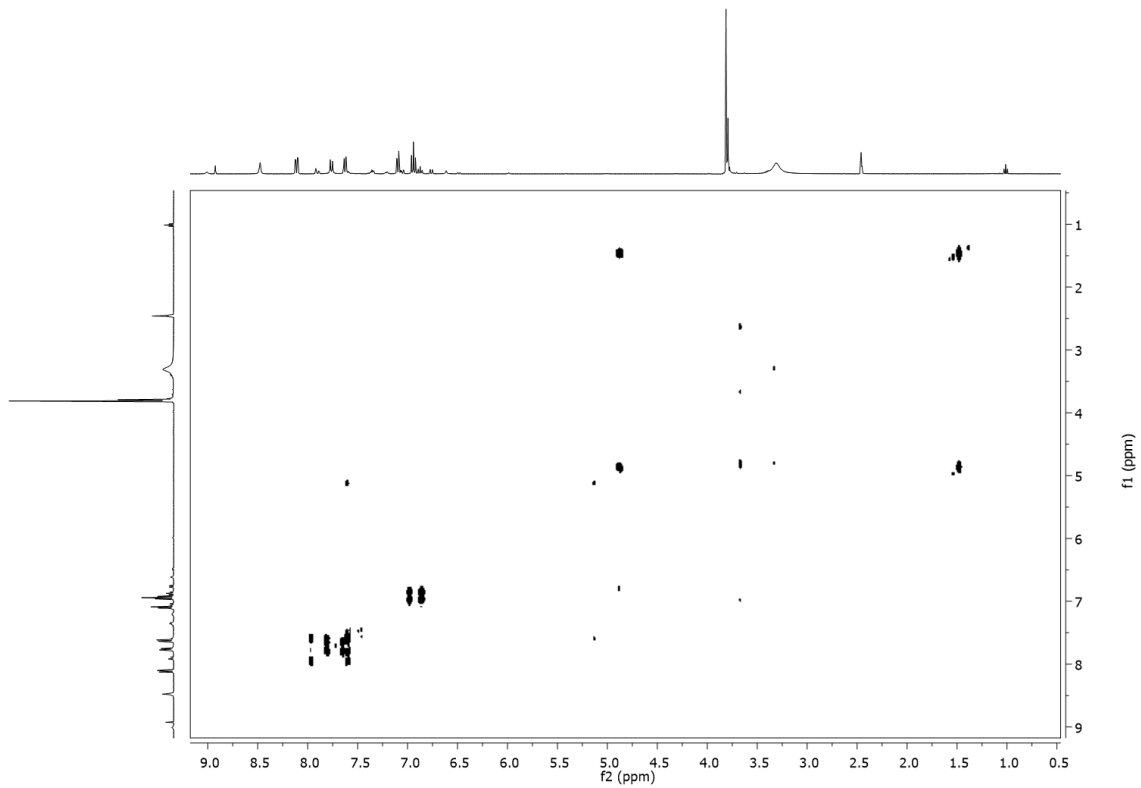
Espectro 10. Espectro de RMN HMBC del intermediario KSC6



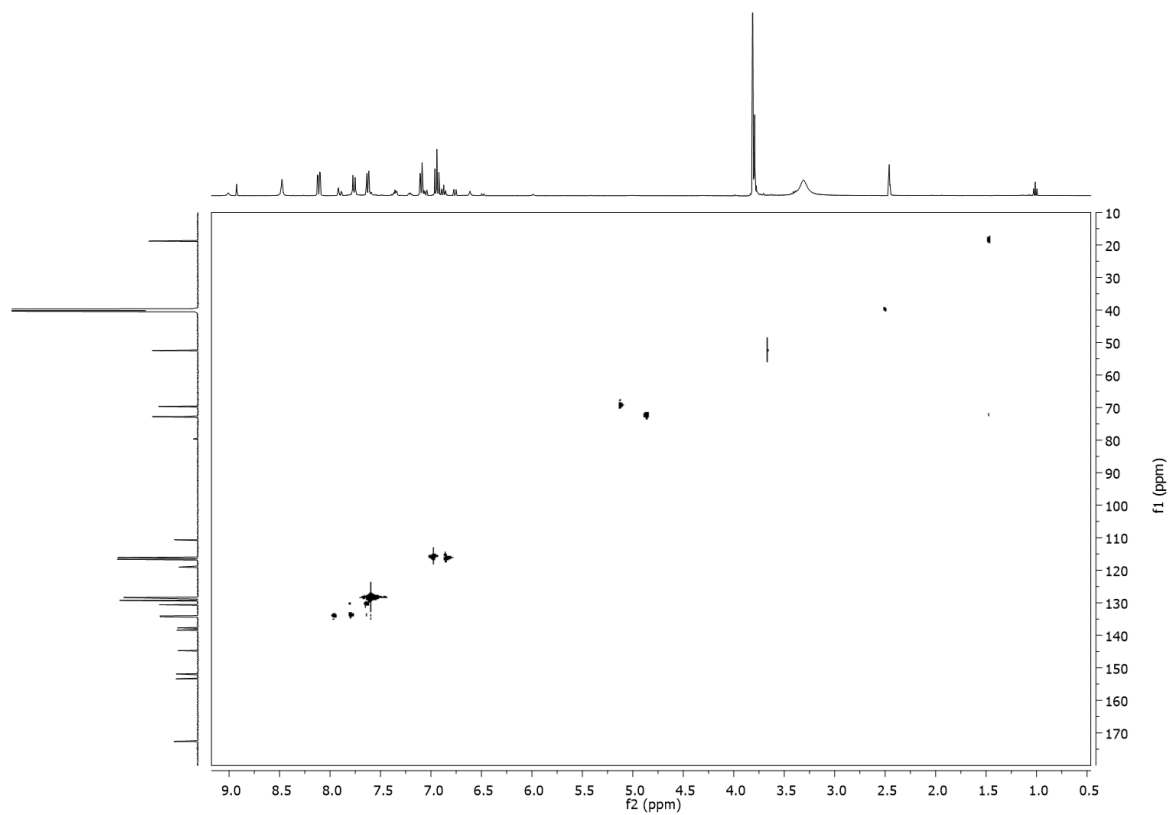
Espectro 11. Espectro de RMN de ^1H 300MHz del intermediario KSC7.



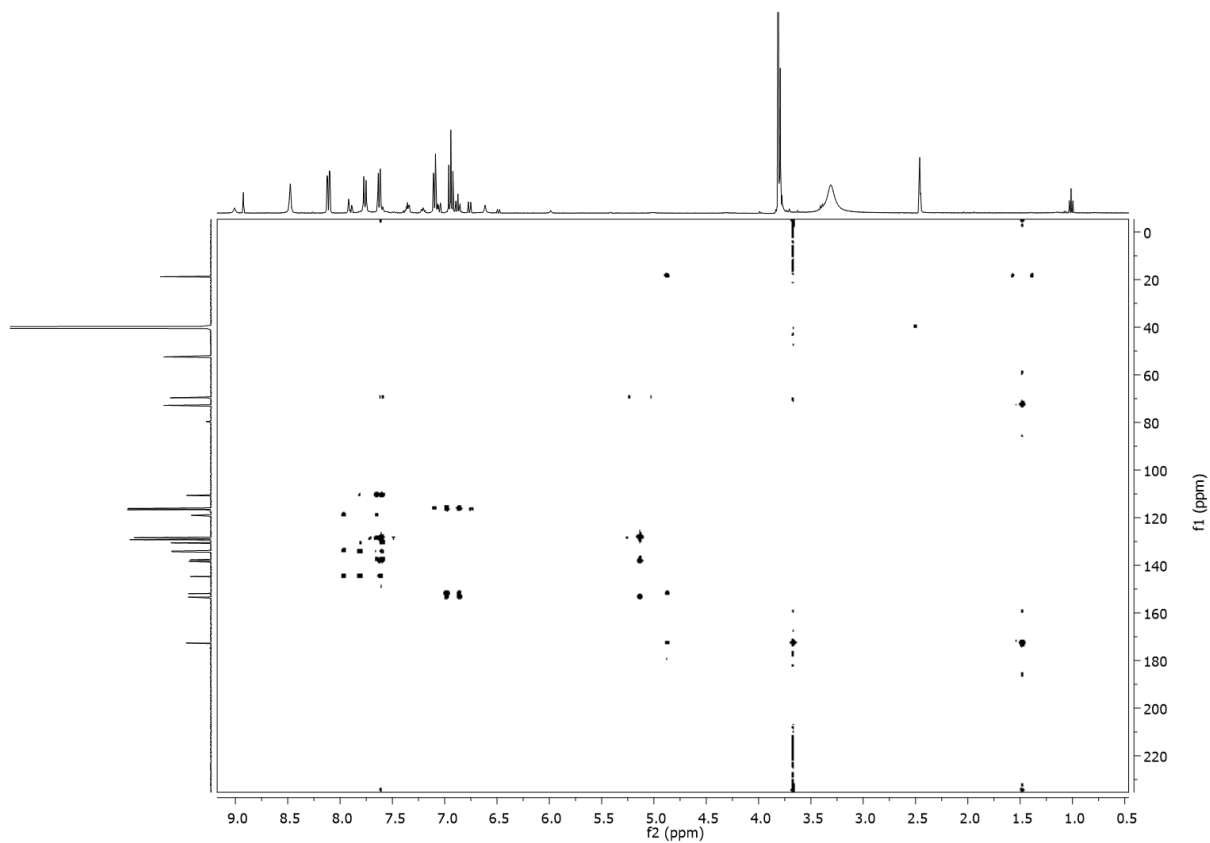
Espectro 12. Espectro de RMN ^{13}C 700MHz del intermediario KSC7.



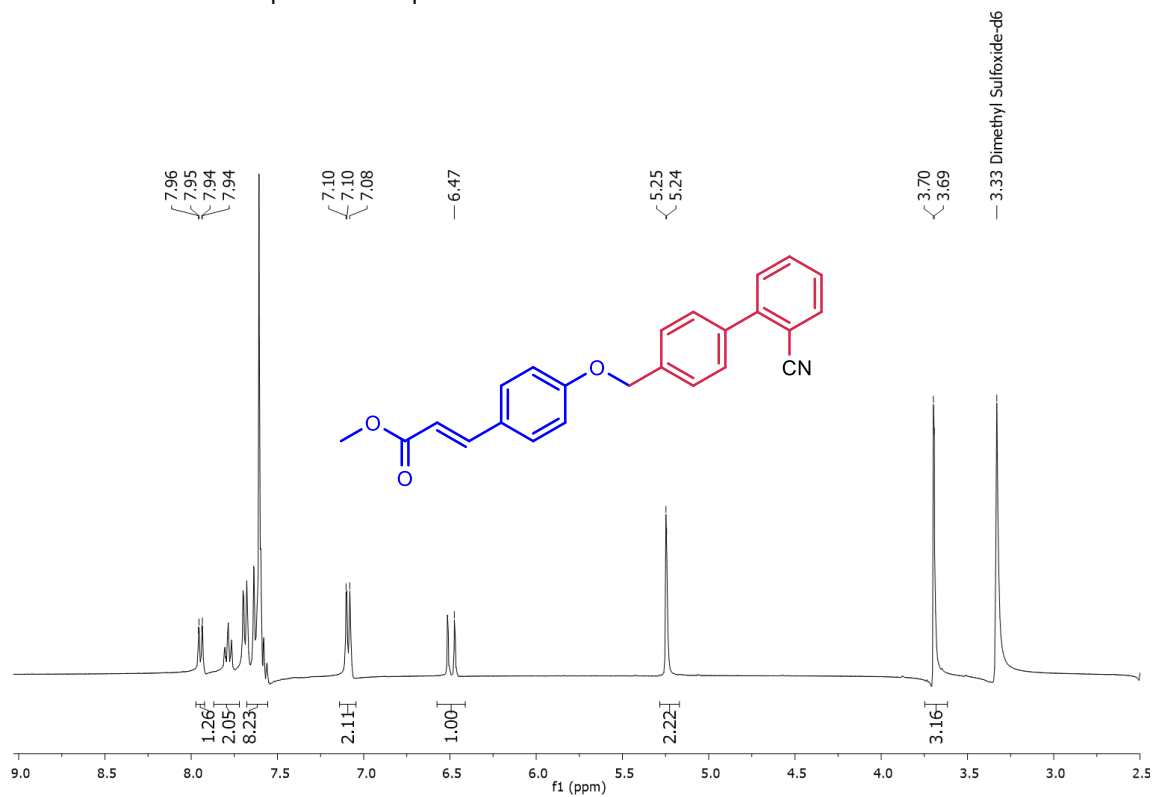
Espectro 13. Espectro de RMN COSY del intermediario KSC7.



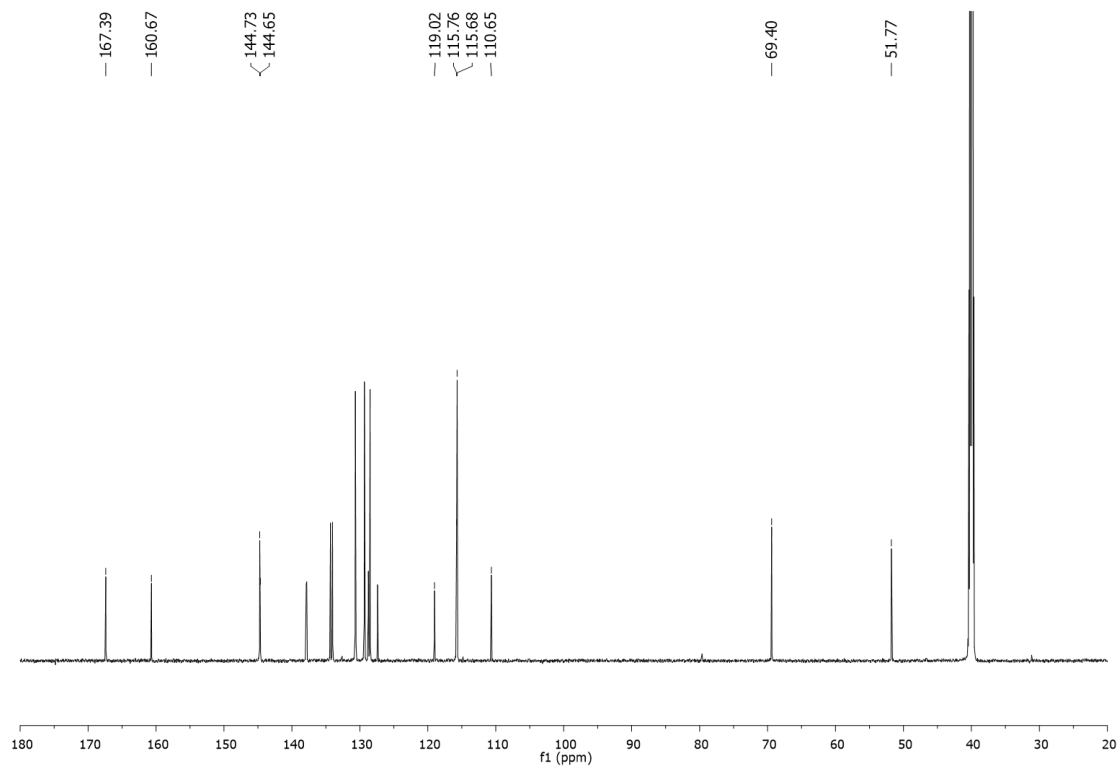
Espectro 14. Espectro de RMN HSQC del intermediario KSC7



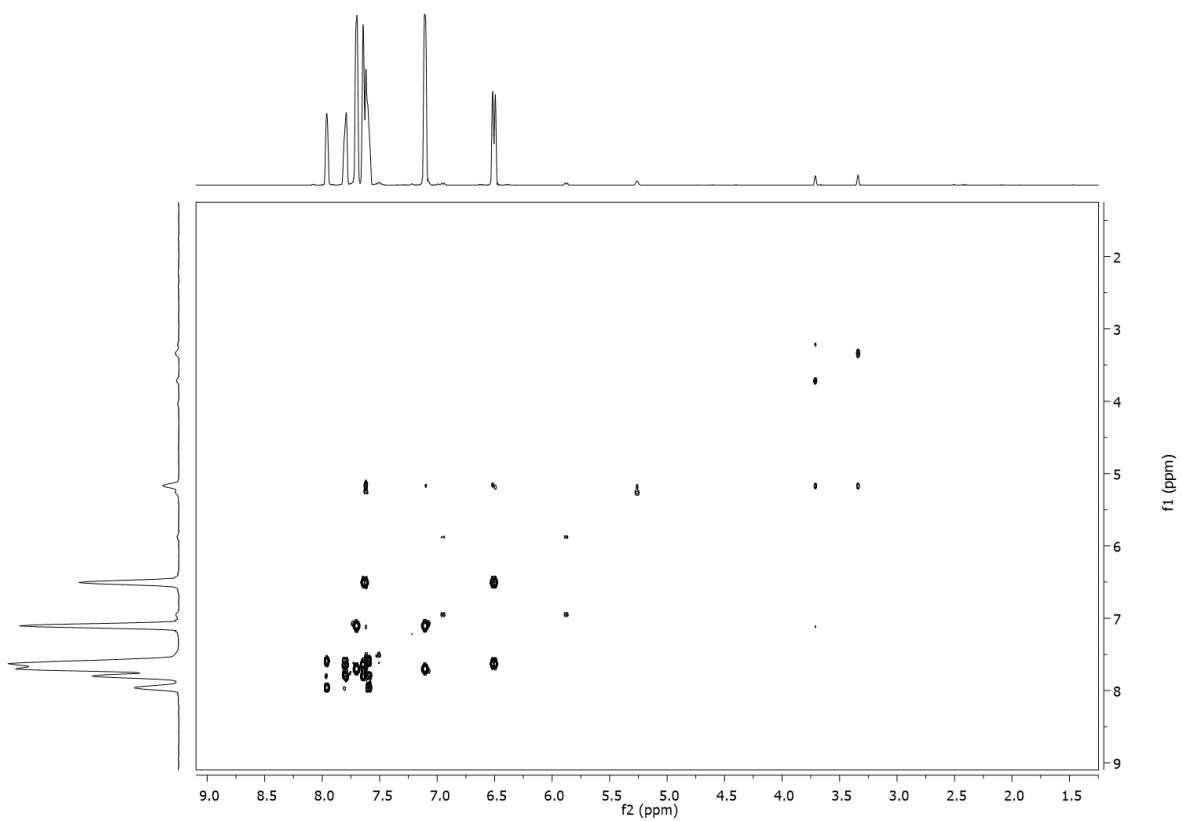
Espectro 15. Espectro de RMN HMBC del intermediario KSC7.



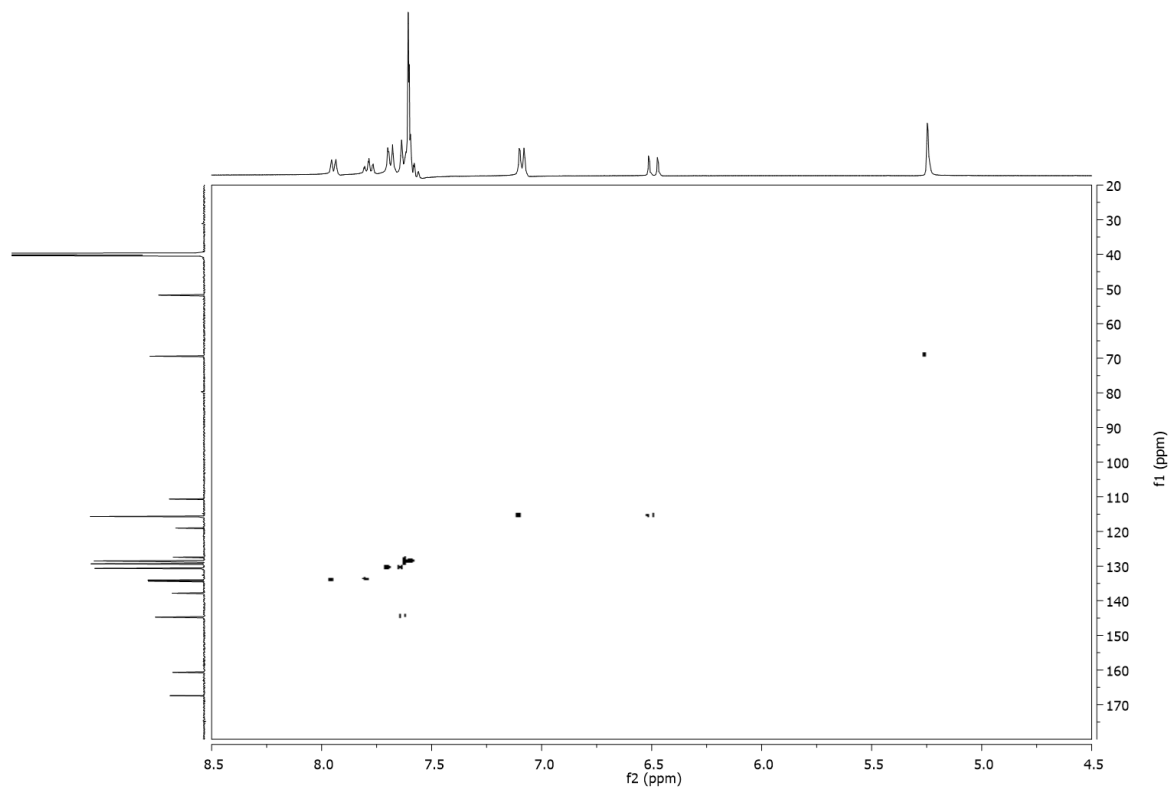
Espectro 16. Espectro de RMN ^1H 300MHz del intermediario KSC8.



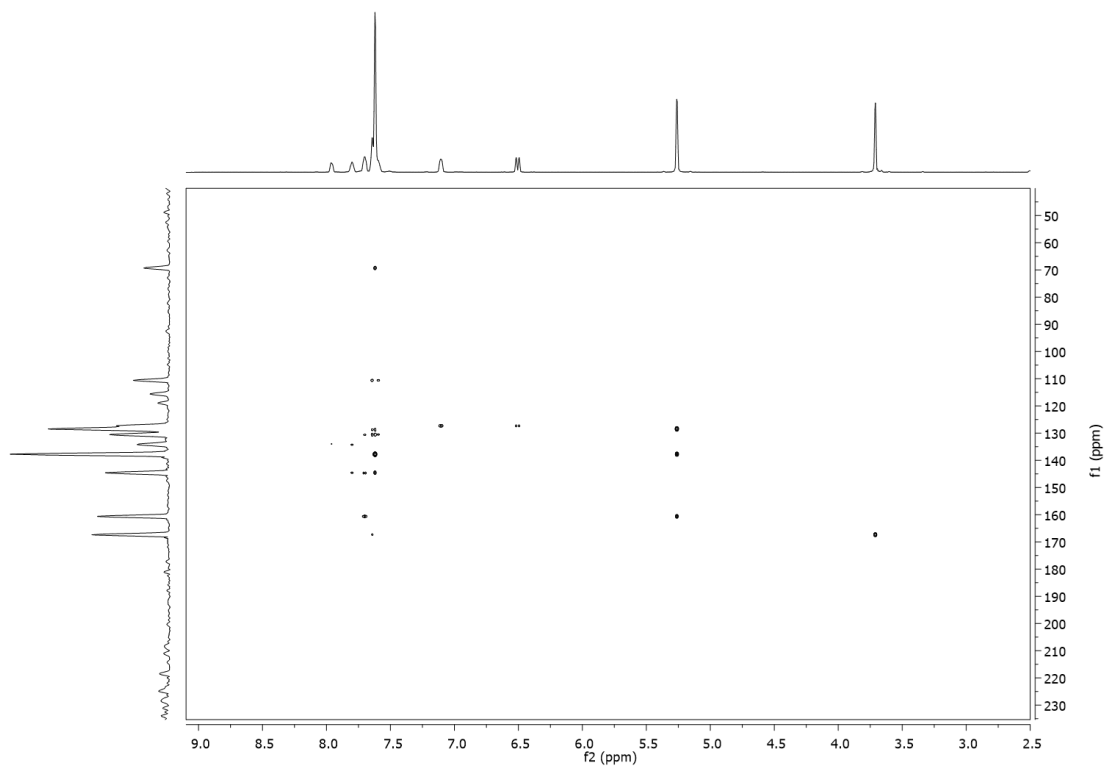
Espectro 17. Espectro de RMN ^{13}C 700MHz del intermediario KSC8.



Espectro 18. Espectro de RMN COSY del intermediario KSC8.



Espectro 19. Espectro de RMN HSQC del intermediario KSC8.



Espectro 20. Espectro de RMN HMBC del intermediario KSC8.