



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Bilógicos

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

INFORME DE SERVICIO SOCIAL

**Síntesis y actividad in vitro de derivados del ácido
litocólico con diferentes heterociclos nitrogenados
saturados como inhibidores de la enzima Proteína
Tirosina Fosfatasa 1B para el tratamiento de la
diabetes tipo 2**

PROYECTO GENÉRICO CORRESPONDIENTE
Síntesis y modificación estructural de sustancias bioactivas

P R E S E N T A
Romero Pérez Iván
2202700054

ASESORES

Asesor interno

Dr. Juan Francisco Cortés Benítez

Asesor externo

Dr. González Andrade Martín

Laboratorio N-015, edificio N, UAM Xochimilco



INDICE

1. Resumen	5
2. Introducción	5
3. Planteamiento del problema y justificación.....	6
4. Objetivo general	6
5. Objetivos específicos	6
6. Antecedentes	7
Mortalidad y Morbilidad.....	7
Diabetes Mellitus tipo II.....	8
Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B).....	9
Ácido litocólico.....	10
7. Materiales y métodos	11
Síntesis de derivados del ácido litocólico	11
Caracterización de los productos	12
a. Síntesis del éster metílico del ácido litocólico (2).....	12
b. Síntesis del éster metílico del ácido 3-oxolitocólico (3)	12
c. Síntesis del éster metílico del ácido 3 β -epoxilitocólico(4).....	13
d. Reacción de aminólisis para la obtención de los intermediarios (5a-5f).....	13
e. Reacción de hidrólisis del éster metílico para la obtención de los compuestos finales (6a-6f)	14
Ensayos de actividad in vitro de los compuestos finales	15
f. Ensayo de inhibición de la PTP1B.....	15
8. Análisis de resultados.....	16
Síntesis de derivados del ácido litocólico	16
Ensayos de actividad <i>in vitro</i> de los compuestos finales	16
a. Efecto inhibitorio de los derivados del ácido litocólico (6a-6f) sobre PTP1B	16
b. Concentración inhibitoria (CI ₅₀) de derivados del ácido litocólico (AL) sobre PTP1B.....	17
9. Discusión	17

10.	Conclusiones	19
11.	Referencias	19
12.	ANEXO	21
	RMN Compuesto 6a	21
	RMN Compuesto 6b	22
	RMN Compuesto 6c	23
	RMN Compuesto 6d	24
	RMN Compuesto 6e	25
	RMN Compuesto 6f	26

Agradecimientos

Quiero agradecer mi más profundo agradecimiento a mi mamá, por ser mi constante apoyo y fortaleza a lo largo de este proceso porque sin su confianza, entusiasmo y cariño, no habría llegado a terminar esta etapa. A mi hermano, por ser mi compañero en cada paso y por brindarme siempre su apoyo incondicional.

A mi abuelo quien, aunque ya no se encuentra entre nosotros, sigue siendo una fuente de inspiración y tenacidad pues, su ejemplo y enseñanza me han acompañado en cada decisión y logro en este camino.

A mi asesor y profesor, el Dr. Juan Francisco Cortés Benítez por su enseñanza, paciencia, dedicación y humanidad. Agradezco enormemente por acompañarme, no solo como guía académico, sino como alguien que verdaderamente se preocupó por mi evolución personal y profesional. Sin duda, este logro no habría sido el mismo sin su valioso apoyo genuino.

A mi asesor Dr. Martín González Andrade por sus valiosas aportaciones y constante disposición para ayudarme a mejorar.

A mis compañeros y profesores de laboratorio N-015, por su apoyo, compañerismo, enseñanzas y por los momentos compartidos, tanto dentro como fuera de laboratorio. Gracias por hacer de este camino algo más llevadero.

A mi universidad, por brindarme las herramientas y espacio necesario para desarrollar este proyecto. Así mismo, agradezco a la beca CONAHCyT otorgada por parte del proyecto con clave CF-2023-I-186.

1. Resumen

Este estudio se enfoca en la síntesis y evaluación de compuestos derivados del ácido litocólico con el objetivo de obtener inhibidores específicos para la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B), una enzima crucial en la regulación de la resistencia a la insulina en la diabetes tipo II. El presente estudio responde a la necesidad de tratamientos efectivos para esta enfermedad metabólica, que afecta a millones de personas a nivel mundial. Se sintetizaron seis derivados del ácido litocólico incorporando heterociclos nitrogenados saturados en la posición C3. Estos se caracterizaron por sus propiedades físicas y espectroscópicas. Los resultados de los ensayos in vitro mostraron que algunos compuestos, especialmente aquellos con tiomorfolina y piperazina, exhiben una inhibición significativa de la PTP1B, con valores de CI_{50} cercanos al del ácido litocólico. La modificación química del ácido litocólico, al aumentar su biodisponibilidad y actividad inhibitoria ofrecen una estrategia innovadora para mejorar el tratamiento de la diabetes tipo II. Estos resultados contribuyen en el desarrollo de tratamientos más efectivos para mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados por esta condición.

2. Introducción

La diabetes tipo II es una preocupación creciente a nivel mundial que demanda enfoques terapéuticos más efectivos. En este estudio, se reporta la síntesis de derivados del ácido litocólico, con la meta específica de desarrollar inhibidores para la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B). Esta enzima desempeña un papel crítico para la mejora a la resistencia a la insulina, lo que hace que la búsqueda de inhibidores específicos sea esencial para mejorar el control glucémico en pacientes con diabetes tipo II.

La complejidad de esta enfermedad, con sus raíces profundas en factores genéticos y ambientales, motiva la exploración de soluciones innovadoras. El ácido litocólico, conocido por sus propiedades biológicas diversas, sirve como la base para la síntesis de compuestos con potencial aplicación terapéutica. La modificación química de este ácido biliar no solo busca mejorar su actividad inhibitoria sobre PTP1B, sino también abordar desafíos relacionados con sus diversos factores fisicoquímicos tales como la solubilidad acuosa.

La relevancia clínica de este enfoque radica en su capacidad para ofrecer tratamientos personalizados y efectivos. Al dirigirse específicamente a la enzima PTP1B, se espera mejorar la respuesta a la insulina y, por ende, la disminución de la resistencia a la insulina lo que daría como tratamiento efectivo contra la diabetes tipo II. Este estudio no solo se enfoca en llenar un vacío terapéutico actual, sino que también promete contribuir a la evolución de estrategias

avanzadas y específicas para mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados por esta enfermedad metabólica.

3. Planteamiento del problema y justificación

La diabetes tipo II ha mostrado un aumento considerable en prevalencia como en morbilidad a nivel mundial. Tan solo en el 2021, la Federación Internacional de Diabetes estimó que 537 millones de personas entre 20 a 79 años viven con esta enfermedad, dando un resultado de 4.8 millones de fallecimientos. En México pasó de ser una causa menor de muerte en 1940 a ser la segunda principal en 2022, con 115,025 defunciones y 14.6 millones de afectados. Esta investigación se propone abordar la creciente demanda de tratamientos más efectivos para la diabetes tipo II, ante la continua preocupación a nivel mundial por esta enfermedad metabólica.^{1,2}

Al dirigir nuestra atención hacia la síntesis de nuevas moléculas con propiedades que puedan intervenir de manera efectiva en las complejas interacciones biológicas implicadas en la enfermedad, buscamos contribuir al progreso de terapias más eficaces. Este enfoque tiene el propósito de ofrecer nuevas alternativas terapéuticas para los pacientes afectados, con la esperanza de mejorar significativamente su calidad de vida. El AL es un inhibidor conocido de la PTP1B, enzima que reduce la sensibilidad a la insulina, pero la insolubilidad de este compuesto en agua limita su efectividad. Este estudio busca mejorar su solubilidad y actividad mediante la síntesis de derivados con diferentes heterociclos nitrogenados.

4. Objetivo general

Sintetizar derivados del ácido litocólico con diferentes heterociclos nitrogenados que tengan actividad inhibitoria *in vitro* sobre la enzima Proteína Fosfatasa 1B (PTP1B).

5. Objetivos específicos

- Sintetizar seis derivados del ácido litocólico con diferentes compuestos heterociclos nitrogenados saturados en C3 en la misma posición del ácido litocólico.
- Determinar sus constantes fisicoquímicas (punto de fusión y factor de retención) y espectroscópicas (Resonancia Magnética de ¹H) para todos los compuestos finales.
- Evaluar para todos los compuestos finales la actividad inhibitoria *in vitro* sobre la enzima Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B).

6. Antecedentes

En el complejo panorama de la salud mundial, la diabetes se presenta como un problema complicado, entrelazada con complejidades genéticas, factores ambientales y estilos de vida contemporáneos. Esta condición crónica, caracterizada por niveles elevados de glucosa en la sangre, ha alcanzado dimensiones epidémicas, planteando desafíos significativos a la comunidad médica y científica en la comprensión de sus raíces profundas que abarca desde los primeros indicios de la enfermedad hasta las actuales estrategias de gestión. La comprensión de este trastorno histórico no solo proporciona una visión evolutiva del conocimiento y los enfoques terapéuticos, sino que también resalta la urgente necesidad de soluciones innovadoras en la constante lucha contra esta condición que impacta la calidad de vida de millones de individuos en todo el mundo.¹

Mortalidad y Morbilidad

Actualmente, la diabetes mellitus se sitúa en los primeros puestos a nivel global en termino de enfermedades que causan tanto morbilidad como mortalidad. Su relevancia se debe a su naturaleza crónico-degenerativa a nivel orgánico, además de generar un considerable impacto económico tanto en los servicios de salud como en la vida del paciente, mismo que experimenta una afección adicional en su calidad de vida; así como de sus familiares.^{1,2} En el 2021, la Federación Internacional de Diabetes estimó que alrededor de 537 millones de personas de entre 20 a 79 años tenían diabetes, de las cuales 4.8 millones fallecieron.³ En México, hasta 1940, la diabetes no era una de las principales causas de muerte, con una tasa promedio de 4.2 defunciones por cada 100 mil habitantes, afectando a una de cada 100 personas adultas; sin embargo, a partir de 1950, la mortalidad por diabetes aumentó gradualmente, situándose en el noveno lugar en 1980 con 14,626 defunciones confirmadas y una tasa de 21.8 decesos por 100 mil habitantes. A finales del año 2022, la diabetes ascendió al segundo lugar entre las principales causas de muertes a nivel nacional con alrededor de 115 025 personas, sin dejar de mencionar a las 14.6 millones de personas que la padecen.^{2,4}

La diabetes mellitus tipo II se ha vuelto una de las enfermedades más comunes en nuestro entorno, con una prevalencia cercana al 15%. Su incidencia está en aumento debido a cambios en el estilo de vida, falta de actividad física y la actual epidemia de obesidad, vinculada a diversas complicaciones, siendo la principal causa de ceguera, enfermedad renal crónica, hemodiálisis, trasplante renal y amputación no traumática de extremidades. Además, las personas con este tipo de condición enfrentan un riesgo de 2 a 4 veces mayor

de sufrir complicaciones cardiovasculares, siendo la principal causa de muerte en este grupo (90-95%).⁵

Diabetes Mellitus tipo II

La diabetes mellitus es una afección metabólica en la que el cuerpo tiene dificultades para regular los niveles de glucosa en la sangre. En términos más específicos, esto puede deberse a la falta de producción de insulina por parte del páncreas como es el caso de la diabetes tipo I; también, puede deberse a una respuesta insuficiente a la insulina producida, como la diabetes tipo II; o a situaciones específicas como el embarazo, como la diabetes gestacional. La insulina es clave para facilitar la entrada de la glucosa en las células, donde se utiliza como fuente de energía. Cuando hay un desequilibrio en este proceso, se producen elevaciones en los niveles de glucosa en la sangre, lo que puede llevar a complicaciones a largo plazo.^{2,5}

El desarrollo de la diabetes tipo II se caracteriza por la reducción en la funcionalidad de las células β , así como por la disminución de la actividad de las vías de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (PKB). Esta situación se atribuye principalmente a una alteración en la vía de señalización de la insulina, lo que conlleva a una disminución en la actividad de los transportadores de glucosa (GLUT), especialmente GLUT1 y GLUT4. Como consecuencia, la glucosa no puede atravesar la membrana plasmática en los músculos, el hígado y el tejido adiposo, dando lugar a lo que se conoce como resistencia a la insulina, caracterizada por la incapacidad del cuerpo para utilizar la insulina de manera eficiente.⁶

Actualmente, debido a la complejidad multifactorial de este tipo de diabetes y la diversidad de objetivos moleculares en las vías metabólicas asociadas con su etiología, no existe una diana farmacológica específica que sugiera un tratamiento definitivo para esta enfermedad. No obstante, se han identificado varios de ellos que pudiesen ser utilizados para su tratamiento, como lo son los inhibidores de la dipeptil peptidasa-4 (DPP-4), agonistas receptor de ácidos grasos libres 1 (FFAR1), inhibidores de la α -glucosidasa, agonistas del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR), el potenciador de la regeneración hepática (ALR), el receptor acoplado a proteínas G para el glucagón (GCGr), el transportador vinculado sodio-glucosa (SGLT), la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK) y los inhibidores de la PTP1B, entre otros los más relevantes.⁷

Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B)

La fosforilación y desfosforilación de residuos de tirosina constituyen un mecanismo crucial para regular la actividad de las proteínas a nivel celular, siendo esencial para el correcto funcionamiento de las redes de transducción de señales vinculadas a los receptores de diversas hormonas, citocinas y otras moléculas bioactivas. Las PTP (proteínas tirosina fosfatasa) se clasifican en tres subfamilias, como lo son las fosfatasas de tirosina específicas, fosfatasas de doble especificidad y fosfatasas de bajo peso molecular. Cabe destacar que, varias PTP, entre ellas la fosfatasa tirosina de proteínas a (PTPa), la fosfatasa tirosina de tipo receptor LAR (PTP-LAR) y PTP1B, han sido identificadas como participantes en la regulación negativa de la vía de señalización de la insulina. La evidencia más sólida indica que PTP1B desempeña el papel más crucial como regulador principal de este proceso.^{6,7}

PTP1B es una proteína que está en el retículo endoplásmico liso y su función es controlar la actividad de otras proteínas mediante un proceso llamado desfosforilación de residuos de tirosina. Esta actividad es esencial para que las señales de diferentes hormonas y moléculas bioactivas se transmitan normalmente a través de las células y un aumento en la actividad de PTP1B en tejidos periféricos parece ser esencial para establecer la resistencia a la insulina, según sugieren numerosos estudios. En conjunto, su función es conocida por llevar a cabo el papel de regulación en la señalización tanto de la insulina como de la leptina.⁶

El entendimiento de esta proteína se basa en que PTP1B tiene tres partes estructurales importantes: un área catalítica en el extremo N-terminal, una región reguladora desordenada en el medio y un área señalizadora en el extremo C-terminal. Estas partes tienen funciones específicas en la actividad de la PTP1B.

Por un lado, se ha descubierto que dominio catalítico de esta enzima (PTP1B₁₋₃₀₀) es el sitio clave para desarrollar diferentes tipos de inhibidores que podrían ayudar a regular la actividad de la PTP1B. Por otro lado, la región reguladora (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀) también se sugiere como un segundo sitio importante para la inhibición. Este segundo sitio es esencial para interactuar con posibles inhibidores y hacer que sean más efectivos.⁷

De este modo, PTP1B desempeña un papel importante en la regulación de la vía de señalización de la insulina, afectando la forma en que las células responden a la insulina y, es por ello por lo que la inhibición de la PTP1B se ha considerado como una posible estrategia para el diseño de fármacos que podrían mejorar el tratamiento de la diabetes tipo II al prolongar los efectos de la insulina.⁷

Ácido litocólico

El ácido litocólico (AL), es uno de los principales ácidos biliares excretados por los mamíferos. Este se forma en el metabolismo por la 7 α -deshidroxilación bacteriana del ácido biliar primario, el ácido quenodesoxicólico, en el colon.⁸ Las propiedades biológicas de este compuesto y sus derivados han sido ampliamente estudiadas, entre ellas antimicrobiano,⁹⁻¹² modulador del receptor de vitamina D,¹³ efecto anti proliferativo en líneas celulares de cáncer⁸ así como inhibidores del proteasoma.¹⁴ El AL tiene actividad inhibitoria moderada sobre la enzima PTP1B con una concentración inhibitoria media (CI₅₀) de 12.7 μ M.¹⁵ Sin embargo, el AL al ser un ácido biliar, tiene una baja solubilidad acuosa así como una pobre absorción intestinal.

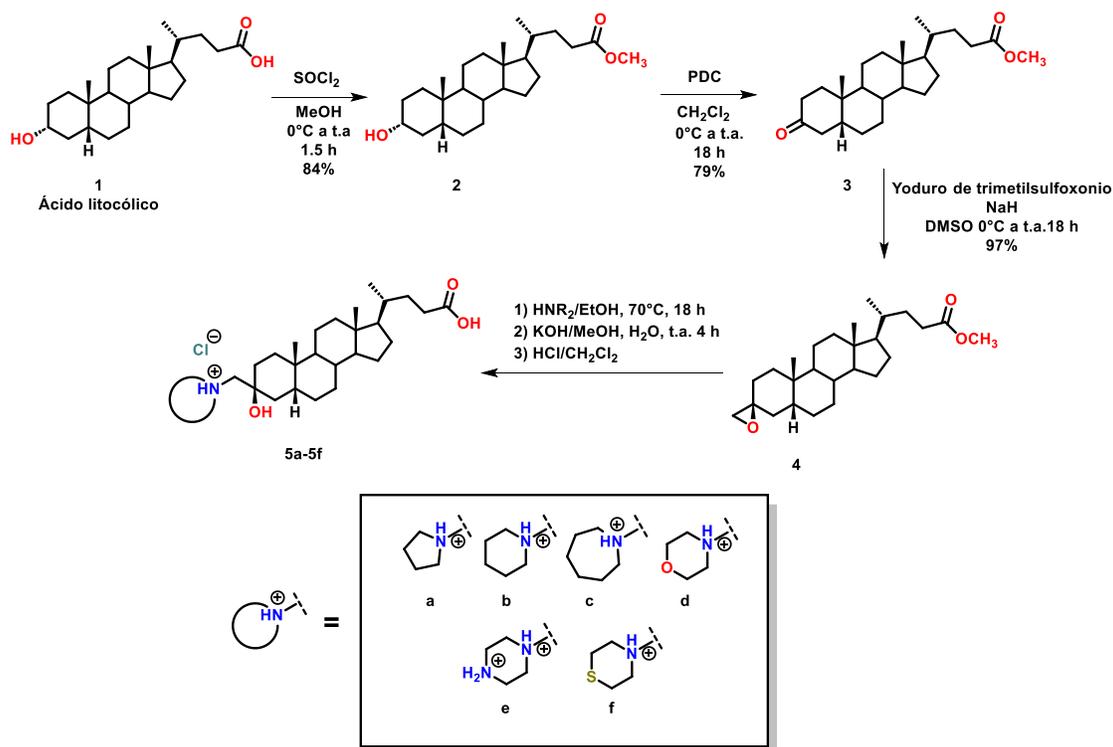
Por tanto, la modificación química del AL para incrementar su biodisponibilidad, puede ser una estrategia para el desarrollo de nuevos inhibidores de la PTP1B y por ende un tratamiento alternativo para la diabetes tipo II. En este sentido, se sabe que la incorporación de heterociclos saturados nitrogenados es una estrategia común para incrementar la biodisponibilidad de moléculas bioactivas.¹⁵ Por esta razón, en el presente proyecto, se pretende llevar a cabo la síntesis de derivados del AL con diferentes heterociclos nitrogenados saturados en la posición C3. Adicionalmente se observará el impacto que tienen estas modificaciones estructurales sobre la actividad inhibitoria sobre la enzima PTP1B. Principalmente, se pretende estudiar el efecto de la presencia o ausencia de heterociclos, la influencia del tamaño del heterociclo (homología estructural), así como el reemplazo bioisotérico de un grupo CH₂ en la piperidina por oxígeno (en la morfolina), nitrógeno (en la piperazina) o azufre (en la tiomorfolina).

Cabe resaltar que, por un lado, la morfolina a través de su átomo de oxígeno puede formar enlaces de hidrogeno, lo que proporciona propiedades únicas y que, junto a su lipofilia del anillo, contribuye a diversas interacciones biológicas.¹⁶ Del mismo modo, se ha demostrado en diversos estudios que la piperidina y sus derivados contribuyen a varias acciones, entre ellas mejoran las propiedades estructurales de diversas moléculas dándoles mejor absorción, distribución y metabolismo.¹⁷⁻¹⁸ Por otro lado, el anillo de la piperazina ofrece características que mejoran las propiedades farmacocinéticas de los candidatos a fármacos; ya que, sus átomos de nitrógeno influyen en la solubilidad en agua de las moléculas; además su versatilidad permite la introducción de diversos grupos funcionales que mejoran la biodisponibilidad.¹⁹⁻²⁰

7. Materiales y métodos

Síntesis de derivados del ácido litocólico

Para la obtención de los derivados semisintéticos **6a-6f** (Esquema 1), se utilizó como materia prima el ácido litocólico (**1**). Con el cuál, se llevó a cabo una reacción de esterificación utilizando cloruro de tionilo en metanol para así obtener el éster metílico del ácido litocólico (**2**). Este intermediario se hizo reaccionar con dicromato de piridinio (PDC) para la oxidación del carbinol en posición C3 y así obtener el ácido 3-oxolitocólico (**3**). Mediante la reacción de epoxidación de Corey-Chaykovsky, este intermediario se hizo reaccionar con yoduro de trimetilsulfoxonio e hidruro de sodio en dimetilsulfóxido, dando el éster metílico del ácido (3 β -oxirano)litocólico (**4**) el cual, se hizo reaccionar con los heterociclos nitrogenados saturados tales como la pirrolidina, piperidina, azepano, morfolina, piperazina y tiomorfolina para dar los productos **5a-5f**, respectivamente. A estos últimos se les realizó una reacción de hidrólisis en medio alcalino para formar los productos finales **6a-6g**, los cuales después se trataron con ácido clorhídrico concentrado en diclorometano, para formar los clorhidratos de cada compuesto. Cabe mencionar que la síntesis de los intermediarios **2**, **3** y **4** se hizo acorde a lo reportado en la referencia.²¹



Esquema 1. Reactivos y condiciones para la obtención de los derivados del ácido litocólico **6a-6f**.

Caracterización de los productos

El punto de fusión de los compuestos fue determinado utilizando un equipo BUCHI modelo M-565. Para la obtención de los espectros de RMN de ^1H , se emplearon espectrómetros Agilent DD2 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) y Bruker Ascend (Bruker, Billerica, MA, USA) a una frecuencia de 600 MHz. Las muestras fueron analizadas utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) y dimetilsulfóxido- d_6 como disolventes.

a. Síntesis del éster metílico del ácido litocólico (2)

En un matraz redondo de 250 mL, se disolvieron 3.74 g (9.93 mmol) de ácido litocólico (AL) en 100 mL de metanol (MeOH). La solución se enfrió a una temperatura entre 5 y 10°C, y posteriormente se añadieron 2.9 mL (24.3 mmol) de cloruro de tionilo (SOCl_2). Después, se realizó un análisis por cromatografía en placa fina utilizando una fase móvil hexano-acetato en una proporción de 7:3 para verificar el término de la reacción que duró 2 horas. Finalmente, el metanol se concentró a presión reducida en un rotavapor. Al sólido obtenido se le agregaron 150 mL de agua y se filtró al vacío. Se obtuvieron 3.27 g (84% de rendimiento) de un compuesto blanco con punto de fusión de 76-80 °C, con la suficiente pureza para la siguiente reacción.

Posteriormente, se realizó un escalamiento de la reacción, donde se ajustaron proporcionalmente las cantidades de los reactivos, manteniendo las mismas condiciones experimentales como temperatura y tiempo de reacción, aunque fue necesario optimizar la velocidad de agitación para asegurar una mezcla más homogénea. Las proporciones de AL fueron 6 g junto a 120 mL de metanol (MeOH) y 4.64 mL de cloruro de tionilo (SOCl_2). Se obtuvieron 5.78 g (98% de rendimiento) de compuesto blanco.

b. Síntesis del éster metílico del ácido 3-oxolitocólico (3)

En un matraz de fondo redondo de 500 mL, se disolvió 5.64 g (14.4 mmol) de éster metílico del ácido litocólico en 300 mL de diclorometano (DCM). La solución se mantuvo en un baño de hielo/agua para asegurar que la temperatura no excediera los 10 °C. A continuación, se añadieron 2 g de sílica a la reacción. Posteriormente, se agregaron 5.64 (14.9 mmol) de dicromato de piridinio (PDC) en seis porciones, con intervalos de 15 minutos entre cada adición dejando reaccionar durante 72 horas. Una vez transcurridas las horas se tomó cromatografía en placa fina en un medio de elusión hexano-acetato de etilo 8:2 para verificar que la reacción terminó. Posteriormente, el diclorometano se eliminó por medio de destilación a presión reducida en un rotavapor. El sólido obtenido purificó en una columna abierta de gel de sílice utilizando como fase móvil hexano- acetato (85:15). Se obtuvieron 4.01 g (79% de rendimiento) de un sólido blanco con un punto de fusión de 115-118 °C.

c. Síntesis del éster metílico del ácido 3 β -epoxilitocólico(4)

En un matraz de fondo redondo de 25 mL, se disolvieron 572 mg (2.8 mmol) de yoduro de trimetilsulfoxonio (TMSI) en 8 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Luego, se añadieron 98 mg (2.4 mmol) de hidruro de sodio (NaH al 60%), manteniendo la mezcla bajo agitación constante durante una hora y en atmósfera de nitrógeno (N₂). Transcurrido este tiempo, se agregaron 502 mg (1.29 mmol) del éster metílico del ácido 3-oxolitocólico (**3**) disueltos en 2 mL adicionales de DMSO. La reacción se dejó con agitación magnética constante por 24 horas, después de las cuales se realizó una cromatografía en placa fina utilizando una fase móvil de hexano-acetato en proporción 8:2 para verificar la finalización de la reacción. Una vez confirmado el término de la reacción, esta se depositó en 150 mL de agua. El precipitado se filtró al vacío y se lavó con agua. Tras secar el sólido, se recuperó y se depositó en un matraz de bola de 50 mL, adsorbiéndolo con 7 mL de diclorometano (DCM) y 1 g de sílica para concentrarlo en rotavapor. Finalmente, el crudo de reacción se purificó en una columna abierta de gel de sílice utilizando como medio de elusión una fase móvil de hexano-acetato en proporción 9:1. Se obtuvieron 472 mg (97% de rendimiento), de un sólido blanco con un punto de fusión de 132 °C.

Del mismo modo, se realizó un escalamiento de la reacción, donde se ajustaron proporcionalmente las cantidades de los reactivos, manteniendo las mismas condiciones experimentales como temperatura y tiempo de reacción, aunque fue necesario optimizar la velocidad de agitación para asegurar una mezcla homogénea. Las proporciones de ácido 3-oxolitocólico (**3**) fueron 3 g (7.7 mmol) junto a 25 mL de (DMSO), 3.531 g (16.1 mmol) de yoduro de trimetilsulfoxonio (TMSI) y 0.587 mg (14.4 mmol) de hidruro de sodio (NaH) al 60%. Se obtuvieron 2.56 g (88% de rendimiento) de compuesto blanco.

d. Reacción de aminólisis para la obtención de los intermediarios (5a-5f)

Se llevó a cabo una serie de reacciones bajo las mismas condiciones experimentales para seis compuestos diferentes. A continuación, se describe el procedimiento general seguido para cada reacción:

En un matraz de fondo redondo de 50 mL, se añadieron 200 mg (0.49 mmol) del éster metílico ácido (3 β -oxirano)litocólico (**4**), los cuales se disolvieron en 10 mL de etanol anhidro y se mantuvieron en agitación constante. Posteriormente, se añadieron los siguientes compuestos correspondientes a cada una de las seis reacciones diferentes, en un baño de aceite:

- Pirrolidina: 0.12 mL (1.4 mmol) para el compuesto 6a
- Piperidina: 0.15 mL (1.4 mmol) para el compuesto 6b.

- Hexametildienamina: 0.21 mL (1.4 mmol) para el compuesto 6c.
- Morfolina: 0.13 mL (1.4 mmol) para el compuesto 6d.
- Piperazina: 128 mg (1.4 mmol) para el compuesto 6e.
- Tiomorfolina: 0.15 mL (1.4 mmol) para el compuesto 6f.

Después de ser añadidos, se adaptó al matraz un tubo condensador en posición de reflujo y la reacción se ajustó a una temperatura de 70 °C durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo, se realizó una cromatografía en placa fina utilizando una fase móvil de hexano-acetato en una proporción 8:2 para corroborar que la reacción había terminado. Finalmente, al concluir la reacción, esta se concentró al vacío en un rotavapor. El residuo se purificó en una columna abierta de gel de sílice y como fase móvil una mezcla de hexano-acetato en una proporción 7:3. Los productos obtenidos que en su mayoría tuvieron una consistencia oleosa, pero con la suficiente pureza para utilizarlos en la siguiente reacción.

e. Reacción de hidrólisis del éster metílico para la obtención de los compuestos finales (6a-6f)

Para la hidrólisis de cada uno de los seis compuestos sintetizados en la reacción anterior, se procedió de la siguiente manera: a los compuestos obtenidos en la reacción anterior, los cuales estaban contenidos en un matraz de fondo redondo de 25 mL, se les añadieron 100 mg (1.8 mmol) de hidróxido de potasio disueltos en 5 mL de metanol (MeOH) y dos gotas de agua. Esta mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente con agitación constante durante 4 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se verificó el término de la reacción mediante cromatografía en placa fina utilizando una fase móvil de hexano-acetato en una proporción 8:2. El disolvente eliminó a presión reducida en un rotavapor. El sólido obtenido en cada reacción se precipitó con 10 mL de diclorometano (DCM) y 1 mL de ácido clorhídrico concentrado (HCl), manteniéndolo en agitación constante durante 20 minutos. Finalmente, el precipitado se filtró al vacío. Los compuestos finales se obtuvieron con rendimientos del 29 al 59%. Las constantes fisicoquímicas y espectroscópicas son las siguientes:

Compuesto 6a: sólido amorfo color blanco; rendimiento = 29%; p.f. = 253-257 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ_H = 11.97 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 3.57 (s, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.22 (m, 1H), 1.08 (m, 1H), 2.02 – 0.97 (m, 30H), 0.91 (s, 3H), 0.87 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.62 (s, 3H).

Compuesto 6b: sólido amorfo color crema; rendimiento = 43%; p.f. = 234-240 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ_H = 11.97 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 5.00 (s, 1H), 3.40 (s, 2H), 3.02

(s,2H), 2.22 (m, 1H), 2.10 (m, 1H), 1.94 – 0.97 (m, 35H), 0.91 (s, 3H), 0.86 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.62 (s, 3H).

Compuesto 6c: sólido amorfo color blanco; rendimiento = 39%; p.f. = 204-206 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) $\delta_{\text{H}} = 11.96$ (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 5.01 (s, 1H), 3.45 – 3.35 (m, 2H), 3.24 (s, 2H), 3.10 (s, 2H), 2.52 – 2.47 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H), 2.25 – 2.18 (m, 1H), 2.14 – 2.05 (m, 1H), 1.94 – 1.10 (m, 34H), 0.91 (s, 3H), 0.87 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.61 (s, 3H).

Compuesto 6d: sólido amorfo color crema; rendimiento = 59%; p.f. = 212-219 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) $\delta_{\text{H}} = 11.97$ (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.01 – 3.92 (m, 2H), 3.86 (d, $J = 12.5$ Hz, 2H), 3.47 (t, $J = 11.3$ Hz, 2H), 3.15 (dd, $J = 20.1, 6.1$ Hz, 4H), 2.22 (ddd, $J = 15.1, 9.6, 5.2$ Hz, 2H), 3.16 (dd, $J = 20.1, 6.1$ Hz, 4H), 2.22 (ddd, $J = 15.1, 9.6, 5.2$ Hz, 1H), 2.10 (ddd, $J = 15.8, 9.1, 7.1$ Hz, 1H), 1.92 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 1.85 – 1.73 (m, 3H), 1.66 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 1.49 (ddd, $J = 16.7, 9.5, 4.7$ Hz, 3H), 1.40 – 1.28 (m, 8H), 1.29 – 0.97 (m, 10H), 0.91 (s, 3H), 0.86 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.61 (s, 3H).

Compuesto 6e: sólido amorfo color blanco; rendimiento = 22%; p.f. = 218-222 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) $\delta_{\text{H}} = 10.48$ (s, 1H), 10.03 – 9.73 (m, 3H), 8.03 (s, 2H), 4.97 (s, 2H), 3.76 (s, 2H), 3.63 – 3.49 (m, 2H), 3.21 (s, 2H), 2.22 (ddd, $J = 15.1, 9.6, 5.3$ Hz, 1H), 2.10 (ddd, $J = 15.8, 9.0, 7.1$ Hz, 1H), 1.92 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 1.87 – 1.73 (m, 2H), 1.66 (dd, $J = 10.3, 2.8$ Hz, 2H), 1.56 – 1.41 (m, 3H), 1.39 – 1.28 (m, 8H), 1.28 – 0.96 (m, 10H), 0.91 (s, 3H), 0.86 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.61 (s, 3H).

Compuesto 6f: sólido amorfo color blanco; rendimiento = 29%; p.f. = 209-212 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) $\delta_{\text{H}} = 11.96$ (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 5.01 (s, 1H), 3.67 (s, 2H), 3.30 – 3.18 (m, 2H), 3.12 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H), 2.86 – 2.75 (m, 2H), 2.22 (ddd, $J = 15.2, 9.6, 5.3$ Hz, 1H), 2.10 (ddd, $J = 15.8, 9.2, 7.0$ Hz, 1H), 1.94 – 1.60 (m, 7H), 1.56 – 0.94 (m, 22H), 0.91 (s, 3H), 0.87 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H) 0.62 (s, 3H).

Ensayos de actividad in vitro de los compuestos finales

f. Ensayo de inhibición de la PTP1B

Para el ensayo de inhibición de los compuestos sintetizados se empleó un método espectrofotométrico. Se prepararon soluciones stock (1000 mM) en DMSO de los compuestos finales y los controles positivos a usar serán el ortovanadato de sodio (OV) y el ácido ursólico (UA). Se utilizaron alícuotas de 1-10 mL de los compuestos evaluados (por triplicado) y serán incubados con 90 μL de solución stock de proteína (96 nM) en solución buffer (50 mM; Tris-HCl, pH 6.8) y 5 μL del sustrato *p*-nitrofenilfosfato (pNPP, 10 mM) a 37°C durante 15 min para después leer la absorbancia a λ_{405} nm. El porcentaje de inhibición se

graficó como función de las concentraciones del inhibidor. El valor de CI_{50} se calculó por un análisis de regresión usando la siguiente ecuación (OriginPro 2018):

$$a) \%PTP1B = \frac{A_{100}}{1 + \left(\frac{i}{CI_{50}}\right)^s}$$

Donde $\%PTP1B$ es el porcentaje de inhibición, A_{100} es la inhibición máxima, i es la concentración del inhibidor, CI_{50} es la concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática y s es el grado de cooperación.

8. Análisis de resultados

Síntesis de derivados del ácido litocólico

Los derivados del ácido litocólico se obtuvieron siguiendo la metodología descrita en el Esquema 1 y los rendimientos obtenidos se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento de los compuestos sintetizados.

<i>Compuesto</i>	<i>Rendimiento obtenido</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Rendimiento obtenido</i>
2	84.5%	6c	38.89%
3	79.32%	6d	58.52%
4	97.5%	6e	21.59%
6a	28.06%	6f	28.8%
6b	43.02%		

Ensayos de actividad *in vitro* de los compuestos finales

a. Efecto inhibitorio de los derivados del ácido litocólico (6a-6f) sobre PTP1B

Se evaluaron los compuestos 6a–6f como potenciales inhibidores de la enzima PTP1B utilizando la variante $hPTP1B_{1-400}$ (forma larga). Primero se probaron diferentes concentraciones de inhibidores de referencia, ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), así como las mismas concentraciones para los seis compuestos.

Primero se realizó un *screening* para determinar a altas concentraciones qué compuestos eran capaces de inhibir a la PTP1B. Los resultados iniciales mostraron que los compuestos 6a y 6b no presentaron inhibición a concentraciones inferiores a 200 μ M. Por otro lado, los compuestos 6c y 6d mostraron inhibición a concentraciones por debajo de 200 μ M. El compuesto 6e tuvo una actividad moderada, con inhibición a concentraciones inferiores a

100 μM . Sin embargo, el hallazgo más significativo fue el derivado 6f, que demostró una inhibición por debajo de 50 μM .

b. Concentración inhibitoria (CI_{50}) de derivados del ácido litocólico (AL) sobre PTP1B.

Para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de los compuestos recién sintetizados, se seleccionaron los derivados 6c-6f, que fueron los únicos que mostraron actividad sobre la enzima a concentraciones menores de 200 μM . El ensayo se llevó a cabo siguiendo el procedimiento previamente descrito.¹⁰ Los resultados de este solo se pudo obtener el valor de CI_{50} para el compuesto 6f, el cuál fue de 20 μM como se muestra en el Gráfico 1.

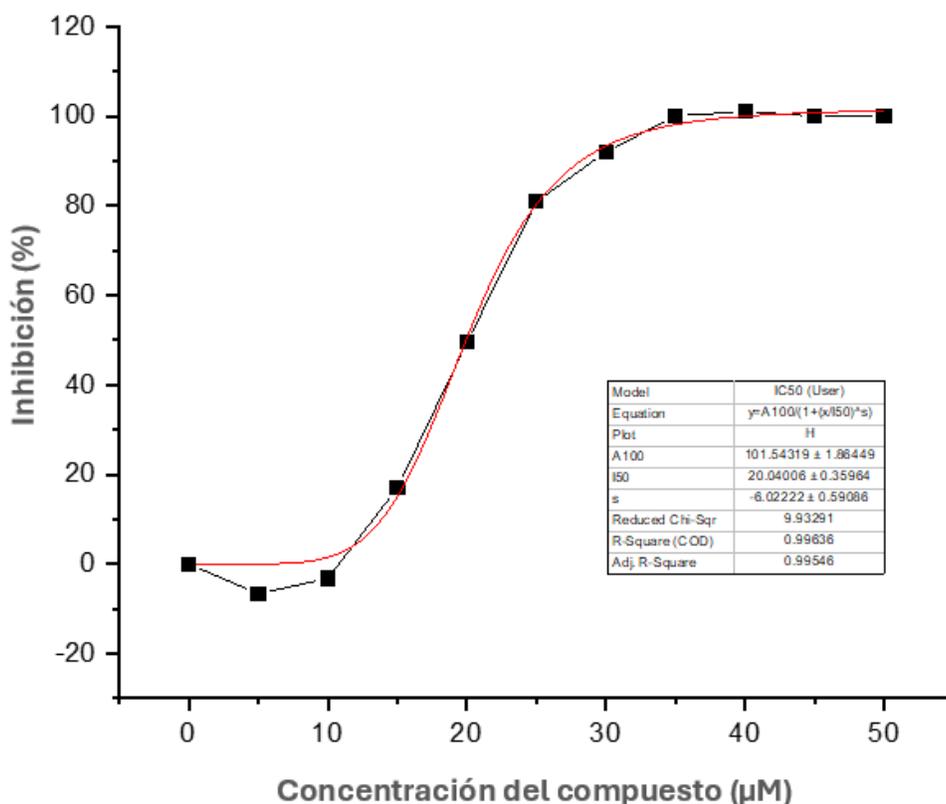


Gráfico 1. Curva de concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) del compuesto 6f.

9. Discusión

La síntesis y las evaluaciones de los compuestos derivados del ácido litocólico (AL) presentaron una serie de hallazgos que proporcionaron información relevante en cuanto al potencial para inhibir a la enzima Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B).

Los intermediarios y los seis productos finales fueron sintetizados conforme a los procedimientos descritos anteriormente, en términos generales, los intermediarios 2, 3 y 4

mostraron rendimientos de 84%, 79% y 98%, respectivamente, lográndose destacar una alta eficiencia en estas primeras etapas de la ruta de reacción.

En particular, la síntesis del compuesto 4, ácido (3 β -oxirano) litocólico, fue de notable interés debido a su elevado rendimiento (98%) y pureza, lo que permitió una caracterización estructural precisa mediante difracción de rayos X mostrando aspectos importantes sobre la regioselectividad y estereoespecificidad de la reacción de epoxidación, tal y como se muestra en la Figura 1.

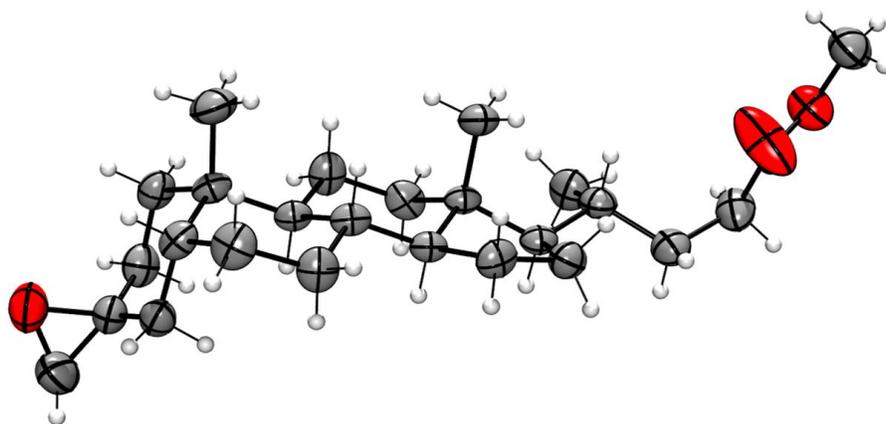


Figura 1. Diagrama ORTEP del compuesto éster metálico del ácido 3 β -epoxilitocólico (4)

Por otro lado, la síntesis de los compuestos finales 6a-6f mostraron una tendencia hacia rendimientos más bajos. Sin embargo, compuestos como 6e (22%) y 6a (28%) presentaron rendimientos particularmente bajos en comparación con otros, como 6b (43%) y 6f (58%). Esta variabilidad puede atribuirse a factores como la reactividad diferencial de los nucleófilos utilizados en cada reacción. En el caso del compuesto 6e, el bajo rendimiento puede deberse a la formación de un dímero por parte de la piperazina. Asimismo, tomando en cuenta que los compuestos se precipitaron en diclorometano y ácido clorhídrico, es probable que parte de este compuesto se haya solubilizado en el medio y por tanto mermado el rendimiento de la reacción. Las constantes fisicoquímicas de estos compuestos finales se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de punto de fusión, factor de retención (R_f) y apariencia física para los compuestos obtenidos.

Compuesto	R_f (Hexano: Acetato de etilo 8:2)	Compuesto	Punto de fusión (°C)	Apariencia física
5a	0.31	6a	253-257	Sólido color crema

5b	0.35	6b	234-240	Sólido color crema
5c	0.37	6c	204-206	Sólido color blanco
5d	0.3	6d	212-219	Sólido color crema
5e	0.27	6e	218-222	Sólido color blanco
5f	0.35	6f	209-212	Sólido color blanco

Por último, las evaluaciones y análisis de los compuestos sintetizados en cuanto a su capacidad inhibidora sobre la enzima PTP1B arrojó resultados mixtos. Los compuestos 6a y 6b no presentaron actividad a concentraciones inferiores a 200 μM enfatizando una baja afinidad por la enzima; sin embargo, los compuestos 6c y 6d mostraron una inhibición apreciable en este rango de concentraciones, con valores de CI_{50} entre 100 y 200 μM .

El derivado 6f con un grupo tiomorfolina fue el único compuesto con una inhibición significativa sobre la PTP1B ($\text{CI}_{50} = 20 \mu\text{M}$).

10. Conclusiones

La síntesis de los seis derivados del ácido litocólico y su evaluación como inhibidores de la enzima PTP1B fueron llevaban a cabo satisfactoriamente, mostrando resultados con rendimientos variados de los compuestos finales, que oscilaron entre 21% y 59% siendo éstos moderados, de los cuales, los compuestos 6a y 6b no mostraron inhibición significativa, mientras que 6c y 6d presentaron actividad pero no tan significativa, el compuesto 6e mostró inhibición moderada, mientras que 6f fue el más prometedor con una CI_{50} de 20 μM .

Cabe destacar que, aunque los compuestos no mostraron una inhibición mayor que la del ácido litocólico (AL), tienen potencial para ser optimizados en estudios futuros, lo que podría mejorar su potencia in vitro sobre la PTP1B.

11. Referencias

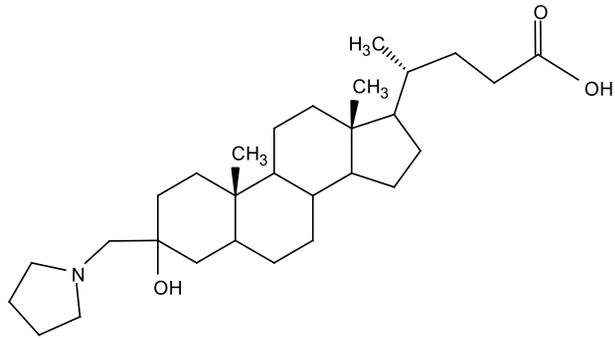
- Morales, M. & Gallegos, E. (2022). Riesgo de diabetes mellitus tipo 2 y sus determinantes. *Enfermería Global*, (21), pp. 179-202.
- Velasco, B. & Brena, V. (2014). Diabetes mellitus tipo 2: Epidemiología y Emergencia en Salud. *Salud y Administración*, (1), pp. 11-16, International Diabetes Federation
- International Diabetes Atlas. (2021). *IDF Diabetes Atlas*. USA: SANOFI.
- INEGI. (Enero 2024). Estadística de defunciones registradas (EDR) 2022. México. INEGI Recuperado de <https://inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/EDR/EDR2022-Dft.pdf>
- Martínez, B. (2022). Recomendaciones para el uso racional del medicamento en el tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2. *Junta de Andalucía Consejería de Salud y Familias*, (1), pp. 14-25.

6. Coronell, A., Cortés, F. & González, B. (2023). The importance of including the C-terminal domain of PTP1B1-400 to identify potential antidiabetic inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, (38), p. 2-11.
7. Álvarez, S., *Et al.* (2023). Anti-Diabetic Activity of Glycyrrhetic Acid Derivatives FC-114 and FC-122: Scale-Up, In Silico, In Vitro, and In Vivo Studies. *Int. J. Mol. Sci.*, (24), p. 1-25.
8. Di Gregorio, M.C.; Cautela, J.; Galantini, L. Physiology and Physical Chemistry of Bile Acids. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 1780, 1-7.
9. Yan-Tao Y, *et al.* (2019). Synthesis of new steroidal quinolines with antitumor properties, *Steroids*, (151), pp. 1-4.
10. Bellin, A.; Quaglio, M.; Guarneri, M. & Cavazzini, G. (1991). Antimicrobial activity of basic cholane derivatives. Parts I and II. *Eur J Med Chem*, (198), 95-185.
11. Bellin, A.; Quaglio, M.; Guarneri, M. & Cavazzini, G. (1984). Antimicrobial activity of basic cholane derivatives. Part IV. *Eur J Med Chvem*, (39), pp. 10-305.
12. Bellin, A.; Quaglio, M.; Guarneri, M.; Cavazzini, G. (1986). Antimicrobial activity of basic cholane derivatives: amino and amido derivatives (VI). *Boll Chim Farm*, (125), pp. 65-362
13. Hiroyuki, M., *et al.* (2019). Development of novel lithocholic acid derivatives as vitamin D receptor agonists, *Bioorg, Med. Chem.*, (27), pp. 3674-3681.
14. Dang, Z., *et al.* (2011). Synthesis and proteasome inhibition of lithocholic acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, (21), pp. 28-1926.
15. Wang, L. J., Jiang, B., Wu, N., Wang, S. Y., & Shi, D. Y. (2015). Natural and semisynthetic protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors as anti-diabetic agents. *RSC Advances*, (60), pp. 48822-48834.
16. Kourounakis, P., Xanthopoulos, D., Tzara, A. (2019). Morpholine as a privileged structure: a review on the medical chemistry and pharmacological activity of morpholine containing bioactive molecules. *Med Res Rev*, (40), pp. 709-752.
17. Jayan, J. *et al.* (2023). Piperidine: a versatile heterocyclic ring for developing monoamine oxidase inhibitors. *ACS Omega*, (8), pp. 37731-37751.
18. Chen, Q., Jian-Qi, L., & Qing, Z. (2023). Application of chiral piperidine scaffolds in drug design. *Pharmaceut Fronts*, (5), pp. e-1- e14.
19. Zhang, R., *et al.* (2021). Piperazine skeleton in the structural modification of natural products: a review. *Taylor & Francis Group*, (1), pp. 1165-1197.
20. Wang, L., *et al.* (2015). Natural and semisynthetic protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors as anti-diabetic agents. *RSC Advances*, (5), pp.48822- 48834.
21. Mendoza-Jasso, M. E., Pérez-Villanueva, J., Alvarado-Rodríguez, J. G., González-Andrade, M., & Cortés-Benítez, F. (2024). 3-Benzylaminomethyl Lithocholic Acid Derivatives Exhibited Potent and Selective Uncompetitive Inhibitory Activity Against Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B). *ACS omega*, 9(30), 33224-33238.

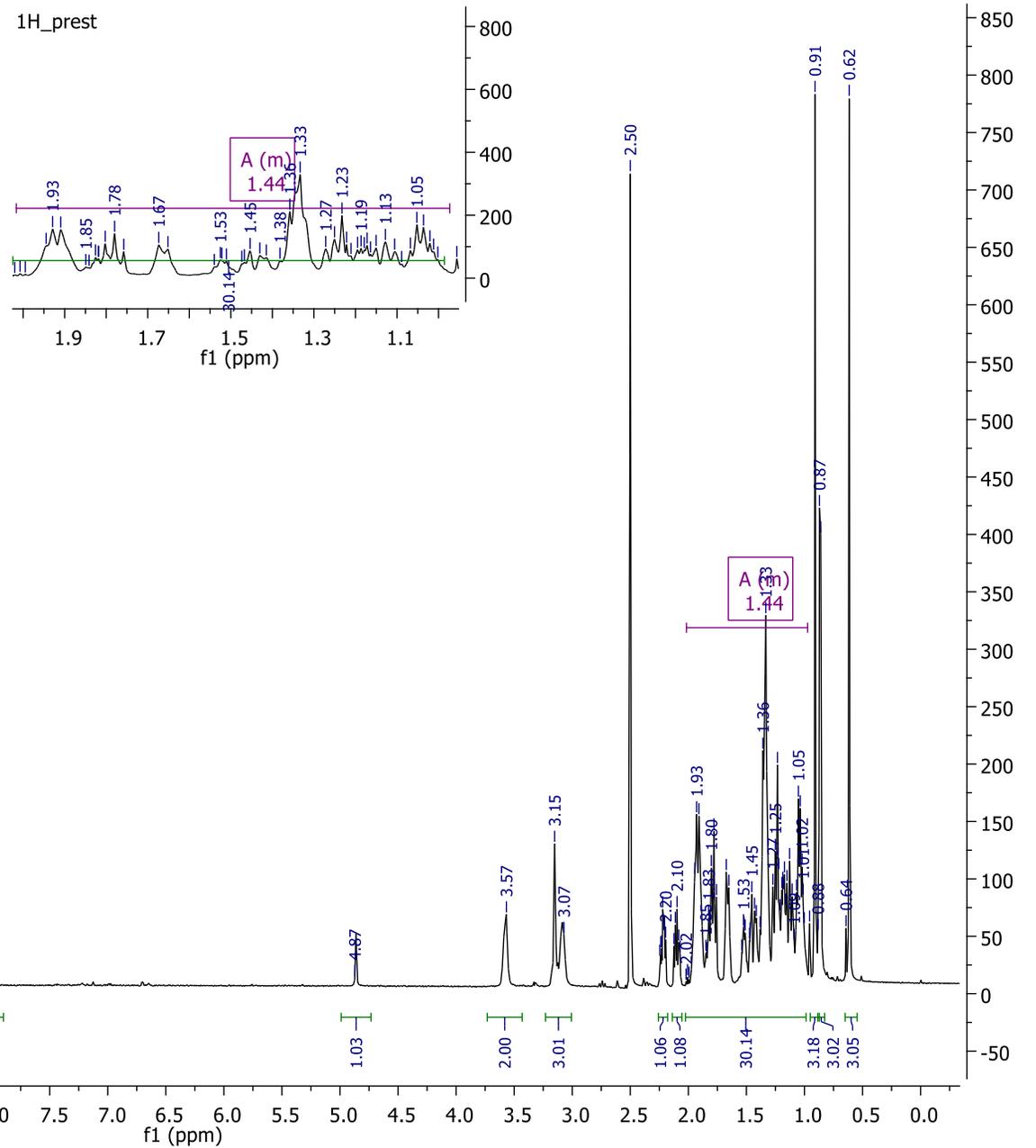
12. ANEXO

RMN Compuesto 6a

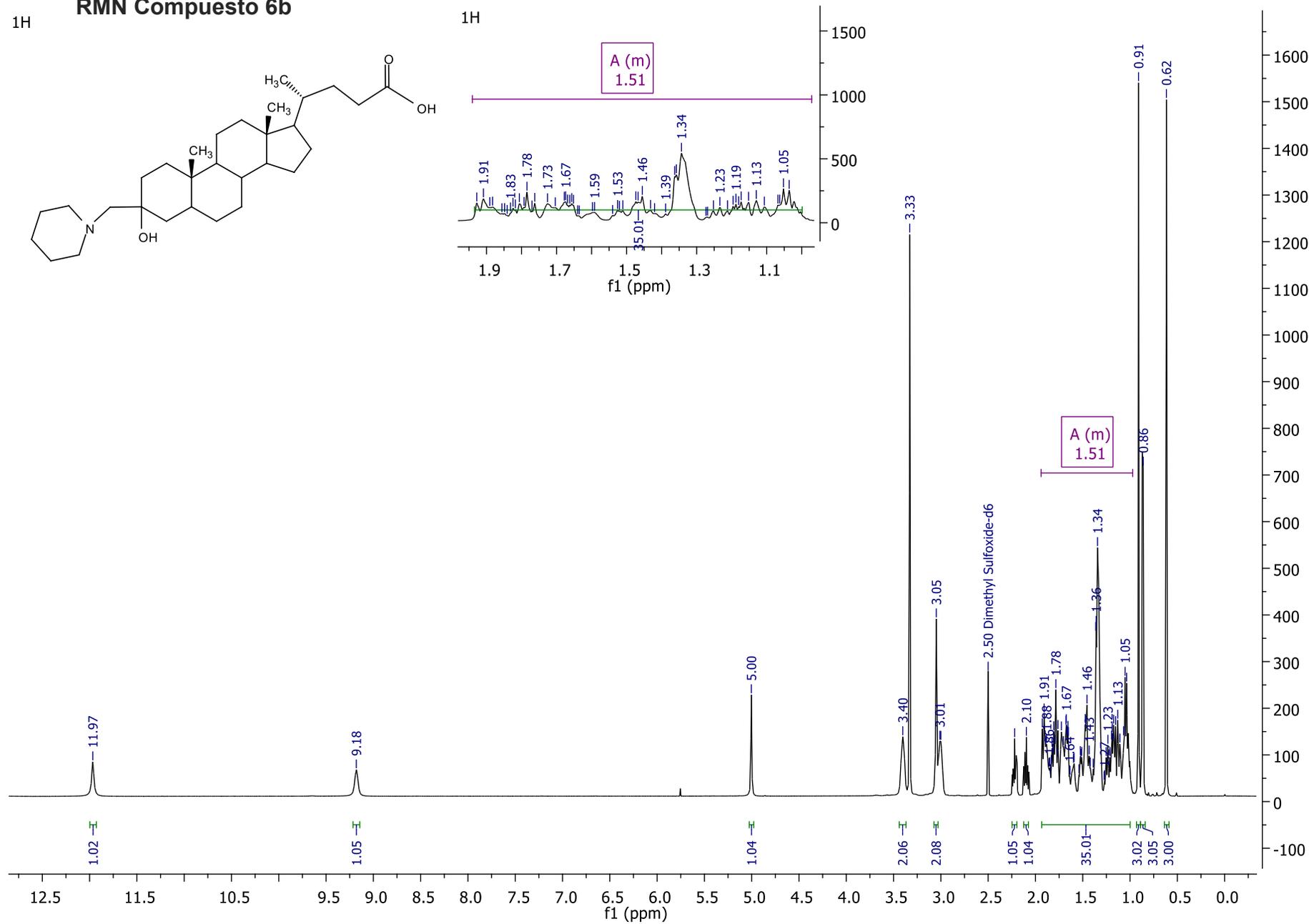
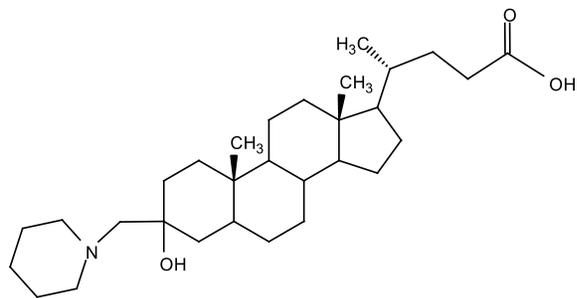
1H_prest



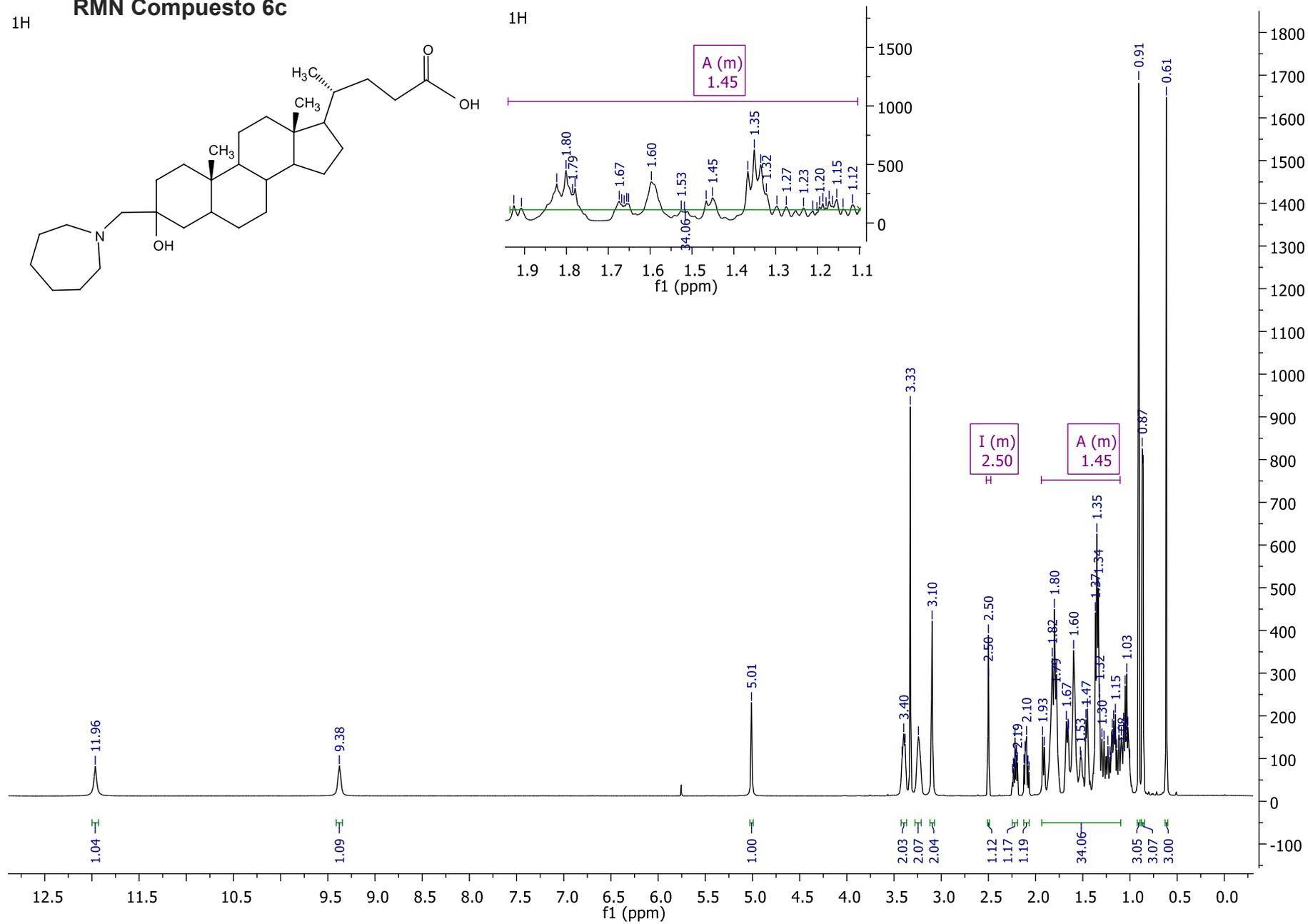
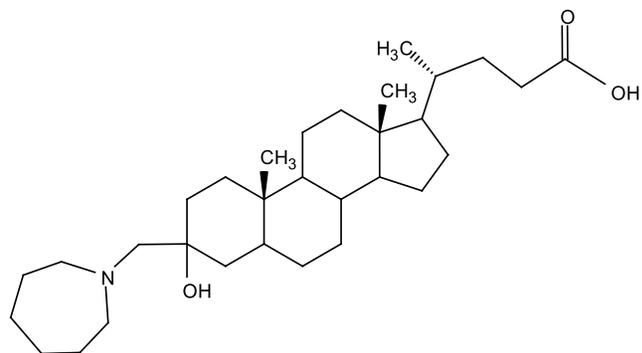
1H_prest



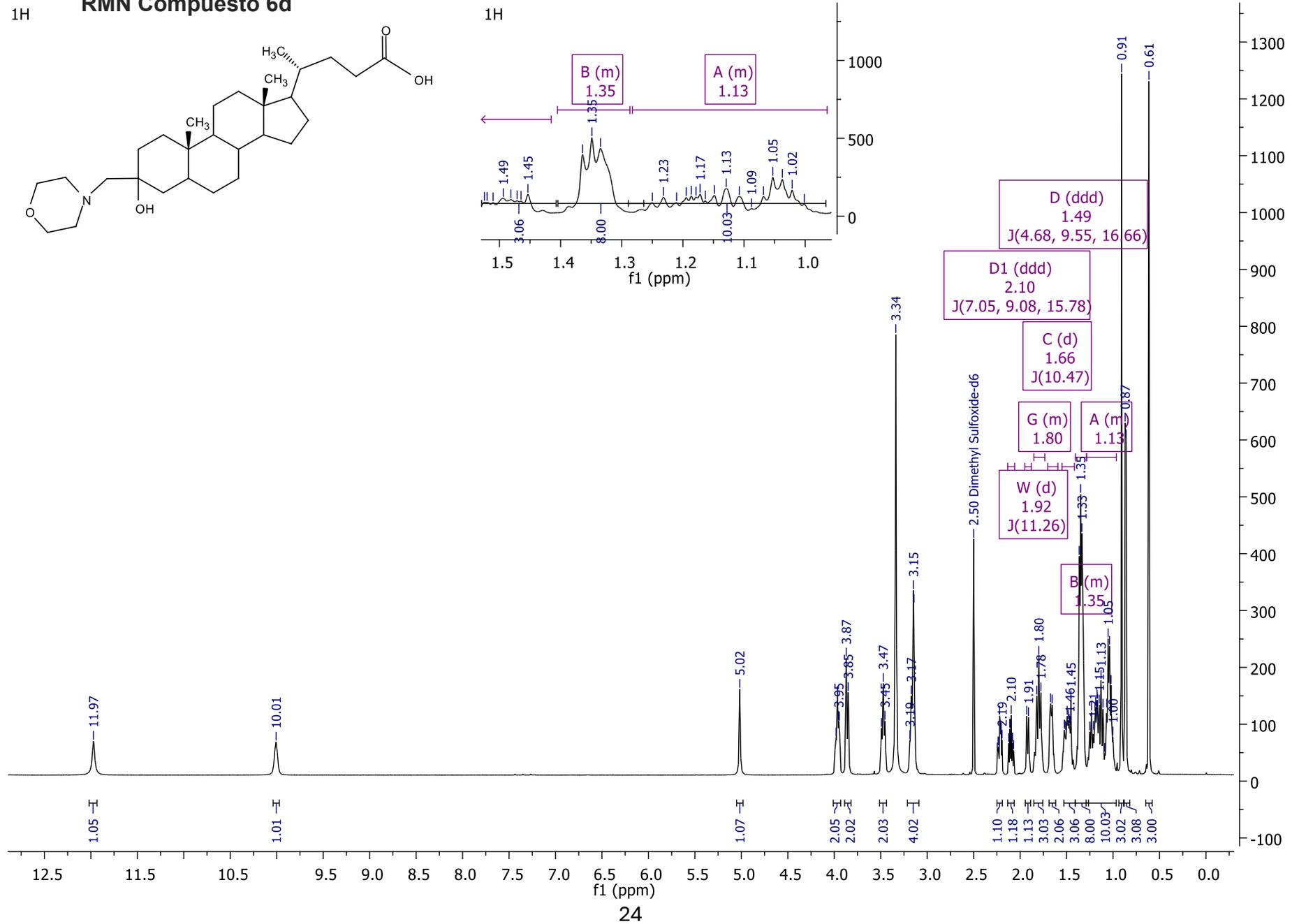
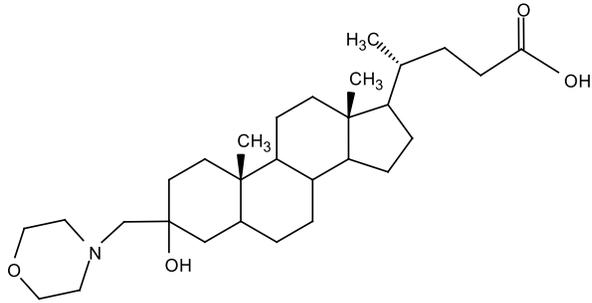
¹H RMN Compuesto 6b



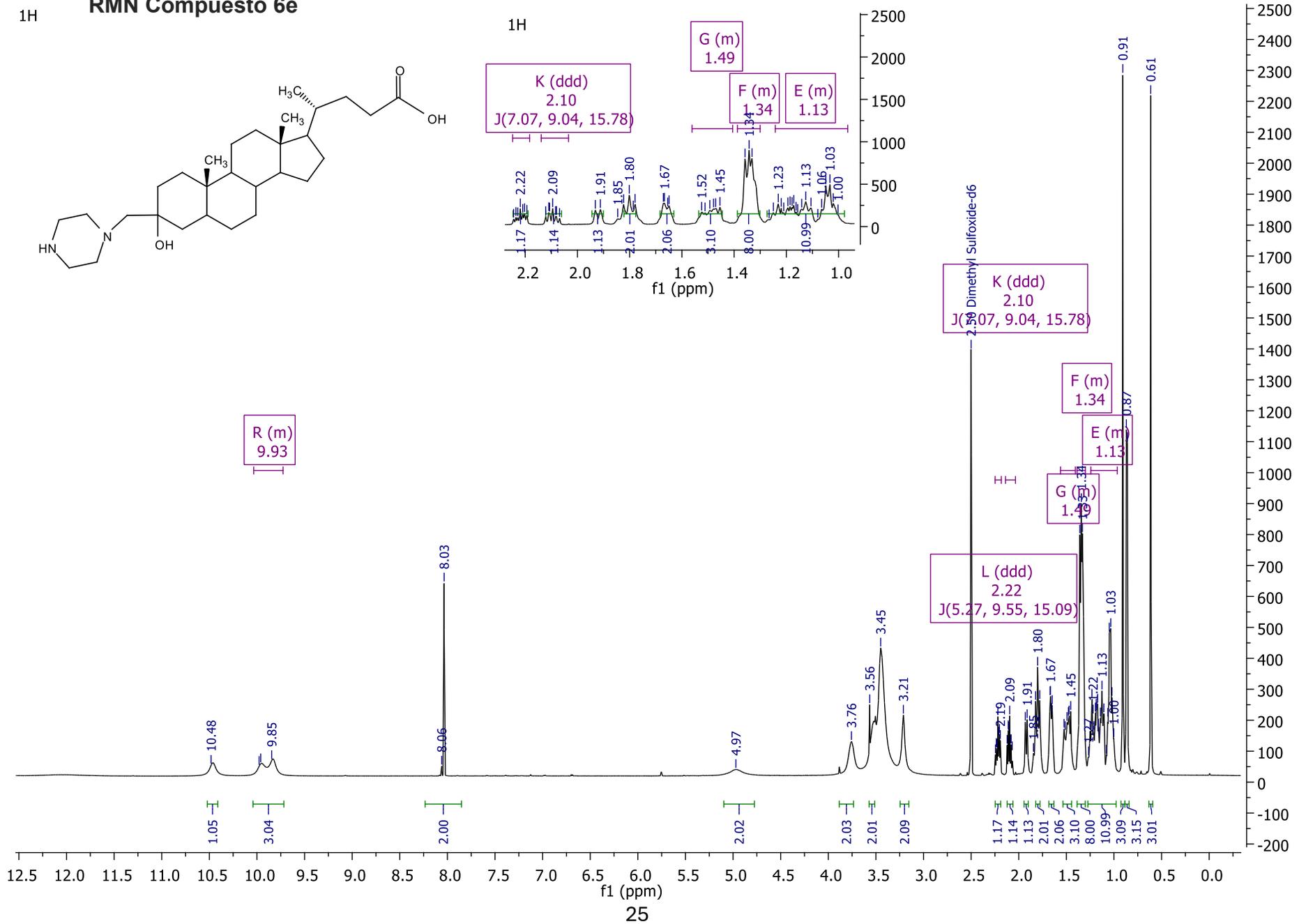
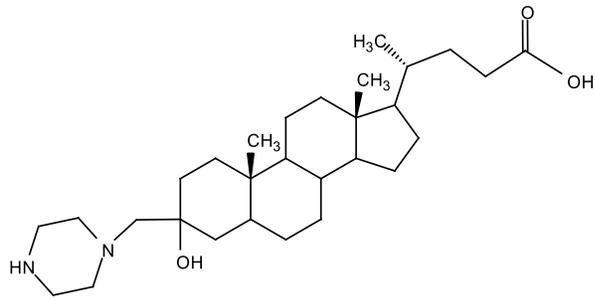
¹H RMN Compuesto 6c



¹H RMN Compuesto 6d



¹H RMN Compuesto 6e



¹H RMN Compuesto 6f

