



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
DISEÑO, OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE FÁRMACOS Y BIOMOLÉCULAS**

**SÍNTESIS, ACTIVIDAD *IN SILICO E IN VITRO* DE DERIVADOS DEL ÁCIDO
LITOCÓLICO CON GRUPOS *N*-ARILAMINO EN POSICIÓN C3 COMO INHIBIDORES
DE LA PTP1B PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES TIPO 2 Y OBESIDAD**

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER
EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**PRESENTA
M. en C. MARÍA EUGENIA MENDOZA JASSO
2221800533**

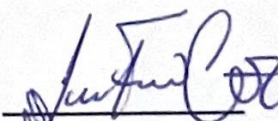
COMITÉ TUTORAL
Cotutor: Dr. Juan Francisco Cortés Benítez
Cotutor: Dr. Martín González Andrade
Asesor: Dr. Jaime Pérez Villanueva

Julio, 2026

**SÍNTESIS, ACTIVIDAD *IN SILICO* E *IN VITRO* DE DERIVADOS DEL ÁCIDO
LITOCÓLICO CON GRUPOS *N*-ARILAMINO EN POSICIÓN C3 COMO INHIBIDORES
DE LA PTP1B PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES TIPO 2 Y OBESIDAD**

Vo. Bo. DEL COMITÉ TUTORAL

Cotutor Dr. Juan Francisco Cortés Benítez



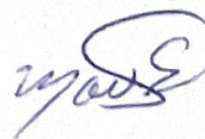
Cotutor Dr. Martín González Andrade



Asesor Dr. Jaime Pérez Villanueva



Alumna: M. en C. María Eugenia Mendoza Jasso



Matrícula: 2221800533

**SÍNTESIS, ACTIVIDAD *IN SILICO* E *IN VITRO* DE DERIVADOS DEL ÁCIDO
LITOCÓLICO CON GRUPOS N-ARILAMINO EN POSICIÓN C3 COMO INHIBIDORES
DE LA PTP1B PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES TIPO 2 Y OBESIDAD**

JURADO

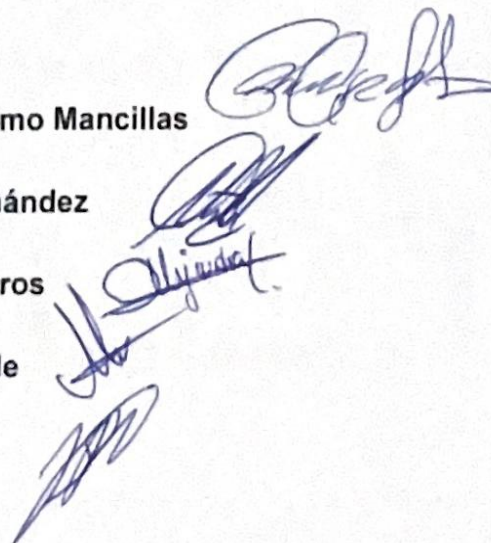
Presidente: Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Secretario: Dr. Martín Gómez Hernández

Vocal: Dra. Alejandra Chávez Riveros

Vocal: Dr. Martín González Andrade

Vocal: Dr. Jaime Pérez Villanueva



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Dr. Juan Francisco Cortés Benítez, por invitarme a formar parte de su grupo de trabajo e investigación, así como al Dr. Jaime Pérez Villanueva y al Dr. Martín González Andrade por la supervisión en el desarrollo y culminación de este proyecto.

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la Beca Nacional para Estudios de Posgrado (CVU: 480269). Y por el Apoyo Complementario de Movilidad en el Extranjero, Movilidad Nacional, Movilidad en los Sectores de Interés y Movilidad para Programas de Doble Titulación 2025.

A la SECIHTI por el proyecto CF-2023-I-186.

A la Universidad Autónoma Metropolitana–Unidad Xochimilco (UAM–X) por la Beca de Movilidad Internacional de Posgrado y por la Beca para el curso de idioma en línea de Posgrado.

A la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM–X, por el proyecto “Estudios *in silico*, síntesis y actividad biológica de compuestos antidiabéticos”.

Al Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo (LSVP) de la UAM–Iztapalapa por el tiempo de cómputo requerido para la realización de los estudios *in silico*.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA–UNAM), por los proyectos PAPIIT–IN203222 e IN205025,

A la Dirección General de Tecnologías de la Información y Comunicación de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGTIC–UNAM), por el proyecto LANCAD–UNAM–DGTIC–313.

Al Dr. Félix Matadamas y a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias – UIMEIP del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI por el espacio otorgado para la realización de las pruebas *in vitro* con líneas celulares.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. Martín González Andrade, quien no sólo fue un tutor, sino que además fue un gran guía y líder durante todo el desarrollo del proyecto. Por cada una de sus grandes aportaciones a la realización de este trabajo. Agradezco no sólo la confianza que depositó en mí, sino también todas las veces que me escuchó, aprobó y me incitó a desarrollar cada una de mis ideas en pro de un trabajo de calidad, así como por alentarme y confiar en mí en la realización de una estancia en el extranjero.

Al Dr. Martín Gómez y al Dr. Juan Manuel Martínez, excoordinador y coordinador, respectivamente, del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Farmacéuticas, por el apoyo brindado para el ingreso y la permanencia en el posgrado.

Al jurado por la revisión, aportaciones, sugerencias y recomendaciones para la mejora del escrito.

A Yazmín, Ledy y Mitzi, por todos los conocimientos, momentos, frustraciones y logros compartidos, por hacer del doctorado algo ameno. Gracias, chicas.

A mis amigos del “Yo soy 125” por apoyarme desde el inicio de este proyecto y no juzgarme por las decisiones que tomé.

A Bere, Iván y Janeth por su valiosa amistad, por su acompañamiento cotidiano a la distancia durante 9 meses, por escucharme y motivarme a seguir adelante.

A mi familia, por todo el apoyo que siempre han brindado. En especial a mis papás y a Ceci, quienes siempre han sido mis más grandes pilares, además de un gran ejemplo de trabajo, compromiso, responsabilidad, valentía y resiliencia. ¡LOS AMO!

RESUMEN

En años recientes, la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) se ha convertido en una diana farmacológica prometedora para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y la obesidad, dando lugar al desarrollo de terapias enfocadas en la inhibición de PTP1B. En el presente trabajo se presentan 15 nuevos derivados del ácido litocólico con un grupo α -bencilaminometilo en la posición C3 del esteroide, los cuales fueron evaluados en la forma corta (*h*PTP1B_{1–285}) y larga (*h*PTP1B_{1–400}) de PTP1B. Los derivados evaluados inhibieron la enzima PTP1B. Conjuntamente, estos presentaron una mejor inhibición de *h*PTP1B_{1–400} versus *h*PTP1B_{1–285}, además de ser selectivos en comparación con la proteína tirosina fosfatasa de células T (TCPTP). En ensayos de cinética enzimática, mostraron una inhibición acompetitiva de PTP1B.

Mediante ensayos celulares se determinó también el potencial anti-obesidad, vía la inhibición de un modelo de diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos con células 3T3–L1. Los compuestos **6c** y **6l** inhibieron la diferenciación a adipocitos, mostrando un perfil similar al del control, atorvastatina.

Ensayos de citotoxicidad fueron llevados a cabo mediante el método de sulforrodamina B (SRB) empleando células HFF–1 y 3T3–L1. Los compuestos **6c** y **6l** destacaron al no mostrar potencial citotóxico en el rango de concentración evaluado (3.125–100 μ M), mientras que los derivados **6m** y **6n** presentaron concentraciones citotóxicas medias (CC₅₀) alrededor de 40 μ M en ambas líneas celulares.

Estudios de acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular (MDS) fueron diseñados para determinar el modo de interacción de los nuevos derivados con la región desestructurada de la enzima. Los estudios de acoplamiento molecular revelaron interacciones de tipo hidrofóbico, así como puentes de hidrógeno con residuos de aminoácidos de la región desestructurada. Por su parte, las MSD mostraron que estas interacciones prevalecen durante la simulación (200 ns), mostrando la importancia de esta región en la actividad biológica e inhibición de PTP1B.

ABSTRACT

In recent years, the protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) has emerged as a promising target for the treatment of type 2 (T2DM) diabetes mellitus and obesity, leading to the development of therapies aimed at inhibiting PTP1B. In this study, we introduce a series of fifteen novel 3 α -bencilaminomethyl lithocholic acid derivatives, which were subject to evaluation as potential inhibitors for PTP1B using *h*PTP1B_{1–285} and *h*PTP1B_{1–400}. The evaluated compounds inhibit both isoforms. Overall, they show enhanced inhibition for *h*PTP1B_{1–400}. Selectivity assays were conducted using the TCPTP enzyme. The newly synthesized compounds have been shown to exhibit a 75-fold increase in selectivity for PTP1B in comparison to TCPTP.

Kinetic enzymatic studies were developed to determine the type of inhibition of the new compounds using the isoform *h*PTP1B_{1–400}. The new compounds exhibit uncompetitive inhibition.

Assays with 3T3–L1 cells were conducted to ascertain the anti-obesity potential of the novel compounds, with the assay measuring the inhibition of differentiation from pre-adipocytes to adipocytes. Derivatives **6c** and **6l** exhibit a comparable inhibition profile to that of the control atorvastatin.

Finally, the media cytotoxic concentration of the compounds was determined using the sulforhodamine B method and HFF–1 and 3T3–cells. The compounds **3c** and **3l** demonstrate no evidence of cytotoxic effect at the concentration range (3.25–100 μ M). Meanwhile, derivatives **6m** and **6m** demonstrate cellular toxicity at approximately 40 μ M.

Docking studies and molecular dynamics simulations were performed to determine how the new compounds interact with the C-unstructured region of *h*PTP1B_{1–400}. The presence of both hydrophobic interactions and H-bond interactions were detected, and these interactions persisted throughout the duration of the simulation (200 ns). This observation underscores the significance of this region in the inhibition of PTP1B.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1. Productos naturales como fuente para el diseño y síntesis de inhibidores de PTP1B.....	3
2.1.1. El ácido litocólico como inhibidor de PTP1B	5
2.1.2. La trodusquemina, a un paso del éxito.....	6
3. Antecedentes	8
3.1. Diabetes mellitus.....	8
3.1.1. La diabetes mellitus en números	8
3.1.2. Resistencia a la insulina	11
3.1.3. Tratamiento farmacológico de la DMT2.....	13
3.2. Obesidad	15
3.2.1. Índice de masa corporal (IMC) como criterio para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad	16
3.2.2. Factores de riesgo para el desarrollo de la obesidad	17
3.2.3. Tejido adiposo	18
3.2.4. Manejo y tratamiento de la obesidad	19
3.2.5. La obesidad y su relación con la leptina.....	18
3.2.6. Leptina, obesidad y DMT2.....	22
3.3. Proteínas tirosina fosfatasas	23
3.3.1. Proteína tirosina fosfatasa 1B.....	24
4. Planteamiento del problema.....	36
5. Hipótesis.....	37
6. Objetivos	38
6.1. Objetivo general.....	38
6.2. Objetivos específicos.....	38
7. Materiales y métodos	39
7.1. Reactivos y equipos.....	39
7.2. Cromatografía y punto de fusión	39
7.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear: RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C.....	37
7.4. Espectrometría de masas: ESI-MS.....	40
7.5. Síntesis de los nuevos derivados del ácido litocólico con un grupo bencilaminometilo en C3 (6a-6o).....	39
7.5.1. Síntesis de 3 α -hidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (2).....	40

7.5.2. Síntesis de 3-oxo-5 β -colan-24-oato de metilo (3)	40
7.5.3. Síntesis de 3 β -oxirano-5 β -colan-24-oato de metilo (4)	40
7.5.4. Método general de síntesis de los intermediarios 5a-5o	42
7.5.5. Método general de síntesis de los 3 α -bencilaminometilo derivados de ácido litocólico (6a-6o)	43
7.6. Ensayos <i>in vitro</i>	51
7.6.1. Ensayos enzimáticos	51
7.6.2. Ensayos con líneas celulares	53
7.7. Estudios computacionales	55
7.7.1. Modelo estructural de hPTP1B ₁₋₄₀₀ y hTCPTP ₁₋₄₁₅	55
7.7.2. Modelado molecular (docking molecular)	55
7.7.3. Estudios de simulación de dinámica molecular (MDS)	56
8. Resultados y discusión	57
8.1. Parte química	58
8.2. Ensayos de actividad biológica	64
8.2.1. Ensayos enzimáticos	64
8.2.2. Ensayos en líneas celulares	71
8.3. Estudios computacionales	77
8.3.1. Estudios de acoplamiento molecular (docking molecular)	78
8.3.2. Estudios de simulación de dinámica molecular (MDS)	82
9. Conclusiones	87
10. Referencias	88
ANEXO I	
Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C de los intermediarios y derivados 3 α -bencilaminometilo del ácido litocólico	98
ANEXO II	
Informe de la fórmula del espectro de masas (EM) de los derivados 3 α -bencilaminometilo del ácido litocólico	123
ANEXO III	
Gráficos de selectividad de los derivados 3 α -bencilaminometilo (6m-6o) y controles	133
ANEXO IV	
Actividad inhibitoria de los derivados del ácido litocólico en la síntesis de lípidos	136
ANEXO V	
Gráficos de trayectoria de las simulaciones de dinámica molecular de los derivados 3 α -bencilaminometilo del ácido litocólico	140
ANEXO VI	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Parámetros de diagnóstico para DM	11
Tabla 3.2. Fármacos actualmente empleados para el tratamiento de DMT2	14
Tabla 3.3. Índice de masa corporal y clasificación del grado de obesidad	17
Tabla 3.4. Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la obesidad	21
Tabla 3.5. Sitio catalítico y sitios de unión adyacentes al sitio catalítico de PTP1B	33
Tabla 8.1. Desplazamientos químicos (ppm) detectados por RMN- ¹ H de los nuevos derivados 3α-bencilaminometilo del ácido litocólico	61
Tabla 8.2. Desplazamientos químicos (ppm) detectados por RMN- ¹³ C de los nuevos derivados 3α-bencilaminometilo del ácido litocólico	62
Tabla 8.3. Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de los nuevos derivados 3α-bencilaminometilo de ácido litocólico (6a-6o).....	66
Tabla 8.4. Parámetros electrónicos, lipófilos y estéricos para los derivados 6a-6o	67
Tabla 8.5. Parámetros cinéticos y tipo de inhibición en <i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀ de los nuevos derivados del AL	69
Tabla 8.6. Selectividad del AL y derivados en PTP1B vs TCPTP.....	71
Tabla 8.7. Concentración citotóxica media (CC ₅₀) de los nuevos derivados de ácido litocólico en fibroblastos humanos, de ratón y en adipocitos	72
Tabla 8.8. Resultados de los estudios de acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular (MDS) del ácido litocólico y sus derivados	80

ÍNDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS Y GRÁFICOS

Figura 2.1. Inhibidores de naturaleza terpenoide de PTP1B.....	4
Figura 2.2. Ácido litocólico y derivado 4-fenilpirazol como inhibidores de PTP1B.	6
Figura 2.3. Trodusquemina y su análogo metilaminobutamino DPM-1001.....	7
Figura 3.2. Dominios estructurales de PTP1B. E.....	25
Figura 3.3. Sitios de unión de ligandos en PTP1B.	26
Figura 3.5. Representación gráfica del grado de homología entre PTP1B y TCPTP.	30
Figura 3.6. Inhibidores ortostéricos y alostéricos de PTP1B.	33
Figura 3.7. Sitio catalítico y sitios adyacentes al sitio catalítico de PTP1B:	34
Figura 3.8. Ejemplos de inhibidores bidentados de PTP1B	35
Figura 4.1. Estrategia de modificación estructural del AL para la obtención de derivados <i>N</i> -arilamino como potenciales inhibidores de PTP1B	37

Esquema 7.1. Reactivos y condiciones de síntesis.	40
Esquema 8.1. Rendimientos obtenidos en la síntesis de los nuevos derivados del AL.....	58
Figura 8.1. Cinética enzimática de inhibición de hPTP1B ₁₋₄₀₀	70
Gráfico 8.1. Efecto de los nuevos derivados de AL en la viabilidad celular de células HFF-1. .	73
Gráfico 8.2. Efecto de los nuevos derivados de AL en la viabilidad celular de células 3T3-L1.	74
Gráfico 8.3. Efecto de los nuevos derivados de AL en la viabilidad celular de adipocitos.....	74
Gráfico 8.4. Cuantificación de lípidos (%) tras inducir la diferenciación de células 3T3-L1	77
Figura 8.2. Modelo 2D de las interacciones generadas entre los residuos de aminoácidos de la región C-terminal desestructurada de hPTP1B ₁₋₄₀₀ con ácido ursólico y TCS401.	78
Figura 8.3. Modelo 2D de las interacciones generadas entre los residuos de aminoácidos de la región C-terminal desestructurada de hPTP1B ₁₋₄₀₀ con ácido litocólico y 6m.	79
Figura 8.4. Modelo 2D de las interacciones de los derivados 6e, 6f, 6n y 6o con aminoácidos de la región C-terminal desestructurada de hPTP1B ₁₋₄₀₀	82
Figura 8.5. Modelo estructural en 3D de la enzima hPTP1B ₁₋₄₀₀	83
Figura 8.6. Matriz de contactos de residuos de con el compuesto 6m generada a partir de la MDS.	86

ABREVIATURAS

3T3–L1	Fibroblastos de ratón	dd	doble de doble
Å	Angstrom	DE	Desviación estándar
ACG	Ácido clorogénico	DM	Diabetes mellitus
AL	Ácido litocólico	DMSO–d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
Ala	Alanina	DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
Arg	Arginina	DPP–4	Dipeptidil peptidasa–4
Asn	Asparagina	DXM	Dexometasona
Asp	Ácido aspártico	ECV	Enfermedad cardiovascular
ATOR	Atorvastatina	EMAR	Análisis de masa exacta
ATP	Adenosina trifosfato	ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
UA	Ácido ursólico	Es	Coeficiente de Taft
AVAD	Años de vida ajustados por discapacidad	FFAR1	Receptor de ácidos grasos libres –1
BAT	Tejido adiposo marrón	FGP	Concentración de glucosa plasmática en ayunas
BBB	Barrera hematoencefálica	Gln	Glutamina
β–IR	Receptor de insulina beta	Glu	Ácido glutámico
CC	Cromatografía en columna	Gly	Glicina
CC ₅₀	Concentración citotóxica media	GPCR	Receptor acoplado a proteína G
CCF	Cromatografía en capa fina	HBA	Aceptor de puentes de hidrógeno
CDCA	Ácido quenodesoxicólico	HbA1c	Hemoglobina glucosilada
CDCl ₃	Cloroformo deuterado	HFF–1	Fibroblastos de humano
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media	His	Histidina
COSY	Espectroscopía de correlación	HMBC	Correlación de enlaces múltiples heteronucleares
CRP	Proteína C reactiva	<i>h</i> PTP1B _{1–285}	Forma corta de PTP1B
Cys	Cisteína	<i>h</i> PTP1B _{1–400}	Forma larga de PTP1B

HSQC	Consistencia cuántica única heteronuclear	MHz	Megahertz
IBMX	Isobutilmetilxantina	MR	Refractividad molar
IL-6	Interleucina-6	NOESY	Espectroscopía del efecto nuclear Overhauser
Ile	Isoleucina	OID	Obesidad inducida por la dieta
IMC	Índice de masa corporal	OMS	Organización Mundial de la Salud
Ins	Insulina	OPS	Organización Panamericana de la Salud
IR	Receptor de insulina	OV	Ortovanadato de sodio
IRS	Sustrato del receptor de insulina	PFA	<i>para</i> -formaldehído
<i>J</i>	Constante de acoplamiento	PGZ	Pioglitazona
JAK2	Cinasa Janus 2	Phe	Fenilalanina
K	Kelvin	PIK3/Akt	Fosfatidilinositol-3-cinasa
kDa	Kilodalton		
<i>K_i</i>	Constante de inhibición enzimática	PKB	Proteína cinasa B
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis	pNP	<i>para</i> -nitrofenol
LepRb	Receptor de leptina	pNPP	<i>para</i> -nitrofenilfosfato
Leu	Leucina	POMC	Propiomelanocortina
LogP	Coefficiente de partición n-octanol-agua	PPAR γ	Receptor de proliferación de peroxisoma gamma
Lys	Lisina	Pro	Prolina
m	múltiple	ps	picosegundos
<i>m/z</i>	Relación masa-carga	PTGO	Prueba tolerancia a la glucosa oral
MDS	Simulaciones de dinámica molecular	PTK	Proteína tirosina cinasa
MID	Medio de inducción de la diferenciación	PTP	Proteínas tirosina fosfatasas
Met	Metionina	PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
MET	Metformina	pTyr	Fosfotirosina

RMN	Resonancia magnética nuclear	TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
RO	Rojo oleoso	Trp	Triptofano
RMSD	Desviación de la media cuadrática	Tyr	Tirosina
RMSF	Fluctuación de la media cuadrática	UDCA	Ácido ursodesoxicólico
s	simple/singulete	Val	Valina
SAR	Relación estructura-actividad	Vit. B12	Vitamina B12
SFB	Suero fetal bovino	V_{max}	Velocidad máxima
SNC	Sistema nervioso central	WAT	Tejido adiposo blanco
SOCS3	Supresor de la señalización de citocinas	WPD	Triptofano-prolina-ácido aspártico
SRB	Sulforrodamina B	ΔG	Energía libre de Gibbs
STAT3	Transductor de señales y activador de transcripción 3	π	Pi de Hansch
SUR	Suramina	σ	Sigma de Hammett
TCPTP	Proteína tirosina fosfatasa de células T		
Thr	Treonina		

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un problema de salud pública a nivel mundial y se encuentra entre las principales causas de muerte. En el año 2022, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que para el año 2045, 693 millones de personas se verían afectadas por este padecimiento. No obstante, en su reporte más reciente (noviembre de 2024), la OMS reportó un total de 830 millones de pacientes con diabetes, superando la estimación predicha. De acuerdo con datos de esta organización, la DM es una de las principales causas de ceguera en adultos, insuficiencia renal, infarto al miocardio, accidente cerebrovascular y amputaciones de miembros inferiores en adultos (WHO, 2024).

En México, el 90% de los casos de DM se relacionan con el sobrepeso y la obesidad, sin olvidar que estas afecciones van en aumento en todo el mundo. Las cifras actuales en México señalan que el 70% de los adultos tienen sobrepeso u obesidad. Aunque ejercitarse y comer saludablemente son las formas de prevenir la DM tipo 2 (DMT2) y la obesidad, en la realidad, desafortunadamente, el ritmo de trabajo diario y el sedentarismo del mexicano, acompañados de una dieta alta en calorías, llevan a desarrollar con más facilidad ambos padecimientos (Federación Mexicana de Diabetes, 2024). Ante esta problemática, actualmente existen fármacos para el tratamiento de la DMT2 y la obesidad; sin embargo, muchos de ellos presentan efectos adversos que disminuyen la calidad de vida del paciente. Es por ello que surge la necesidad de diseñar moléculas que ofrezcan un tratamiento farmacológico que aborde la DMT2 y la obesidad como una sola enfermedad, además de que sean fármacos con un perfil de efectos adversos menores y de bajo costo.

A la fecha, se han identificado diversas dianas farmacológicas para tratar la diabetes y la obesidad; entre estas destaca la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B). Esta proteína es un regulador negativo de las vías de señalización de insulina y leptina, hormonas asociadas a la homeostasis de la glucosa y al balance energético, respectivamente (Coronell-Tovar et al., 2023; Tiganis & Tonks, 2025; Z. Y. Zhang et al., 2015). Aunado a ello, ha sido validada como diana terapéutica para el tratamiento de diabetes y obesidad. En consecuencia, muchos productos naturales han sido evaluados como potenciales

inhibidores de PTP1B; entre ellos, destaca el ácido litocólico, que ha sido reportado como un inhibidor débil (H. B. He et al., 2012).

En este trabajo se reportan 15 nuevos derivados del ácido litocólico, los cuales fueron evaluados como inhibidores de la enzima PTP1B. También se determinó su selectividad frente a la proteína tirosina fosfatasa de células T (TCPTP). De estos resultados, los derivados **6m** y **6n**, presentaron el mejor potencial para inhibir de manera acompetitiva a la enzima con valores de K_i de **2.5** y **3.4 μM** , respectivamente, y mostraron ser hasta 75 veces más selectivos hacia PTP1B. Estudios de acoplamiento molecular y de simulación de dinámica molecular ayudaron a determinar cómo es que estos compuestos se unen a un sitio de la región C-terminal desestructurada de PTP1B, evidenciando la importancia que juega esta región en la inhibición de la enzima.

Posteriormente, se evaluó su efecto citotóxico en pre-adipocitos humanos (HFF-1) y de ratón (3T3-L1) y su potencial como inhibidores de la síntesis de lípidos. De estos ensayos, se encontró que los derivados **6m** y **6n** presentaron efecto citotóxico, mientras que los derivados **6c** y **6l**, junto con el ácido litocólico, inhibieron la síntesis de lípidos de manera similar a como lo hace la atorvastatina.

Basados en estos resultados, el ácido litocólico y sus derivados, **6c** y **6l**, podrían considerarse como potenciales agentes anti-obesidad y/o antidiabéticos. No obstante, estudios de farmacocinética y farmacodinámica en modelos animales, así como ensayos clínicos, son requeridos para confirmar este potencial.

2. MARCO TEÓRICO

A la fecha, existe una extensa colección de inhibidores de PTP1B que mimetizan la fosfotirosina (pTyr). Sin embargo, ninguno de estos inhibidores ha sido aprobado. Una característica en común es que estas moléculas suelen interactuar con el sitio catalítico de la enzima, el cual está altamente conservado, convirtiéndolas en inhibidores poco selectivos.

2.1. PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE PARA EL DISEÑO Y SÍNTESIS DE INHIBIDORES DE PTP1B

Los productos naturales han sido y siguen siendo una fuente muy importante para la identificación de compuestos cabeza de serie (leads) en el descubrimiento de fármacos. Se han hecho muchos esfuerzos farmacológicos para identificar y obtener compuestos líderes a partir de productos naturales con potencial antidiabético. Un amplio rango de productos naturales como ácidos grasos, compuestos fenólicos, terpenoides, esteroides y alcaloides han sido reconocidos como potentes inhibidores de PTP1B (Yang et al., 2020).

Dentro de los productos naturales que se han reportado como potentes inhibidores de esta enzima se encuentran los derivados esteroidales como el ácido litocólico y triterpenos pentacíclicos tales como los ácidos betulínico, oleanólico, maslínico y ursólico (Figura 2.1) (X. L. He et al., 2017; Jones, 2012; Qian et al., 2010).

A partir de estas estructuras como base, se han generado derivados semisintéticos que han demostrado tener una mejor actividad inhibitoria sobre PTP1B que sus productos de partida. Las modificaciones estructurales que se han realizado contemplan la fusión de un heterociclo con el anillo A del triterpeno, por ejemplo, un anillo de pirazol fusionado con el ácido oleanólico, o la fusión del indol con el ácido glicirretínico (Figura 2.1). (H. B. He et al., 2012; Qian et al., 2010).

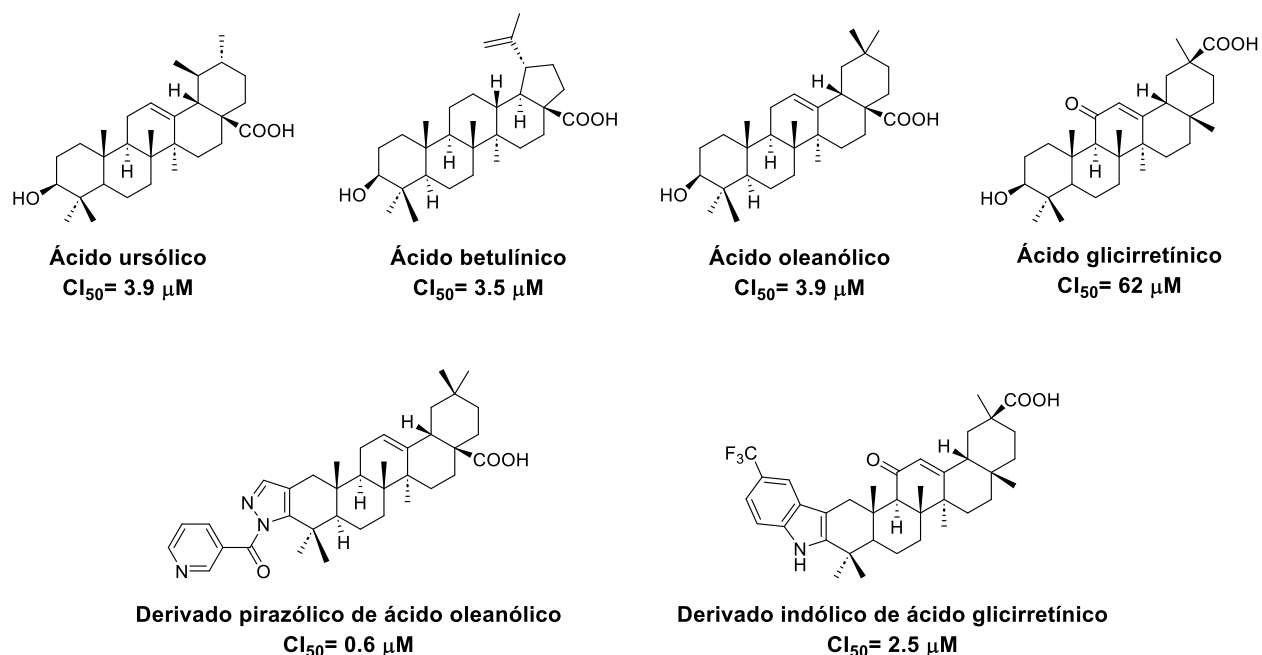


Figura 2.1. Inhibidores de naturaleza terpenoide de PTP1B

De acuerdo con estudios de Relación Estructura–Actividad (SAR, por sus siglas en inglés), para derivados del ácido litocólico se encontró que: a) la presencia de sustituyentes en el heterociclo tienen una contribución fundamental en la inhibición de la enzima, esto por los efectos de carga que estos sustituyentes generan, b) el tamaño del anillo heterocíclico no tiene influencia en la actividad inhibitoria de la enzima y c) la presencia del grupo carboxilo en C–24 es fundamental para la actividad (H. B. He et al., 2012)

2.1.1. EL ÁCIDO LITOCÓLICO COMO INHIBIDOR DE PTP1B

El ácido litocólico (AL) es un monoácido biliar hidrofóbico que se obtiene por la 7–deshidroxilación bacteriana de los ácidos quenodesoxicólico (CDCA) y ursodesoxicólico (UDCA). El AL y sus derivados han llamado la atención por su amplia gama de actividades biológicas, tales como actividad antibacteriana, antifúngica, como modulador del receptor de vitamina D, así como también actividad inhibitoria de PTP1B, reportando un valor de $CI_{50} = 12.7 \mu M$ por lo que se considera un inhibidor débil (X. L. He et al., 2017). Hai–Bing He y colaboradores se dieron a la tarea de investigar y proponer derivados de AL basados en la premisa de que es necesario un fragmento mono ácido (se une al sitio catalítico de PTP1B) y que la presencia de una cadena hidrofóbica es esencial para la actividad inhibitoria (H. B. He et al., 2012).

Posteriormente, en el mismo grupo diseñaron, sintetizaron y evaluaron derivados del ácido litocólico con un grupo *N*–fenilpirazol fusionado al anillo A (Figura 2.2). Después de realizar estudios SAR y de acoplamiento molecular, encontraron que la presencia del grupo fenilo es esencial para la actividad inhibitoria de PTP1B. Además, el grupo carboxilo en C24 genera una interacción de puente salino con la Arg¹²¹ y el –OH del carboxilo muestra un puente de hidrógeno con Glu¹¹⁵ del sitio activo de la proteína (H. B. He et al., 2012). Aunado a esto, se observó que, para su derivado más potente, sustituido con 4–fluorofenilo, éste se unía al segundo sitio de unión de la pTyr de la PTP1B a través de puentes de hidrógeno con el grupo guanidina de la Arg²⁵⁴ considerando esta interacción como crucial para reforzar el complejo ligando–PTP1B (Mao et al., 2015).

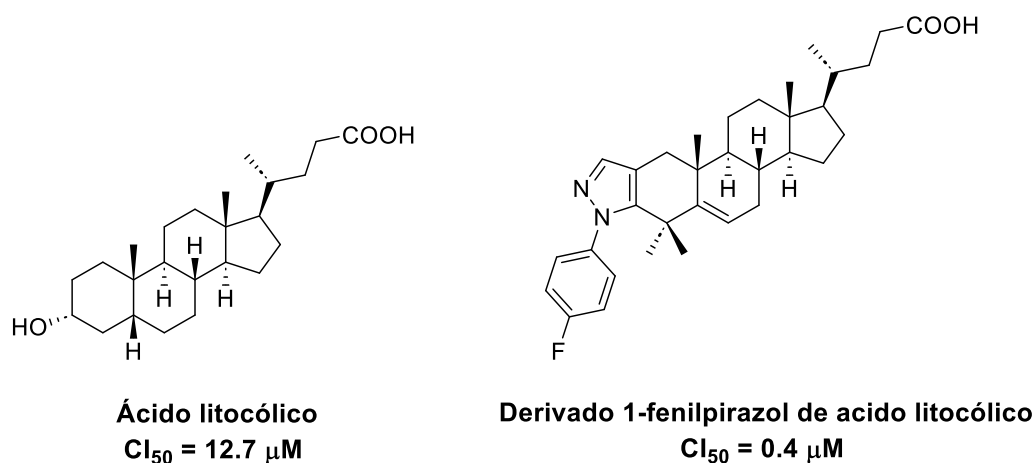


Figura 2.2. Ácido litocólico y su derivado 4-fenilpirazol como inhibidores de PTP1B.

2.1.2. LA TRODUSQUEMINA, A UN PASO DEL ÉXITO

Los inhibidores de PTP1B tienen una característica en común: suelen ser estructuras con grupos altamente cargados, lo que ha limitado su biodisponibilidad. No obstante, hay que señalar que existe un número limitado de inhibidores de PTP1B, tales como el Ertiprotafib, la Trodusquemina y JTT-1, que han avanzado a ensayos clínicos (Koren & Fantus, 2007).

Khrisnan y colaboradores (2018), a través de una serie de estudios sobre PTP1B empleando la trodusquemina, concluyeron que esta es un inhibidor específico, reversible y no competitivo de PTP1B que se une a través del segmento C-terminal extendido de la enzima (sitio alostérico). Desafortunadamente, al ser una molécula altamente cargada, en pH fisiológico su biodisponibilidad oral está limitada y no lo hace un buen candidato para su uso como agente antidiabético y/o para el tratamiento de la obesidad (Krishnan et al., 2018).

En sus esfuerzos por encontrar análogos de trodusquemina más potentes, el mismo grupo de investigación diseñó el compuesto DPM-1001. A diferencia de la trodusquemina, en DPM-1001 el grupo espermina de la posición C3 fue sustituido por un grupo piridin-2-il-metilaminobutamina, así como la incorporación de un grupo metil éster en la posición C24 en lugar del grupo sulfato (Figura 2.3). Ambos derivados fueron evaluados contra PTP1B, encontrando que DPM-1001 fue 6 veces más potente ($CI_{50} = 100 \text{ nM}$) que su análogo trodusquemina ($CI_{50} = 600 \text{ nM}$) (Krishnan et al., 2018).

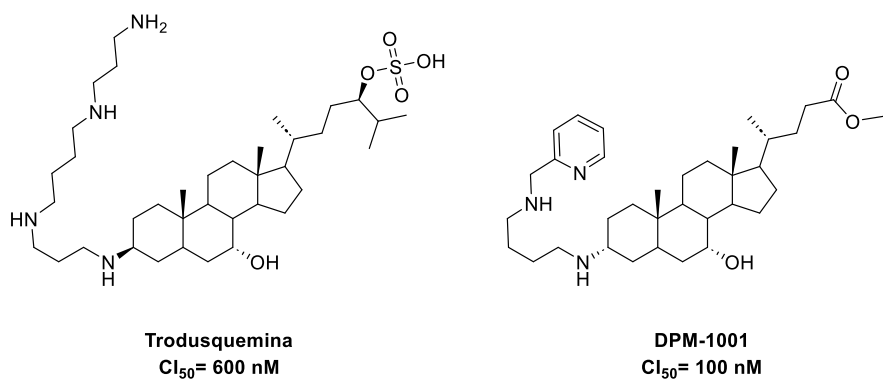


Figura 2.3. Trodusquemina y su análogo metilaminobutamino DPM-1001.

Tomando en consideración estos antecedentes, se plantea la incorporación de un grupo arilamino en la posición C3 del ácido litocólico, así como la conservación del grupo ácido en C24, lo cual favorecerá el potencial inhibitorio de este esteroide, que previamente ha sido reportado como inhibidor débil de PTP1B.

3. ANTECEDENTES

3.1. DIABETES MELLITUS

La OMS define a la diabetes mellitus (DM) como una enfermedad crónico–degenerativa que se presenta cuando el páncreas no secreta suficiente insulina o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. Un efecto común de esta enfermedad es la hiperglucemia (niveles de glucosa elevados en sangre), que con el tiempo daña, de manera grave, muchos órganos y sistemas del organismo, afectando principalmente al sistema nervioso y al sistema circulatorio (WHO, 2024).

3.1.1. LA DIABETES MELLITUS EN NÚMEROS

En noviembre de 2024, la OMS reportó que el número de pacientes con DM aumentó de 200 millones en 1990 a 830 millones en 2022. Es decir, el número de personas con DM se cuadruplicó en los últimos 30 años y los países de ingresos medios fueron los que presentaron la mayor prevalencia. Para el año 2014, el 14% de los adultos mayores de 18 años vivía con DM, lo que supone un aumento respecto al porcentaje en 1990, que era del 7%. Desde el año 2000, las tasas de mortalidad por DM han aumentado. En 2021, este padecimiento fue la causa directa de 1.6 millones de defunciones, de las cuales el 47% correspondió a pacientes con una edad menor a los 70 años, mientras que otras 530 mil personas fallecieron a causa de nefropatía diabética, y el 11% de las defunciones se debieron a falla cardiovascular como consecuencia de la hiperglucemia (WHO, 2024).

3.1.1.1. DIABETES MELLITUS EN LAS AMÉRICAS

En el año 2023, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reportó que, en la región de las Américas, la cifra de adultos mayores de 18 años se había triplicado desde 1990, alcanzando un total de 112 millones de pacientes diabéticos. Este padecimiento causa, en promedio, la muerte prematura de 8 millones de personas y es la tercera causa de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD), precedida sólo por la cardiopatía isquémica y el COVID–19. La OPS también reporta que el incremento de este padecimiento va de la mano con los factores de riesgo. Las Américas son la región con

los niveles más altos de sobrepeso/obesidad e inactividad física del mundo. 68% de los adultos sufren sobrepeso u obesidad y 36% tienen un nivel de actividad física insuficiente (OPS, 2025).

En el caso de la población menor de 18 años, el aumento de factores de riesgo para el desarrollo de la DM2 es alarmante. El 16% y 19% de la población adolescente e infantil, respectivamente, tienen obesidad; mientras que 81 de cada 100 adolescentes practican actividad física insuficiente (OPS, 2025).

De manera general, en la región de América del Norte y el Caribe, se estima que 56 millones de personas viven con DM. Según el Atlas de Diabetes, el número de individuos con diabetes, en esta región, alcanzará los 68 millones para 2050. En 2015, los gastos de salud para la diabetes en América del Norte y el Caribe se estimaron en \$439 mil millones de dólares (International Diabetes Federation, 2025).

3.1.1.2. DIABETES MELLITUS EN MÉXICO

En México, las cifras son alarmantes. Desde el año 2000, la DM es la primera causa de muerte entre las mujeres y la segunda entre los hombres. Para agosto de 2020, esta enfermedad causó cerca de 100 mil muertes en el país, siendo la tercera causa de muerte a nivel nacional. De acuerdo con datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2025), el 17 % de la población mexicana ha sido diagnosticada con DM y se estima que para 2045, la prevalencia de esta enfermedad oscilará entre el 11% y el 26% del total de la población (ENSANUT, 2025; Federación Mexicana de Diabetes, 2024).

Las principales complicaciones de la diabetes son el desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV), ceguera, nefropatía, úlceras en los pies y amputaciones. El riesgo de morir por ECV y todas las complicaciones antes señaladas es entre 2 y 3 veces mayor en personas diabéticas que en las personas sin diabetes (International Diabetes Federation, 2025). En México, el 90% de los casos de DM se relacionan con el sobrepeso y la obesidad, sin olvidar que estas afecciones aumentan a nivel mundial. Cifras actuales señalan que el 70% de los adultos presentan sobrepeso u obesidad, lo cual es un problema que ha generado un gasto aproximado de \$3,872 millones de dólares anuales a

la economía mexicana. En un futuro próximo, México no será capaz de subsidiar dicho problema (Federación Mexicana de Diabetes, 2024).

3.1.1.3. DIABETES MELLITUS: CARACTERÍSTICAS Y DIAGNÓSTICO

La característica común de los tipos de diabetes *mellitus* (tipo 1, tipo 2 y gestacional) es la disfunción o destrucción de las células pancreáticas, las cuales no tienen la capacidad de reemplazarse debido a que el páncreas no es capaz de renovarlas después de los 30 años. Existen muchos factores que pueden dar lugar a una disminución de la función de las células pancreáticas, entre los más frecuentes están la predisposición genética, los procesos epigenéticos, la resistencia a la insulina, la autoinmunidad, las enfermedades recurrentes, la inflamación y determinados factores ambientales (International Diabetes Federation, 2025).

La DMT1 es la de menor incidencia en la población. Más del 90% de los casos de DM reportados son de tipo 2. Esta última se caracteriza porque el páncreas no es capaz de producir insulina suficiente o bien el cuerpo no es capaz de usarla adecuadamente (resistencia a la insulina). En ambos casos, la glucosa se acumula en sangre debido a que no puede ser asimilada de manera eficaz por las células del cuerpo, principalmente por el tejido adiposo, el tejido muscular y el hígado, generando que estas no funcionen adecuadamente. La acumulación de glucosa en sangre también afecta otros órganos, tales como los riñones, el corazón y los ojos (Federación Mexicana de Diabetes, 2024; International Diabetes Federation, 2025; WHO, 2024). Aunado a ello, otras complicaciones serias han sido asociadas con la diabetes, tales como un mayor riesgo de desarrollar cáncer, daño hepático, complicaciones relacionadas con infecciones, así como desórdenes afectivos y cognitivos (Tomic et al., 2022).

Para diagnosticar a un paciente como diabético, se usan principalmente tres pruebas de laboratorio: porcentaje de hemoglobina glucosilada en sangre (HbA1c), concentración de glucosa plasmática en ayunas (FGP), prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO). De

manera general, se han establecido valores universales para hacer el diagnóstico de esta enfermedad (Tabla 3.1) (American Diabetes Association, 2025).

Tabla 3.1. Parámetros de diagnóstico para DM

Diagnóstico	HbA1c (%)	FGP (mg/dL)	PTGO (mg/dL)
No diabético	< 5.7	< 100	< 140
Prediabetes	5.7–6.4	100–125	140–199
Diabetes	> 6.5	> 126	> 200

HbA1c: hemoglobina glucosilada. FGP: glucosa plasmática en ayunas. PTGO: prueba de tolerancia a la glucosa oral.

3.1.2. RESISTENCIA A LA INSULINA

La insulina es una hormona que desempeña múltiples funciones en el control de un número de actividades celulares tales como la homeostasis de la glucosa, la síntesis de proteínas, la transcripción de genes y el metabolismo. En relación con el metabolismo de los nutrientes, sus principales blancos son el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo, con la finalidad de mantener la homeostasis de la glucosa estimulando su absorción en el tejido adiposo y en los músculos, reprimiendo la posterior producción de glucosa en el hígado (Hussain et al., 2019).

La insulina es un péptido de 51 aminoácidos que consiste en dos cadenas polipeptídicas A y B de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente, conectadas por puentes disulfuro, y que es sintetizado y secretado por las células β -pancreáticas. Su función inicia cuando se une a su receptor (glucoproteína integral de membrana), el cual está conformado por dos subunidades α y dos subunidades β . La subunidad α (135 kDa) es extracelular y es la que contiene el sitio de unión de la insulina. Mediante puentes disulfuros se une a la otra subunidad α , así como al dominio extracelular de la subunidad β (95 kDa), la cual también cuenta con un dominio transmembranal y uno intracelular de cinasa, que es activado por autofosforilación (Gutiérrez-Rodelo, 2017; Hubbard, 2013).

Cuando la insulina se une a la subunidad α de su receptor (IR), se da lugar a una serie de cambios conformacionales que inducen su actividad catalítica y la autofosforilación de ciertos residuos de tirosina ubicados en la región extracelular de la subunidad β . Estos residuos fosforilados son reconocidos por diferentes proteínas, entre las que destaca la familia del sustrato del receptor de insulina (IRS), siendo IRS-1 e IRS-2 los principales sustratos e intermediarios en la etapa inicial de la vía de señalización de la insulina (Gutiérrez-Rodelo, 2017; Hubbard, 1997). Una vez activada esta vía, da lugar a la activación de la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PIK3)/Akt también conocida como proteína cinasa B (PKB). La cinasa Akt desempeña un rol importante en la cascada de señalización de la insulina, ya que, al activarse, da lugar a la fosforilación de un número significativo de sustratos clave para la función celular. A la fecha, se han reportado tres isoformas de Akt (1, 2 y 3), siendo Akt2 la que, al parecer, está involucrada en la homeostasis de la glucosa en el músculo y el tejido adiposo vía la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT-4) de compartimentos intracelulares a la membrana celular aumentando la captación de glucosa en la célula (M. Jensen & De Meyts, 2009; Manning & Cantley, 2007). Varios mecanismos y condiciones, tales como inflamación, disfunción mitocondrial e hiperinsulinemia, han sido propuestos como los principales factores involucrados en el desarrollo de resistencia a la insulina, y todos estos están relacionados con la obesidad (Boutari et al., 2023). La resistencia periférica a la insulina genera un estado de hiperinsulinemia compensatoria, generando un agotamiento de las células β , generando hiperglucemia sostenida y DM2. Esta condición da lugar al desarrollo de otros padecimientos, como la hipertensión, la dislipidemia y la arteriosclerosis (Gutiérrez-Rodelo, 2017).

El deterioro de la función de las células β -pancreáticas, así como la disminución de la actividad de las vías de PIK3/Akt es una característica observada en el transcurso del desarrollo de DM2 (Galicia-García et al., 2020). Esto se debe, principalmente, a que la vía de señalización de la insulina se encuentra alterada, lo que conlleva a una disminución en la actividad de los transportadores de glucosa, principalmente GLUT-1 y GLUT-4 (Maria et al., 2015), como consecuencia, la glucosa no puede atravesar la membrana plasmática del músculo, hígado y tejido adiposo, dando lugar a la resistencia a la insulina

debido a que el cuerpo pierde su habilidad para usarla de manera efectiva (Álvarez–Almazán et al., 2023; Klip et al., 1992).

3.1.2.1. REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA

Los procesos de fosforilación y desfosforilación de proteínas son cruciales en las distintas vías de señalización celular. Para el caso particular de la insulina, se ha demostrado que la actividad del receptor de insulina (IR) está regulada por la acción de proteínas tirosina fosfatasas (PTP) vía la desfosforilación de residuos específicos de Tyr del receptor activo, generando una disminución en su actividad. En particular, se sabe que la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) es un componente esencial en la regulación de la insulina. Mediante ensayos realizados en ratones *knock-out* de PTP1B se observó un aumento en la sensibilidad a la insulina y en la fosforilación de residuos de Tyr del IR, así como una resistencia al desarrollo de obesidad cuando fueron sometidos a una dieta rica en grasa (Boucher et al., 2014; Elchebly et al., 1999; Klamman et al., 2000). Por el contrario, cuando hubo sobreexpresión de PTP1B se observó una disminución en el grado de fosforilación de residuos de tirosina tanto en el IR como en el IRS–1, y por ende en AKT, así como de la secreción de insulina estimulada por la glucosa (Lu, 2016).

3.1.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA DMT2

Debido a su naturaleza multifactorial y a la variedad de blancos moleculares de las rutas metabólicas asociadas a la etiopatología de la DMT2, no existe un blanco terapéutico específico para intervenir con un tratamiento concreto para este padecimiento. A la fecha, se han identificado diversas dianas farmacológicas prometedoras para tratar y/o controlar esta enfermedad, entre las que se encuentran la PTP1B, la dipeptidil peptidasa–4 (DPP–4), el receptor de ácidos grasos libres–1 (FFAR1), el receptor acoplado a proteína G (GPCR), el receptor de proliferación de peroxisoma– γ (PPAR γ), el co–transportador 2 de sodio–glucosa (SGLT2), la α –glucosidasa, entre otros (Kerru et al., 2018; Weinberg Sibony et al., 2023).

El principal objetivo del manejo de la DMT2 es mantener un control glucémico favorable y sostenido, logrando que los niveles de glucosa en sangre sean lo más cercanos posible

a los niveles normales. El uso de la insulina se ha convertido en un pilar para el tratamiento de DMT2. No obstante, se han desarrollado otras estrategias que consideran la reducción de la resistencia a la insulina, la reducción de la secreción hepática de glucosa, el aumento de la secreción endógena de insulina y la limitación de la reabsorción de la glucosa (Kerru et al., 2018; Rendell, 2004). La figura 3.1 ilustra ejemplos de fármacos actualmente empleados en el tratamiento de la DMT2, mientras que la tabla 3.2 resume los efectos adversos de algunos de ellos.

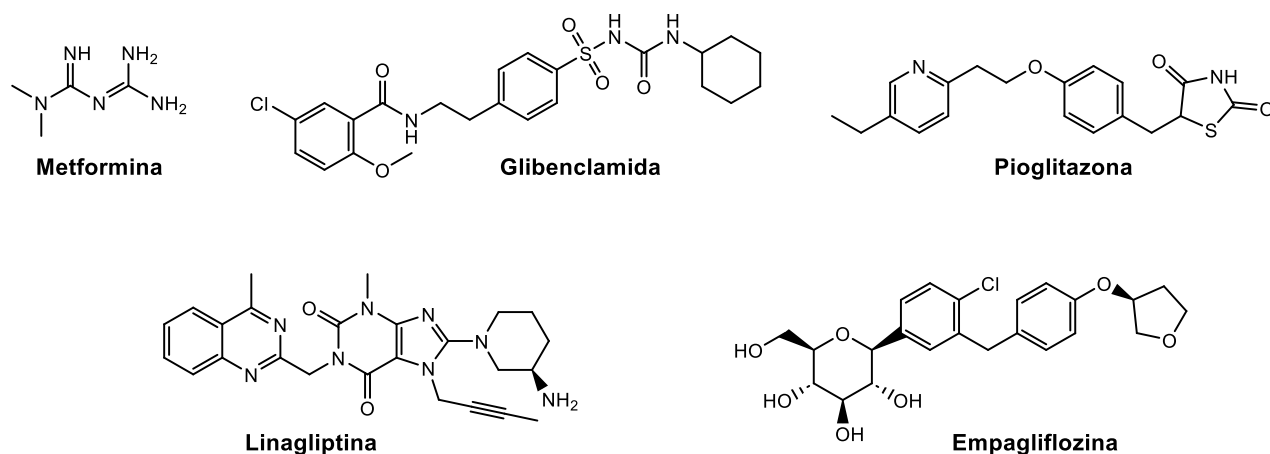


Figura 3.1. Estructuras químicas de fármacos actualmente empleados en el tratamiento de DMT2.

Tabla 3.2. Fármacos actualmente empleados para el tratamiento de DMT2

Clasificación	Fármaco	Efecto	Efectos adversos
Biguanidas	Metformina	Reducción de los niveles de glucosa en el hígado Reducción de HbA1c Reducción del peso corporal	Desórdenes gastrointestinales, aumento en la deficiencia de Vit. B12, aumento de acidosis láctica.
Sulfonilureas	Glibenclamida Glimepirida	Aumento de insulina endógena (inhibición de los canales de potasio dependientes de ATP) Reducción de HbA1c	Aumento de peso corporal, hipoglucemia.
Tiazolidinedionas (TZD)	Pioglitazona	Reducción de HbA1c	Aumento de peso corporal, edema periférico, anemia,

	Rosiglitazona	Aumento de células β Activación del PPAR γ	fracturas (mujeres), falla cardíaca.
Inhibidores de DPP-4	Linagliptina Sitagliptina	Aumenta el efecto de las incretinas involucradas en el control del azúcar en sangre Reducción de HbA1c	Faringitis, dolor de cabeza, hipoglucemia. Posible riesgo de pancreatitis, cáncer pancreático y/o tumores neuroendocrinos.
Inhibidores de α -glucosidasa	Acarbosa	Ralentización de la absorción de carbohidratos	Hinchazón, flatulencia
Inhibidores de SGLT2	Empagliflozina Dapagliflozina	Reducción de HbA1c Reducción del peso corporal Disminución en la progresión de enfermedad renal	Aumento de cetoacidosis, de infecciones urinarias e hipovolemia.

ATP: adenosina-trifosfato. DPP-4: dipeptidil peptidasa-4. HbA1c: hemoglobina glucosilada. PPAR γ : el receptor de proliferación de peroxisoma- γ . SGLT2: co-transportador 2 de sodio-glucosa. Vit. B12: vitamina B12.

3.2. OBESIDAD

La obesidad junto con la DM se consideran epidemias del siglo XXI. La OMS y la Federación Mundial de la Obesidad (FMO) definen la obesidad como una condición médica debida a un exceso de peso corporal por la acumulación excesiva de tejido graso que suele ir acompañada de inflamación aguda, crónica y sistémica. La acumulación de esta grasa puede provocar graves problemas de salud, como el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas y accidentes cerebrovasculares, así como la muerte. Según datos de la FMO, alrededor de 4 millones de muertes anuales se deben a la obesidad (WHO, 2024; World Obesity, 2025).

3.2.1. LA OBESIDAD EN NÚMEROS

En sus reportes más recientes, la OMS y la FMO (2025) destacan que, en el año 2022, 2.5 millones de adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso, de los cuales 890 padecían obesidad. Esto corresponde a un 43% de adultos con sobrepeso, lo que representa un aumento del 18% con respecto a 1990, cuando sólo el 25% de adultos mayores de 18 años padecían obesidad a nivel mundial. Además, se estima que para el año 2030 el número total de adultos que vivan con obesidad aumentará en más de un 115%, pasando de 524 millones a 1130 millones. La prevalencia de esta enfermedad varía dependiendo de la región, desde un 31% en la región suroriental de Asia y la región de África hasta el 67% en la región de las Américas. No obstante, se ha observado que el aumento de casos de obesidad y las enfermedades atribuibles a ella han ido en aumento en los países de bajos y medianos ingresos. Datos de la FMO informan que ha habido un aumento considerable en casos de obesidad Clase II (riesgo moderado) y superior, en todo el mundo (WHO, 2024; World Obesity, 2025).

3.2.2. ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC) COMO CRITERIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE SOBREPESO Y OBESIDAD

A la fecha, se han diseñado y desarrollado diversos métodos para determinar si una persona es obesa y en qué medida. Estos métodos se basan en la antropometría, el análisis de impedancia bioeléctrica, la densitometría y en imágenes. No obstante, el índice de masa corporal (IMC) pese a que es una herramienta imprecisa y burda, es el método más empleado para determinar si una persona padece sobrepeso y obesidad (González–Muniesa et al., 2017). El IMC toma en consideración el peso (kg) y la estatura al cuadrado (m^2) de la persona y varía dependiendo del grupo de edad. En la tabla 3.3 se describe la definición y clasificación de la OMS para la obesidad, basadas en el IMC, en adultos mayores de 18 años. (WHO, 2024; González–Muniesa et al., 2017).

Tabla 3.3. Índice de masa corporal y clasificación del grado de obesidad

IMC (kg/m²)	Definición	Grado de riesgo
< 18.5	Desnutrición	NA
18.5–24.9	Peso normal	NA
25–29.9	Sobrepeso (no obesidad)	Alto
30–34.9	Obesidad clase I	Bajo
35–39.9	Obesidad clase II	Moderado
≥ 40	Obesidad clase III	Alto

La medida de la circunferencia de la cintura puede emplearse como parámetro complementario del IMC. Este parámetro generalmente ayuda a discernir entre obesidad subcutánea y visceral (González–Muniesa et al., 2017). En este sentido, las mujeres con una circunferencia de cintura mayor o igual a 89 cm y los hombres con una medida de cintura mayor a 102 cm, así como aquellas personas con cuerpos en forma de pera, tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y DMT2 (Medline Plus Información de salud para usted, 2023).

3.2.3. FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE LA OBESIDAD

En un trabajo publicado por Bray (2017), se describe la obesidad como un modelo epidemiológico en el que existe un agente que afecta al hospedero y provoca la enfermedad. En la obesidad, el principal agente ambiental es la mala alimentación acompañada de una baja actividad física. La comida ultraprocesada y de bajo costo es abundante en occidente. El aumento en el consumo de este tipo de comida, junto con la disminución de los niveles de actividad física, constituye uno de los principales factores para el desarrollo de la obesidad.

Por su parte, los factores que atañen al hospedero son aquellos relacionados con la genética. Estos factores genéticos son un componente de la respuesta a los agentes ambientales. Existen genes con una alta penetrancia que conducen, de manera

inevitable, al desarrollo de una obesidad masiva. Por ejemplo, defectos en la producción de leptina o un receptor de leptina defectuoso (Bray et al., 2017).

Para hospederos susceptibles genéticamente, un exceso de energía (proveniente de la comida) y una baja actividad física conllevan la acumulación y almacenamiento de grasa en las células grasas (adipocitos). El aumento del tamaño y del número de adipocitos puede considerarse una lesión patológica de la obesidad. Conforme los adipocitos aumentan su tamaño y número, también se da lugar al aumento en la producción de una variedad de péptidos tales como la leptina, citocinas (IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), metabolitos como ácidos grasos libres y lactato, mientras que los niveles de adiponectina disminuyen. Los productos de las células adiposas, a su vez, modifican los procesos metabólicos e inflamatorios en el huésped, teniendo efectos tanto en el cerebro como en los sistemas periféricos (Halberg et al., 2008). En el huésped, todos estos cambios pueden conducir a una variedad de otros procesos, tales como el desarrollo de dislipidemia, hipertensión, hiperinsulinemia y diabetes, dando lugar, en muchas ocasiones, a arteriosclerosis (Bray et al., 2017).

3.2.4. TEJIDO ADIPOSO

El exceso de energía se almacena en el tejido adiposo (adipocitos). A la fecha se han identificado 3 tipos de tejido adiposo: tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés), marrón (BAT, por sus siglas en inglés) y beige, siendo los dos primeros los de mayor importancia ya que juegan un papel clave en la detección y respuesta a los cambios en el equilibrio energético sistémico (Giralt & Villarroya, 2013). El tejido adiposo marrón está implicado en la contribución al gasto energético vía la termogénesis para mantener la temperatura corporal (Sacks & Symonds, 2013). Este tejido se sitúa alrededor de los riñones, el corazón, la aorta, el páncreas y la tráquea. Los depósitos del tejido marrón disminuyen con la edad. Este tipo de tejido adiposo se ha correlacionado negativamente con el IMC, aunque su papel en la etiología de la obesidad no se ha logrado elucidar (González-Muniesa et al., 2017; Prodhomme et al., 2018). El tejido

adiposo blanco es el más abundante en los humanos y, durante mucho tiempo, se ha creído que su única función es el almacenamiento de energía. Estudios recientes han revelado que las células del tejido adiposo blanco secretan diversas sustancias bioactivas, como las adiponectinas y las adipocinas. Por otro lado, el tejido adiposo beige se recluta en los depósitos del tejido adiposo blanco cuya función es disipar la energía (González–Muniesa et al., 2017).

Tomando en consideración la localización del tejido adiposo, este se clasifica en tejido adiposo subcutáneo, que se localiza debajo de la piel (hipodermis), y tejido adiposo visceral que se localiza en las zonas intraabdominales, perirrenales y pericardiales. El tejido intraabdominal es el de mayor interés para los investigadores, ya que su acumulación está altamente relacionada con el desarrollo del denominado síndrome metabólico (González–Muniesa et al., 2017)

3.2.5. MANEJO Y TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD

El manejo y tratamiento de la obesidad están principalmente enfocados en la pérdida de peso corporal utilizando tratamientos de bajo riesgo tales como modificaciones en el estilo de vida (alimentación más saludable y actividad física), la medicación o la cirugía en ciertos casos. La respuesta a cualquiera de los tratamientos es variable, ya que las estrategias para la pérdida de peso pueden también ser diferentes de aquellas diseñadas para mantener la pérdida de peso estable.

3.2.5.1. ESTILO DE VIDA

Los programas enfocados en los cambios del estilo de vida consisten en estrategias que ayudan a las personas a desarrollar comportamientos asertivos y vías para el manejo del estrés. Estas estrategias incluyen terapias del comportamiento, lo cual ayuda a los pacientes a entender y controlar su comportamiento alimenticio, desde aquellos factores desencadenantes hasta el lugar, la velocidad y tipo de alimentación, pasando por las consecuencias de esta y las recompensas que pueden cambiarla.

3.2.5.2. DIETA

La dieta prácticamente consiste en un balance energético negativo a través de la restricción calórica para conseguir la pérdida de peso. De manera general, se recomienda una restricción de 500 kcal/día o una dieta de 1200 kcal/día para mujeres y de 1500 kcal/día para hombres. La clave para conseguir bajar de peso mediante esta estrategia es adherirse al plan dietético y ser constante (González–Muniesa et al., 2017; M. D. Jensen et al., 2014).

3.2.5.3. ACTIVIDAD FÍSICA

La sugerencia para perder peso corporal en las personas con sedentarismo y obesidad es aumentar gradualmente la actividad física aeróbica. Por ejemplo, caminar 30 minutos/día a un paso moderado (respiración acelerada, pero no se queda sin aliento, sudoración a los 10 minutos de iniciada la actividad). Esta estrategia, además de ayudar en la pérdida de peso, trae consigo muchos beneficios, tales como disminuir el riesgo del desarrollo de DM y enfermedad cardiovascular (González–Muniesa et al., 2017; WHO, 2010).

3.2.5.4. TRATAMIENTO MÉDICO

Los fármacos empleados para tratar a pacientes con obesidad están aprobados como complementos de la dieta y la actividad física, y su uso está restringido a aquellos pacientes con obesidad de Clase II y III. No obstante, si el paciente no consigue una pérdida de peso del 4–5% en un lapso de 3 meses, entonces el medicamento se tiene que retirar y emplear otra técnica que ayude a la pérdida de peso (Eckel et al., 2014). En la tabla 3.4 (González–Muniesa et al., 2017) se enlistan algunos fármacos aprobados por la Administración de Fármacos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration) para su uso en el tratamiento de la obesidad.

Tabla 3.4. Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la obesidad

Fármaco	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Orlistat	Inhibidor de lipasa pancreática e intestinal. Reduce la absorción de grasas.	Vómito y diarrea.
Lorcaserina	Agonista del receptor 5 de serotonina, el cual actúa en el cerebro para reducir la ingesta de alimento.	Dolor de cabeza, mareo, náuseas, boca seca, constipación.
Liraglutida	Agonista del receptor similar a glucagón tipo 1. Reduce la ingesta de alimentos.	Náuseas y vómito. Pancreatitis aguda, hipoglicemia.
Dietilpropion, fentermina, fendimetrazina y benzfetamina	Fármaco noradrenérgico. Supresor del apetito.	Mareo, boca seca, insomnio, constipación, irritabilidad y efectos cardio–estimulatorios.
Fentermina–topiramato de liberación prolongada	Supresor del apetito vía liberación de neurotransmisores.	Parestesia, disgeusia (alteración del gusto). En casos raros, acidosis metabólica y glaucoma.
Naltrexona–bupropion de liberación sostenida	Incremento de la saciedad y disminución del apetito vía inhibición de la recaptura de dopamina y noradrenalina, bloqueando el receptor μ -opioide.	Náuseas, constipación y dolor de cabeza.

3.2.6. LA OBESIDAD Y SU RELACIÓN CON LA LEPTINA

La leptina es una proteína que consta de 167 aminoácidos, con un peso molecular de 16 kDa. Pertenece a la familia de las adiponectinas y recientemente ha sido reconocida como una hormona sintetizada predominantemente por los adipocitos. Su producción depende del volumen de depósitos de grasa en el cuerpo (Friedman, 2009; Y. Zhang et al., 1994). Para que esta hormona ejerza su acción, debe interactuar con los receptores en el hipotálamo, situados en las neuronas de varios núcleos, por lo que debe atravesar

la barrera hematoencefálica (BBB) (Vilariño–García et al., 2024). El primer sitio de acción comprende dos tipos distintos de poblaciones de neuronas. Las primeras son aquellas que liberan el neuropéptido Y involucradas en la vía orexigénica (inducción del apetito). Las segundas secretan proopiomelanocortina, formando la vía anorexigénica (inductor de la saciedad), estimulando la pérdida de peso y aumentando la termogénesis. Muchos estudios afirman que la leptina estimula la vía anorexigénica, lo que destaca su rol en la regulación del peso corporal (Considine & Caro, 1997; Obradovic et al., 2021; Vilariño–García et al., 2024). Aunado a ello y basados en los primeros estudios realizados a partir de su descubrimiento (1994), se ha postulado que cuando hay un incremento en la adiposidad, también se han observado niveles aumentados de leptina en suero, lo cual está relacionado con el desarrollo de resistencia a la leptina a nivel del transportador en la BBB. Esto se traduce en que una menor cantidad de leptina es capaz de atravesar la BBB, lo que lleva a una reducción en la activación de la vía de señalización de la regulación del peso corporal. No obstante, los mecanismos involucrados en la resistencia a la leptina no han sido del todo elucidados (Izquierdo et al., 2019; Obradovic et al., 2021; Vilariño–García et al., 2024).

3.2.7. LEPTINA, OBESIDAD Y DMT2

Se sabe que el sobrepeso y la obesidad son condiciones que están ampliamente relacionadas con la DMT2. De manera reciente, la OMS ha reconocido a la obesidad como un catalizador de la resistencia a la insulina, la cual se manifiesta en WAT, hígado y músculo esquelético. Aunado a ello, las células β –pancreáticas también han demostrado una inadecuada secreción de insulina debido a esta resistencia, la cual se ha identificado en las etapas tempranas de la enfermedad (Boutari et al., 2023; Vilariño–García et al., 2024). Además, la obesidad también lleva a un aumento en los niveles de leptina y de marcadores inflamatorios tales como la proteína C–reactiva (CRP, por sus siglas en inglés), exacerbando los daños vasculares y del miocardio (Vilariño–García et al., 2024).

Como se mencionó anteriormente, la leptina juega un papel clave en el control y equilibrio del gasto energético. Se ha observado que, en pacientes con deficiencia de leptina, estos han desarrollado obesidad e hiperfagia. No obstante, también se ha observado que, en aquellos pacientes con niveles elevados de leptina, la enfermedad persiste, sugiriendo la posibilidad de resistencia a la leptina. Esta resistencia puede contribuir a un aumento en la ingesta calórica y la dificultad para bajar de peso (Obradovic et al., 2021; Vilariño–García et al., 2024).

La secreción de leptina también está regulada por varias hormonas. La insulina y otras hormonas pancreáticas como la amilina, el glucagón y los polipéptidos pancreáticos reducen la ingesta de alimentos afectando la secreción de leptina. De hecho, la insulina es el principal regulador de la producción de leptina. En casos de hiperinsulinemia crónica o prolongada se ha observado un incremento de la concentración de leptina en plasma. Basado en estudios *in vitro*, se ha asumido que la insulina estimula la producción de leptina vía el metabolismo de la glucosa. También se ha observado que un aumento de los niveles de insulina conlleva a un bloqueo de la glucólisis, inhibiendo la secreción de leptina en los adipocitos (Fried et al., 2000; Obradovic et al., 2021).

3.3. PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASAS

Las proteínas tirosina fosfatasas (PTP) son una amplia familia de enzimas que están involucradas en numerosos procesos celulares, tales como el crecimiento, la diferenciación, el metabolismo y la respuesta inmune. Las PTP junto con las proteínas tirosina cinasas (PKT) son factores reguladores importantes en las vías de transducción de señales. En conjunto, coordinan la señalización celular dependiente de la fosforilación de residuos de tirosina (Kerru et al., 2018).

En los humanos, la familia de PTP comprende aproximadamente 100 genes, de los cuales 38 corresponden a PTP clásicas. De estos, 17 son PTP no transmembranales o citoplasmáticas, tal como la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), la cual desfosforila, de manera exclusiva, sustratos de proteínas tirosina–fosforiladas (Tonks, 2006).

3.3.1. PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA 1B

La proteína tirosina fosfatasa (PTP1B) es una enzima ubicua que juega un papel crucial en la regulación de diferentes vías de señalización celular, incluida la regulación negativa de la señalización de insulina y leptina, así como en vías asociadas al metabolismo de la glucosa y de lípidos (Delibegović et al., 2024).

3.3.1.1. ESTRUCTURA Y MECANISMO CATALÍTICO DE PTP1B

En humanos, la PTP1B es codificada por el gen *PTPN1*, con una secuencia de 435 residuos de aminoácidos (50 kDa). Está distribuida en tres dominios estructurales: el dominio catalítico N-terminal, el cual está definido por un set altamente conservado de residuos y que juega un papel importante en los mecanismos estructurales y catalíticos (Tiganis & Tonks, 2025). Un dominio de regulación intrínsecamente desordenado y que es rico en prolinas, y un dominio hidrofóbico C-terminal que se ancla a la membrana del retículo endoplásmico (Figura 3.2) (Coronell-Tovar et al., 2023; Delibegović et al., 2024).

Las PTP cuentan con un sitio catalítico altamente conservado, conformado por los residuos Tyr⁴⁶, Arg⁴⁵, Asp⁴⁸, Lys¹²⁰, Asp¹⁸¹, Phe¹⁸², Cys²¹⁵, Ile²¹⁹ y Gln²⁶² (Figura 3.3), el cual permite el reconocimiento del grupo fosfato del sustrato fosfotirosina (pTyr) que se encuentra en la base de la hendidura en la superficie de la proteína. La profundidad de esta hendidura junto con la presencia invariable de Tyr⁴⁶ le brinda especificidad a los sustratos que contienen pTyr (Coronell-Tovar et al., 2023; Maccari & Ottanà, 2023).

Por su parte, el loop WPD (Thr¹⁷⁷–Pro¹⁸⁵) sufre un cambio conformacional cuando el sustrato se une al sitio catalítico (Figura 3.3). En estado basal, este bucle se encuentra en una conformación abierta. La unión del sustrato permite que la enzima adopte una conformación cerrada debido a que se pliega sobre sí misma, dando lugar a que el residuo Asp¹⁸¹ adopte una orientación óptima y actúe con su función ácida en la primera etapa del mecanismo catalítico de PTP1B. A su vez, el residuo Gln²⁶² (loop Q) y el loop

YRD también están involucrados en la etapa de reconocimiento del sustrato mediante interacciones de éste con Tyr⁴⁶ y Asp⁴⁸ (Maccari & Ottanà, 2023).

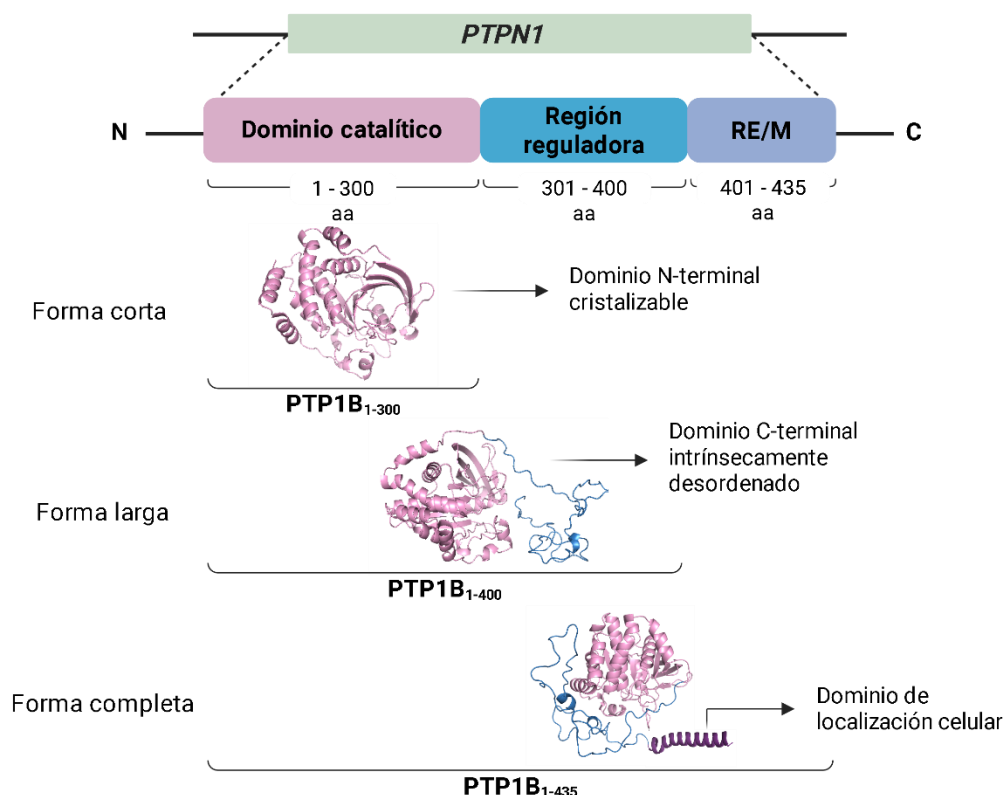


Figura 3.2. Dominios estructurales de PTP1B. El dominio catalítico N-terminal (forma corta) es el sitio más estudiado en la búsqueda de inhibidores de la enzima; el dominio C-terminal (forma larga) se encuentra intrínsecamente desestructurado. A la fecha se sabe que también juega un papel importante en la inhibición de la actividad de la enzima. El dominio de localización celular (forma larga) anclado a la membrana del retículo endoplásmico. Tomado y adaptado de Coronell-Tovar (2023).

Además del sitio de reconocimiento de pTyr en la región catalítica de PTP1B, existen otras regiones, vecinas a este, donde también se reconoce y se ancla la pTyr. Estos sitios alostéricos favorecen una afinidad de unión más eficiente a la enzima. El descubrimiento de un sitio de unión no catalítico conformado por las hélices $\alpha 3$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ (Tyr²⁰, Arg²⁴, Ala²⁷, Phe⁵², Arg²⁵⁴, Met²⁵⁸ y Gly²⁵⁹) ubicado a 20 Å del sitio activo permitió comprender cómo el loop WPD se coordinaba con la catálisis (Figura 3.3). Esto permitió demostrar que cuando un inhibidor alostérico se une a este sitio, la hélice $\alpha 7$ está desordenada, lo cual impide su interacción con las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 6$ llevando a que PTP1B adopte una

conformación cerrada. Estudios posteriores destacaron la importancia de la hélice $\alpha 7$ en la actividad total de PTP1B (Choy et al., 2017; Olmez & Alakent, 2011; Wiesmann et al., 2004). La importancia de estos sitios alostéricos radica en que son regiones no conservadas en la mayoría de las PTP, haciéndolas atractivas para el diseño de inhibidores selectivos de PTP1B (Maccari & Ottanà, 2023; Tiganis & Tonks, 2025).

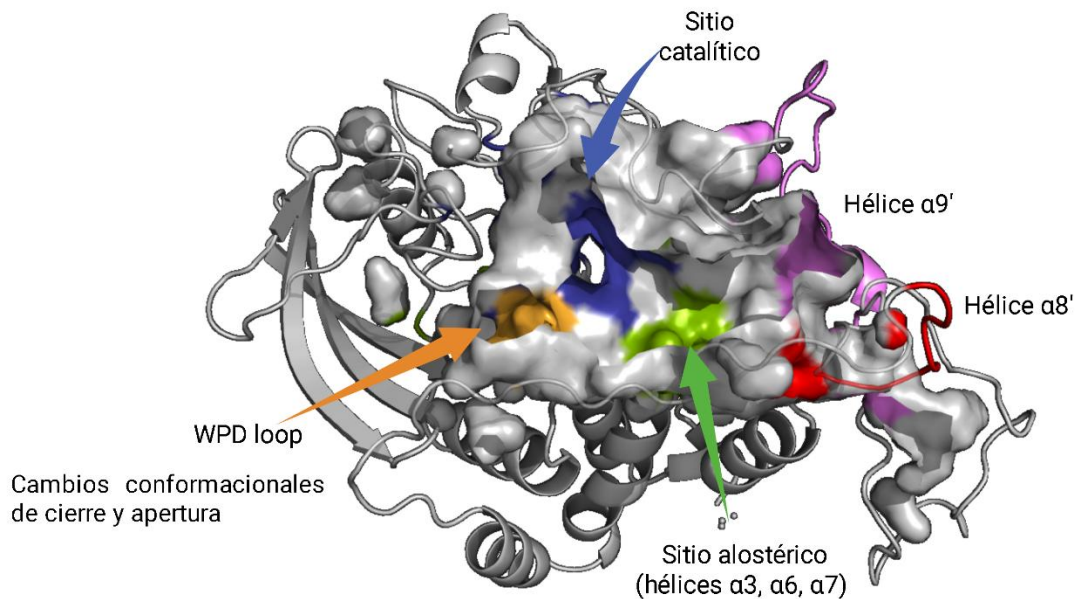


Figura 3.3. Sitios de unión de ligandos en PTP1B. Creado en <https://BioRender.com>

3.3.1.2. IMPLICACIÓN DE PTP1B EN EL DESARROLLO DE DM Y OBESIDAD

Las PTP trabajan en conjunto con las quinasas de tirosina (PTK) para coordinar la señalización celular dependiente de la fosforilación de los residuos de tirosina. De manera general, se ha sugerido que mientras las cinasas controlan la magnitud de la respuesta, las fosfatasas controlan el grado y la duración de la respuesta en la señalización. Por lo tanto, tienen una función crucial en las diferentes etapas (iniciación, mantenimiento, finalización) de la señalización de diversas vías moleculares (Coronell-Tovar et al., 2024).

Las alteraciones en los procesos de fosforilación/desfosforilación están relacionadas con el desarrollo de diversas enfermedades inmunológicas y neurológicas, así como también

diabetes, hipertensión y cáncer (Coronell-Tovar et al., 2024; Kołodziej–Sobczak et al., 2024).

La PTP1B tiene la función de desfosforilar los residuos de tirosina. En el loop de activación PTK de la subunidad beta del receptor de insulina (β -IR) desfosforila a Tyr¹¹⁶² y Tyr¹¹⁶³ para atenuar la señalización de este receptor en tejidos involucrados en la homeostasis de la glucosa, tales como el hígado y los músculos (Tiganis & Tonks, 2025).

PTP1B también tiene una función importante en el control del balance energético y el peso corporal a nivel del sistema nervioso central (SNC). PTP1B actúa a nivel del hipotálamo, donde atenúa la señalización del receptor de leptina (LepRb) en las neuronas vía la desfosforilación de pTyr¹⁰⁰⁷ y pTyr¹⁰⁰⁸ de JAK2, lo que conlleva la inactivación de STAT3, controlando así la expresión de los genes POMC y SOCS3 involucrados en el balance energético. En las neuronas del hipotálamo sensibles a la leptina, la deficiencia y/o inhibición de PTP1B mejora la señalización de JAK2 inducida por la propia leptina para promover la saciedad y la pérdida de peso (Coronell–Tovar et al., 2023; Z. Y. Zhang et al., 2015).

Hoy en día se sabe que PTP1B es un regulador negativo (“downstream”) clave en la vía clásica de señalización de la insulina y la leptina (Figura 3.4). La deficiencia y/o inhibición de esta enzima en el hígado, el músculo esquelético y, principalmente, el tejido adiposo permite potenciar la fosforilación de la tirosina del IR y del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS–1) favoreciendo la señalización descendente de PI3K. Esto facilita la interrupción de la síntesis de glucosa por parte del hígado y, por ende, la absorción de la glucosa, ocasionando una mayor sensibilidad a la insulina y mejorando el metabolismo de la glucosa (Elchebly et al., 1999; Klamman et al., 2000; Tiganis & Tonks, 2025). Los efectos combinados de la inhibición de PTP1B, tanto en el hipotálamo como en los tejidos periféricos sensibles a la insulina, dan lugar a una protección contra la obesidad inducida por la dieta (OID), contra la DMT2 y sus complicaciones, tales como hígado graso y enfermedad cardiovascular (ECV) (Tiganis & Tonks, 2025).

La PTP1B es una diana validada a nivel farmacológico. Estudios en ratones con deficiencia de PTP1B o con delección del gen PTPN1 demostraron que estos tienen una menor sensibilidad a la insulina y resistencia a la obesidad inducida por dieta rica en grasas en comparación con los ratones sanos (Elchebly et al., 1999; Klamann et al., 2000). De hecho, Elchebly y colaboradores demostraron que la pérdida de actividad de la PTP1B ocasiona un incremento en los niveles de insulina y resistencia a la ganancia de peso en ratones con deficiencia de PTP1B. En conjunto, estos resultados soportan la idea de que esta enzima es un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de la DMT2 y la obesidad (Elchebly et al., 1999).

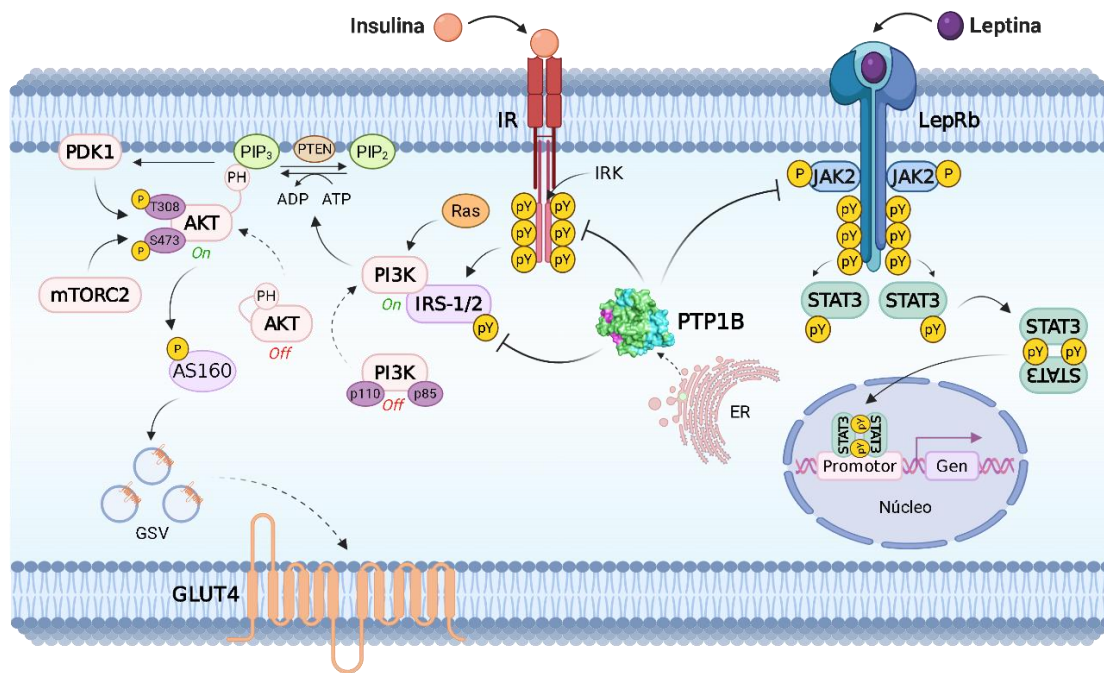


Figura 3.4. Mecanismo de regulación negativa de PTP1B en el metabolismo de la insulina y la leptina. En la vía de señalización de insulina, PTP1B actúa desfosforilando los residuos de fosfotirosina (pY) del IR y de IRS-1/2 favoreciendo la homeostasis de la glucosa mediante la modulación del tránsito de GLUT4. En la vía de señalización de leptina, PTP1B desfosforila al LepRb y JAK2, inactivando a STAT3 controlando de esta manera la expresión de los genes POMC y STAT3 involucrados en el balance energético. Abreviaturas: ADP: adenosina bifosfato; ATP: adenosina trifosfato; Akt: proteína transformante de la cepa Ak; AS160: sustrato de Akt de 160 kDa; ER: retículo endoplásmico; GLUT4: transportador tipo 4 de glucosa; IRK: dominio tirosina cinasa del receptor de insulina; IR: receptor de insulina; IRS-1/2: sustrato del receptor de insulina 1 y 2; JAK2: cinasa Janus 2; mTORC2: complejo 2 de la diana de rifampicina; PDK1: cinasa dependiente de fosfatidilinositol; PI3K: fosfatidil 3 cinasa; PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; POMC: proopiomelanocortina; PTEN: homólogo de fosfatasa y la tensina;

Ras: virus del sarcoma de la rata; SOCS3: supresor de la señalización de citocinas 3; STAT3: transductor de señales y activador de transcripción 3. Tomado y adaptado de Coronell-Tovar (2023).

3.3.1.3. INHIBICIÓN DE PTP1B: ESTRATEGIAS Y CLASIFICACIÓN DE INHIBIDORES

A la fecha, no existen fármacos inhibidores de la PTP1B aprobados. En las últimas dos décadas, el desarrollo de inhibidores de esta enzima ha cobrado relevancia. Sin embargo, debido a la alta homología de la PTP1B con otras PTP, la obtención de inhibidores selectivos se ha convertido en todo un reto. La tirosina fosfatasa de células T (TCPTP) es una PTP codificada por el gen *PTPN2* cuyo sitio catalítico comparte un 72–74% de homología con el sitio catalítico de PTP1B (Figura 3.5). TCPTP tiene un papel fundamental en el desarrollo de las células hematopoyéticas, en la inflamación y en el mantenimiento de las células T mediante la regulación de la familia Src de las cinasas y la señalización JAK–1/3 y STAT–1/3/5 (Kyriakou et al., 2018). Ratones *knockout* de *PTPN2* fallecen dentro de las siguientes 3–5 semanas después de su nacimiento debido a defectos en la función hematopoyética e inmunológica causados por anomalías en las células T y B. Por tal motivo, la inhibición dual de PTP1B y TCPTP se considera inadecuada (You–Ten et al., 1997). Otro punto en contra del diseño y la obtención de inhibidores selectivos de PTP1B es su localización subcelular, así como su naturaleza altamente polar (de carácter catiónico). Las moléculas diseñadas mimetizando la pTyr tienen una carga negativa muy alta, lo que limita su capacidad para atravesar la membrana celular y, en consecuencia, su biodisponibilidad (Coronell-Tovar et al., 2024; Kołodziej–Sobczak et al., 2024; Koren & Fantus, 2007; Maccari & Ottanà, 2023; Mao et al., 2015).

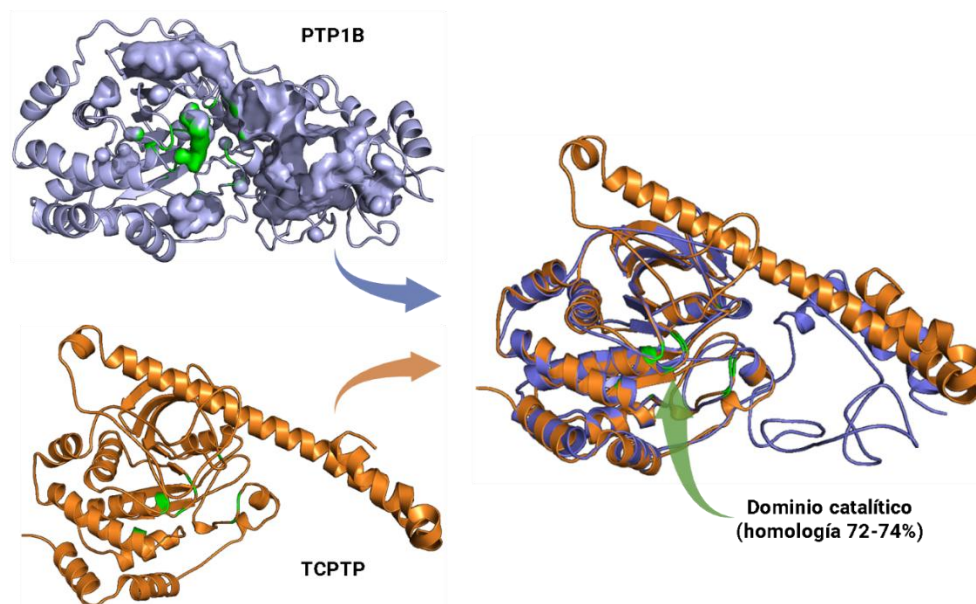


Figura 3.5. Representación gráfica del grado de homología entre PTP1B (azul) y TCPTP (anaranjado). Ambas proteínas comparten un alto porcentaje de homología del sitio catalítico (verde), generando un problema de selectividad en la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos para la DM2 y la obesidad. Creado en <https://BioRender.com>

En una reciente revisión realizada por Coronell–Tovar y colaboradores (2024) se destacan los siguientes hallazgos sobre la inhibición de PTP1B, resultando de interés el diseño de nuevos inhibidores de esta enzima. De manera específica, concluyen que: a) La conformación oxidada de la PTP1B es esencial para estabilizar la inactivación de la enzima en un modelo de inhibición competitiva. b) La inhibición alostérica requiere que el inhibidor genere interacciones con las hélices $\alpha 3$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ de la proteína. c) La inhibición bidentada consiste en la inactivación de regiones vecinas al sitio activo de la proteína. Aunado a ello, existe evidencia de que sitios alostéricos en el dominio regulatorio C–terminal podrían constituir una estrategia viable para potenciar la actividad inhibitoria de los nuevos inhibidores (Coronell-Tovar et al., 2024).

Desde su descubrimiento, reconocimiento y validación como potencial diana farmacológica para el tratamiento dual de la DM2 y la obesidad, la PTP1B ha sido objeto de la búsqueda de inhibidores. La obtención de estos se ha logrado a través de productos naturales, síntesis orgánica y semisíntesis. A la fecha existen diversas moléculas que han sido evaluadas *in vitro*, *in vivo* e *in silico* como potenciales inhibidores de PTP1B, algunas

de las cuales han sido patentadas para el tratamiento de DMT2, obesidad y cáncer (Coronell-Tovar et al., 2024). Estas moléculas pueden clasificarse según el tipo de inhibición que presentan.

3.3.1.3.1. INHIBICIÓN ORTOSTÉRICA

La inhibición ortostérica o competitiva es una inhibición reversible dirigida hacia el sitio catalítico de la enzima. Esta inhibición fue la primera en estudiarse y brindó las primeras aproximaciones en la búsqueda de inhibidores de PTP1B. Desafortunadamente, debido a las características del sitio catalítico antes mencionadas, este tipo de inhibición está limitado por la falta de selectividad, de permeabilidad celular y de biodisponibilidad de potenciales inhibidores de PTP1B. (Coronell-Tovar et al., 2024; Liu et al., 2022; S. Singh et al., 2022).

El Erpitrifabib (Figura 3.6) fue el primer inhibidor de PTP1B reportado en alcanzar estudios clínicos de fase II, pero más tarde fue descartado debido a la falta de especificidad, una falta de eficacia y por la presencia de efectos adversos (Coronell-Tovar et al., 2024; Liu et al., 2022; S. Singh et al., 2022).

3.3.1.3.2. INHIBICIÓN ALOSTÉRICA

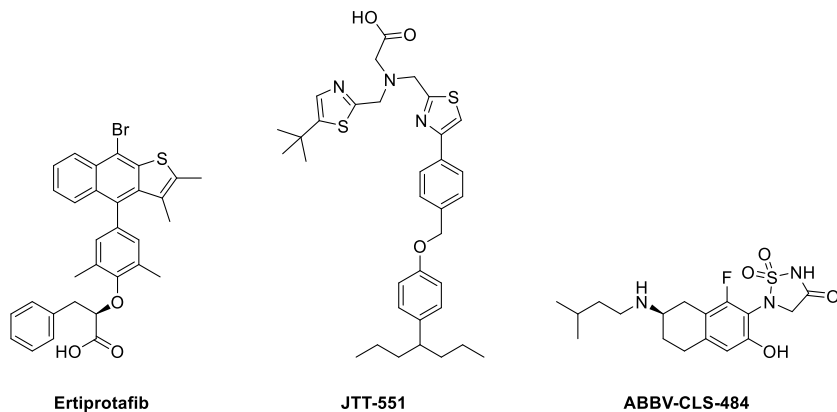
La inhibición alostérica o no competitiva consiste en inhibir la función catalítica de la enzima al dirigir los ligandos a sitios de unión en la periferia del sitio catalítico de la proteína. Para PTP1B, la unión de ligandos en la región alostérica, ubicada a 20 Å del sitio activo, bloquea el cierre del loop WPD, manteniendo así la conformación inactiva de la proteína. El enfoque de esta inhibición permite el diseño de inhibidores selectivos y con buena biodisponibilidad, ya que los residuos de aminoácidos en esta región no se conservan entre PTP y la polaridad también difiere de la del sitio activo. Existen dos vías para la inhibición alostérica: a) la unión de ligandos en las hélices $\alpha 3$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$ del dominio catalítico N-terminal (PTP1B₁₋₃₀₀) y b) inhibición dirigida a las hélices $\alpha 8'$ y $\alpha 9'$ del dominio regulatorio C-terminal intrínsecamente desordenado (PTP1B₃₀₁₋₄₀₀). (Coronell-Tovar et al., 2024; Wiesmann et al., 2004).

El inhibidor alostérico de PTP1B más conocido es la trodusquemina (Figura 3.6) y fue el primer inhibidor no competitivo reportado que se une al dominio regulatorio C-terminal de la proteína de manera efectiva, selectiva y reversible. También fue el primer inhibidor alostérico en alcanzar estudios clínicos de fase I. Su mecanismo de inhibición comprende la unión de dos moléculas del inhibidor a PTP1B que, de manera cooperativa, inducen un cambio conformacional significativo en la proteína. La trodusquemina, en primera instancia, se une a una cavidad formada por Arg³⁷¹, Arg³⁷³ y Val³⁷⁵ en la hélice $\alpha 9'$, y después a una cavidad conformada por Val²⁸⁷, Lys²⁹² y Leu²⁹⁴ en la hélice $\alpha 7$, así como por los residuos Leu²⁹⁹, His³¹⁰ e Ile³¹¹. Esta primera unión es la responsable del cambio conformacional, ocasionando que $\alpha 7$ se aproxime a las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 6$ que se localizan en el dominio C-terminal de PTP1B, generando así un segundo sitio de unión de ligandos. Pese a su alta selectividad, este inhibidor fue discontinuado debido a su baja biodisponibilidad y solubilidad (Coronell-Tovar et al., 2024; Liu et al., 2022; Maccari & Ottanà, 2023).

3.3.1.3.3. INHIBICIÓN BIDENTADA

Este tipo de inhibición es reversible. En el caso particular de PTP1B permitió la identificación de un segundo sitio de unión de pTyr. De manera conjunta, los residuos de aminoácidos del sitio activo (sitio A) y de algunos sitios adyacentes (B, C y D) (Figura 3.7), no estructuralmente conservados, participan en la inactivación de la función enzimática. De esta manera se incrementa la potencia de inhibición y su selectividad (Tabla 3.5, Figura 3.8) (Asante-Appiah et al., 2001; Liu et al., 2022; Low et al., 2014; Puius et al., 1997; R. Zhang et al., 2017; Y. Zhang & Du, 2018).

a



b

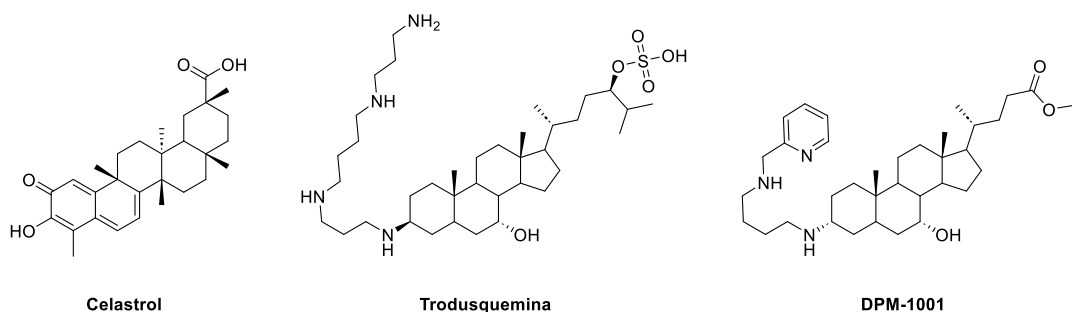


Figura 3.6. Inhibidores de PTP1B. a) Inhibidores ortostéricos y b) inhibidores alostéricos de PTP1B.

Tabla 3.5. Sitio catalítico y sitios de unión adyacentes al sitio catalítico de PTP1B

Sitio	Residuos de aminoácidos	Características	Referencia
Catalítico	Arg ⁴⁵ , Tyr ⁴⁶ , Asp ⁴⁸ , Lys ¹²⁰ , Asp ¹⁸¹ , Phe ¹⁸² , Cys ²¹⁵ , Ile ²¹⁹ y Gln ²⁶²	Naturaleza catiónica. Participación de la Cys ²¹⁵ en la catálisis enzimática.	Coronell-Tovar et al., 2024; Liu et al., 2022
B	Tyr ²⁰ , Arg ²⁴ , Ala ²⁷ , Phe ⁵² , Arg ²⁵⁴ , Met ²⁵⁸ –Gly ²⁵⁹ .	Naturaleza lipofílica. Contribuye a la unión y la especificidad del sustrato. La interacción directa del grupo fosfato de pTYr con el grupo guanidinio de Arg ²⁴ y Arg ²⁵⁴ contribuye significativamente a la selectividad en PTP1B.	Liu et al., 2022. Low et al., 2014. Puius et al., 1997

C	Tyr ⁴⁶ , Arg ⁴⁷ , Asp ⁴⁸ .	Región polar completamente expuesta en la superficie de la proteína. Interacciones de puente salino y por puentes de hidrógeno entre los inhibidores y este sitio, prevalecen en la selectividad de inhibición de PTP1B.	Asante–Appiah et al., 2001. Liu et al., 2022. Low et al., 2014
D	Tyr ⁴⁶ , Lys ¹²⁰ , Ser ²¹⁶ .	Glu ¹¹⁵ , Asp ¹⁸¹ , Región pequeña, polar y cargada. Papel significativo de la Lys ¹²⁰ en la potencia y selectividad de inhibidores de PTP1B.	Liu et al., 2022. R. Zhang et al., 2017. Y. Zhang & Du, 2018

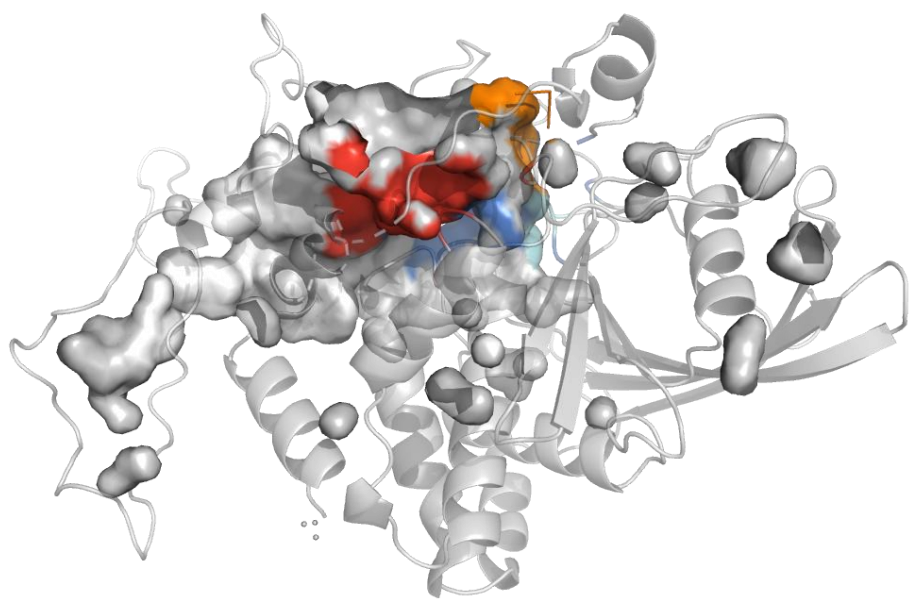


Figura 3.7. Sitio catalítico (azul) y sitios adyacentes al sitio catalítico de PTP1B: sitio B (rojo), sitio C(anaranjado) y sitio D (cian).

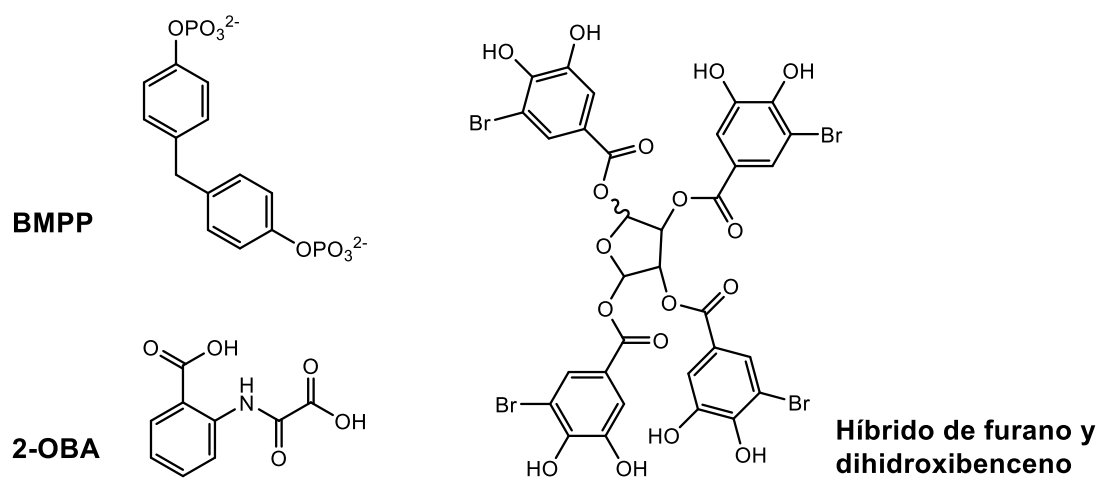


Figura 3.8. Ejemplos de inhibidores bidentados de PTP1B

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con los antecedentes mencionados y recordando que hasta el momento no existe un fármaco aprobado que inhiba PTP1B para el tratamiento de la DMT2 y la obesidad, resulta importante y necesario generar nuevas moléculas que actúen sobre esta diana farmacológica que parece ser prometedora. En este sentido, y como se expuso anteriormente, el AL es un inhibidor competitivo débil de la PTP1B. Por lo tanto, se propone hacer una serie de modificaciones estructurales sobre la posición C3 de su esqueleto esteroidal (Figura 4.1). Estas modificaciones contemplan la introducción de arilaminas sustituidas, las cuales podrían favorecer la afinidad hacia esta enzima. Esta estrategia está basada en que se sabe que el AL se une a una región cercana al sitio catalítico de la PTP1B, por lo que la incorporación de bencilaminas a la posición C3 del AL generaría interacciones de estas últimas con el sitio catalítico, lo que, en teoría, incrementaría significativamente la afinidad del AL por la PTP1B y, por tanto, su inhibición. Por otro lado, debido a que se ha observado que en general los derivados fluorados como inhibidores de la PTP1B han mostrado buena actividad, se pretende incorporar este átomo sólo o como grupo $-CF_3$ sobre el anillo aromático de los derivados propuestos.

Por otro lado, la química computacional, la cual integra los conocimientos de la química con la informática, es ampliamente usada para tratar de dar explicación sobre los modos de interacción fármaco–receptor (A. Singh et al., 2019). En este sentido, los estudios de acoplamiento molecular (docking molecular) y las simulaciones de dinámica molecular (MDS) son herramientas computacionales que actualmente han tomado un papel fundamental en la búsqueda, el diseño y el descubrimiento de nuevos fármacos (Jakhar et al., 2020). Por lo tanto, se propone también incluir este tipo de estudios para proponer el modo y tipo de interacción que se está dando entre los derivados de AL y la PTP1B. Con esta información se podrán plantear, de manera más precisa, los aminoácidos y los grupos involucrados en la actividad inhibitoria de la enzima, lo que permitirá, en un futuro, proponer nuevos análogos.

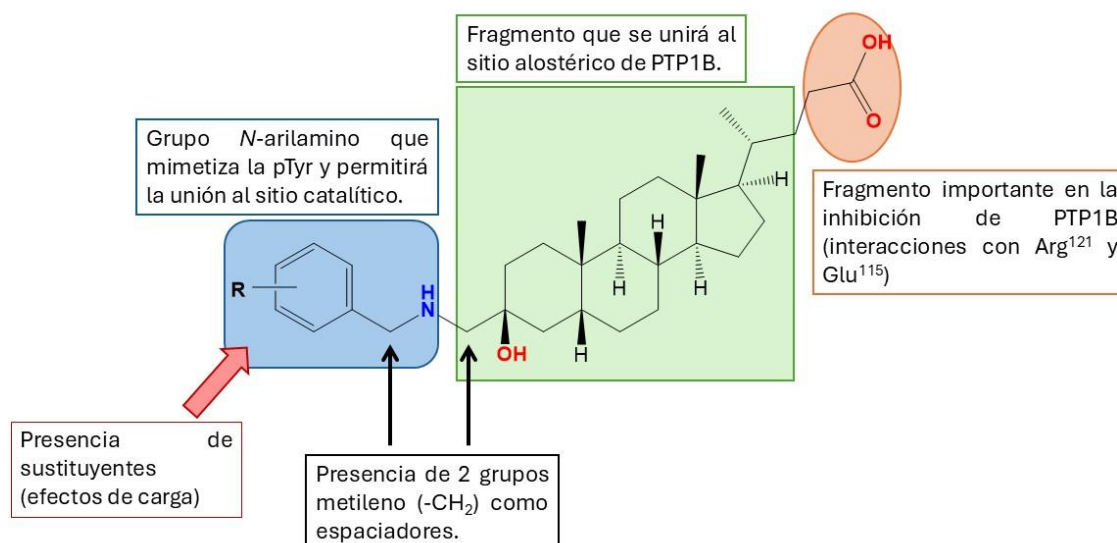


Figura 4.1. Estrategia de modificación estructural del AL para la obtención de derivados *N*-arilamino como potenciales inhibidores de PTP1B

5. HIPÓTESIS

Los derivados de ácido litocólico sustituidos en la posición C3 con diferentes *N*-arilaminas sustituidas serán inhibidores de la PTP1B en ensayos *in vitro*, los cuales, serán consistentes con estudios *in silico*.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar derivados del ácido litocólico con diferentes *N*-arilaminas en la posición C3 y evaluar su efecto inhibitorio en modelos *in vitro* e *in silico* sobre PTP1B, así como su actividad biológica *in vitro* en adipocitos.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Sintetizar una serie de derivados del ácido litocólico con arilaminas en C3 y realizar la caracterización estructural mediante métodos espectroscópicos (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C) y espectrométricos (EM).
- b. Evaluar la actividad inhibitoria sobre PTP1B mediante ensayos *in vitro*.
- c. Evaluar los nuevos derivados de ácido litocólico, en modelos *in vitro*, como potenciales inhibidores de la síntesis de lípidos.
- d. Realizar estudios de acoplamiento molecular de los derivados propuestos.
- e. Llevar a cabo estudios de simulación de dinámica molecular (MDS) de los derivados que presenten el mejor potencial inhibitorio de PTP1B.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. REACTIVOS Y EQUIPOS

Todas las materias primas y reactivos se obtuvieron comercialmente en grado reactivo de la casa Sigma–Aldrich y fueron empleados sin purificación previa.

7.2. CROMATOGRAFÍA Y PUNTO DE FUSIÓN

Las reacciones de síntesis fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina (CCF) usando placas de sílica gel 60 F254 con 0.2 mm de espesor adquiridas de la casa Sigma–Aldrich. Su visualización se realizó empleando una lámpara de UV, mientras que para la elución se emplearon diversos sistemas variando la polaridad de estos.

La purificación de los intermediarios se llevó a cabo mediante cromatografía en columna (CC) empleando como fase estacionaria sílica gel 60 (malla 0.063–0.2 mm) y como fase móvil diversos sistemas de elución.

Los intervalos de temperatura de fusión de los intermediarios y los compuestos finales se determinaron usando un aparato de Fisher–Johns y no están corregidos.

7.3. ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR: RMN–¹H Y RMN–¹³C

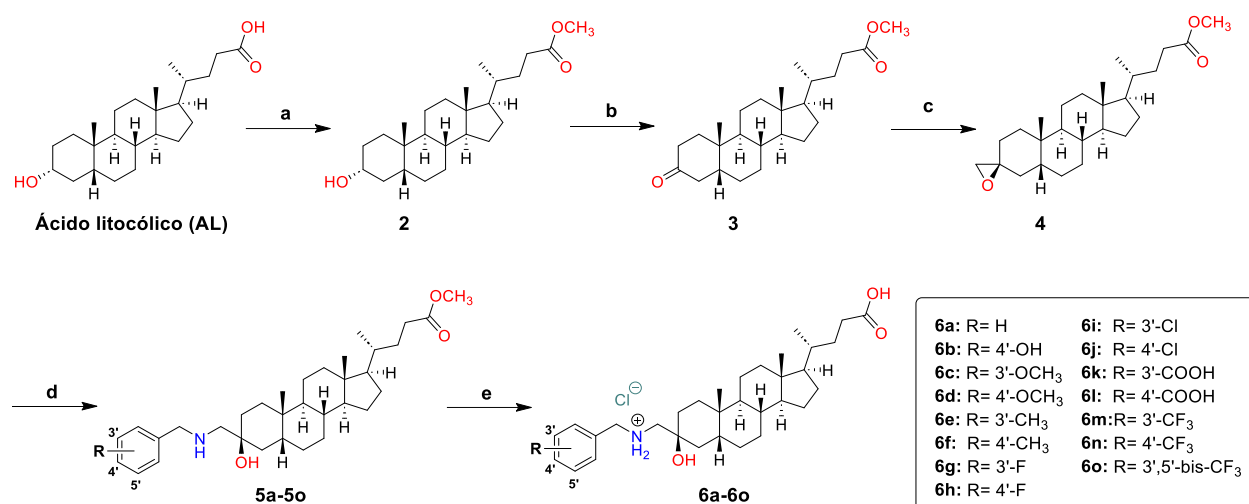
Los espectros de RMN fueron realizados en un equipo Agilent DD2 a 600 MHz y 151 MHz para RMN–¹H y RMN–¹³C, respectivamente; así como también se empleó un equipo Bruker Ascend a 500 MHz y 126 MHz para RMN–¹H y RMN–¹³C, respectivamente.

Los desplazamientos químicos están reportados en ppm y las constantes de acoplamiento (*J*) se reportan en Hertz (Hz). La multiplicidad de la señal está expresada como s: simple/singulete, d: doblete, dd: doble de dobles y m: multiplete.

7.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS: ESI-MS

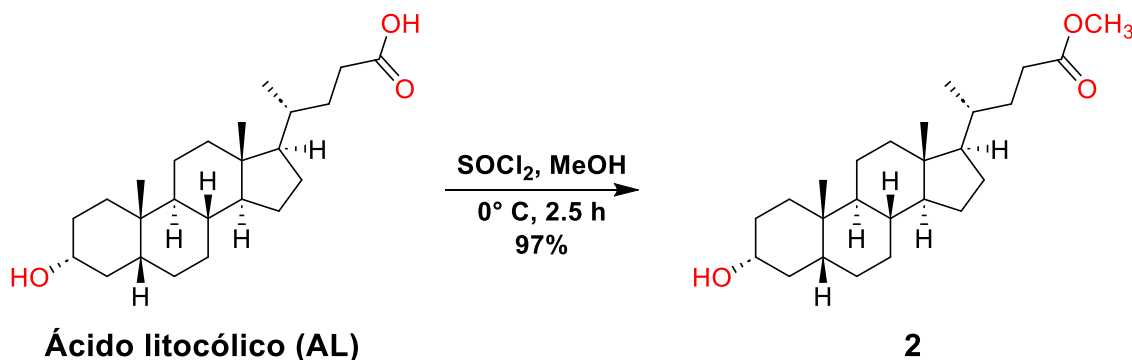
Los espectros de masas fueron obtenidos usando un equipo micrOTOF-ESI-TOF-MS mediante infusión directa en modo positivo. El gas de nebulización usado fue nitrógeno con una velocidad de 4 mL/min y un voltaje de 4.5 kV a 150 °C. El rango de masas para la elucidación estructural empleado fue $m/z = 50\text{--}3000$. Los resultados están expresados como una relación m/z .

7.5. SÍNTESIS DE LOS NUEVOS DERIVADOS DEL ÁCIDO LITOCÓLICO CON UN GRUPO BENCILAMINOMETILO EN C3 (6a-6o)



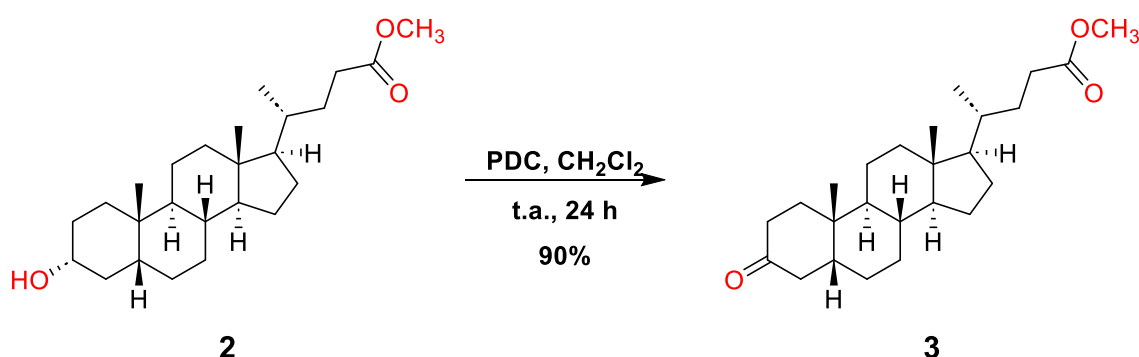
Esquema 7.1. Reactivos y condiciones de síntesis. SOCl₂, MeOH, 0 °C, 2.5 h; b) PDC, CH₂Cl₂, t.a, 24 h; c) TMSI, NaH, DMSO, t.a, 18–22 h; d) bencilaminas *meta* o *para*-sustituidas, EtOH, 60 °C, 18 h; e) 1. KOH, MeOH, 70 °C, 2 h; 2. HCl conc, CH₂Cl₂.

7.5.1. SÍNTESIS DE 3α-HIDROXI-5β-COLAN-24-OATO DE METILO (2)



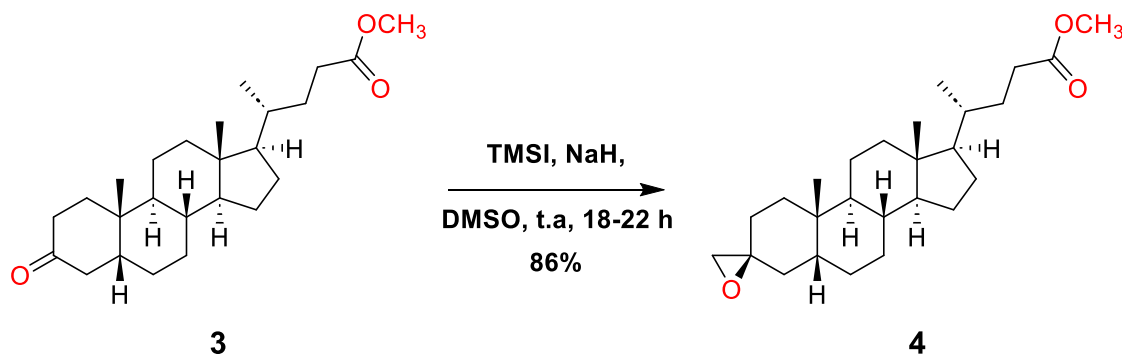
A una solución de ácido litocólico (AL, 9.83 mmol) en metanol (100 mL), se le agregaron 2.9 mL (39.97 mmol) de cloruro de tionilo (SOCl_2). La reacción se mantuvo en agitación a 0 °C durante 30 min y posteriormente a temperatura ambiente por 2 h. El disolvente fue evaporado a presión reducida en un rotavapor y se añadió agua generando un precipitado, el cual fue filtrado y secado por filtración al vacío obteniendo el intermediario **2**. Este producto fue usado en la siguiente reacción sin purificación alguna.

7.5.2. SÍNTESIS DE 3-OXO-5 β -COLAN-24-OATO DE METILO (**3**)



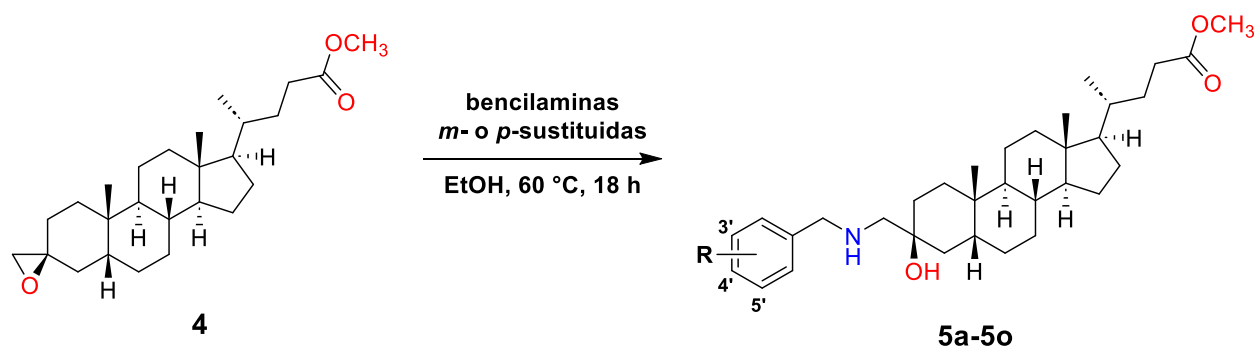
A una solución del compuesto **2** (10.05 mmol) en 150 mL de diclorometano se le añadieron 19.3 mmol de dicromato de piridinio (PDC) y 1 g de sílice gel. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se evaporó el disolvente y el crudo obtenido fue purificado por cromatografía en columna usando como medio de elución hexano:AcOEt (85:15) obteniendo un sólido blanco cristalino (97% rendimiento) con un p.f.= 117–118 °C. RMN- ^1H (600 MHz, CDCl_3) δ 3.67 (s, 3H), 2.79 – 2.62 (m, 1H), 1.02 (s, 3H), 0.92 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.68 (s, 3H). RMN- ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) δ 213.82, 175.07, 56.72, 56.24, 51.84, 21.50, 18.59, 12.38.

7.5.3. SÍNTESIS DE (3β-OXIRANO)-5β-COLAN-24-OATO DE METILO (4)



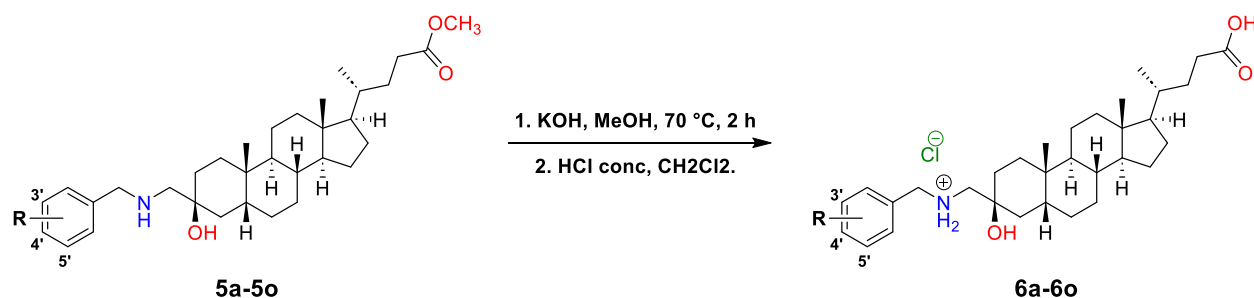
A una solución de yoduro de trimetilsulfoxonio (TMSI, 1.93 mmol)) en 5 mL de DMSO anhidro se agregaron 4.2 mmol de hidruro de sodio (NaH) al 60% en aceite. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por una hora bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se agregó, lentamente, el intermediario 3 (1.29 mmol) previamente disuelto en 3 mL de DMSO anhidro. Se continuó con la agitación por 18 h, tras las cuales la mezcla se vació en un baño de agua-hielo, se filtró y se secó. El crudo obtenido fue purificado por cromatografía en columna (hexano: AcOEt 90:10) consiguiendo el intermediario 4 como un sólido blanco (86% de rendimiento) con un p.f.= 132 °C. RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃) δ 3.67 (s, 3H), 2.62 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H), 0.99 (s, 3H), 0.92 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.66 (s, 3H). RMN-¹³C (151 MHz, CDCl₃) δ 174.90, 59.39, 56.72, 56.11, 53.74, 51.63, 21.22, 18.39, 12.18. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₂₆H₄₃O₃ [M+H]⁺ 403.3207, experimental 403.3207

7.5.4. MÉTODO GENERAL DE SÍNTESIS DE LOS INTERMEDIARIOS 5a-5o



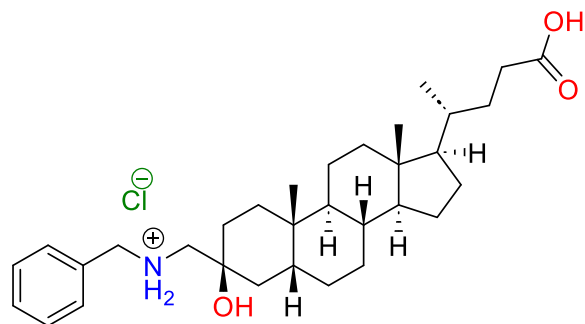
A una solución del oxirano **4** (0.3741 mmol), en 5 mL de etanol, se le agregó 1.112 mmol de la bencilamina *meta* o *para*-sustituida adecuada. La solución se mantuvo en agitación a una temperatura de 60–70 °C durante 18 h. Concluido este tiempo, se evaporó el exceso de disolvente y los crudos obtenidos fueron purificados por cromatografía en columna por gradiente de polaridad (hexano:AcOEt 90:10 a 85:15) para dar las aminas secundarias correspondientes. Para la obtención de las aminas **5k** y **5l**, se empleó DMF como medio de reacción a 90 °C durante 22 h.

7.5.5. MÉTODO GENERAL DE SÍNTESIS DE LOS 3 α -BENCILAMINOMETILO DERIVADOS DE ÁCIDO LITOCÓLICO (**6a–6o**)



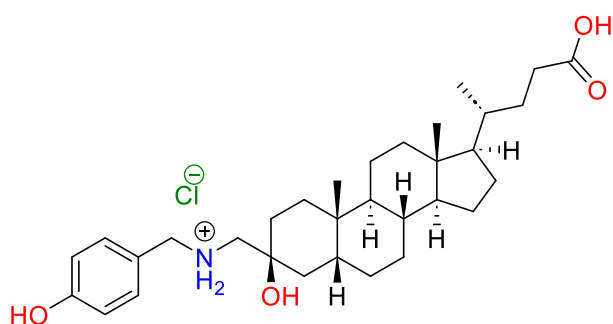
A una solución metanólica (25 mL) de cada uno de los intermediarios **5a–5o** (1.112 mmol) se agregó 1.71 mmol de KOH. La mezcla de reacción se sometió a agitación y calentamiento a 70 °C durante una noche. A continuación, se evaporó el disolvente y una mezcla de HCl conc. (1 mL) y diclorometano (10 mL) fue agregada al matraz de reacción. El sólido obtenido fue filtrado y secado, generando los compuestos finales **6a–6o** respectivamente.

7.5.5.1. CLORURO DE *N*-BENCIL-1-((3*S*,5*R*,10*S*,13*R*)-17-((*R*)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1*H*-CICLOPENTA[*A*]FENANTREN-3-IL) METANAMINIO (**6a**)



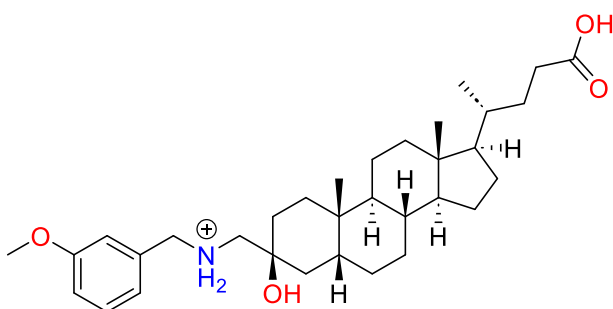
Sólido blanco. 37 % rendimiento. P.f. 262–266 °C. RMN-¹H (600 MHz, Piridina-d₅) δ 7.96 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.66 (s, 2H), 3.67 (s, 1H), 3.38 (q, *J* = 12.6 Hz, 2H), 0.97 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.58 (s, 3H). RMN-¹³C (151 MHz, Piridina-d₅) δ 176.71, 132.97, 131.08, 129.43, 129.39, 70.36, 58.83, 56.45, 52.28, 43.01, 40.04, 38.31, 35.95, 35.86, 35.15, 32.05, 31.99, 31.78, 31.02, 27.18, 26.74, 23.98, 18.77, 12.38. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₂H₅₀NO₃⁺ [M+H]⁺ 496.3786; experimental 496.3786.

7.5.5.2. CLORURO DE 1-((3*S*,5*R*,10*S*,13*R*)-17-((*R*)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1*H*-CICLOPENTA[*A*]FENANTREN-3-IL)-*N*-(4-HIDROXIBENCIL) METANAMINIO (**6b**)



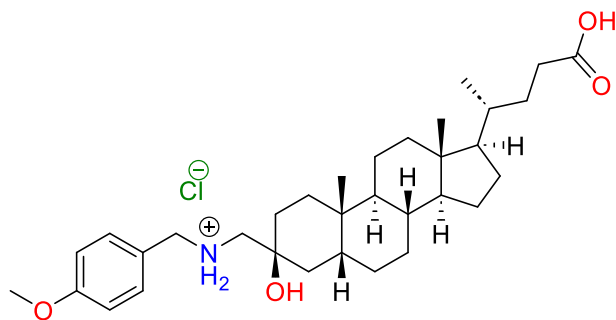
Sólido blanco. 32 % rendimiento. P.f. 215–218 °C. RMN-¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12.01 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 8.93 (d, *J* = 56.6 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 3.98 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 2.68 (s, 2H), 0.88 (s, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.59 (s, 3H). RMN-¹³C (151 MHz, DMSO-d₆) δ 174.90, 158.13, 132.09, 121.33, 115.42, 68.92, 56.54, 55.85, 55.70, 52.83, 50.51, 42.36, 38.87, 37.04, 35.27, 34.92, 34.33, 30.84, 30.79, 23.45, 18.26, 11.96. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₂H₅₀NO₄⁺ [M+H]⁺ 512.3735; experimental 512.3727.

7.5.5.3. CLORURO DE 1-[(3S,5R,10S,13R)-17-[(R)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL]-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1H-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL)-N-(3-METOXIBENCIL) METANAMINIO (**6c**)



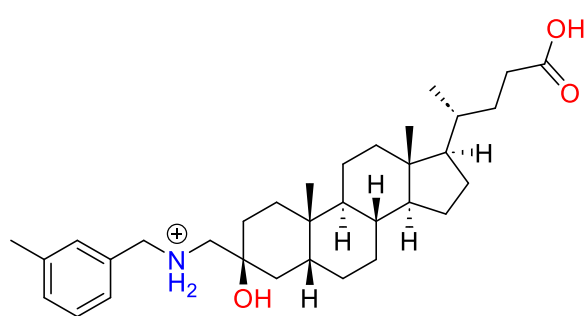
Sólido blanco. 51 % rendimiento. P.f. 243–246 °C. RMN-¹H (600 MHz, Piridina-d₅) δ 7.85 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.45 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.69 (s, 3H), 3.76 (d, *J* = 2.3 Hz, 3H), 3.43 (q, *J* = 12.6, 2H), 2.61 (m, 2H), 0.98 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.58 (s, 3H). RMN-¹³C (151 MHz, Piridina-d₅) δ 177.05, 161.01, 134.56, 130.75, 123.39, 116.58, 116.07, 70.70, 59.07, 56.76, 55.99, 52.58, 43.34, 40.37, 36.29, 36.19, 35.48, 32.39, 32.32, 24.32, 19.10, 12.71. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₃H₅₂NO₄⁺ [M+H]⁺ 526.3891; experimental 526.3896.

7.5.5.4. CLORURO DE 1-[(3S,5R,10S,13R)-17-[(R)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL]-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1H-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL)-N-(4-METOXIBENCIL) METANAMINIO (**6d**)



Sólido blanco. 44 % rendimiento. P.f. 132–135 °C. RMN-¹H (600 MHz, Piridina-d₅) δ 7.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.67 (s, 2H), 3.62 (s, 3H), 3.42 (q, *J* = 12.6 Hz, 2H), 2.66 (m, 2H), 0.98 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.58 (s, 3H). RMN-¹³C (151 MHz, CDCl₃) δ 176.87, 160.92, 132.96, 124.49, 114.99, 70.49, 58.51, 56.60, 55.50, 51.82, 43.17, 40.20, 38.47, 36.12, 36.02, 35.32, 32.21, 32.15, 28.74, 27.36, 26.91, 24.15, 18.93, 12.54. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₃H₅₂NO₄⁺ [M+H]⁺ 526.3891; experimental 526.3902.

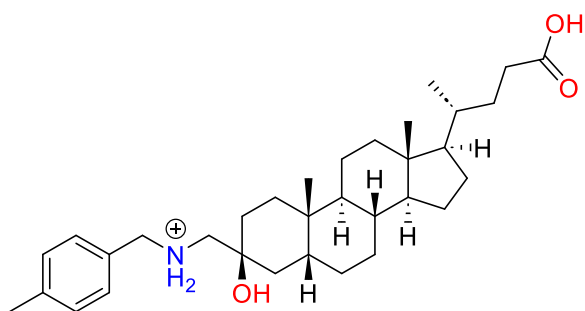
7.5.5.5. CLORURO DE 1-((3S,5R,10S,13R)-17-((R)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1H-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL)-N-(3-METILBENCIL) METANAMINIO (**6e**)



Sólido blanco. 25 % rendimiento. P.f. 249–250 °C. RMN-¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 12.13 (s, 1H), 9.22 (s, 1H), 7.57 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.48 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.03 (s, 1H), 4.25 (s, 2H), 4.13 (s, 1H), 2.91 (s, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.35 (m, 2H), 1.07 (s, 3H), 1.03 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H),

0.78 (s, 3H). RMN-¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ 174.81, 137.73, 137.26, 131.39, 130.97, 129.49, 128.49, 127.43, 125.94, 68.85, 56.91, 55.78, 55.63, 50.82, 39.52, 36.93, 35.15, 34.79, 30.73, 30.68, 23.31, 20.96, 20.65, 18.14, 11.83. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₃H₅₂NO₃⁺ [M+H]⁺ 510.3942; experimental 510.3943.

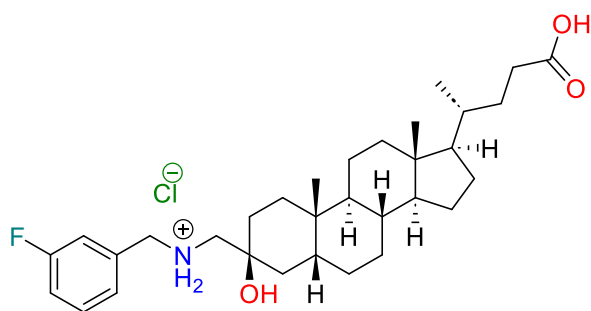
7.5.5.6. CLORURO DE 1-((3S,5R,10S,13R)-17-((R)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1H-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL)-N-(4-METILBENCIL) METANAMINIO (**6f**)



Sólido blanco. 22 % rendimiento. P.f. 255 °C. RMN-¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.92 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.83 (s, 1H), 4.07 (s, 2H), 2.70 (s, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.15 (m, 2H), 0.89 (s, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.60 (s, 3H). RMN-¹³C (126 MHz,

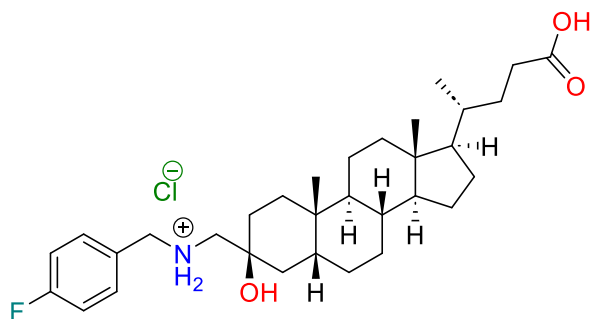
DMSO-d₆) δ 174.81, 138.29, 130.60, 129.31, 128.56, 68.98, 56.85, 55.94, 55.79, 50.68, 37.09, 35.32, 34.96, 30.89, 30.85, 23.93, 23.48, 20.97, 18.31, 12.0. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₃H₅₂NO₃⁺ [M+H]⁺ 510.3942; experimental 510.3943.

7.5.5.7. CLORURO DE 1-((3S,5R,10S,13R)-17-((R)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1H-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL)-N-(3-FLUOROBENCIL) METANAMINIO (**6g**)



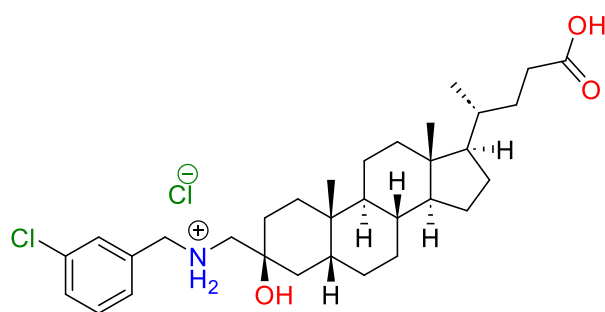
Sólido blanco. 40 % rendimiento. P.f. > 300 °C. RMN-¹H (600 MHz, Piridina-d₅) δ 7.89 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.06 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.44 (s, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.37 (q, *J* = 12.4 Hz, 2H), 2.61 (m, 2H), 0.97 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.58 (s, 3H). RMN-¹³C (151 MHz, Piridina-d₅) δ 172.21, 157.83, 126.79, 123.71, 122.43, 113.33, 111.83, 66.0, 54.82, 51.95, 47.43, 38.49, 33.84, 31.34, 30.68, 24.33, 24.06, 22.68, 22.07, 19.99, 19.45, 16.97, 14.24, 10.80. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₂H₄₉FNO₃ [M+H]⁺ 514.3691; experimental 514.3696.

7.5.5.8. CLORURO DE 1-((3S,5R,10S,13R)-17-((R)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1H-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL)-N-(4-FLUOROBENCIL) METANAMINIO (**6h**)



Sólido blanco. 52 % rendimiento. P.f. 234–236 °C. RMN-¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12.03 (s, 1H), 9.30 (d, *J* = 74.8 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.24 (d, *J* = 1.1 Hz, 2H), 4.90 (s, 1H), 4.12 (s, 2H), 3.41 (s, 2H), 2.72 (s, 2H), 0.88 (s, 3H), 0.84 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.58 (s, 3H). RMN-¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ 174.88, 161.6, 133.04, 132.98, 127.88, 115.48, 115.38, 68.93, 56.82, 55.80, 55.63, 49.89, 36.98, 35.21, 34.85, 34.25, 30.79, 30.72, 26.34, 25.85, 23.83, 23.39, 20.71, 18.19, 11.88. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₂H₄₉FNO₃⁺ [M+H]⁺ 514.3691; experimental 514.3705.

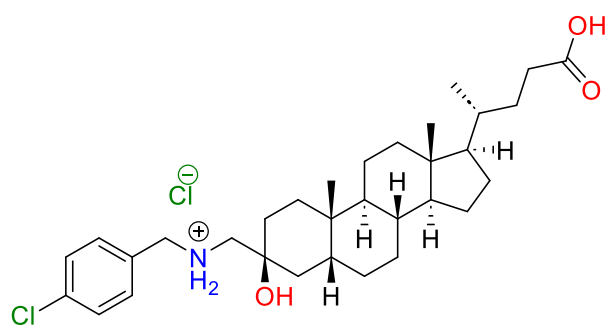
7.5.5.9. CLORURO DE 1-((3S,5R,10S,13R)-17-((R)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1H-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL)-N-(3-CLOROBENCIL) METANAMINIO (**6i**)



Sólido blanco. 79% rendimiento. P.f. 249–251 °C. RMN-¹H (600 MHz, Piridina-d₅) δ 7.64 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.17 (s, 1H), 3.98 (s, 2H), 2.87 (s, 2H), 1.04 (s, 3H), 1.00 (d, *J* = 3.9 Hz, 3H), 0.64 (s, 3H). RMN-¹³C (151 MHz, Piridina) δ 177.55, 135.15, 131.04,

129.72, 128.21, 127.99, 72.10, 57.35, 57.15, 54.73, 43.74, 41.21, 40.85, 39.29, 36.70, 36.54, 32.71, 29.27, 28.11, 27.49, 25.25, 24.88, 22.27, 19.44, 13.10. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₂H₄₉ClNO₃⁺ [M+H]⁺ 530.3396; experimental 530.3379.

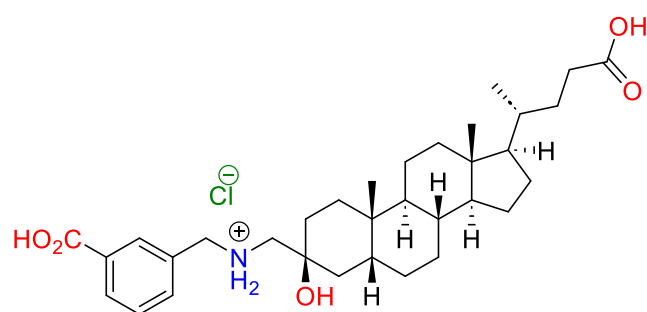
7.5.5.10. CLORURO DE 1-((3S,5R,10S,13R)-17-((R)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1H-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL)-N-(4-CLOROBENCIL) METANAMINIO (**6j**)



Sólido blanco. 82 % rendimiento. P.f. 255–256 °C. RMN-¹H (600 MHz, Piridina-d₅) δ 7.92–7.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.6 (s, 2H), 3.37 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 2.65 (m, 2H), 0.98 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.59 (s, 3H). RMN-¹³C (151 MHz, Piridina-d₅) δ 177.37, 133.36, 130.07,

71.13, 59.71, 57.13, 52.33, 41.07, 40.70, 39.02, 35.50, 36.61, 36.52, 35.85, 24.65, 22.15, 19.43, 13.05. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₂H₄₉ClNO₃⁺ [M+H]⁺ 530.3396; experimental 530.3388.

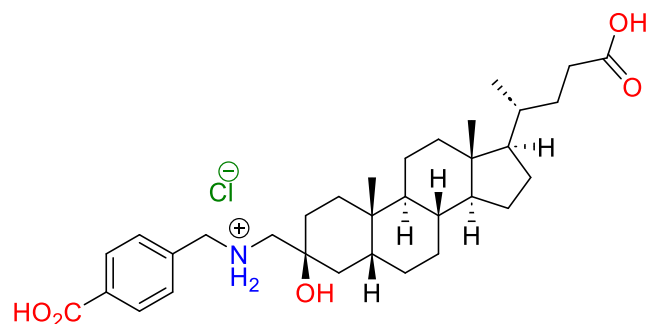
7.5.5.11. CLORURO DE *N*-(3-CARBOXIBENCIL)-1-((3*S*,5*R*,10*S*,13*R*)-17-((*R*)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1*H*-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL) METANAMINIO (**6k**)



Sólido blanco. 22 % rendimiento. P.f. 220–223 °C. RMN-¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12.39 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.98–7.97 (d, *J*= 7.7 Hz, 1H), 7.83–7.82 (d, *J*= 7.6 Hz 1H), 7.56 (t, *J*= 7.7 Hz 1H), 4.79 (s, 1H), 4.2 (s, 2H), 2.77 (s, 2H), 0.9 (s, 3H) 0.86–0.85 (d, *J*= 6.4 Hz, 3H),

0.6 (s, 3H). RMN-¹³C (151 MHz, DMSO-d₆) δ 174.83, 166.97, 134.94, 131.14, 129.77, 128.88, 68.84, 55.79, 55.65, 50.49, 39.52, 38.79, 36.91, 35.14, 34.90, 34.79, 34.23, 30.73, 26.29, 23.30, 18.15, 11.84. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₃H₅₀NO₅⁺ [M+H]⁺ 540.3684; experimental 540.3516.

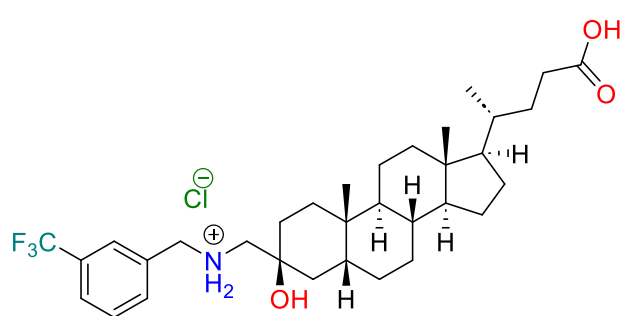
7.5.5.12. CLORURO DE *N*-(4-CARBOXIBENCIL)-1-((3*S*,5*R*,10*S*,13*R*)-17-((*R*)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1*H*-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL) METANAMINIO (**6l**)



Sólido blanco. 39 % rendimiento. P.f. 231–234 °C. RMN-¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ 7.95–7.94 (d, *J*= 7.9 Hz, 2H), 7.62–7.61 (d, *J*= 7.9 Hz, 2H), 4.18 (s, 2H), 2.7 (s, 2H), 0.85 (s, 3H), 0.79 (d, *J*= 5.8 Hz, 3H), 0.53 (s, 3H). RMN-¹³C (151 MHz, DMSO-d₆) δ 175.83, 167.66, 136.42,

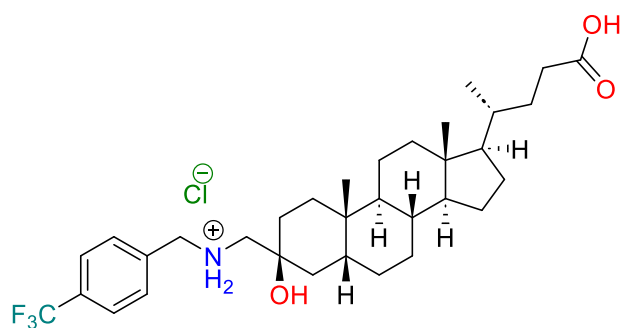
131.89, 131.06, 130.12, 69.33, 57.57, 56.34, 56.06, 51.0, 42.74, 37.39, 35.62, 35.26, 34.69, 29.68, 28.19, 26.69, 26.27, 23.80, 18.59, 12.29. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₃H₅₀NO₅⁺ [M+H]⁺ 540.3684; experimental 540.3388.

7.5.5.13. CLORURO DE 1-((3S,5R,10S,13R)-17-((R)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1H-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL)-N-(3-TRIFLUOROMETILBENCIL) METANAMINIO (**6m**)



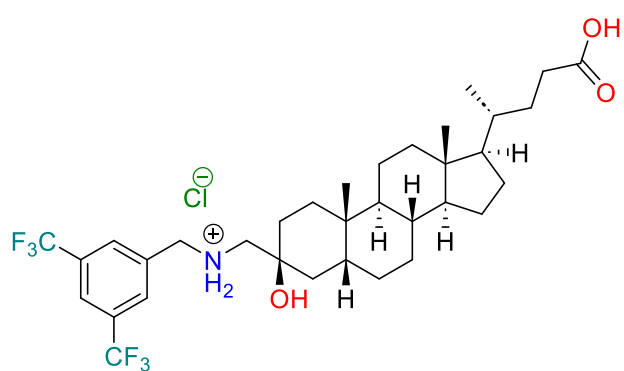
Sólido blanco. 26 % rendimiento. P.f. 248–250 °C. RMN-¹H (600 MHz, Piridina-d₅) δ 8.34 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.45 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 3.44 (q, *J* = 12.4 Hz, 2H), 2.60 (m, 2H), 0.98 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.58 (s, 3H). RMN-¹³C (151 MHz, Piridina-d₅) δ 176.82, 136.11, 134.98, 130.16, 127.90, 126.06, 124.1, 70.65, 59.43, 56.54, 52.05, 43.10, 40.49, 40.13, 38.45, 36.04, 35.95, 35.28, 32.14, 32.09, 31.13, 27.29, 26.83, 24.09, 18.87, 12.48. EMAR (ESI-experimental 564.3665.3H₄₉F₃NO₃⁺ [M+H]⁺ 564.3660; experimental 564.3665.

7.5.5.14. CLORURO DE 1-((3S,5R,10S,13R)-17-((R)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1H-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL)-N-(4-TRIFLUOROMETILBENCIL) METANAMINIO (**6n**)



Sólido blanco. 25 % rendimiento. P.f. 228 °C. RMN-¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ 7.77–7.76 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.21 (s, 1H), 2.74 (s, 2H), 0.85 (s, 3H), 0.80 (d, *J* = 6.4 Hz, d, 3H), 0.55 (s, 3H). RMN-¹³C (151 MHz, DMSO-d₆) δ 175.83, 136.25, 131.76, 130.18, 126.03, 126.01, 125.43, 123.62, 69.35, 57.64, 56.33, 56.09, 50.80, 42.75, 35.63, 35.26, 34.69, 31.24, 31.17, 29.63, 28.18, 26.68, 26.28, 23.77, 18.58, 12.29. EMAR (ESI-experimental 564.3652.3H₄₉F₃NO₃⁺ [M+H]⁺ 564.3660; experimental 564.3652.

7.5.5.15. CLORURO DE *N*-(3,5-BIS(TRIFLUOROMETIL)BENCIL)-1-((3S,5R,10S,13R)-17-((R)-4-CARBOXIBUTANO-2-IL)-3-HIDROXI-10,13-DIMETILHEXADECAHIDRO-1H-CICLOPENTA[A]FENANTREN-3-IL) METANAMINIO (**6o**)



Sólido blanco. 10% rendimiento. P.f. 222 °C. RMN-¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ 11.79 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 8.35 (d, *J*= 24.5 Hz, 2H), 8.16 (s, 1H), 4.84 (s, 1H), 4.34 (s, 2H), 2.85 (s, 2H), 2.16 (m, 2H), 0.9 (s, 3H), 0.86 (d, *J*= 6.5 Hz, 3H), 0.61 (s, 3H). RMN-¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ 174.83,

131.74, 130.26, 129.99, 122.64, 122.16, 68.94, 57.77, 55.83, 55.65, 49.83, 36.91, 35.15, 34.79, 30.73, 30.68, 25.81, 23.76, 23.31, 18.14, 11.83. EMAR (ESI-MS) *m/z* teórico para C₃₄H₄₈F₆NO₃⁺ [M+H]⁺ 632.3533; experimental 632.3545.

7.6. ENSAYOS IN VITRO

7.6.1. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

7.6.1.1. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA PTP1B

Los ensayos de inhibición enzimática se llevaron a cabo a través del método de detección espectrofotométrico de *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) y emplearon dos isoformas de PTP1B, *h*PTP1B₁₋₂₈₅ y *h*PTP1B₁₋₄₀₀ (forma corta y larga, respectivamente). Se prepararon soluciones stock (1000 μM) en DMSO de los compuestos y de los controles: ortovanadato de sodio (OV), ácido clorogénico (ACG) y TCS401. Alícuotas de 1–10 μL de los compuestos evaluados fueron incubados (por triplicado) con 90 μL de solución stock de proteína 66 nM en solución buffer (50 mM; Tris-HCl, pH 6.8) y 5 μL del sustrato *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP, 10 mM) a 37°C durante 15 min. El producto de hidrólisis, *p*-nitrofenol (*p*NP) fue leído a 405 nm usando un lector de absorbancia de microplacas. El porcentaje de inhibición se graficó en función de las concentraciones del inhibidor. El valor de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se realizó mediante un análisis de regresión usando la siguiente ecuación (OriginPro 2018):

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

donde $\%PTP1B$ es el porcentaje de inhibición de la enzima, A_{100} es el máximo de inhibición, i es la concentración del inhibidor, CI_{50} es la concentración requerida para inhibir el 50% de la actividad enzimática y s es el grado de cooperatividad.

7.6.1.2. ENSAYO DE CINÉTICA ENZIMÁTICA

Con base en los resultados de los ensayos de inhibición de la enzima PTP1B, algunos compuestos fueron seleccionados para el ensayo de cinética enzimática. Esta prueba biológica se realizó bajo las mismas condiciones que el ensayo de inhibición de la enzima, sólo variando las concentraciones del sustrato $pNPP$ por incrementos de 0.1 mM en un intervalo de concentración de 0.1–0.5 mM. Para los inhibidores, se emplearon 5 concentraciones, en aumento, tomando como referencia el valor de CI_{50} previamente determinado. Cada ensayo se realizó por duplicado de manera independiente.

Los parámetros estadísticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ fueron obtenidos por ajuste al modelo de Michaelis–Menten usando la siguiente ecuación (OriginPro 2018):

$$y = \frac{V_{max} i}{K_m + i}$$

donde V_{max} es la velocidad máxima, i es la concentración del inhibidor y K_m es la constante de Michaelis. Para determinar el tipo de inhibición enzimática, los datos se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal de acuerdo con las ecuaciones definidas para un modelo de inhibición competitiva, no competitiva, acompetitiva y mixta (ecuaciones 1–4, respectivamente).

$$y = \frac{V_{max}(x)}{K_m \left(1 + \left(\frac{i}{K_i}\right)\right) + x} \quad (1)$$

$$y = V_{max} \frac{x^{nh}}{\left(1 + \left(\frac{i}{K_i}\right)\right) (x_{0.5}^{nh}) + \left(1 + \left(\frac{i}{K_i}\right)\right) (s_{0.5}^{nh})} \quad (2)$$

$$y = \frac{V_{max} (x)}{(K_m/(1+i)/K_i) + x} \quad (3)$$

$$y = \frac{V_{max} (x)/(1+i)/(\alpha K_i)}{x + K_m \left(\frac{(1+i)}{K_i}\right)/(1+i)/(\alpha K_i)} \quad (4)$$

donde V_{max} es la velocidad máxima, x es la concentración de sustrato, i es la concentración de inhibidor, nh es la constante de Hill, K_i es la constante de inhibición y K_m es la constante de Michaelis.

7.6.1.3. ENSAYO DE SELECTIVIDAD ENZIMÁTICA PTP1B VS TCPTP

Los ensayos para determinar la selectividad de los nuevos compuestos frente a PTP1B versus TCPTP se realizaron de manera similar a los ensayos de inhibición enzimática, usando como material biológico *h*PTP1B_{1–400} y *h*TCPTP_{1–415}.

7.6.1.4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA

La expresión y purificación de *h*PTP1B (corta y larga) y de *h*TCPTP se llevó a cabo tal como se describe en Coronell–Tovar et al., 2023; Mendoza–Jasso et al., 2024, respectivamente.

7.6.2. ENSAYOS CON LÍNEAS CELULARES

Para los ensayos de citotoxicidad se emplearon 2 líneas celulares de fibroblastos, HFF–1 (humano) y 3T3–L1 (ratón). Estas fueron donadas por el Dr. Francisco Cortés de la UAM–Xochimilco y por el Dr. José Carlos Páez del Hospital de Nutrición Salvador Zubirán.

Las líneas celulares se descongelaron a 37 °C y fueron trasvasadas a frascos T25 que contenían 5 mL del medio adecuado (DMEM para fibroblastos; suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%), permitiendo su crecimiento a una temperatura de 37 °C y 5%

de CO₂ hasta alcanzar una confluencia $\geq 75\%$. Posteriormente fueron sembradas en placas de 96 pozos a una concentración celular de 3000 cél/pozo.

7.6.2.1. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD POR EL MÉTODO DE SULFORRODAMINA B (SRB)

Las células previamente sembradas se mantuvieron en incubación a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, fueron expuestas, durante 48 horas y bajo condiciones de incubación, a los tratamientos con el ácido litocólico y sus derivados en un rango de concentración de 3.125–100 μM . Se empleó metformina como control positivo de no citotoxicidad.

Concluidas las 48 h de exposición, las células se fijaron con una solución de ácido tricloroacético al 50% (m/v) y se incubaron a 4 °C por 2 horas. Posteriormente, las placas se enjuagaron con agua, se secaron y se agregaron 100 μL /pozo de SRB al 4% y se incubaron 60 min a temperatura ambiente, para proceder con 2–5 lavados con ácido acético (1% v/v). Finalmente, se agregaron 100 μL /pozo de una solución Tris–base (pH= 10.5) y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una $\lambda = 490 \text{ nm}$. Con los valores obtenidos se determinó el porcentaje de viabilidad y de mortalidad. Mediante un análisis probit, usando el programa estadístico STAT5, se determinó el valor de citotoxicidad media (CC₅₀) de los derivados.

7.6.2.2. ENSAYO DE DIFERENCIACIÓN DE PRE-ADIPOCITOS A ADIPOCITOS A PARTIR DE CÉLULAS 3T3–L1

Células 3T3–L1 fueron sembradas en placas de 96 pozos a una concentración celular de 3000 cél/pozo. Tras 24 horas de incubación en medio DMEM suplementado con SFB al 10%, las células fueron expuestas al medio de inducción de la diferenciación (MID) compuesto por isobutilmetilxantina (IBMX, 0.25 μM), dexametasona (DXM, 2.5 μM), insulina (Ins, 0.1 μM) y pioglitazona (PGZ, 10 μM). El cambio de MID fresco se realizó a los días 1, 4, 7 y 9 (D1, D4, D7 y D9, respectivamente). La diferenciación ocurrió en los días 5–9 desde el inicio del tratamiento.

Las células diferenciadas (adipocitos) fueron sometidas a ensayos de citotoxicidad por el método de SRB descrito en el apartado anterior.

7.6.2.3. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS EN UN MODELO DE PRE-ADIPOCITO USANDO CÉLULAS 3T3-L1

Las células previamente sembradas se mantuvieron en medio DMEM suplementado y en incubación a 37 °C y 5% CO₂ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio DMEM por MID. Las células fueron expuestas a los tratamientos con el ácido litocólico y sus derivados en un rango de concentración de 3.125–100 µM durante 9 días, realizando el cambio del MID los días D1, D4, D7 y D9. Al día 10 (D10) se realizó el ensayo de detección de lípidos por el método de tinción con rojo oleoso (RO).

7.6.2.4. ENSAYO DE DETECCIÓN DE LÍPIDOS POR EL MÉTODO DEL ROJO OLEOSO

Las células se fijaron con una solución de *p*-formaldehído (PFA) al 4%. Se incubaron durante 60 min a 4 °C para posteriormente ser lavadas con PBS 1x e incubadas 5 min con isopropanol (60%). A continuación, las células fueron teñidas con una solución de rojo oleoso al 5% (m/v) en isopropanol e incubadas durante 20–30 min, tras lo cual fueron lavadas de 2–3 veces con agua. Para realizar la medición de absorbancia, se agregaron 100 µL/pozo de isopropanol y se leyó a una $\lambda = 490$ nm.

7.7. ESTUDIOS COMPUTACIONALES

7.7.1. MODELO ESTRUCTURAL DE *h*PTP1B_{1–400} Y *h*TCPTP_{1–415}

Los modelos estructurales de ambas enzimas se diseñaron y obtuvieron tal como se describe en Mendoza–Jasso (2024).

7.7.2. MODELADO MOLECULAR (DOCKING MOLECULAR)

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron empleando los modelos estructurales de *h*PTP1B_{1–400} y *h*TCPTP_{1–415}.

Los ligandos 6c–6f, 6k–6o, ácido litocólico (AL), TCS401 y ácido ursólico (UA) fueron contruidos y minimizados usando AVOGADRO (Hanwell et al., 2012). La preparación de los archivos pdb de las proteínas y los ligandos se realizó usando AutoDock Tools 1.5.4 (Morris et al., 2009). Los átomos de hidrógeno polares y las cargas parciales de los átomos unidos de Kollman se añadieron a las estructuras de las proteínas. Las cargas de Gasteiger–Marsili y los grupos rotatorios se asignaron automáticamente a las estructuras de los ligandos. Se hizo uso de idock (Li et al., 2012) para ejecutar todo el estudio de docking. El tamaño de la caja de la rejilla para *h*PTP1B_{1–400} fue de 68 Å × 94 Å × 84 Å en las dimensiones x, y y z, y las coordenadas centrales de 25,6, 65,8 y 42,1 para x, y y z, respectivamente; mientras que para *h*TCPTP_{1–415} el tamaño de la caja de la rejilla fue de 100 Å x 100 Å x 100 Å para x, y y z, respectivamente y las coordenadas centrales de 90.47, 52.41 y 76.27 para x, y y z, respectivamente, con una exhaustividad de 25 en ambos casos. Los mejores estados conformacionales se visualizaron con PyMOL, versión 2.4.0, y Maestro Visualizer, v. 21.1.020298.

7.7.3. ESTUDIOS DE SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR (MDS)

Las coordenadas de los ligandos resultantes del estudio de docking se procesaron con una antecámara para generar topologías adecuadas para el módulo LEaP de AmberTools22 (Case et al., 2005, 2023). Cada estructura y complejo se sometieron al siguiente protocolo: se añadieron hidrógenos y otros átomos que faltaban utilizando el módulo LEaP con el campo de fuerza Amber ff99SB, además de contraiones Na⁺ para neutralizar el sistema. Los complejos se solvataron en una caja octaédrica de moléculas de agua modelo TIP3P explícitas, localizando los límites de la caja a 12 Å de la superficie de la proteína. La MDS se realizó a una presión de 1 atm y temperatura de 310 K, mantenidas con el baróstato y el termostato Berendsen, utilizando condiciones de contorno periódicas y sumas de Ewald de malla de partículas (espaciado de rejilla de 1 Å) para tratar las interacciones electrostáticas de largo alcance con un corte de 10 Å para computar las interacciones directas. Para satisfacer las restricciones de enlace se utilizó el algoritmo SHAKE, lo que permitió emplear un paso de tiempo de 2 fs para integrar las ecuaciones de Newton, tal y como recomienda el paquete AmberTools22. Se utilizaron los parámetros del campo de fuerza de Amber ff99SB para todos los residuos y los

parámetros del campo de fuerza de Gaff para los ligandos. (Case et al., 2023; Lindorff-Larsen et al., 2010; Thomas et al., 2013; Wang et al., 2006). Todos los cálculos se realizaron utilizando el motor MDS acelerado por unidades de procesamiento gráfico GeForce en AMBER (pmemd.cuda), un paquete de programas que se ejecuta íntegramente en GPUs con CUDA. (Salomon-Ferrer et al., 2013)

El protocolo consistió en optimizar la estructura inicial, seguido de un paso de calentamiento de 50 ps a 298 K, 50 ps para el equilibrio a volumen constante y 500 ps para el equilibrio a presión constante. Se realizaron, por triplicado, MDS independientes de 200 ns a una temperatura de 310 K, de la proteína y de los complejos PTP1B-pNPP-ligando. Los fotogramas se guardaron a intervalos de 100 ps para su posterior análisis.

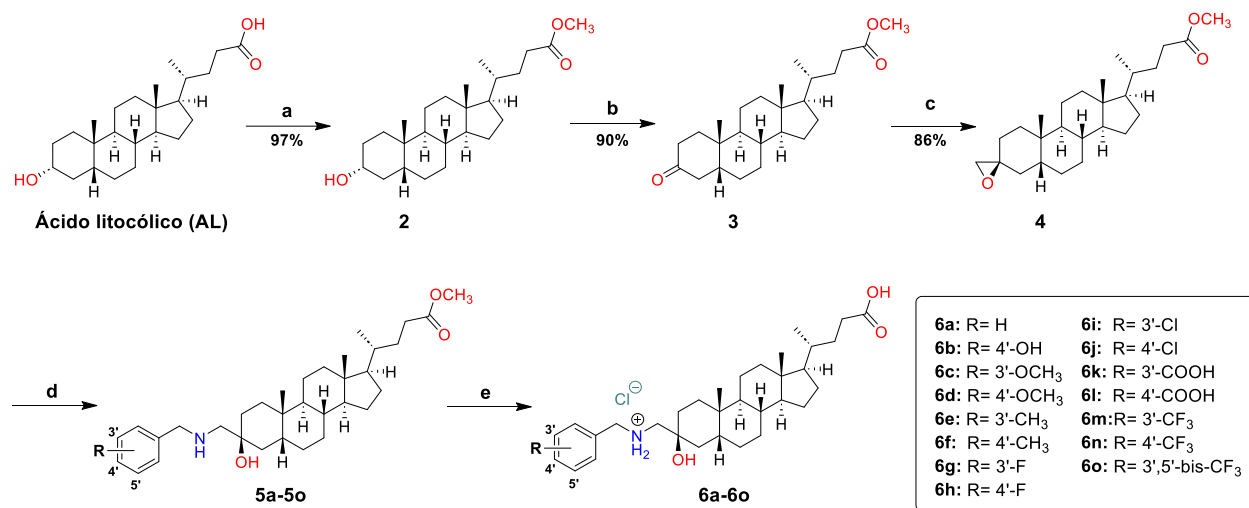
7.7.3.1. ANÁLISIS DE TRAYECTORIA DE LOS ESTUDIOS DE MDS

En los análisis se utilizó CPPTRAJ (Díaz-Rojas et al., 2023) como parte de las utilidades AmberTools22 y Origin 9.0. En primer lugar, se realizaron los cálculos de RMSD y Root Mean Square Fluctuations (RMSF), considerando el C, CA y N; sólo se utilizó el CA para las distancias. Los gráficos se crearon con Origin 9.0 y las tendencias se ajustaron mediante el procesamiento de funciones suaves (método Lowess). Las energías libres de enlace calculadas mediante mecánica molecular/área superficial de Poisson Boltzmann (MM/PBSA) se calcularon utilizando una técnica que combina la energía de la mecánica molecular con modelos de solvatación implícitos para estimar las energías libres de enlace. (Treesuwan & Hannongbua, 2009; Zhou & Madura, 2004).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. PARTE QUÍMICA

Los nuevos derivados del ácido litocólico con diferentes grupos bencilaminometilo en C3 se obtuvieron vía el siguiente esquema de síntesis (Esquema 8.1).



Esquema 8.1. Rendimientos obtenidos en cada etapa de la ruta de síntesis para la obtención de los nuevos derivados del AL.

Para la obtención de los nuevos derivados (**6a–6o**), se empleó el ácido litocólico (AL) como materia prima. El primer paso de reacción fue la generación del éster metílico del ácido empleando metanol y cloruro de tionilo obteniendo **2** con un rendimiento del 97%. Este intermediario fue sometido a una reacción de oxidación con dicromato de piridinio para generar la cetona **3** con un rendimiento del 90%. La generación del oxirano **4** fue clave para la obtención de los derivados finales. Este intermediario se obtuvo a partir de la cetona **3** vía la reacción de epoxidación de Corey–Chaikovsky con un rendimiento del 86%. (Cook et al., 1968; Corey & Chaykovsky, 1962). Los intermediarios **5a–5o** se sintetizaron vía la apertura nucleofílica del oxirano **4** con bencilaminas *meta*- y *para*-sustituidas en etanol a reflujo (Cortés–Benítez et al., 2017; Maltais et al., 2011). Estos intermediarios fueron purificados mediante cromatografía en columna para finalmente ser hidrolizados en condiciones alcalinas seguidas de la acidificación para la obtención de

los compuestos finales (**6a–6o**) en su forma de clorhidrato con rendimientos globales que van del 10 al 80 %.

Debido a la unión *cis* de los anillos A/B del núcleo esteroidal, los 5 β esteroides tienen un mayor impedimento estérico en la cara alfa del carbonilo en la posición C3. Como resultado, producen 3 β -oxiranos cuando son expuestos a condiciones de reacción de Corey–Chaykovsky con metiluro de dimetilsulfoxonio. Un estudio previo (Aher et al., 2009) confirmó esta observación utilizando difracción de rayos X de cristal único para el metil–(3 β -oxirano)–12 α -hidroxi–5 β -colano–24-oato sintetizado a partir de su derivado 3-ceto bajo las mismas condiciones de reacción. Sin embargo, la estereoquímica del 3-oxirano (**4**) continúa desconocida y requiere ser determinada para deducir la estereoquímica de los compuestos finales **6a–6o**. Para determinarla, se llevó a cabo una difracción de rayos X de cristal único del intermediario **4**. Como se anticipó, los datos de este estudio corroboraron el grupo 3 β -oxirano de este intermediario (Anexo I).

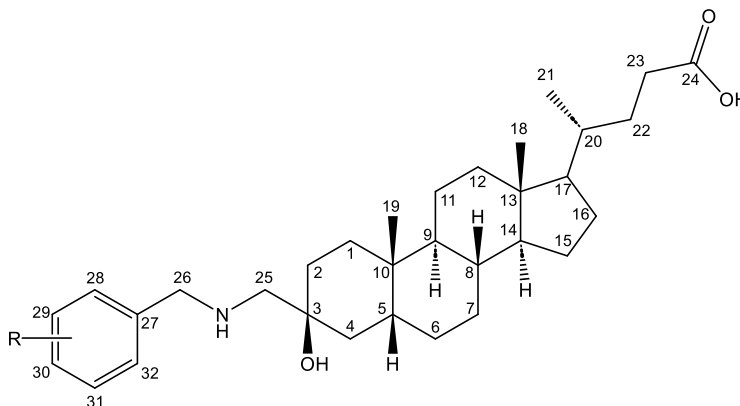
Con base en los espectros de RMN-¹H de los compuestos finales (Tabla 8.1 y Anexo I), se observa la desaparición de una señal a 5 ppm, correspondiente al grupo metileno del intermediario oxirano (**4**). La presencia de 2 señales alrededor de 2.7 y 4.1 ppm corresponde a los grupos metileno de C25 y C26, respectivamente. Señales entre 7 y 8 ppm con constantes de acoplamiento alrededor de 8 Hz fueron asignadas al grupo bencílico, mientras que una señal alrededor de 4.8 ppm alude al alcohol en C3 (3-OH). Una señal amplia alrededor de 9 ppm se adjudicó al grupo Bz–NH₂⁺–CH₂–. Algo a destacar de esta señal es que, cuando se empleó piridina deuterada, sólo se observó una señal que integró a un protón, lo que sugiere que estos derivados se obtuvieron como clorhidratos. El protón del ácido 24–COOH fue asignado a la señal alrededor de 11.8 ppm. Con respecto al análisis de los espectros de RMN-¹³C (Tabla 8.2 y Anexo I), las señales en el rango de 135–120 ppm corresponden al anillo de benceno. Señales cercanas a 174 y 70 ppm conciernen al grupo carboxilo 24–COOH y al carbono cuaternario C3, respectivamente.

Debido a que el intermediario **4** es un 3 β -oxirano, se sospechó que los compuestos finales **6a–6o** tenían un alcohol terciario en posición 3 β . Para determinar la orientación

espacial del grupo bencilaminometilo y, por ende, del alcohol anclado a C3 del esteroide, se realizaron los experimentos de espectroscopía en 2D, HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), COSY (Correlation Spectroscopy) y NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) del derivado **6f** (Anexo I). Los desplazamientos químicos del ácido litocólico fueron reportados previamente por Waterhous et al. (1985). Las señales de 0.9 ppm y 23.28 ppm fueron asignadas al metilo C19 (19-CH₃). Con los experimentos HMBC y HSQC, las posiciones de los carbonos C10, C5 y C1 fueron asignadas a los desplazamientos químicos de 34.19, 38.77 y 30.55 ppm, respectivamente. Los protones 5β-CH y 1-CH₂ se encontraron en desplazamientos químicos de 1.29, 1.69 y 1.16 ppm, respectivamente. La posición C25 fue crucial para determinar la orientación del grupo sustituyente bencilaminometilo en C3 del esteroide. El grupo metileno de C25 mostró una señal simple que integra 2 protones y un desplazamiento químico de 2.71 y 56.66 ppm. Un hallazgo interesante para este grupo fue que su multiplicidad varía dependiendo del disolvente empleado. En DMSO-*d*₆, aparece como una señal simple, mientras que en piridina-*d*₅ esta se divide en un cuádruplete y se desplaza a 3.37 ppm. En el experimento HMBC, este grupo metileno interactúa con los carbonos de las posiciones C2, C3 y C4 con desplazamientos químicos de 35.13, 68.79 y 29.29 ppm, respectivamente. Usando experimentos HSQC y COSY, los protones correspondientes a los metilenos 2-CH₂ fueron asignados a 1.68 y 1.17 ppm; mientras que las señales de 1.33 y 1.25 ppm conciernen a 4-CH₂. Con ayuda del experimento NOESY se determinó la orientación de los protones. De manera específica, se observó una interacción interespacial del protón 5β-H con la señal de 1.25 ppm del 4-CH₂, asignando ésta a una posición 4β-H, mientras que la señal de 1.33 ppm fue asignada al protón 4α-H. Además, la señal del metilo 19-CH₃, orientada hacia la cara beta del esteroide fue observada por tener una interacción NOE con la señal de 1.16 ppm del grupo 1-CH₂, asignándola al protón 1β-H, mientras que para el protón 1α-H se asignó la señal con desplazamiento químico de 1.66 ppm. Los experimentos COSY y NOESY, así como los datos de las posiciones 1-CH₂ y 4-CH₂ determinaron que los desplazamientos de 1.68 y 1.17 ppm corresponden a los protones 2α-H y 2β-H, respectivamente. Finalmente, se observó que solo los desplazamientos químicos de 1.68 y 1.33 ppm corresponden a las posiciones 2α-H y 4α-H,

respectivamente, mostrando una correlación NOE con el grupo 25-CH₂. Por lo tanto, se asume que el grupo bencilaminometilo, unido a la posición C3 del ácido litocólico, está orientado hacia la cara alfa del esqueleto esteroidal, mientras que el grupo 3-OH está orientado hacia la cara beta.

Tabla 8.1. Desplazamientos químicos (ppm) detectados por RMN-¹H de los nuevos derivados 3α-bencilaminometilo del ácido litocólico



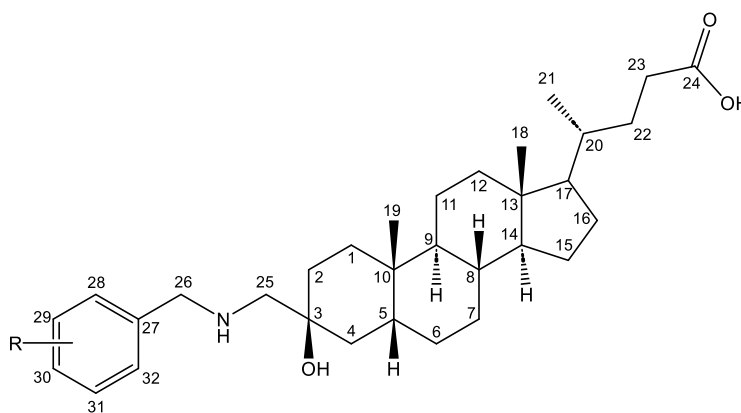
Derivado	AL ^a	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g
R	—	H	4'-OH	3'-OCH ₃	4'-OCH ₃	3'-CH ₃	4'-CH ₃	3'-F
H-3	3.51	—	—	—	—	—	—	—
H-18	0.64	0.58	0.59	0.58	0.58	0.78	0.6	0.58
H-19	0.91	0.94	0.85	0.95	0.95	1.03	0.9	0.97
H-21	0.92	0.98	0.88	0.98	0.98	1.07	0.84	0.94
24-COOH	1.18	—	12.0	—	—	12.1	11.9	—
H-25		3.38	2.68	3.43	3.42	2.91	2.71	3.37
H-26		4.66	4.83	4.69	4.67	4.13, 4.25	4.07	4.61
H-28		7.96	7.36	7.59	6.93	7.57	7.45	7.89
H-29		7.33	6.8	7.85	7.92	7.48	7.23	7.29
H-30		7.29	—	7.28	—	7.39	—	7.71
H-31		7.3	6.8	—	7.92	—	7.23	—
H-32		7.96	7.33	7.45	6.93	7.57	7.45	7.06
3-OH		—	—	—	—	5.03	4.84	5.44
Otros		—	9.81 (Ar-OH)	3.76 (Ar-OCH ₃)	3.62 (Ar-OCH ₃)	2.68 (Ar-CH ₃)	2.31 (Ar-CH ₃)	—
NH ₂		—	8.93	6.95	—	9.22	9.02	—

...continuación de Tabla 8.1

Derivado	6h	6i	6j	6k	6l	6m	6n	6o
R	4'-F	3'-Cl	4'-Cl	3'-COOH	4'-COOH	3'-CF ₃	4'-CF ₃	3',5'-bis-CF ₃
H-18	0.58	0.64	0.59	0.6	0.53	0.58	0.55	0.61
H-19	0.84	1.00	0.98	0.86	0.79	0.98	0.8	0.86
H-21	0.88	1.04	0.96	0.9	0.85	0.95	0.85	0.9
24-COOH	12.0	—	—	12.3	—	—	—	11.7
H-25	2.72, 3.41	2.87	3.37	2.77	2.7	3.44	2.74	2.85
H-26	4.12	3.98	4.6	4.2	4.18	4.75	4.21	4.34
H-28	7.24	7.41	7.34	8.17	7.62	7.72	7.76	8.35
H-29	7.69	7.26	7.92	7.56	7.95	7.45	7.73	—
H-30	—	7.23	—	7.83	—	8.28	—	8.16
H-31	7.69	—	7.92	—	7.95	—	7.73	—
H-32	7.24	7.64	7.34	7.98	7.62	8.34	7.76	8.35
3-OH	4.9	5.17	—	4.79	—	—	—	4.84
Otros	—	—	—	3.33 (24-COOCH ₃)	—	—	—	—
NH ₂	9.3	—	—	8.92	—	—	—	9.2

^a (Waterhous et al., 1985)

Tabla 8.2. Desplazamientos químicos (ppm) detectados por RMN-¹³C de los nuevos derivados 3α-bencilaminometilo del ácido litocólico



Derivado	AL ^a	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g
R	—	H	4'-OH	3'-OCH ₃	4'-OCH ₃	3'-CH ₃	4'-CH ₃	3'-F
C-3	70.5	69.92	68.92	70.7	70.49	68.85	68.79	66
C-18	11.9	11.94	11.96	12.71	12.54	11.83	11.81	10.8
C-19	23.3	21.03	23.45	24.32	24.15	23.31	23.28	16.97
C-21	18.2	18.33	18.26	19.1	18.93	18.14	18.12	14.24
24-COOH	178.1	176.71	174.97	177.05	176.87	174.81	174.81	172.21
C-25	—	58.83	56.54	59.07	58.51	56.91	56.66	54.82
C-26	—	52.28	52.83	52.58	51.82	50.82	50.49	47.43
C-27	—	132.97	121.4	134.56	132.96	137.73–125.94	128.37	126.79
C-28	—	131.08	132.09	123.39	114.99		129.12	122.43
C-29	—	129.43	115.42	130.75	124.349		130.41	157.83
C-30	—	129.39	158.2	116.58	160.92		138.29	111.83
C-31	—	129.43	115.42	161.01	124.49		130.41	123.71
C-32	—	131.08	132.09	116.07	114.99		129.12	113.33
Otros		—	—	55.99 (Ar-OCH ₃)	55.5 (Ar-OCH ₃)	23.31 (Ar-CH ₃)	20.78 (Ar-CH ₃)	—

...continuación Tabla 8.2

Derivado	6h	6i	6j	6k	6l	6m	6n	6o
R	4'-F	3'-Cl	4'-Cl	3'-COOH	4'-COOH	3'-CF ₃	4'-CF ₃	3',5'-bis-CF ₃
C-3	68.93	72.1	71.13	68.84	69.33	70.65	69.35	68.94
C-18	11.88	13.1	13.05	11.84	12.29	12.48	12.29	11.83
C-19	20.71	22.27	22.15	23.3	23.8	24.09	23.77	23.31
C-21	18.19	19.44	19.43	18.15	18.59	18.87	18.58	18.14
24-COOH	174.88	177.55	177.37	174.83	175.83	176.82	175.83	174.83
C-25	56.82	57.35	59.71	55.79	57.57	59.43	57.64	57.77
C-26	49.89	54.53	52.33	50.49	51	52.05	50.8	49.83
C-27	133.04	135.15– 127.99	130.07	134.94	136.42– 130.12	136.11	136.25	131.74
C-28	132.98–127.88	135.15– 127.100		129.77– 128.88		134.98	131.76	129.99
C-29	115.48–115.34	135.15– 127.101		131.14		127.9	126.03	130.26
C-30	161.6	135.15–		129.77–		126.06	123.62	129.99

		127.102		128.88				
C-31	115.48–115.34	135.15– 127.103	130.07			130.16	126.01	130.26
C-32	132.98–127.88	135.15– 127.104				126.06	130.18	122.16
Otros	—	—	—	166.97 (Ar–COOH)	167.66 (Ar–COOH)	124.1 (Ar–CF ₃)	125.43 (Ar–CF ₃)	122.64 (Ar–(CF ₃) ₂)

8.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

8.2.1. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

8.2.1.1. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE PTP1B DE LOS DERIVADOS 3 α -BENCILAMINOMETILO DEL ÁCIDO LITOCÓLICO

La serie de 15 derivados del AL (**6a–6o**) fue evaluada como potenciales inhibidores de la enzima PTP1B. En los ensayos enzimáticos se emplearon dos variantes de la enzima, *h*PTP1B_{1–285} y *h*PTP1B_{1–400} (forma corta y larga, respectivamente). La finalidad de emplear ambas variantes fue inferir el posible sitio de unión de los compuestos. La forma corta contiene el dominio catalítico, compuesto por los residuos de aminoácidos Tyr⁴⁶, Asp⁴⁸, Lys¹²⁰, Asp¹⁸¹, Phe¹⁸², Cys²¹⁵, Ser²¹⁶, Ile²¹⁹, Arg²²¹, y Gln²⁶². Por su parte, la forma larga consiste en el sitio catalítico, además de una región C-terminal desestructurada. La expresión y purificación de la enzima se llevó a cabo usando un método previamente reportado (Coronell–Tovar et al., 2023). En este mismo trabajo, se recalca la importancia de realizar los ensayos enzimáticos con la forma larga de la enzima, ya que es esta la que se encuentra in vivo en nuestro organismo.

Los 15 nuevos compuestos y los inhibidores de referencia, ácido litocólico (AL), ácido ursólico (UA), suramina (SUR), ácido clorogénico (ACG) y TCS401 (Anexo III) fueron evaluados a diferentes concentraciones. Para los inhibidores de referencia, se encontraron valores de concentración inhibitoria media (CI₅₀) de 14.0, 6.8, 2.6, 392.3 y 8.1 μ M, respectivamente (Tabla 8.3).

Con base en los resultados de inhibición de los nuevos derivados de AL (Tabla 8.3), resultó de interés observar cómo la incorporación de moléculas bencilaminometilo en la posición C3 del esteroide favoreció la actividad biológica de este, obteniendo compuestos con mejor potencia que el AL *per se*. Ejemplo de ello fueron los derivados **6m** y **6n** con valores de Cl_{50} de 7.3 y 5.3 μ M, respectivamente, demostrando ser 2 y 3 veces más potentes que el AL, respectivamente. Además, también demostraron ser más potentes que el TCS401 y el ACG, y con una potencia similar a la del UA. Para los derivados **6g–6j** no fue posible determinar su potencial inhibitorio sobre PTP1B debido a que precipitaron en el medio.

Como se observa en la tabla 8.3, los derivados trifluorometilados (**6m** y **6n**) fueron los más potentes (Cl_{50} = 7.3 y 5.3 μ M, respectivamente). El grupo trifluorometilo ($-CF_3$) es un grupo electroatractor que puede actuar como aceptor de puentes de hidrógeno no clásicos. Al realizar un estudio SAR exploratorio considerando factores electrónicos (σ de Hammett), lipófilos (π de Hansch) y estéricos (Es de Taft), los derivados **6m–6o** presentan los valores más altos de σ y π , así como los más negativos de Es (Tabla 8.4). Esto sugiere que la molécula se une a sitios lipófilos y electropositivos de la enzima. Sin embargo, la presencia de grupos polares ($-OH$ y $-COOH$ para los compuestos **6b**, **6k**) conduce a una reducción de la actividad debido a que estos grupos restan carácter lipófilo a la molécula, lo que podría estar generando una disminución en el número de interacciones de este tipo dentro de la enzima. El efecto estérico también juega un papel importante en la inhibición de la enzima PTP1B. El compuesto **6o**, que cuenta con dos grupos $-CF_3$ en el anillo aromático, mostró una disminución de la potencia, lo que indica que la presencia de dos o más grupos voluminosos en estos derivados del AL no es bien tolerada para la inhibición de PTP1B.

Tabla 8.3. Concentración inhibitoria media (CI_{50}) de los nuevos derivados 3 α -bencilaminometilo de ácido litocólico (6a–6o)

Compuesto	R	$CI_{50} \pm DE$ (μM)	
		<i>h</i> PTP1B _{1–285}	<i>h</i> PTP1B _{1–400}
6a	H	ND	33.1 $\pm$ 2.7
6b	4'–OH	ND	26.9 $\pm$ 3.5
6c	3'–OCH ₃	ND	10.5 $\pm$ 0.2
6d	4'–OCH ₃	ND	26.6 $\pm$ 0.9
6e	3'–CH ₃	53.8 $\pm$ 2.7	16.3 $\pm$ 0.5
6f	4'–CH ₃	46.0 $\pm$ 1.7	34.3 $\pm$ 0.5
6g	3'–F	ND	> 100
6h	4'–F	ND	> 100
6i	3'–Cl	ND	> 100
6j	4'–Cl	ND	> 100
6k	3'–COOH	ND	32.3 $\pm$ 1.2
6l	4'–COOH	33.3 $\pm$ 2.4	12.6 $\pm$ 0.7
6m	3'–CF ₃	34.9 $\pm$ 0.4	7.3 $\pm$ 0.5
6n	4'–CF ₃	16.3 $\pm$ 0.9	5.3 $\pm$ 0.2
6o	3',5'–bis–CF ₃	43.0 $\pm$ 1.3	11.0 $\pm$ 0.2
AL	—	22.2 $\pm$ 0.9	14 $\pm$ 0.9
UA ^a	—	26.59 $\pm$ 1.46	6.83 $\pm$ 0.07
SUR ^a	—	9.95 $\pm$ 0.39	2.59 $\pm$ 0.15
TCS401	—	12.4 $\pm$ 1.0	8.1 $\pm$ 0.9
ACG	—	718.6 $\pm$ 93.4	392.3 $\pm$ 16.8

ND: no determinado. ^a Tomado de Coronell–Tovar (2023).

Por otra parte, para estudiar y determinar la afinidad de los nuevos derivados por la forma corta (*h*PTP1B_{1–285}) versus la forma larga (*h*PTP1B_{1–400}) de la enzima, los compuestos **6e**, **6f**, **6l–6o**, así como los inhibidores de referencia AL, TCS401, UA, SUR y ACG fueron ensayados usando la isoforma *h*PTP1B_{1–285}. Los resultados de CI_{50} para TCS401 revelaron que esta molécula tiene una potencia muy similar en ambas formas, mientras que el ACG y la SUR mostraron ser 2 y 4 veces más potentes en la forma larga,

respectivamente. Estos tres derivados están reportados como inhibidores competitivos; no obstante, el hecho de que el ACG y la SUR hayan mostrado mayor afinidad por la forma larga de la enzima frente a la forma corta sugiere que los residuos 286–400 de *h*PTP1B_{1–400} desempeñan un papel significativo en la actividad inhibitoria de ambos inhibidores. Por su parte, el control UA también mostró una afinidad cuatro veces mayor por *h*PTP1B_{1–400} en comparación con *h*PTP1B_{1–285}. Este inhibidor está reportado como un inhibidor mixto, es decir, que se puede unir tanto a la forma libre de la enzima como al complejo enzima–sustrato.

Al evaluar la afinidad del AL, este fue 1.5 veces más potente en la forma larga en comparación con la forma corta. De manera general, todos los derivados evaluados en ambas formas de PTP1B mostraron una mayor afinidad (3–5 veces más) por *h*PTP1B_{1–400} versus *h*PTP1B_{1–285}, excepto **6f**, que no mostró una diferencia significativa en la potencia entre ambas formas de PTP1B.

Estos resultados sugieren que la adición del grupo bencilaminometilo en la posición C3 del AL favorece la actividad inhibitoria de la forma larga de PTP1B. Además, esta modificación estructural del esteroide puede favorecer la interacción de estos nuevos inhibidores con los residuos 286–400 de la enzima, demostrando que estos residuos son cruciales para el efecto inhibitorio. Estas interacciones son particularmente significativas para los compuestos con grupos trifluorometilo en el bencilo, ya que este grupo podría colaborar en el posicionamiento de los derivados dentro de la enzima con una conformación tal que favorece la inhibición de PTP1B permitiendo un incremento del efecto inhibitorio.

Tabla 8.4. Parámetros electrónicos, lipófilos y estéricos para los derivados 6a–6o

Compuesto	R	^a π	^a σ_m	^a σ_p	^a Es	^b MR	^b Log P
6a	H	0.0	0.0	0.0	0.0	155.35	4.86
6b	4'–OH	–0.67	–	–0.37	–0.55	157.37	4.52
6c	3'–OCH ₃	–0.02	0.12	–	–0.55	161.84	4.79
6d	4'–OCH ₃	–0.02	–	–0.27	–0.55	161.84	4.79

6e	3'-CH ₃	0.56	-0.07	-	-1.24	160.31	5.14
6f	4'-CH ₃	0.56	-	-0.17	-1.24	160.31	5.14
6g	3'-F	0.14	0.34	-	-0.46	155.30	5.15
6h	4'-F	0.14	-	0.06	-0.46	155.30	5.15
6i	3'-Cl	0.71	0.37	-	-0.97	160.36	5.33
6j	4'-Cl	0.71	-	0.23	-0.97	160.36	5.33
6k	3'-COOH	-0.32	0.37	-	-	162.30	4.51
6l	4'-COOH	-0.32	-	0.45	-	162.30	4.51
6m	3'-CF ₃	0.88	0.43	-	-2.40	160.35	5.83
6n	4'-CF ₃	0.88	-	0.54	-2.40	160.35	5.83
6o	3',5'-bis-CF ₃	1.76	0.86	-	-4.80	165.35	6.81

Valores obtenidos de ^a <https://www.wiredchemist.com/chemistry/data> (Flynn, 1980) ^b <https://www.swissadme.ch/> (Daina et al., 2017)
Es: coeficiente de Taft; log P: coeficiente de partición n-octanol-agua; MR: refractividad molar.

8.2.1.2. ESTUDIOS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA

Con la finalidad de determinar el tipo de inhibición enzimática de los nuevos derivados del AL, se realizaron ensayos de cinética enzimática con la enzima *h*PTP1B₁₋₄₀₀. Para ello se seleccionaron los compuestos **6c**, **6d**, **6k-6o** y el ácido litocólico y se compararon con los controles SUR, UA y ACG. La tabla 8.5 concentra los resultados de estos estudios.

Los controles SUR, TCS401 y ACG están reportados como inhibidores de tipo competitivo con valores de *K_i* de 3.0, 4.7 y 1030 μ M, respectivamente, mientras que el UA se reporta como inhibidor mixto con una *K_i* de 4.03 μ M (Coronell-Tovar et al., 2023; Andersen et al., 2002)

Para el AL se reportó una *K_i* de 5.5 μ M y una inhibición acompetitiva contra *h*PTP1B₁₋₄₀₀. En estos ensayos cinéticos, al igual que en los ensayos de inhibición enzimática, se observó que la adición del grupo bencilaminometilo en C3, nuevamente, favorece la actividad inhibitoria de los compuestos derivados del AL. Esto se evidencia con los valores de *K_i* para **6m**, **6n** y **6o**, los cuales fueron 2.5, 3.4 y 3.9 μ M, respectivamente,

mostrando, incluso, una mejor afinidad que el UA (4.03 μM). De esta serie de derivados, destacó **6m** al ser el compuesto con la mayor afinidad (K_i de 2.5 μM) por la enzima, incluso aún mejor que la SUR (3.0 μM). Con respecto al tipo de inhibición enzimática, el AL y todos sus derivados evaluados (**6c–6o**) mostraron inhibición acompetitiva (Figura 8.1A). Este tipo de inhibición ocurre una vez que el sustrato se une al sitio catalítico. Una vez formado el complejo sustrato–enzima, el inhibidor se une a este modificando la conformación de la enzima, inhibiendo así la liberación del producto de la catálisis enzimática (Figura 8.1B).

Tabla 8.5. Parámetros cinéticos y tipo de inhibición en *hPTP1B*_{1–400} de los nuevos derivados del AL

Compuesto	V_{max} (mM/min)	K_m (mM)	K_i (μM)	Mecanismo de inhibición
6c	0.64 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.02	4.0 $\pm$ 0.2	Acompetitiva
6d	1.10 $\pm$ 0.09	0.78 $\pm$ 0.09	19.7 $\pm$ 2.6	Acompetitiva
6k	0.80 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.06	11.0 $\pm$ 1.0	Acompetitiva
6l	1.41 $\pm$ 0.17	0.95 $\pm$ 0.15	10.7 $\pm$ 1.6	Acompetitiva
6m	1.05 $\pm$ 0.18	0.78 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.4	Acompetitiva
6n	0.73 $\pm$ 0.06	0.52 $\pm$ 0.07	3.4 $\pm$ 0.3	Acompetitiva
6o	2.7 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 0.7	Acompetitiva
AL	1.7 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 1.1	Acompetitiva
UA ^a	0.63 $\pm$ 0.08	1.70 $\pm$ 0.33	4.03 $\pm$ 0.8	Mixta
SUR ^a	0.64 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.02	3.0 $\pm$ 0.2	Competitiva
TCS401 ^b	ND	ND	4.7 ^b	Competitiva ^c
ACG ^a	6.71 $\pm$ 3.13	3.63 $\pm$ 1.88	1030 $\pm$ 70	Competitiva

^a V_{max} , K_m y K_i y mecanismo de inhibición tomado de Coronell–Tovar et al., 2023.

^b K_i tomado de Andersen et al., 2002.

^c Mecanismo de inhibición reportado para *hPTP1B*_{1–285}. Tomado de Iversen et al., 2000.

AL: ácido litocólico. UA: ácido ursólico. ACG: ácido clorogénico. SUR: suramina. ND: no determinado

Estos resultados y hallazgos son de relevancia ya que, hasta la fecha, la mayoría de los inhibidores de PTP1B reportados son de tipo competitivo, es decir, se unen al dominio catalítico de la enzima. Aunado a ello, debido a que este dominio se encuentra altamente conservado en la familia de PTP, la selectividad de los inhibidores es baja. Con base en

los resultados de inhibición acompetitiva mostrados por el AL y sus derivados, se puede inferir que estos presentan potencial de selectividad inhibitoria de PTP1B ya que no se unen al sitio catalítico de la enzima.

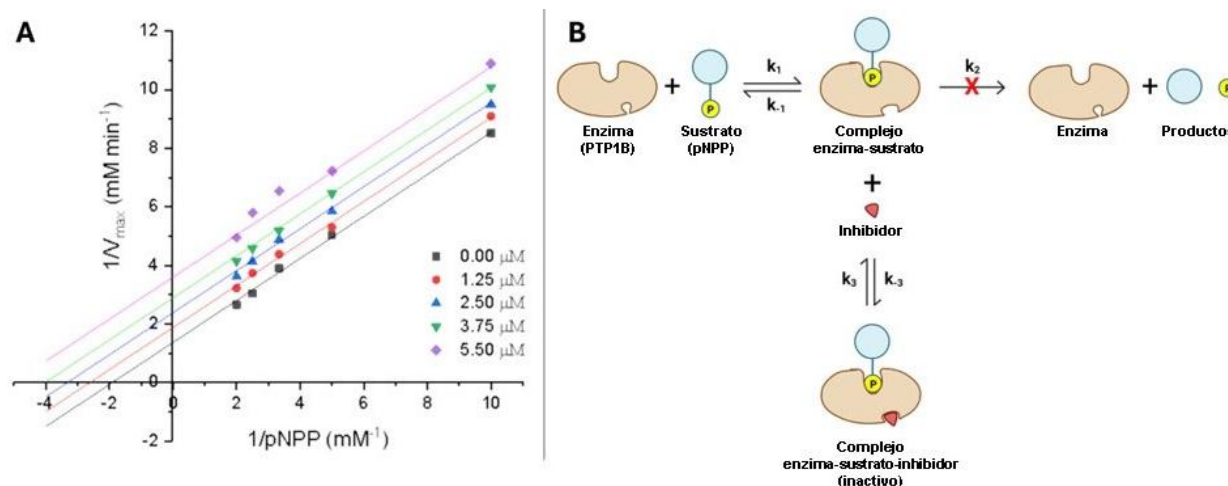


Figura 8.1. Cinética enzimática de inhibición de hPTP1B₁₋₄₀₀. El gráfico de Lineweaver–Burk muestra el mecanismo de inhibición de 6m. (A). Representa el recíproco de la velocidad de reacción ($1/V_{max}$) como función del recíproco de la concentración de pNPP ($1/p\text{NPP}$). (B). Modelo de inhibición acompetitiva. (Mendoza–Jasso et al., 2024)

8.2.1.3. ENSAYOS DE SELECTIVIDAD DE LA ENZIMA PTP1B VS TCPTP

Como se mencionó anteriormente, la familia de las PTP comparte un alto grado de homología del sitio catalítico, por lo que en el diseño de inhibidores de la PTP1B la selectividad juega un papel fundamental. Por ejemplo, la PTP1B y la TCPTP tienen una identidad de secuencia de aminoácidos del 74% en el dominio catalítico (Figura 8.2) (Javier, 2021; Mao et al., 2015; Mendoza–Jasso et al., 2024). Es por ello que el diseño de nuevos inhibidores de PTP1B es todo un reto, ya que estos también podrían inhibir la TCPTP, resultando en el desarrollo de efectos adversos a nivel del sistema inmunológico.

Para determinar la selectividad de los compuestos en PTP1B y TCPTP, se evaluaron los inhibidores de referencia UA, ACG, ortovanadato de sodio (OV), TCS401, así como el AL y los derivados **6I–6o** (Tabla 8.6). El OV es un inhibidor competitivo (Javier, 2021), por lo que inhibió a PTP1B y TCPTP con valores de CI_{50} similares ($\text{CI}_{50} = 0.12$ y $0.18 \mu\text{M}$, respectivamente). El mismo comportamiento se observó en el control TCS401 con valores de CI_{50} de 8.15 y $6.7 \mu\text{M}$, respectivamente. Para el control UA, AL y los derivados

6m–6o se demostró que son inactivos frente a TCPTP en el rango de concentraciones ensayado (1–400 μ M) haciéndolos hasta 75 veces más selectivos hacia PTP1B versus TCPTP. Estos resultados son de gran interés, ya que, en conjunto con los resultados de afinidad (*h*PTP1B_{1–285} vs *h*PTP1B_{1–400}) sugieren que la alta selectividad mostrada por el AL y sus derivados **6m–6o** se debe, principalmente, a que estos ligandos se unen al dominio C-terminal desestructurado de PTP1B. Las estructuras de los inhibidores de referencia y los gráficos de selectividad se reportan en el anexo III.

Tabla 8.6. Selectividad del AL y derivados en PTP1B vs TCPTP

Compuesto	PTP1B CI ₅₀ $\pm$ DE (μ M)	TCPTP CI ₅₀ $\pm$ DE (μ M)	Selectividad
6m	7.3 $\pm$ 0.5	>400	Sí
6n	5.3 $\pm$ 0.2	>400	Sí
6o	11.0 $\pm$ 0.2	>400	Sí
AL	14.0 $\pm$ 0.9	>400	Sí
UA	6.83 $\pm$ 0.07	>400	Sí
OV	0.12 $\pm$ 0.3	0.18 $\pm$ 0.1	No
TCS401	8.15 $\pm$ 0.91	6.7 $\pm$ 0.6	No

AL: ácido litocólico. UA: ácido ursólico. OV: ortovanadato de sodio.

8.2.2. ENSAYOS EN LÍNEAS CELULARES

8.2.2.1. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD EN FIBROBLASTOS Y ADIPOCITOS DIFERENCIADOS

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo en células sanas de fibroblastos de humano (HFF–1), de ratón (3T3–L1) y adipocitos diferenciados a partir de células 3T3–L1. Se sabe que las células 3T3–L1 sirven como un modelo de diferenciación a adipocitos bajo ciertas condiciones de crecimiento. Para el ensayo de citotoxicidad en fibroblastos humanos y de ratones, se evaluaron los compuestos **6a**, **6c–6f**, **6k–6o**, así como el AL y la metformina (MET). En primera instancia, se realizó el ensayo con los compuestos **6m–6o**, ya que estos fueron los que presentaron una mejor constante de inhibición (*K_i*) en la enzima *h*PTP1B_{1–400}. Con base en los resultados (Tabla 8.7 y Gráficos 8.1 y 8.2), el compuesto **6o** mostró un mayor índice de citotoxicidad en ambas líneas celulares con

concentraciones citotóxicas medias de 20 μM para HFF-1 y 28.9 μM para 3T3-L1. Por su parte, los derivados **6m** y **6n**, que cuentan con un solo grupo trifluorometilo en su estructura, arrojaron valores de CC_{50} mayores a 40 μM para las células HFF-1, mientras que en células 3T3-L1 los valores de CC_{50} fueron 35 y 37 μM , respectivamente. Si comparamos los valores de CI_{50} (Tabla 8.3) con los de CC_{50} (Tabla 8.7), se requerirían de 3 a 7 veces la CI_{50} para generar un daño citotóxico; no obstante, se considera que estos valores de CC_{50} son bajos. Debido a esto, se optó por evaluar los isómeros metilados (**6e** y **6f**), así como los análogos **6a**, **6c**, **6d**, **6k** y **6l**. Para ello, se realizó un screening inicial evaluando estos compuestos a dos concentraciones (50 y 100 μM). Los compuestos que mostraron daño citotóxico a 50 μM fueron descartados (**6a**, **6d**, **6f** y **6k**) para posteriores evaluaciones celulares.

Tabla 8.7. Concentración citotóxica media (CC_{50}) de los nuevos derivados de ácido litocólico en fibroblastos humanos, de ratón y en adipocitos

Compuesto	R	$\text{CC}_{50} \pm \text{DE} (\mu\text{M})$		
		HFF-1	3T3-L1	Adipocito
6c	3'-OCH ₃	> 100	> 100	> 100
6e	3'-CH ₃	> 100	> 100	ND
6l	4'-COOH	>100	> 100	> 100
6m	3'-CF ₃	46.8 $\pm$ 4.06	35.4 $\pm$ 0.2	ND
6n	4'-CF ₃	41.9 $\pm$ 3.34	37.6 $\pm$ 1.9	ND
6o	3',5'-bis-CF ₃	20.0 $\pm$ 1.9	28.9 $\pm$ 0.9	ND
AL	–	> 100	> 100	> 100
MET	–	> 100	> 100	ND

HFF-1: fibroblastos de humano. 3T3-L1: fibroblastos de ratón.

AL: ácido litocólico. MET: metformina. ND: No determinado

Los derivados **6c**, **6e** y **6l**, en ambas líneas celulares, arrojaron valores de CC_{50} mayores a 100 μM (Gráficos 8.1 y 8.2), donde el porcentaje de viabilidad fue mayor al 80% a esta concentración. Por otro lado, una vez que los fibroblastos de ratón (3T3-L1) se diferenciaron a adipocitos, estos también fueron expuestos a ensayos de citotoxicidad. En esta ocasión sólo se evaluaron los derivados **6c** y **6l** porque presentaron una CI_{50} en

*h*PTP1B_{1–400} inferior a la CI_{50} del ácido litocólico (10.5, 12.6 y 14 μ M, respectivamente). De igual manera que en los fibroblastos humanos y de ratón, los análogos **6c** y **6l**, así como el AL arrojaron una CC_{50} mayor a 100 μ M en adipocitos diferenciados a partir de células 3T3–L1 (Tabla 8.5). No obstante, los adipocitos mostraron mayor sensibilidad frente al AL y al derivado **6c**, en donde se observa que a una concentración de 100 μ M hay una disminución promedio del porcentaje de viabilidad del 30% y 40%, respectivamente (Gráfico 8.3).

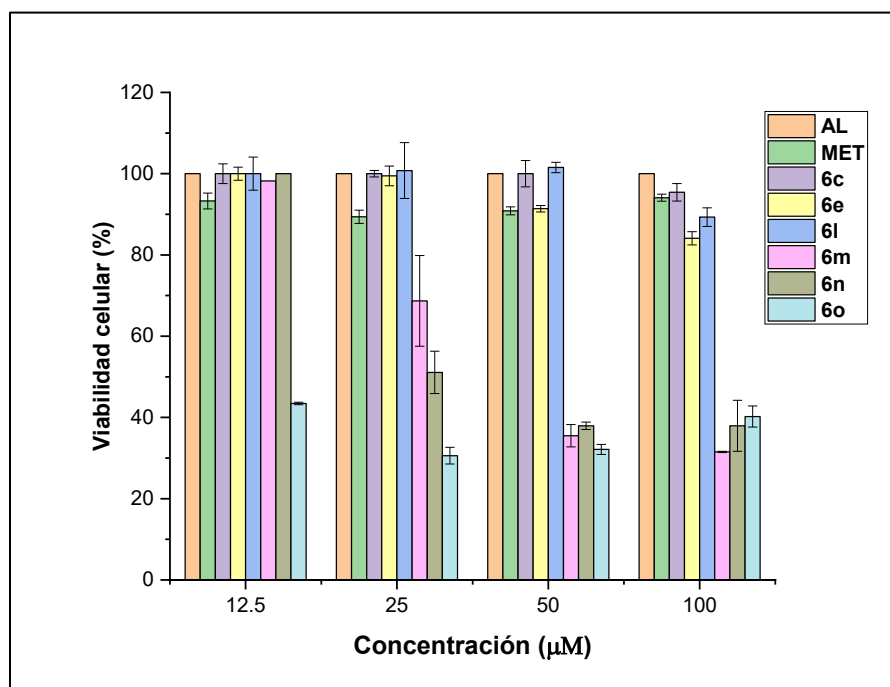


Gráfico 8.1. Efecto de los nuevos derivados de AL en la viabilidad celular de células HFF–1. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes. Las barras representan la desviación estándar. AL: ácido litocólico; MET: metformina.

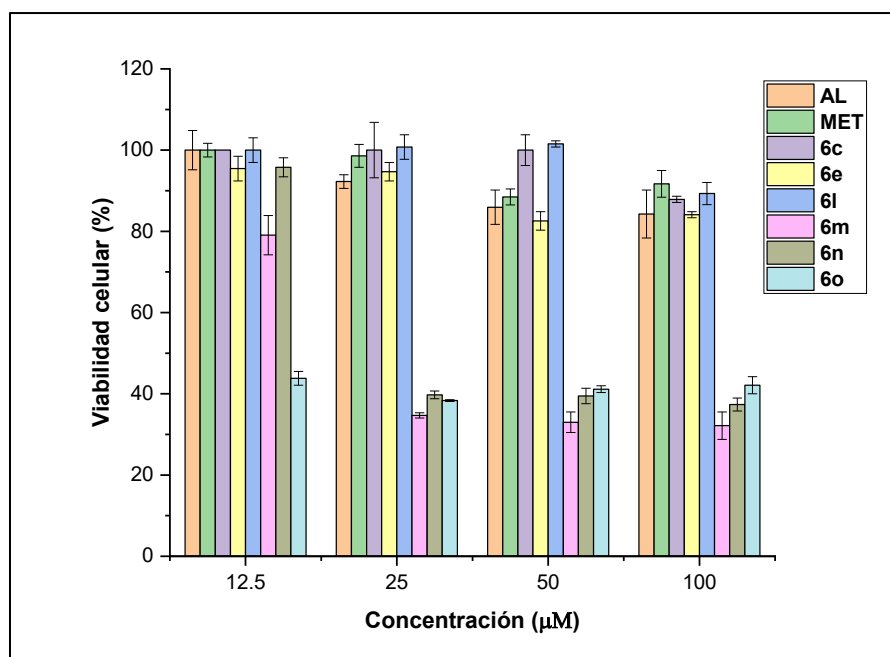


Gráfico 8.2. Efecto de los nuevos derivados de AL en la viabilidad celular de células 3T3-L1. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes. Las barras representan la desviación estándar. AL: ácido litocólico; MET: metformina.

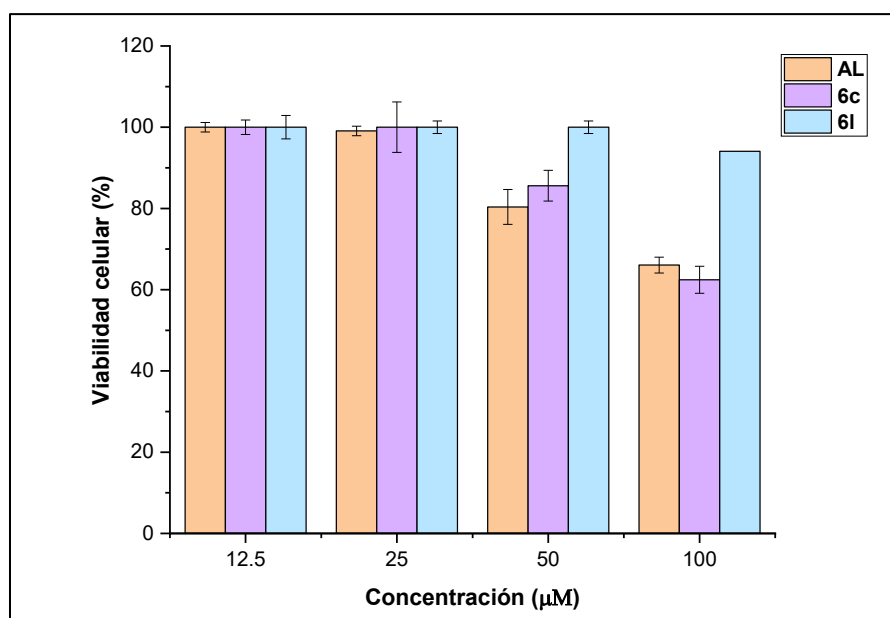


Gráfico 8.3. Efecto de los nuevos derivados de AL en la viabilidad celular de adipocitos. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes. Las barras representan la desviación estándar. AL: ácido litocólico; MET: metformina.

8.2.2.2. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS EN PRE-ADIPOCITOS 3T3-L1

Para este ensayo se usaron fibroblastos de ratón (3T3-L1). Se tiene reportado que estas células son empleadas como un modelo de síntesis de lípidos, ya que bajo ciertas condiciones de crecimiento se diferencian a adipocitos, los cuales acumulan lípidos en forma de vacuolas. En esta ocasión, se evaluó el potencial inhibitorio en la diferenciación a adipocitos de los compuestos **6c**, **6e**, **6l-6o** y del AL, empleando como controles el ácido ursólico (UA) y la atorvastatina en un en un rango de concentración de 3.125 a 100 μ M, durante 9 días, en presencia del medio de inducción de la diferenciación, el cual está compuesto por isobutilmetilxantina (IBMX), dexametasona (DXM), insulina y pioglitazona, realizando observaciones microscópicas diarias

Para el control UA, se observó muerte celular a las 48 horas de iniciado el tratamiento. Haciendo revisión en la literatura se encontró que, para este ensayo, el UA suele emplearse a una concentración máxima de 10 μ M (Y. He et al., 2013), lo cual coincide con las observaciones realizadas, ya que a las 24 horas de iniciado el ensayo se observó muerte celular en las concentraciones mayores (50 y 100 μ M) y, tras 48 horas de exposición, la mayoría de las células presentaron signos de muerte celular.

Un comportamiento similar se presentó en las células expuestas a los compuestos trifluorometilados (**6m-6o**). En este caso, tras 96 horas (día 4) de exposición, las células también presentaron muerte celular, por lo que no se pudo determinar el potencial inhibitorio de **6m-6o** en la síntesis de lípidos debido a la toxicidad que mostraron.

En el caso del control positivo, atorvastatina, y del AL, así como sus derivados **6c** y **6l**, estos cuatro agentes mostraron potencial para inhibir la síntesis de lípidos en células 3T3-L1 y, por ende, su transformación en adipocitos. En el gráfico 8.4 se representa el porcentaje de lípidos extraídos en las células tras la tinción con rojo oleoso, el cual es un colorante específico para la tinción de lípidos.

Como se puede observar, la inhibición de la síntesis de lípidos es dependiente de la concentración ya que, en todos los casos, se observó una disminución en la formación de vacuolas lipídicas conforme aumentó la concentración del agente de tratamiento. Otra

información interesante es que los derivados **6c** y **6l** mostraron un mejor perfil inhibitorio en comparación con el AL, lo que podría sugerir que la adición del grupo 3-bencilometilamino al núcleo de ácido litocólico favorece la inhibición de la síntesis de lípidos en pre-adipocitos de ratón. Al comparar con la atorvastatina, el AL y los derivados presentaron un perfil inhibitorio muy similar, en el cual no hay diferencias significativas. Para el compuesto **6c**, con un grupo 3-OMe en su estructura, se reporta un porcentaje promedio de lípidos de 30.3%, y para el derivado **6l**, con un grupo 4-COOH, se encontró un valor promedio de porcentaje de lípidos de 26.5%, a 100 μ M, mientras que para la atorvastatina este porcentaje fue de 24.1%. Si bien ninguno de los derivados superó significativamente a la atorvastatina en cuanto a la inhibición de la síntesis de lípidos, sí es de destacar que estos derivados, particularmente **6l**, tienen un menor índice de citotoxicidad, ya que a los días 6 y 7 de iniciada la inducción, las células tratadas con atorvastatina mostraron signos de muerte celular, principalmente a concentraciones superiores (datos no mostrados). AL, **6c** y **6l** no mostraron citotoxicidad significativa tras los 9 días de tratamiento de inducción (Tabla 8.7, Gráfico 8.3) en el rango de concentración evaluado (3.125–100 μ M). Cabe hacer mención de que en los ensayos enzimáticos sobre *h*PTP1B_{1–400}, para los derivados **6c** y **6l** se reportó una CI_{50} = 10.5 y 12.6 μ M, respectivamente. Aunado a ello, **6l** también mostró ser 2.6 veces más afín a la forma larga de PTP1B. Asimismo, dado el tipo de inhibición que presentó (acompetitiva), se presume que también es selectivo hacia PTP1B versus TCPTP, por lo que tanto el ácido litocólico como sus derivados **6c** y **6l**, podrían considerarse como prometedores agentes anti-obesidad y/o antidiabéticos. Estudios de farmacocinética y farmacodinámica en modelos animales y ensayos clínicos son requeridos para confirmar este potencial.

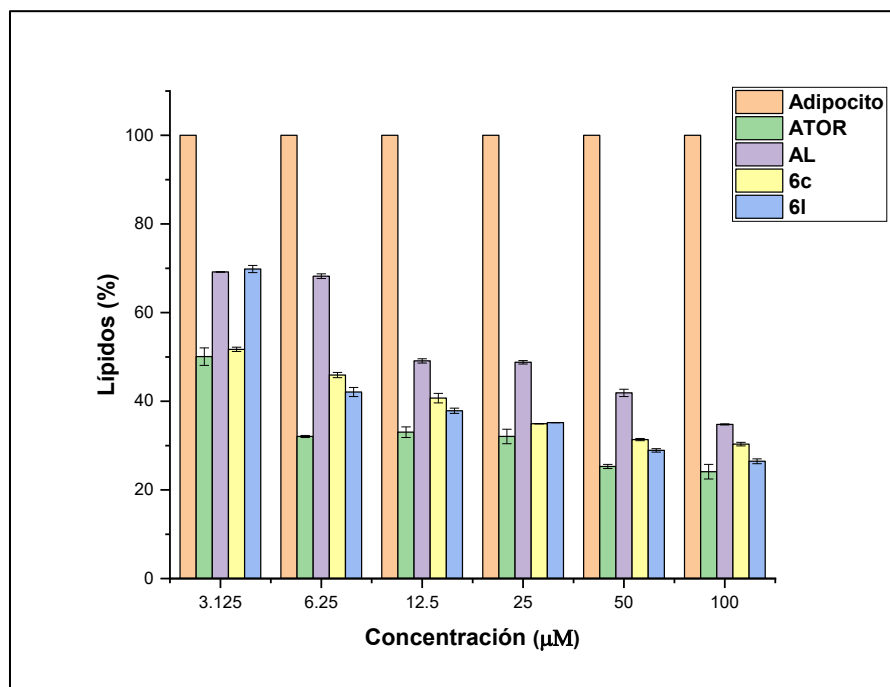


Gráfico 8.4. Cuantificación de lípidos (%) tras inducir la diferenciación de células 3T3–L1 en adipocitos durante 9 días. Los resultados corresponden a 3 ensayos independientes. Las barras representan la desviación estándar. ATOR: atorvastatina, AL: ácido litocólico.

8.3. ESTUDIOS COMPUTACIONALES

Estos estudios se llevaron a cabo con idock y se basaron en los resultados experimentales de cinética enzimática; es decir, se diseñó un modelo de acoplamiento molecular que simuló una inhibición acompetitiva. Para ello, en primera instancia, se realizó el acoplamiento molecular entre la enzima *h*PTP1B_{1–400} y el sustrato *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP). Posteriormente, este complejo sustrato–enzima fue sometido a acoplamiento molecular en presencia de los ligandos **AL**, **6e**, **6f**, **6m**, **6n** y **6o** en la zona C–terminal desestructurada, donde se han reportado posibles sitios de unión de inhibidores. Los controles UA y TCS401 fueron acoplados en ausencia del sustrato *p*NPP.

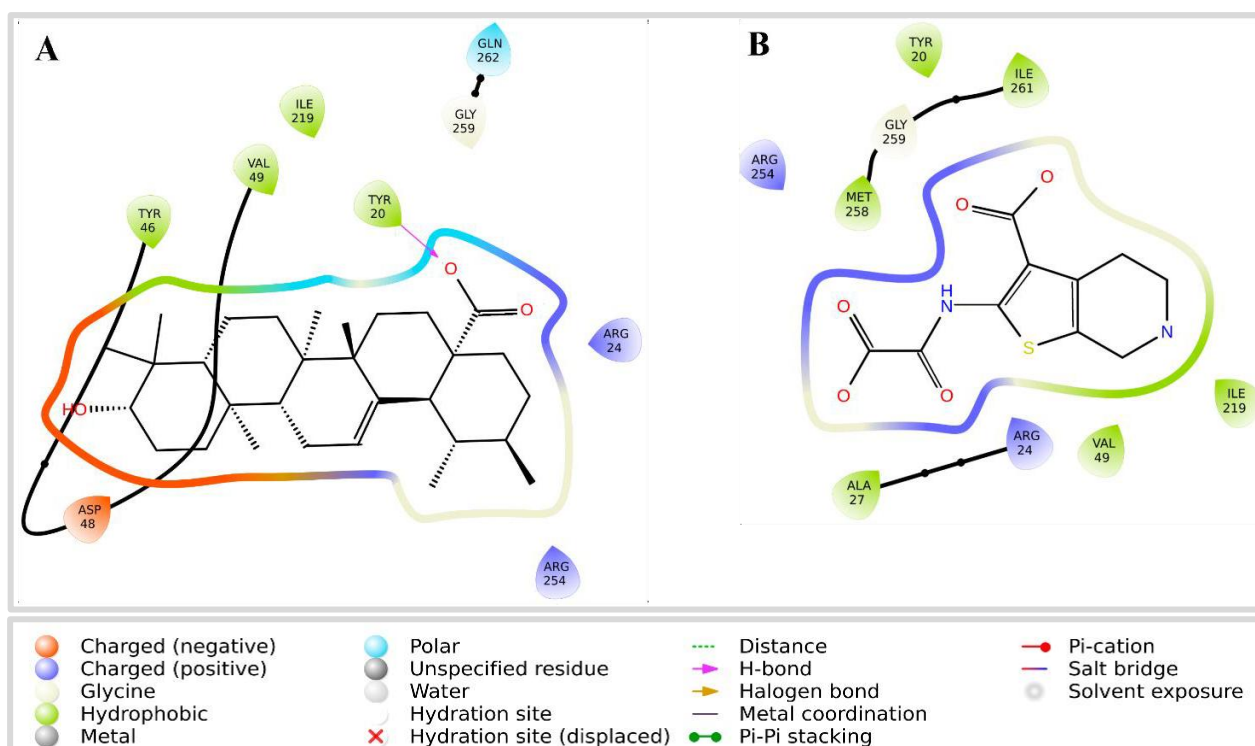


Figura 8.2. Modelo 2D de las interacciones generadas entre los residuos de aminoácidos de la región C-terminal desestructurada de *hPTP1B*_{1–400} con (A) ácido ursólico y (B) TCS401. El análisis de las interacciones con los aminoácidos a 4 Å se muestra en la periferia.

8.3.1. ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING MOLECULAR)

Los resultados de estos estudios mostraron que los controles TCS401 y UA se unen a un segundo sitio de unión de la fosfotirosina (Tyr²⁰, Arg²⁴, Arg²⁵⁴ y Gly²⁵⁹) mediante interacciones hidrofóbicas y polares. Además, el UA mostró interacciones con Tyr⁴⁶ y Asp⁴⁸ los cuales están involucrados en el reconocimiento del sustrato, así como una interacción de tipo polar con Gln²⁶² (Figura 8.2).

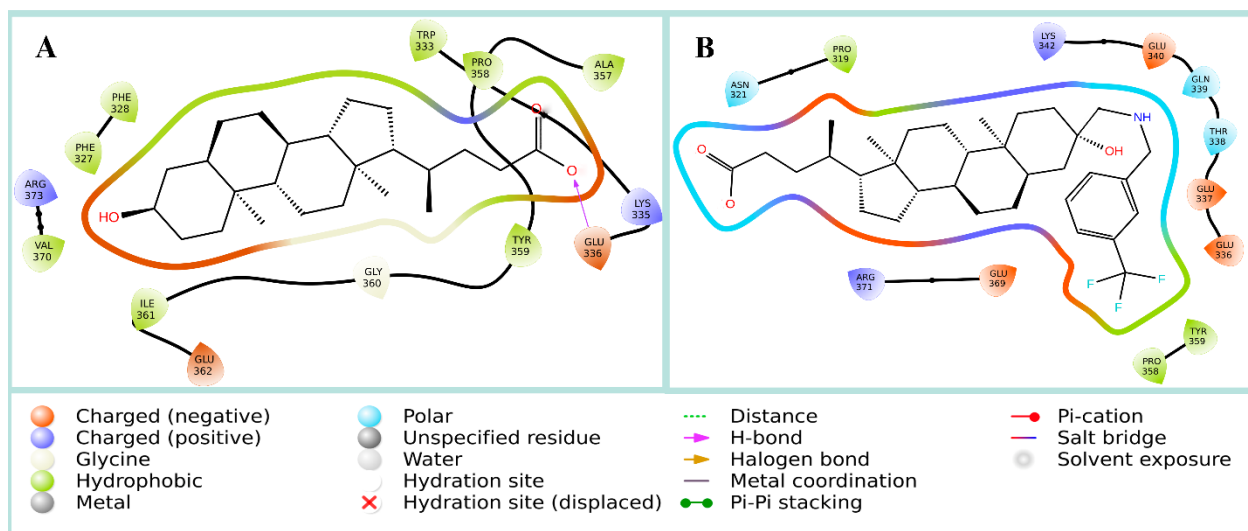


Figura 8.3. Modelo 2D de las interacciones generadas entre los residuos de aminoácidos de la región C-terminal desestructurada de *hPTP1B*_{1–400} con (A) ácido litocólico y (B) 6m. El análisis de las interacciones con los aminoácidos a 4 Å se muestra en la periferia.

Para el AL y sus derivados **6e**, **6f**, **6m**, **6n** y **6o**, estos registraron energías de unión favorables con la enzima (Tabla 8.8), incluso mejores que la energía de unión del TCS401 (–5.89 kcal/mol). La interacción entre el AL y el dominio C-terminal desestructurado de la *hPTP1B*_{1–400} mostró, en primera instancia, interacciones hidrofóbicas con los residuos Phe^{327, 328}, Ile³⁶¹ y Val³⁷⁰. Además, una interacción polar entre el grupo 3–OH del esteroide y la Arg³⁷³ (Tabla 8.8, Figura 8.3 A). Estas interacciones son destacables ya que se ha reportado la presencia de dos hélices α compuestas por los residuos 320–327 (α 8') y 306–377 (α 9') en el dominio C-terminal y que juegan un papel crucial en la inhibición de PTP1B (Coronell–Tovar et al., 2023; Krishnan et al., 2014).

Con base en la Figura 8.4, para el compuesto **6e**, el núcleo esteroideal mostró interacciones con Trp³³³, Val³³⁴ e Ile³⁴⁶, además de interacciones con un sitio electropositivo de la región C-terminal entre el grupo –NH– y residuos de la hélice α 8' (Lys³²³ y Arg³²⁵) y α 9' (Arg³⁷¹), así como un puente de hidrógeno entre el grupo 3–OH del AL y Asn³²¹. Por su parte, el análogo 6f presentó tres interacciones hidrofóbicas con residuos cercanos al sitio catalítico, Val⁴⁹, Phe¹⁸² e Ile²¹⁹. Interacciones polares se dieron entre Ser²⁸ y Gln²⁶² con el carboxilato C24 (Figura 8.4). Para el isómero **6m**, interacciones hidrofóbicas entre el grupo trifluorometilo (–CF₃) y las cadenas laterales de los residuos

Pro³⁵⁸ y Tyr³⁵⁹ fueron observadas. También se crearon interacciones de tipo puente de hidrógeno entre la Gln³³⁹ y Thr³³⁸ con el grupo amonio (Figura 8.3 B). Para este derivado, también se observó la interacción entre el grupo carboxilato C24 el cual sirve como un aceptor de puente de hidrógeno (HBA) con Asn³²¹. Además de estas interacciones, **6m** mostró interacciones con los residuos Lys³⁴², Arg³⁷¹, Glu^{336, 337, 340, 374 369} y Thr³³⁸, que en conjunto crean regiones electropositivas y electronegativas del dominio C-terminal desestructurado de PTP1B.

Para **6n** (Figura 8.4), el grupo bencilaminometilo se unió al segundo sitio de unión de fosfotirosina (*p*-Tyr) a través de interacciones hidrofóbicas con Tyr²⁰, Ala²⁷ y Met²⁵⁸ e interacciones por puente de hidrógeno no clásicas entre el grupo –CF₃ y Arg^{24, 254}. Al igual que su isómero (**6f**), también mostró interacciones con residuos del sitio catalítico (Val⁴⁹, Phe¹⁸² e Ile²¹⁹), así como una interacción polar con Gln²⁶². Este último forma parte de la región denominada Q-loop. Por otro lado, el carboxilato C24 de **6o** es un HBA de Asn³²¹.

Tabla 8.8. Resultados de los estudios de acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular (MDS) del ácido litocólico y sus derivados

Complejo	Acoplamiento molecular i-dock score (Kcal/mol)	MDS ^a ΔG (Kcal/mol)	Residuos de interacción en el acoplamiento molecular	Residuos de interacción en MDS
PTP1B–pNPP–6e	–8.50	–52.71± 3.4	His ³²⁰ , Asn ³²¹ , Lys ³²³ , Arg ³²⁵ , Gln ³³² , Trp ³³³ , Val ³³⁴ , Glu ³³⁷ , Ile ³⁴⁶ , Arg ³⁷¹	Asn ⁴⁴ , Arg ⁴⁵ , Tyr ⁴⁶ , Leu ⁸⁸ , Pro ⁸⁹ , Ser ¹¹⁸ , Leu ¹¹⁹ , Lys ¹²⁰ , Gln ³³⁹ , Glu ³⁴⁰ , Asp ³⁴¹ , Lys ³⁴² , Asp ³⁴³
PTP1B–pNPP–6f	–6.74	–57.32 ± 2.2	Arg ²⁴ , Ser ²⁸ , Asp ⁴⁸ , Val ⁴⁹ , Phe ¹⁸² , Ile ²¹⁹ , Gly ²⁵⁹ , Gln ²⁶²	Tyr ²⁰ , Arg ²⁴ , Asp ⁴⁸ , Val ⁴⁹ , Ile ²¹⁹ , Arg ²⁵⁴ , Met ²⁵⁸ , Gly ²⁵⁹ , Leu ²⁶⁰ , Ile ²⁶¹ , Gln ²⁶² , Ile ³⁶¹ , Glu ³⁶² , Ser ³⁶³
PTP1B–pNPP– 6m	–6.63	–57.73 ± 8.7	Pro ³¹⁹ , Asn ³²¹ , Glu ³³⁶ , Glu ³³⁷ , Thr ³³⁸ , Gln ³³⁹ , Glu ³⁴⁰ , Lys ³⁴² , Pro ³⁵⁸ , Tyr ³⁵⁹ , Glu ³⁶⁹ , Arg ³⁷¹	Asn ⁴² , Leu ⁸⁸ , Pro ⁸⁹ , Asn ⁹⁰ , Arg ³¹¹ , Pro ³¹² , Pro ³¹³ , Lys ³¹⁴ , Arg ³¹⁵ , Gln ³³⁹ , Glu ³⁴⁰ , Asp ³⁴¹ , Lys ³⁴² , Glu ³⁹⁹ , Asp ⁴⁰⁰
PTP1B–pNPP–6n	–7.20	–27.34 ± 5.9	Tyr ²⁰ , Arg ²⁴ , Ala ²⁷ , Ser ²⁸ , Asp ²⁹ , Asp ⁴⁸ , Val ⁴⁹ , Ser ⁵⁰ , Phe ¹⁸² , Ile ²¹⁹ , Arg ²⁵⁴ , Met ²⁵⁸ , Gly ²⁵⁹ , Gln ²⁶²	Asp ²⁹ , Phe ³⁰ , Pro ³¹ , Cys ³² , Arg ³³ , Lys ³⁶ , Asp ⁴⁸ , Ser ⁵⁰ , Phe ⁵² , Met ²⁵⁸ ,

PTP1B–pNPP–6o	–7.00	–54.93 ± 4.5	Pro ³¹⁹ , Asn ³²¹ , Glu ³³⁶ , Glu ³³⁷ , Thr ³³⁸ , Gln ³³⁹ , Glu ³⁴⁰ , Lys ³⁴² , Tyr ³⁵⁹ , Glu ³⁶⁹ , Arg ³⁷¹	Arg ²⁴ , Asp ⁴⁸ , Val ⁴⁹ , Ile ²¹⁹ , Arg ²⁵⁴ , Met ²⁵⁸ , Gly ²⁵⁹ , Gln ²⁶² , Asp ³⁴³ , Cys ³⁴⁴ , Pro ³⁴⁵ , Lys ³⁵⁰ , Gly ³⁵¹
PTP1B–pNPP–AL	–7.31	–29.56 ± 8.9	Phe ³²⁷ , Phe ³²⁸ , Trp ³³³ , Lys ³³⁵ , Glu ³³⁶ , Ala ³⁵⁷ , Pro ³⁵⁸ , Tyr ³⁵⁹ , Gly ³⁶⁰ , Ile ³⁶¹ , Glu ³⁶² , Val ³⁷⁰ , Arg ³⁷³	Arg ³³ , Lys ³⁶ , Met ³⁶⁴ , Gln ³⁸³
PTP1B–UA	–7.45	–28.44 ± 2.6	Tyr ²⁰ , Arg ²⁴ , Tyr ⁴⁶ , Asp ⁴⁸ , Val ⁴⁹ , Ile ²¹⁹ , Arg ²⁵⁴ , Gly ²⁵⁹ , Gln ²⁶²	Arg ²⁴ , Tyr ⁴⁶ , Asp ⁴⁸ , Phe ¹⁸² , Ala ²¹⁷ , Ile ²¹⁹ , Arg ²⁵⁴ , Met ²⁵⁸ , Gly ²⁵⁹ , Gln ²⁶²
PTP1B–TCS401	–5.89	–22.57 ± 1.7	Tyr ²⁰ , Arg ²⁴ , Ala ²⁷ , Val ⁴⁹ , Ile ²¹⁹ , Arg ²⁵⁴ , Met ²⁵⁸ , Gly ²⁵⁹ , Ile ²⁶¹	Tyr ²⁰ , Arg ²⁴ , Asp ⁴⁸ , Val ⁴⁹ , Ile ²¹⁹ , Arg ²⁵⁴ , Met ²⁵⁸ , Gly ²⁵⁹ , Leu ²⁶⁰ , Ile ²⁶¹ , Gln ²⁶² , Thr ²⁶³

^a Tiempo de simulación de dinámica molecular (200 ns)

Además, un grupo –CF₃ mostró una interacción hidrofóbica con Tyr³⁵⁹, mientras que el segundo grupo –CF₃ mostró un puente de hidrógeno no clásico con Gln³³⁹ y Thr³³⁸. Interacciones con las cadenas de los residuos Glu³⁶⁹ y Glu³⁴⁰ se formaron con el grupo amonio y el grupo 3–OH, respectivamente (Figura 8.4). De manera notable, el AL y sus derivados 6m y 6o mostraron propiedades de unión al dominio C–terminal desordenado de la enzima PTP1B (Figura 8.5).

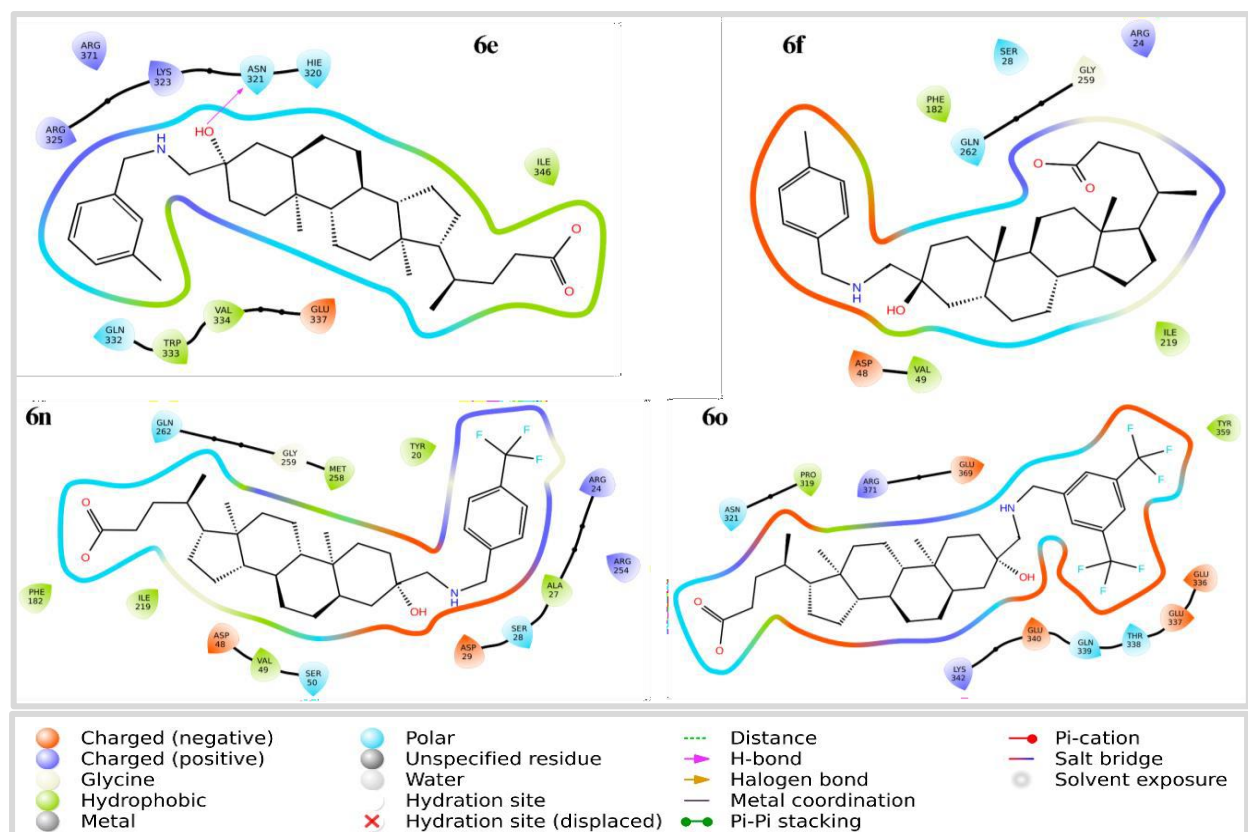


Figura 8.4. Modelo 2D de las interacciones de los derivados **6e**, **6f**, **6n** y **6o** con aminoácidos de la región C-terminal desestructurada de *hPTP1B*₁₋₄₀₀. En la periferia se muestra el análisis de las interacciones con residuos a 4 Å.

8.3.2. ESTUDIOS DE SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR (MDS)

Los estudios de MDS se llevaron a cabo usando el software AmberTools22. Se utilizaron los parámetros del campo de fuerza Amber ff99SB para todos los residuos y los parámetros del campo de fuerza Gaff para los ligandos. Las simulaciones se realizaron en los complejos ligando-receptor previamente obtenidos de los estudios de acoplamiento molecular, siguiendo un modelo de inhibición incompetitiva (Figura 8.5), y en la región C-terminal desestructurada de la enzima bajo las siguientes condiciones: 1 atm de presión, temperatura de 310 K y un tiempo de 200 ns. Los complejos estudiados fueron PTP1B-pNPP-**6e**, PTP1B-pNPP-**6f**, PTP1B-pNPP-**6m**, PTP1B-pNPP-**6n** y PTP1B-pNPP-**6o**, así como los controles PTP1B-pNPP-**AL**, PTP1B-**UA** y PTP1B-**TCS401**. Los valores de RMSD (root-mean-square-deviation) y de RMSF (root-mean-square-fluctuation) fueron analizados durante toda la simulación.

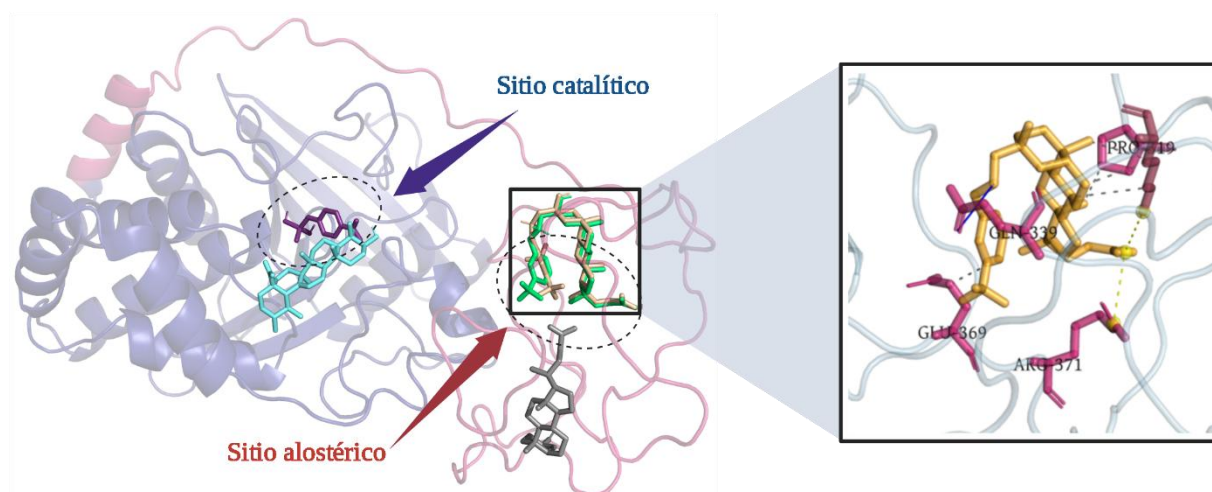


Figura 8.5. Modelo estructural en 3D de la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀. En azul se señala el sitio catalítico al cual se une el sustrato pNPP (morado) y el ácido úrsólico (UA, cian). En rojo se señala el sitio de la región C-terminal desestructurada al cual se unieron los inhibidores derivados del AL evaluados: 6m (verde), 6o (dorado), así como los residuos de aminoácidos con los cuales generaron interacciones de puente de H, electrostáticas y lipofílicas (Mendoza–Jasso et al., 2024). Creado en <https://BioRender.com>

Los resultados de los análisis de RMSD de la fluctuación global de los C α de PTP1B mostraron que el complejo PTP1B–pNPP tiende a estabilizarse a los 65 ns de simulación con un valor promedio de RMSD de 3.8 Å (Gráfico 8.5). Los controles TCS401, UA no alcanzaron el equilibrio en el sistema durante los 200 ns de la MDS, arrojando un valor promedio de RMSD de 10.7 Å y 6.8 Å, respectivamente (Gráfico 8.5). Por su parte, el AL alcanza el equilibrio del sistema por arriba de los 160 ns con un RMSD promedio de 7.5 Å. Los ligandos **6e** y **6f** mostraron un RMSD similar al del AL (7.8 Å y 7.5 Å, respectivamente) (Gráfico 8.5), mientras que el ligando **6o** (RMSD= 8.6 Å) estabilizó el sistema después de 150 ns de simulación. Por otro lado, el compuesto **6m** estabilizó el sistema a los 65 ns con un RMSD de 4.1 Å, mostrando que estabiliza a la proteína de manera muy similar a como lo hace el sustrato pNPP (Gráfico 8.5). La evidencia indica que la unión de **6m** al sitio alostérico de la región no estructurada de PTP1B estabiliza significativamente la conformación global de esta enzima. Adicionalmente, la energía de unión del sistema PTP1B–pNPP–**6m** (–53.73 kcal/mol) fue la más favorable de todos los ligandos estudiados. Asimismo, el valor de RMSF fue usado para analizar la fluctuación de los residuos de aminoácidos ocasionada por la unión de los ligandos.

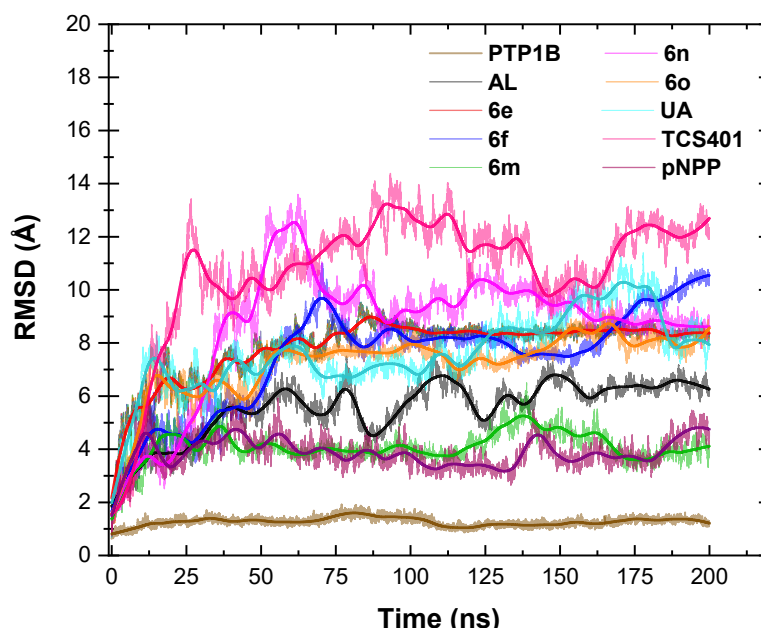


Gráfico 8.5. RMSD (Å) estándar de PTP1B (dorado) con los controles ácido ursólico (UA, aqua), TCS401 (rosa), AL (negro) y sus derivados con el complejo PTP1B–pNPP (violeta). El complejo PTP1B–pNPP–6m (verde) presenta un comportamiento similar al de PTP1B–pNPP, indicando estabilidad del sistema PTP1B–pNPP–6m durante la simulación (200 ns).

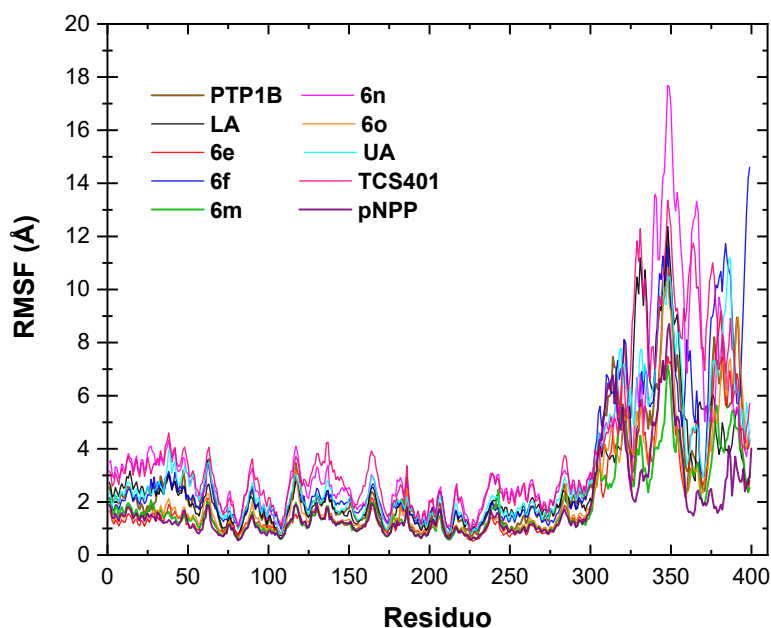


Gráfico 8.6. RMSF (Å) estándar de los controles y los derivados de AL con el complejo PTP1B–pNPP (violeta). El complejo PTP1B–pNPP–6m (verde) presenta un comportamiento similar al de PTP1B–pNPP, indicando estabilidad del sistema PTP1B–pNPP–6m durante la simulación (200 ns).

El gráfico 8.6 muestra que este sistema presentó una menor fluctuación en la secuencia de los residuos de aminoácidos de la región no estructurada de PTP1B en comparación con su isómero **6e** y los controles AL, UA y TCS401 (RMSF: 3.2, 2.3 y 3.8, respectivamente). El valor promedio de RMSF fue equivalente al del sistema PTP1B–pNPP (1.8 Å).

Las trayectorias de MDS fueron analizadas con CPPTRAJ y Origin 9.0. La figura 8.6 muestra la matriz de contactos de los residuos de aminoácidos para el compuesto **6m**. Se observó que en la región C-terminal desestructurada de PTP1B, este ligando formó nuevas y numerosas interacciones con otros aminoácidos diferentes a los reportados por el estudio de acoplamiento molecular (Tabla 8.6), las cuales persisten de manera sólida a lo largo de la trayectoria de la simulación de dinámica molecular. En contraste, el resto de los ligandos, así como los controles UA y TCS401, formaron menos interacciones (Anexo III). Estos hallazgos permiten comprender la naturaleza acompetitiva de la inhibición y el valor más bajo de K_i del compuesto **6m** observado en los estudios de cinética enzimática. Asimismo, también explica el que estos compuestos tengan una alta afinidad (Cl_{50} = 7.3 μ M) por la forma larga de PTP1B (h PTP1B_{1–400}) versus la forma corta (h PTP1B_{1–285}, Cl_{50} = 34.9 μ M).

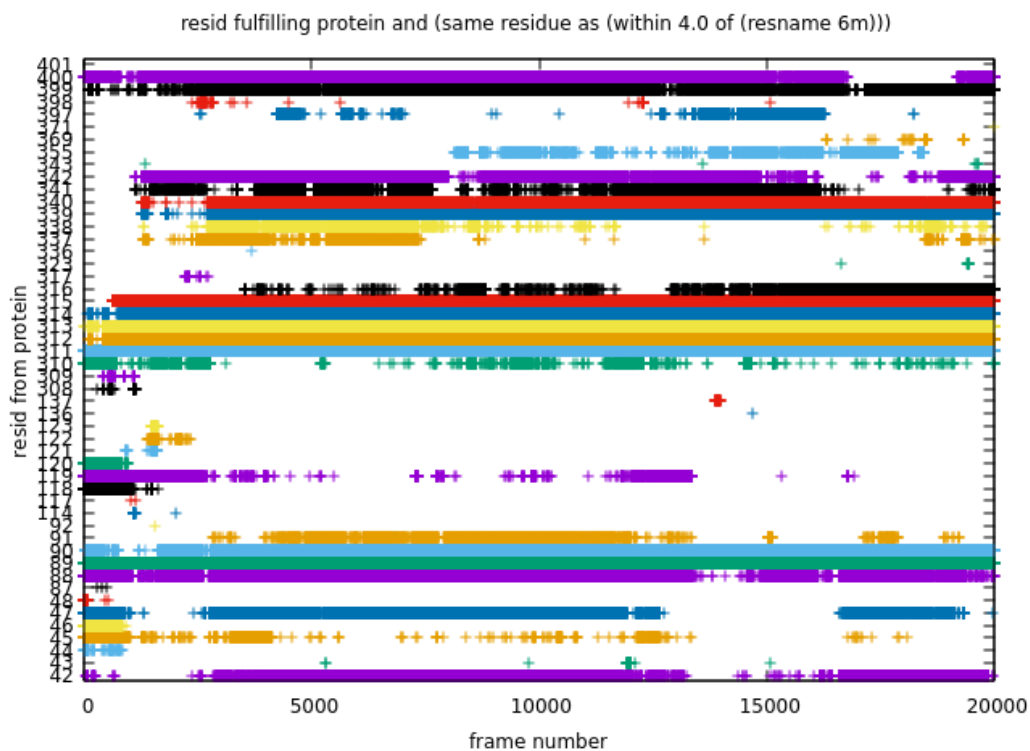


Figura 8.6. Matriz de contactos de residuos de con el compuesto **6m** generada a partir de la MDS. Las líneas continuas representan la prevalencia del complejo PTP1B–pNPP–6m con los residuos de aminoácidos durante el tiempo (200 ns) de la simulación de dinámica molecular.

9. CONCLUSIONES

A través de una ruta de síntesis que contempla 5 pasos y 4 intermediarios, se obtuvieron 15 nuevos derivados del ácido litocólico con un grupo α -bencilaminometilo en la posición C3 del esqueleto esteroideal con rendimientos globales de hasta 61%.

Los nuevos inhibidores de la enzima PTP1B en su forma corta (*h*PTP1B_{1–285}) y en su forma larga (*h*PTP1B_{1–400}) demostraron una afinidad hasta 4 veces mayor por *h*PTP1B_{1–400}, siendo los derivados trifluorometilados **6m** y **6n** los que presentaron una mejor actividad inhibitoria de *h*PTP1B_{1–400} con valores de CI_{50} = 7.3 y 5.3 μ M, respectivamente, lo que indica que la presencia de este sustituyente en el grupo 3 α -bencilaminometilo tiene un efecto positivo en la inhibición de la enzima.

Los nuevos derivados de AL presentaron una inhibición enzimática de tipo incompetitiva. Los compuestos **6m** y **6n** fueron los más potentes con valores de K_i de 2.5 y 3.4 μ M, respectivamente, siendo **6m** el más potente en comparación con el control suramina (K_i = 3.0 μ M). Conjuntamente, mostraron ser hasta 75 veces más selectivos para PTP1B versus TCPTP.

En los ensayos celulares, los compuestos **6m** y **6n** mostraron un perfil citotóxico con valores de CC_{50} de alrededor de 40 μ M, descartándolos como posibles inhibidores de la síntesis de lípidos. A su vez, el ácido litocólico y sus derivados **6c** y **6l** no fueron citotóxicos, ya que presentaron porcentajes de viabilidad superiores al 80% a una concentración de 100 μ M. Sumado a ello, inhibieron la síntesis de lípidos vía la inhibición de la transformación de pre-adipocitos a adipocitos de manera concentración-dependiente, considerándolos como prometedores agentes anti-obesidad.

Finalmente, basado en los resultados del tipo de inhibición enzimática, se construyó un modelo de acoplamiento molecular y de MDS de inhibición incompetitiva. Los hallazgos indican que los derivados 3 α -bencilaminometilo del ácido litocólico interactúan con sitios hidrofóbicos y electropositivos en la región desestructurada C-terminal de PTP1B, indicando que esta zona desempeña una función importante en la inhibición de la enzima. Estos hallazgos están respaldados por los ensayos de cinética y afinidad enzimática

10. REFERENCIAS

Álvarez–Almazán, S., Solís–Domínguez, L. C., Duperou–Luna, P., Fuerte–Gómez, T., González–Andrade, M., Aranda–Barradas, M. E., Palacios–Espinosa, J. F., Pérez–Villanueva, J., Matadamas–Martínez, F., Miranda–Castro, S. P., Mercado–Márquez, C., & Cortés–Benítez, F. (2023). Anti–diabetic activity of glycyrrhetic acid derivatives FC–114 and FC–122: scale–up, in silico, in vitro, and in vivo studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12812. <https://doi.org/10.3390/ijms241612812>

American Diabetes Association. (2025, November 1). *About Diabetes Diagnosis*. American Diabetes Association. <https://diabetes.org/about-diabetes/diagnosis>

Asante–Appiah, E., Ball, K., Bateman, K., Skorey, K., Friesen, R., Desponts, C., Payette, P., Bayly, C., Zamboni, R., Scapin, G., Ramachandran, C., & Kennedy, B. P. (2001). The YRD motif is a major determinant of substrate and inhibitor specificity in T–cell protein–tyrosine phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26036–26043. <https://doi.org/10.1074/JBC.M011697200>

Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin–resistant states. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1), a009191–a009191. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>

Boutari, C., DeMarsilis, A., & Mantzoros, C. S. (2023). Obesity and diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 202, 110773. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2023.110773>

Bray, G. A., Kim, K. K., & Wilding, J. P. H. (2017). Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obesity Reviews*, 18(7), 715–723. <https://doi.org/10.1111/obr.12551>

Case, D. A., Aktulga, H. M., Belfon, K., Cerutti, D. S., Cisneros, G. A., Cruzeiro, V. W. D., Forouzes, N., Giese, T. J., Götz, A. W., Gohlke, H., Izadi, S., Kasavajhala, K., Kaymak, M. C., King, E., Kurtzman, T., Lee, T.–S., Li, P., Liu, J., Luchko, T. Merz, K. M. (2023). AmberTools. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 63(20), 6183–6191. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01153>

Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., & Woods, R. J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1668–1688. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>

Choy, M. S., Li, Y., Machado, L. E. S. F., Kunze, M. B. A., Connors, C. R., Wei, X., Lindorff–Larsen, K., Page, R., & Peti, W. (2017). Conformational rigidity and protein dynamics at distinct timescales regulate PTP1B activity and allostery. *Molecular Cell*, 65(4), 644–658.e5. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2017.01.014>

Considine, R. v., & Caro, J. F. (1997). Leptin and the regulation of body weight. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(11), 1255–1272. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00050-2)

Cook, C. E., Corley, R. C., & Wall, M. E. (1968). Steroids. LXXIX. Synthesis and reactions of oxiranes obtained from 3- and 16-oxo steroids. *The Journal of Organic Chemistry*, 33(7), 2789–2793. <https://doi.org/10.1021/jo01271a038>

Corey, E. J., & Chaykovsky, Michael. (1962). Dimethylsulfonium methylide, a reagent for selective oxirane synthesis from aldehydes and ketones. *Journal of the American Chemical Society*, 84(19), 3782–3783. <https://doi.org/10.1021/ja00878a046>

Coronell-Tovar, A., Cortés-Benítez, F., & González-Andrade, M. (2023). The importance of including the C-terminal domain of PTP1B 1–400 to identify potential antidiabetic inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1). <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2170369>

Coronell-Tovar, A., Pardo, J. P., Rodríguez-Romero, A., Sosa-Peinado, A., Vásquez-Boehm, L., Cano-Sánchez, P., Álvarez-Añorve, L. I., & González-Andrade, M. (2024). Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) function, structure, and inhibition strategies to develop antidiabetic drugs. *FEBS Letters*, 598(15), 1811–1838. <https://doi.org/10.1002/18733468.14901>

Cortés-Benítez, F., Roy, J., Maltais, R., & Poirier, D. (2017). Impact of androstane A- and D-ring inversion on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 inhibitory activity, androgenic effect and metabolic stability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(7), 2065–2073. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.008>

Delibegović, M., Dall'Angelo, S., & Dekeryte, R. (2024). Protein tyrosine phosphatase 1B in metabolic diseases and drug development. *Nature Reviews Endocrinology*, 20(6), 366–378. <https://doi.org/10.1038/s41574024009651>

Díaz-Rojas, M., González-Andrade, M., Aguayo-Ortiz, R., Rodríguez-Sotres, R., Pérez-Vásquez, A., Madariaga-Mazón, A., & Mata, R. (2023). Discovery of inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B contained in a natural products library from Mexican medicinal plants and fungi using a combination of enzymatic and in silico methods**. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1281045>

Eckel, R. H., Jakicic, J. M., Ard, J. D., de Jesus, J. M., Miller, N. H., Hubbard, V. S., Lee, I.-M., Lichtenstein, A. H., Loria, C. M., Millen, B. E., Nonas, C. A., Sacks, F. M., Smith, S. C., Svetkey, L. P., Wadden, T. A., & Yanovski, S. Z. (2014). 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk. *Circulation*, 129(25_suppl_2). <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000437740.48606.d1>

Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.-C., Ramachandran, C., Gresser, M. J., Tremblay, M. L., & Kennedy, B. P. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B Gene. *Science*, 283(5407), 1544–1548. <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1544>

ENSANUT. (2022, December). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición Continua 2022*. ENSANUT. <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanutcontinua2022/index.php>

Federación Mexicana de Diabetes. (2018, March 23). *La diabetes en México*. Federación Mexicana de Diabetes. <https://fmdiabetes.org/estadisticas-en-mexico/>

Fried, S. K., Ricci, M. R., Russell, C. D., & Laferrère, B. (2000). Regulation of leptin production in humans. *The Journal of Nutrition*, 130(12), 3127S–3131S. <https://doi.org/10.1093/JN/130.12.3127S>

Friedman, J. M. (2009). Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutrition Reviews*, 56, S38–S46. <https://doi.org/10.1111/j.17534887.1998.tb01685.x>

Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>

Giralt, M., & Villarroya, F. (2013). White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*, 154(9), 2992–3000. <https://doi.org/10.1210/en.20131403>

González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F. B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., Moreno, L. A., Bray, G. A., & Martinez, J. A. (2017). Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17034. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>

Gupta, A., Behl, T., & Sachdeva, M. (2020). Key milestones in the diabetes research: a comprehensive update. *Obesity Medicine*, 17, 100183. <https://doi.org/10.1016/J.OBMED.2020.100183>

Gutiérrez-Rodelo, C., R.-G. A., & O.-R. J. A. (2017). Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: una actualización. *Gaceta Médica de México*, 214–228.

Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I., & Scherer, P. E. (2008). The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 37(3), 753–768. <https://doi.org/10.1016/J.ECL.2008.07.002>

- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- He, H. B., Gao, L. X., Deng, Q. F., Ma, W. P., Tang, C. L., Qiu, W. W., Tang, J., Li, J. Y., Li, J., & Yang, F. (2012). Synthesis and biological evaluation of 4,4-dimethyl lithocholic acid derivatives as novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(23), 7237–7242. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2012.09.040>
- He, X. L., Xing, Y., Gu, X. Z., Xiao, J. X., Wang, Y. Y., Yi, Z., & Qiu, W. W. (2017). The synthesis and antitumor activity of lithocholic acid and its derivatives. *Steroids*, 125, 54–60. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2017.06.009>
- He, Y., Li, Y., Zhao, T., Wang, Y., & Sun, C. (2013). Ursolic acid inhibits adipogenesis in 3T3–L1 adipocytes through LKB1/AMPK pathway. *PLoS ONE*, 8(7), e70135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070135>
- Hubbard, S. R. (1997). Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *The EMBO Journal*, 16(18), 5572–5581. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.18.5572>
- Hubbard, S. R. (2013). The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), a008946–a008946. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008946>
- Hussain, H., Green, I. R., Abbas, G., Adekenov, S. M., Hussain, W., & Ali, I. (2019). Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors as potential anti-diabetes agents: patent review (2015–2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29(9), 689–702. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1655542>
- International Diabetes Federation. (2025, October 1). *El Atlas de la Diabetes*. International Diabetes Federation. <https://diabetesatlas.org/es/>
- Iversen, L. F., Andersen, H. S., Branner, S., Mortensen, S. B., Peters, G. H., Norris, K., Olsen, O. H., Jeppesen, C. B., Lundt, B. F., Ripka, W., Møller, K. B., & Møller, N. P. H. (2000). Structure-based design of a low molecular weight, nonphosphorus, nonpeptide, and highly selective inhibitor of protein-tyrosine phosphatase 1B. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10300–10307. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.10300>
- Izquierdo, A. G., Crujeiras, A. B., Casanueva, F. F., & Carreira, M. C. (2019). Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later? *Nutrients*, 11(11), 2704. <https://doi.org/10.3390/nu11112704>

Javier, G.–M. (2021). Computational insight into the selective allosteric inhibition for PTP1B versus TCPTP: a molecular modelling study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(15), 5399–5410. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1790421>

Jensen, M. D., Ryan, D. H., Donato, K. A., Apovian, C. M., Ard, J. D., Comuzzie, A. G., Hu, F. B., Hubbard, V. S., Jakicic, J. M., Kushner, R. F., Loria, C. M., Millen, B. E., Nonas, C. A., Pi-Sunyer, F. X., Stevens, J., Stevens, V. J., Wadden, T. A., Wolfe, B. M., & Yanovski, S. Z. (2014). Executive summary: Guidelines (2013) for the management of overweight and obesity in adults. *Obesity*, 22(S2). <https://doi.org/10.1002/oby.20821>

Jensen, M., & de Meyts, P. (2009). Chapter 3: Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitamins and Hormones*, 80(C), 51–75. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00603-1](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00603-1)

Jones, R. M. (Ed.). (2012). *New therapeutic strategies for type 2 diabetes*. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781849735322>

Kerru, N., Singh–Pillay, A., Awolade, P., & Singh, P. (2018). Current anti–diabetic agents and their molecular targets: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 152, 436–488. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2018.04.061>

Klaman, L. D., Boss, O., Peroni, O. D., Kim, J. K., Martino, J. L., Zabolotny, J. M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y.–B., Sharpe, A. H., Stricker–Krongrad, A., Shulman, G. I., Neel, B. G., & Kahn, B. B. (2000). Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue–specific insulin sensitivity in protein–tyrosine phosphatase 1B–deficient mice. *Molecular and Cellular Biology*, 20(15), 5479–5489. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.15.5479-5489.2000>

Klip, A., Marette, A., Dimitrakoudis, D., Ramlal, T., Giacca, A., Shi, Z. Q., & Vranic, M. (1992). Effect of diabetes on glucoregulation: from glucose transporters to glucose metabolism in vivo. *Diabetes Care*, 15(11), 1747–1766. <https://doi.org/10.2337/diacare.15.11.1747>

Kołodziej–Sobczak, D., Sobczak, Ł., & Łączkowski, K. Z. (2024). Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): A comprehensive review of its role in pathogenesis of human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 7033. <https://doi.org/10.3390/ijms25137033>

Koren, S., & Fantus, I. G. (2007). Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type–2 diabetes mellitus. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21(4), 621–640. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.08.004>

Krishnan, N., Konidaris, K. F., Gasser, G., & Tonks, N. K. (2018). A potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of the protein–tyrosine phosphatase PTP1B improves insulin and leptin signaling in animal models. *Journal of Biological Chemistry*, 293(5), 1517–1525. <https://doi.org/10.1074/JBC.C117.819110>

- Kyriakou, E., Schmidt, S., Dodd, G. T., Pfuhlmann, K., Simonds, S. E., Lenhart, D., Geerlof, A., Schriever, S. C., de Angelis, M., Schramm, K.-W., Plettenburg, O., Cowley, M. A., Tiganis, T., Tschöp, M. H., Pfluger, P. T., Sattler, M., & Messias, A. C. (2018). Celastrol promotes weight loss in diet-induced obesity by inhibiting the protein tyrosine phosphatases PTP1B and TCPTP in the hypothalamus. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(24), 11144–11157. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01224>
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(8), 1950–1958. <https://doi.org/10.1002/prot.22711>
- Liu, R., Mathieu, C., Berthelet, J., Zhang, W., Dupret, J.-M., & Rodrigues Lima, F. (2022). Human protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): from structure to clinical inhibitor perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7027. <https://doi.org/10.3390/ijms23137027>
- Low, J.-L., Chai, C. L. L., & Yao, S. Q. (2014). Bidentate inhibitors of protein tyrosine phosphatases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(14), 2225–2250. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5710>
- Lu, B., G. P., X. Y., Y. X., W. Y., D. H., & S. J. (2016). Overexpression of protein tyrosine phosphatase 1B impairs glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 cells. *Minerva Endocrinologica*, 47(1), 1| – 9.
- Maccari, R., & Ottanà, R. (2023). Can allostery be a key strategy for targeting PTP1B in drug discovery? A lesson from trodusquemine. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9621. <https://doi.org/10.3390/ijms24119621>
- Maltais, R., Fournier, M.-A., & Poirier, D. (2011). Development of 3-substituted-androsterone derivatives as potent inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(15), 4652–4668. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.06.003>
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Mao, S.-W., Shuai, L., He, H.-B., Pan, N., Gao, L.-X., Yu, L.-F., Li, J., Li, J.-Y., & Yang, F. (2015). Synthesis and biological evaluation of novel 2,3-pyrazole ring-substituted-4,4-dimethyl lithocholic acid derivatives as selective protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors with cellular efficacy. *RSC Advances*, 5(129), 106551–106560. <https://doi.org/10.1039/C5RA20238H>
- Maria, Z., Campolo, A. R., & Lacombe, V. A. (2015). Diabetes alters the expression and translocation of the insulin-sensitive glucose transporters 4 and 8 in the Atria. *PLOS ONE*, 10(12), e0146033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146033>

Matsuzawa, Y. (2006). The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Letters*, 580(12), 2917–2921. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.028>

Medline Plus Información de salud para usted. (2023, August 7). *Riesgos de la obesidad para la salud*. Medline Plus. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000348.htm>

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*. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c04948>

Obradovic, M., Sudar–Milovanovic, E., Soskic, S., Essack, M., Arya, S., Stewart, A. J., Gojobori, T., & Isenovic, E. R. (2021). Leptin and obesity: role and clinical implication. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>

Olmez, E. O., & Alakent, B. (2011). Alpha7 helix plays an important role in the conformational stability of PTP1B. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 28(5), 675–693. <https://doi.org/10.1080/07391102.2011.10508599>

OPS. (2025, Agosto 1). *Organización Panamericana de la Salud (OPS)*. OPS. <https://www.paho.org/>

Pedrianes Martín, P. B., & de Pablos Velasco, P. L. (2010). Seguridad y tolerabilidad de los antidiabéticos orales en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Medicina Clínica*, 135(SUPPL. 2), 20–26. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(10\)70029-4](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(10)70029-4)

Prodhomme, H., Ognard, J., Robin, P., Alavi, Z., Salaun, P., & Ben Salem, D. (2018). Imaging and identification of brown adipose tissue on CT scan. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 38(2), 186–191. <https://doi.org/10.1111/cpf.12373>

Puius, Y. A., Zhao, Y., Sullivan, M., Lawrence, D. S., Almo, S. C., & Zhang, Z.–Y. (1997). Identification of a second aryl phosphate–binding site in protein–tyrosine phosphatase 1B: A paradigm for inhibitor design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13420–13425. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13420>

Qian, S., Li, H., Chen, Y., Zhang, W., Yang, S., & Wu, Y. (2010). Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *Journal of Natural Products*, 73(11), 1743–1750. <https://doi.org/10.1021/np100064m>

Rendell, M. (2004). The role of sulphonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 64(12), 1339–1358. <https://doi.org/10.2165/00003495-200464120-00006>

Sacks, H., & Symonds, M. E. (2013). Anatomical locations of human brown adipose tissue. *Diabetes*, 62(6), 1783–1790. <https://doi.org/10.2337/db12-1430>

Salomon–Ferrer, R., Götz, A. W., Poole, D., le Grand, S., & Walker, R. C. (2013). Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh Ewald. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(9), 3878–3888. <https://doi.org/10.1021/ct400314y>

Singh, A., Singh, H., & Khurana, J. M. (2019). Computational study of new 1,2,3–triazole derivative of lithocholic acid: Structural aspects, non–linear optical properties and molecular docking studies as potential PTP1B enzyme inhibitor. *Computational Biology and Chemistry*, 78, 144–152. <https://doi.org/10.1016/J.COMPBIOLCHEM.2018.11.016>

Singh, S., Singh Grewal, A., Grover, R., Sharma, N., Chopra, B., Kumar Dhingra, A., Arora, S., Redhu, S., & Lather, V. (2022). Recent updates on development of protein–tyrosine phosphatase 1B inhibitors for treatment of diabetes, obesity and related disorders. *Bioorganic Chemistry*, 121, 105626. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2022.105626>

Thomas, A. S., Mao, S., & Elcock, A. H. (2013). Flexibility of the bacterial chaperone trigger factor in microsecond–timescale molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 105(3), 732–744. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2013.06.028>

Tomic, D., Shaw, J. E., & Magliano, D. J. (2022). The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 18(9), 525–539. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00690-7>

Tonks, N. K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 833–846. <https://doi.org/10.1038/nrm2039>

Treesuwan, W., & Hannongbua, S. (2009). Bridge water mediates nevirapine binding to wild type and Y181C HIV–1 reverse transcriptase–Evidence from molecular dynamics simulations and MM–PBSA calculations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 27(8), 921–929. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2009.02.007>

Vilariño–García, T., Polonio–González, M., Pérez–Pérez, A., Ribalta, J., Arrieta, F., Aguilar, M., Obaya, J., Gimeno–Orna, J., Iglesias, P., Navarro, J., Durán, S., Pedro–Botet, J., & Sánchez–Margalet, V. (2024). Role of leptin in obesity, cardiovascular disease, and type 2 diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 2338. <https://doi.org/10.3390/ijms25042338>

Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2006). Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 25(2), 247–260. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2005.12.005>

Waterhous, D. V., Barnes, S., & Muccio, D. D. (1985). Nuclear magnetic resonance spectroscopy of bile acids. Development of two-dimensional NMR methods for the elucidation of proton resonance assignments for five common hydroxylated bile acids, and their parent bile acid, 5 beta-cholanoic acid. *Journal of Lipid Research*, 26(9), 1068–1078. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34280-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34280-2)

Weinberg Sibony, R., Segev, O., Dor, S., & Raz, I. (2023). Drug therapies for diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17147. <https://doi.org/10.3390/ijms242417147>

WHO. (2024, November 14). *World Health Organization*. WHO. <https://www.who.int/>

WHO. (2010, January 1). *Global recommendations on physical activity for health*. WHO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241599979>

Wiesmann, C., Barr, K. J., Kung, J., Zhu, J., Erlanson, D. A., Shen, W., Fahr, B. J., Zhong, M., Taylor, L., Randal, M., McDowell, R. S., & Hansen, S. K. (2004). Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(8), 730–737. <https://doi.org/10.1038/nsmb803>

World Obesity. (2025, March 4). *World Obesity Atlas 2025*. World Obesity Atlas 2025. <https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-atlas-2025>

Yang, Y., Tian, J. Y., Ye, F., & Xiao, Z. (2020a). Identification of natural products as selective PTP1B inhibitors via virtual screening. *Bioorganic Chemistry*, 98, 103706. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2020.103706>

You-Ten, K. E., Muise, E. S., Itié, A., Michaliszyn, E., Wagner, J., Jothy, S., Lapp, W. S., & Tremblay, M. L. (1997). impaired bone marrow microenvironment and immune function in t cell protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(5), 683–693. <https://doi.org/10.1084/jem.186.5.683>

Zhang, R., Yu, R., Xu, Q., Li, X., Luo, J., Jiang, B., Wang, L., Guo, S., Wu, N., & Shi, D. (2017). Discovery and evaluation of the hybrid of bromophenol and saccharide as potent and selective protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 134, 24–33. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2017.04.004>

Zhang, Y., & Du, Y. (2018). The development of protein tyrosine phosphatase 1B Inhibitors defined by binding sites in crystalline complexes. *Future Medicinal Chemistry*, 10(19), 2345–2367. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0089>

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425–432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>

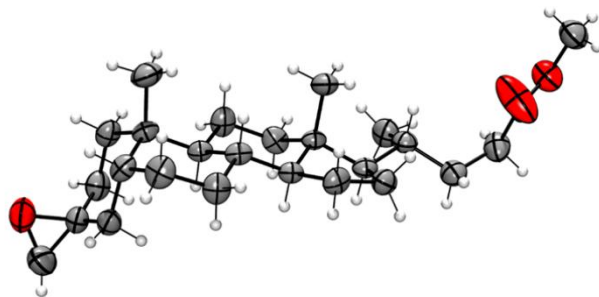
Zhang, Z. Y., Dodd, G. T., & Tiganis, T. (2015). Protein tyrosine phosphatases in hypothalamic insulin and leptin signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(10), 661–674. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2015.07.003>

Zhou, Z., & Madura, J. D. (2004). Relative free energy of binding and binding mode calculations of HIV-1 RT inhibitors based on dock-MM-PB/GS. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 57(3), 493–503. <https://doi.org/10.1002/prot.20223>

ANEXO I

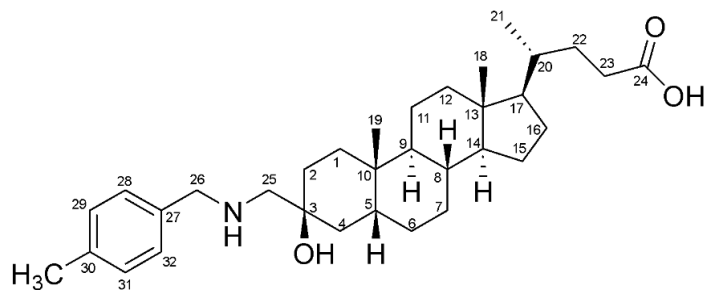
ESPECTROS DE RMN-¹H Y RMN-¹³C DE LOS INTERMEDIARIOS Y DERIVADOS 3 α - BENCILAMINOMETILO DEL ÁCIDO LITOCÓLICO

Table A1. Datos cristalinos, solución estructural y parámetros de refinamiento para el compuesto **4**



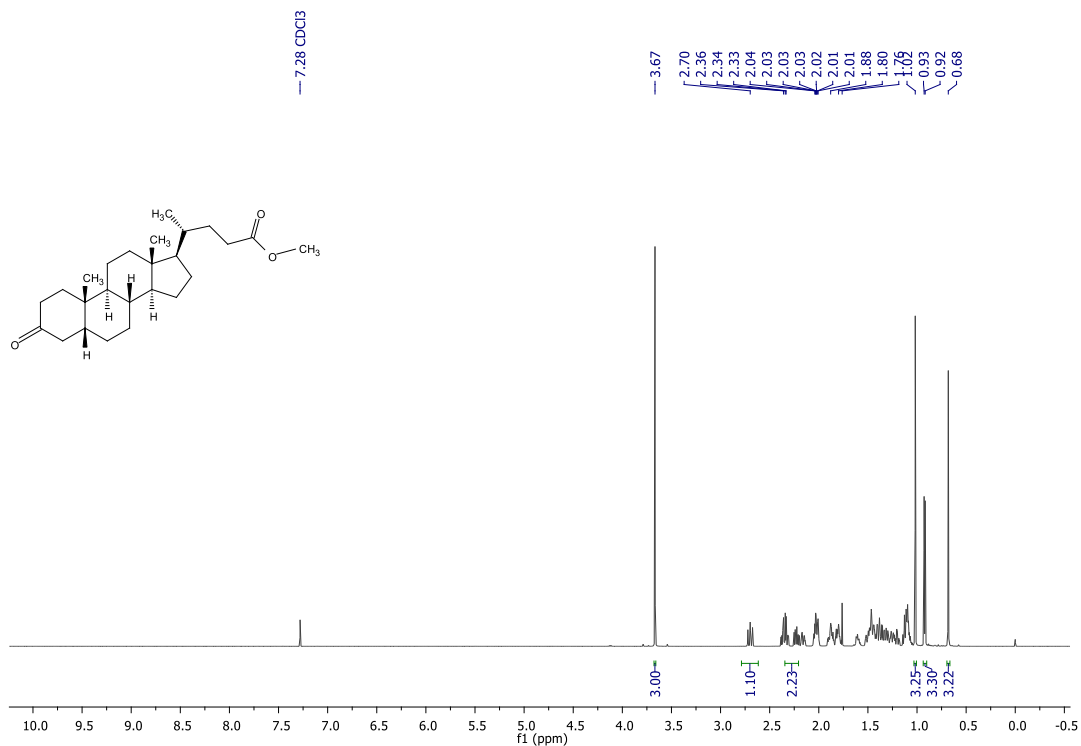
4	
Formula	C ₂₆ H ₄₂ O ₃
Molecular weight	402.59
Temperature (K)	293
Crystal size (mm ³)	0.4 × 0.2 × 0.05
Crystal system	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> (Å)	10.0725(7)
<i>b</i> (Å)	7.6889(4)
<i>c</i> (Å)	15.2885(10)
β (°)	93.408(6)
Volume (Å ³)	1181.95(13)
<i>Z</i> , ρ _{calc} (g/cm ³)	2, 1.131
μ (mm ⁻¹)	0.072
<i>F</i> (000)	444.0
Radiation	Mo Kα (λ = 0.71073)
2Θ range for data collection (deg)	5.934 to 52.736
Index ranges	-12 ≤ <i>h</i> ≤ 12, -9 ≤ <i>k</i> ≤ 9, -19 ≤ <i>l</i> ≤ 19
Reflections collected	37711
Independent reflections	4831
Data/restraints/parameters	4831/1/266
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	0.893
Final <i>R</i> indexes [<i>I</i> ≥ 2σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0507, <i>wR</i> ₂ = 0.0977
Final <i>R</i> indexes [all data]	<i>R</i> ₁ = 0.1297, <i>wR</i> ₂ = 0.1165
Largest diff. peak/hole (e Å ⁻³)	0.10/-0.14
Flack and Hooft parameters	-0.4(10) and 0.2(11)
Inverted Flack and Hooft parameters	1.4(10) and 0.8(11)
CCDC number	2354163

Tabla A2. Numeración del esqueleto del compuesto 6f para asignación de señales en RMN- ^1H y RMN- ^{13}C .

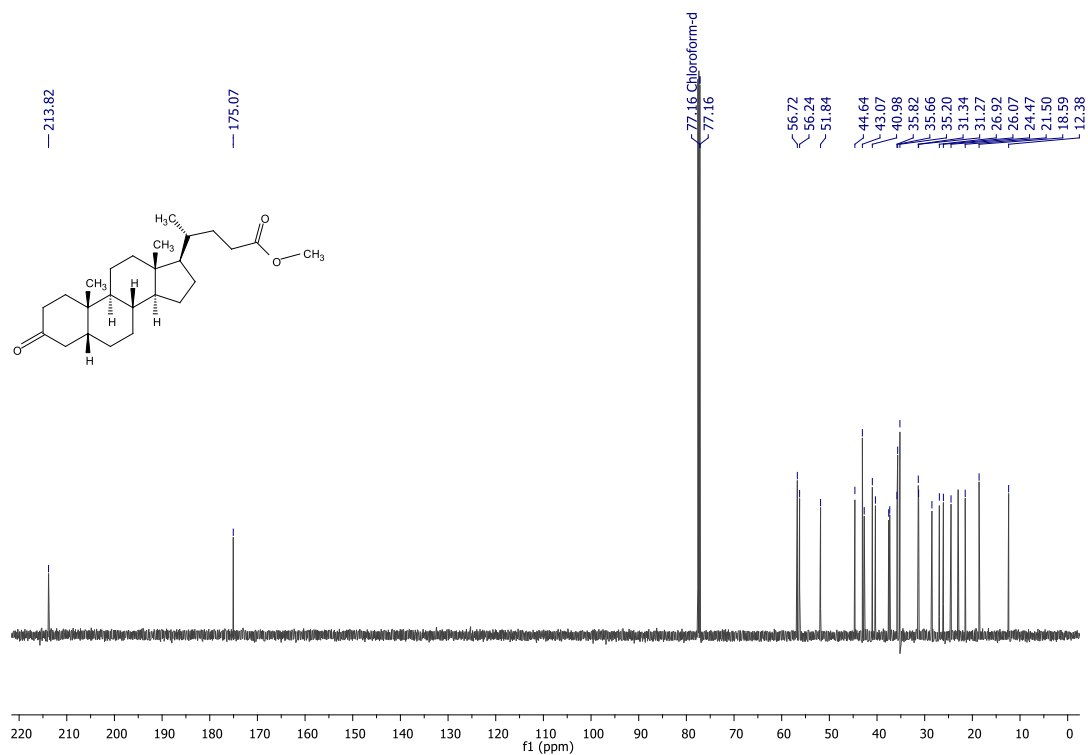


#	Tipo	Carbono	Protón	
			α	β
1	CH_2	30.55	1.69	1.16
2	CH_2	35.13	1.68	1.17
3	C	68.79	—	—
4	CH_2	29.29	1.33	1.25
5	CH	38.77	—	1.29
6	CH_2	26.27	1.01	1.81
7	CH_2	25.77	1.09	1.39
8	CH	34.95	—	1.30
9	CH	36.90	1.65	—
10	C	34.19	—	—
11	CH_2	20.63	1.28	1.14
12	CH_2	39.33	1.13	1.90
13	C	42.24	—	—
14	CH	55.60	1.03	—
15	CH_2	23.74	1.02	1.50
16	CH_2	27.66	1.77	1.22
17	CH	55.76	1.17	—
18	CH_3	11.81	0.60	
19	CH_3	23.28	0.90	
20	CH	34.77	1.33	—

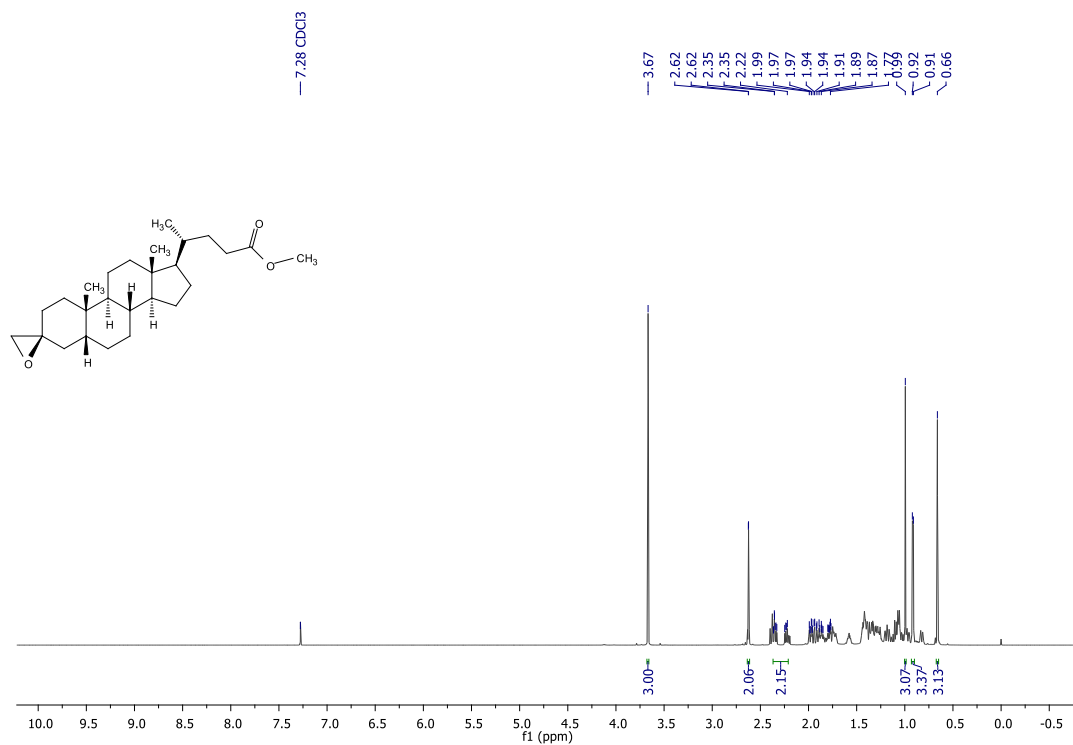
21	CH ₃	18.12	0.84	
22	CH ₂	30.66	1.31	1.42
23	CH ₂	30.70	2.21	2.10
24	COOH	174.81	11.92	
25	CH ₂	56.66	2.70	
26	CH ₂	50.49	4.07	
27	Ar-C	128.37	—	
28 and 32	Ar-CH	129.12	7.45	
29 and 31	Ar-CH	130.41	7.23	
30	Ar-C	138.29	—	
Ar-CH ₃	Ar-CH ₃	20.78	2.31	
3-OH	OH	—		4.84
-NH ₂ -	NH ₂	—	9.02	



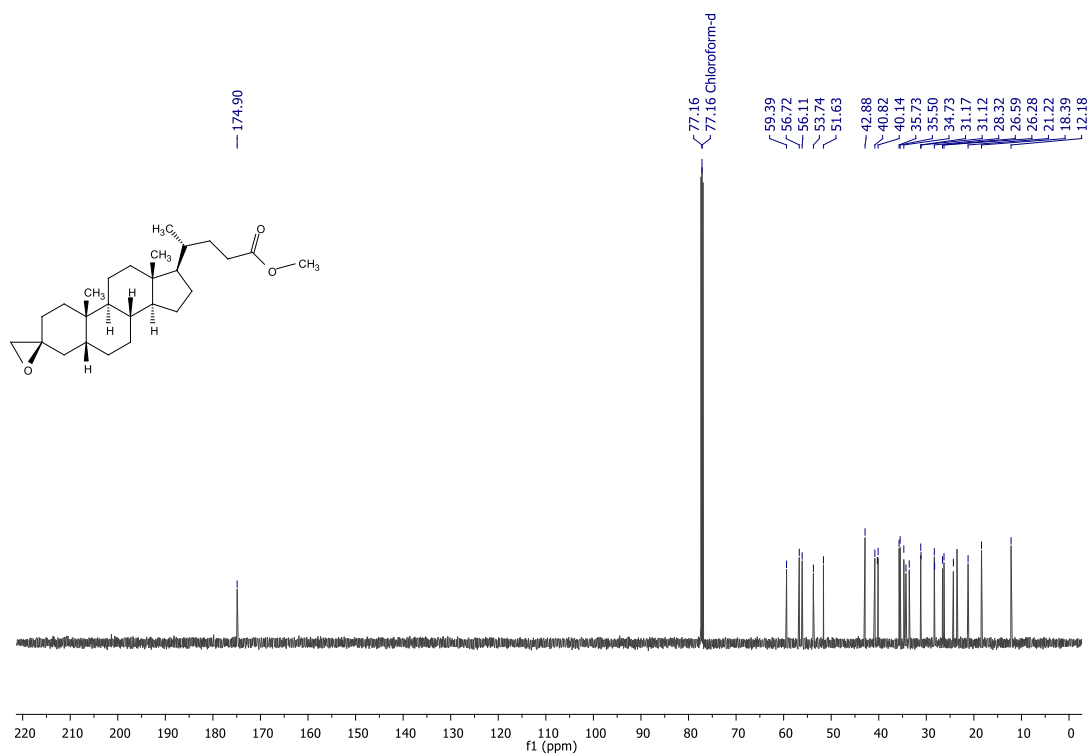
Espectro A1. RMN– ^1H (600 MHz) del intermediario **3** en CDCl_3 .



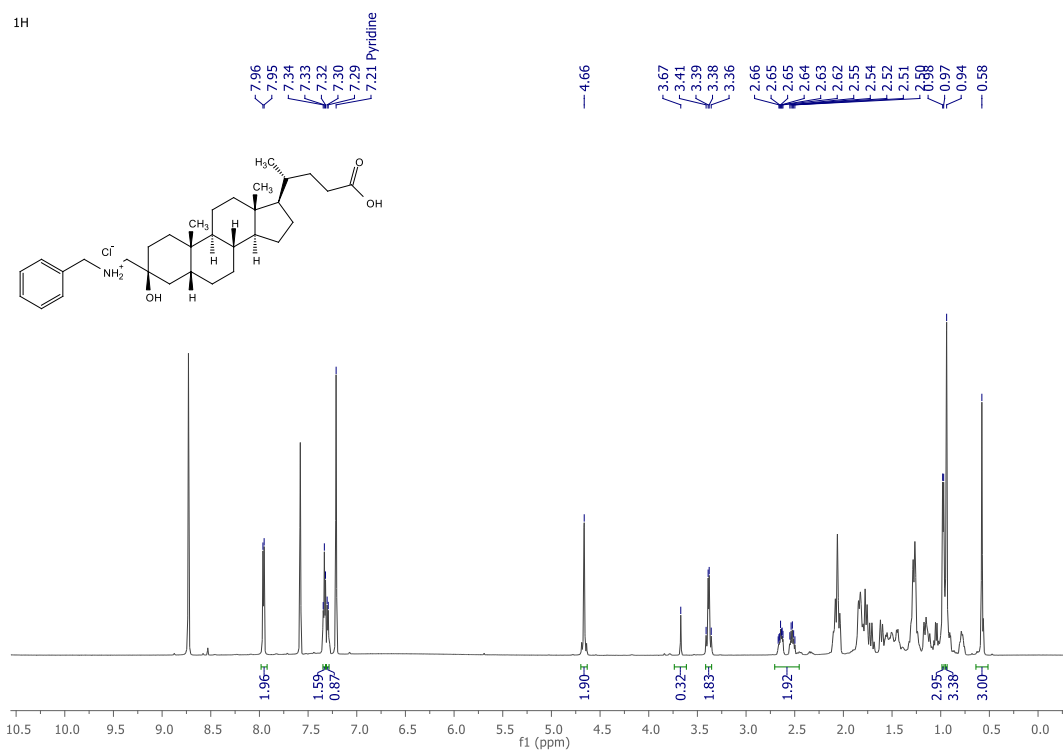
Espectro A2. RMN– ^{13}C (600 MHz) del intermediario **3** en CDCl_3 .



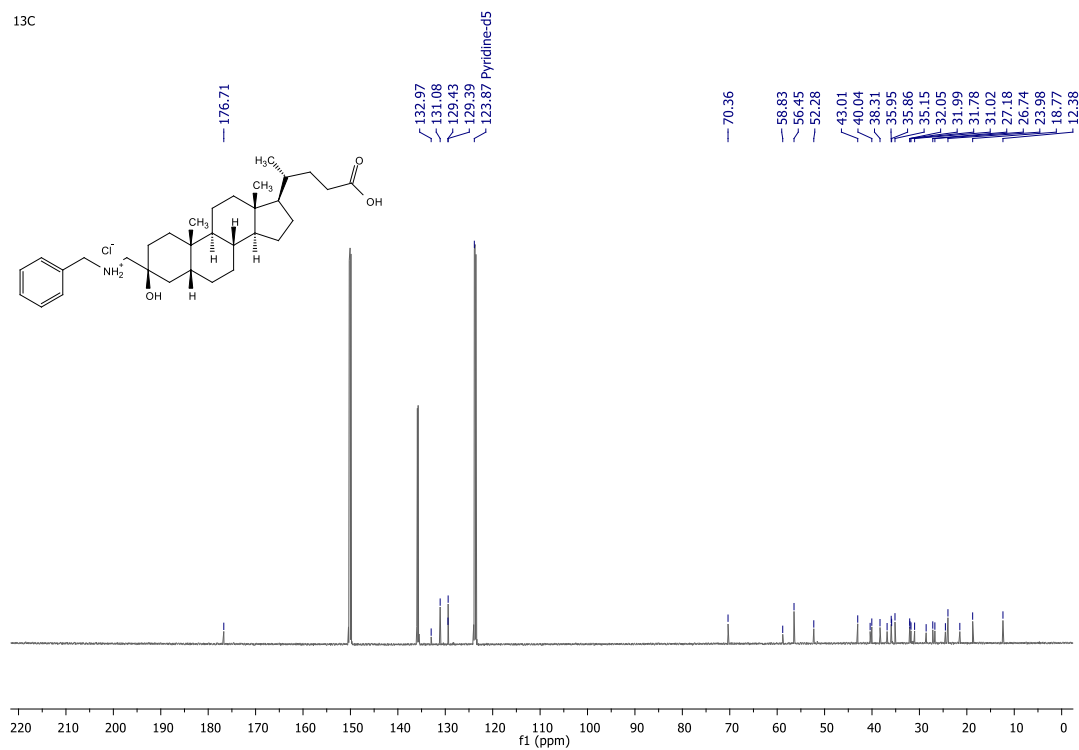
Espectro A3. RMN–¹H (600 MHz) del intermediario **4** en CDCl₃.



Espectro A4. RMN–¹³C (600 MHz) del intermediario **4** in CDCl₃.

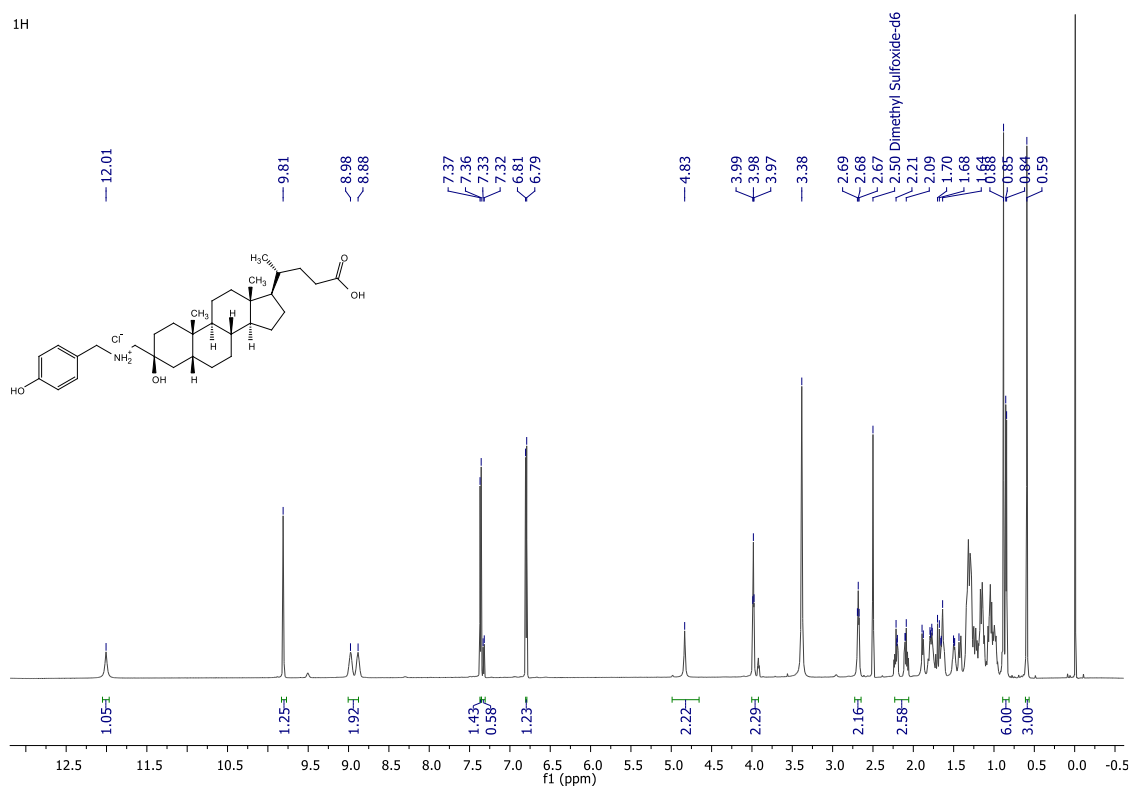


Espectro A5. RMN– ¹H (600 MHz) del compuesto **6a** en piridina–d₅.



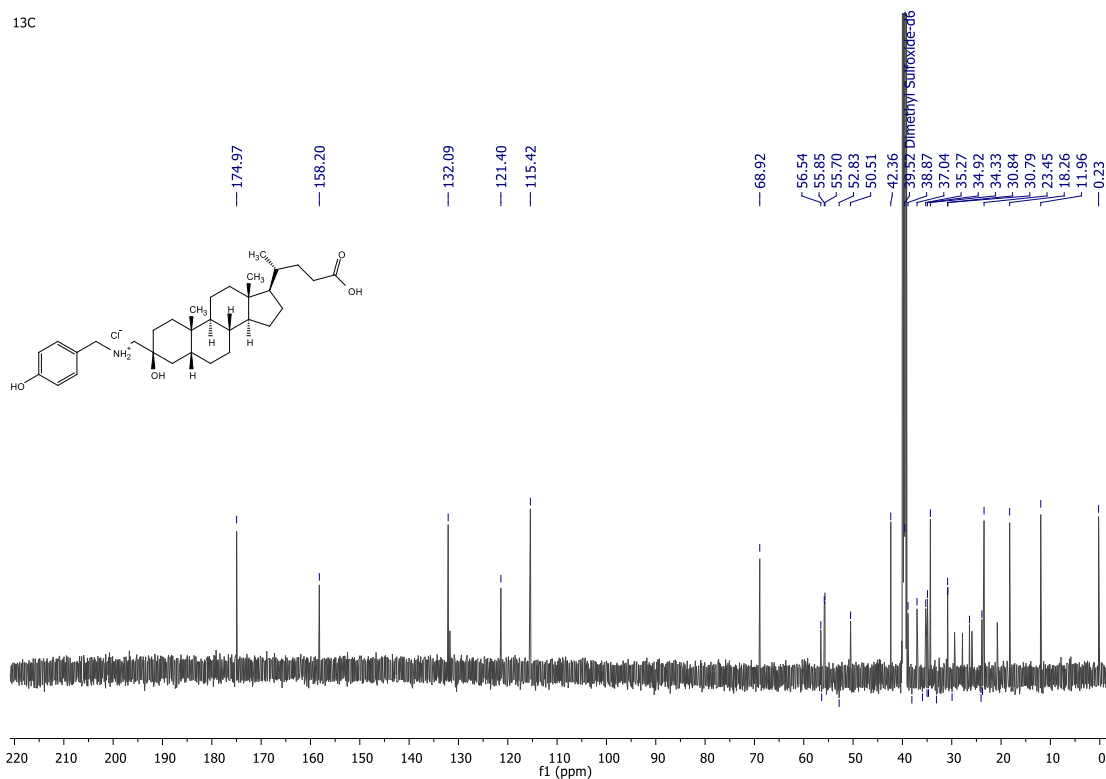
Espectro A6. RMN– ¹³C (600 MHz) del compuesto **6a** en piridina–d₅.

¹H



Espectro 7. RMN– ¹H (600 MHz) del compuesto **6b** en DMSO–d₆.

¹³C



Espectro A8. RMN– ¹³C (600 MHz) del compuesto **6b** en DMSO–d₆.

1H

Chemical structure of the compound (a steroid derivative) is shown above the spectrum.

Chemical shifts (ppm) listed on the right:

- 7.85, 7.59, 7.46, 7.45, 7.28, 7.22 Pyridine-d5, 6.97, 6.95
- 4.69
- 3.76, 3.76, 3.45, 3.43, 3.41, 3.39
- 2.65, 2.65, 2.64, 2.64, 2.63, 2.54, 2.53, 0.86, 0.98, 0.95, 0.58

Integration values (from left to right):

- 1.16
- 1.29
- 1.12
- 1.12
- 1.00
- 2.13
- 3.00
- 2.14
- 2.37
- 2.92
- 2.73
- 3.11

Espectro A9. RMN- ^1H (600 MHz) del compuesto **6c** en piridina- d_5 .

¹³C

Chemical structure of the compound is shown above the spectrum. The structure is a complex steroid derivative with a 4-methoxyphenyl group attached to the C-14 position via a chiral auxiliary (a chiral amine salt). The steroid core features a ketone at C-3, a hydroxyl group at C-14, and a side chain at C-17 containing a methyl group and a carboxylic acid group.

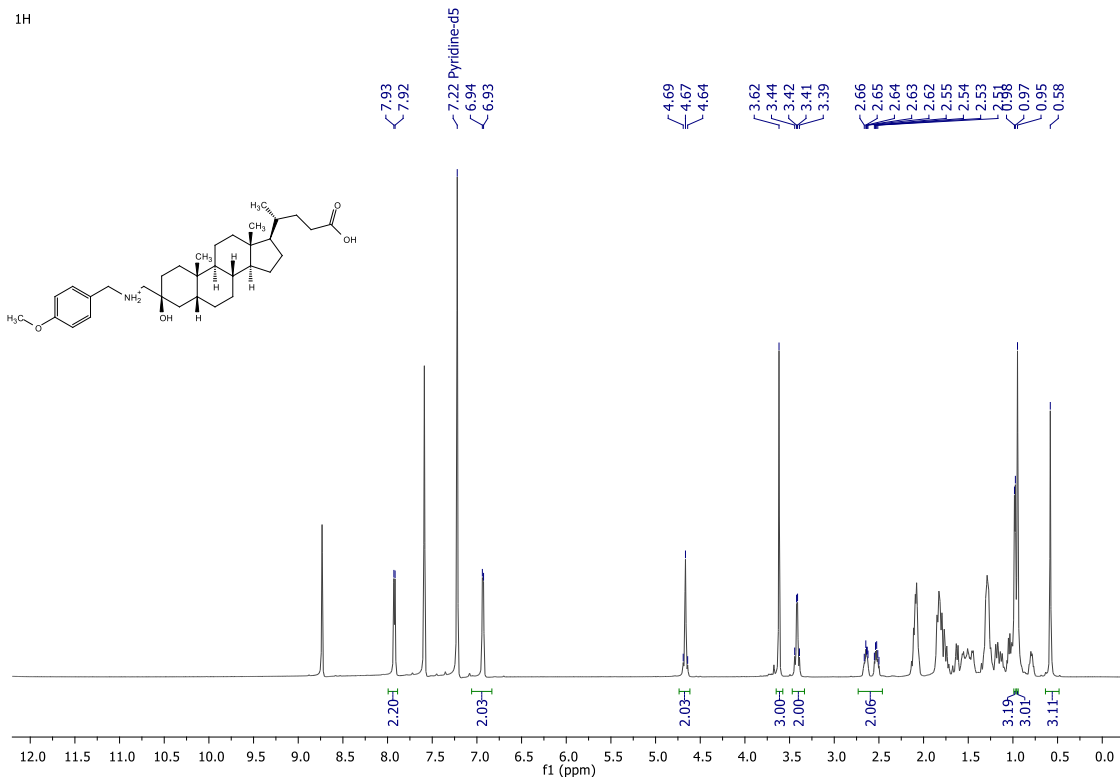
Pyridine-d5

The spectrum shows the following chemical shifts (ppm) for the Pyridine-d5 solvent:

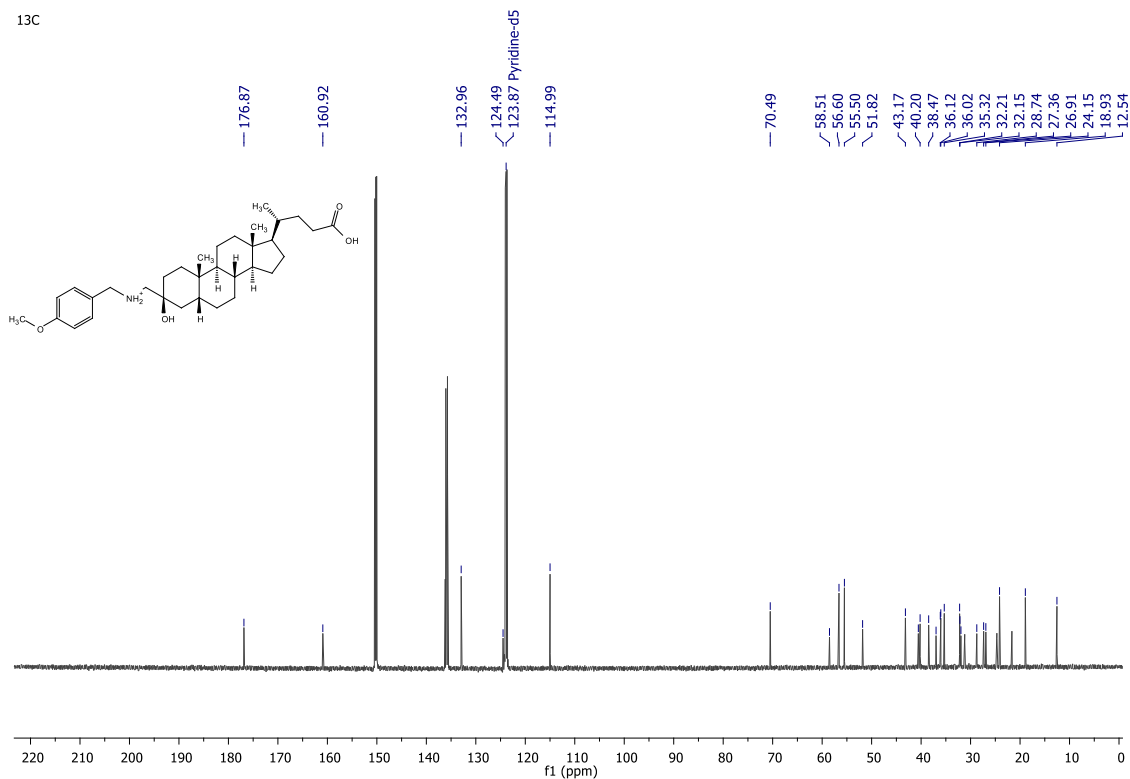
- 177.05
- 161.01
- 134.56
- 130.75
- 123.87
- 123.39
- 116.58
- 116.07
- 70.70
- 59.07
- 56.76
- 55.99
- 52.58
- 43.34
- 40.37
- 36.29
- 36.19
- 35.48
- 32.39
- 31.32
- 31.32
- 19.10
- 12.71

The spectrum displays the ¹³C NMR peaks for the compound, with the x-axis labeled "f1 (ppm)" ranging from 220 to 0. The peaks are labeled with their corresponding chemical shifts in ppm.

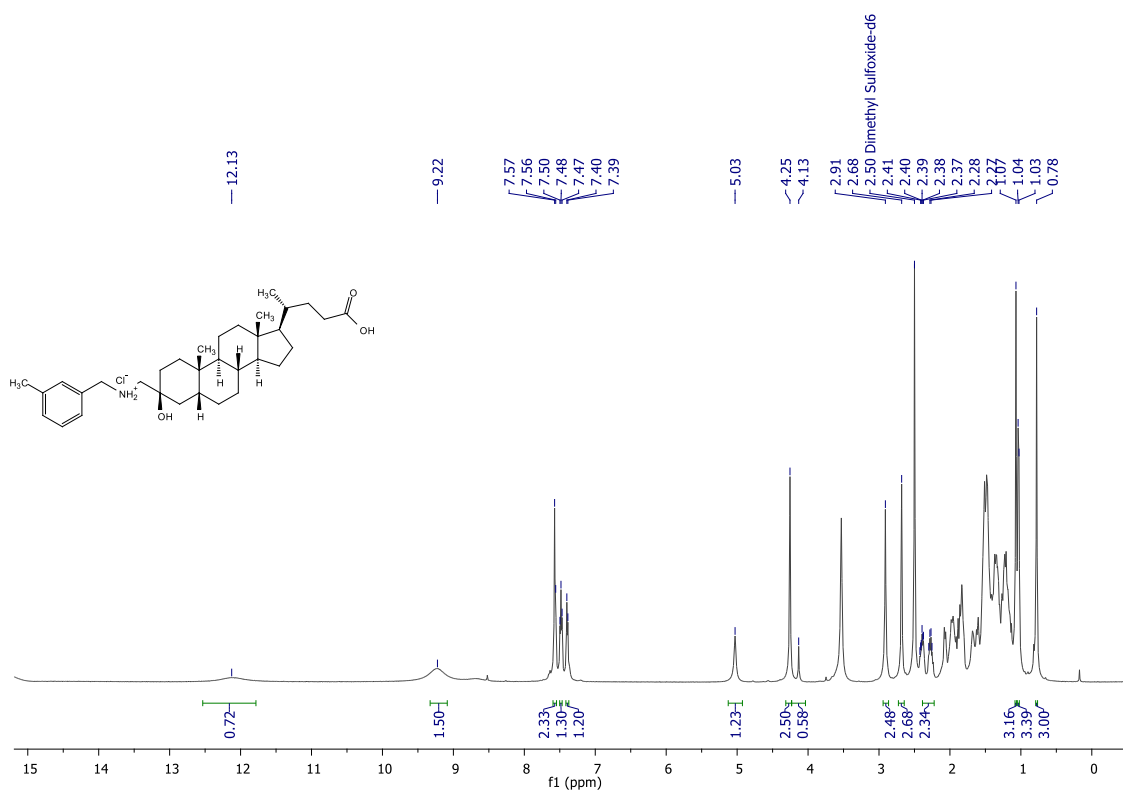
Espectro A10. RMN-¹³C (600 MHz) del compuesto **6c** en piridina-d₅.



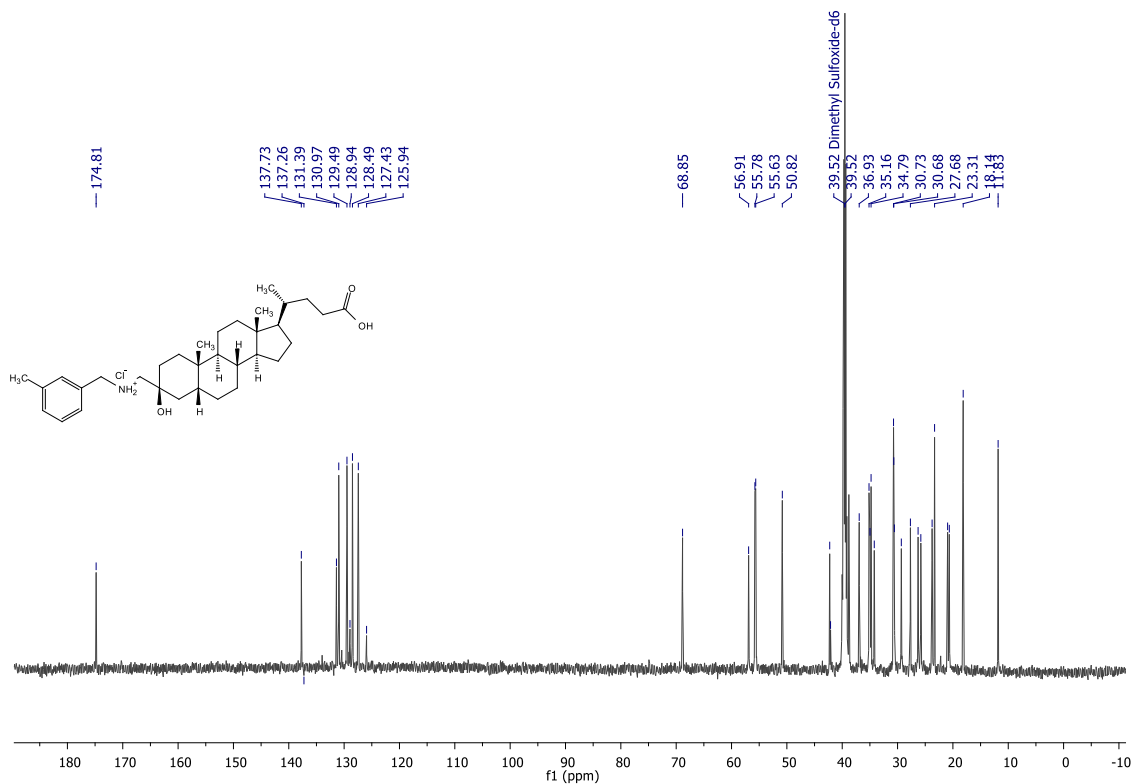
Espectro A11. RMN– ¹H (600 MHz) del compuesto **6d** en piridina–d₅.



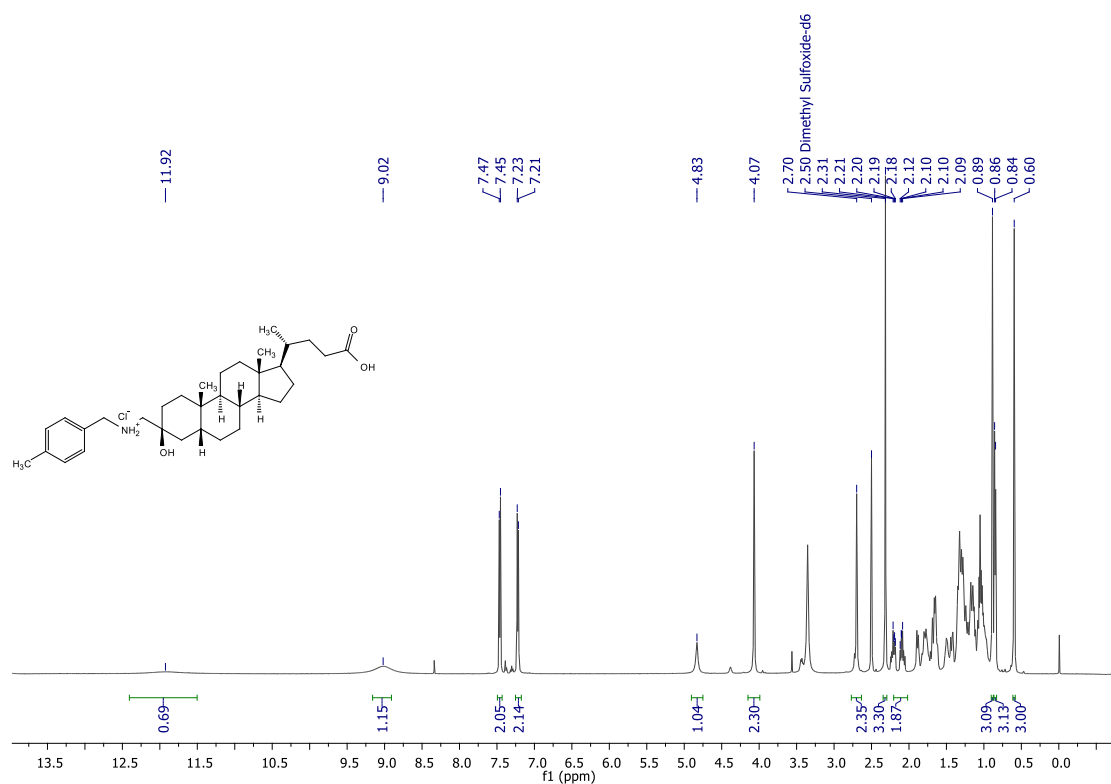
Espectro A12. RMN– ¹³C (600 MHz) del compuesto **6d** en piridina–d₅.



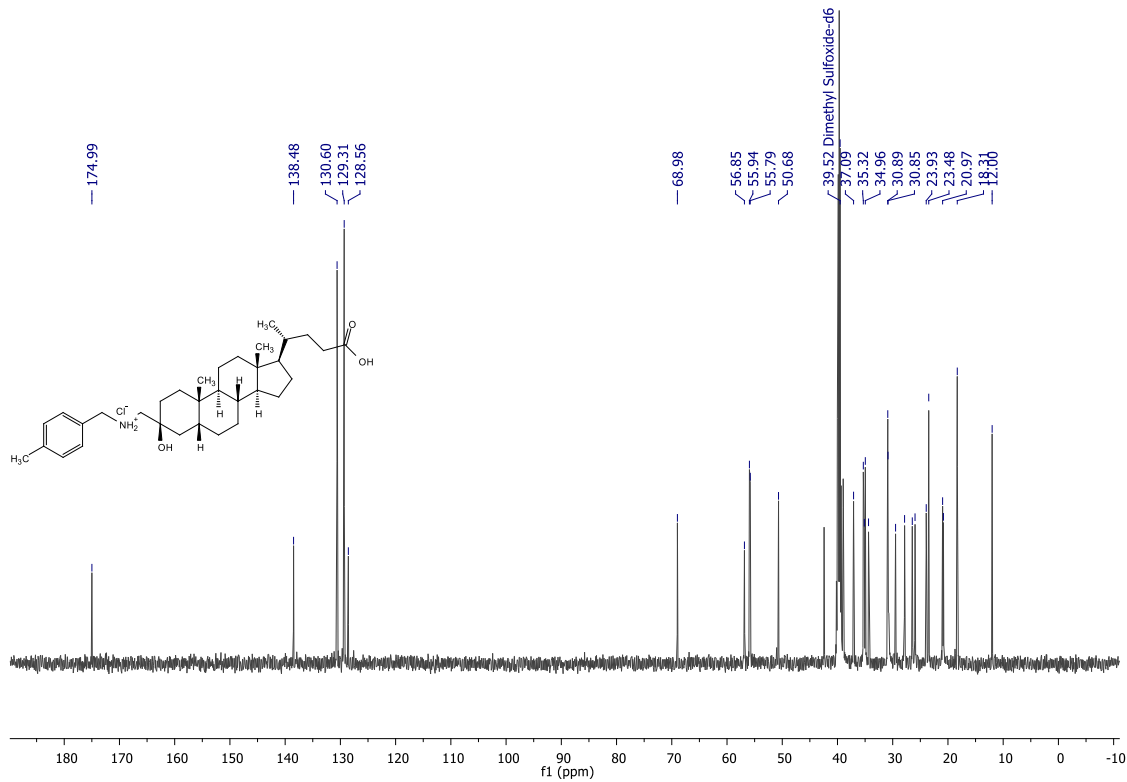
Espectro A13. RMN- ^1H (600 MHz) del compuesto **6e** en DMSO-d₆.



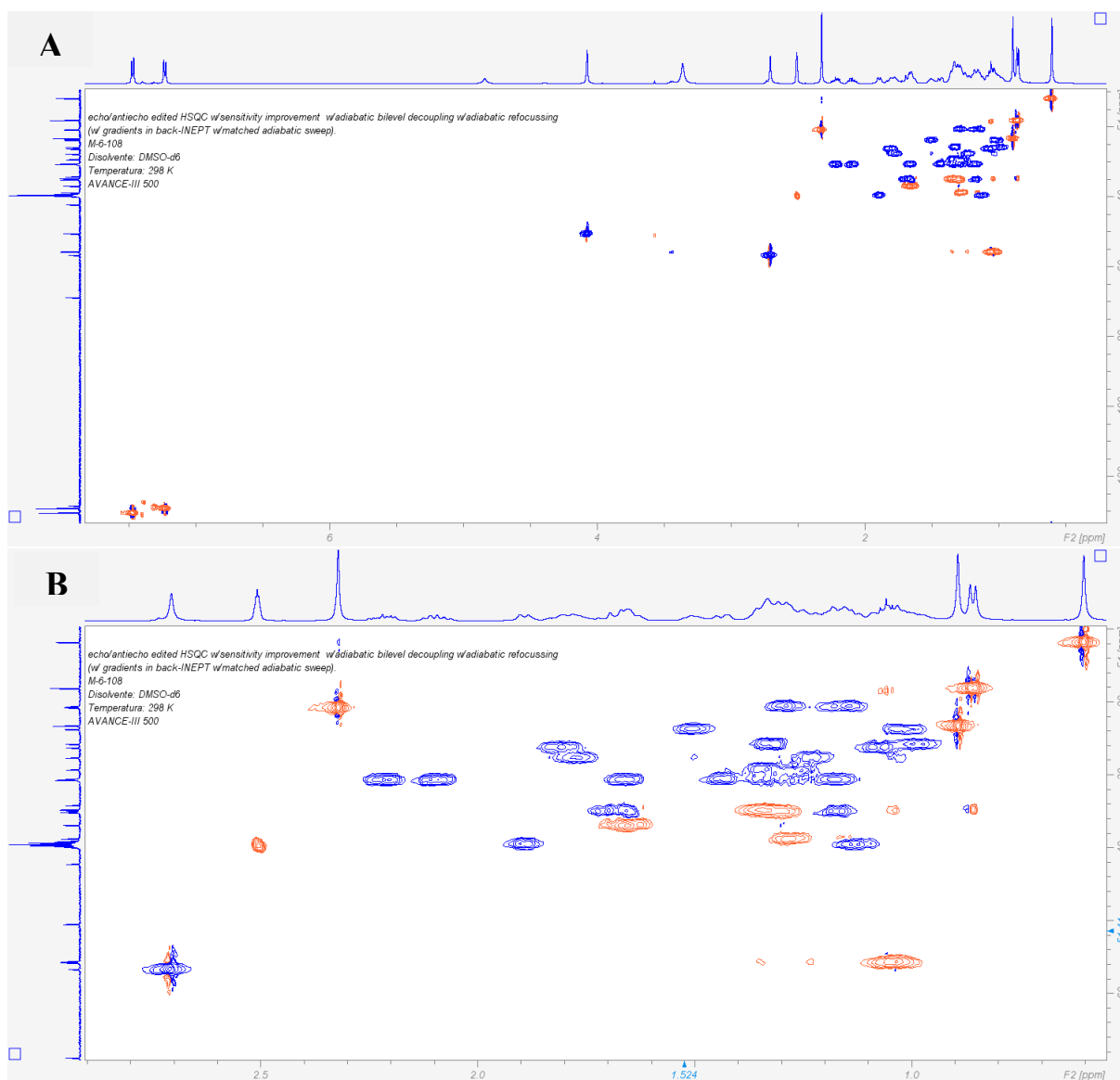
Espectro A14. RMN- ^{13}C (600 MHz) del compuesto **6e** en DMSO-d₆.



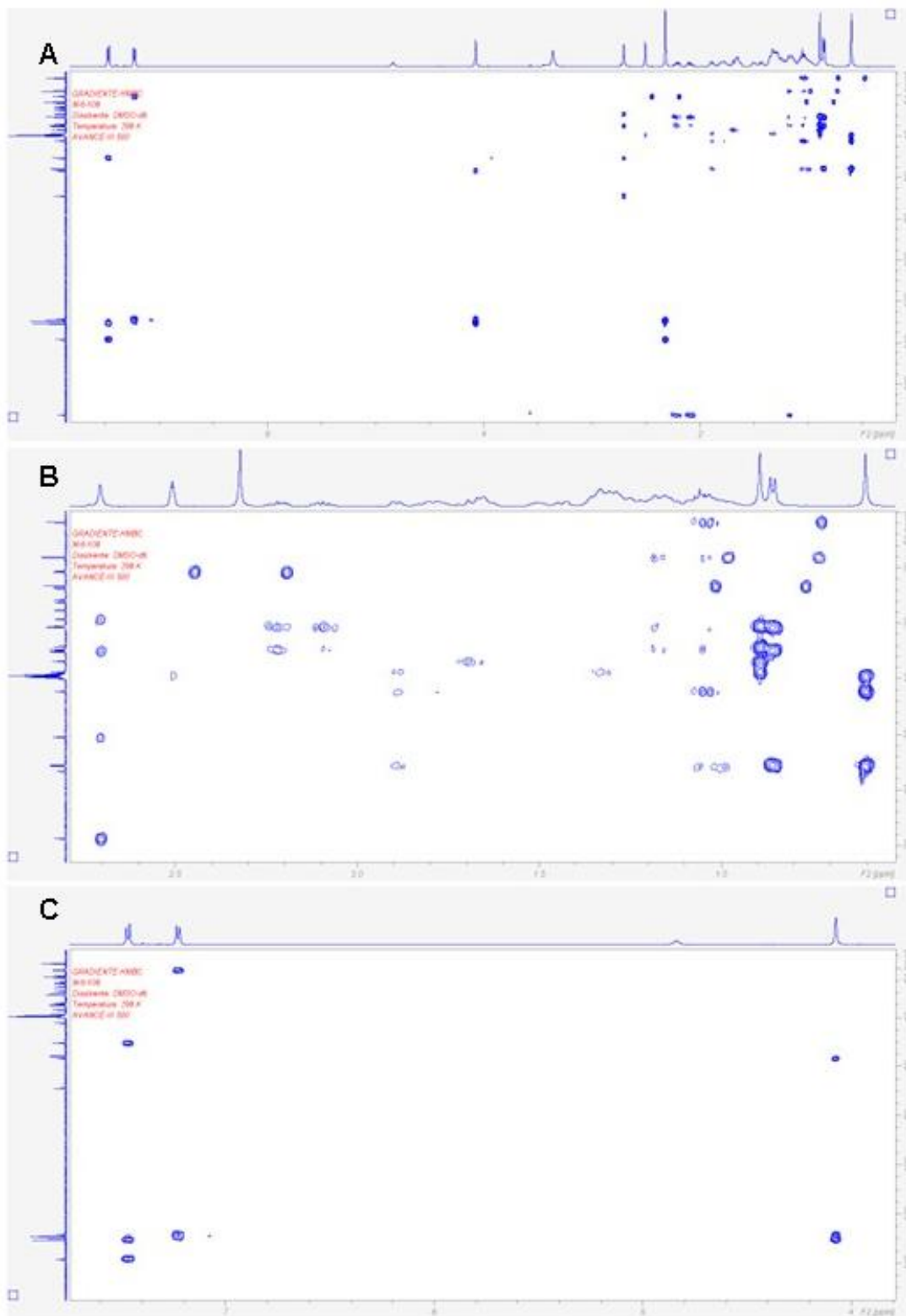
Espectro A15. RMN- ^1H (600 MHz) del compuesto **6f** en DMSO- d_6 .



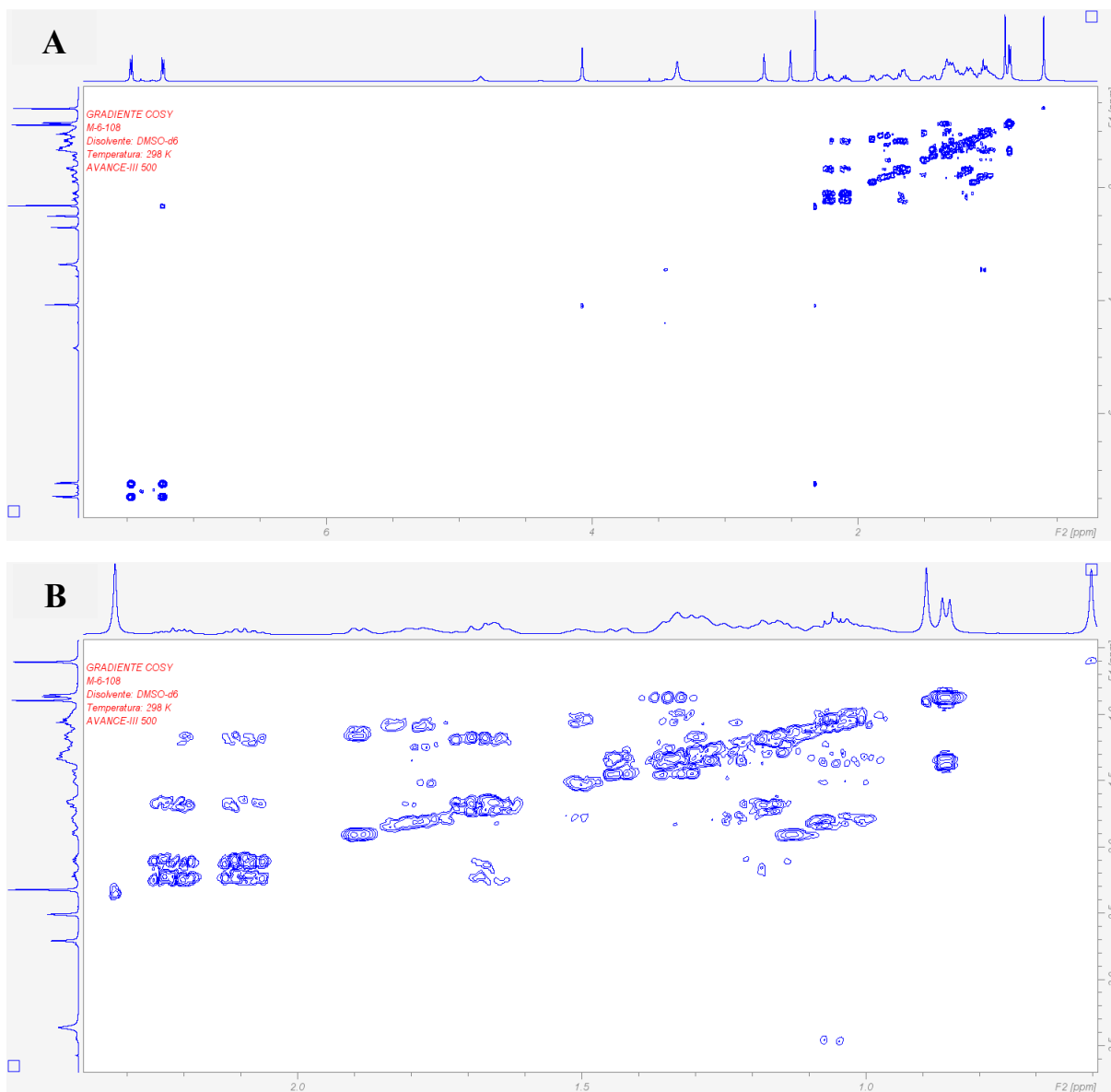
Espectro A16. RMN- ^{13}C (600 MHz) del compuesto **6f** en DMSO- d_6 .



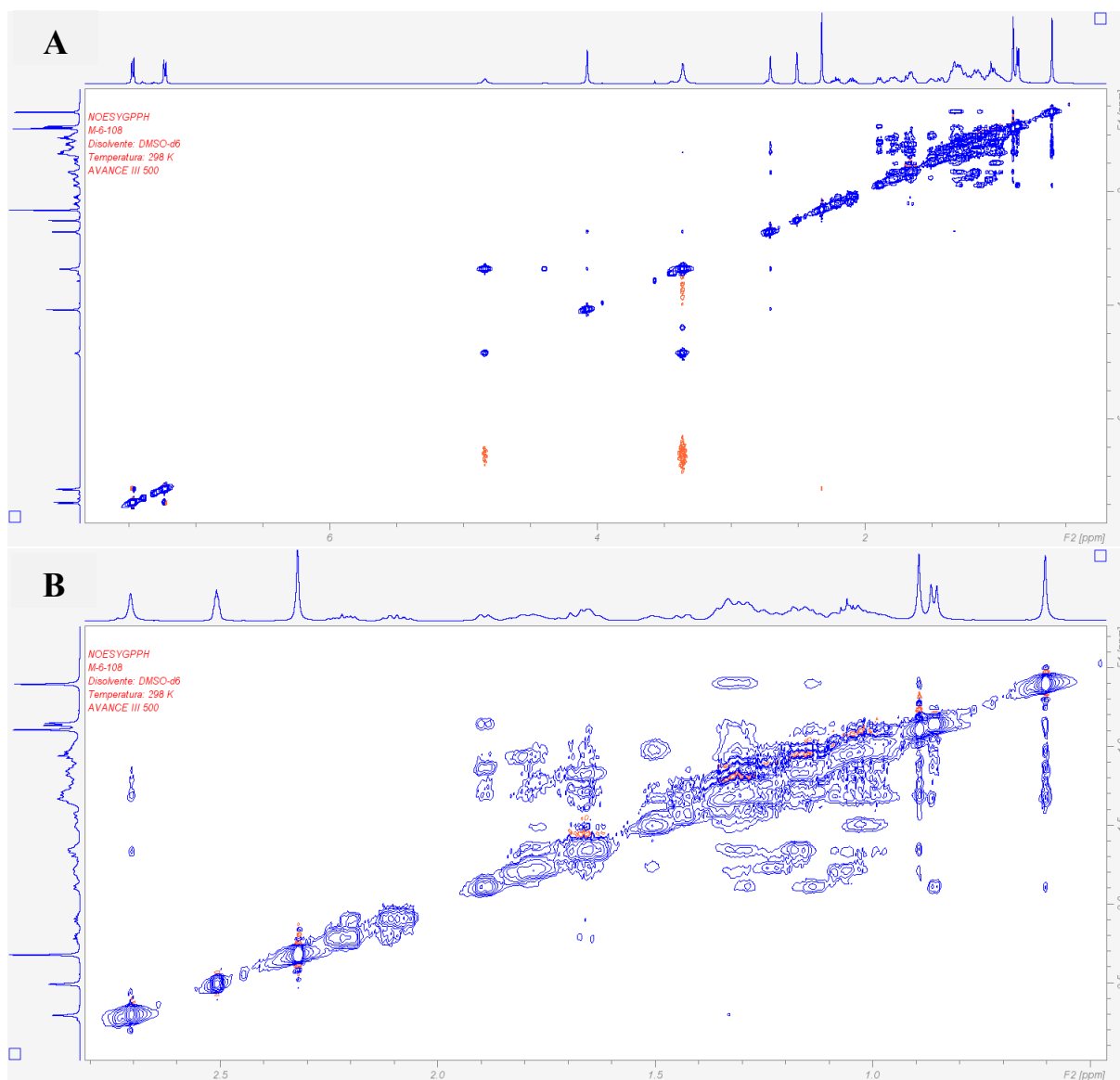
Espectro A17. Espectro HSQC del compuesto **6f**. **A)** espectro completo; **B)** espectro en frecuencia alta.



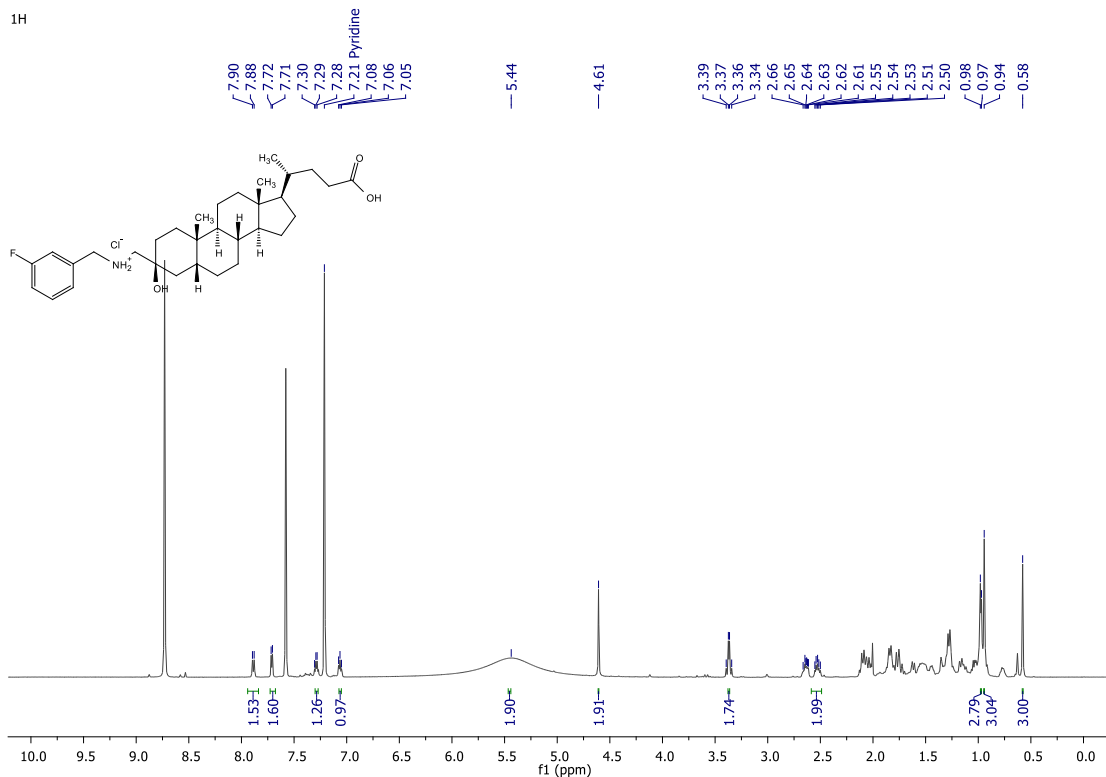
Espectro A18. Espectro HMBC del compuesto **6f**. **A)** espectro completo; **B)** espectro en frecuencia alta; **C)** espectro en frecuencia baja.



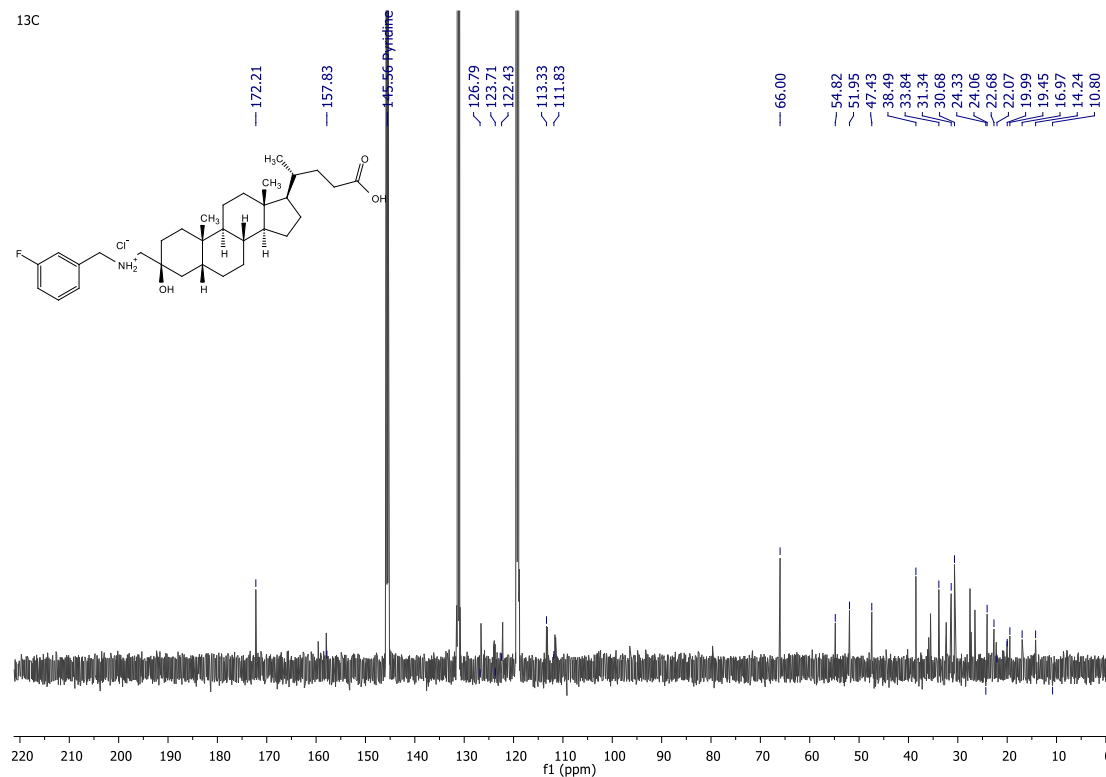
Espectro A19. Espectro COSY del compuesto **6f**. **A)** espectro completo; **B)** espectro en frecuencia alta.



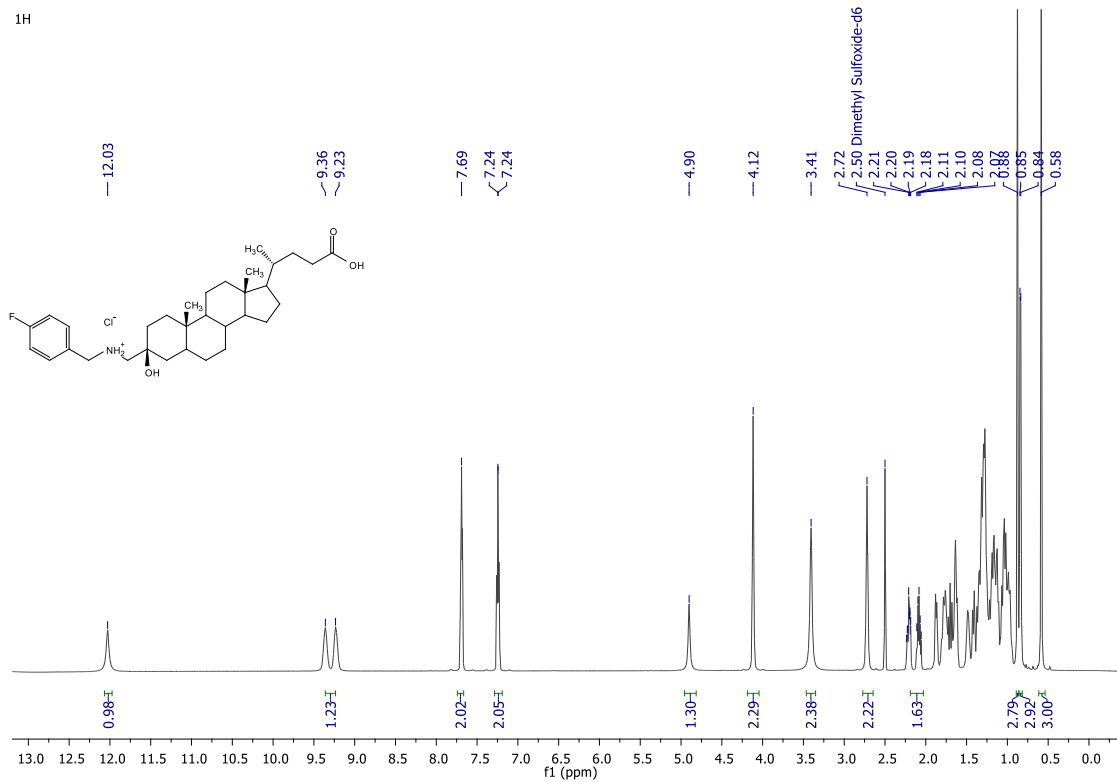
Espectro A20. Espectro NOESY del compuesto **6f**. **A)** espectro completo; **B)** espectro en frecuencia alta.



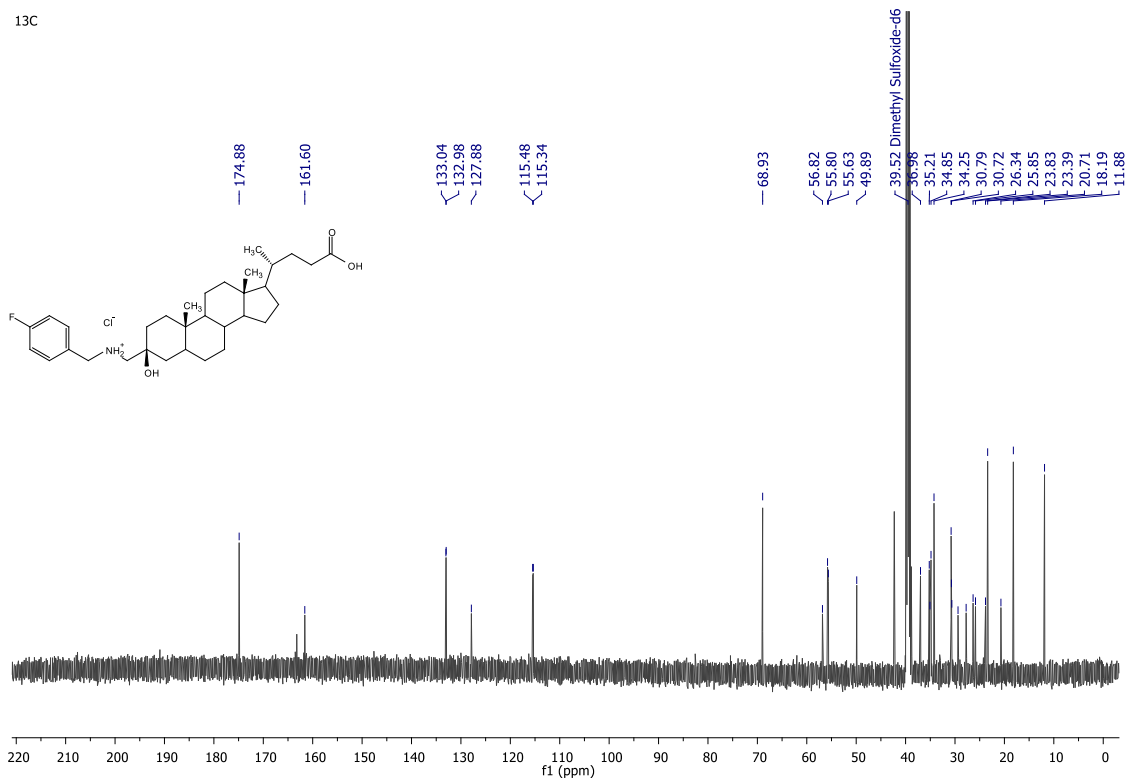
Espectro A21. RMN– ¹H (600 MHz) del compuesto **6g** en piridina–d₅.



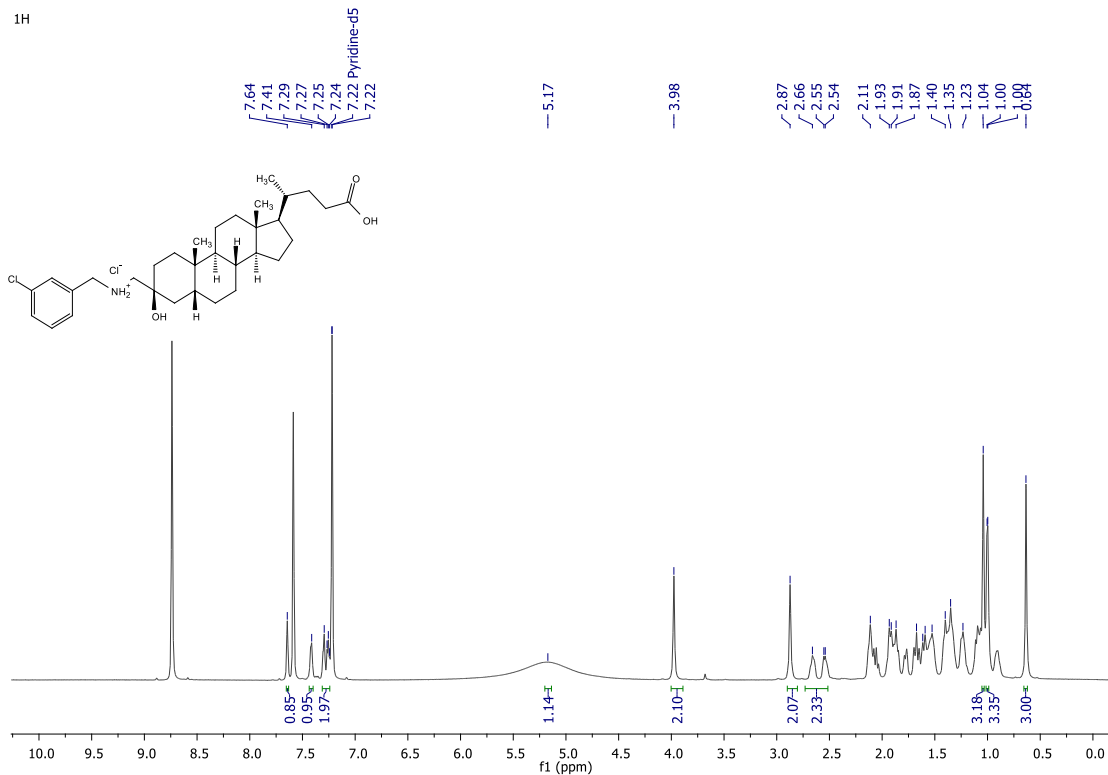
Espectro A22. RMN– ¹³C (600 MHz) del compuesto **6g** en piridina–d₅.



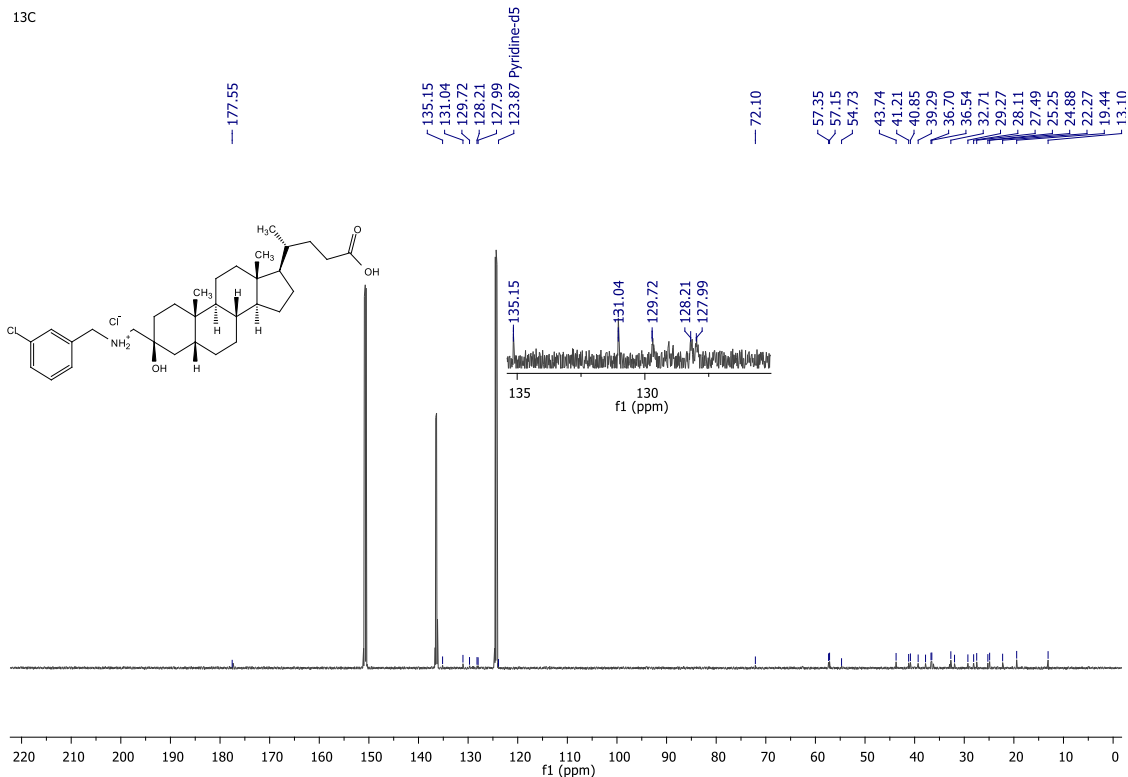
Espectro A23. RMN– ¹H (600 MHz) del compuesto **6h** en DMSO–d₆.



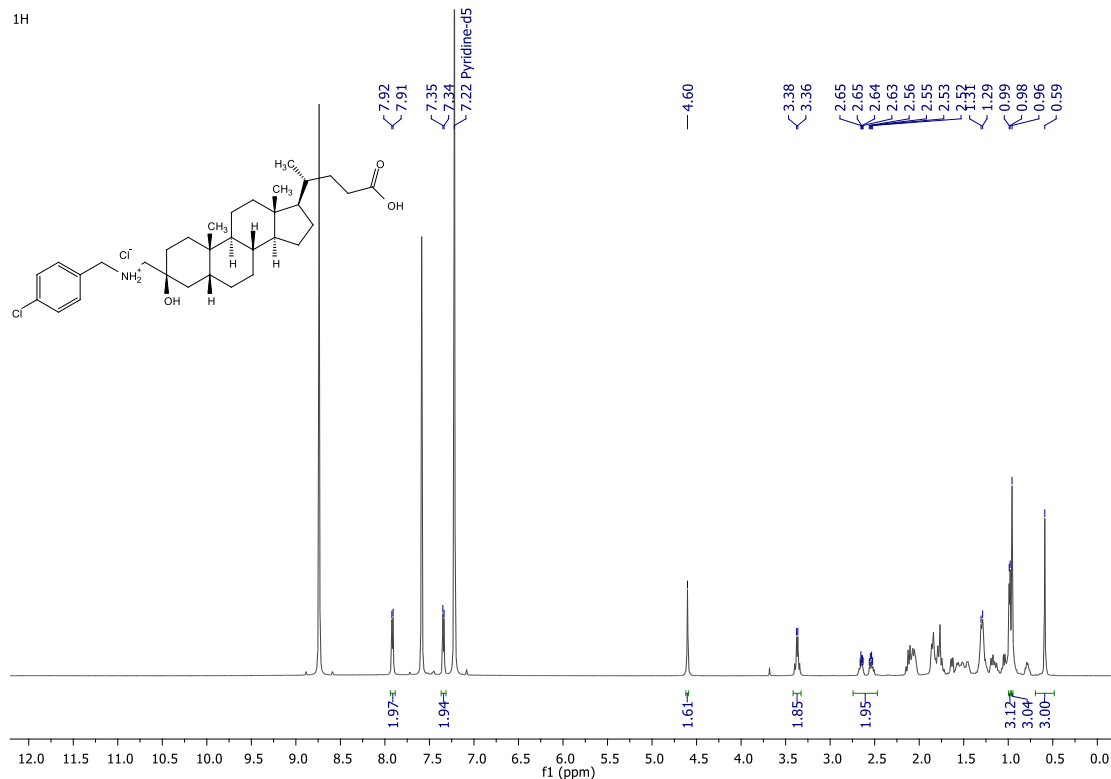
Espectro A24. RMN– ¹³C (600 MHz) del compuesto **6h** en DMSO–d₆.



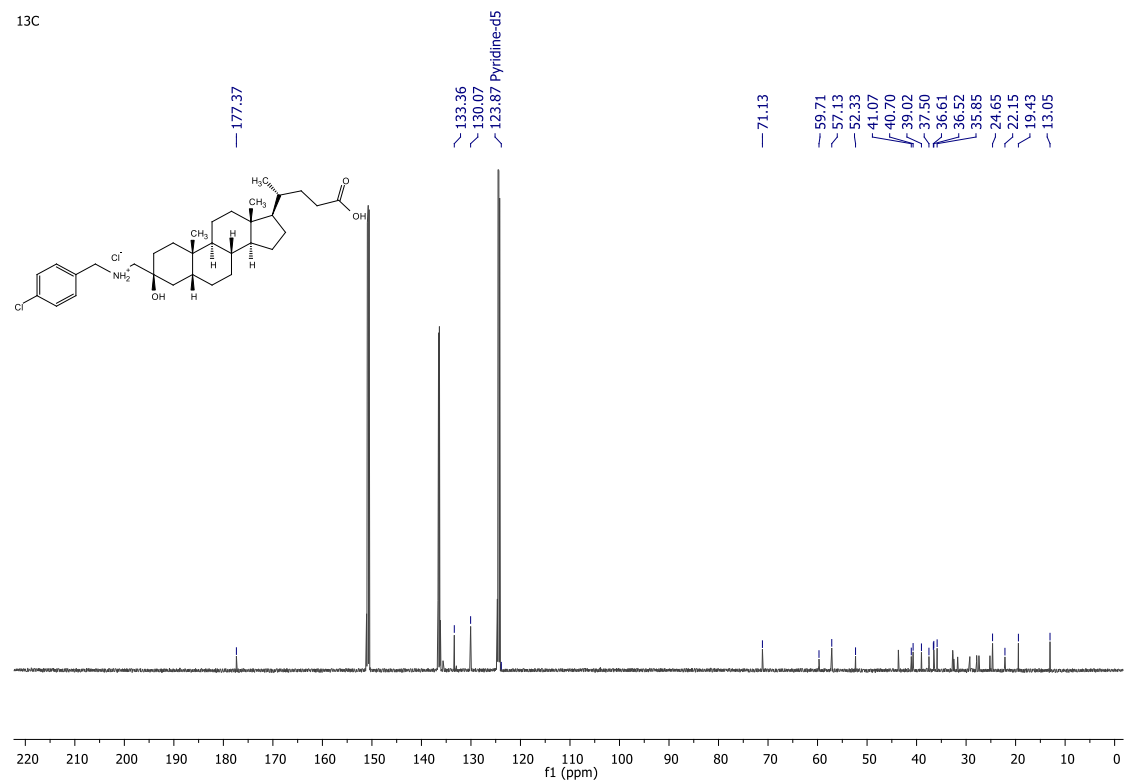
Espectro A25. RMN– ¹H (600 MHz) del compuesto **6i** en piridina–d5.



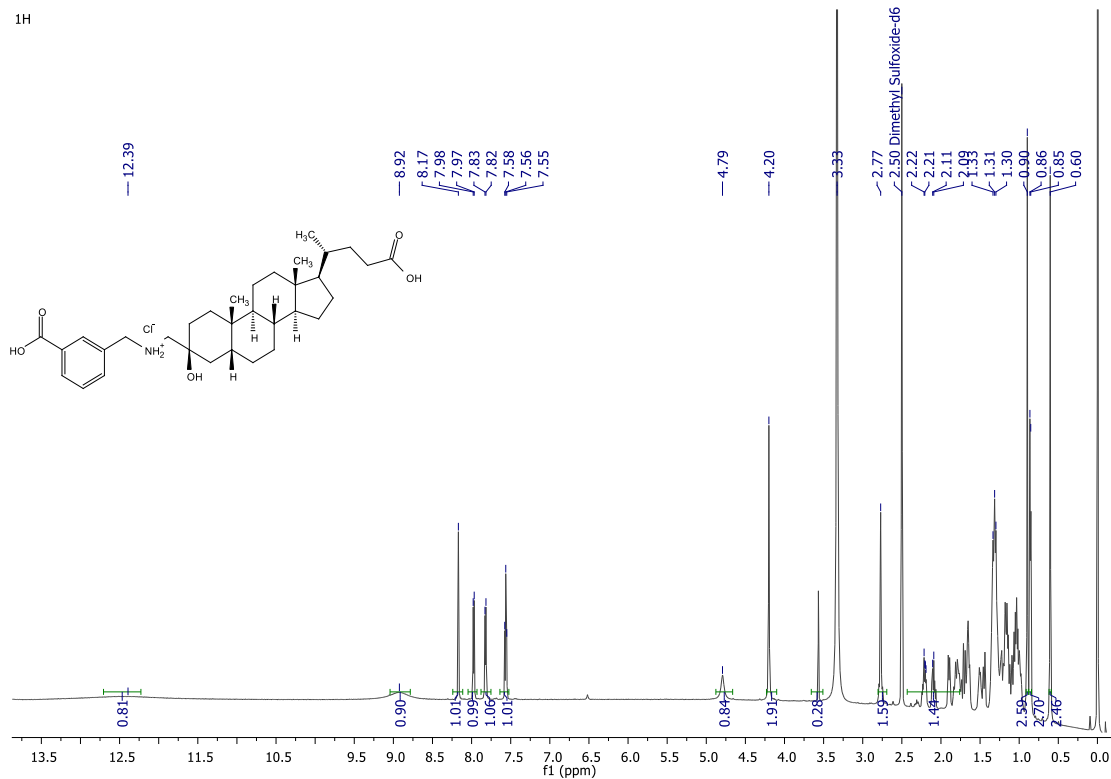
Espectro A26. RMN– ¹³C (600 MHz) del compuesto **6i** en piridina–d5.



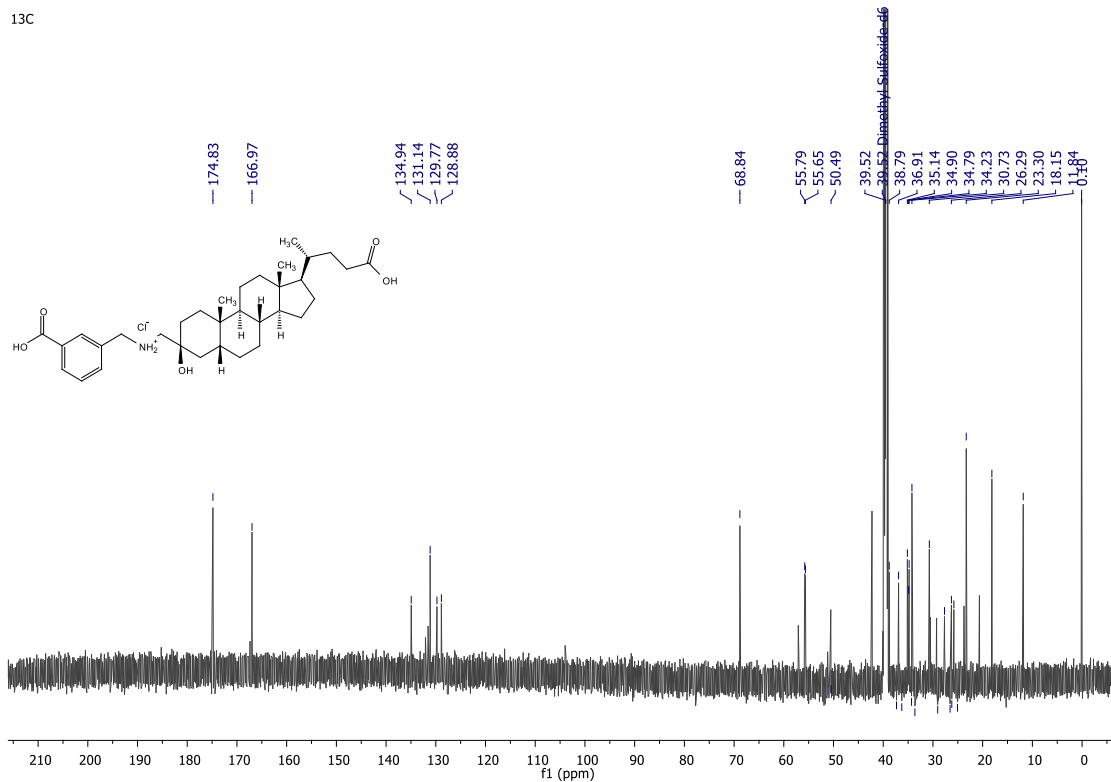
Espectro A27. RMN– ¹H (600 MHz) del compuesto **6j** en piridina–d5.



Espectro A28. RMN– ¹³C (600 MHz) del compuesto **6j** en piridina–d5.

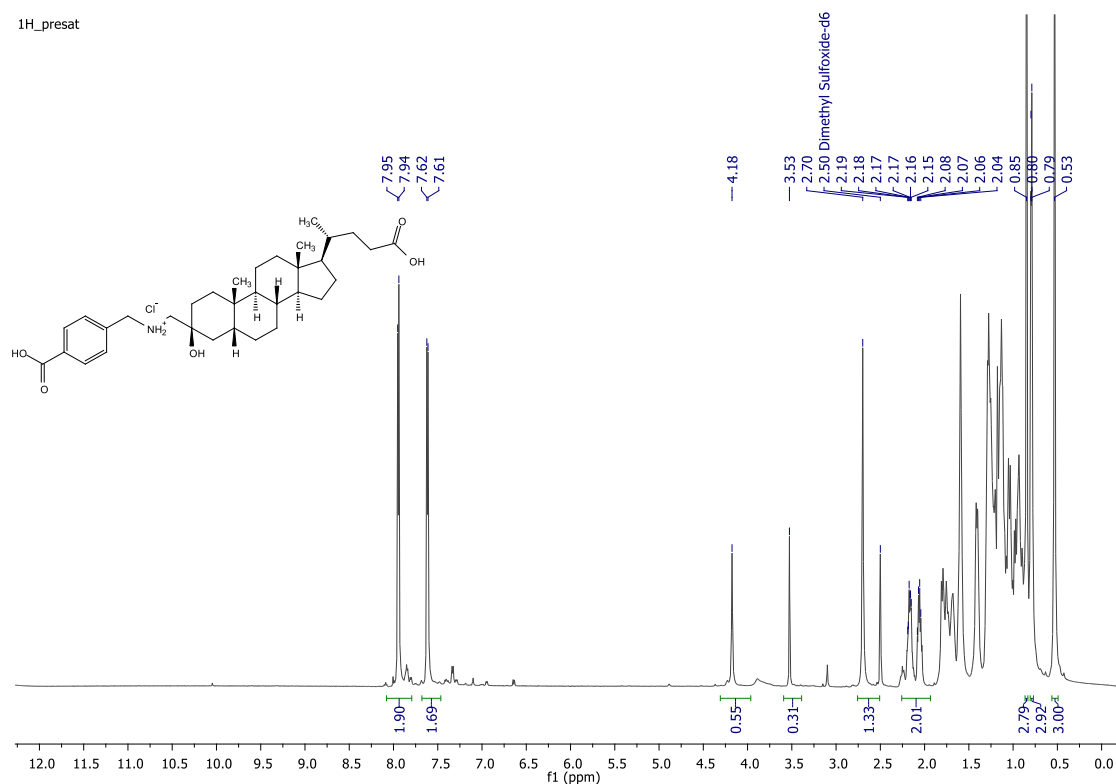


Espectro A29. RMN- ¹H (600 MHz) del compuesto **6k** en DMSO-d₆.



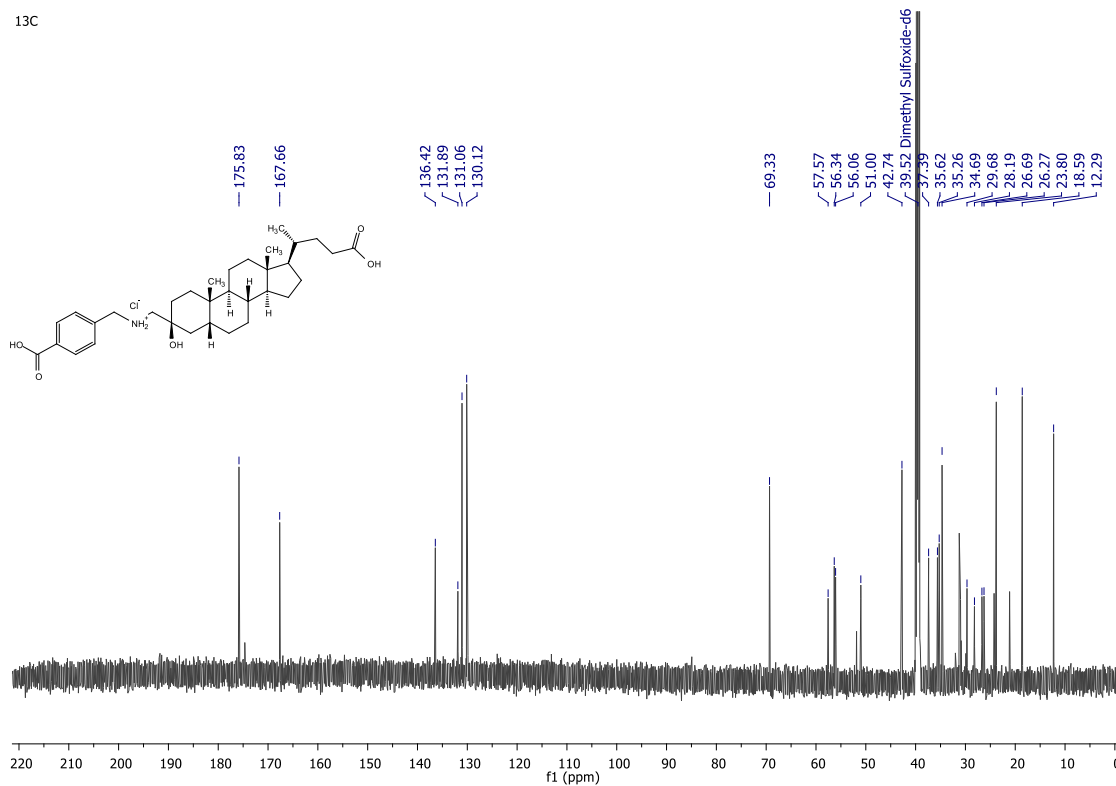
Espectro A30. RMN- ¹³C (600 MHz) del compuesto **6k** en DMSO-d₆.

1H_presat



Espectro A31. RMN– ¹H (600 MHz) del compuesto **6l** en DMSO–d6.

13C



Espectro A32. RMN– ¹³C (600 MHz) del compuesto **6l** en DMSO–d6.

1H

Chemical structure of the compound (1) is shown in the top left. The structure is a complex steroid derivative with a pentafluorophenyl group and a carboxylic acid side chain.

1H NMR spectrum (Pyridine-d5) showing peaks from 0.0 to 12.0 ppm. The spectrum is labeled with chemical shifts (ppm) and integrations.

Chemical shifts (ppm) and integrations are listed below the spectrum:

- 8.35, 8.33, 8.28 (integration: 0.87)
- 7.72, 7.46, 7.45, 7.22 (integration: 0.75)
- 7.12 (integration: 0.70)
- 7.00 (integration: 1.17)
- 4.75 (integration: 1.64)
- 3.47, 3.45, 3.44, 3.42 (integration: 1.65)
- 2.65, 2.55, 2.53 (integration: 1.71)
- 2.06, 1.85, 1.83, 1.78 (integration: 2.86)
- 1.69 (integration: 3.00)
- 0.97, 0.95, 0.58 (integration: 3.00)

Espectro A33. RMN- ^1H (600 MHz) del compuesto **6m** en piridina- d_5 .

¹³C

Chemical structure of the compound is shown above the spectrum. The compound is a complex molecule featuring a steroid-like core with a carboxylic acid group, a hydroxyl group, and a side chain containing a quaternary carbon atom bonded to two fluorine atoms and a phenyl ring.

The spectrum displays the ¹³C NMR peaks (f1, ppm) for the compound. The peaks are labeled with their corresponding chemical shifts (ppm):

- 176.82
- 150.35 Pyridine-d5
- 136.11
- 134.98
- 130.16
- 127.90
- 126.06
- 124.10
- 70.65
- 59.43
- 56.54
- 52.05
- 43.10
- 40.49
- 40.13
- 38.45
- 36.04
- 35.95
- 35.28
- 32.14
- 32.09
- 31.13
- 27.29
- 26.83
- 24.09
- 18.87
- 12.48

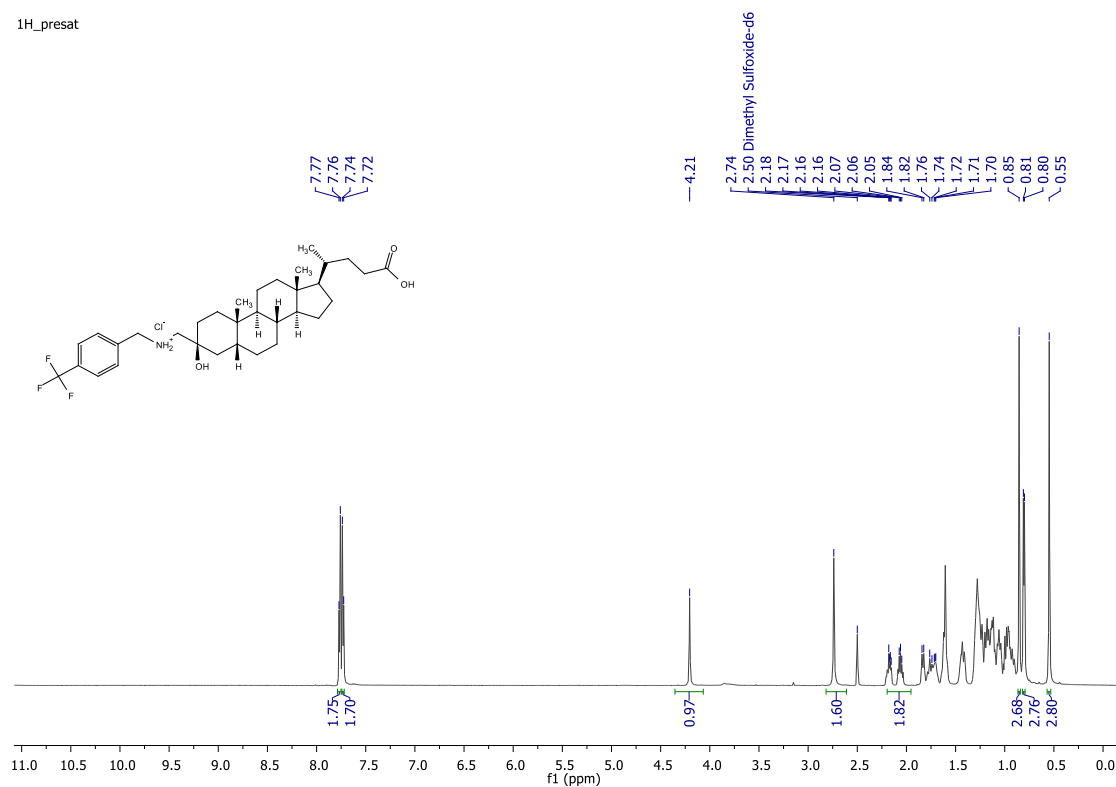
Chemical structure of the compound is shown above the spectrum. The compound is a complex molecule featuring a steroid-like core with a carboxylic acid group, a hydroxyl group, and a side chain containing a quaternary carbon atom bonded to two fluorine atoms and a phenyl ring.

The spectrum displays the ¹³C NMR peaks (f1, ppm) for the compound. The peaks are labeled with their corresponding chemical shifts (ppm):

- 176.82
- 150.35 Pyridine-d5
- 136.11
- 134.98
- 130.16
- 127.90
- 126.06
- 124.10
- 70.65
- 59.43
- 56.54
- 52.05
- 43.10
- 40.49
- 40.13
- 38.45
- 36.04
- 35.95
- 35.28
- 32.14
- 32.09
- 31.13
- 27.29
- 26.83
- 24.09
- 18.87
- 12.48

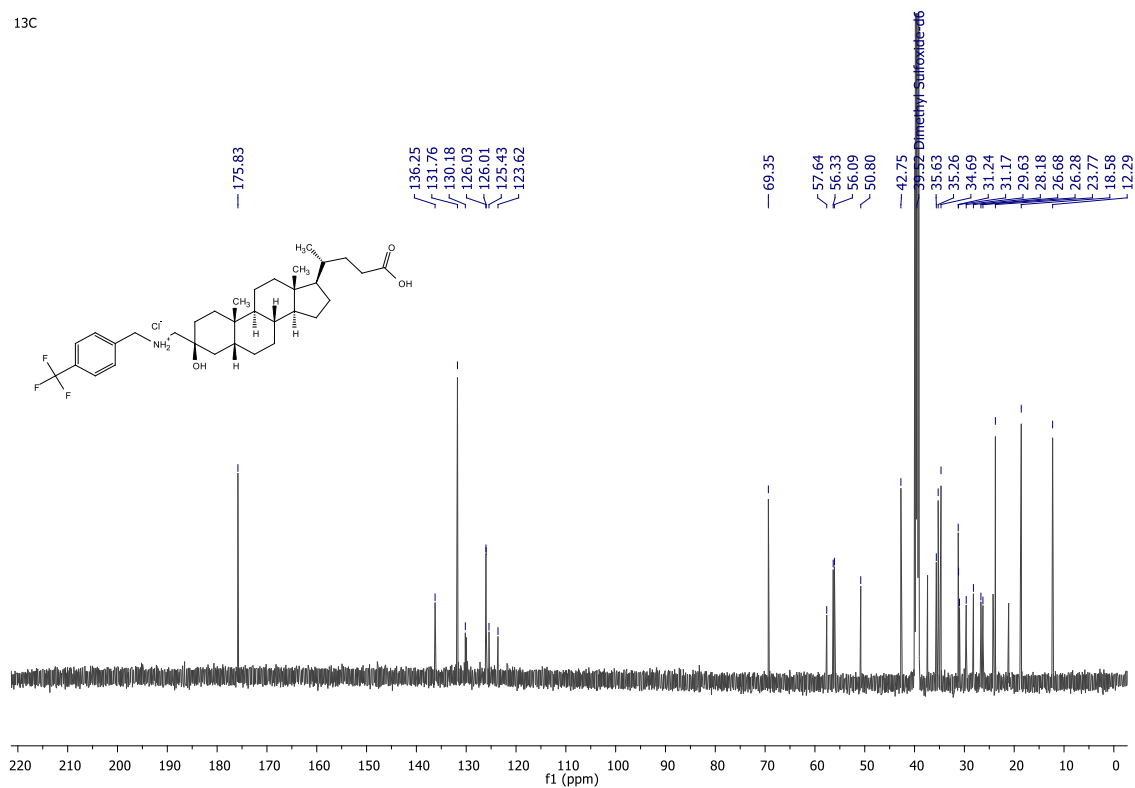
Espectro A34. RMN-¹³C (600 MHz) del compuesto **6m** en piridina-d₅.

1H_presat

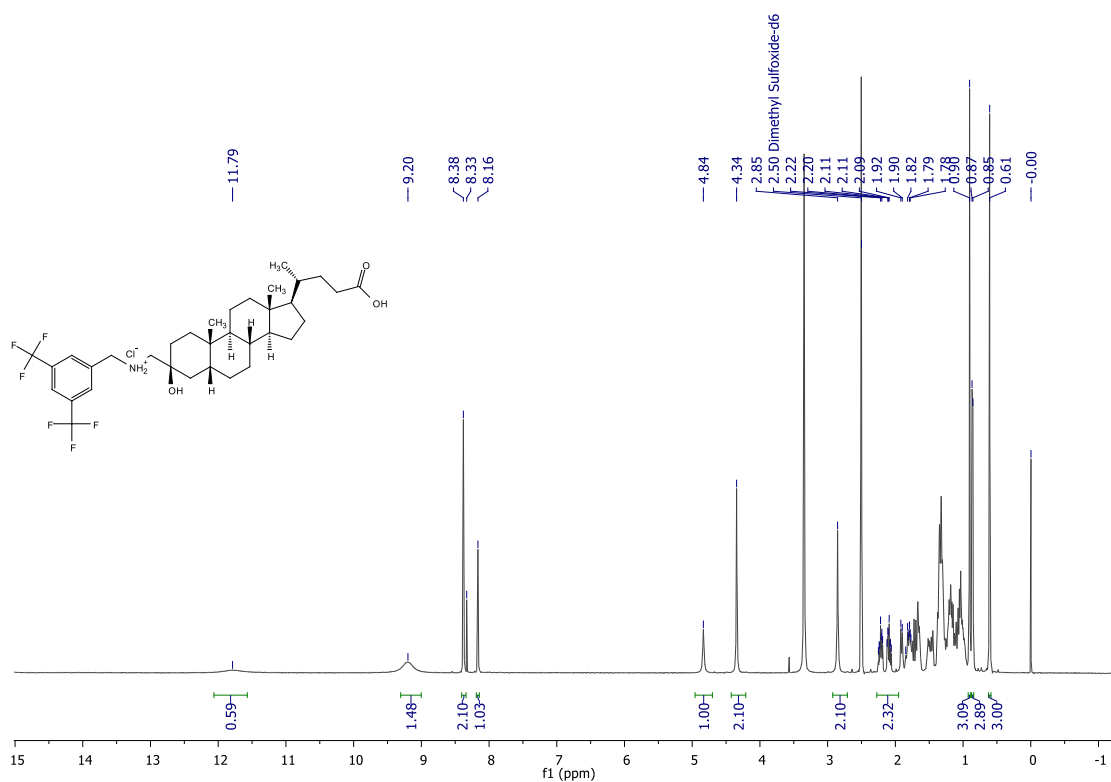


Espectro A35. RMN- ^1H (600 MHz) del compuesto **6n** en DMSO-d₆.

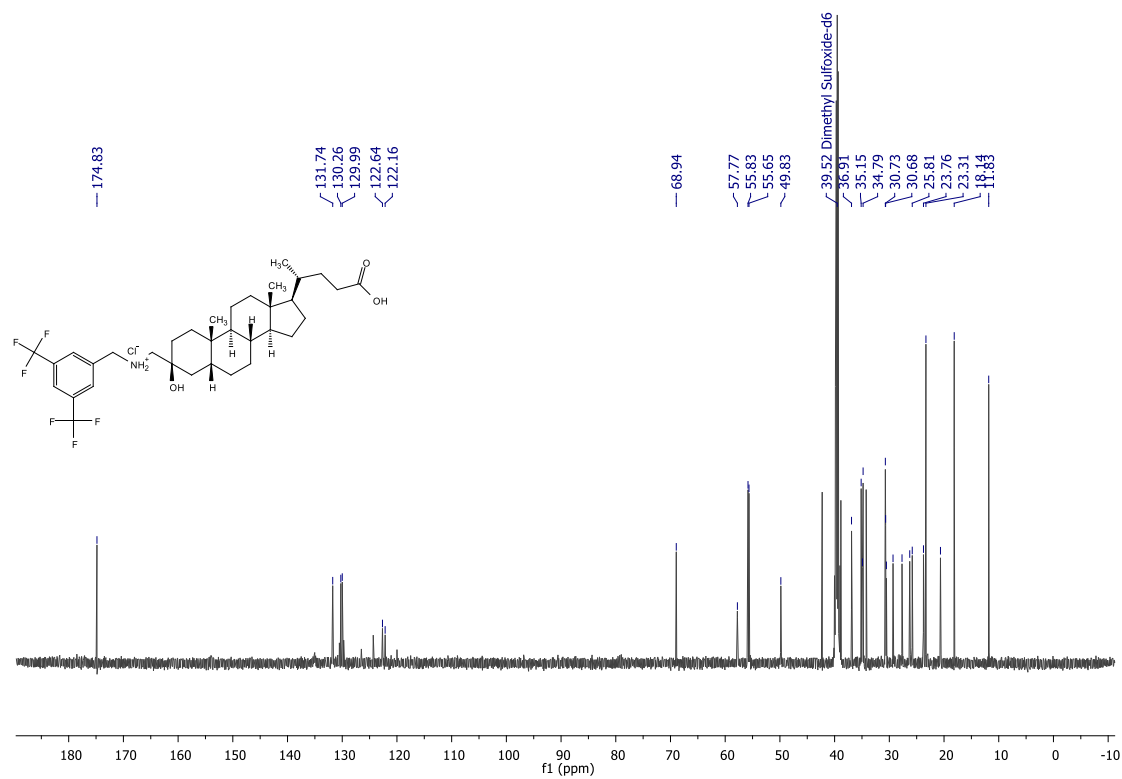
13C



Espectro A36. RMN- ^{13}C (600 MHz) del compuesto **6n** en DMSO-d₆.



Espectro A37. RMN- ¹H (600 MHz) del compuesto **6o** en DMSO-d₆.



Espectro A38. RMN- ¹³C (600 MHz) del compuesto **6o** en DMSO-d₆.

ANEXO II

INFORME DE LA FÓRMULA DEL ESPECTRO DE MASAS (EM) DE LOS DERIVADOS 3 α - BENCILAMINOMETILO DEL ÁCIDO LITOCÓLICO

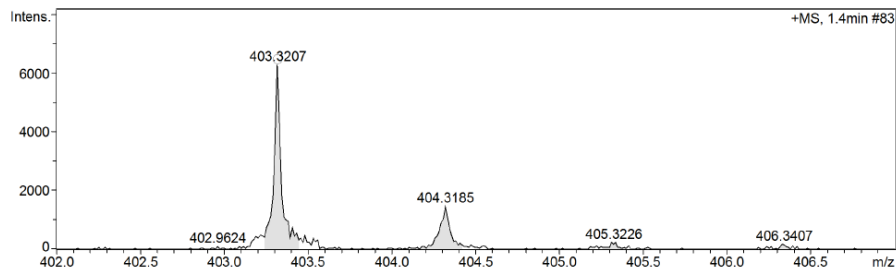
Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20230911_4.d Acquisition Date 9/11/2023 5:20:35 PM
 Method Tune Low extendido.m Operator Admin
 Sample Name 20230911_4 Instrument micrOTOF 213750.00410
 Comment

Acquisition Parameter

Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.5 Bar
 Focus Active Set Dry Heater 150 °C
 Scan Begin 50 m/z Set Capillary 4500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Divert Valve Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	Sum Formula	m/z	err [ppm]	err [mDa]	mSigma	# mSigma
403.3207	1	C26H43O3	C26H42O3	403.3207	-0.2	0.1	30.8	1
425.3025	1	C26H42NaO3		425.3026	0.3	0.1	28.4	1

Espectro A39. EM y reporte de fórmula del intermediario 4.

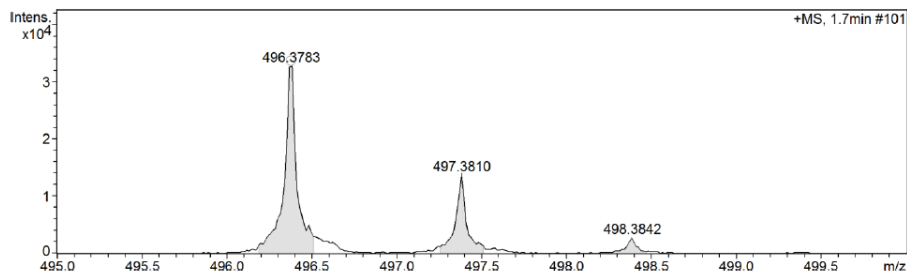
Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20231006_6a.d Acquisition Date 10/6/2023 5:04:00 PM
 Method Tune Low extendido.m Operator Admin
 Sample Name 20231006_6a Instrument micrOTOF 213750.00410
 Comment

Acquisition Parameter

Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.5 Bar
 Focus Active Set Dry Heater 150 °C
 Scan Begin 50 m/z Set Capillary 4500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Divert Valve Waste



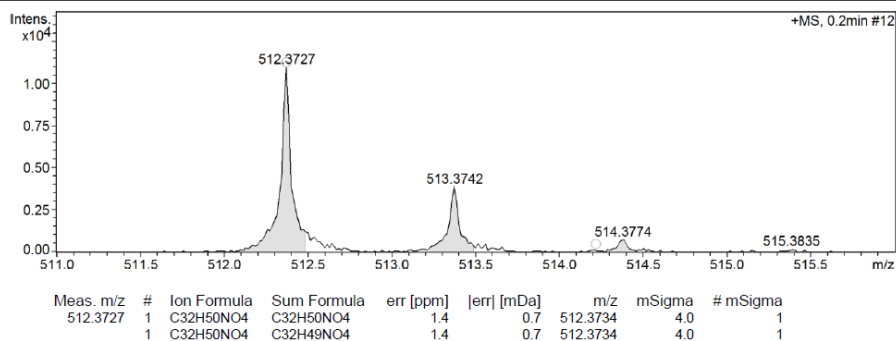
Meas. m/z	#	Ion Formula	Sum Formula	m/z	err [ppm]	err [mDa]	mSigma	# mSigma
496.3783	1	C32H50NO3	C32H50NO3	496.3785	0.5	0.3	32.5	1
	1	C32H50NO3	C32H49NO3	496.3785	0.5	0.3	32.5	1

Espectro A40. EM y reporte de fórmula del compuesto 6a.

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info			Acquisition Date	10/6/2023 4:36:35 PM	
Analysis Name	D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20231006_6b.d				
Method	Tune Low extendido.m			Operator	Admin
Sample Name	20231006_6b			Instrument	micrOTOF
Comment					213750.00410

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	150 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste

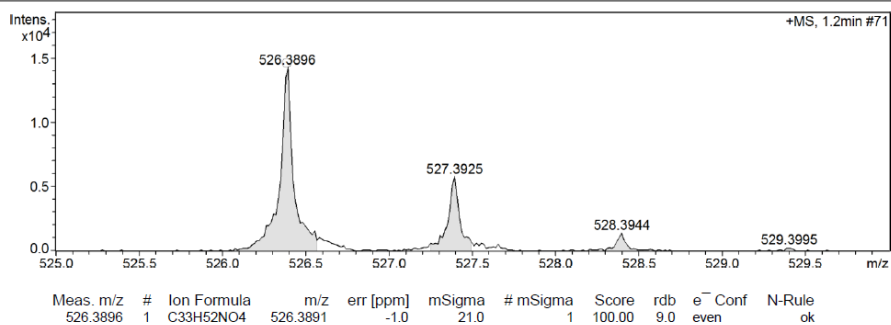


Espectro A41. EM y reporte de fórmula del compuesto 6b.

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info		Acquisition Date		10/5/2023 4:37:32 PM	
Analysis Name	D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20231005_6c.d			Operator	Admin
Method	Tune Low extendido.m			Instrument	micrOTOF
Sample Name	20231005_6c			213750.00410	
Comment					

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	150 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste

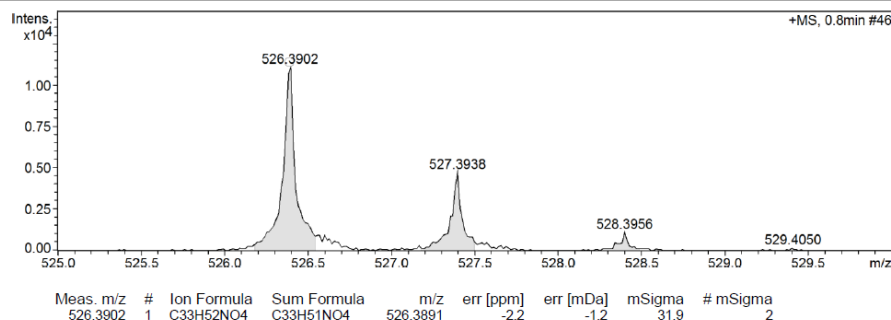


Espectro A42. EM y reporte de fórmula del compuesto 6c.

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info		Acquisition Date 10/5/2023 4:01:47 PM	
Analysis Name	D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20231005_6d.d	Operator	Admin
Method	Tune Low extendido.m	Instrument	micrOTOF
Sample Name	20231005_6d		213750.00410
Comment			

Acquisition Parameter			
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive
Focus	Active		
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V
		Set Nebulizer	0.5 Bar
		Set Dry Heater	150 °C
		Set Dry Gas	4.0 l/min
		Set Divert Valve	Waste

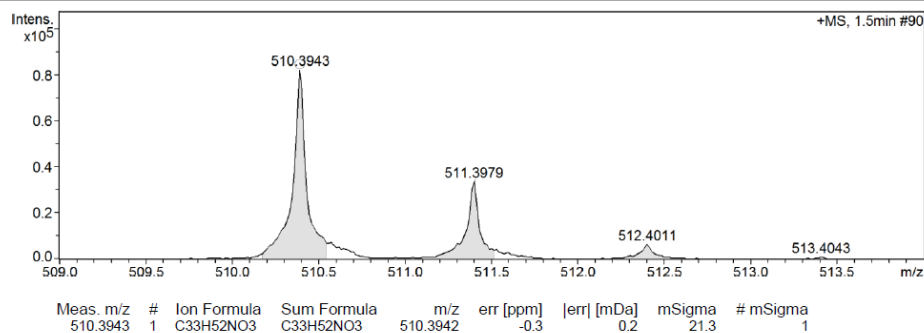


Espectro A43. EM y reporte de fórmula del compuesto 6d.

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info		Acquisition Date 3/22/2024 12:15:56 PM	
Analysis Name	D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20240322_6e.d	Operator	Admin
Method	Tune Low extendido.m	Instrument	micrOTOF
Sample Name	20240322_6e		213750.00410
Comment			

Acquisition Parameter			
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive
Focus	Active		
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V
		Set Nebulizer	0.5 Bar
		Set Dry Heater	150 °C
		Set Dry Gas	4.0 l/min
		Set Divert Valve	Waste

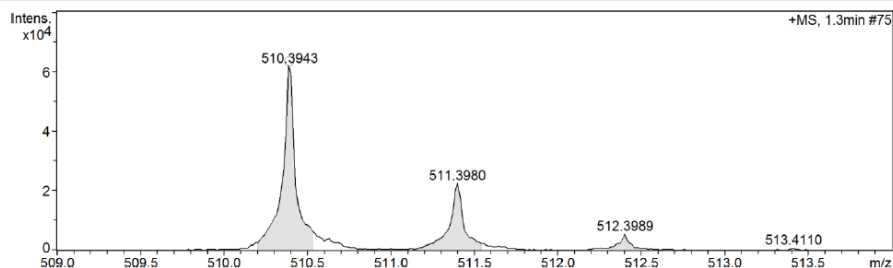


Espectro A44. EM y reporte de fórmula del intermediario 6e.

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info
 Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20240322_6f.d
 Method Tune Low extendido.m
 Sample Name 20240322_6f
 Comment
 Acquisition Date 3/22/2024 11:59:25 AM
 Operator Admin
 Instrument micrOTOF 213750.00410

Acquisition Parameter
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.5 Bar
 Focus Active Set Dry Heater 150 °C
 Scan Begin 50 m/z Set Capillary 4500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Divert Valve Waste



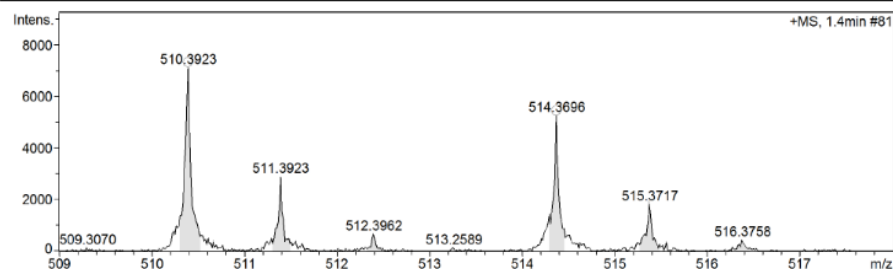
Meas. m/z	#	Ion Formula	Sum Formula	m/z	err [ppm]	[err] [mDa]	mSigma	# mSigma
510.3943	1	C33H52NO3	C33H52NO3	510.3942	-0.2	0.1	7.9	1

Espectro A45. EM y reporte de fórmula del compuesto 6f.

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info
 Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20240322_6g_d
 Method Tune Low extendido.m
 Sample Name 20240322_6g_
 Comment
 Acquisition Date 3/22/2024 1:16:12 PM
 Operator Admin
 Instrument micrOTOF 213750.00410

Acquisition Parameter
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.5 Bar
 Focus Active Set Dry Heater 150 °C
 Scan Begin 50 m/z Set Capillary 4500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Divert Valve Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	Sum Formula	m/z	err [ppm]	[err] [mDa]	mSigma	# mSigma
510.3923	1	C33H52NO3	C33H52NO3	510.3942	3.7	1.9	24.4	1
514.3696	1	C32H49FNO3	C32H49FNO3	514.3691	-1.0	0.5	9.6	1

Espectro A46. EM y reporte de fórmula del compuesto 6g.

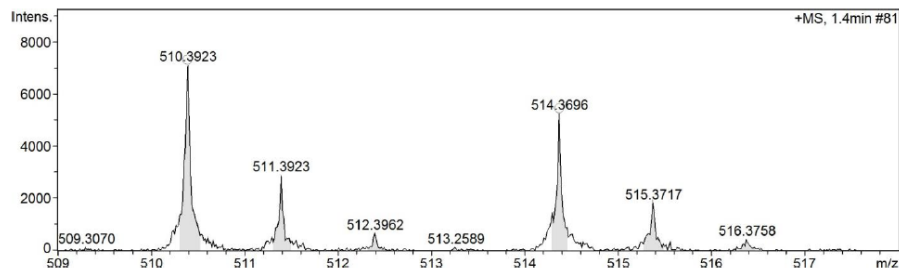
Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20240322_6h_d Acquisition Date 3/22/2024 1:16:12 PM
 Method Tune Low extendido.m Operator Admin
 Sample Name 20240322_6h_ Instrument micrOTOF 213750.00410
 Comment

Acquisition Parameter

Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.5 Bar
 Focus Active Set Dry Heater 150 °C
 Scan Begin 50 m/z Set Capillary 4500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Divert Valve Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	Sum Formula	m/z	err [ppm]	err [mDa]	mSigma	# mSigma
510.3923	1	C33H52NO3	C33H52NO3	510.3942	3.7	1.9	24.4	1
514.3696	1	C32H49FNO3	C32H49FNO3	514.3691	-1.0	0.5	9.6	1

Espectro A47. EM y reporte de fórmula del compuesto **6h**.

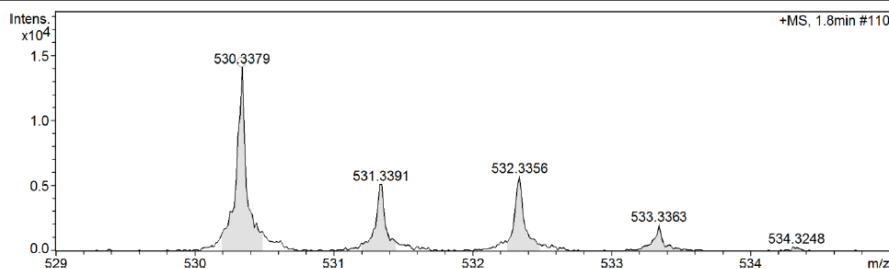
Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20231006_6i.d Acquisition Date 10/6/2023 5:22:02 PM
 Method Tune Low extendido.m Operator Admin
 Sample Name 20231006_6i Instrument micrOTOF 213750.00410
 Comment

Acquisition Parameter

Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.5 Bar
 Focus Active Set Dry Heater 150 °C
 Scan Begin 50 m/z Set Capillary 4500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Divert Valve Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	Sum Formula	m/z	err [ppm]	err [mDa]	mSigma	# mSigma
530.3379	1	C32H49ClNO3	C32H49ClNO3	530.3395	3.1	1.6	15.1	1
	1	C32H49ClNO3	C32H48ClNO3	530.3395	3.1	1.6	15.1	1

Espectro A48. EM y reporte de fórmula del compuesto **6i**.

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

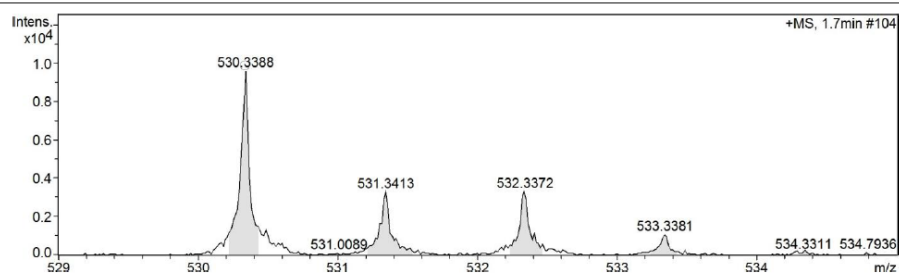
Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20231006_6j.d
 Method Tune Low extendido.m
 Sample Name 20231006_6j
 Comment

Acquisition Date 10/6/2023 4:49:34 PM

Operator Admin
 Instrument micrOTOF 213750.00410

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	150 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	Sum Formula	m/z	err [ppm]	err [mDa]	mSigma	# mSigma
530.3388	1	C32H49ClNO3	C32H49ClNO3	530.3395	1.4	0.7	22.7	2
	1	C32H49ClNO3	C32H48ClNO3	530.3395	1.4	0.7	22.7	2

Espectro A49. EM y reporte de fórmula del compuesto **6j**.

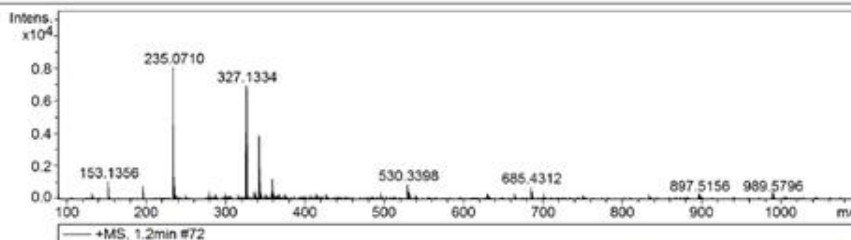
Mass Spectrum List Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20231006_6k.d Acquisition Date 10/6/2023 5:41:26 PM
 Method Tune Low extendido.m Operator Admin
 Sample Name 20231006_6k Instrument micrOTOF 213750.00410
 Comment

Acquisition Parameter

Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.5 Bar
 Focus Active Set Dry Heater 150 °C
 Scan Begin 50 m/z Set Capillary 4500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Divert Valve Waste



#	m/z	Res.	S/N	I	I %	FWHM	#	m/z	Res.	S/N	I	I %	FWHM
1	91.0507	7043	12.1	476	5.9	0.0129	37	532.3318	7368	11.7	427	5.3	0.0722
2	131.9578	3306	7.1	278	3.4	0.0399	38	533.3321	16908	5.4	198	2.5	0.0315
3	133.9524	4914	4.9	191	2.4	0.0273	39	540.3516	21424	5.3	192	2.4	0.0252
4	153.1356	7219	28.6	1102	13.6	0.0212	40	631.2752	6422	6.0	211	2.6	0.0983
5	197.0945	10180	20.6	804	10.0	0.0194	41	632.2792	27597	5.2	182	2.3	0.0229
6	235.0710	7569	206.3	8074	100.0	0.0311	42	664.4595	10810	10.9	378	4.7	0.0615
7	236.0748	8424	34.7	1356	16.8	0.0280	43	685.4312	9208	22.3	771	9.5	0.0744
8	237.0813	10757	8.8	344	4.3	0.0220	44	686.4372	22991	14.8	511	6.3	0.0299
9	239.1679	16200	4.9	192	2.4	0.0148	45	701.4134	8494	9.0	311	3.9	0.0826
10	251.0424	13543	4.0	158	2.0	0.0185	46	834.4913	11753	5.4	178	2.2	0.0710
11	281.1723	19331	6.9	272	3.4	0.0145	47	897.5156	4223	8.9	293	3.6	0.2125
12	288.2764	18905	5.2	204	2.5	0.0152	48	898.5159	11612	7.8	255	3.2	0.0774
13	301.1360	6890	6.5	256	3.2	0.0437	49	989.5796	7715	9.2	296	3.7	0.1283
14	316.0468	26758	4.2	166	2.1	0.0118	50	990.5745	9193	6.9	220	2.7	0.1077
15	327.1334	9043	177.2	6930	85.8	0.0362							
16	328.1336	8369	39.5	1545	19.1	0.0392							
17	329.1396	7591	6.4	250	3.1	0.0434							
18	337.0980	7147	6.3	246	3.0	0.0472							
19	338.3363	7862	6.8	264	3.3	0.0430							
20	343.1082	9892	101.2	3946	48.9	0.0354							
21	344.1101	10964	27.2	1060	13.1	0.0314							
22	345.1077	5380	8.3	323	4.0	0.0641							
23	351.1166	13139	8.1	315	3.9	0.0267							
24	358.9743	5444	6.1	236	2.9	0.0659							
25	360.3224	9645	32.2	1257	15.6	0.0374							
26	360.9767	10308	4.7	184	2.3	0.0350							
27	361.3268	9209	9.9	384	4.8	0.0392							
28	368.4198	10168	8.9	348	4.3	0.0362							
29	376.2975	6330	4.9	189	2.3	0.0595							
30	408.3034	17618	4.7	180	2.2	0.0232							
31	415.0408	8107	5.7	216	2.7	0.0512							
32	417.0311	20517	5.3	203	2.5	0.0203							
33	427.1495	7950	9.2	350	4.3	0.0537							
34	496.3587	5363	7.2	268	3.3	0.0925							
35	530.3398	9134	25.6	934	11.6	0.0581							
36	531.3400	23694	14.3	520	6.4	0.0224							

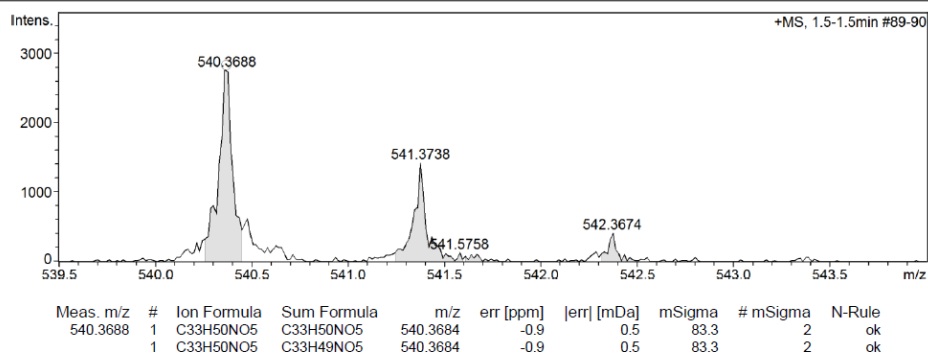
Espectro A50. EM y reporte de fórmula del compuesto 6k.

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info		Acquisition Date	10/6/2023 3:48:46 PM	
Analysis Name	D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20231006_6l.d		Operator	Admin
Method	Tune Low extendido.m		Instrument	micrOTOF
Sample Name	20231006_6l			213750.00410
Comment				

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	150 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



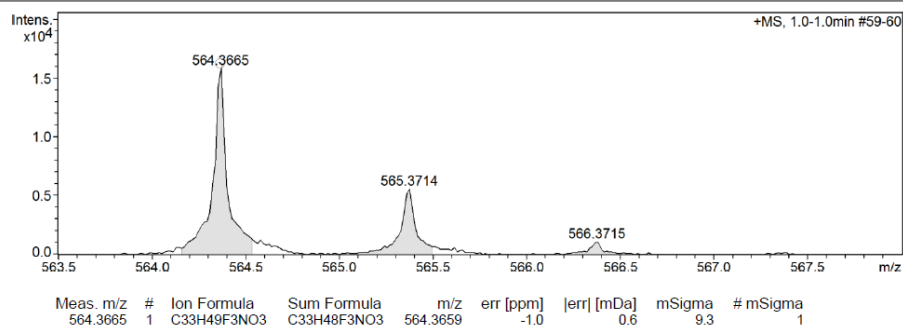
Espectro A51. EM y reporte de fórmula del compuesto 6l.

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info		Acquisition Date	10/5/2023 4:54:13 PM	
Analysis Name	D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20231005_6m.d		Operator	Admin
Method	Tune Low extendido.m		Instrument	micrOTOF
Sample Name	20231005_6m			213750.00410
Comment				

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	150 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Espectro A52. EM y reporte de fórmula del compuesto 6m.

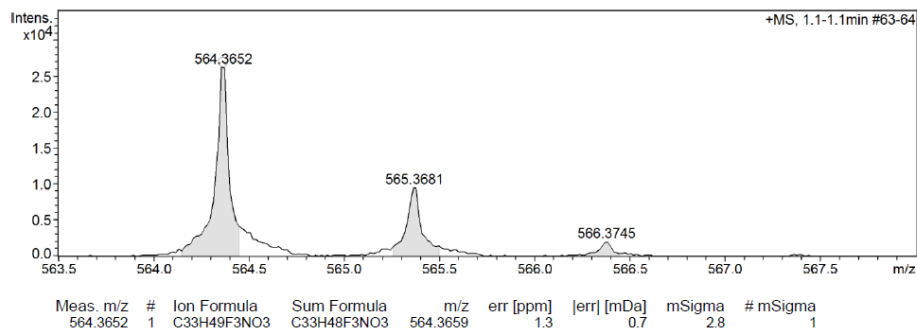
Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20231005_6n.d Acquisition Date 10/5/2023 4:19:44 PM
 Method Tune Low extendido.m Operator Admin
 Sample Name 20231005_6n Instrument micrOTOF 213750.00410
 Comment

Acquisition Parameter

Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.5 Bar
 Focus Active Set Dry Heater 150 °C
 Scan Begin 50 m/z Set Capillary 4500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Divert Valve Waste



Espectro A53. EM y reporte de fórmula del compuesto **6n**.

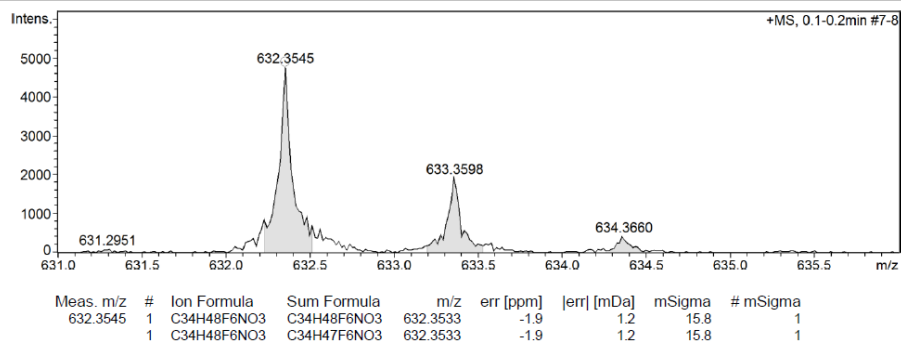
Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Monica Rincon\Francisco Cortes Benitez\20231006_6o.d Acquisition Date 10/6/2023 2:58:53 PM
 Method Tune Low extendido.m Operator Admin
 Sample Name 20231006_6o Instrument micrOTOF 213750.00410
 Comment

Acquisition Parameter

Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.5 Bar
 Focus Active Set Dry Heater 150 °C
 Scan Begin 50 m/z Set Capillary 4500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Divert Valve Waste



Espectro A54. EM y reporte de fórmula del compuesto **6o**.

ANEXO III

GRÁFICOS DE SELECTIVIDAD DE LOS DERIVADOS 3 α -BENCILAMINOMETILO (6m– 6o) Y CONTROLES

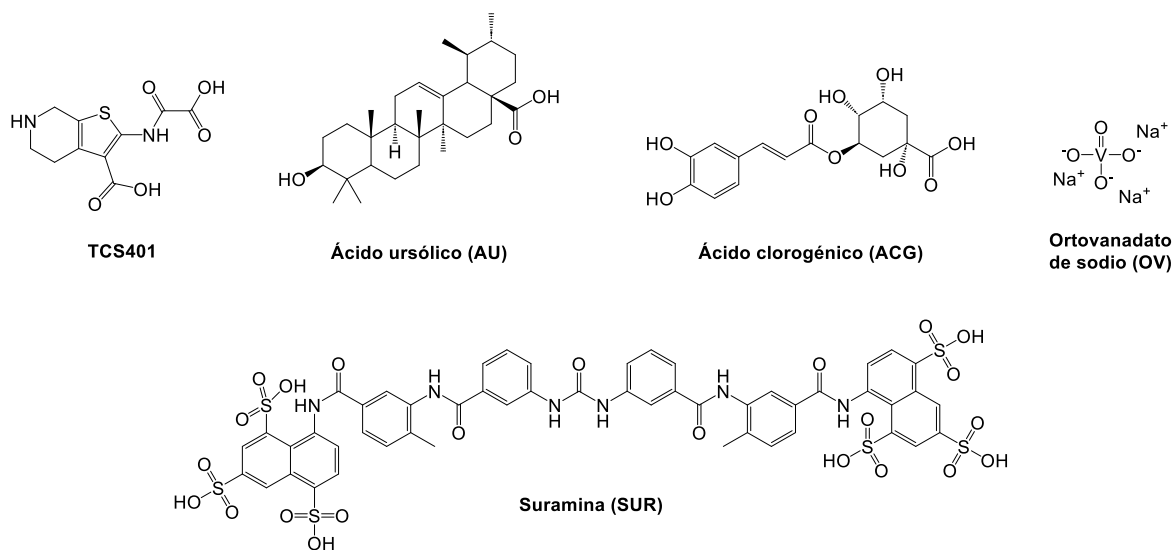


Figura A1. Estructuras de los controles empleados en los ensayos enzimáticos.

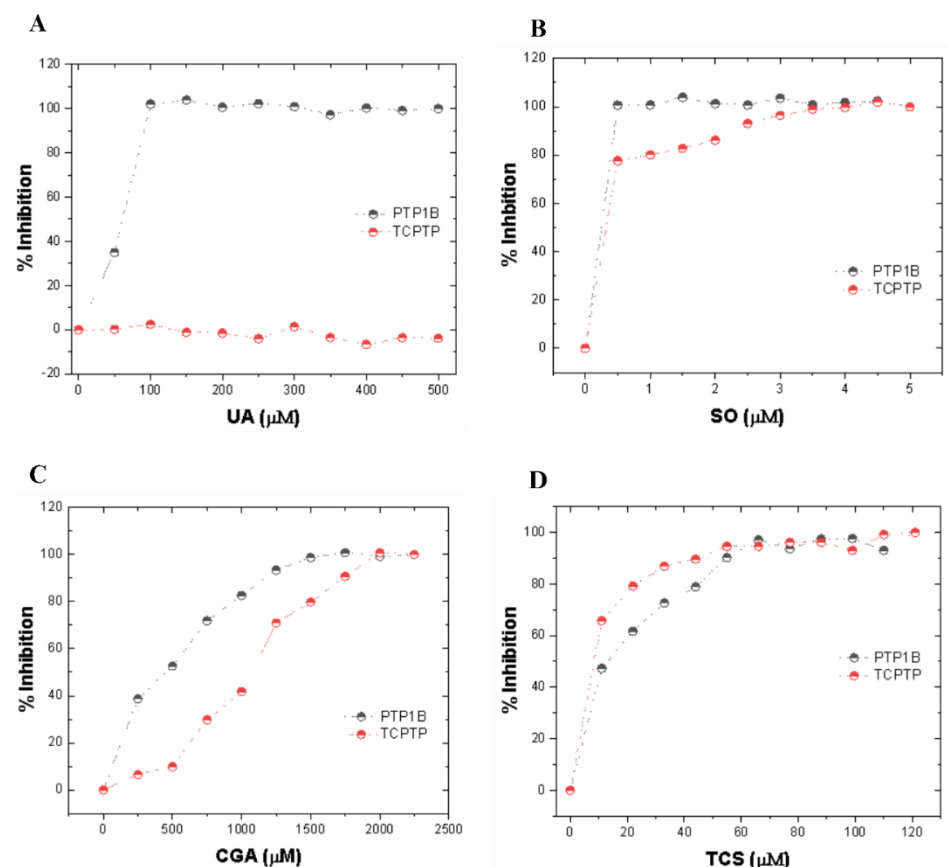


Gráfico A1. Selectividad en la inhibición de PTP1B y TCPTP para **A)** ácido ursólico; **B)** ortovanadato de sodio; **C)** ácido clorogénico; y **D)** TCS401.

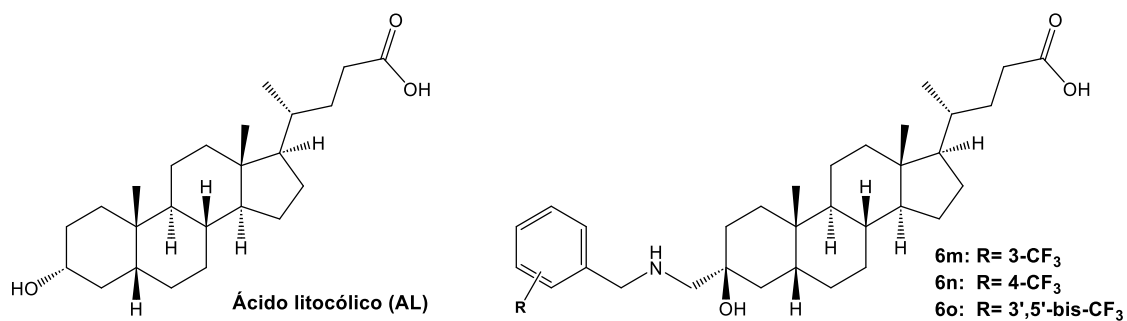


Figura A2. Estructuras de los derivados evaluados en ensayos enzimáticos de selectividad.

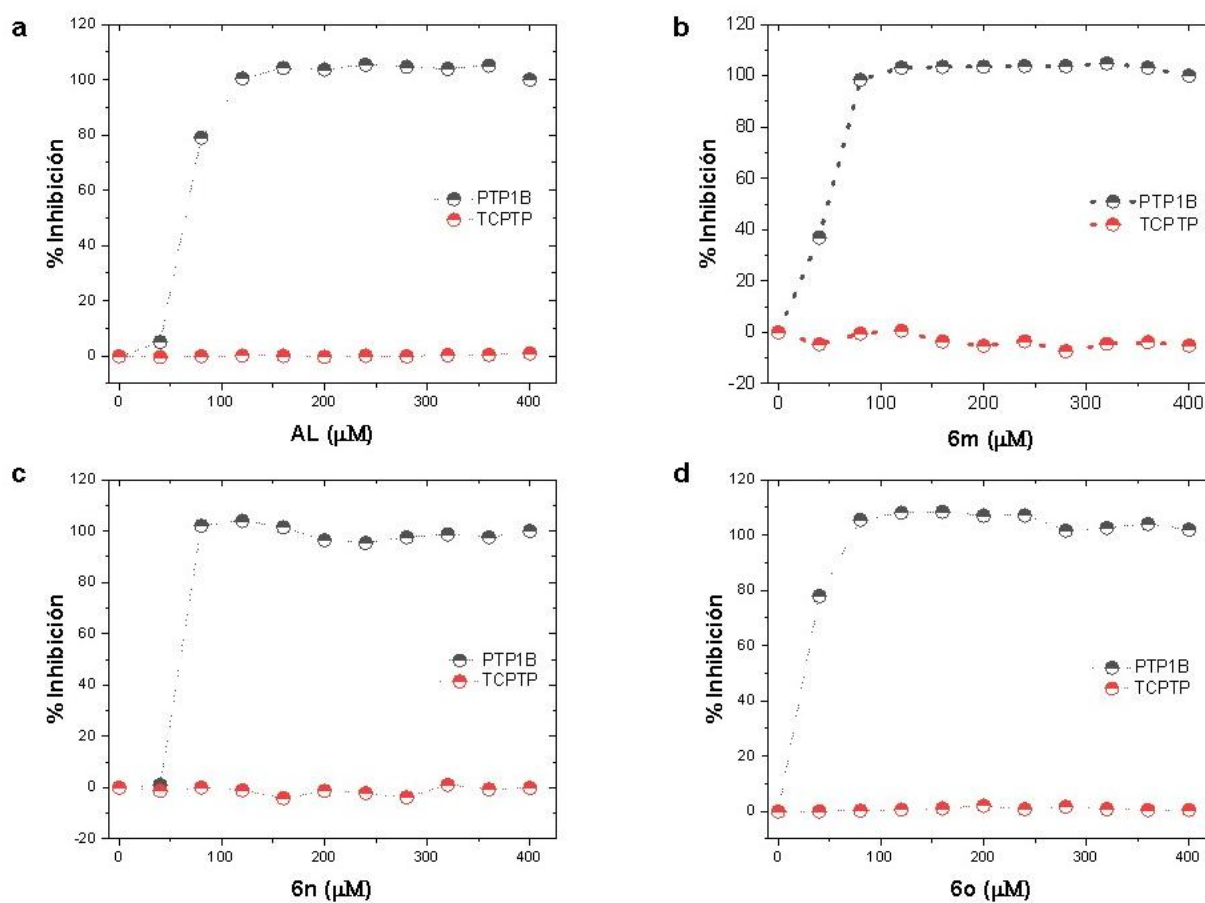


Gráfico A2. Selectividad en la inhibición de PTP1B y TCPTP para derivados del AL a 400 μM.

ANEXO IV

ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS DERIVADOS DEL ÁCIDO LITOCÓLICO EN LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS

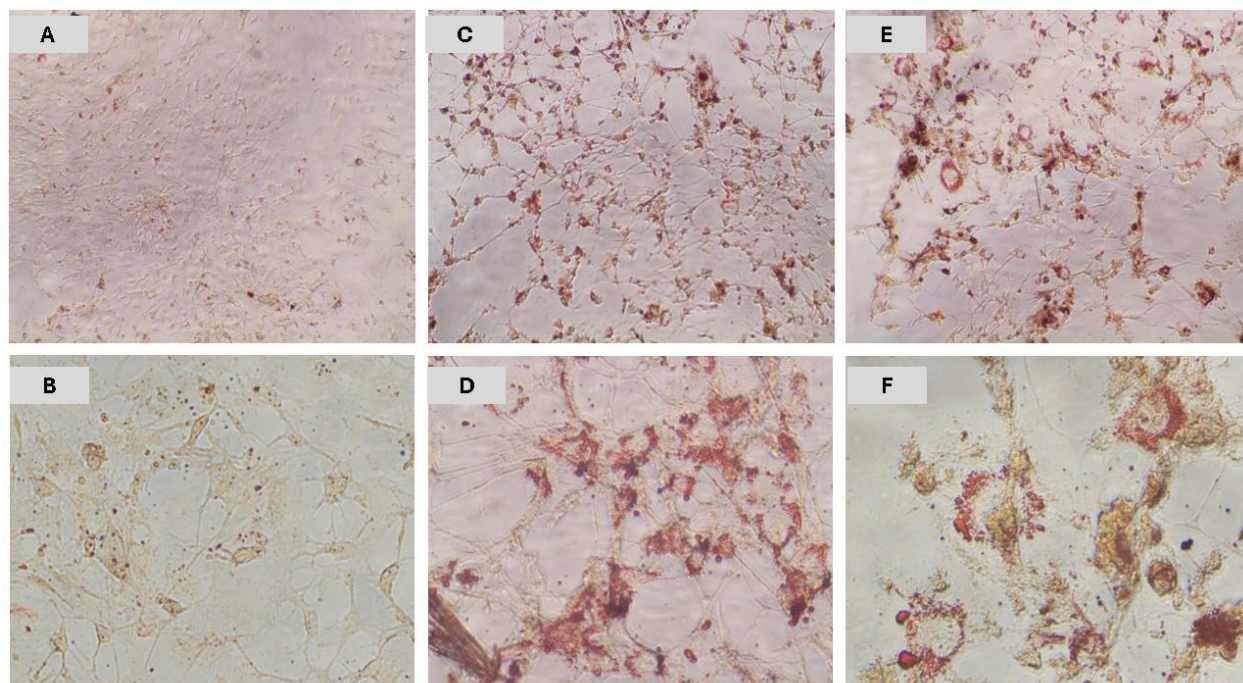


Figura A3. Efecto inhibitorio en la síntesis de lípidos de los nuevos derivados del AL en el D9 de inducción. **A, B)** pre-adipocitos sin inducción de la diferenciación (campo 4X, 10X, respectivamente); **C, D)** control celular de adipocito (campo 4X, 10x, respectivamente); **E, F)** pre-adipocito en presencia de AL a 100 μ M. Las células se mantuvieron con medio de inducción de la diferenciación durante 9 días.

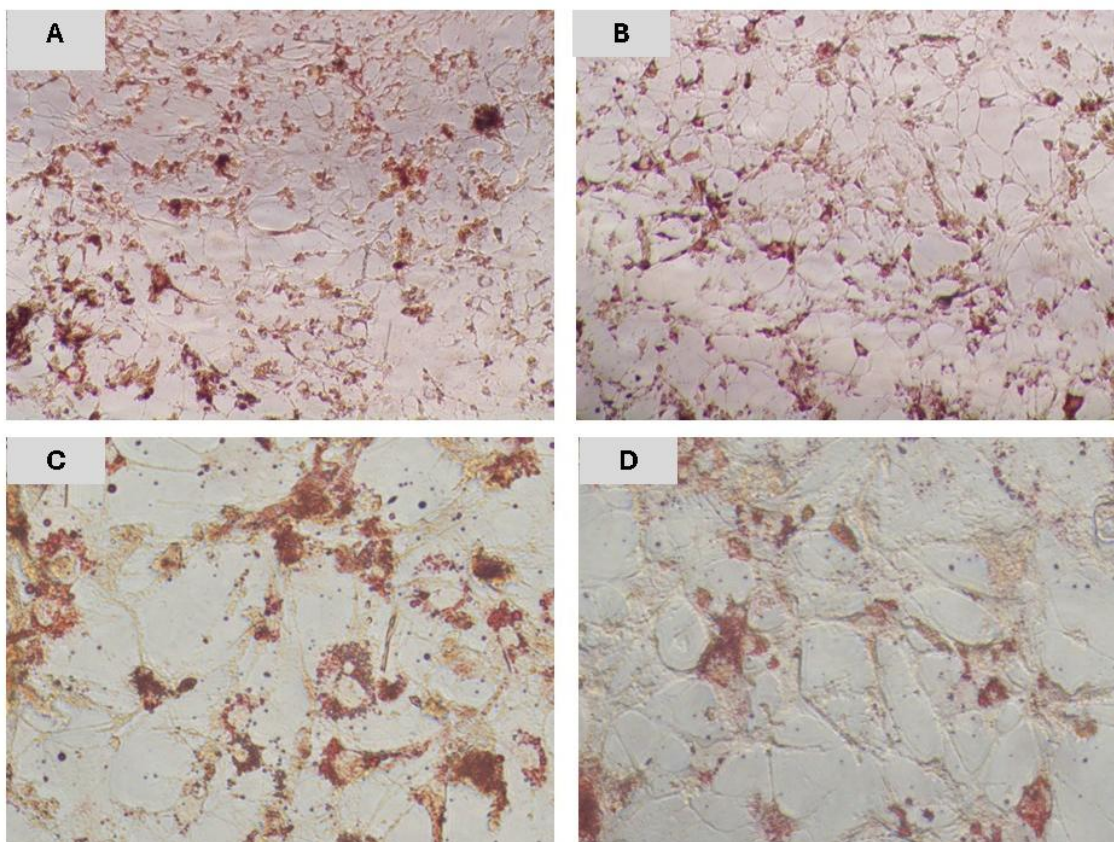


Figura A4. Efecto inhibitorio en la síntesis de lípidos de los nuevos derivados del AL en el D9 de inducción. **A, C)** pre-adipocitos en presencia de 6c a 3.125 μM (campo 4X, 10X, respectivamente); **B, D)** pre-adipocitos en presencia de 6c a 25 μM (campo 4X, 10X, respectivamente). Las células se mantuvieron con medio de inducción de la diferenciación durante 9 días.

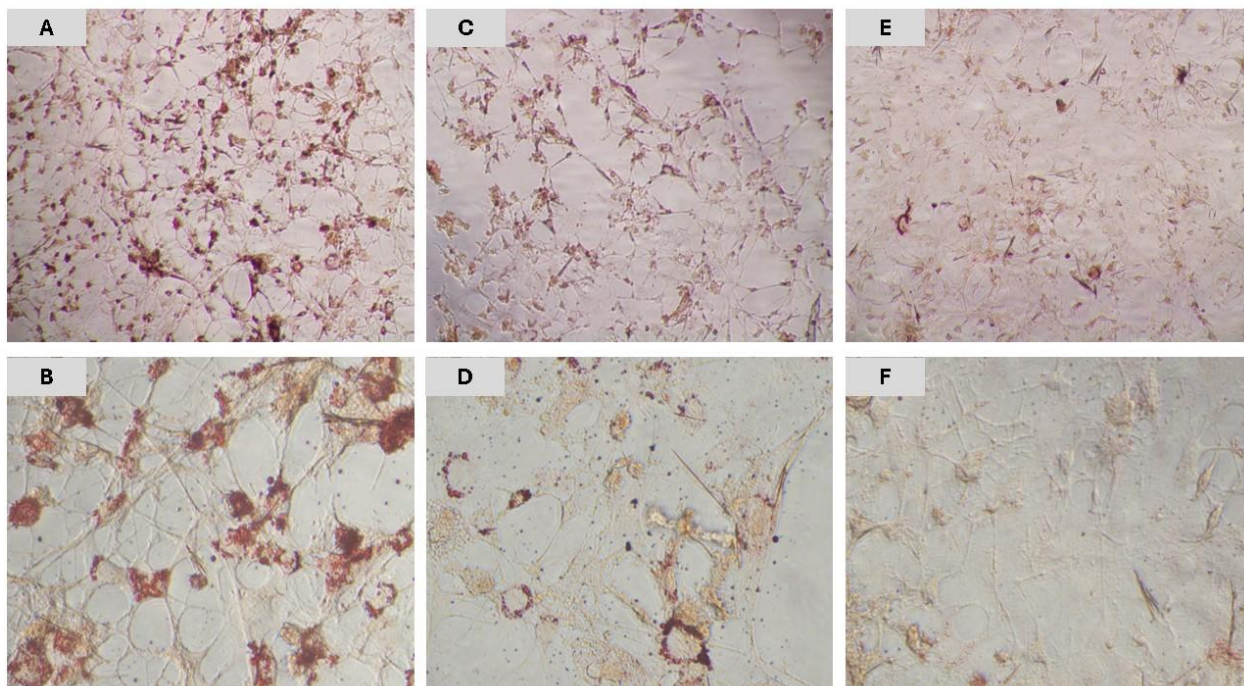


Figura A5. Efecto inhibitorio en la síntesis de lípidos de los nuevos derivados del AL en el D9 de inducción. **A, B)** pre-adipocitos en presencia de 6I a 6.25 μ M (campo 4X, 10X, respectivamente); **C, D)** pre-adipocitos en presencia de 6I a 25 μ M (campo 4X, 10X, respectivamente); **E, F)** pre-adipocitos en presencia de 6I a 100 μ M (campo 4X, 10X, respectivamente). Las células se mantuvieron con medio de inducción de la diferenciación durante 9 días.

ANEXO V

GRÁFICOS DE TRAYECTORIA DE LAS SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR DE LOS DERIVADOS 3 α - BENCILAMINOMETILO DEL ÁCIDO LITOCÓLICO

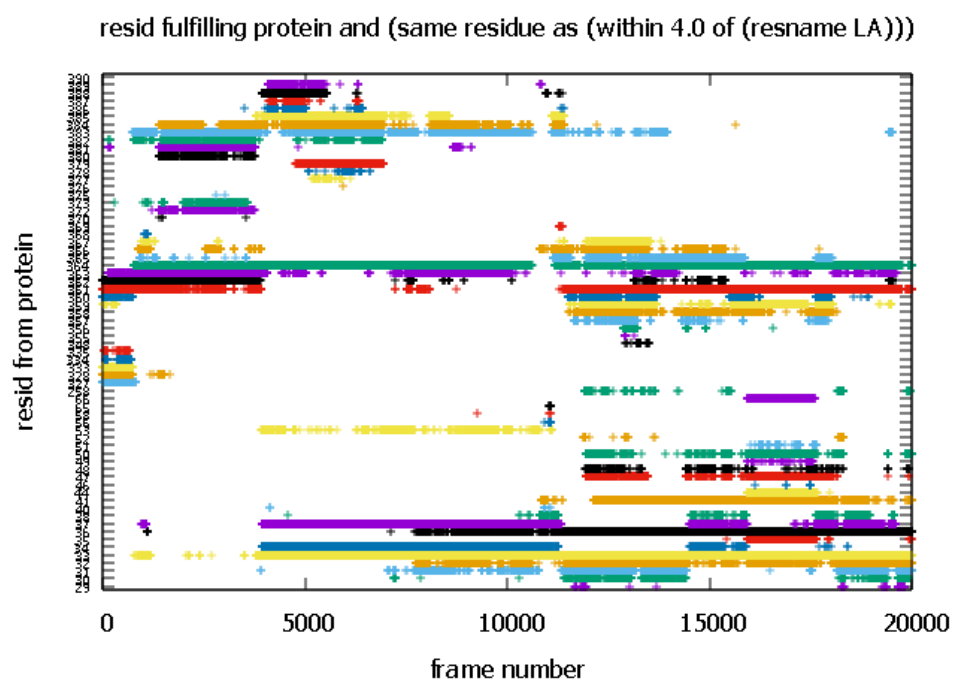
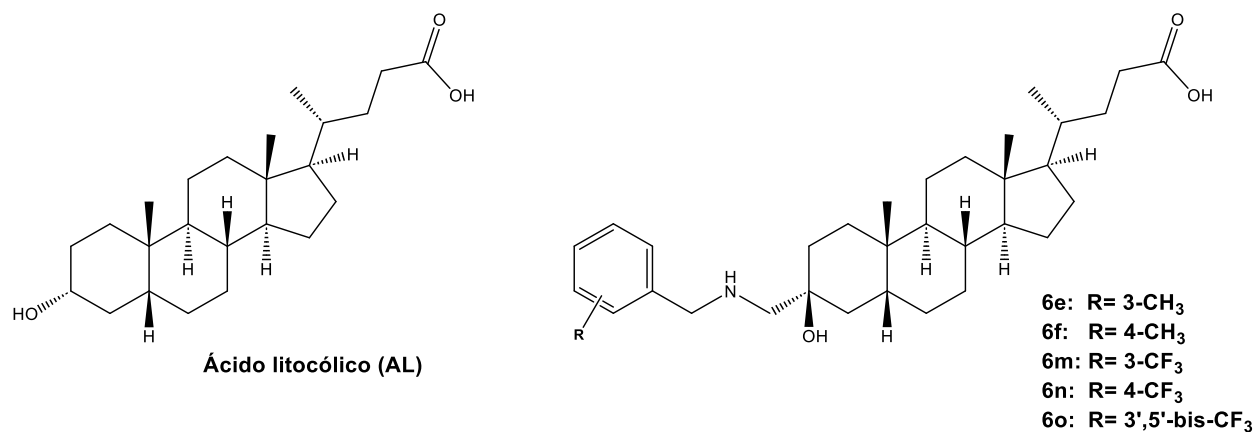


Figura A6. Matriz de contacto generada a partir de la MDS del ácido litocólico (AL). Las líneas continuas representan la prevalencia del complejo PTP1B-pNPP-AL con los residuos de aminoácidos durante el tiempo (200 ns) de la simulación de dinámica molecular.

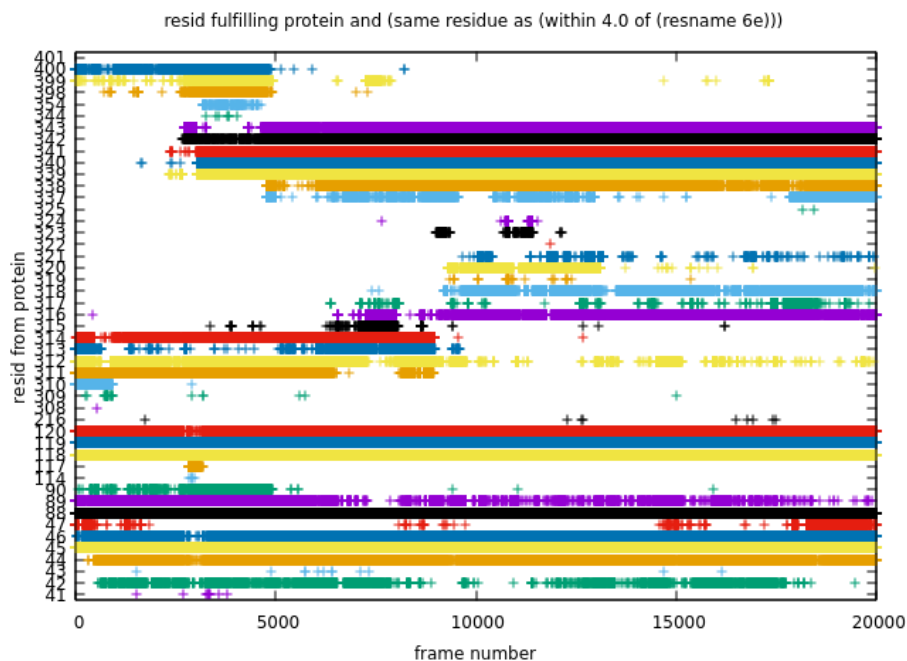


Figura A7. Matriz de contacto generada a partir de la MDS del derivado 6e. Las líneas continuas representan la prevalencia del complejo PTP1B–pNPP–6e con los residuos de aminoácidos durante el tiempo (200 ns) de la simulación de dinámica molecular.

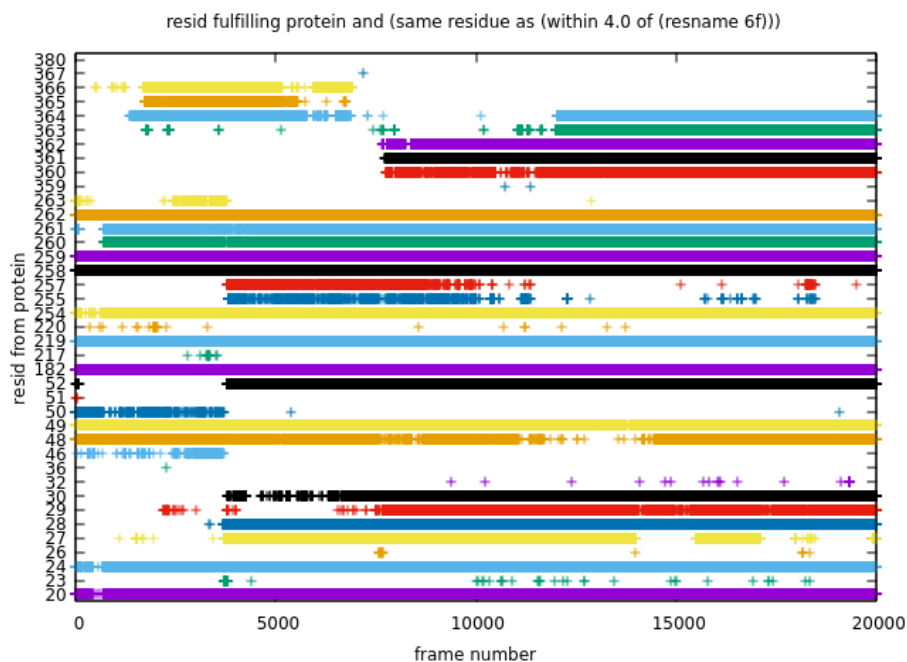


Figura A8. Matriz de contacto generada a partir de la MDS del derivado 6f. Las líneas continuas representan la prevalencia del complejo PTP1B–pNPP–6f con los residuos de aminoácidos durante el tiempo (200 ns) de la simulación de dinámica molecular.

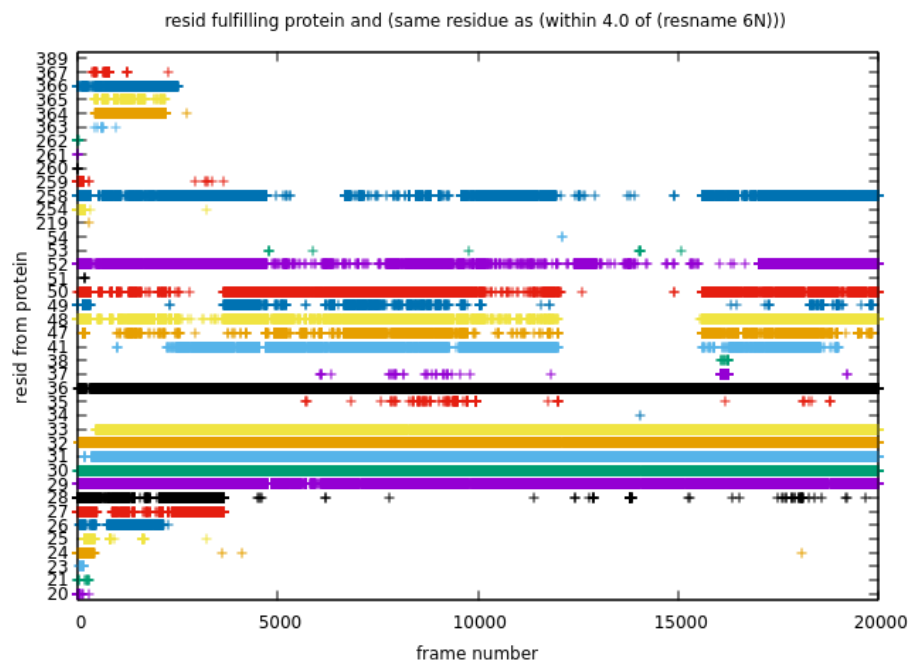


Figura A9. Matriz de contacto generada a partir de la MDS del derivado 6n. Las líneas continuas representan la prevalencia del complejo PTP1B–pNPP–6n con los residuos de aminoácidos durante el tiempo (200 ns) de la simulación de dinámica molecular.

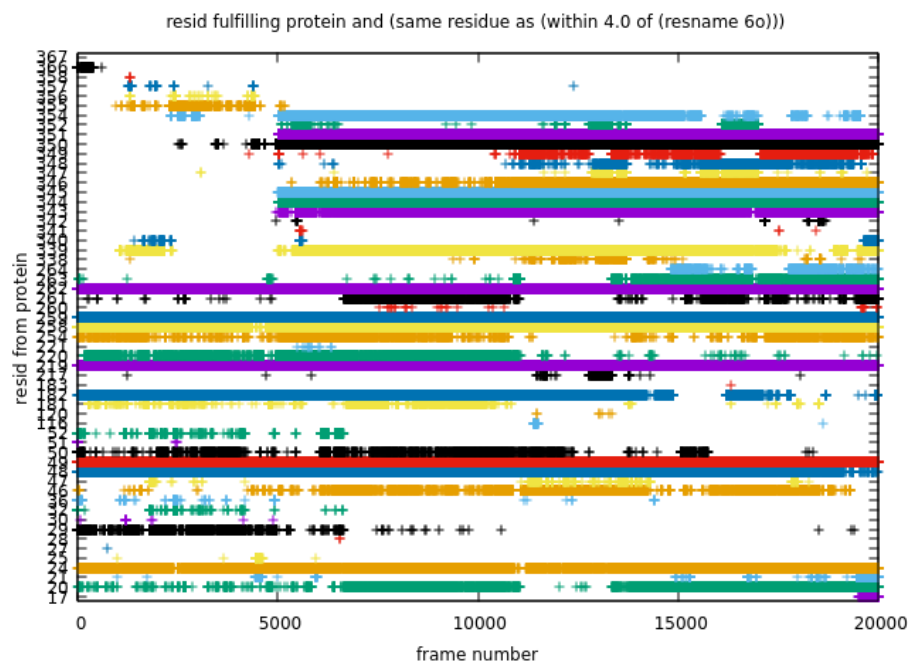


Figura A10. Matriz de contacto generada a partir de la MDS del derivado 6o. Las líneas continuas representan la prevalencia del complejo PTP1B–pNPP–6o con los residuos de aminoácidos durante el tiempo (200 ns) de la simulación de dinámica molecular.

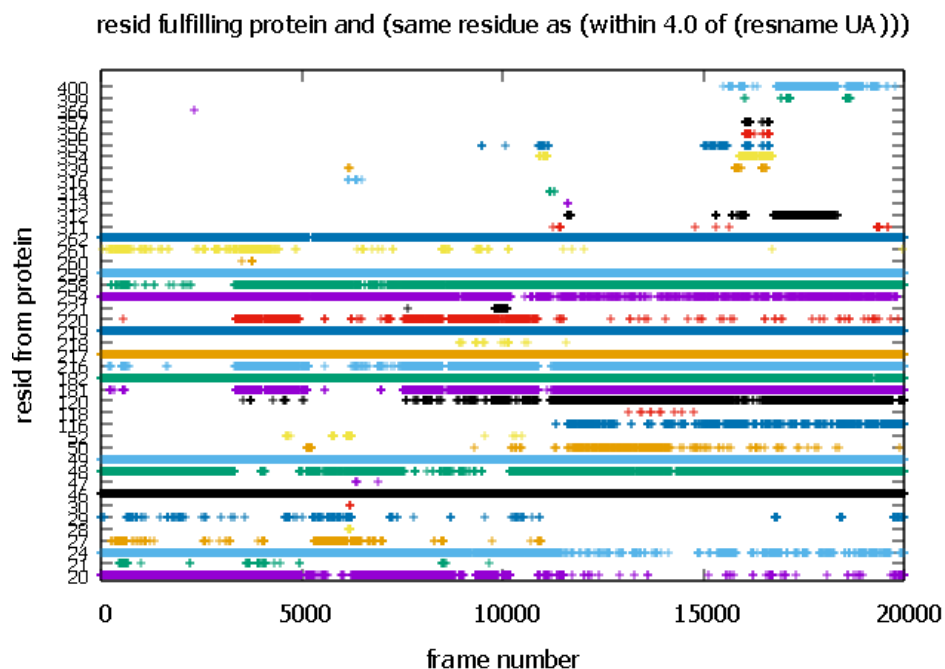


Figura A11. Matriz de contacto generada a partir de la MDS del ácido ursólico (UA). Las líneas continuas representan la prevalencia del complejo PTP1B–UA con los residuos de aminoácidos durante el tiempo (200 ns) de la simulación de dinámica molecular.

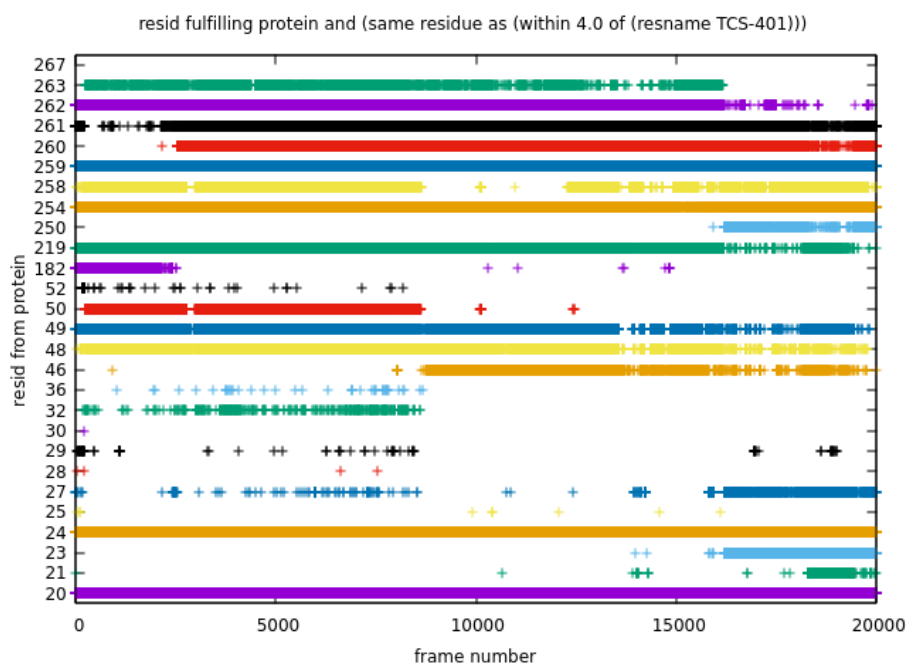


Figura A12. Matriz de contacto generada a partir de la MDS de TCS401. Las líneas continuas representan la prevalencia del complejo PTP1B–TCS401 con los residuos de aminoácidos durante el tiempo (200 ns) de la simulación de dinámica molecular.

ANEXO VI

PARTICIPACIÓN EN EVENTOS DE DIFUSIÓN Y DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Evento: **XVII Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica (AMQO)** celebrada los días 25 y 26 de agosto de 2022. Puebla, Puebla.

Modalidad de presentación: **cartel**

Título del trabajo: **“Síntesis de nuevos derivados de ácido litocólico como agentes antidiabéticos y antiobesidad”**



Evento: **XIX Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica (AMQO)**, celebrada los días 29 y 30 de agosto de 2024. Tepic, Nayarit.

Modalidad de presentación: **cartel**

Título del trabajo: **“Síntesis y evaluación inhibitoria de PTP1B de nuevos derivados del ácido litocólico con grupos bencilamino en C3”**



La Academia Mexicana de Química Orgánica a través de la Universidad Autónoma de Nayarit otorgan la presente

CONSTANCIA

a: **MARÍA EUGENIA MENDOZA JASSO; MARTÍN GONZÁLEZ ANDRADE; JAIME PÉREZ VILLANUEVA; JOSÉ G. ALVARADO-RODRÍGUEZ; FRANCISCO CORTÉS BENÍTEZ.**

Por la presentación del cartel **Te-103**
"Síntesis y evaluación inhibitoria de PTP1B de nuevos derivados del ácido litocólico con grupos bencilamino en C3".

En el marco de la XIX Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica celebrada los días 29 y 30 de agosto de 2024 en la ciudad de Tepic, Nayarit.


Dr. Ivan Omar Romero Estudillo
Presidente de la AMQO


Dra. Gabriela María Ávila Villarreal
Comité Organizador local

Evento: **Ciclo de seminarios de investigación de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP)- Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, celebrado el día 16 de diciembre de 2024. CDMX, México.**

Modalidad de presentación: **oral**

Título del trabajo: **“Derivados del ácido litocólico como inhibidores selectivos de la PTP1B, blanco terapéutico en el tratamiento de la Diabetes Mellitus”**

 **GOBIERNO DE MÉXICO**  **IMSS**

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
Unidad de Educación e Investigación
Unidad de Educación e Investigación
Coordinación de Investigación en Salud
División de Desarrollo de la Investigación en Salud
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias

Ciudad de México, a 16 de diciembre de 2024.

CONSTANCIA

A la M. en C. María Eugenia Mendoza Jasso

La Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) del Hospital de Pediatría-Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, agradece su participación en el ciclo de seminarios de investigación de esta Unidad que se realizó en el auditorio del Hospital de Pediatría, con el siguiente tema:

“Derivados del ácido litocólico como inhibidores selectivos de la PTP1B, blanco terapéutico en el tratamiento de la Diabetes Mellitus”

La UIMEIP le hace un reconocimiento por compartir su experiencia y conocimientos, expresa su deseo de seguir contando con su valiosa participación.


Dr. Francisco Javier Torres López
Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias


Dra. Guadalupe Gordillo Pérez
Coordinadora de Seminario Investigadora UIMEIP

Av. Cuauhtémoc No. 330, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Edif. Pilo Hospital de Pediatría, Cal. Doctora. Amalia Cuastromero, C.P. 06720, CDMX, Tel. Dr. 56 Camébrides 56-27 69-60 ext. 77940, www.imss.gob.mx

 **2024 Felipe Carrillo PUERTO**

Evento: **25th Tetrahedron Symposium** celebrado los días 1–4 de julio. Brugge, Bélgica.

Modalidad de presentación: **cartel**

Título del trabajo: **“Development of new Lithocholic Acid derivatives as selective and uncompetitive Protein Tyrosine Phosphatase 1B inhibitors.”**



Publicación generada:

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*. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c04948>



Open Access

This article is licensed under [CC-BY 4.0](#)

<http://pubs.acs.org/journal/acsofd>

Article

3-Benzylaminomethyl Lithocholic Acid Derivatives Exhibited Potent and Selective Uncompetitive Inhibitory Activity Against Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B)

María-Eugenia Mendoza-Jasso, Jaime Pérez-Villanueva, José G. Alvarado-Rodríguez, Martin González-Andrade,* and Francisco Cortés-Benítez*



Cite This: *ACS Omega* 2024, 9, 33224–33238



Read Online

ACCESS |

Metrics & more

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is a promising drug target for treating type 2 diabetes (T2DM) and obesity. As a result, developing new therapies that target PTP1B is an attractive strategy for treating these diseases. Herein, we detail the synthesis of 15 lithocholic acid (LA) derivatives, each containing different benzylaminomethyl groups attached to the C3 position of the steroid skeleton. The derivatives were assessed against two forms of PTP1B enzyme (*h*PTP1B_{1–400} and *h*PTP1B_{1–285}), and the most potent compounds were then tested against T-cell protein tyrosine phosphatase (TCPTP) to determine their selectivity. The results showed that compounds **6m** and **6n** were more potent than the reference compounds (ursolic acid, chlorogenic acid, suramin, and TCS401). Additionally, both compounds exhibited greater potency over *h*PTP1B_{1–400}. Furthermore, enzyme kinetic studies on *h*PTP1B_{1–400} revealed that these two lithocholic acid derivatives have an uncompetitive inhibition against *h*PTP1B_{1–400} with K_i values of 2.5 and 3.4 μ M, respectively. Interestingly, these compounds were around 75-fold more selective for PTP1B over TCPTP. Finally, docking studies and molecular dynamics simulations (MDS) were conducted to determine how these compounds interact with PTP1B. The docking studies revealed hydrophobic and H-bond interactions with amino acid residues in the unstructured region. MDS showed that these interactions persisted throughout the 200 ns simulation, indicating the crucial role of the unstructured zone in the biological activity and inhibition of PTP1B.

