



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

---

---

**FACULTAD DE FARMACIA**

**“DISEÑO DE DIHIDROPIRIDINAS Y SU ESTUDIO  
FARMACOLOGICO *IN SILICO* COMO LIGANDOS  
VIRTUALES DE LA PROTEASA PRINCIPAL (Mpro/3CLpro)  
DE SARS-CoV-2”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**LICENCIADO EN FARMACIA**

**P R E S E N T A:**

**MARIO ESTRADA OLIVERA**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. JUAN GABRIEL NAVARRETE VÁZQUEZ**

**ASESOR TÉCNICO: M.F. CARLOS MARTÍNEZ CONDE**

# AGRADECIMIENTOS

Al financiamiento interno otorgado por la **Facultad de Farmacia** de la **Universidad Autónoma del Estado de Morelos** (UAEM) para la realización de este proyecto.

Al **M. F. Carlos Martínez Conde** por sus aportaciones y asesoría técnica durante el desarrollo de este proyecto, y por su contribución en la parte computacional (*in silico*).

Al comité revisor: **Dra. María Crystal Columba Palomares**, **Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza**, **Dra. Blanca Iris Colín Lozano**, **Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez** y **Dra. Yoshajandith Aguirre Vidal** por sus observaciones y tiempo invertido en la revisión de este trabajo de tesis.

Finalmente, un agradecimiento especial al **Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez** por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por sus enseñanzas y consejos que han contribuido bastante en mi desarrollo como estudiante y profesional. Muchas ¡GRACIAS!

# DEDICATORIAS

A todos aquellos que me han apoyado en distintas circunstancias a lo largo de este camino y han proporcionado a mi persona esas ganas de no darme por vencido y seguir adelante.

En especial a mi familia, quienes han sido mi mayor inspiración para afrontar cada obstáculo. Incluyendo aquellas personas que en su momento llenaron de mucha alegría mi vida y siguen guiándome desde aquel lejano lugar.

Gracias Infinitas.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
RESUMEN.....	IV
ÍNDICE DE COMPUESTOS DISEÑADOS.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 EPIDEMIOLOGÍA DE SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO GRAVE (SARS-CoV-2).....	3
2.2 TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN DE LOS CORONAVIRUS HUMANOS.....	5
2.3 BIOLOGÍA DEL SARS-CoV-2.....	6
2.4 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES.....	6
2.4.1 PROTEÍNA DE NUCLEOCÁPSIDE N.....	6
2.4.2 PROTEÍNA DE MEMBRANA M.....	7
2.4.3 PROTEÍNA DE ENVOLTURA E.....	7
2.4.4 PROTEÍNA DE ESPIGA S.....	7
2.5 PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES.....	8
2.5.1 PROTEASA PLpro (nsp3).....	8
2.5.2 ARN POLIMERASA DEPENDIENTE DE ARN (NSP12).....	9
2.5.3 COMPLEJO DE FACTORES ESTIMULADORES nsp7 Y nsp8.....	7
2.5.4 PROTEASA PRINCIPAL MPRO O 3CLpro (nsp5).....	7
2.5.4.1 MECANISMO CATALÍTICO DE 3CLpro EN EL SITIO ACTIVO.....	11
2.6 PROCESO INFECTIVO, CICLO DE REPLICACIÓN.....	13
2.7 VARIANTES DE SARS-CoV-2.....	14

2.7.1 VARIANTES VOC DE SARS-CoV-2 DE MAYOR IMPORTANCIA MÉDICA.....	15
2.7.1.1 ALFA.....	15
2.7.1.2 BETA.....	15
2.7.1.3 GAMMA.....	16
2.7.1.4 DELTA.....	16
2.7.1.5 ÓMICRON.....	16
2.7.1.6 SUBVARIANTE ÓMICRON BA.2.75.....	17
2.7.1.7 SUBVARIANTE ÓMICRON BA.5.....	17
2.7.1.8 SUBVARIANTE ÓMICRON BF.7.....	18
2.7.1.9 SUBVARIANTE ÓMICRON BQ.1, BQ.1.1 Y XBB.....	18
<b>2.8 SIGNOS Y SÍNTOMAS.....</b>	<b>19</b>
<b>2.9 DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>19</b>
2.9.1 ALGUNOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2.....	20
<b>2.10 TRATAMIENTO.....</b>	<b>22</b>
2.10.1 VACUNAS APROBADAS POR LA FDA Y EN DESARROLLO.....	22
2.10.2 FÁRMACOS CONTRA SARS-CoV-2.....	23
2.10.2.1 FÁRMACOS ANTICOAGULANTES.....	24
2.10.2.1.1 HEPARINA NO FRACCIONADA / ENOXAPARINA.....	24
2.10.2.2 FÁRMACOS ANTIVIRALES.....	26
2.10.2.2.1 REMDESIVIR.....	26
2.10.2.2.2 PAXLOVID (NIRMATRELVIR + RITONAVIR).....	26
2.10.2.2.3 MOLNUPIRAVIR.....	28

2.10.2.2.4 TRIAZAVIRINA.....	28
2.10.2.2.5 UMIFENOVIR.....	29
2.10.2.3 ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	30
2.10.2.3.1 TOCILIZUMAB.....	30
2.10.2.4 CORTICOSTEROIDES.....	30
2.10.2.4.1 DEXAMETASONA.....	30
2.10.3 REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS Y SU IMPORTANCIA PARA COMBATIR EL SARS-CoV- 2.....	31
2.10.3.1 BLOQUEADORES DE LOS CANALES DE CALCIO.....	32
2.10.3.1.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS BCC.....	32
2.10.3.1.2 IMPORTANCIA DE LOS CANALES DE CALCIO PARA INHIBIR LA REPLICACIÓN DEL SARS-CoV-2.....	34
2.10.4 PEPTIDOMIMÉTICOS Y SU IMPORTANCIA COMO COMPUESTOS ANTIVIRALES.....	34
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>37</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	37
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>6. CONSIDERACIONES DEL DISEÑO MOLECULAR.....</b>	<b>38</b>
6.1 BASES PARA EL DISEÑO MOLECULAR.....	38
6.2 BIOISOSTERISMO.....	39
6.3 POSTULADO DE LIPINSKI.....	40
<b>7. METODOLOGÍA.....</b>	<b>43</b>
7.1 PARTE COMPUTACIONAL ( <i>IN SILICO</i> ).....	43

7.1.1 ANÁLISIS DE CONSENSO FARMACOLÓGICO.....	43
7.1.1.1 PREDICCIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS/BIOFARMACÉUTICAS.....	44
7.1.1.1.1 MOLINSPIRATION.....	44
7.1.1.2 PREDICCIÓN DEL PERFIL FARMACODINÁMICO.....	45
7.1.1.2.1 PASS ONLINE.....	45
7.1.1.2.2 ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING MOLECULAR).....	46
7.1.1.3 PREDICCIÓN DEL PERFIL FARMACOCINÉTICO.....	49
7.1.1.3.1 SWISS ADME.....	49
7.1.1.3.2 admetSAR.....	49
7.1.1.3.3 Pre-ADMET.....	50
7.1.1.3.4 ADMETlab.....	51
7.1.1.4 PREDICCIÓN DEL PERFIL TOXICOLÓGICO.....	51
7.1.1.4.1 ACD/ToxSUITE.....	51
7.2 PARTE QUÍMICA.....	53
7.2.1 ESTUDIO RETROSÍNTETICO.....	53
7.2.2 SÍNTESIS QUÍMICA GENERAL.....	53
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
8.1 PARTE COMPUTACIONAL ( <i>IN SILICO</i> ).....	54
8.1.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS / BIOFARMACÉUTICAS .....	54
8.1.2 PERFIL FARMACODINÁMICO.....	56
8.1.2.1 PREDICCIÓN DEL MODO DE ACCIÓN.....	56
8.1.2.2 ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	58
8.1.2.2.1 VALIDACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR SOBRE LA PROTEÍNA 3CLpro DE	

SARS-CoV-2, CON LOS PROGRAMAS DE MOE, AUTODOCK 4 Y AUTODOCK VINA.....	59
8.1.2.2.1.1 SOBREPONIAMIENTO DE <b>RZS</b> SOBRE LA PROTEÍNA 3CLpro DE SARS-CoV-2 CON LOS PROGRAMAS MOE, AUTODOCK 4 Y AUTODOCK VINA.....	60
8.1.2.2.2 RESULTADOS Y DISCUSION DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LA SERIE DE COMPUESTOS DISEÑADOS <b>MEO 1-4</b> Y NIFEDIPINA SOBRE LA PROTEASA 3CLpro DE SARS-CoV-2.....	61
8.1.2.2.2.1 SOBREPONIAMIENTO DE LA SERIE DE COMPUESTOS DISEÑADOS <b>MEO 1-4</b> Y NIFEDIPINA SOBRE LA PROTEÍNA 3CLpro DE SARS-CoV-2 CON MOE.....	68
8.1.3 PERFIL FARMACOCINÉTICO.....	69
8.1.3.1 ABSORCIÓN GASTROINTESTINAL.....	69
8.1.3.2 BARRERA HEMATOENCEFÁLICA.....	70
8.1.3.3 SUSTRATO DE GLICOPROTEÍNA-P.....	72
8.1.4 PERFIL TOXICOLÓGICO.....	73
8.1.4.1 INHIBICIÓN DE PRINCIPALES ISOFORMAS DE CYP 450.....	74
8.1.4.2 BLOQUEO DE CANALES hERG.....	75
8.1.4.3 TOXICIDAD DE AMES (MUTAGENICIDAD) Y CARCINOGENICIDAD.....	77
8.1.4.4 TOXICIDAD AGUDA.....	78
8.1.5 ANÁLISIS DE CONSENSO FARMACOLÓGICO.....	80
<b>8.2 PARTE QUÍMICA.....</b>	<b>82</b>
8.2.1 RETROSÍNTESIS.....	82
8.2.2 PROPUESTA DE LA SÍNTESIS QUÍMICA.....	84

8.2.2.1 SÍNTESIS DE HANTZCH DE NIFEDIPINA .....	86
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>87</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>88</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>89</b>

## I. ABREVIATURAS

AMP - Monofosfato de Adenosina

aPTT - Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada

ARN - Ácido ribonucleico

BCC - Bloqueadores de Canales de Calcio

BHE - Barrera Hematoencefálica

CTD - C-terminal

CYP 450 - Citocromo P450

DL<sub>50</sub> - Dosis letal media

ECA2 - Enzima Convertidora de Angiotensina 2

FDA - Food and Drug Administration

hERG - *Human ether-a-go-go-related gen*

IL-6R - Receptor de la Interleucina-6

LogP - Logaritmo de Coeficiente de Partición

Mpro/3CLpro - Proteasa Principal

NSP - Proteínas no Estructurales

OECD - Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

OMS - Organización Mundial de la Salud

ORF - Por sus siglas en inglés: Marco de Lectura Abierto

$P_a$  - Probabilidad de Actividad

$P_i$  - Probabilidad de Inactividad

PM - Peso Molecular

P-gp - Glicoproteína-P

RBD - Dominio de Unión al Receptor

RdRp - Polimerasa de ARN Dependiente de ARN

RT-qPCR - Reacción en Cadena Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real

SAR - Relación Estructura-Actividad

SARS-CoV-2 - Síndrome Respiratorio Agudo Grave

SNC - Sistema Nervioso Central

TMPRSS - Proteasa Transmembrana de la Superficie Celular

TT - Tiempo de Trombina

TVP - Trombosis Venosa Profunda

TPSA - Área Polar Superficial Topológica

VOC - Variantes de Preocupación

VOI - Variantes de Interés

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Tablero oficial de la OMS, casos y muertes notificadas a nivel mundial.....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura del SARS-CoV-2, proteínas estructurales y no estructurales.....	5
<b>Figura 3.</b> Estructura cristalográfica de la proteasa principal de SARS-CoV-2.....	10
<b>Figura 4.-</b> Visualización de los residuos de aminoácidos de interés dentro del sitio de reconocimiento de la proteasa 3CLpro.....	11
<b>Figura 5.</b> Mecanismo catalítico de 3CLpro.....	12
<b>Figura 6.</b> Ciclo de vida del SARS-CoV-2.....	14
<b>Figura 7.-</b> Ilustración de la prueba RT-qPCR.....	21
<b>Figura 8.-</b> Ilustración de un ensayo de antígenos para COVID-19.....	21
<b>Figura 9.-</b> Representación de un ensayo de detección de anticuerpos.....	22
<b>Figura 10.</b> Estructura química de la heparina.....	26
<b>Figura 11.</b> Estructura química del remdesivir.....	26
<b>Figura 12. A:</b> estructura química del Nirmatrelvir, <b>B:</b> estructura química de Ritonavir.....	27
<b>Figura 13.</b> Estructura química del Molnupiravir.....	28
<b>Figura 14.</b> Estructura química del Triazavirina.....	28
<b>Figura 15.</b> Estructura química del Umifenovir.....	29
<b>Figura 16.</b> Estructura química de la Dexametasona.....	31
<b>Figura 17.</b> Estructuras químicas de los BCC: <b>A)</b> Felodipina, <b>B)</b> Nifedipina, <b>C)</b> Manidipina y <b>D)</b> Lercanidipina.....	33
<b>Figura 18.</b> Grupo farmacofórico presente en la Nifedipina.....	38
<b>Figura 19.</b> Diseño de la serie de compuestos <b>MEO 1-4</b> basado en el reemplazo bioisotérico del fármaco base Nifedipina.....	39

<b>Figura 20.</b> Interfaz del programa en línea Molinspiration Cheminformatics.....	44
<b>Figura 21.</b> Interfaz del servidor en línea PASS online.....	45
<b>Figura 22.</b> Interfaz del programa AutoDock.....	47
<b>Figura 23.</b> Interfaz del programa MOE.....	48
<b>Figura 24.</b> Interfaz del programa PyMOL.....	48
<b>Figura 25.</b> Interfaz del programa en línea Swiss ADME.....	49
<b>Figura 26.</b> Interfaz del programa en línea admetSAR.....	50
<b>Figura 27.</b> Interfaz del programa en línea Pre-ADMET.....	50
<b>Figura 28.</b> Interfaz del programa en línea ADMETlab.....	51
<b>Figura 29.</b> Interfaz del programa ACD/ToxSuite.....	52
<b>Figura 30.</b> Superposición dentro del sitio de unión de las soluciones proporcionadas por el acoplamiento molecular realizado con MOE.....	61
<b>Figura 31. A)</b> Visualización en 3D de interacciones del compuesto <b>MEO-1</b> dentro del sitio de unión. <b>B)</b> Mapa de interacciones 2D del compuesto <b>MEO-1</b> con la proteína 3CLpro.....	63
<b>Figura 32. A)</b> Visualización en 3D de interacciones del compuesto <b>MEO-2</b> dentro del sitio de unión. <b>B)</b> Mapa de interacciones 2D del compuesto <b>MEO-2</b> con la proteína 3CLpro.....	64
<b>Figura 33. A)</b> Visualización en 3D de interacciones del compuesto <b>MEO-3</b> dentro del sitio de unión. <b>B)</b> Mapa de interacciones 2D del compuesto <b>MEO-3</b> con la proteína 3CLpro.....	65
<b>Figura 34. A)</b> Visualización en 3D de interacciones del compuesto <b>MEO-4</b> dentro del sitio de unión. <b>B)</b> Mapa de interacciones 2D del compuesto <b>MEO-4</b> con la proteína 3CLpro.....	66
<b>Figura 35. A)</b> Visualización en 3D de interacciones del fármaco de referencia Nifedipina dentro del sitio de unión. <b>B)</b> Mapa de interacciones 2D del fármaco de referencia Nifedipina con la proteína 3CLpro.....	67
<b>Figura 36.</b> Superposición dentro del sitio de unión de las soluciones arrojadas por el programa MOE de la serie de compuestos <b>MEO 1-4</b> y de la nifedipina.....	68

<b>Figura 37.</b> Esquema general de retrosíntesis para la serie de compuestos diseñados <b>MEO 1-4</b> .....	83
<b>Figura 38.</b> Esquema general de la reacción para la obtención del compuesto <b>MEO-4</b> .....	84
<b>Figura 39.</b> Esquema general de la reacción para la obtención de los compuestos <b>MEO 1-3</b> .....	85
<b>Figura 40.-</b> Esquema general de reacción de Hantzsch para nifedipina.....	86

### III. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Fármacos reposicionados contra SARS-CoV-2, según la guía clínica para el tratamiento del COVID-19.....	24
<b>Tabla 2.</b> Resultados obtenidos de las propiedades calculadas en Molinspiration Cheminformatics de los compuestos <b>MEO 1-4</b> .....	42
<b>Tabla 3.</b> Propiedades fisicoquímicas/biofarmacéuticas de la serie de compuestos <b>MEO 1-4</b> y nifedipina.....	56
<b>Tabla 4.</b> Propiedad de actividad biológica de la serie de compuestos <b>MEO 1-4</b> y nifedipina.....	57
<b>Tabla 5.</b> Valores de RMSD obtenidos de la validación proporcionados por los programas de MOE, AutoDock 4 y AutoDock Vina.....	60
<b>Tabla 6.</b> Energías de unión obtenidas del acoplamiento molecular con 3CLpro.....	62
<b>Tabla 7.</b> Determinación de la absorción intestinal de la serie de compuestos <b>MEO 1-4</b> y nifedipina.....	70
<b>Tabla 8.</b> Permeabilidad hematoencefálica de la serie de compuestos <b>MEO 1-4</b> y nifedipina.....	71
<b>Tabla 9.</b> Probabilidad de ser sustratos de la glicoproteína-P de la serie de compuestos <b>MEO 1-4</b> y nifedipina.....	73
<b>Tabla 10.</b> Probabilidad de inhibición de CYP 450 de la serie de compuestos <b>MEO 1-4</b> y nifedipina.....	75
<b>Tabla 11.</b> Probabilidad del bloqueo de canales hERG de la serie de compuestos <b>MEO 1-4</b> .....	76
<b>Tabla 12.</b> Ensayo de AMES de la serie de compuestos <b>MEO 1-4</b> y nifedipina.....	77
<b>Tabla 13.</b> Prueba de carcinogenicidad de los compuestos <b>MEO 1-4</b> y nifedipina.....	78
<b>Tabla 14.</b> Determinación de la toxicidad aguda de la serie de compuestos diseñados MEO 1-4 y nifedipina.....	78

<b>Tabla 15.</b> Clasificación de la toxicidad de acuerdo a la OECD.....	79
<b>Tabla 16.</b> Análisis de consenso farmacológico de los compuestos <b>MEO 1-4</b> .....	81

## IV. RESUMEN

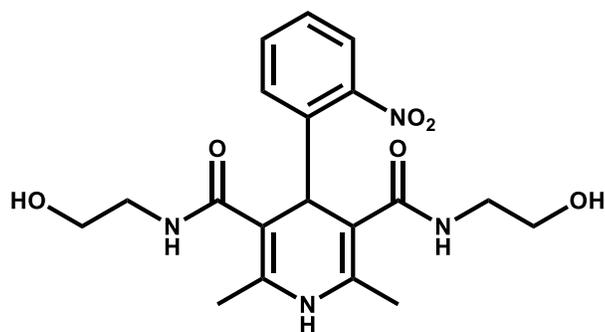
El virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS-CoV-2) fue la causa de la enfermedad y pandemia del COVID-19 ocasionada a finales del 2019 y hasta la fecha se han registrado un gran número de contagios y una alta mortalidad. Gran parte de las personas que adquieren el virus del SARS-CoV-2 sufren síntomas de intensidad leve a moderada y se recuperan sin la necesidad de recurrir a tratamientos especiales, sin embargo, otras personas desarrollan casos graves con requerimiento médico especializado. Hasta la fecha el tratamiento de primera línea ha sido el uso de vacunas, sin embargo, solo existe un fármaco o molécula pequeña que actúa exclusivamente dirigida hacia el SARS-CoV-2: el nirmatrelvir, uno de los principios activos del Paxlovid®.

Con base a lo anterior, en este trabajo de tesis se propone el diseño y la evaluación *in silico* de nuevas moléculas de origen dihidropiridínicas con acción peptidomimética de interés farmacológico, las cuales abrirían posibles oportunidades en la parte de la investigación química-farmacéutica para combatir la problemática generada recientemente por el SARS-CoV-2. Los compuestos **MEO 1-4** se diseñaron racionalmente considerando diversos criterios importantes como: baja toxicidad, buenas propiedades físico-químicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas. Dichas propiedades se calcularon con diversos servidores quimio-informáticos (Molinspiration, PASS, admetSAR, ADMETlab, SwissADME, Pre-ADMET, etc.).

Con ayuda del servidor PASS online se evaluaron las probabilidades de actividad biológica, en donde destaca el compuesto **MEO-1** que presentó probable afinidad hacia la proteasa principal (Mpro/3CLpro) de SARS-CoV-2. Se hizo uso del análisis *in silico* de consenso farmacológico, el cual reúne los diferentes resultados obtenidos por los distintos servidores quimio-informáticos empleados y con ello se realiza una selección o discriminación de aquellos compuestos con las mejores propiedades. De acuerdo a lo anterior los compuestos **MEO-1** y **MEO-4** presentaron los mejores valores por lo que serán candidatos para su futura síntesis química y

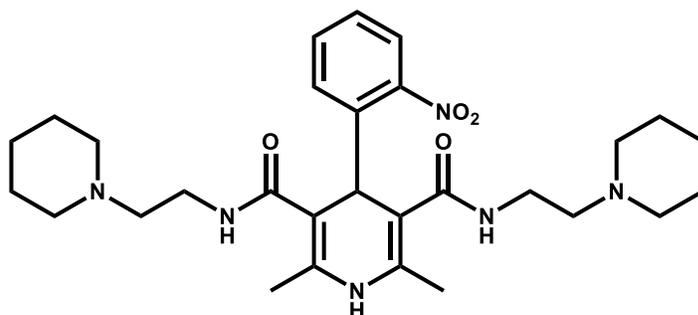
evaluación biológica. Finalmente se hizo una propuesta de la síntesis química para la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4**.

## V. ÍNDICE DE COMPUESTOS DISEÑADOS



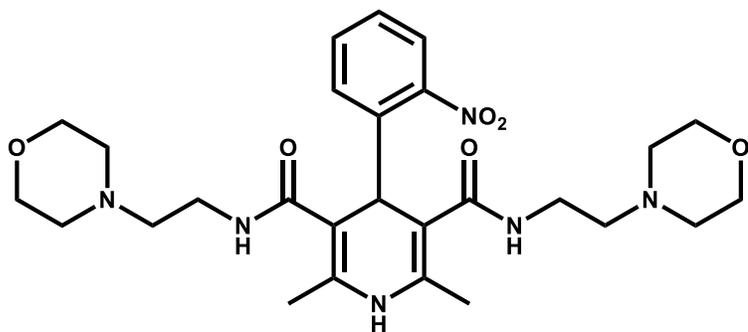
**MEO-1**

*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>5</sup>-bis(2-hidroxietyl)-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarboxamida



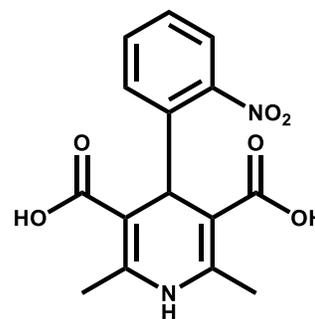
**MEO-2**

2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>5</sup>-bis(2-(piperidin-1-il)etyl)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarboxamida



**MEO-3**

2,6-dimetil-*N*<sup>3</sup>,*N*<sup>5</sup>-bis(2-morfolin-4-il)etyl)-4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxamida



**MEO-4**

Ácido 2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarboxílico

# 1. INTRODUCCIÓN

El coronavirus de tipo 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS-CoV-2) es la causa de la enfermedad y pandemia del COVID-19, la cual dio inicio en Wuhan China a finales del 2019.<sup>1</sup> Últimamente la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha dado prioridad a las afecciones producidas por organismos virales por ser un peligro de alto riesgo a nivel mundial, algunas de las enfermedades virales de mayor impacto son; el Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS), el Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS), el Ébola, Zika y Dengue.<sup>2</sup>

Los coronavirus se clasifican en 4 géneros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ , de los cuales únicamente  $\alpha$  y  $\beta$  coronavirus pueden causar daños en seres humanos. Dentro de los coronavirus humanos que más prevalecen son 4, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 y HCoV-NL63.<sup>3</sup> El SARS-CoV-2 pertenece a una familia de virus altamente patogénicos de tipo ARN positivo envueltos que ocasionan daños agudos y crónicos, los cuales incluyen severos trastornos en el sistema nervioso central, resfriado, infecciones del tracto respiratorio inferior y diarrea.<sup>4</sup>

---

<sup>1</sup> Hoffman, R. L.; Kania, R. S.; Brothers, M. A.; Davies, J. F.; Ferre, R. A.; Gajiwala, K. S.; He, M.; Hogan, R. J.; Kozminski, K.; Li, L. Y.; et al. Discovery of Ketone-Based Covalent Inhibitors of Coronavirus 3CL Proteases for the Potential Therapeutic Treatment of COVID-19. *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (21), 12725.

<sup>2</sup> Cannalire, R.; Cerchia, C.; Beccari, A. R.; Di Leva, F. S.; Summa, V. Targeting SARS-CoV-2 Proteases and Polymerase for COVID-19 Treatment: State of the Art and Future Opportunities. *J. Med. Chem.* **2022**, 65 (4), 2716-2746.

<sup>3</sup> Choudhry, N.; Zhao, X.; Xu, D.; Zanin, M.; Chen, W.; Yang, Z.; Chen, J. Chinese Therapeutic Strategy for Fighting COVID-19 and Potential Small-Molecule Inhibitors against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (22), 13205-13227.

<sup>4</sup> Hoon, S.; Goins, C. M.; Arya, T.; Shin, W. J.; Maw, J.; Hooper, A.; Sonawane, D. P.; Porter, M. R.; Banniester, B. E.; Crouch, R. D.; et al. Structure-Based Optimization of ML300-Derived, Noncovalent Inhibitors Targeting the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3CL Protease (SARS-CoV-2 3CL<sup>pro</sup>). *J. Med. Chem.* **2022**, 65 (4), 2880-2904.

El SARS-CoV-2 codifica a una gran variedad de proteínas que son muy importantes en la etapa de replicación y maduración viral, donde los objetivos antivirales terapéuticos de mayor importancia clínica son las dos proteasas de cisteína, la proteasa principal (Mpro o 3CLpro) y la proteasa con similitud a la papaína (PLpro).<sup>5</sup>

Debido a la emergencia sanitaria ocasionada por SARS-CoV-2, se da la necesidad de recurrir a la evaluación de tipo quimio-informática de nuevas entidades químicas con posible actividad biológica contra la replicación viral de SARS-CoV-2. Por ello en este proyecto, se propone el diseño y la evaluación *in silico* de nuevas moléculas de origen dihidropiridinicas de interés farmacológico, las cuales abrirían posibles oportunidades en la parte de la investigación química-farmacéutica para combatir la problemática generada recientemente por el SARS-CoV-2.

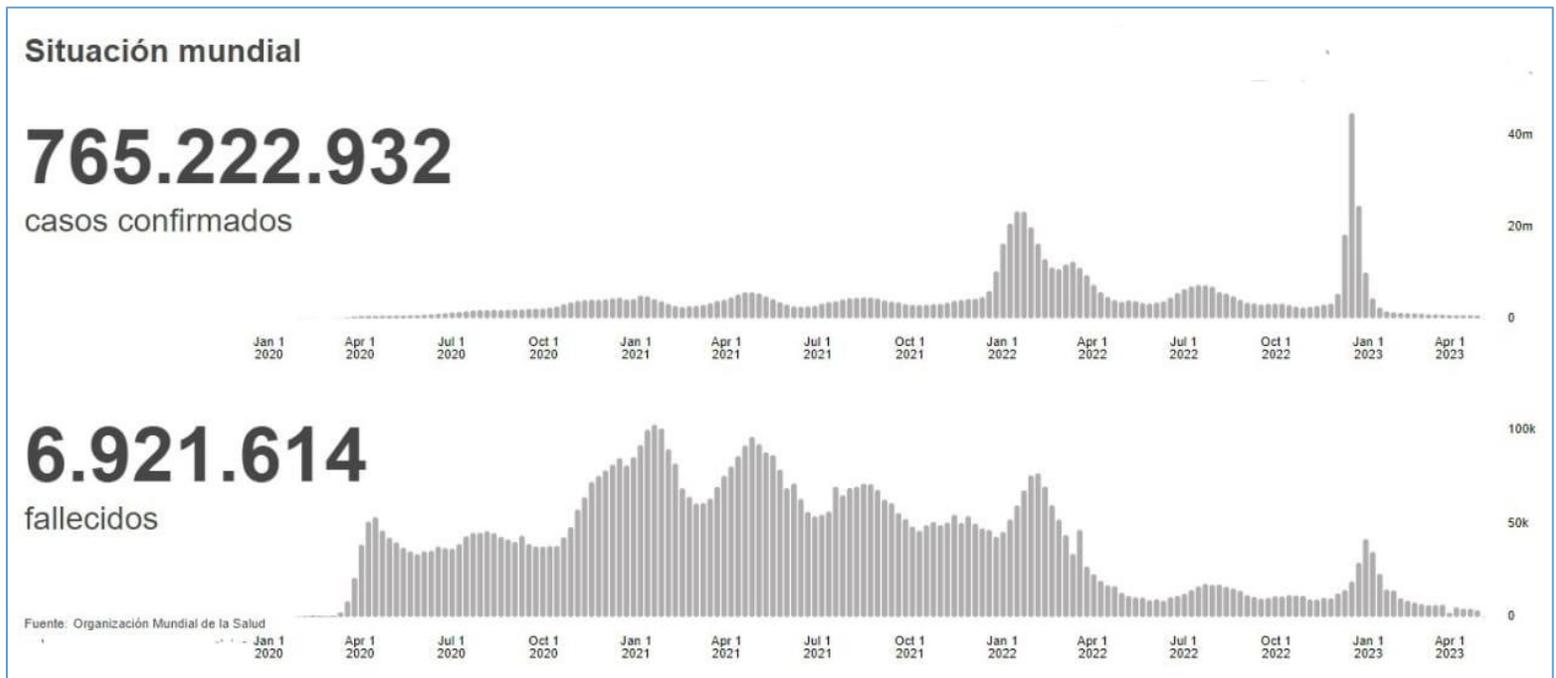
---

<sup>5</sup> Tang, T.; Jaimes, J. A.; Bidon, M. K.; Stratus.; Daniel, S.; Whittaker, G. R. Proteolytic Activation of SARS-CoV-2 Spike at the S1/S1 Boundary: Potential Role of Proteases beyond Furin. *J. Med. Chem.* **2021**, 7 (2), 264-272.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO GRAVE (SARS-CoV-2)

El COVID-19 provocado por el virus SARS-CoV-2 ha alcanzado cifras muy altas que han aquejado a la población mundial, registrando 765,222,932 casos confirmados y 6,921,614 muertes hasta el 3 de mayo del 2023, en la **Figura 1** se muestran los datos de casos y muertes confirmadas de COVID-19.<sup>6</sup>



**Figura 1.-** Tablero oficial de la OMS, casos y muertes notificadas a nivel mundial.

El origen del SARS-CoV-2, así como su modo de introducción a la población humana, aún no se conoce con exactitud, aunque numerosos artículos científicos mencionan dos posibles orígenes del SARS-CoV-2, la primera por un posible origen no natural provocado accidentalmente por un laboratorio de investigación de Wuhan

<sup>6</sup> Organización Mundial de la Salud. (23 de junio de 2022). *Tablero de la OMS sobre el coronavirus (COVID-19)*. <https://covid19.who.int/>

(este posible origen ha sido descartado por varios autores), la segunda por un posible origen natural, siendo iniciado a causa de una emergencia zoonótica (principalmente por murciélagos y pangolinos), esta última teoría es la más aceptada por los investigadores ya que todos o la mayoría de los coronavirus anteriores tienen orígenes zoonóticos, al igual que la mayoría de infecciones causadas por virus. Más puntualmente se menciona que el mercado de Huanan en Wuhan fue un epicentro inicial e importante para el comienzo de la infección por SARS-CoV-2 según datos epidemiológicos reportados.<sup>7,8</sup>

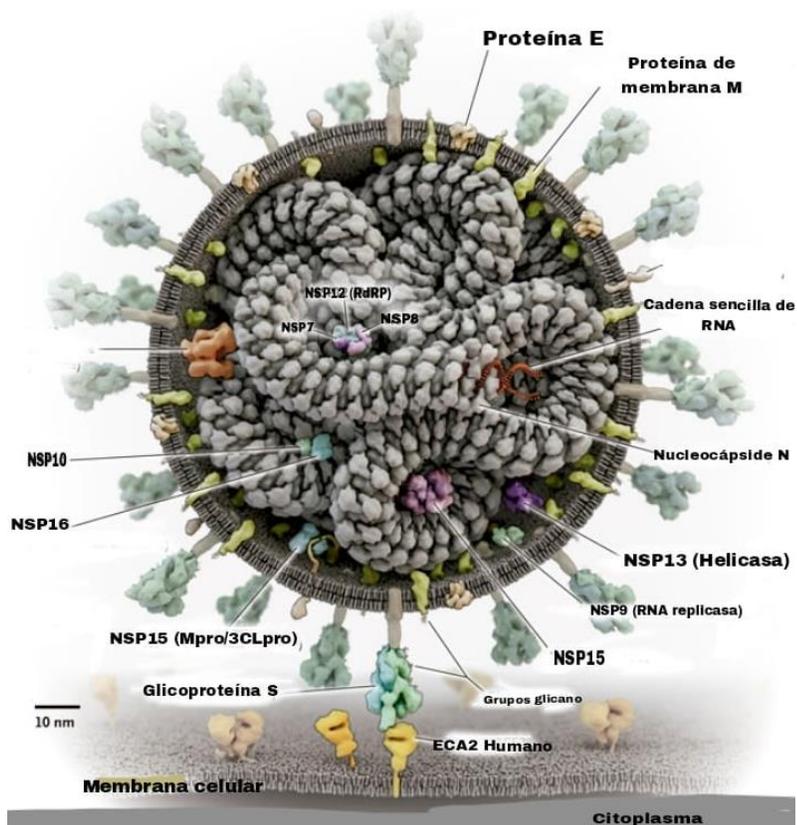
El SARS-CoV-2 pertenece a la familia *Coronaviridae*, a la subfamilia *Orthocoronaviridae*, son virus envueltos de ARN de cadena positiva, que contienen 29, 903 bases de longitud en cuanto al tamaño de su genoma. El genoma del SARS-CoV-2 está conformado por cuatro proteínas estructurales, proteína de nucleocápside N, la proteína de envoltura E, la proteína de membrana M y la proteína de espiga S y contienen 16 proteínas no estructurales: nsp5 o proteasa principal Mpro o 3CLpro, proteasa similar a la papaína nsp3 o PLpro, ARN polimerasa dependiente de ARN o nsp12, complejo de factores estimuladores snp7 y snp8, entre otras.<sup>9</sup> Estas proteínas tanto estructurales como no estructurales cumplen con funciones esenciales para que el virus continúe con su ciclo de infección y replicación como se muestra en la **Figura 2**.

---

<sup>7</sup> Holmes, E. C.; Goldstein, S. A.; Rasmussen, A. L.; Robertson, D. L.; Crits-Christoph, A.; Wertheim, J. O.; Anthony, S. J.; Barclay, W. S.; Boni, M. F.; Doherty, P. C.; et al. The Origins of SARS-CoV-2: A Critical Review. *Cell*. **2021**, 184 (19), 4848-4856.

<sup>8</sup> Domingo, J. L. What We Know and What We Need to Know About the Origin of SARS-CoV-2. *Environmental Research*. **2021**, 200, 111785.

<sup>9</sup> Gil, C.; Ginex, T.; Maestro, I.; Nozal, V.; Barrado-Gil, L.; Cuesta-Geijo, M. A.; Urquiza, J.; Ramírez, D.; Alonso, C.; Campillo, N. E.; Martínez, A. COVID-19: Drug Targets Potential Treatments. *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (21), 12359-12386.



**Figura 2.-** Estructura del SARS-CoV-2, proteínas estructurales y no estructurales, imagen adaptada de <sup>9</sup>.

## 2.2 TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN DE LOS CORONAVIRUS HUMANOS

Los coronavirus humanos forman el grupo más grande de virus del orden de los *Nidovirales*, que incluye a las familias *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Roniviridae* y *Mesoviridae*, con una organización genómica altamente conservada. La familia *Coronaviridae* consta de dos subfamilias: *Coronavirinae* y *Torovirinae*.<sup>10</sup>

Los coronavirus humanos se clasifican en cuatro géneros, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. Así mismo el género *Betacoronavirus* anteriormente se subdividían en los linajes A, B, C y D.<sup>10</sup>

<sup>10</sup> Li, X.; Luk, H. K.; Lau, S. K.; Woo, P. C. Human Coronaviruses: General Features. *Reference Module in Biomedical Sciences*, B978-0-12-801238-3.95704-0. 2019.

Recientemente, estos cuatro linajes se han reclasificado como subgéneros de *Betacoronavirus* y se han renombrado como *Embecovirus* (linaje anterior A), *Sarbecovirus* (linaje anterior B), *Merbecovirus* (linaje anterior C) y *Nebecovirus* (linaje anterior D).<sup>10</sup>

## 2.3 BIOLOGÍA DEL SARS-CoV-2

Las proteínas del SARS-CoV-2 tanto estructurales como no estructurales en el genoma del virus están codificadas en las secuencias del marco de lectura abierto (ORF). Hasta la fecha, se han secuenciado casi 14 ORF en el genoma del virus SARS-CoV-2.<sup>11</sup>

Cada uno de estos ORF es responsable de codificar 17 proteínas (estructurales y no estructurales), que desempeñan funciones importantes para el SARS-CoV-2 en toda su etapa biológica, desde su formación, supervivencia y hasta su virulencia.<sup>11</sup>

## 2.4 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

### 2.4.1 PROTEÍNA DE NUCLEOCÁPSIDE (N)

La proteína de nucleocápside (N) es una fosfoproteína de 45.6 kDa, conformado por un dominio *N*-terminal (NTD) y un dominio *C*-terminal (CTD), conectados por una región de enlace poco estructurada que contiene un dominio rico en serina/arginina (SR-rich domain-). La proteína N posee dos estados oligoméricos diferentes que respaldan sus dos funciones principales: la proteína no modificada que forma un oligómero estructurado adecuado para el ensamblaje de la nucleocápside, mientras que la proteína fosforilada forma un complejo adecuado para el procesamiento del genoma viral, con ello realizan el trabajo de transcripción y replicación del ARN genómico viral.<sup>12</sup>

---

<sup>11</sup> Bakhshandeh, B.; Jahanafrooz, Z.; Abbasi, A.; Babaei, M.; Sadeghi, M.; Sadeq, M.; Zamani, M. Mutations in SARS-CoV-2; Consequences in Structure, Function, and Pathogenicity of the Virus. *Microbial Pathogenesis*. **2021**, 154, 104831.

<sup>12</sup> Khan, W. H.; Khan, N.; Mishra, A.; Gupta, S.; Bansode, V.; Mehta, D.; Bhambure, R.; Ansari, M. A.; Das, S.; Rathore, A. S. Dimerization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein affects sensitivity of ELISA based diagnostics of COVID-19. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2022**, 200, 428-437.

### 2.4.2 PROTEÍNA DE MEMBRANA (M)

La proteína de membrana (M) es la responsable del transporte transmembrana de nutrientes, la cual es esencial para la formación de pseudopartículas facilitando la liberación del contenido genómico viral. Consta de un ectodominio *N*-terminal corto que alberga un sitio de *N*-glicosilación, tres dominios transmembrana, una cola citoplasmática larga, y un dominio C-terminal que se une a *N*-terminal.<sup>13</sup>

### 2.4.3 PROTEÍNA DE ENVOLTURA (E)

La proteína de envoltura (E) es una proteína de membrana multifuncional, la más pequeña de las 4 proteínas estructurales (8 a 12 kDa) y contiene el número de copias más bajo en la envoltura lipídica de las partículas de virus maduros. Gran parte de la reserva de la proteína E se localiza en el compartimento intermedio entre el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico de la célula huésped, donde participa en la gemación, el ensamblaje y en el tráfico del virus. Además de su función estructural, la proteína E se oligomeriza para formar canales iónicos pentaméricos y posee un sitio de unión al dominio PDZ C-terminal (dominios modulares de interacción de proteínas) que induce inmunopatología por sobreexpresión de citoquinas inflamatorias.<sup>14</sup>

### 2.4.4 PROTEÍNA DE ESPIGA (S)

La proteína de espiga (S) es la proteína estructural que más sobresale, es responsable de la unión del virión al receptor de la superficie de la célula huésped y su fusión, lo que permite la liberación del genoma viral en el citoplasma del huésped. El ectodominio de la proteína S comprende dos subunidades funcionales, S1 y S2. La subunidad S1 es responsable de la unión del receptor, mientras que la subunidad S2 mantiene el proceso de maquinaria de fusión. La proteína S es una

---

<sup>13</sup> Peele, K. A.; Kumar, V.; Parate, S.; Srirama, K.; Lee, K. W.; Venkateswarulu. In silico drug repurposing using FDA approved drugs against Membrane protein of SARS-CoV-2. **2021**, 110 (6), 2346-2354.

<sup>14</sup> Duart, G.; García-Murria, M. J.; Mingarro, I. The SARS-CoV-2 envelope (E) protein has evolved towards membrane topology robustness. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. **2021**, 1863 (7).

proteína de fusión viral de clase I y es activada por escisión proteolítica por las proteasas de las células huésped como la catepsina B, la tripsina, la plasmina, la elastasa y la proteasa/serina transmembrana de la superficie celular (TMPRSS) dichas proteasas escinden a la proteína S del SARS-CoV-2 para facilitar la unión viral.<sup>15</sup>

## 2.5 PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

El SARS-CoV-2 contiene 16 proteínas no estructurales de las cuales únicamente se describen a las proteínas no estructurales de mayor importancia médica.

### 2.5.1 PROTEASA PLpro (nsp3)

Es la subunidad de replicasa más grande contiene 1922 aminoácidos. Es probable que esta macromolécula, que posee dominios transmembrana, desempeñe un papel importante para la formación del complejo de replicación al mediar en el reordenamiento de las membranas intracelulares y en múltiples interacciones con otras proteínas no estructurales.<sup>2</sup>

Se han identificado varios dominios de PLpro y se conservan en todos los tipos de coronavirus humano. Entre estos, el dominio PLpro es una cisteína proteasa que escinde la proteína viral en los sitios de escisión nsp1/2, nsp2/3 y nsp3/4. PLpro también reconoce e hidroliza las proteínas celulares Ub y la proteína UbL ISG15 del grupo lisina de las proteínas hospederas ubiquitinadas involucradas en la respuesta antiviral innata. PLpro actúa como un potente supresor de los mecanismos de inmunidad del hospedero dependientes de Ub, bloqueando la producción de IFN $\beta$  y otras citosinas, así como las vías IRF3 y NF-KB.<sup>2</sup>

---

<sup>15</sup> Shokeen, K.; Pandey, S.; Shah, M.; Kumar, S. Insight towards the effect of the multi basic cleavage site of SARS-CoV-2 spike protein on cellular proteases. *Virus Research*. **2022**, 318, 198845.

<sup>2</sup> Cannalire, R.; Cerchia, C.; Beccari, A. R.; Di Leva, F. S.; Summa, V. Targeting SARS-CoV-2 Proteases and Polymerase for COVID-19 Treatment: State of the Art and Future Opportunities. *J. Med. Chem.* **2022**, 65 (4), 2716-2746.

### **2.5.2 ARN POLIMERASA DEPENDIENTE DE ARN (nsp12)**

Es el núcleo de la maquinaria de replicación del virus y es una de las proteínas más grandes del genoma viral (932 residuos de aminoácidos). Se une a nsp7 y nsp8 para formar un complejo activo, primero usa ARN sentido como una plantilla para generar una copia negativa y luego, en un segundo ciclo genera nuevas copias de ARN genómico y subgenómico. ARN polimerasa dependiente de ARN es elemento crucial para mantener la estabilidad del genoma viral, mientras que al mismo tiempo permiten que su mutación se adapte a nuevos entornos.<sup>16</sup>

### **2.5.3 COMPLEJO DE FACTORES ESTIMULADORES nsp7 y nsp8**

La nsp7 actúa como cofactor para mejorar y acelerar la actividad de la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (nsp12).

La nsp8 sintetiza cebadores de hasta seis nucleótidos de longitud para la síntesis de ARN de la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (nsp12).<sup>17</sup>

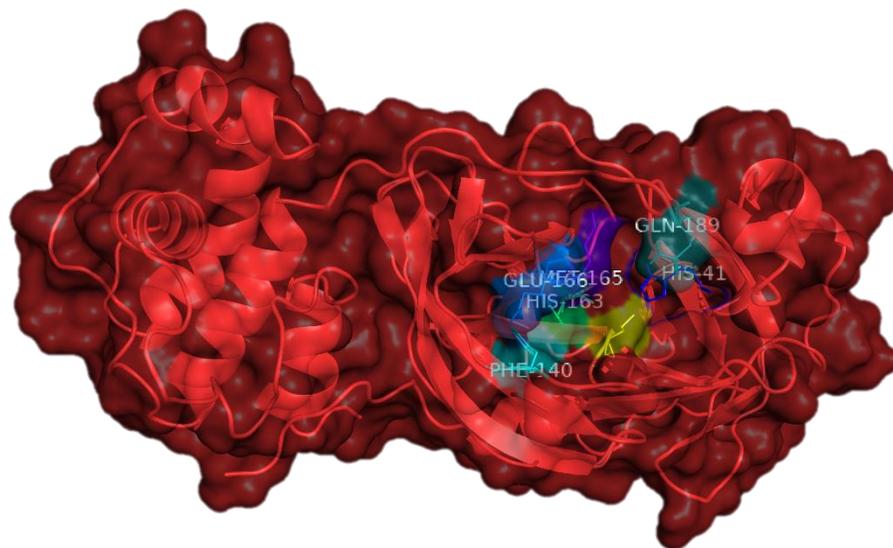
---

<sup>16</sup> Aranda, J.; Wieczór, M.; Terrazas, M.; Brun-Heath, I.; Orozco, M. Mechanism of reaction of RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2. *Chem Catalysis*. **2022**, 2 (5), 1084-1099.

<sup>17</sup> Kumar, P.; Dipak, P.; Chakravorty, D. Nature's therapy for COVID-19: Targeting the vital non-structural proteins (NSP) from SARS-CoV-2 with phytochemicals from Indian medicinal plants. *Phytomedicine Plus*. **2021**, 1 (1), 100002.

### 2.5.4 PROTEASA PRINCIPAL Mpro O 3CLpro (nsp5)

Es llamada proteasa principal (Mpro/3CLpro), debido a la función que realiza en la producción de proteínas virales. La forma activa de Mpro es un homodímero de dos polipéptidos de 306 residuos, dispuestos en una orientación de tipo perpendicular, en la **Figura 3** se muestra una representación cristalográfica de la proteasa principal.<sup>18,19</sup>



**Figura 3.-** Estructura cristalográfica de la proteasa principal de SARS-CoV-2, con código de PDB 5R82, obtenido de la base de datos de: Protein Data Bank.<sup>18</sup>

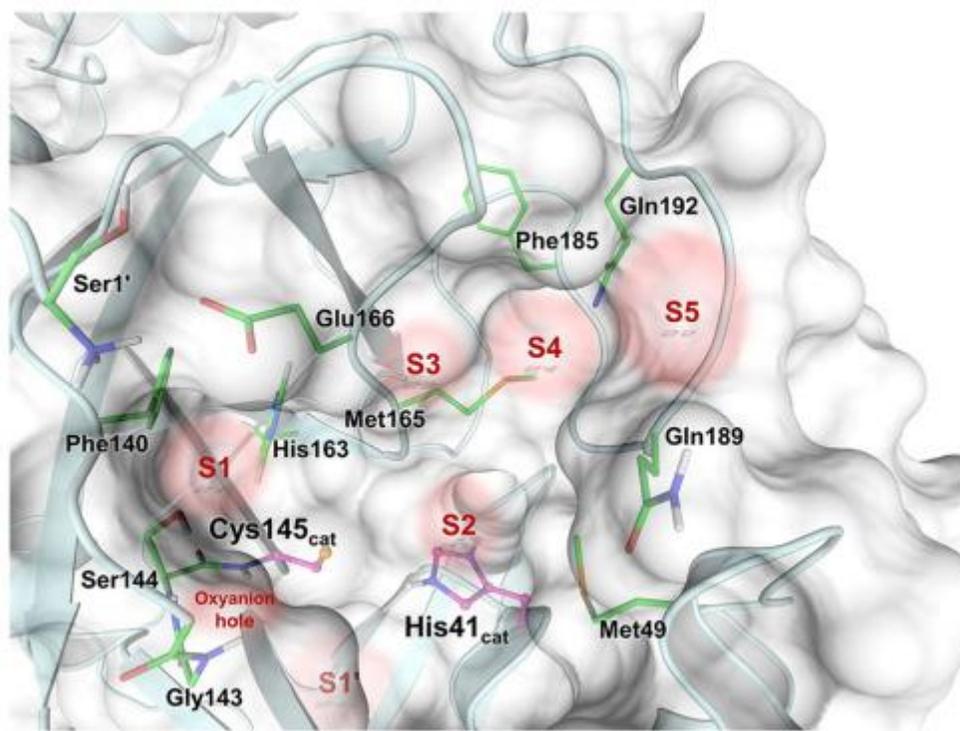
La proteasa 3CLpro desempeña un papel fundamental en la mediación de la replicación viral y la transcripción, por ello es un blanco terapéutico importante para el diseño de nuevas moléculas pequeñas capaces de inhibir dicho sitio biológico, por consiguiente, se eligió dicha proteína como sitio blanco en el presente proyecto de tesis con la finalidad de aportar alternativas terapéuticas contra el COVID-19 ocasionada por SARS-CoV-2.<sup>19</sup>

El sitio activo de 3CLpro comprende una díada catalítica His41 y Cys145, en donde además se contemplan otros aminoácidos de interés biológico: Phe140, His163,

<sup>18</sup> Protein Data Bank. (junio 2021). *Deposición del grupo de análisis de PanDDA: estructura cristalina de la proteasa principal de COVID-19 en complejo con Z2191042 16*. <https://www.rcsb.org/structure/5R82> Fecha de consulta marzo 2021.

<sup>19</sup> Ravanfar, R.; Sheng, Y.; Shahgholi, M.; Lomenick, B.; Jones, J.; Chou, T. F.; Gray, H. B.; Winkler, J. R. Surface cysteines could protect the SARS-CoV-2 main protease from oxidative damage. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2022**, 234, 111886.

Met165, Glu166 y Gln189, dichos residuos de aminoácidos se visualizan en la **Figura 4.**<sup>19,20</sup>



**Figura 4.-** Visualización de los residuos de aminoácidos de interés dentro del sitio de reconocimiento de la proteasa 3CLpro.<sup>21</sup>

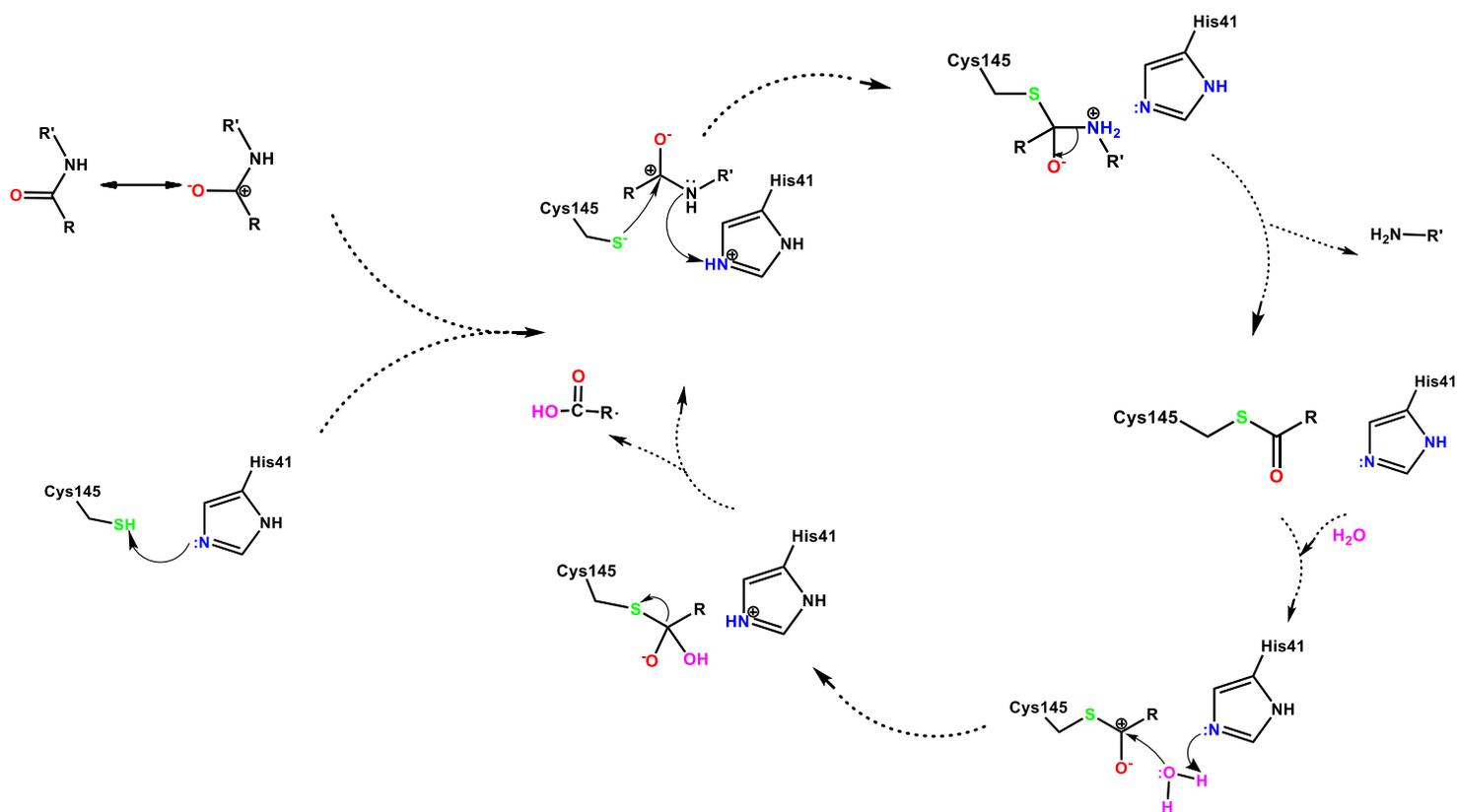
### 2.5.4.1 MECANISMO CATALÍTICO DE 3CLpro EN EL SITIO ACTIVO

La díada catalítica de 3CLpro está formada por Cys145 e His41. Dicha díada catalítica necesita ser activada por agua y mantenida por His164 y Asp187. La escisión de las grandes cadenas poliproteicas por 3CLpro se produce en el residuo de glutamina dentro del sitio de unión a través de una díada Cys145-His41, en la que el tiol de la cisteína funciona como nucleófilo en el proceso proteolítico, dicho mecanismo Cys145-His41 es llamado como reacción de tipo nucleofílica y se

<sup>20</sup> Reyaz, S.; Tansneem, A.; Prakash, G.; Bairagya, H. R. Investigation of structural analogs of hydroxychloroquine for SARS-CoV-2 main protease (Mpro): A computational drug discovery study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **2021**, 109, 108021.

<sup>21</sup> Kneller, D.; Phillips, G.; Weiss, K.; O'Neill, H.; Coates, L.; Kovalevsky, A. Unusual zwitterionic catalytic site of SARS-CoV-2 main protease revealed by neutron crystallography. *Journal of Biological Chemistry*. **2020**, 295, P17365-17373.

representa en la **Figura 5**. Inicialmente, Cys145-tiol en la diada catalítica se desprotona con la ayuda de His41 cercana, donde el azufre aniónico especialmente reconocido como nucleófilo ataca al átomo C-terminal de Gln. Después de eliminar el enlace amida, la histidina restaura la forma desprotonada y el tioéster generado es atacado de la misma manera, el agua ataca como nucleófilo que conduce a la liberación del C-terminal hidrolizado, reiniciando así la díada catalítica. La Cys145 es esencial para llevar a cabo todo el proceso catalítico mencionado anteriormente, por lo tanto, el bloqueo o ataque a dicho residuo detendría el mecanismo catalítico de 3CLpro.<sup>22</sup>



**Figura 5.-** Mecanismo catalítico de 3CLpro.<sup>22</sup>

<sup>22</sup> Hu, Q.; Xiong, Y.; Zhu, G. H.; Zhang, Y. N.; Zhang, Y. W.; Huang, P.; Ge, G. The SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19. *MedComm*. **2022**, 3 (3), e151.

## 2.6 PROCESO INFECTIVO, CICLO DE REPLICACIÓN

El SARS-CoV-2 infecta las células epiteliales del pulmón humano al unirse al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) ubicado en la superficie celular con la ayuda del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína espiga (proteína S). La serina proteasa transmembrana 2 (TMPRSS2) es necesaria para el cebado y activación de la proteína S.

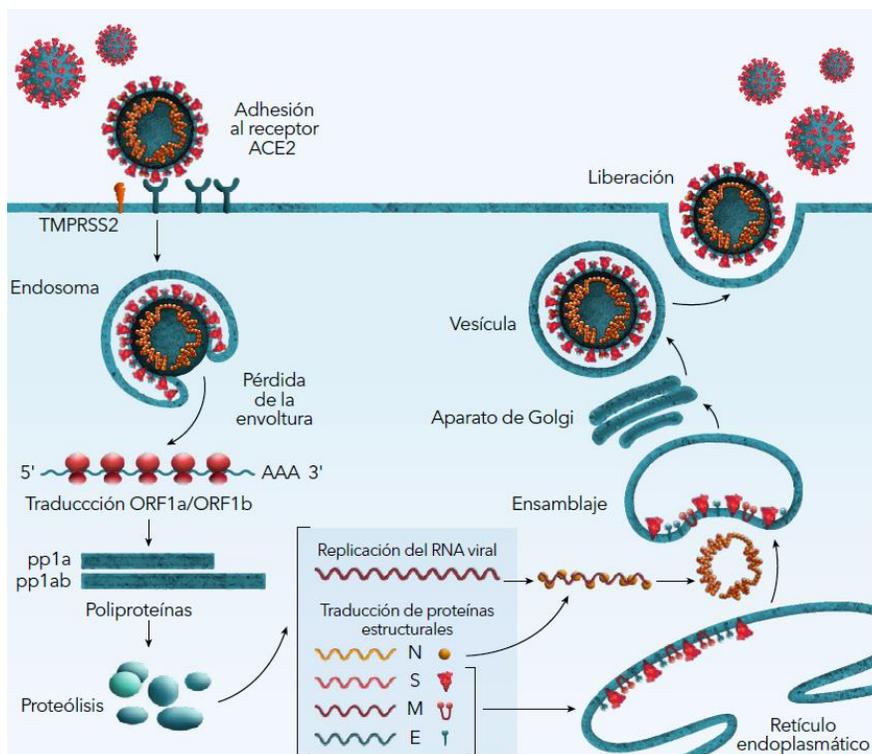
El virus se internaliza directamente a través de la interacción RBD-ECA2 o la fusión de membranas, lo que requiere la actividad proteolítica de TMPRSS2. Posteriormente se da el desprendimiento de su genoma y la liberación en el citoplasma de la célula huésped, que se traduce para después formar proteínas virales.

Las proteínas no estructurales (NSP) contribuyen con la síntesis de ARN y en la replicación vírica son las NSP 2-16. Se forma un intermediario de ARN de sentido negativo para la síntesis de ARN genómico de cadena de un sentido de tipo positivo, así como un conjunto de ARN subgenómicos más cortos.

Finalmente, el ARN genómico es empaquetado y ensamblado en el compartimiento intermedio del retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Los RNA subgenómicos codifican proteínas estructurales como la proteína de envoltura (E), la proteína de membrana (M) y la nucleocápside (N) y varias proteínas accesorias que forman parte de la estructura de SARS-CoV-2.<sup>23</sup> Dicho mecanismo de replicación se ilustra en la **Figura 6**.

---

<sup>23</sup> Reddy, U.; Routhu, N. K.; Kumar, A. Multifaceted roles of plant derived small molecule inhibitors on replication cycle of SARS-CoV-2. *Microbial Pathogenesis*. **2022**, 168, 105512.



**Figura 6.-** Ciclo de vida del SARS-CoV-2, imagen adaptada de<sup>23</sup>

## 2.7 VARIANTES DE SARS-CoV-2

Los virus como el SARS-CoV-2 de tipo ARN, evolucionan rápidamente a medida que se producen cambios en el código genético (provocados por las mutaciones genéticas o la recombinación viral) esto durante la replicación del genoma. Un linaje es un grupo de variantes de virus estrechamente relacionados desde el punto de vista genético derivados de un ancestro en común. Una variante posee una o más mutaciones que la diferencia de las otras variantes del virus del SARS-CoV-2. Un recombinante es una variante creada por la combinación del material genético de dos variantes diferentes.<sup>24</sup>

Tal como se preveía, se han documentado diferentes variantes del SARS-CoV-2 en los Estados Unidos de América y a nivel mundial durante esta pandemia. Para fundamentar las investigaciones de brotes locales y comprender las tendencias

<sup>24</sup> Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. *Clasificación y definiciones de las variantes de SARS-CoV-2.* <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html> Fecha de consulta enero 2022.

nacionales, los científicos comparan las diferencias genéticas entre los virus para identificar todo lo relacionado a las diferentes variantes y que tanta relación hay en las mismas.<sup>24</sup>

Las variantes del SARS-CoV-2 están clasificadas como variantes de preocupación (VOC por sus siglas en inglés) por la OMS, estas son las de mayor riesgo. Y las variantes que muestran mutaciones similares a las de VOC pero que se propagan menos, se clasifican como variante de interés (VOI por sus siglas en inglés).<sup>24</sup>

## **2.7.1 VARIANTES VOC DE SARS-CoV-2 DE MAYOR IMPORTANCIA MÉDICA**

### **2.7.1.1 ALFA**

La variante Alfa tiene múltiples mutaciones en el dominio de unión al receptor (RBD por sus siglas en inglés). Esta variante surgió por primera vez en el Reino Unido en septiembre de 2020 y se detectó en múltiples países incluyendo Estados Unidos de América a principios de 2021. Datos reportados sugieren que la variante Alfa es entre un 43% y un 90% más transmisible que otros linajes que circulan en el Reino Unido. La gravedad de esta variante aun no es reportada con claridad, aunque posiblemente puede ser la más mortal, por la fácil transmisión en la comunidad.<sup>25</sup>

### **2.7.1.2 BETA**

La variante Beta presenta tres mutaciones en RBD y algunas mutaciones dominio amino-terminal (NTD por sus siglas en inglés). Esta variante fue identificada por primera vez en Sudáfrica en octubre de 2020 y desde esa fecha se han encontrado casos fuera de Sudáfrica. Actualmente no hay información que sugiera una asociación de esta variante con una mayor mortalidad en las personas infectadas por SARS-CoV-2.<sup>25</sup>

---

<sup>24</sup> Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. *Clasificación y definiciones de las variantes de SARS-CoV-2.* <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html> Fecha de consulta enero 2022.

<sup>25</sup> Chen, K. W. K.; Huang, D. T. N.; Huang, L. M. SARS-CoV-2 variants – Evolution, spike protein, and vaccines. *Biomedical Journal.* 2022.

### **2.7.1.3 GAMMA**

La variante Gamma presenta entre tres a cuatro mutaciones en el RBD. Esta variante provocó un aumento de la infección en Manaus Brasil en diciembre de 2020, ha sido detectada en numerosos países de Sudamérica y muy pocos casos en el continente europeo. En Manaus Brasil, la mayoría de la población ya había sido infectada con el virus SARS-CoV-2. La variante Gamma es asociada con una mayor transmisibilidad, mayor riesgo de infección y muy probablemente con mayor tasa de mortalidad.<sup>26</sup>

### **2.7.1.4 DELTA**

La variante Delta fue detectada por primera vez en India a principios de 2021, posteriormente saltó al Reino Unido siendo la variante VOC mayoritaria en el continente europeo. Esta variante presenta mutaciones en el RBD y en el sitio de escisión de furina. También presenta mutaciones en la proteína de espiga S y algunas otras en los genes de marco de lectura abierto (ORF) y en la proteína de la nucleocápside N.

La variante Delta es más transmisible y de mayor gravedad clínica desplazó muy rápido a la variante Alfa en varios países del mundo y se convirtió en variante VOC global dominante. Esta variante ha mostrado una mayor transmisibilidad debido a los siguientes mecanismos posibles: presenta una mayor carga viral infecciosa, presenta una mayor duración de la eliminación del virus infeccioso, y presenta también una mayor tasa de reinfección debido al escape de anticuerpos en la población infectada.<sup>26</sup>

### **2.7.1.5 ÓMICRON**

La Ómicron es una variante del SARS-CoV-2 altamente mutada que ha llevado a una rápida propagación mundial. Los primeros informes de Sudáfrica y el Reino

---

<sup>26</sup> Gómez, J. J.; Álvarez, M. J.; Martín, S. Javierre, A. P. Papel protector de las actuales vacunas para las variantes del virus SARS-CoV-2 y la COVID persistente. *FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria*. **2022**, 29 (1), 16-25.

Unido sugieren que la gravedad de la enfermedad clínica con Ómicron puede ser menor con respecto a las otras variantes.<sup>27</sup>

En general, se han detectado más de 60 mutaciones en variantes de Ómicron. Entre todas las variantes de SARS-CoV-2, las variantes de Ómicron tenían la mayoría de los sitios de mutación. Posee sustituciones principalmente en Marco de Lectura Abierto 1a (ORF1a). Para las proteínas estructurales, hay sustituciones en el material genético de la proteína de membrana (M), una sustitución en la proteína de envoltura (E), una delección de tres aminoácidos y tres sustituciones en las proteínas de la nucleocápside (N). Las mutaciones ocurren a lo largo de todo el genoma viral, más de la mitad de las mutaciones de Ómicron se han detectado en la proteína de espiga (S), dichas mutaciones están involucradas en la transmisibilidad, el escape inmunológico y la gravedad de la enfermedad.<sup>27</sup>

#### **2.7.1.6 SUBVARIANTE ÓMICRON BA.2.75**

La subvariante Ómicron BA.2.75 también llamada *Centaurus* se originó en la India reportándose los primeros casos en junio del 2022 y se ha detectado en más de 20 países en todo el mundo. *Centaurus* ha sido de las variantes más contagiosas del SARS-CoV-2, a pesar de ello los índices de hospitalización y mortalidad han sido poco relevantes.<sup>28</sup>

#### **2.7.1.7 SUBVARIANTE ÓMICRON BA.5**

La subvariante Ómicron BA.5 cuenta con varias mutaciones principalmente en la proteína S lo que conlleva a evadir la inmunidad humana sin tantas complicaciones, lo cual genera que se transmita con mayor facilidad al igual que las subvariantes de mayor riesgo derivados de la familia Ómicron.<sup>29</sup>

---

<sup>27</sup> Shao, W.; Zhang, W.; Fang, X.; Yu, D.; Wang, X. Challenges of SARS-CoV-2 Omicron Variant and appropriate countermeasures. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. **2022**, 55 (3), 387-394.

<sup>28</sup> Callaway, E. (2022) Will Centaurus Be The Next Global Coronavirus Variant. *Nature*, vol. 608.

<sup>29</sup> Hansen, C.; Friis, N.; Stegger, M.; Fonager, J.; Fomsgaard, A.; Gram, M.; Christiansen, L.; Ethelberg, S.; Legarth, R.; Krause, T.; Ullum, H.; Valentiner-Branth, P. Risk of reinfection, vaccine protection, and severity of infection with the BA.5 omicron subvariant: a nation-wide population-based study in Denmark. *The Lancet. Infectious diseases*. **2023**, 23 (2), 167-176.

### 2.7.1.8 SUBVARIANTE ÓMICRON BF.7

La subvariante Ómicron BF.7 cuenta con una alta capacidad de trasmisión, aunque se ha reportado que la mortalidad a causa de esta subvariante ha sido poco significativa.<sup>30</sup>

### 2.7.1.9 SUBVARIANTE ÓMICRON BQ.1, BQ.1.1 Y XBB

A finales del año 2022 se detectó en diferentes países la subvariante Ómicron BQ.1 y BQ.1.1, predominando en los Estados Unidos y extendiéndose hasta otros continentes principalmente en Europa. Especialistas mencionan que dichas subvariantes principalmente la BQ.1.1 y la XBB ya son resistentes a las nuevas terapias de anticuerpos, por lo cual es necesario realizar mejoras en el diseño de nuevas moléculas dirigidas hacia SARS-CoV-2.<sup>31</sup>

Las principales mutaciones de las variantes de SARS-CoV-2 se dan en las proteínas estructurales, principalmente en la proteína S, de tal modo la proteína no estructural 3CLpro mantiene el sitio de reconocimiento Cys145-His41 dentro del sitio de unión en casi todos los coronavirus humanos incluyendo a las nuevas variantes de SARS-CoV-2 como lo es la variante Ómicron.<sup>21,32</sup> Por mantener el sitio de reconocimiento en varios de los coronavirus mutantes humanos, la proteasa 3CLpro fue elegida como diana biológica de interés en este trabajo de tesis.

---

<sup>30</sup> Qu, P.; Evans, J.; Faraone, J.; Zheng, Y.; Carlin, C.; Anghelina, M.; Stevens, P.; Fernandez, S.; Jones, D.; Lozanski, G.; Panchal, A.; Saif, L.; Oltz, E.; Xu, K.; Gumina, R.; Liu, S. Enhanced neutralization resistance of SARS-CoV-2 Omicron subvariants BQ.1, BQ.1.1, BA.4.6, BF.7 and BA.2.75.2. *Cell host & microbe*. **2023**, 31 (1), 9-17.

<sup>31</sup> Wang, Q.; Iketani, S.; Li, Z.; Liu, L.; Gou, Y.; Huang, Y.; Bowen, A.; Liu, M.; Wang, M.; Yu, J.; Valdez, R.; Luring, A.; Sheng, Z.; Wang, H.; Gordon, A.; Liu, L.; Ho, D. Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants. *Cell*. **2023**, 186 (2), 279-286.

<sup>21</sup> Kneller, D.; Phillips, G.; Weiss, K.; O'Neill, H.; Coates, L.; Kovalevsky, A. Unusual zwitterionic catalytic site of SARS-CoV-2 main protease revealed by neutron crystallography. *Journal of Biological Chemistry*. **2020**, 295, P17365-17373.

<sup>32</sup> Reina, J.; Iglesias, C. Nirmatrelvir plus ritonavir (Paxlovid) a potent SARS-CoV-2 3CLpro protease inhibitor combination. *Official journal of the Spanish Society of Chemotherapy*. **2022**, 35 (3), 236-240.

## 2.8 SIGNOS Y SÍNTOMAS

La enfermedad COVID-19 afecta a las personas de formas distintas. La mayoría de las personas infectadas por el virus desarrollaran una enfermedad de leve a moderada y se recuperaran sin necesidad de recibir atención en hospital.<sup>33</sup>

Los síntomas presentados se dividen en 3 principalmente.

-Síntomas más comunes: fiebre, tos cansancio y pérdida del gusto.<sup>33</sup>

-Síntomas menos comunes: dolor de garganta, dolor de cabeza, cuerpo cortado, diarrea, erupciones en la piel o decoloración de los dedos de las manos o pies y ojos rojos o irritados.<sup>33</sup>

-Síntomas graves: dificultad para respirar o falta de aire, perdida del habla, problemas de movilidad, confusión, problemas del Sistema Nervioso Central (SNC), dolor de pecho y la más peligrosa es la presencia de neumonía, presentando severo daño a nivel pulmonar dejando secuelas respiratorias importantes, dicha afección ha costado la muerte de gran parte de la población a nivel mundial.<sup>33</sup>

## 2.9 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de cualquier padecimiento o enfermedad dependerá de la historia y del conjunto de signos y síntomas que presente el paciente, donde se determina la situación epidemiológica y otros datos más de valoración que necesita el profesional de la salud. No hay una sola prueba diagnóstica, sino que se incluyen varias posibilidades donde se consideran y valoran prácticas de determinadas exploraciones complementarias y pruebas de laboratorio.<sup>34</sup>

---

<sup>33</sup> Organización Mundial de la Salud. (junio de 2021). *Más información sobre la pandemia de COVID-19.* [https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#tab=tab\\_3](https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#tab=tab_3)

<sup>34</sup> Portal CLINIC. (noviembre 2021) *Diagnóstico del coronavirus SARS-CoV-2.* <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/covid-19/diagnostico>

Para las enfermedades infecciosas es muy importante disponer de pruebas que identifiquen de forma rápida que microorganismo es causante de la enfermedad, dado que eso permite tomar decisiones respecto al manejo y tratamiento farmacológico adecuado para el paciente.<sup>35</sup>

El SARS-CoV-2 no se puede diagnosticar basándose únicamente en los síntomas clínicos que se estén presentando, es necesario detectar al agente causal en una muestra proporcionada por el paciente. Los métodos más comunes de prueba viral incluyen: cultivo de virus, de antígeno y la detección de anticuerpos, la técnica más utilizada y de mejor eficiencia es la detección de ácido nucleico y de antígenos ya que sigue siendo el estándar de oro dado un tiempo de ejecución relativamente corto y una alta especificidad.<sup>35</sup>

## 2.9.1 ALGUNOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2

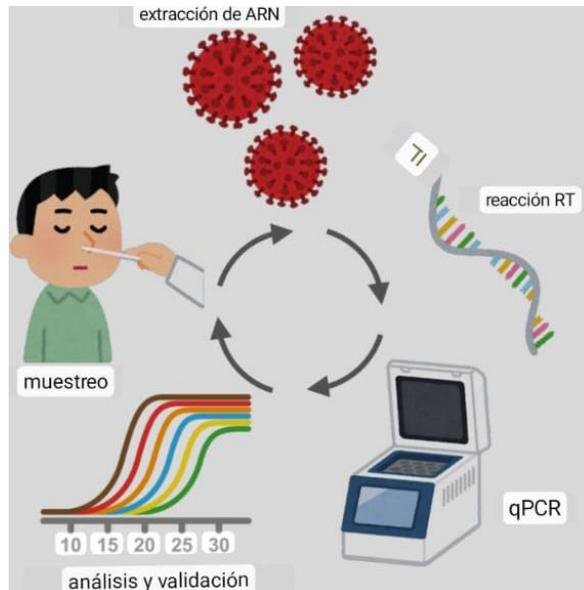
### RT-qPCR EN TIEMPO REAL

Es la prueba diagnóstica estándar de oro para la infección por SARS-CoV-2 dada su sensibilidad, especificidad y velocidad, detecta ARN viral mediante la reacción en cadena polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de transcripción inversa (ilustrada en la **Figura 7**). Esta técnica diagnóstica muestra mejores rendimientos de sensibilidad y especificidad que la serología por identificar casos positivos en la etapa temprana de la infección por SARS-CoV-2.<sup>36</sup>

---

<sup>35</sup> Oh, H.; Ahn, H.; Tripathi, A. A Closer Look into FDA-EUA Approved Diagnostic Techniques of Covid-19. *J. Med. Chem.* **2021**, 7 (10), 2787-2800.

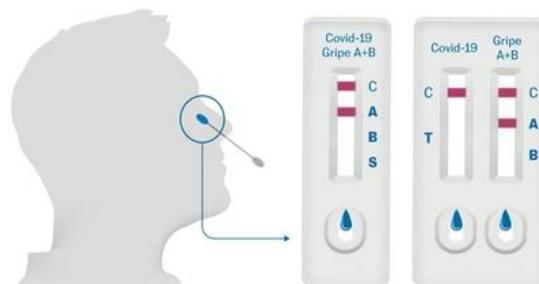
<sup>36</sup> Ribeiro, S. J.; Alves, C. T.; Miranda, K.; Germano, R. P.; Alain, K. P.; Pena, Lindomar. Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. *J. Med. Chem.* **2020**, 6 (9), 2319-2336.



**Figura 7.-** Ilustración de la prueba RT-qPCR. Imagen adaptada de<sup>36</sup>

## PRUEBA DE ANTÍGENOS

Detecta las proteínas del virus llamadas antígenos, estas mismas confirman un contagio con mayor rapidez, y se lleva a cabo en aquellos pacientes que busquen confirmar si sus síntomas son sinónimos de contagio por el virus SARS-CoV-2. Dicho análisis se procesa a partir de una muestra de exudado naso-faríngeo, en la **Figura 8** se hace una representación de dicho ensayo.<sup>37</sup>



**Figura 8.-** Ilustración de un ensayo de antígenos para COVID-19. Imagen adaptada de <sup>36</sup>

<sup>37</sup> Salud Digna-COVID-19. (septiembre 2022). Prueba de Antígenos <https://www.salud-digna.org/antigeno-covid-19/>

## DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

Detecta la cantidad de anticuerpos generados después de la exposición al virus, esta prueba se lleva a cabo en pacientes que tuvieron COVID-19 o que ya fueron vacunados. El estudio es procesado mediante una muestra de sangre como se muestra en la **Figura 9**.<sup>37</sup>



Figura 9.- Representación de un ensayo de detección de anticuerpos.

## 2.10 TRATAMIENTO

### 2.10.1 VACUNAS APROBADAS POR LA FDA Y EN DESARROLLO

En la actualidad existen diferentes tipos de vacunas, diseñadas para reforzar el sistema inmunológico y con ello combatir enfermedades virales. Hasta el día de hoy el tratamiento de primera línea para tratar la COVID-19 ha sido el uso de vacunas, estas se clasifican en cuatro tipos principales:<sup>38</sup>

**Vacunas con virus inactivados o atenuados:** utilizan un virus previamente inactivado o atenuado, de tal modo que no provoca la enfermedad, pero sí genera una respuesta inmunitaria. Algunos ejemplos de estos tipos de vacunas y del laboratorio farmacéutico desarrollador: *CoronaVac* de Sinovac Research and Development Co y BBV152 *Covaxin* de CanSino Biologics Inc.<sup>38</sup>

---

<sup>38</sup> Vacuna COVID-19 (julio 2022). Información de la vacuna. <http://vacunacovid.gob.mx/wordpress/informacion-de-la-vacuna/>

**Vacunas de subunidad proteica:** empujan fragmentos inocuos de proteínas o estructuras proteicas que imitan el virus, con la finalidad de generar una respuesta inmunitaria.<sup>38</sup>

**Vacunas con vectores virales:** utilizan un virus modificado genéticamente que no puede provocar la enfermedad, pero si puede producir proteínas de coronavirus para generar una respuesta inmunitaria segura. Algunos ejemplos de estos tipos de vacunas y del laboratorio farmacéutico desarrollador: AZD1222 *Covishield* de AstraZeneca/Oxford, *Gam-COVID-Vac* de Centro Nacional Gamaleya, Ad5-nCoV *Covidecia* de CanSino Biologics Inc y Ad26.COV2-S de Janssen-Cilag.<sup>38</sup>

**Vacunas con ARN y ADN:** un enfoque pionero que emplea ARN o ADN genéticamente modificados para generar una proteína que por sí sola desencadena una respuesta inmunitaria. Algunos ejemplos de estos tipos de vacunas y del laboratorio farmacéutico desarrollador: BNT162b2, *Comirnaty* de Pfizer, Inc./BioNTech, *Spikevax* de Moderna.<sup>38</sup>

## 2.10.2 FÁRMACOS CONTRA SARS-CoV-2

En la actualidad aún no existe algún fármaco o molécula pequeña para tratar el COVID-19 provocado por SARS-CoV-2, sin embargo, debido a la emergencia sanitaria ocasionada por la misma, se optó por el reposicionamiento de varios fármacos, es decir darles un nuevo uso a fármacos ya existentes en el mercado y con ello tratar de contrarrestar el daño provocado por SARS-CoV-2.<sup>39</sup> En la **Tabla 1** se describen algunos de los fármacos usados para el manejo del COVID-19, según la guía clínica para el tratamiento del COVID-19 en México (en caso de presentar una enfermedad de tipo moderada a grave).<sup>40</sup>

---

<sup>39</sup> Chan, C.; Foster, S. T.; Chan, K. G.; Cacace, M. J.; Ladd, S. L.; Sandum, C. T.; Wright, P. T.; Volmert, B.; Yang, W.; Aguirre, A.; Li, W.; Wright, N. T. Repositioned Drugs for COVID-19-the Impact on Multiple Organs. *SN Compr Clin Med*. 2021; 3 (7), 1484-1501.

<sup>40</sup> Guía Clínica para el Tratamiento de la COVID-19 en México 2022. (marzo 2022). <https://coronavirus.gob.mx/wp-content/uploads/2022/02/2022.02.15-GuiaClinicaTxCOVID.pdf>

**Tabla 1.-** Fármacos reposicionados contra SARS-CoV-2, según la guía clínica para el tratamiento del COVID-19.<sup>40</sup>

Gravedad	Características	Medicamento y criterios de elegibilidad de los pacientes
Leve	Sin evidencia de neumonía o hipoxia, SpO <sub>2</sub> ≥94% al aire ambiente.	Tratamiento sintomático
Moderada	Signos clínicos de neumonía: Fiebre, tos, disnea, respiración rápida.	<p><b>Heparina no fraccionada/enoxaparina:</b> evaluar riesgo de trombosis para indicar el medicamento como trombotoprofilaxis.</p> <p><b>Dexametasona u otros corticosteroides:</b> Administrar exclusivamente en pacientes que requieren oxígeno suplementario para mantener SpO<sub>2</sub>≥94%.</p> <p><b>Remdesivir:</b> en pacientes hospitalizados mayores de 12 años y peso mayor a 40 kilos.</p> <p><b>Tocilizumab:</b> en pacientes con uso actual o previo de esteroide, a quienes no se les haya aplicado otro inhibidor de IL-6 durante el internamiento actual.</p> <p><b>Molnupiravir:</b> dosis habitual de 800 mg cada 12 horas, por 5 días, administrado por vía oral.</p> <p><b>Sotrovimab:</b> dosis habitual 500 mg, dosis única, administrado en infusión por vía intravenosa.</p>
Grave	Signos clínicos de neumonía: fiebre, tos, disnea, respiración rápida. Más 1 de los siguientes: -Frecuencia respiratoria superior a 30 respiraciones por minuto. -Dificultad respiratoria grave. -SpO <sub>2</sub> <90% al aire libre.	<p><b>Heparina no fraccionada/enoxaparina:</b> evaluar riesgo de trombosis para indicar el medicamento como trombotoprofilaxis.</p> <p><b>Dexametasona u otros corticosteroides:</b> Administrar exclusivamente en pacientes que requieren oxígeno suplementario.</p> <p><b>Tocilizumab:</b> en pacientes con uso actual o previo de 10 días de esteroide, a quienes no se les haya aplicado otro inhibidor de IL-6 durante el internamiento actual, y cuando no haya evidencia de otra infección bacteriana o viral (aparte de SARS-CoV-2). SpO<sub>2</sub>: saturación de oxígeno.</p>
SpO <sub>2</sub> : saturación de oxígeno		

## 2.10.2.1 FARMACOS ANTICOAGULANTES

### 2.10.2.1.1 HEPARINA NO FRACCIONADA / ENOXAPARINA

Empleados para la prevención de trombosis en pacientes hospitalizados y ambulatorios que lo requieran. Para el uso de estos fármacos primeramente se debe

de estratificar el riesgo de tromboembolismo venoso (coágulos de sangre) y el riesgo de sangrado. La heparina y enoxaparina han demostrado beneficios favorables al evitar eventos tromboembólicos en pacientes que requieran trombopprofilaxis.<sup>41</sup>

Algunos pacientes graves, pueden presentarse eventos de trombocitopenia y alteraciones en la coagulación que se considera regulada por varias citocinas inflamatorias y son correlacionadas con mortalidad. La Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia Internacional (ISTH por sus siglas en inglés) y la Sociedad Americana de Hematología (ASH por sus siglas en inglés) sugirieron que todos los pacientes hospitalizados por COVID-19 deben de recibir trombopprofilaxis o anticoagulación. La eficacia del uso de heparina reporta valores favorables al reducir la mortalidad en pacientes con COVID-19.<sup>41</sup>

La heparina (**Figura 10**) en combinación con antitrombina III (un cofactor de la heparina), pueden inhibir la trombosis al inactivar el factor Xa y la trombina. Una vez que se ha desarrollado la trombosis activa, cantidades mayores de heparina pueden inhibir la coagulación adicional al inactivar la trombina y prevenir la conversión de fibrinógeno en fibrina. La heparina también previene la formación de un coágulo de fibrina estable al inhibir la activación del factor estabilizador de fibrina.<sup>42</sup>

La enoxaparina aumenta el tiempo de trombina (TT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), previniendo y reduciendo las complicaciones tromboembólicas como la trombosis venosa profunda (TVP), la embolia y las complicaciones cardíacas isquémicas.<sup>43</sup>

---

<sup>41</sup> Mendoza-Pinto, C.; García-Carrasco, M.; Munguía, P; Méndez-Martínez, S. Therapeutic Options in Managing the Severity of COVID-19: a Rheumatology Perspective. *Clinical Rheumatology*. **2021**, 17 (8), 431-436.

<sup>42</sup> DrugBank. (marzo 2022). *Mecanismo de Acción de la Heparina*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01109>

<sup>43</sup> DrugBank. (marzo 2022). *Mecanismo de Acción de la Enoxaparina*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01225>

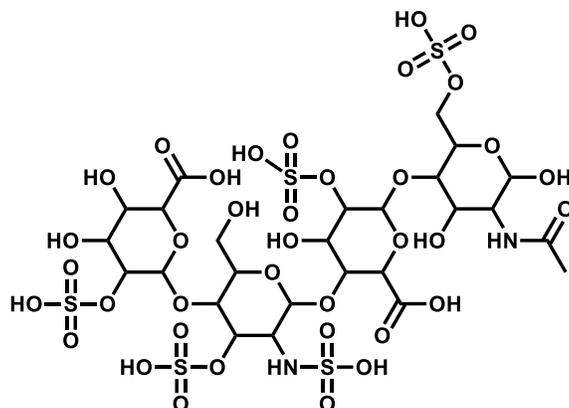


Figura 10.- Estructura química de la heparina.

## 2.10.2.2 FÁRMACOS ANTIVIRALES

### 2.10.2.2.1 REMDESIVIR

Uso para pacientes hospitalizados con gravedad moderada.

Remdesivir (**Figura 11**) es un profármaco, análogo estructural del monofosfato de adenosina (AMP) el cual interfiere con la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp) del SARS-CoV-2. Como posible mecanismo de acción inhibe la síntesis de ARN viral.<sup>44</sup>

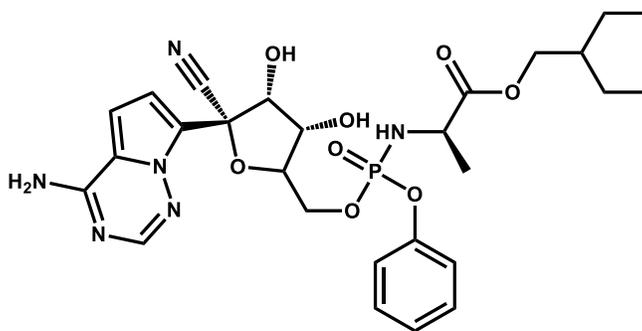


Figura 11.- Estructura química del Remdesivir.

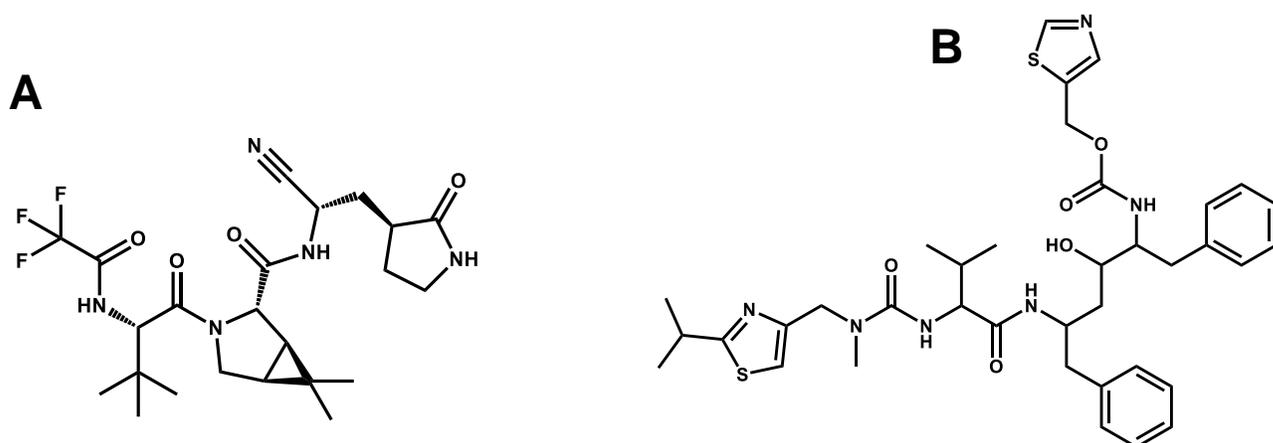
### 2.10.2.2.2 PAXLOVID (NIRMATRELVIR + RITONAVIR)

Surgió una notable eficacia clínica cuando se combinó Nirmatrelvir (**Figura 12, A**) con Ritonavir (**Figura 12, B**), esta combinación redujo en un 89% el riesgo de

<sup>44</sup> Yan, V. C.; Muller, F. L. Advantages of the Parent Nucleoside GS-441524 over Remdesivir for Covid-19 Treatment. *J. Med. Chem.* **2020**, 11 (7), 1361-1366.

hospitalización o muerte por COVID-19. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) otorgó la autorización del uso de emergencia de Paxlovid (nirmaltrevir + ritonavir) en diciembre de 2021.<sup>45</sup>

Paxlovid inhibe a la proteasa de cisteína similar a la quimiotripcina (3CLpro) y es activo por vía oral. Paxlovid tiene autorización de comercialización condicional en el Reino Unido para el tratamiento de COVID-19 en personas adultas que no requieran oxigenación y que se consideran en riesgo de hospitalización.<sup>46</sup> El uso de Paxlovid en México deberá de indicarse en pacientes no hospitalizados con COVID-19 de leve a moderado que presenten riesgo de progresión de la enfermedad.<sup>47</sup>



**Figura 12.-** A: estructura química del Nirmatrelvir, B: estructura química de Ritonavir.

<sup>45</sup> Duveau, D. Y.; Thomas, C. J. The Remarkable Selectivity of Nirmatrelvir. *ACS Pharmacology & Translational Science*. **2022**, 5 (6), 445-447.

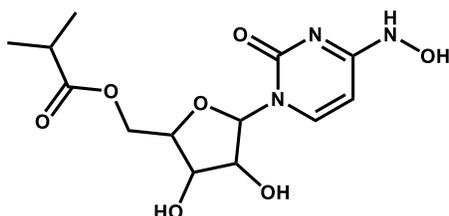
<sup>46</sup> Coulson, J. M.; Adams, A.; Gray, L. A.; Evans, A. COVID-19 “Rebound” associated with nirmatrelvir/ritonavir pre-hospital therapy. *Journal of Infection*. **2022**.

<sup>47</sup> Guía rápida de prescripción clínica en el uso de emergencia de Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir) en grupos de riesgo para COVID-19, en Mexico 2022-2023. (abril **2023**) [https://coronavirus.gob.mx/wp-content/uploads/2023/01/Gui%C3%A1-r%C3%A1pida-de-prescripci%C3%B3n-Paxlovid\\_160123.pdf](https://coronavirus.gob.mx/wp-content/uploads/2023/01/Gui%C3%A1-r%C3%A1pida-de-prescripci%C3%B3n-Paxlovid_160123.pdf)

### 2.10.2.2.3 MOLNUPIRAVIR

Molnupiravir (**Figura 13**) es un profármaco de tipo éster utilizado en pacientes con gravedad de leve a moderada. Molnupiravir es un inhibidor de RdRp activo por vía oral con un buen perfil farmacocinético, ha recibido una atención favorable debido a su buena capacidad para inhibir la replicación del SARS-CoV-2, eliminar el SARS-CoV-2 rápidamente, reducir la carga viral y recuperación inmediata en pacientes.<sup>47</sup>

Además, molnupiravir ha demostrado una buena eficacia y seguridad en ensayos clínicos de fase I, II y III. Los estudios reportados demuestran que molnupiravir reduce el riesgo de hospitalización o muerte en aproximadamente un 50% en adultos no hospitalizados con enfermedad de leve a moderada por COVID-19.<sup>48</sup>



**Figura 13.-** Estructura química del Molnupiravir.

### 2.10.2.2.4 TRIAZAVIRINA

Triazavirina (**Figura 14**) es un fármaco antiviral sintético desarrollado en Rusia para administrarse por vía oral, participa en ensayos clínicos para combatir el SARS-CoV-2. La triazavirina posee eficacia contra una amplia gama de virus de la gripe, incluida la cepa H5N1. Debido a la similitud entre H5N1 y SARS-CoV-2, la triazavirina se considera como una opción para el tratamiento del COVID-19.<sup>49</sup>

<sup>48</sup> Wen, W.; Chen, C.; Tang, J.; et al. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis. *Ann. Med.* **2022**, 54 (1), 516-523.

<sup>49</sup> Valiulin, S. V.; Onischuk, A. A.; Dubtsov, S.N.; et al. Aersol Inhalation Delivery of Triazavirin in Mice: Outlooks for Advanced Therapy Against Novel Viral Infections. *J Pharmaci Sci.* **2021**, 110 (3), 1316-1322.

El mecanismo principal de triazavirina es inhibir la síntesis de ARN viral y prevenir la replicación de fragmentos genómicos.<sup>50</sup>

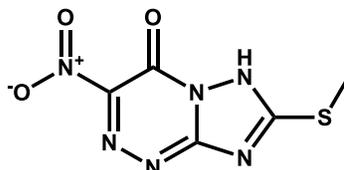


Figura 14- Estructura química del Triazavirina.

### 2.10.2.2.5 UMIFENOVIR

Umifenovir (**Figura 15**) es un antiviral de amplio espectro con actividad demostrada contra diferentes tipos de virus. Ha recibido aprobación para el tratamiento y profilaxis de infecciones virales respiratorias agudas (incluida la influenza A, B) en Rusia (1993) y China (2006). Umifenovir es seguro y bien tolerado en humanos. Umifenovir es un agente viral de amplio espectro que actúa contra numerosos virus, el de la gripe, hepatitis B y C, agentes de gastroenteritis, ébola, herpes y algunos flavovirus transmitidos por artrópodos. Estudios *in silico* han demostrado que umifenovir inhibe la adhesión del SARS-CoV-2 a los receptores ACE2 de la célula huésped al impedir la trimerización de la glicoproteína espiga. Umifenovir se ha empleado en Rusia, China e Irán para tratar a pacientes con COVID-19, ya sea solo o en combinación con otros fármacos de tipo antiviral.<sup>51</sup>

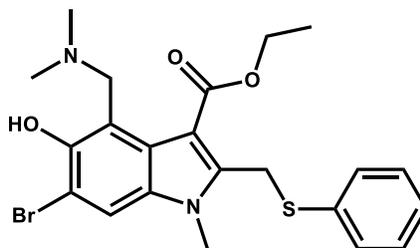


Figura 15.- Estructura química del Umifenovir.

<sup>50</sup> Wu, X.; Yu, K.; Wang, Y.; Xu, W.; Ma, H.; et al. The Efficacy and Safety of Triazavirin for COVID-19: A Trial Protocol. *Engineering*. **2020**, 6 (10), 1199-1204.

<sup>51</sup> Leneva, I.; Kartashova, N.; Poromov, A.; Gracheva, A.; Korchevaya, E; et al. Antiviral Activity of Umifenovir In Vitro against a Broad Spectrum of Coronaviruses, Including the Novel SARS-CoV-2 Virus. *Viruses*. **2021**, 13 (8), 1665.

## 2.10.2.3 ANTICUERPOS MONOCLONALES

### 2.10.2.3.1 TOCILIZUMAB

Empleado para pacientes con gravedad de moderada a severa.

La Comisión Nacional de Salud de China recomienda el tocilizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado inhibidor del receptor de la interleucina-6 (IL-6R), para el tratamiento en pacientes graves y en estado crítico con niveles elevados de IL-6. Estudios reportados informan que varios casos han demostrado que tocilizumab podría mejorar las manifestaciones clínicas de pacientes gravemente enfermos con COVID-19.<sup>52</sup>

## 2.10.2.4 CORTICOSTEROIDES

### 2.10.2.4.1 DEXAMETASONA

Dexametasona (**Figura 16**) es un inmunosupresor empleado en COVID-19 moderado a grave para pacientes que requieran de oxígeno suplementario.

En numerosas ocasiones, las complicaciones del COVID-19 resultan de la exacerbación de la inflamación periférica y neuronal derivada de las llamadas comúnmente tormentas de citoquinas. La dexametasona no se debe aplicar desde el inicio de la infección cuando la inflamación favorece el control de la replicación viral y el establecimiento de una respuesta inmune adaptativa que sirva para poder controlar la infección. Una dosis baja de dexametasona (6 mg por paciente durante 10 días) ha controlado rápida y eficazmente la inflamación pulmonar con efectos adversos mínimos. Además, la ruta intranasal permitiría el acceso directo de dexametasona al Sistema Nervioso Central a través de los nervios olfatorio y trigémino, controlando así la neuroinflamación sostenida, provocada por el daño a astrocitos, neuronas y microglia infectados. Por lo cual, se podría disminuir la

---

<sup>52</sup> Nugroho, C. W.; Suryantoro, S.D.; Yuliasih, Y.; Rosyid, A. N.; Asmarawati, T.P.; et al. Optimal use of tocilizumab for severe and critical COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *F1000Res*. **2021**.

insuficiencia cardíaca y respiratoria central en pacientes con COVID-19, evitando fatalidades.<sup>53</sup>

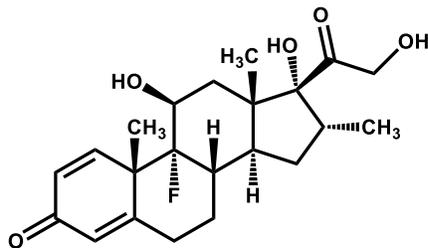


Figura 16.- Estructura química de la Dexametasona.

### 2.10.3 REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS Y SU IMPORTANCIA PARA COMBATIR EL SARS-CoV-2.

Producir un nuevo medicamento y posteriormente lanzarlo al mercado es un trabajo sumamente complejo ya que se requiere de múltiples estudios tanto preclínicos como clínicos, y monitoreos constantes de seguridad y eficacia para garantizar los efectos deseados en el paciente. De la misma manera producir un medicamento tomando en cuenta los estudios de investigación hasta su comercialización conlleva una gran cantidad de tiempo, aproximadamente de 15 a 20 años y un costo muy alto.<sup>54</sup>

Por tal motivo, el reposicionamiento de fármacos o reutilización de fármacos, que se refiere al proceso de identificar usos terapéuticos nuevos a fármacos ya existentes y disponibles en el mercado, reduciendo principalmente el tiempo, los costos y los riesgos del proceso tradicional de descubrimiento de fármacos. El método de reposicionamiento se basa en datos de fármacos y enfermedades

<sup>53</sup> Cardenas, G.; Chavez-Cardenas, M.; Espinoza, A. M.; et al. Intranasal dexamethasone: a new clinical trial for the control of inflammation and neuroinflammation in COVID-19 patients. *Trials*. **2022**, 23 (1), 148. 2022 Feb 14.

<sup>54</sup> Hameed, P.; Verspoor, K.; Kusljic, S.; Halgamuge, S. A two-tiered unsupervised clustering approach for drug repositioning through heterogeneous data integration. *BMC bioinformatics*. **2018**, 19 (1), 129.

existentes y bien reportados en la literatura, lo cual puede facilitar y optimizar los estudios de investigación.<sup>54,55</sup>

Hoy en día el enfoque de reposicionamiento de fármacos ha adquirido una nueva urgencia debido a la problemática sanitaria provocada por el virus SARS-CoV-2. El rápido inicio de la pandemia y el alto número de contagios provocó una recurrencia a los medicamentos ya disponibles en la terapéutica para tratar de detener el virus SARS-CoV-2<sup>56</sup> en donde se emplearon distintos grupos de fármacos como: los distintos tipos de fármacos antivirales, anticuerpos monoclonales, anticoagulantes y corticosteroides, antes mencionados.

### **2.10.3.1 BLOQUEADORES DE LOS CANALES DE CALCIO**

Los bloqueadores de canales de calcio (BCC) fueron aprobados por la FDA como fármacos reposicionados contra SARS-CoV-2, esto debido a los buenos resultados demostrados en los distintos tipos de ensayos, tanto *in vitro* como *in vivo* y al igual en estudios clínicos lo que permitió su uso en varios pacientes con SARS-CoV-2.<sup>57,58</sup>

#### **2.10.3.1.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS BCC**

Los BCC bloquean los canales de calcio de tipo L activados por voltaje en el músculo liso vascular y las células del miocardio. Este bloqueo evita la entrada de iones

---

<sup>55</sup> Jarada, T.; Rokne, J.; Alhaji, R. A review of computational drug repositioning: strategies, approaches, opportunities, challenges, and directions. *Journal of cheminformatics*. **2020**, 12 (1), 46.

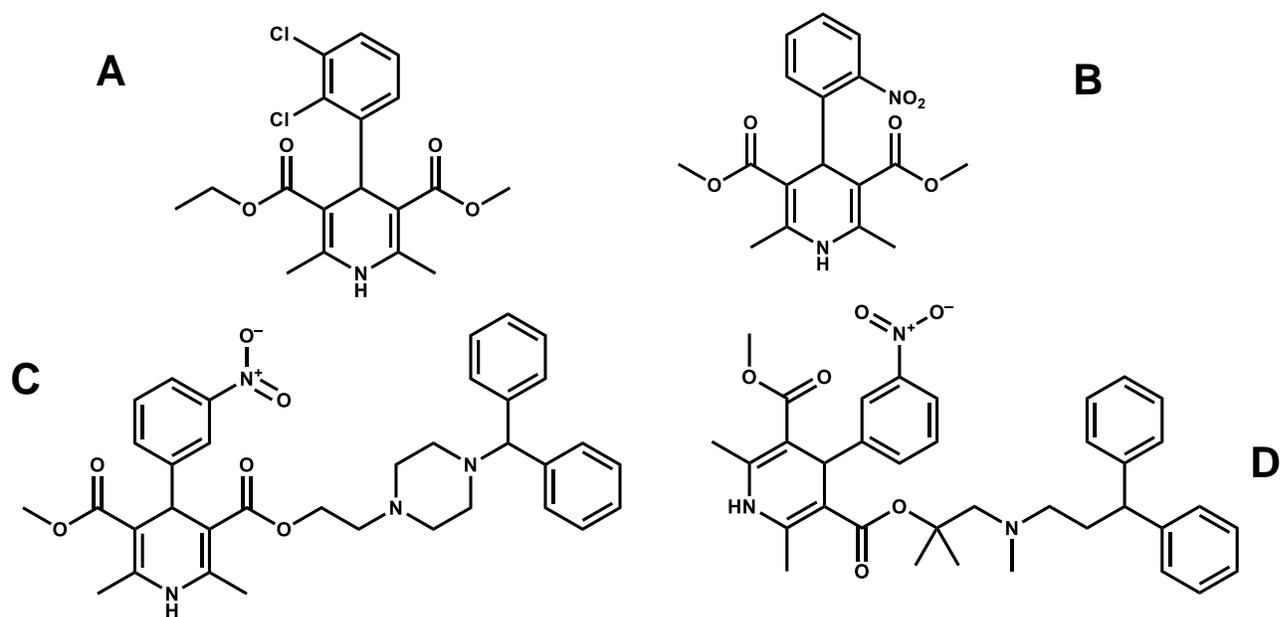
<sup>56</sup> Manohar, K.; Gupta, R. K.; Gupta, P.; Saha, D.; Gare, S.; et al. FDA approved L-type channel blocker Nifedipine reduces cell death in hypoxic A549 cells through modulation of mitochondrial calcium and superoxide generation. *Free Radic Biol Med*. **2021**, 177, 189-200

<sup>57</sup> Straus, M. R.; Bidon, K.; Tang, T.; Jaimes, J. A.; Whittaker, G. R.; Daniel, S. Inhibitors of L-type calcium channels show therapeutic potential for treating SARS-CoV-2 infections by preventing virus entry and spread. **2020**.

<sup>58</sup> Charan, C. Calcium Channel Blockers: A Possible Potential Therapeutics Strategy for the Treatment of Alzheimer's Dementia Patients with SARS-CoV-2 Infection. *ACS Chemical Neuroscience*. 2020, 11 (15), 2145-2148.

calcio en las células durante la despolarización, lo que reduce la resistencia vascular arterial periférica y dilata las arterias coronarias.<sup>59</sup>

Los BCC destacan por tener un efecto inhibitorio en el bloqueo de la replicación viral, el cual puede ser un mecanismo para impedir la propagación del virus y otro de los posibles mecanismos de acción que aún está en etapas de investigación es mediante la inhibición de la proteasa principal (Mpro/3CLpro) de SARS-CoV-2 en donde se ha reportado que la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) *in vitro* de manidipina es de 4.8 μM y la de lercanidipina es de 16.2 μM<sup>82</sup>, por tal motivo, en este trabajo de tesis se hace la propuesta de una serie de compuestos análogos de nifedipina con acción peptidomimética contra 3CLpro de SARS-CoV-2. En la **Figura 17** se muestran los BCC con mejores propiedades de inhibición tanto *in silico* como *in vitro* contra SARS-CoV-2.<sup>57,82</sup>



**Figura 17.-** Estructuras químicas de los BCC: **A)** Felodipina, **B)** Nifedipina, **C)** Manidipina y **D)** Lercanidipina.

<sup>59</sup> DrugBank. (diciembre 2020). *Mecanismo de Acción de nifedipina y BBC*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01115>

<sup>82</sup> Ghahremanpour, M.; Tirado-Rives, J.; Deshmukh, M.; Ippolito, J. A.; Zhang, C. H.; Cabeza de Vaca, I.; Liosi, M. E.; Anderson, K. S.; Jorgensen, W. Identification of 14 Known Drugs as Inhibitors of the Main Protease of SARS-CoV-2. *Medicinal Chemistry Letters*. 2020, 11 (12), 2526-2533.

### **2.10.3.1.2 IMPORTANCIA DE LOS CANALES DE CALCIO PARA INHIBIR LA REPLICACIÓN DEL SARS-CoV-2**

Los canales de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) se han convertido en factores clave del hospedero para adquirir una variedad de infecciones virales. De manera general, se ha demostrado que los BCC tienen gran potencial antiviral y se ha aprobado el uso de estas moléculas como fármacos reposicionados contra SARS-CoV-2.<sup>56</sup> Estudios reportados mencionan que los coronavirus, como el SARS-CoV-2 utilizan iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para la entrada viral, a través de la coordinación del ion por residuos de aminoácidos dentro del péptido de fusión conservado de la proteína S.<sup>57</sup> También se menciona que los virus pueden alterar la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de las células hospederas. Así como modular los mecanismos de transducción de señales. Los organismos virales también pueden secuestrar los canales y bombas de calcio de la célula hospedera para liberar más  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y utilizarlo para su ciclo de vida. La información bibliográfica también menciona que, ya está bien establecido que el  $\text{Ca}^{2+}$  es esencial para la entrada viral, la replicación de genes virales, maduración y liberación de viriones.<sup>58</sup>

### **2.10.4 PEPTIDOMIMÉTICOS Y SU IMPORTANCIA COMO COMPUESTOS ANTIVIRALES**

Los peptidomiméticos son compuestos análogos de péptidos con capacidad de imitar los elementos estructurales y la funcionalidad de los péptidos naturales conservando la capacidad de interactuar con los residuos de aminoácidos de interés en el sitio blanco y llevar a cabo el mismo efecto biológico.<sup>60</sup>

Actualmente los peptidomiméticos se han empleado ampliamente para el desarrollo de moléculas antivirales inhibidores de proteasa 3CLpro de SARS-CoV-2, en donde se ha reportado la función inhibidora en el residuo Cys145 deteniendo así la actividad catalítica de 3CLpro.<sup>22</sup> Por lo que en el presente proyecto se propone una

---

<sup>60</sup> Del Gatto, A.; Cobb, S.; Zhang, J.; Zaccaro, L. Peptidomimetics: Synthetic Tools for Drug Discovery and Development. *Front Chem.* **2021**.

<sup>22</sup> Hu, Q.; Xiong, Y.; Zhu, G. H.; Zhang, Y. N.; Zhang, Y. W.; Huang, P.; Ge, G. The SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19. *MedComm.* **2022**, 3 (3), e151.

serie de compuestos análogos de nifedipina pero con acción peptidomimética (**MEO 1-3**), intercambiando la función éster por una amida (enlace peptídico) para que intervengan en el sitio de reconocimiento de la proteasa 3CLpro inhibiendo su función catalítica, pero sin unirse covalentemente con la enzima viral, y mucho menos con enzimas del hospedero, reduciendo así su toxicidad.

## 3.JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de COVID-19 provocada por el virus SARS-CoV-2 que dio inicio en Wuhan China registra un elevado número de muertes en todo el mundo. Actualmente las moléculas pequeñas para tratar el padecimiento provocado por el Síndrome Respiratorio Agudo Grave son escasas, por lo que se dio la necesidad de recurrir al reposicionamiento de fármacos es decir darles un uso nuevo a fármacos ya existentes en el mercado. En este sentido, destacan los fármacos Bloqueadores de los Canales de Calcio (BCC) que han mostrado impedir la replicación viral de SARS-CoV-2 al inhibir la actividad catalítica de la proteasa principal 3CLpro.

Por consiguiente, en el presente proyecto químico-farmacéutico se propone el diseño y evaluación *in silico* de una serie de moléculas de tipo amidas dihidropiridinicas análogas de nifedipina con acción peptidomimética sobre 3CLpro y que además presenten buenas propiedades ADMET que garanticen su adecuado perfil farmacocinético y baja toxicidad, con la finalidad de aportar alternativas terapéuticas contra el COVID-19 ocasionada por SARS-CoV-2.

## 4. HIPÓTESIS

Los compuestos diseñados de tipo amidas dihidropiridínicas análogas de nifedipina (**MEO 1-4**), mostrarán efecto peptidomimético, baja toxicidad y afinidad *in silico* a la proteasa principal (Mpro/3CLpro), y representan un tratamiento potencial para COVID-19.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar y evaluar *in silico* las propiedades fisicoquímicas, el perfil farmacodinámico, farmacocinético y toxicológico, así como la afinidad a la proteasa principal (Mpro/3CLpro) de los compuestos peptidomiméticos análogos de Nifedipina.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

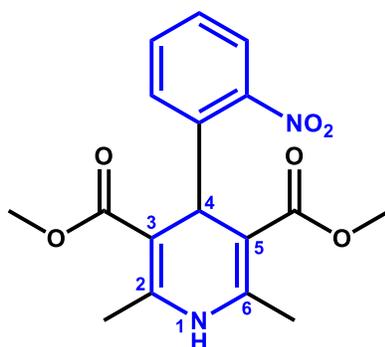
- Diseñar 4 compuestos peptidomiméticos análogos de nifedipina (**MEO 1-4**).
- Calcular *in silico* las propiedades fisicoquímicas, farmacodinámicas y ADME-Tox utilizando diversos programas y servidores quimio-informáticos.
- Realizar un estudio de acoplamiento molecular para dilucidar el posible modo de unión de (**MEO 1-4**) sobre la proteína cristalográfica de la proteasa principal (Mpro/3CLpro) de SARS-CoV-2.
- Realizar un Análisis de Consenso Farmacológico de los compuestos (**MEO 1-4**) para obtener los posibles candidatos computacionales seguros para su futura síntesis, caracterización estructural y evaluación biológica.
- Proponer una ruta de síntesis para los compuestos diseñados para su obtención futura.

## 6. CONSIDERACIONES DEL DISEÑO MOLECULAR

Para las consideraciones del diseño de los compuestos **MEO 1-4**, se tomaron en cuenta ciertos criterios importantes como son: bases para el diseño molecular, bioisosterismo y postulados de Lipinski o regla de los 5's, con la finalidad de conseguir compuestos que presenten mejores interacciones en su sitio de unión, mejores propiedades fisicoquímicas y posiblemente un buen perfil farmacocinético.<sup>61</sup>

### 6.1 BASES PARA EL DISEÑO MOLECULAR

El diseño de los compuestos **MEO 1-4** se basó en el farmacóforo (parte de la molécula que es responsable de la acción farmacológica) presente en la nifedipina (**Figura 18**). La estructura dihidropiridínica y el fenilo en posición 4 forman parte del grupo farmacofórico responsable de llevar a cabo y potenciar el efecto biológico. Mientras que los sustituyentes en las posiciones 3 y 5 actúan como la parte auxofórica, la cual reforzará las interacciones del farmacóforo dentro del sitio de unión.<sup>62</sup>



**Figura 18.-** Grupo farmacofórico presente en la Nifedipina.

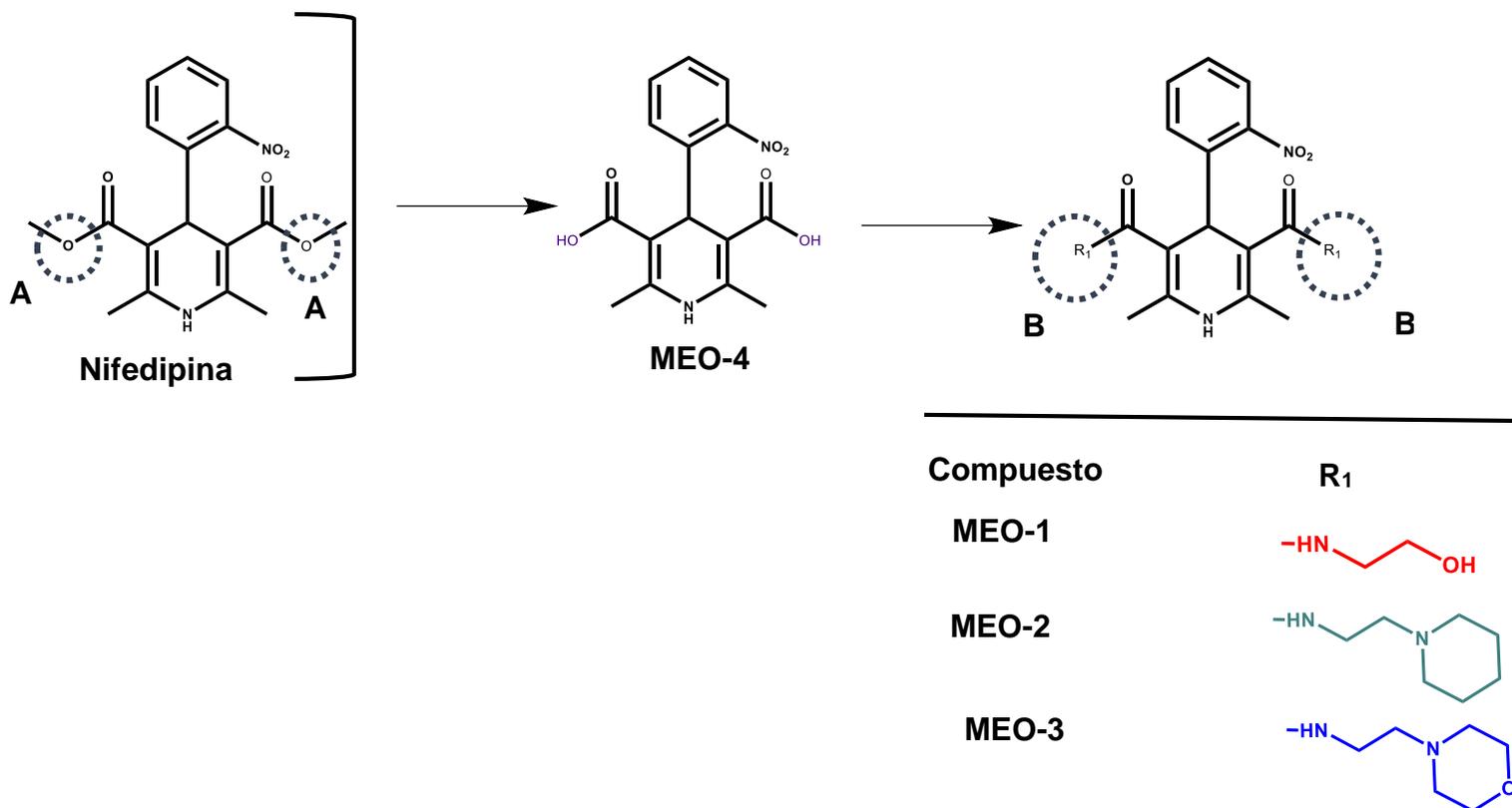
<sup>61</sup> Martínez Conde, Carlos. Síntesis y Evaluación In Silico de Benciloxibencilidenbarbituratos con Afinidad a Múltiples Blancos (multi target) para el Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo II. Tesis de Licenciatura, Facultad de Farmacia UAEM., **2015**.

<sup>62</sup> Morales Montecinos, Juan. Caracterización Electroquímica y Reactividad con Radicales 3,4 dihidroxifenil, 3,5 dihidroxifenil y C-4 Galato 1,4 Dihidropiridinas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile., **2007**.

## 6.2 BIOISOSTERISMO

Un bioisostero se define como un compuesto resultante del intercambio de un átomo o de un grupo de átomos con otro, con similitud en sus características tanto químicas como físicas, con el objetivo de crear un nuevo compuesto con propiedades biológicas similares a las del compuesto original.<sup>63</sup>

Para la obtención de la serie de compuestos **MEO 1-4** se realizaron diferentes cambios en la parte auxofórica, con la finalidad de reforzar las interacciones en el sitio de unión por lo que la actividad podría verse favorecida, ya que los enlaces éster fueron reemplazados por enlaces amida (tipo peptídico), los cuales son reconocidos más fácilmente por las enzimas proteasas/peptidasas (**Figura 19**).



**Figura 19.-** Diseño de la serie de compuestos **MEO 1-4** basado en el reemplazo bioisostérico del fármaco base Nifedipina.

<sup>63</sup> Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. Glossary of Terms Used in. *Pure and Applied Chemistry* **1998**, 70(5), 1129–1143.

**A)** Para el diseño del compuesto **MEO-4** se hizo una disminución de las cadenas laterales partiendo de la nifedipina para obtener al homólogo inferior pasando de ésteres a grupos de ácido carboxílico (dada por la hidrólisis básica de la nifedipina).

**B)** Reemplazo bioisostérico bivalente de oxígeno por nitrógeno y además de una homologación de las cadenas alifáticas teniendo al 2-Aminoetanol, *N*-(2-aminoetil) piperidina y 4-(2-aminoetil) morfolina, para formar a los compuestos **MEO-1**, **MEO-2** y **MEO-3** respectivamente, dichas modificaciones estructurales en la parte auxofórica podrían aumentar las interacciones con los residuos de aminoácidos de interés dentro del sitio biológico, ya que al ser enlaces amida pueden mimetizar a los enlaces peptídicos y ser mejor reconocidas por la proteasa principal (Mpro/3CLpro) de SARS-CoV-2.

### 6.3 POSTULADOS DE LIPINSKI

Para obtener un diseño racional de moléculas bioactivas como potenciales candidatos a fármacos, en la química farmacéutica se contemplan diferentes parámetros con la finalidad de incrementar la probabilidad del éxito.

Los postulados de Lipinski son 4 parámetros (peso molecular, log P, número de donantes de puentes de hidrógeno y número de aceptores de puentes de hidrógeno) que se asocian con la permeabilidad, absorción y biodisponibilidad de los compuestos que permean exclusivamente por un sistema celular mediante difusión pasiva.<sup>64</sup>

Habrán problemas de permeabilidad, absorción y biodisponibilidad<sup>64</sup> cuando:

- Hay más de 5 donadores de puentes de hidrógeno
- El número de aceptores de puentes de hidrógeno es más de (2x5=10)
- El peso molecular (PM) de la molécula es mayor a 500g/mol
- Un valor de lipofilidad (log P) mayor de 5

---

<sup>64</sup> Lipinski, C.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery* **1997**, 23 (1-3), 3–25.

Es importante considerar los postulados de Lipinski en el diseño racional de moléculas bioactivas para obtener un mayor éxito. Para la determinación de dichas reglas se hizo uso del programa químio-informático Molinspiration Cheminformatics el cual se encuentra disponible de manera gratuita en la red (sitio web <http://molinspiration.com/>).<sup>65</sup>

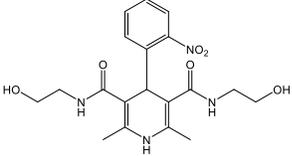
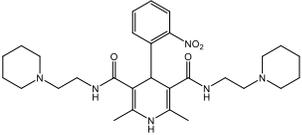
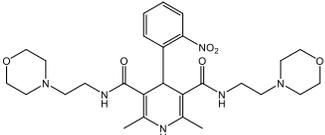
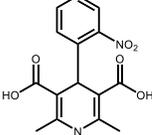
Los compuestos diseñados no deben de presentar más de dos violaciones a las reglas de Lipinski de lo contrario las moléculas diseñadas tendrán altas probabilidades de presentar problemas de absorción y de permeabilidad.

Los resultados obtenidos para la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** se visualizan en la **Tabla 2**, donde se puede observar que los compuestos diseñados no presentan más de dos violaciones a estas reglas por lo que se podría decir que presentarán una buena absorción por difusión pasiva, a excepción del compuesto **MEO-3** el cual presenta dos violaciones a dicho criterio.

---

<sup>65</sup> Molinspiration Cheminformatics disponible en la web: <https://www.molinspiration.com/> . Fecha de consulta: marzo 2021.

**Tabla 2.-** Resultados obtenidos de las propiedades calculadas en Molinspiration Cheminformatics de los compuestos **MEO 1-4.**

Compuesto	cLogP <5	Peso molecular <500 g/mol	nOH <10	nOHNH <5	Número de violaciones
<b>MEO-1</b> 	0.30	404	10	5	0
<b>MEO-2</b> 	3.44	538	10	3	1
<b>MEO-3</b> 	1.31	542	12	3	2
<b>MEO-4</b> 	1.84	318	8	3	0
nOH: Número de aceptores de puentes de hidrógeno. nOHNH: Número de donadores de puentes de hidrógeno.					

# 7.METODOLOGÍA

La metodología utilizada en este proyecto de tesis se dividió en dos partes:

## 7.1 PARTE COMPUTACIONAL (*IN SILICO*)

Se llevó a cabo con el apoyo de diversos programas y servidores quimio-informáticos, los cuales calculan y predicen las posibles propiedades del perfil farmacodinámico (PASSonline, acoplamiento molecular), farmacocinético (ADMETlab, SwissADME, admetSAR, Pre-ADMET), Físicoquímico (Molinspiration, SwissADME) y toxicológico (ADMETlab, admetSAR, ACD/Toxsuite). Estos estudios se llevaron a cabo en el Laboratorio 5 de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección del Dr. Gabriel Navarrete Vázquez.

### 7.1.1 ANÁLISIS DE CONSENSO FARMACOLÓGICO.

El análisis de consenso farmacológico es una herramienta que recopila los diferentes resultados obtenidos por los distintos servidores quimio-informáticos empleados, en donde se incluyen las siguientes predicciones:

- Predicciones físicoquímicas
- Predicciones del perfil farmacodinámico
- Predicciones del perfil farmacocinético
- Predicciones del perfil toxicológico

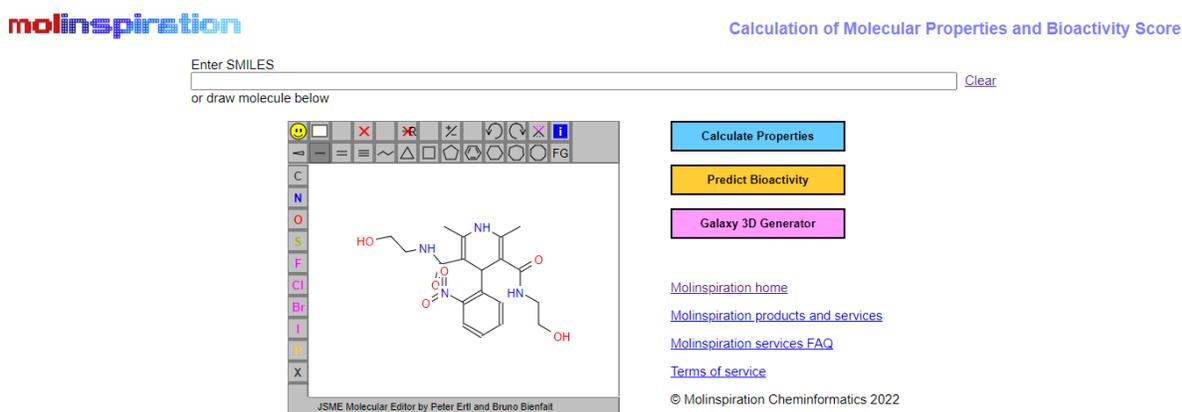
El fundamento del análisis de consenso farmacológico menciona que cuanto mayor sea la coincidencia de los valores esperados, proporcionados por los distintos programas utilizados, mayor será la probabilidad de que los compuestos diseñados presenten buenas propiedades en los distintos perfiles evaluados, incluyendo las

propiedades fisicoquímicas y con ello obtener una selección o discriminación más confiable de que un compuesto o una serie de compuestos diseñados presenten un efecto biológico. De modo que el compuesto o la serie de compuestos que presenten resultados más óptimos serán candidatos para su futura síntesis, caracterización estructural y su posterior evaluación biológica.

## 7.1.1.1 PREDICCIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS/BIOFARMACÉUTICAS

### 7.1.1.1.1 MOLINSPIRATION

Molinspiration Cheminformatics (**Figura 20**) es un software que se encuentra disponible en la red de manera gratuita. Molinspiration Cheminformatics apoya a la comunidad de investigación de diseño y descubrimiento de fármacos, donde se obtienen cálculos de propiedades moleculares importantes como: cLog P, área de superficie polar, número de donantes de puentes de hidrógeno, número de aceptores de puentes de hidrógeno, así como la puntuación de la posible actividad biológica y el peso molecular, números de enlaces rotables, etc., importantes para el diseño racional de compuestos bioactivos. Molinspiration arroja también valores de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas.<sup>65</sup> Se puede acceder en la dirección web <https://www.molinspiration.com/>



**Figura 20.-** Interfaz del programa en línea Molinspiration Cheminformatics.

## 7.1.1.2 PREDICCIÓN DEL PERFIL FARMACODINÁMICO

### 7.1.1.2.1 PASS ONLINE

PASS online (**Figura 21**) es un tipo de Software que predice más de 4,000 tipos de actividad biológica, en donde se incluyen efectos farmacológicos, mecanismos de acción, posibles efectos tóxicos y adversos, interacción con enzimas metabólicas y transportadores. PASS online evalúa el potencial de la actividad biológica mediante un análisis de Relación Estructura Actividad (SAR por sus siglas en inglés, Structure Activity Relationships) con una precisión media de predicción del 95% sobre la base de la formula estructural del compuesto a evaluar.<sup>66</sup> Los resultados arrojados por el programa se visualizan en un listado de valores que van de mayor a menor dependiendo de las características que obtenga cada molécula, y son divididos en *Pa* (probabilidad de ser activo) estima la posibilidad de que el compuesto estudiado pertenezca a la subclase de compuestos activos y *Pi* (probabilidad de estar inactivo) estima la posibilidad de que el compuesto estudiado pertenezca a la subclase de compuestos inactivos. Se puede consultar en la dirección <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/predict.php>



**Figura 21.-** Interfaz del servidor en línea PASS online.

<sup>66</sup> PASS online disponible en la web: <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/predict.php> Fecha de consulta: diciembre 2020.

### 7.1.1.2.2 ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING MOLECULAR)

Acoplamiento molecular (Molecular Docking en inglés) es una herramienta quimio-informática muy útil para el diseño, obtención y desarrollo de fármacos ya que permite superponer la estructura tridimensional de un compuesto biológicamente activo sobre el sitio blanco de interés terapéutico, con la finalidad de predecir su probable modo de unión y la energía ( $\Delta G = \text{kcal/mol}$ ) con la cual se lleva a cabo dicho proceso.<sup>67</sup>

En este ensayo computacional es importante conocer la estructura tridimensional de la proteína de interés (normalmente obtenida por la técnica cristalográfica de rayos X), así como la estructura del ligando a interactuar.<sup>67</sup>

Para el desarrollo del estudio de acoplamiento molecular en este trabajo de tesis, se emplearon algunos softwares como Autodock, y MOE (Molecular Operating Environment del inglés), así como también se empleó el programa de PyMOL para la visualización molecular de resultados obtenidos.<sup>68</sup>

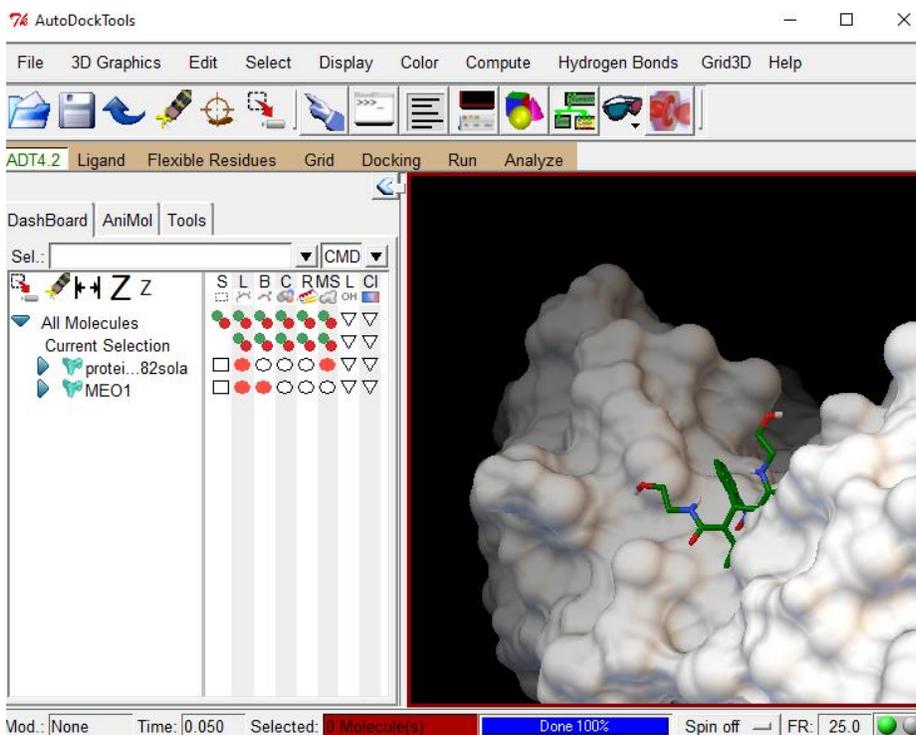
**AUTODOCK (Figura 22)** es un software de libre acceso que se puede obtener en la dirección web <https://ccsb.scripps.edu/mgltools/> Este programa computacional está diseñado para configurar, efectuar, y analizar estudios de acoplamiento molecular, así como predecir las moléculas pequeñas como moléculas bioactivas o candidatos a fármacos, se unen a un receptor de estructura 3D conocida (diana biológica de interés). Las distribuciones actuales de Autodock constan de dos generaciones de software: Autodock 4 y Autodock vina.<sup>69</sup>

---

<sup>67</sup> Torres, P. H.; Sodero, A. C.; Jofily, P.; Silva-Jr, F. P. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci.* **2019**, 20 (18), 4574.

<sup>68</sup> Miranda Martínez, J. Síntesis de Derivados Del Ácido Ferúlico Afines in Silico a Múltiples Dianas Terapéuticas Relacionadas En El Abordaje Experimental de La DM 2. Tesis de Licenciatura, Facultad de Farmacia, UAEM., **2018**.

<sup>69</sup> AutoDock disponible en la web: <https://ccsb.scripps.edu/mgltools/> Fecha de consulta enero **2022**.



**Figura 22.-** Interfaz del programa Autodock.

**MOE (Figura 23)** es un software que requiere de licencia para su uso, se puede obtener en la siguiente dirección web [https://www.chemcomp.com/Download\\_Request.htm](https://www.chemcomp.com/Download_Request.htm)

Este un programa computacional útil para el descubrimiento y estudio de nuevas moléculas bioactivas frente a diversas dianas biológicas, integra simulaciones, modelado y visualización, así como el desarrollo de metodologías.<sup>70</sup>

MOE arroja visualizaciones moleculares de las interacciones proteína-ligando en diagramas 2D y 3D.

<sup>70</sup> MOE (Molecular Operating Environment) disponible en la web: [https://www.chemcomp.com/Download\\_Request.htm](https://www.chemcomp.com/Download_Request.htm) Fecha de consulta enero 2022.

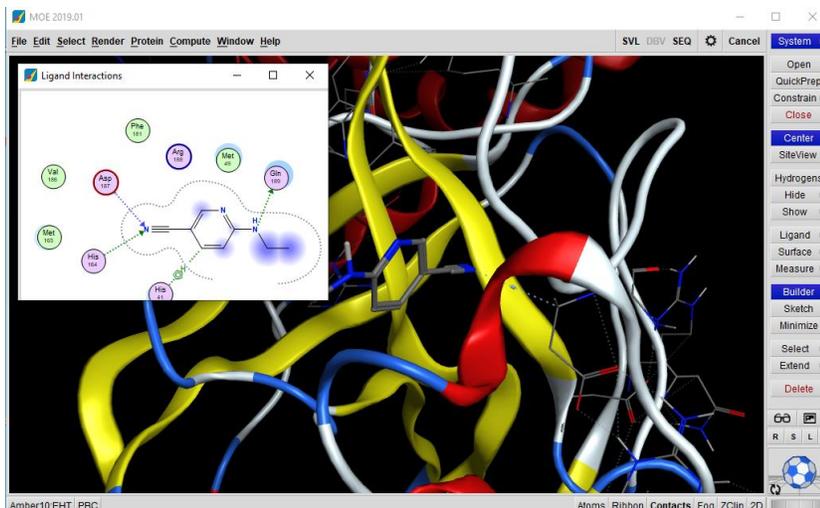


Figura 23.- Interfaz del programa MOE.

**PYMOL (Figura 24)** es un software de libre acceso (versión educativa) que se puede obtener en la dirección web <https://pymol.org/2/>

Es un visualizador molecular 2D y 3D de moléculas pequeñas y de macromoléculas en diagramas, permite el estudio profundizado entre las interacciones del receptor y el ligando.<sup>71</sup>

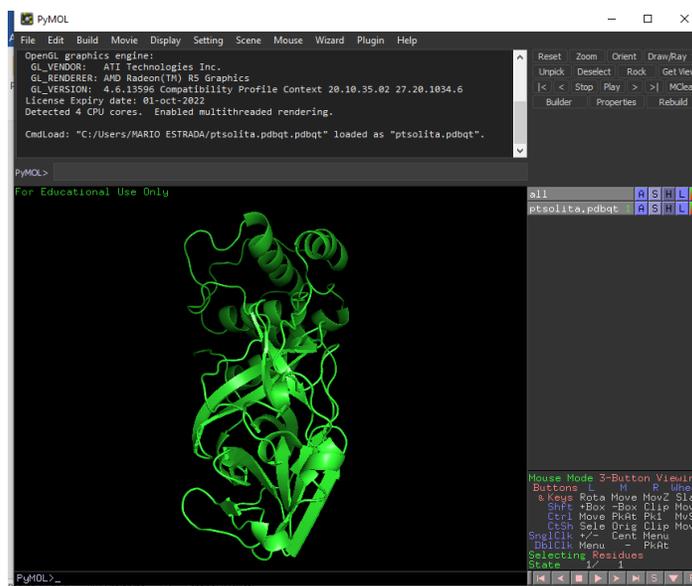


Figura 24.- Interfaz del programa PyMOL.

<sup>71</sup> PyMOL disponible en la web: <https://pymol.org/2/> Fecha de consulta enero 2022.

## 7.1.1.3 PREDICCIONES DEL PERFIL FARMACOCINÉTICO

### 7.1.1.3.1 SWISS ADME

Es un software gratuito disponible en la red. Swiss ADME (**Figura 25**) es de origen suizo que permite calcular posibles propiedades fisicoquímicas, posibles parámetros del perfil farmacocinético, parámetros del perfil farmacodinámico. Swiss ADME identifica también la presencia de compuestos con falsos positivos de bioactividad (PAINS por sus siglas en inglés Pan Assay Interference Compounds).<sup>72</sup> Se puede acceder en la dirección web <http://www.swissadme.ch/>



**Figura 25.-** Interfaz del programa en línea Swiss ADME.

### 7.1.1.3.2 admetSAR

El servidor admetSAR (**Figura 26**) realiza un estudio de relación estructura actividad de gran variedad de moléculas químicas, dicho programa brinda propiedades del

<sup>72</sup> Swiss ADME disponible en web: <http://www.swissadme.ch/> Fecha de consulta diciembre 2020.

perfil farmacocinético, toxicológico y algunas propiedades fisicoquímicas.<sup>73</sup> El servidor admetSAR es de acceso gratuito y se puede consultar en el siguiente link: <http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetSAR2/>.



Figura 26.- Interfaz del programa en línea admetSAR.

### 7.1.1.3.3 Pre-ADMET

El programa Pre-ADMET (Figura 27) realiza predicciones del perfil farmacocinético, toxicológico y brinda también algunas propiedades fisicoquímicas.<sup>74</sup> Dicho programa es de acceso libre y se puede consultar en la web en la siguiente dirección: <https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>.

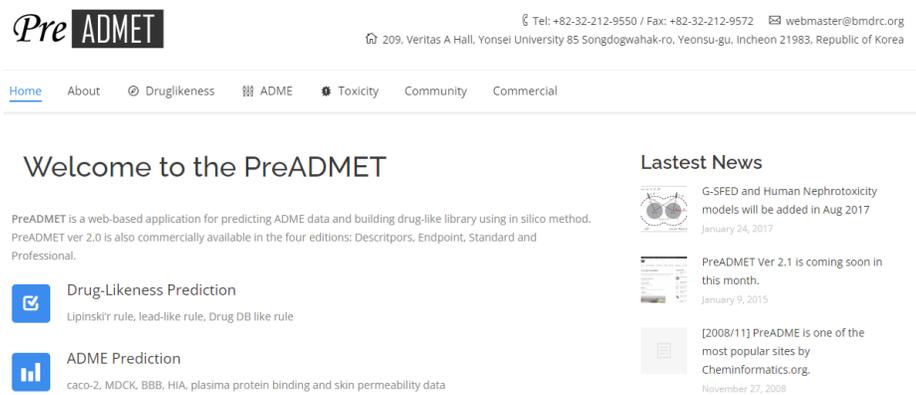


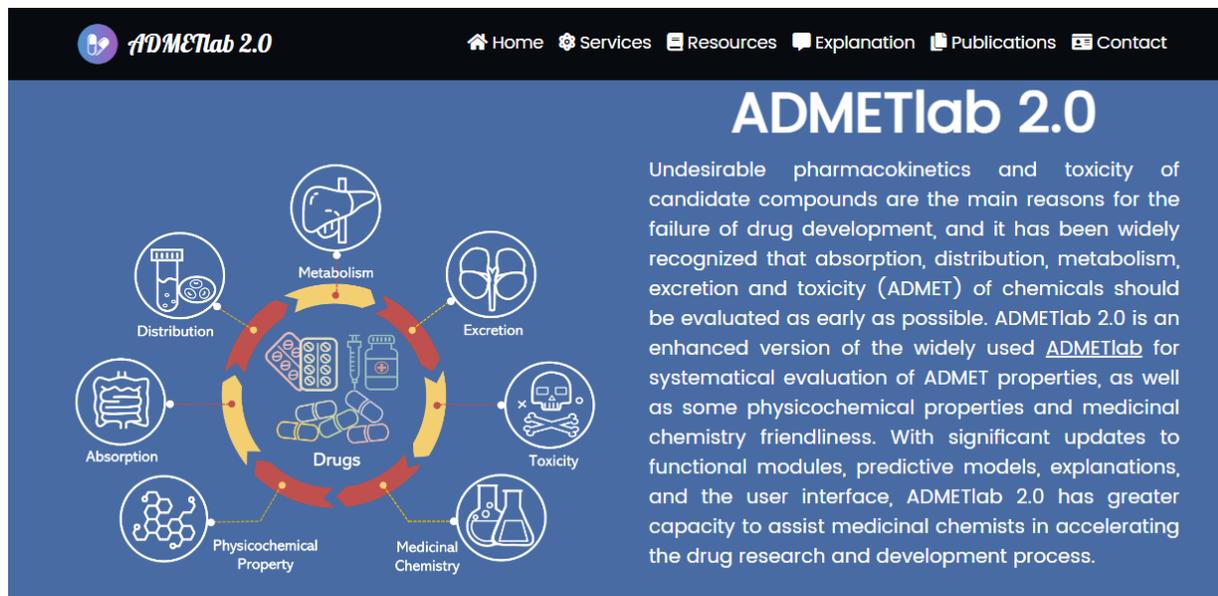
Figura 27.- Interfaz del programa en línea Pre-ADMET.

<sup>73</sup> AdmetSAR disponible en la web: <http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetSAR2/> Fecha de consulta junio 2022.

<sup>74</sup> Pre-ADMET disponible en la web: <https://preadmet.webservice.bmdrc.org/> Fecha de consulta junio 2022.

### 7.1.1.3.4 ADMETlab

ADMETlab (**Figura 28**) es un software de libre acceso disponible en la red, brinda valores del perfil farmacocinético y del perfil toxicológico, al igual que algunas propiedades fisicoquímicas. El módulo de función de la evaluación ADMET se compone de una serie de modelos de predicción de alta calidad.<sup>75</sup> Se puede acceder en la dirección web <https://admetmesh.scbdd.com/>



**Figura 28.-** Interfaz del programa en línea ADMETlab.

## 7.1.1.4 PREDICCIÓN DEL PERFIL TOXICOLÓGICO

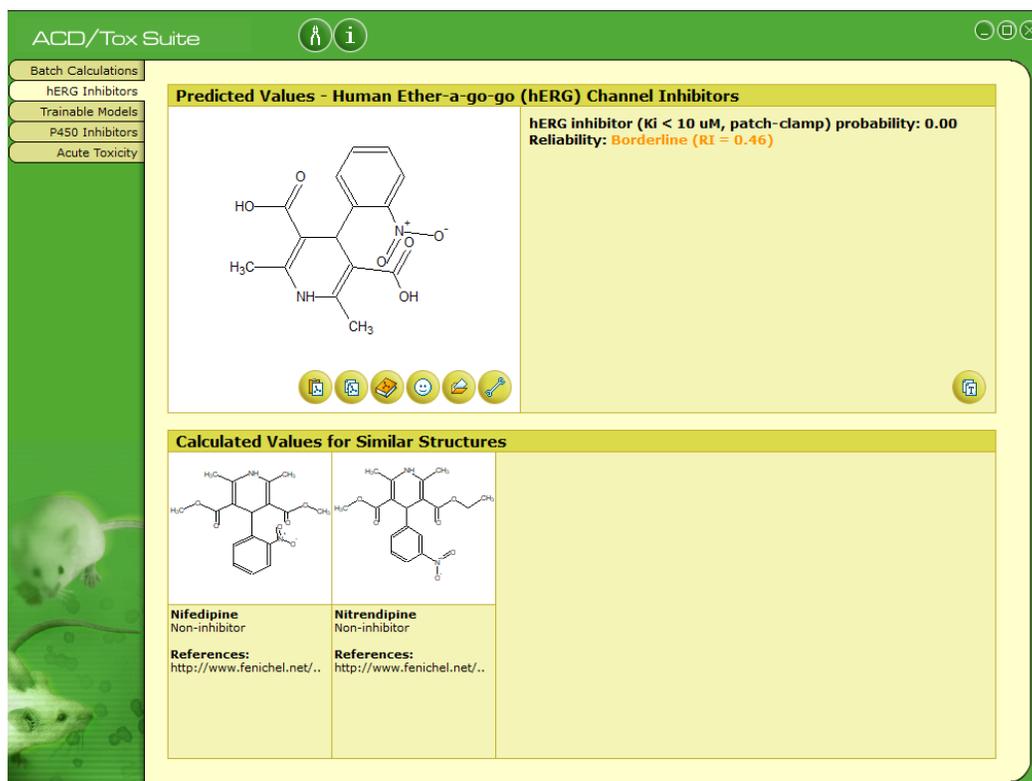
### 7.1.1.4.1 ACD/ToxSUITE

ACD/ToxSuite (**Figura 29**) es un software que requiere licencia para su uso. ACD/ToxSuite proporciona un cálculo de alta calidad, preciso y confiable. La predicción de la toxicidad se basa a partir de la estructura química de interés.

El programa proporciona cálculos de toxicidad aguda, toxicidad acuática, disrupción del sistema endocrino, mutagenicidad, efectos adversos en los órganos, bloqueo de

<sup>75</sup> ADMETlab disponible en la web: <https://admetmesh.scbdd.com/> Fecha de consulta junio 2021.

los canales hERG, inhibición de las principales isoformas del CYP450, irritación, así como también propiedades fisicoquímicas.<sup>76</sup>



The screenshot displays the ACD/Tox Suite interface. On the left, a sidebar lists calculation categories: Batch Calculations, hERG Inhibitors, Trainable Models, P450 Inhibitors, and Acute Toxicity. The main window is titled "Predicted Values - Human Ether-a-go-go (hERG) Channel Inhibitors".

In the center, the chemical structure of a hERG inhibitor is shown. To its right, the prediction results are displayed: "hERG inhibitor (K<sub>i</sub> < 10 μM, patch-clamp) probability: 0.00" and "Reliability: Borderline (RI = 0.46)".

Below this, a section titled "Calculated Values for Similar Structures" compares the target molecule with two similar structures:

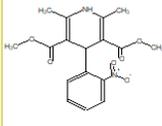
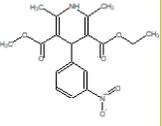
Chemical Structure	Name	Inhibition Status	References
	Nifedipine	Non-inhibitor	<a href="http://www.fenichel.net/">http://www.fenichel.net/..</a>
	Nitrendipine	Non-inhibitor	<a href="http://www.fenichel.net/">http://www.fenichel.net/..</a>

Figura 29.- Interfaz del programa ACD/ToxSuite.

<sup>76</sup> Fuat Gatnik, M.; Worth, A. P. Review of Software Tools for Toxicity Prediction. *JRC Sci. Tech. Reports* **2010**, 1–22.

## 7.2 PARTE QUÍMICA

Está comprendido por el diseño molecular de la serie de compuestos, así como la propuesta de ruta de síntesis y el estudio retrosintético de los compuestos **MEO 1-4**. Esta parte se llevó a cabo en el Laboratorio 5 de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección del Dr. Gabriel Navarrete Vázquez.

### 7.2.1 ESTUDIO RETROSINTÉTICO

Para conocer las materias primas para la síntesis de la serie de compuestos propuestos **MEO 1-4** se utilizó la técnica de estudio retrosintético. Dicha técnica es empleada en el área de diseño de moléculas bioactivas, la cual permite retroceder paso a paso de una molécula objetivo a un conjunto de materias primas que sean asequibles comercialmente y que puedan ser utilizadas como materias primas para la posterior síntesis de una determinada serie de compuestos.

### 7.2.2 SÍNTESIS QUÍMICA GENERAL

Para llevar a cabo la síntesis de la serie de compuestos **MEO 1-4**, se propone una ruta de síntesis sencilla y óptima que conlleva la realización de reacciones de tipo: hidrólisis básica, intercambio de grupo funcional y una reacción general de amidación conocida como reacción de Schotten-Baumann, dicha reacción consiste en la formación de amidas a partir de aminas y cloruros de ácido.<sup>77</sup>

---

<sup>77</sup> Organic Chemistry Portal disponible en la web: <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/schotten-baumann-reaction.shtm> Fecha de consulta abril 2023.

# 8.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 8.1 PARTE COMPUTACIONAL (*IN SILICO*)

Es importante evaluar los parámetros fisicoquímicos, farmacodinámicos, farmacocinéticos y toxicológicos *in silico* ya que brindan mayores probabilidades de éxito en un tiempo relativamente corto, ahorrando materias primas, disminuyendo o evitando el uso de animales de experimentación y reduciendo costos. Con ello se puede acelerar el descubrimiento de nuevas entidades químicas gracias al aporte multidisciplinario que ofrecen los métodos computacionales *in silico*.

Por ende, en el presente trabajo de tesis se hizo uso de diversos programas químio-informáticos, dividiendo los resultados en cuatro partes, evaluación de las propiedades fisicoquímicas, evaluación del perfil farmacodinámico, perfil farmacocinético y perfil toxicológico, para posteriormente integrar todos estos resultados en un análisis de consenso farmacológico y seleccionar a los líderes computacionales seguros.

Todos los resultados están clasificados en un sistema de color tipo semáforo en donde el **color verde** significa que los datos arrojados son muy satisfactorios, en **color amarillo** satisfactorios y en **color rojo** poco satisfactorios.

### 8.1.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS/BIOFARMACÉUTICAS

Las propiedades fisicoquímicas son importantes ya que están directamente relacionadas con la solubilidad de los principios activos. Con dichos datos se puede estimar el nivel de concentración sérica que puede presentar una molécula dentro de la circulación sistémica.

En la **Tabla 3** se muestran los resultados de las propiedades fisicoquímicas en donde se tomaron en cuenta diferentes parámetros entre ellos: el área polar superficial topológica (TPSA), tal criterio evalúa la capacidad que puede presentar

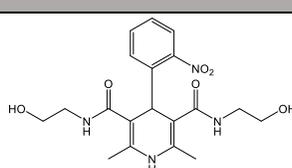
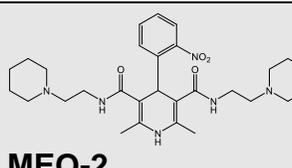
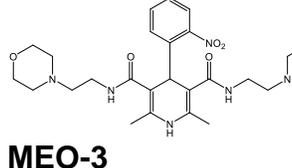
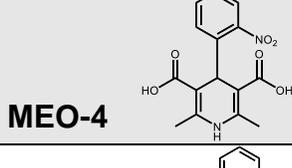
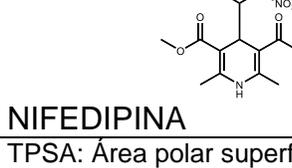
un fármaco para penetrar las barreras celulares. El intervalo para que un fármaco penetre membranas del tracto gastrointestinal es de 100-150 Ångströms cuadrados ( $\text{Å}^2$ )<sup>78</sup>, donde se observa que la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** se encuentran dentro del rango. Otro parámetro importante es el cLog P, tal criterio proporciona el nivel de lipofilidad que puede presentar una molécula, un valor de cLog P entre 1-3 es óptimo para que una molécula presente una buena absorción gastrointestinal, por lo que se puede observar que todos los compuestos presentan valores de cLog P que se encuentran dentro del rango.

Dentro de los postulados de Lipinski se determinó que los compuestos no presentan violaciones significativas a excepción del compuesto **MEO-2** y **MEO-3** cuyos valores de peso molecular fueron superiores a 500 g/mol. Con respecto a la solubilidad todos los compuestos diseñados incluyendo al fármaco de referencia nifedipina presentan valores adecuados.

---

<sup>78</sup> Opera, TI. Property Distribution of Drug-Related Chemical Databases. *J Comput Aided Mol Des.* **2000**, 14 (3), 251-64.

**Tabla 3.-** Propiedades fisicoquímicas/biofarmacéuticas de la serie de compuestos **MEO 1-4** y nifedipina.

Propiedades fisicoquímicas						
Compuesto	TPSA (Å <sup>2</sup> )	cLog P	Peso molecular (g/mol)	Viol. Lipinski	Solubilidad en agua	Resultado
 <b>MEO-1</b>	150.5	0.30	404	0	Buena	
 <b>MEO-2</b>	122.5	2.92	538	1	Media	
 <b>MEO-3</b>	140.9	1.31	542	2	Media	
 <b>MEO-4</b>	132.4	1.83	318	0	Media	
 <b>NIFEDIPINA</b>	110.4	3.07	346	0	Media	
TPSA: Área polar superficial topológica Color verde: muy satisfactorio. Color amarillo: satisfactorio. Color rojo: poco satisfactorio						

## 8.1.2 PERFIL FARMACODINÁMICO

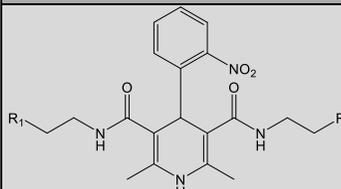
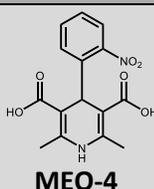
### 8.1.2.1 PREDICCIÓN DEL MODO DE ACCIÓN

Para la evaluación de la posible actividad biológica de la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** se utilizó el servidor químio-informático de PASS. Para realizar las predicciones de las entidades químicas PASS efectúa la predicción basándose en un ensayo de tipo relación estructura-actividad (SAR del inglés *Structure-activity*

relationships) de varios compuestos que ya están contenidos dentro de su base de datos y de los cuales la actividad biológica está bien definida.<sup>79</sup>

El programa arroja valores de 0 a 100%, donde un valor entre 50% a 70% indica una probabilidad mediana de interactuar con el blanco biológico de interés, un valor <50% indica una probabilidad baja de interacción. Para el análisis de la posible actividad biológica de los compuestos **MEO 1-4** se tomaron en cuenta 2 receptores o blancos terapéuticos: la proteasa principal 3CLpro y el receptor de canales de calcio los cuales están relacionados con la detención viral de SARS-CoV-2, los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.-** Propiedad de actividad biológica de la serie de compuestos **MEO 1-4** y nifedipina.

Propiedad de actividad biológica				
				
	<b>MEO-1</b> R <sub>1</sub> —OH <b>MEO-2</b> R <sub>1</sub> —N—(cyclohexane) <b>MEO-3</b> R <sub>1</sub> —N—(piperazine)		<b>MEO-4</b>	
	Inhibidor de proteasa 3CLpro de SARS-CoV-2		Bloqueador de los canales de calcio	
Compuesto	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>
<b>MEO-1</b>	26%	1%	50%	3%
<b>MEO-2</b>	-----	-----	60%	2%
<b>MEO-3</b>	-----	-----	58%	3%
<b>MEO-4</b>	-----	-----	50%	3%
Nifedipina	29%	2%	70%	2%
Pa: probabilidad de actividad Pi: probabilidad de inactividad				

De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que el compuesto **MEO-1** es el único que presentó valores discretos de ser inhibidor de la proteasa principal 3CLpro de SARS-CoV-2, presentando un valor de probabilidad de actividad (*Pa*)

<sup>79</sup> Poroikov, V.; Filimonov, D.; Ihlenfeldt, W. D.; Glorizova, A.; Borodina, Y.; Stepanchikova, A.; Nicklaus, M. Pass Biological Activity Spectrum Predictions in the Enhanced Open NCI Database Browser. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, 43, 228-236.

similar al fármaco nifedipina ya reportado en la literatura, los demás compuestos propuestos parecieran no poseer efectos hacia el blanco terapéutico de la proteasa principal, pero al ser nuevas amidas en vez de esteres pueden mimetizar a los enlaces peptídicos y ser mejor reconocidas por la proteasa e inhibir su proceso catalítico, además que los compuestos propuestos comparten en común el mismo grupo farmacofórico de la dihidropiridina y el fenilo en posición 4 hay mayor probabilidad de que los demás compuestos diseñados también presenten un efecto hacia la proteasa 3CLpro. Al no haber registrado probabilidad de interacción con la proteasa principal 3CLpro muy probablemente puede deberse a que PASS online no encontró similitud estructural con compuestos de actividad biológica similar dentro de su base de datos. Por otro lado, para la actividad bloqueadora de los canales de calcio los 4 compuestos diseñados presentaron probabilidades regulares de actividad al igual que la nifedipina.

### 8.1.2.2 ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Para llevar a cabo el acoplamiento molecular de la serie de compuestos **MEO 1-4** y del fármaco de referencia nifedipina se hizo uso de la proteína co-cristalizada de la proteasa principal (3CLpro/Mpro) de SARS-CoV-2 la cual forma un complejo ligando-receptor con el 6-(etilamino)piridina-3-carbonitrilo (**RZS**), dichas moléculas se obtuvieron de la base de datos de Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) bajo el código PDB ID: 5R82.<sup>80</sup>

Para el estudio se consideraron todos los compuestos de la serie **MEO 1-4**, el fármaco de referencia nifedipina y el ligando co-cristalizado **RZS** 6-(etilamino)piridina-3-carbonitrilo, mismos que fueron construidos con ayuda de los constructores moleculares ChemDraw y Chem3D.<sup>81</sup> El experimento se realizó con tres programas diferentes: AutoDock 4, AutoDock Vina y MOE, cada uno por triplicado para todos los compuestos diseñados. Dentro del sitio de unión destacan

---

<sup>80</sup> Protein Data Bank disponible en la web: <https://www.rcsb.org/> Fecha de consulta marzo 2021.

<sup>81</sup> PerkinElmer Informatics disponible en la web: <https://perkinelmerinformatics.com/products/research/chemdraw> Fecha de consulta junio 2022.

los siguientes residuos de aminoácidos de interés His41, Cys145, Phe140, His163, Met165, Glu166 y Gln189 encargados de llevar a cabo el proceso proteolítico de la proteasa 3CLpro.<sup>82</sup>

#### 8.1.2.2.1 VALIDACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR SOBRE LA PROTEÍNA 3CLpro DE SARS-CoV-2, CON LOS PROGRAMAS DE MOE, AUTODOCK 4 Y AUTODOCK VINA.

La validación en un estudio de acoplamiento molecular consiste en realizar el reacoplamiento o redocking dentro del sitio de unión del ligando co-cristalizado **RZS** diseñado previamente en ChemDraw. En dicho estudio se hace la comparación del sobreposicionamiento u overlay de las soluciones arrojadas en cada uno de los estudios efectuados del ligando co-cristalizado diseñado con el ligando co-cristalizado **RZS** de referencia, con el fin de que la metodología a utilizar sea más eficiente y reproducible, y con ello obtener veracidad en los resultados.

El experimento se llevó a cabo con 3 servidores: MOE, AutoDock 4 y AutoDock Vina cada uno ejecutado por triplicado, para realizar el experimento en MOE se efectuaron 100 repeticiones para cada evaluación, para el estudio en AutoDock 4 se hicieron 50 repeticiones empleando un tamaño de caja o grid de 36x36x36 puntos y en AutoDock Vina se consideraron las 12 poses más representativas de cada evaluación.

El cálculo de RMSD (raíz de la desviación cuadrática media) se ejecutó con el servidor DockRMSD de la Universidad de Michigan (esto para todos los valores de RMSD calculados), disponible en la web en el siguiente link <https://zhanggroup.org/DockRMSD/>.<sup>83</sup> En la **Tabla 5** se muestran los valores de RMSD obtenidos por cada uno de los servidores empleados.

---

<sup>82</sup> Ghahremanpour, M.; Tirado-Rives, J.; Deshmukh, M.; Ippolito, J. A.; Zhang, C. H.; Cabeza de Vaca, I.; Liosi, M. E.; Anderson, K. S.; Jorgensen, W. Identification of 14 Known Drugs as Inhibitors of the Main Protease of SARS-CoV-2. *Medicinal Chemistry Letters*. **2020**, 11 (12), 2526-2533.

<sup>83</sup> DockRMSD (Docking Pose Distance Calculation) disponible en la web: <https://zhanggroup.org/DockRMSD/> Fecha de consulta julio **2022**.

**Tabla 5.-** Valores de RMSD obtenidos de la validación proporcionados por los programas de MOE, AutoDock 4 y AutoDock Vina.

Compuesto	Servidor	RMSD
6-(etilamino) piridina-3-carbonitrilo	MOE	0.133 Å
	AutoDock 4	1.753 Å
	AutoDock Vina	0.651 Å

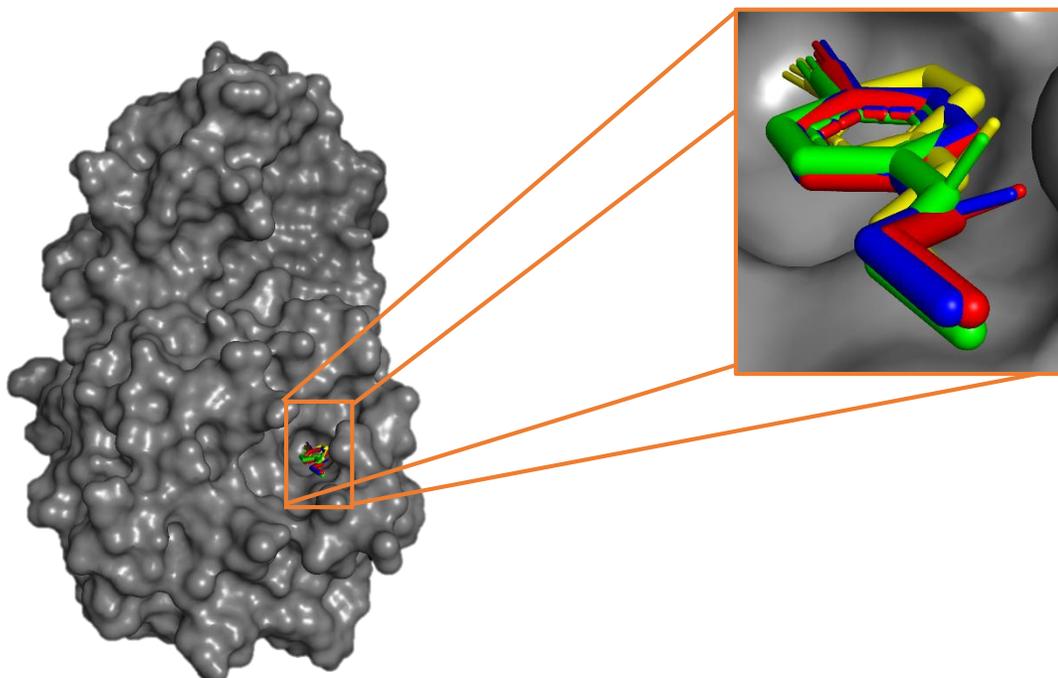
El valor de RMSD arrojado por MOE fue de 0.133 Å, en AutoDock 4 se obtuvo un valor de 1.753 Å y en AutoDock Vina se registró un valor de 0.651 Å. Para que un estudio de validación en docking molecular sea considerado como óptimo y validado, se debe de obtener un valor de RMSD < 2Å, por lo que podemos mencionar que los valores arrojados por los servidores son aceptables y viables para llevar a cabo los estudios de acoplamiento molecular de la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** y del fármaco de referencia Nifedipina sobre la diana biológica de la proteína 3CLpro de SARS-CoV-2.

#### **8.1.2.2.1.1 SOBREPONIAMIENTO DE RZS SOBRE LA PROTEÍNA 3CLpro DE SARS-CoV-2 CON LOS PROGRAMAS MOE, AUTODOCK 4 Y AUTODOCK VINA.**

Análisis de la similitud conformacional de **RZS** sobre la proteína 3CLpro de SARS-CoV-2 efectuado con el programa de visualización molecular PyMOL, en donde se realiza la comparación entre las soluciones del docking de **RZS** comparada con el ligando co-cristalizado que forma un complejo ligando receptor con la proteína 3CLpro con código de PDB 5R82, esto con la finalidad de identificar la similitud conformacional de las soluciones del docking.

En la **Figura 30** se muestra la superposición molecular de las soluciones del ligando co-cristalizado diseñado obtenidas de los servidores MOE, AutoDock 4 y AutoDock Vina representados en colores: azul, amarillo y verde respectivamente con el

ligando co-cristalizado que trae integrado la proteína 3CLpro representado en color rojo. Cabe mencionar que todas las poses representadas de cada uno de los programas mantienen una disposición espacial muy semejante dentro del sitio de unión, por lo tal, la validación es adecuada para los estudios de acoplamiento con las moléculas diseñadas e indica que los cálculos son reproducibles.



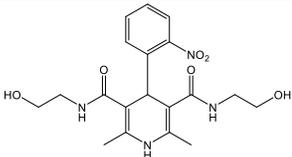
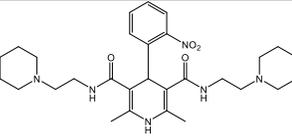
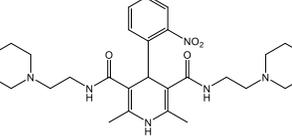
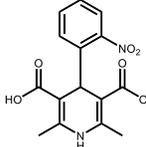
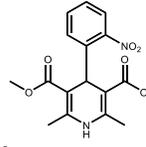
**Figura 30.-** Superposición dentro del sitio de unión de las soluciones proporcionadas por el acoplamiento molecular realizado con MOE representado en color azul, AutoDock 4 en color amarillo y AutoDock Vina en color verde del ligando co-cristalizado diseñado con el ligando co-cristalizado que trae integrado la proteína 3CLpro representado en color rojo.

#### **8.1.2.2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LA SERIE DE COMPUESTOS DISEÑADOS MEO 1-4 Y NIFEDIPINA SOBRE LA PROTEASA 3CLpro DE SARS-CoV-2.**

Se realizó el acoplamiento molecular para cada uno de los compuestos diseñados sobre la proteína 3CLpro de SARS-CoV-2. En este análisis, se destacan los compuestos **MEO 1-3** que obtuvieron las mejores energías de unión y las mayores interacciones dentro del sitio de unión, con respecto al fármaco de referencia nifedipina. En la **Tabla 6** se muestran los resultados de los scores (-kcal/mol)

obtenidos por el acoplamiento molecular realizado con MOE, AutoDock 4 y AutoDock Vina.

**Tabla 6.-** Energías de unión obtenidas del acoplamiento molecular con 3CLpro.

Compuesto	Programa utilizado	Score consenso $\Delta G$ (kcal/mol)
 <b>MEO-1</b>	MOE	$-6.50 \pm 0.015$
	AutoDock 4	$-5.91 \pm 0.085$
	AutoDock Vina	$-5.66 \pm 0.057$
 <b>MEO-2</b>	MOE	$-6.4 \pm 0.057$
	AutoDock 4	$-6.18 \pm 0.060$
	AutoDock Vina	$-6.8 \pm 0$
 <b>MEO-3</b>	MOE	$-6.4 \pm 0.061$
	AutoDock 4	$-5.42 \pm 0.21$
	AutoDock Vina	$-5.9 \pm 0.1$
 <b>MEO-4</b>	MOE	$-5.15 \pm 0.032$
	AutoDock 4	$-4.85 \pm 0.02$
	AutoDock Vina	$-4.93 \pm 0.090$
 <b>NIFEDIPINA</b>	MOE	$-5.18 \pm 0.039$
	AutoDock 4	$-5.37 \pm 0.036$
	AutoDock Vina	$-5.45 \pm 0.057$

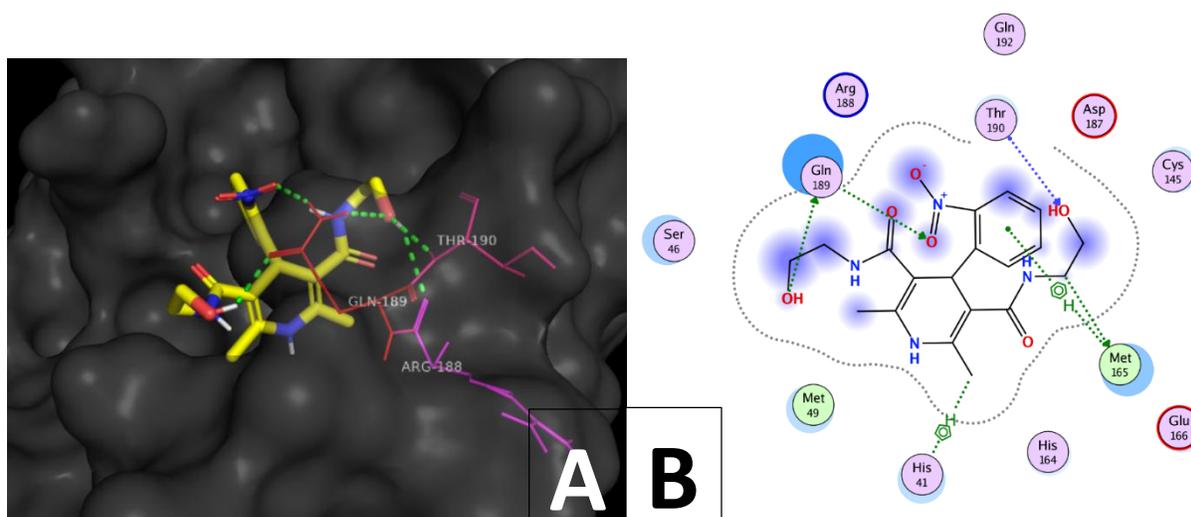
Por contar con la licencia del programa MOE en el laboratorio se optó por representar y discutir únicamente los resultados del docking arrojados por dicho programa y de la misma manera se optó por hacer las representaciones 2D con el mismo servidor.

Se realizó el acoplamiento molecular de la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** y del fármaco de referencia nifedipina con el programa MOE, el cual se hizo por

triplicado con 100 repeticiones para cada evaluación, esto para cada compuesto analizado.

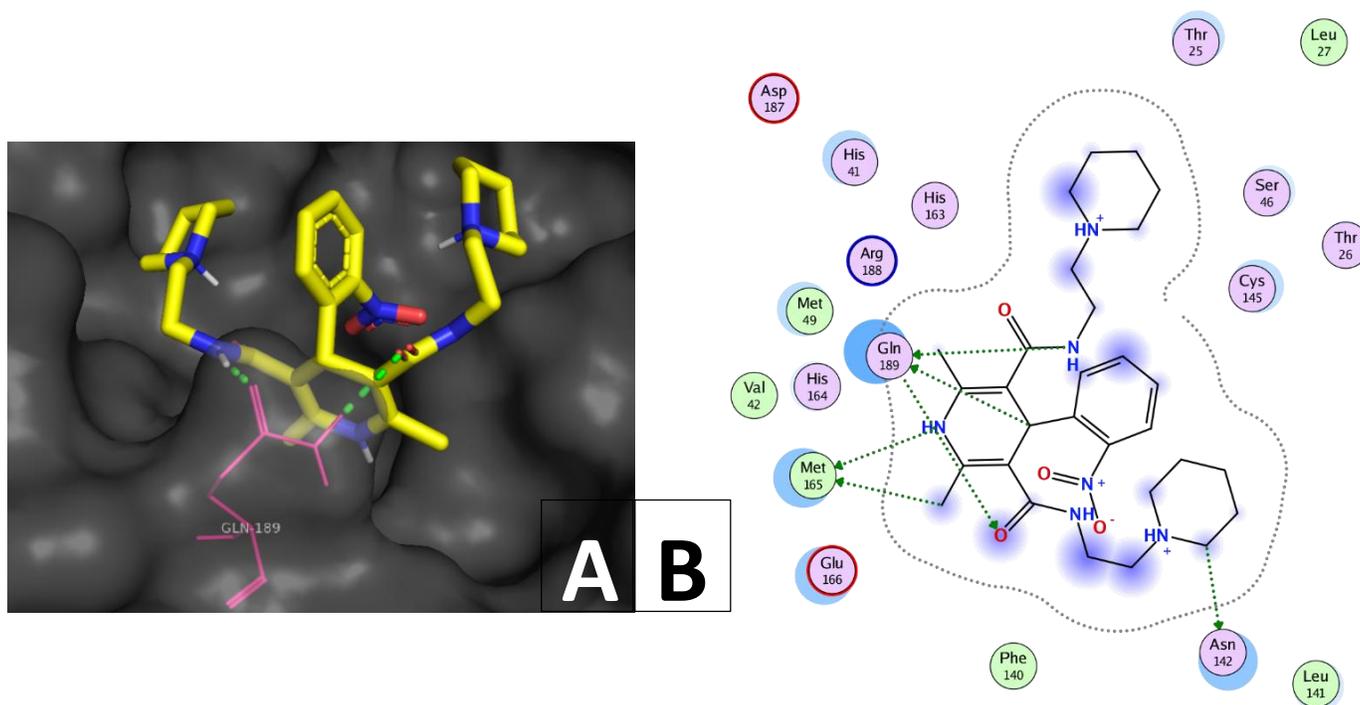
Los resultados obtenidos para la serie de compuestos **MEO 1-4** y del fármaco de referencia nifedipina, se visualizan en las **Figuras 31-35**, mostrando a las soluciones que presentaron un mejor score y una mejor pose dentro del sitio de unión. Dichos resultados se presentan en mapas de interacciones 2D y diagramas 3D obtenidos por los programas MOE y PyMOL respectivamente.

El valor de RMSD obtenido para el compuesto **MEO-1** fue de 1.169 Å y con un score de -6.50 kcal/mol. En la **Figura 31** parte **A** y **B** se muestran los mapas de interacción del compuesto **MEO-1** dentro del sitio de unión, en donde se observan interacciones con los residuos de aminoácidos de interés de tipo  $\pi$ -sp<sup>3</sup> con Met165 e His41, por otro lado, se mantienen las interacciones polares con los residuos de aminoácidos de interés como: Gln189 y Glu166 de la misma manera se observan aquellos aminoácidos de interés restantes en el sitio de unión que pueden hacer interacciones con la diana biológica en algún momento.



**Figura 31.- A)** Visualización en 3D de interacciones del compuesto **MEO-1** dentro del sitio de unión. **B)** Mapa de interacciones 2D del compuesto **MEO-1** con la proteína 3CLpro.

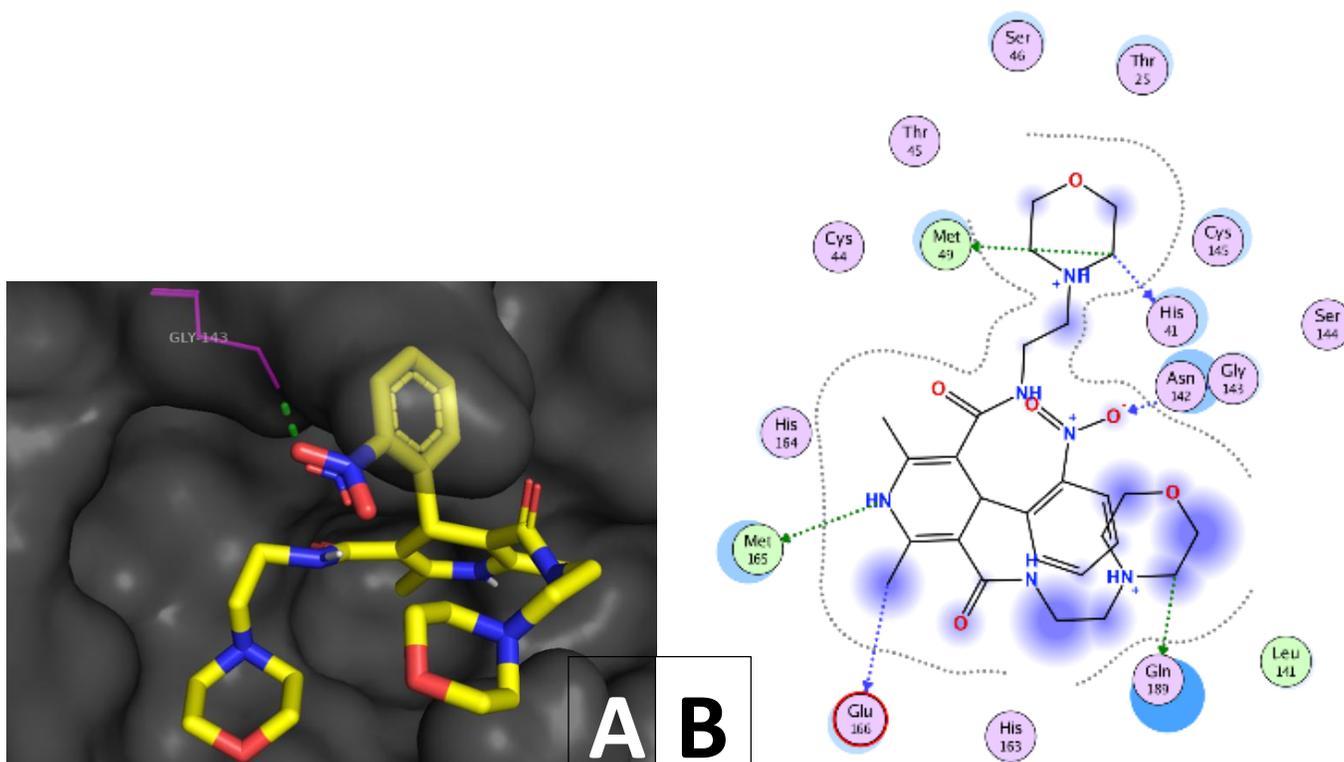
El valor de RMSD obtenido para el compuesto **MEO-2** fue de 1.675 Å y obtuvo un score de -6.4 kcal/mol. En la **Figura 32** parte **A** y **B** se muestran los mapas de interacción del compuesto **MEO-2** dentro del sitio de unión, en donde se observa una interacción de tipo no polar con Met165, por otro lado, se mantienen las interacciones polares con los residuos de aminoácidos de interés, tomando en cuenta que en el sitio de unión se observan los aminoácidos de interés restantes que favorecerán las interacciones entre ligando-proteasa.<sup>22</sup>



**Figura 32.- A)** Visualización en 3D de interacciones del compuesto **MEO-2** dentro del sitio de unión. **B)** Mapa de interacciones 2D del compuesto **MEO-2** con la proteína 3CLpro.

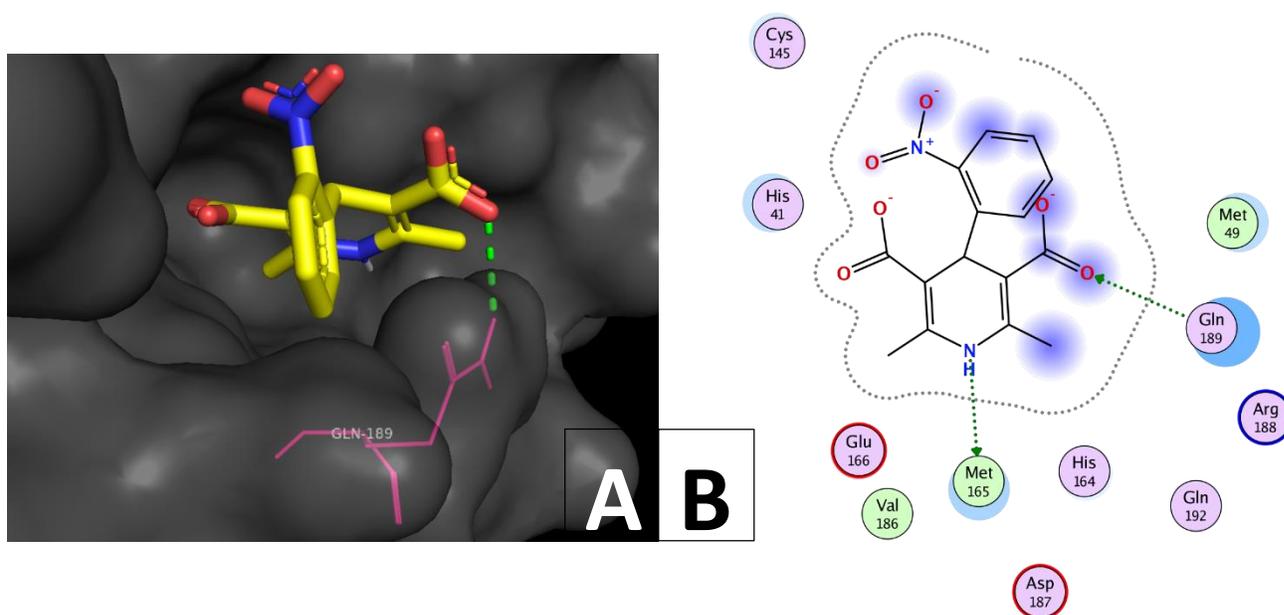
<sup>22</sup>Hu, Q.; Xiong, Y.; Zhu, G. H.; Zhang, Y. N.; Zhang, Y. W.; Huang, P.; Ge, G. The SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19. *MedComm.* **2022**, 3 (3), e151.

El valor de RMSD obtenido para el compuesto **MEO-3** fue de 1.971 Å y tuvo un score de -6.4 kcal/mol. En la **Figura 33** parte **A** y **B** se muestran los mapas de interacción del compuesto **MEO-3** dentro del sitio de unión, en donde se observan interacciones con los residuos de aminoácidos de interés de tipo no polar como con Met165 y Met49, tomando en cuenta que en el sitio de unión se encuentran otros aminoácidos clave los cuales reforzarán las interacciones entre ligando-proteasa.



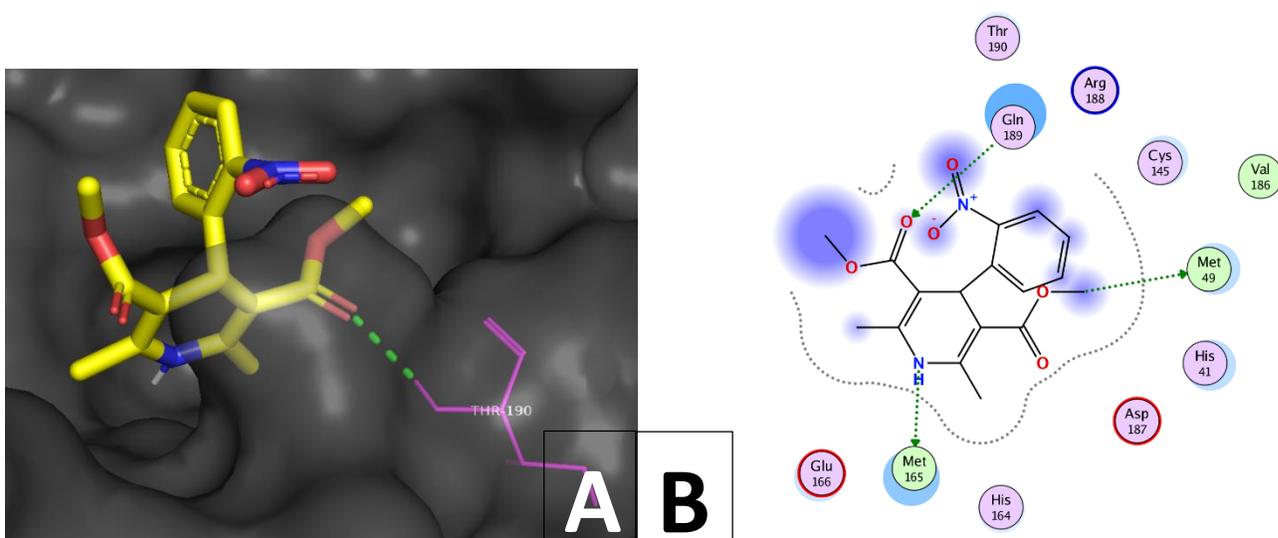
**Figura 33.-** A) Visualización en 3D de interacciones del compuesto **MEO-3** dentro del sitio de unión. B) Mapa de interacciones 2D del compuesto **MEO-3** con la proteína 3CLpro.

El valor de RMSD obtenido para el compuesto **MEO-4** fue de 1.325 Å y mostró un score de -5.15 kcal/mol. En la **Figura 34** parte **A** y **B** se muestran los mapas de interacción del compuesto **MEO-4** dentro del sitio de unión, en donde se observan interacciones con los residuos de aminoácidos claves de tipo puente de hidrógeno como con Gln189, Met165, considerando que en el sitio de unión se encuentran otros aminoácidos de que pueden favorecer las interacciones entre ligando-proteasa.



**Figura 34.- A)** Visualización en 3D de interacciones del compuesto **MEO-4** dentro del sitio de unión. **B)** Mapa de interacciones 2D del compuesto **MEO-4** con la proteína 3CLpro.

El valor de RMSD obtenido para el fármaco de referencia nifedipina fue de 1.1953 Å y obtuvo un score de -5.18 kcal/mol. En la **Figura 35** parte **A** y **B** se muestran los mapas de interacción del fármaco de referencia nifedipina dentro del sitio de unión, en donde se observan interacciones de tipo no polar con los residuos Met49 y Met165, también se predijo una interacción tipo puente de hidrógeno con el residuo Gln189, considerando que en el sitio de unión se pueden observar los residuos de aminoácidos de interés restantes que pueden aumentar las interacciones entre ligando-proteasa.



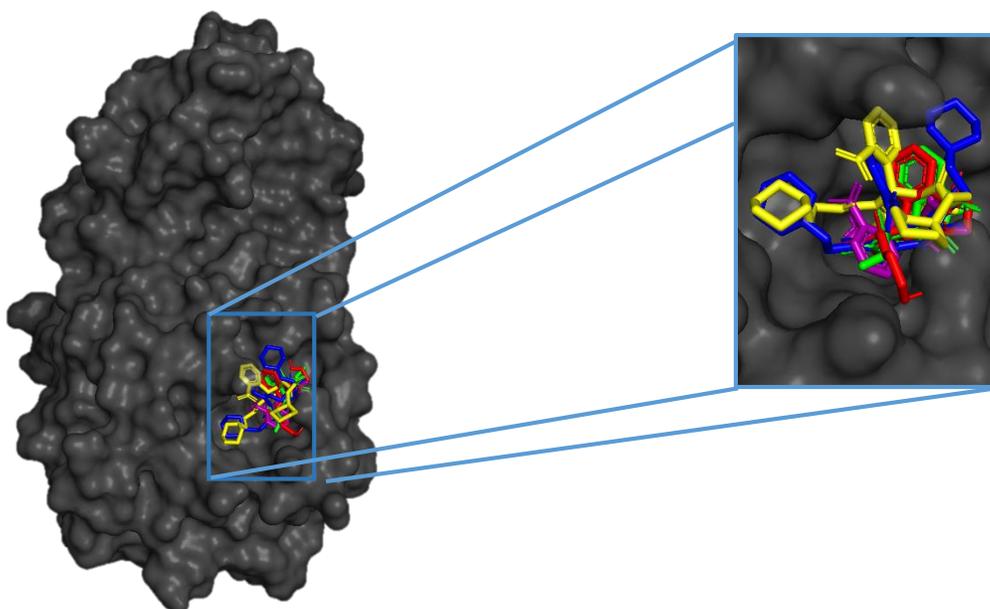
**Figura 35.- A)** Visualización en 3D de interacciones del fármaco de referencia nifedipina dentro del sitio de unión. **B)** Mapa de interacciones 2D del fármaco de referencia nifedipina con la proteína 3CLpro.

Los compuestos **MEO 1-3** presentaron mayores interacciones con la proteasa principal a diferencia de la nifedipina, esto puede deberse por el reemplazo de esteres a amidas lo cual le favoreció el reconocimiento por la proteasa 3CLpro al imitar enlaces peptídicos, además que las partes auxofóricas de los compuestos reforzaron las interacciones con los aminoácidos clave. Los programas de AutoDock 4 y AutoDock Vina arrojaron interacciones similares a los resultados presentados y discutidos anteriormente, por lo que se espera que presenten una afinidad hacia la proteasa principal de SARS-CoV-2.

### 8.1.2.2.2.1 SOBREPONIAMIENTO DE LA SERIE DE COMPUESTOS DISEÑADOS MEO 1-4 Y NIFEDIPINA SOBRE LA PROTEASA 3CLpro DE SARS-CoV-2 CON MOE.

En la **Figura 36** se muestran los sobreposicionamientos moleculares u overlays de las soluciones arrojadas por el programa MOE para la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** y del fármaco de referencia nifedipina dentro del sitio de unión. Los diagramas 3D representados fueron calculados con el programa PyMOL.

En tal análisis se puede observar que no hay sobreposicionamiento estructural de los compuestos debido a los grados de libertad de las cadenas alifáticas, pero sí de los anillos centrales de la dihidropiridina (parte fundamental del farmacóforo encargado de la acción biológica) presente en cada uno de los compuestos diseñados, al igual que se puede observar que ocupan una disposición espacial similar dentro del sitio de unión. Se destaca que la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** presentaron mejores calificaciones (scores) que la nifedipina, en donde se registraron interacciones con los residuos de aminoácidos de interés ya discutidas anteriormente en el apartado de acoplamiento molecular, por lo que se espera que todos los compuestos propuestos presenten una afinidad hacia la proteasa 3CLpro de SARS-CoV-2.



**Figura 36.-** Superposición dentro del sitio de unión de las soluciones arrojadas por el programa MOE de la serie de compuestos **MEO 1-4** y de la nifedipina.

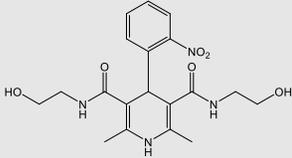
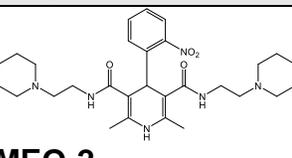
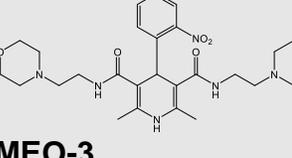
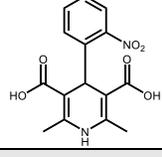
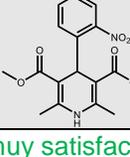
### 8.1.3 PERFIL FARMACOCINÉTICO

Es fundamental la determinación de los parámetros farmacocinéticos en etapas tempranas del descubrimiento de moléculas bioactivas, dichas características permitirán a la molécula llegar a su sitio diana para ejercer su respectivo efecto biológico, para esto se deben considerar ciertas características farmacocinéticas como: la probabilidad de absorción gastrointestinal, la permeabilidad hematoencefálica y la probabilidad de ser sustratos de la glicoproteína-P como se explica a continuación.

#### 8.1.3.1 ABSORCIÓN GASTROINTESTINAL

Como se observa en la **Tabla 7** los compuestos diseñados **MEO 1-4** presentaron resultados muy satisfactorios de absorberse por la vía intestinal obteniendo valores similares al fármaco de referencia nifedipina comercializado actualmente en el mercado, lo cual indica que la serie de compuestos diseñados presentarán una absorción gastrointestinal adecuada, por tal obtendrán una buena biodisponibilidad en el organismo.

**Tabla 7.-** Determinación de la absorción intestinal de la serie de compuestos **MEO 1-4** y nifedipina.

Absorción intestinal humana				
Compuesto	SwissADME	admetSAR	ADMETlab	Resultado
 <b>MEO-1</b>	+	++	+	
 <b>MEO-2</b>	++	++	+	
 <b>MEO-3</b>	+	++	+	
 <b>MEO-4</b>	++	++	+	
 <b>Nifedipina</b>	++	++	+	
Color verde: muy satisfactorio. Color amarillo: satisfactorio. Color rojo: poco satisfactorio				

Probabilidad alta ++, probabilidad media +, probabilidad baja -

### 8.1.3.2 BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

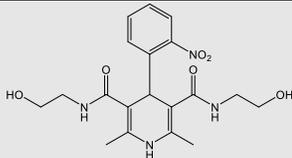
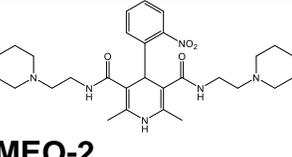
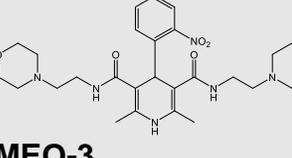
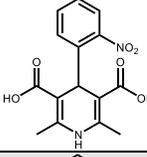
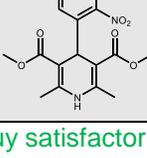
La barrera hematoencefálica (BHE) actúa como barrera protectora compleja constituida por células endoteliales que consta de una red capilar del SNC, lo que limita el paso de sustancias exógenas al cerebro.<sup>84</sup> El SARS-CoV-2 puede actuar

<sup>84</sup> Bernhardt, R. V. The Blood-Brain Barrier and the Pathology of the Central Nervous System: Its Importance for the Inflammatory Response. *Rev Chil Neuro-Psiquiat.* **2004**, 42 (2), 121-130.

en las células del endotelio, producir inflamación y dañar la barrera hematoencefálica lo cual facilita la entrada del virus al SNC.<sup>85</sup>

En la **Tabla 8** se muestran los resultados de permeabilidad hematoencefálica de la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** y nifedipina. Los compuestos **MEO 1-4** incluyendo a la nifedipina presentan una probabilidad satisfactoria de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que hay probabilidades de atacar el SARS-CoV-2 en el SNC, donde ha presentado varios de sus efectos negativos de tipo neurocovid.

**Tabla 8.-** Permeabilidad hematoencefálica de la serie de compuestos **MEO 1-4** y nifedipina.

Barrera hematoencefálica (BHE)				
Compuesto	SwissADME	admetSAR	ADMETlab	Resultado
 <b>MEO-1</b>	-	+	+	
 <b>MEO-2</b>	-	+	+	
 <b>MEO-3</b>	+	+	-	
 <b>MEO-4</b>	+	++	+	
 <b>Nifedipina</b>	-	+	+	
Color verde: muy satisfactorio. Color amarillo: satisfactorio. Color rojo: poco satisfactorio				

Probabilidad alta ++, probabilidad media +, probabilidad baja -

<sup>85</sup> Escobar, L.; Martínez, S.; Del Rio, M. A.; Vaca, L. Nervous System Infection Caused by The SARS-CoV-2 Coronavirus. *Rev. Fac. Med. (Méx)*. 2021.

### 8.1.3.3 SUSTRATO DE GLICOPROTEÍNA-P

Se determinó la probabilidad de la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** como sustratos de la glicoproteína-P (P-gp). La P-gp es codificada por el gen ABCB-1 (transportadores dependientes de ATP, del inglés *ATP-binding cassette*), dicha glicoproteína se expresa en múltiples tejidos como: células sanguíneas, BHE, hepatocitos y en las células del túbulo proximal renal especialmente. La P-gp actúa como bomba expulsora de fármacos, con mayor recurrencia en el tracto gastrointestinal donde promueve la expulsión de fármacos de tipo: antitumorales, antiepilépticos e inhibidores de proteasa, lo cual manifiesta una limitación de su absorción. Por ende, el flujo efectuado por la P-gp es un parámetro de importancia en el área de descubrimiento de nuevas entidades químicas, ya que altera las propiedades del perfil farmacocinético.<sup>86</sup>

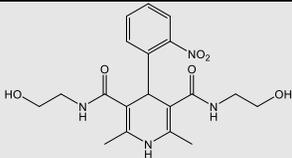
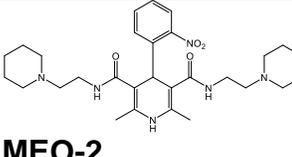
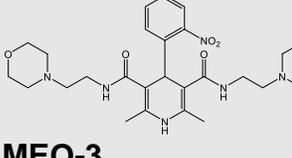
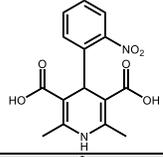
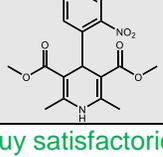
La probabilidad de los compuestos **MEO 1-4** y nifedipina de ser sustratos de la P-gp se muestran en la **Tabla 9**.

El compuesto **MEO-4** presenta bajas probabilidades de ser sustratos de la P-gp al igual que el fármaco de referencia nifedipina, mientras que los compuestos **MEO 1-3** presentan probabilidad media de ser sustratos, por tanto, pueden estar relacionados con la resistencia a fármacos mediado por la proteína de eflujo.

---

<sup>86</sup> Peralta, G.; Sánchez, M.; Echevarría, S.; Valdizán, E.; Armijo, J. P-glycoprotein and Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Infect Dis.* **2008**, 26 (3), 150-159.

**Tabla 9.-** Probabilidad de ser sustratos de la glicoproteína-P de la serie de compuestos **MEO 1-4** y nifedipina.

Sustrato glicoproteína-P				
Compuesto	SwissADME	admetSAR	ADMETlab	Resultado
 <p><b>MEO-1</b></p>	+	+	+	
 <p><b>MEO-2</b></p>	+	++	+	
 <p><b>MEO-3</b></p>	+	+	+	
 <p><b>MEO-4</b></p>	-	-	-	
 <p>Nifedipina</p>	-	-	-	
Color verde: muy satisfactorio. Color amarillo: satisfactorio. Color rojo: poco satisfactorio				

Probabilidad alta ++, probabilidad media +, probabilidad baja -

### 8.1.4 PERFIL TOXICOLÓGICO

Los parámetros toxicológicos son altamente importantes en la etapa temprana del diseño de nuevas moléculas pequeñas ya que con ello se puede descartar la presencia de alertas estructurales generadas por ciertos grupos funcionales, lo cual reduce el riesgo de presentar efectos adversos significativos a futuro. En este apartado se tomaron en cuenta las siguientes evaluaciones: inhibición de las principales isoformas de CYP 450, bloqueo de canales hERG, mutagenicidad,

carcinogenicidad y toxicidad aguda. Tales evaluaciones se describen a continuación.

#### 8.1.4.1 INHIBICIÓN DE PRINCIPALES ISOFORMAS DE CYP 450

En el presente proyecto se evaluaron las principales isoformas del citocromo P450 (CYP 450): 3A4, 2D6 y 2C9 responsables de la biotransformación de la mayoría de los fármacos. La inhibición de dichas isoformas está relacionado con interacciones fármaco-fármaco.

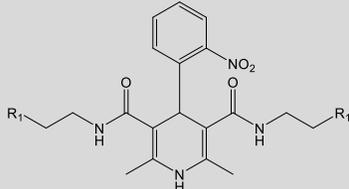
Las enzimas del CYP450 catalizan reacciones de biotransformación de fase I de xenobióticos mayormente los de carácter lipofílico o moléculas no polares que ingresan al organismo por lo que es necesario hacerlos polares para su correcta eliminación. Las familias de enzimas CYP450 involucradas en el metabolismo de la mayoría de los fármacos son primordialmente 2D6, 2C9 y 3A4 siendo esta última la enzima más abundante.<sup>87</sup> La evaluación de inhibición de las isoformas de CYP 450 es de gran importancia ya que con ello se pueden descartar interacciones significativas fármaco-fármaco, lo cual reduciría el riesgo de presentar efectos adversos. En la **Tabla 10** se muestran los resultados de la predicción de inhibición de las principales isoformas de CYP 450.

La serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** al igual que el fármaco de referencia nifedipina presentaron probabilidades bajas de ser inhibidores de las principales isoformas de CYP 450, por lo que se puede descartar la presencia de interacciones de tipo fármaco-fármaco lo cual daría como resultado pocas probabilidades de presentar efectos adversos. Por otro lado, el fármaco control positivo ketoconazol presentó altas probabilidades de inhibir dichas isoformas y a pesar de ello es empleado en la actualidad en la terapéutica como un agente antimicótico, a pesar de las muchas interacciones fármaco-fármaco que presenta.

---

<sup>87</sup> Quiñones, L.; Rosero, M.; Roco, A.; Moreno, I.; Sasso, J.; Varela, N.; Caceres, D.; Saavedra, I. Role of Cytochrome P450 Enzymes in the Metabolism of Antineoplastic Drugs. *Rev Med Chile*. **2008**, 136, 1327-1335.

**Tabla 10.-** Probabilidad de inhibición de CYP 450 de la serie de compuestos **MEO 1-4** y nifedipina.

Inhibición de CYP 450					
		<b>MEO-1</b> R <sub>1</sub> —OH <b>MEO-2</b> R <sub>1</sub> —N—(cyclohexane) <b>MEO-3</b> R <sub>1</sub> —N—(piperazine)			
Compuesto	Isoforma	admetSAR	ADMETlab	ACD/ToxSuite	Resultado
<b>MEO-1</b>	CYP3A4	+	-	-	
	CYP2D6	-	-	-	
	CYP2C9	-	-	-	
<b>MEO-2</b>	CYP3A4	+	-	-	
	CYP2D6	-	-	-	
	CYP2C9	-	-	-	
<b>MEO-3</b>	CYP3A4	+	-	-	
	CYP2D6	-	-	-	
	CYP2C9	-	-	-	
<b>MEO-4</b>	CYP3A4	+	-	-	
	CYP2D6	-	-	-	
	CYP2C9	-	-	-	
Nifedipina	CYP3A4	++	-	-	
	CYP2D6	-	-	-	
	CYP2C9	-	-	-	
Ketoconazol	CYP3A4	++	++	++	
	CYP2D6	+	++	+	
	CYP2C9	+	+	+	
Color verde: muy satisfactorio. Color amarillo: satisfactorio. Color rojo: poco satisfactorio					

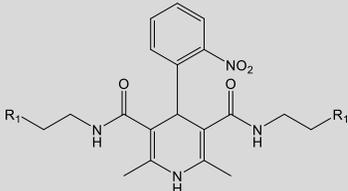
Probabilidad alta ++, probabilidad media +, probabilidad baja -

### 8.1.4.2 BLOQUEO DE CANALES hERG

Los canales hERG pertenecen a la familia de canales de potasio los cuales tienen un papel muy importante en la actividad eléctrica normal del corazón. Dichos canales dependientes de voltaje no sólo ejercen su función en el tejido cardíaco, sino que también colaboran en otros procesos de importancia como en la transmisión de los impulsos nerviosos, la secreción de hormonas y neurotransmisores, e incluso tienen una destacada participación en la proliferación de células tumorales. Por ende, el bloqueo de los canales hERG pueden causar trastornos cardiacos muy graves que conlleven a presentar un mayor riesgo de

arritmias cardiacas y la muerte súbita, por lo tanto, es fundamental el desarrollo y la selección de compuestos bioactivos que no presenten valores de bloqueo hacia estos canales, previniendo efectos cardiotóxicos.<sup>88</sup> Los resultados obtenidos de la predicción de bloqueo de canales hERG se muestran en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.-** Probabilidad del bloqueo de canales hERG de la serie de compuestos **MEO 1-4**.

Bloqueo canales hERG				
		<b>MEO-1</b> R <sub>1</sub> —OH <b>MEO-2</b> R <sub>1</sub> —N(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> <b>MEO-3</b> R <sub>1</sub> —N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> O		
Compuesto	ADMETlab	admetSAR	ACD/ToxSuite	Resultado
<b>MEO-1</b>	-	-	-	
<b>MEO-2</b>	++	+	++	
<b>MEO-3</b>	+	+	++	
<b>MEO-4</b>	-	-	-	
Nifedipina	-	-	-	
Clorfenamina	++	++	++	
Color verde: muy satisfactorio. Color amarillo: satisfactorio. Color rojo: poco satisfactorio				

Probabilidad alta ++, probabilidad media +, probabilidad baja -

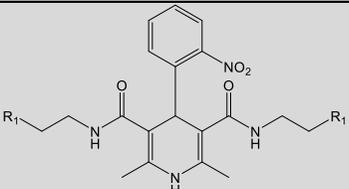
Los compuestos **MEO-1** y **MEO-4** presentan probabilidades bajas de ser bloqueadores de los canales hERG, mientras que los compuestos **MEO-2** y **MEO-3** presentan probabilidades moderadas de ser bloqueadores de dichos canales. No obstante, el fármaco control positivo empleado clorfenamina obtuvo probabilidades muy altas de bloquear dichos canales y actualmente se encuentra disponible en la terapéutica como antihistamínico de venta libre.

<sup>88</sup> Mitcheson, J. S. hERG Potassium Channels and the Structural Basis of Drug-Induced Arrhythmias. *Chemical Research in Toxicology*. **2008**, 21 (5), 1005-1010.

### 8.1.4.3 TOXICIDAD DE AMES (MUTAGENICIDAD) Y CARCINOGENICIDAD

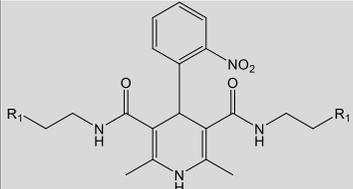
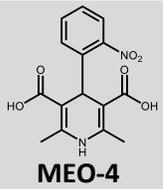
En las **Tablas 12 y 13** se muestran los resultados de la probabilidad de que los compuestos presenten propiedades mutagénicas y carcinogénicas. En ambos parámetros evaluados se puede observar que la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** y nifedipina presentaron valores bajos de ser mutagénicos y carcinogénicos.

**Tabla 12.-** Ensayo de AMES de la serie de compuestos **MEO 1-4** y nifedipina.

Ensayo de AMES				
		<p><b>MEO-1</b> R<sub>1</sub> —OH</p> <p><b>MEO-2</b> R<sub>1</sub> —</p> <p><b>MEO-3</b> R<sub>1</sub> —</p>		
Compuesto	Pre-ADME	admetSAR	ADMETlab	Resultado
<b>MEO-1</b>	-	-	-	
<b>MEO-2</b>	-	-	-	
<b>MEO-3</b>	-	-	-	
<b>MEO-4</b>	-	-	-	
Nifedipina	-	-	-	
<p>Color verde: muy satisfactorio. Color amarillo: satisfactorio. Color rojo: poco satisfactorio</p>				

Probabilidad alta ++, probabilidad media +, probabilidad baja -

**Tabla 13.-** Prueba de carcinogenicidad de los compuestos **MEO 1-4** y nifedipina.

Carcinogenicidad				
		<b>MEO-1</b> R <sub>1</sub> —OH <b>MEO-2</b> R <sub>1</sub> —N(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> <b>MEO-3</b> R <sub>1</sub> —N(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> O		
Compuesto	Pre-ADME	admetSAR	ADMETlab	Resultado
<b>MEO-1</b>	-	-	-	
<b>MEO-2</b>	-	-	-	
<b>MEO-3</b>	-	-	-	
<b>MEO-4</b>	-	-	-	
Nifedipina	-	-	-	
Color verde: muy satisfactorio. Color amarillo: satisfactorio. Color rojo: poco satisfactorio				

Probabilidad alta ++, probabilidad media +, probabilidad baja -

#### 8.1.4.4 TOXICIDAD AGUDA

La toxicidad aguda es un tipo de ensayo que permite evaluar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>), la cual se define como la cantidad de una sustancia necesaria para matar a la mitad de un conjunto de población a evaluar en un cierto tiempo determinado. Dicho cálculo se determinó con el servidor ACD/ToxSuite, el cual predice los valores de DL<sub>50</sub> basándose en modelos de ratón y rata, empleando diferentes vías de administración tales como: vía Intraperitoneal (IP) y la vía oral (VO). Los resultados obtenidos para el parámetro de toxicidad aguda se muestran en la **Tabla 14**.

**Tabla 14.-** Determinación de la toxicidad aguda de la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** y nifedipina.

Compuesto	DL <sub>50</sub> (mg/kg) Modelo de estudio y vía de administración				Calificación
	Ratón IP	Ratón VO	Rata IP	Rata VO	
<b>MEO-1</b>	150	290	100	100	
<b>MEO-2</b>	150	560	32	130	
<b>MEO-3</b>	100	630	42	140	
<b>MEO-4</b>	170	920	220	1900	
NIFEDIPINA	160	800	250	1472	

Todos los valores de  $DL_{50}$  arrojados por el programa ACD/ToxSuite de la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** muestran calificaciones entre bajos y medios, lo cual indica que no presentaran valores significativos de toxicidad, teniendo así valores similares al fármaco control empleado Nifedipina.

Con el apoyo de los valores arrojados del parámetro de  $DL_{50}$ , la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4** y el fármaco control empleado nifedipina se pueden clasificar por su grado de toxicidad de acuerdo a los parámetros empleados por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD). Dichos parámetros se muestran en la **Tabla 15**.

**Tabla 15.-** Clasificación de la toxicidad de acuerdo a la OECD.

Categoría	Rango de la $DL_{50}$	Clasificación
I	$DL_{50} < 5\text{mg/kg}$	Altamente tóxico
II	$5\text{mg/kg} \leq DL_{50} \leq 50\text{mg/kg}$	Muy tóxico
III	$50\text{mg/kg} \leq DL_{50} \leq 300\text{mg/kg}$	Tóxico
IV	$300\text{mg/kg} \leq DL_{50} \leq 2000\text{mg/kg}$	Toxicidad moderada
V	$DL_{50} > 2000\text{mg/kg}$	Sin peligro

La categoría IV es donde se encuentran la mayoría de los fármacos empleados actualmente en el mercado. Con base a los resultados arrojados por el servidor ACD/ToxSuite los compuestos **MEO 1-3** se encuentran dentro de la categoría 3-4 de la clasificación de la OECD, mientras que el compuesto **MEO-4** se encuentra dentro de la categoría 4-5 presentando valores similares al fármaco de referencia Nifedipina que se encuentra en la misma categoría.

### 8.1.5 ANÁLISIS DE CONSENSO FARMACOLÓGICO

El análisis de consenso farmacológico reúne todos los resultados de las diferentes herramientas quimio-informáticas empleadas, el cual tiene como propósito la identificación de aquellos compuestos que presenten las mejores características tanto físico-químicas, farmacodinámicas, farmacocinéticas y toxicológicas. En la **Tabla 16** se presenta el análisis de consenso farmacológico realizado para la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4**. Se determinaron las características físico-químicas donde los compuestos **MEO-1**, **MEO-2** y **MEO-4** presentaron propiedades óptimas. Para el perfil farmacodinámico se evaluó la probabilidad de inhibición de la proteína 3CLpro de SARS-CoV-2 donde únicamente el compuesto **MEO-1** registró un valor discreto de inhibición, esto se debe a que el servidor de PASS no encontró similitud estructural con estructuras reportadas con este efecto. Además, dentro del perfil farmacodinámico se evaluó el comportamiento de los compuestos basado en los scores obtenidos por los programas empleados (AutoDock 4, AutoDock Vina y MOE), en tal estudio los compuestos **MEO 1-3** presentaron los mejores scores que la nifedipina y registrando mayor número de interacciones con los residuos de aminoácidos de interés dentro del sitio de unión. Por otro lado, se evaluó el perfil farmacocinético donde el compuesto **MEO-4** presentó los mejores valores y los compuestos **MEO 1-3** presentaron valores discretos. Y finalmente se determinó el perfil toxicológico, en tal parámetro los compuestos **MEO-1** y **MEO-4** no presentan alertas de toxicidad, mientras que los compuestos **MEO-2** y **MEO-3** presentan dos alertas por una probabilidad alta de bloquear canales hERG.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente basado en las puntuaciones obtenidas de cada compuesto diseñado, se determinó que los compuestos **MEO-1** y **MEO-4** presentaron los mejores valores, siendo seleccionados como hits computacionales seguros, por lo que serán candidatos para su futura síntesis y evaluación biológica.

**Tabla 16.** - Análisis de consenso farmacológico de los compuestos **MEO 1-4** y nifedipina.

		COMPUESTOS				
		MEO-1	MEO-2	MEO-3	MEO-4	NIFEDIPINA
PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS	PM (g/mol)	Green	Yellow	Yellow	Green	Green
	Log P	Green	Green	Green	Green	Green
	Sol. agua	Green	Green	Green	Green	Green
	Lipinski	Green	Green	Yellow	Green	Green
	Veber	Green	Green	Green	Green	Green
PROPIEDADES FARMACODINÁMICAS	Inhibidor de 3CLpro	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green
	AutoDock 4	Green	Green	Green	Yellow	Yellow
	AutoDock Vina	Green	Green	Green	Yellow	Yellow
	MOE	Green	Green	Green	Yellow	Yellow
PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS	Abs. intestinal	Green	Green	Green	Green	Green
	Abs. BHE	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
	Sustrato glicoproteína P	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green
TOXICIDAD	AMES	Green	Yellow	Yellow	Green	Green
	CYP 3A4	Green	Green	Green	Green	Green
	hERG	Green	Red	Red	Green	Green
<p>Color verde: muy satisfactorio.    Color amarillo: satisfactorio.    Color rojo: poco satisfactorio</p>						

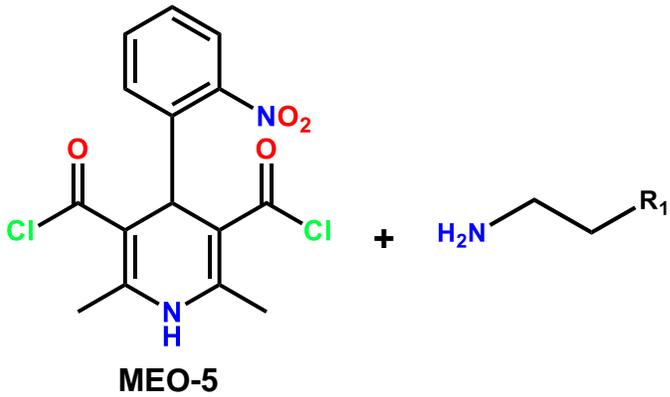
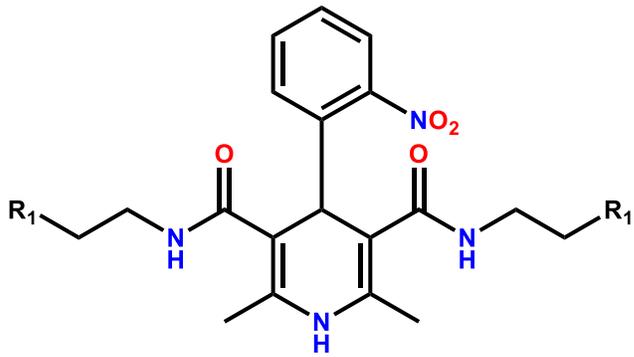
## 8.2 PARTE QUÍMICA

### 8.2.1 RETROSÍNTESIS

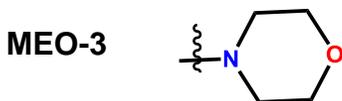
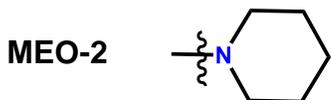
El análisis retrosintético es una de las técnicas que se emplean en los laboratorios de química orgánica para el diseño de moléculas. Dicha técnica permite retroceder paso a paso de una molécula objetivo a un conjunto de materias primas que sean asequibles comercialmente y que puedan ser utilizadas como materias primas para la síntesis de una determinada serie de compuestos. En tal análisis retrosintético se consideran los diferentes grupos funcionales, tipos de enlaces y la estereoquímica que pueden ser tomados en cuenta para la planeación de una ruta de síntesis de una determinada serie de compuestos de interés ahorrándose tiempo, materiales y recursos.

Se realizó un esquema general de la retrosíntesis para la obtención de las materias iniciales de los compuestos **MEO 1-4**, dicho esquema se visualiza en la **Figura 37**. Para la obtención de las materias iniciales de los compuestos **MEO 1-3** inicia con una serie de desconexiones a los grupos amida para obtener al precursor cloruro de ácido (**MEO-5**) y la respectiva amina. Por otro lado, para la obtención de las materias iniciales del compuesto **MEO-4** primeramente, se lleva a cabo un intercambio de grupo funcional cambiando los cloruros de ácido del precursor **MEO-5** por ácidos carboxílicos del compuesto **MEO-4** generado, posterior a ello se lleva a cabo otro intercambio de grupo funcional de un ácido carboxílico a éster perteneciente al fármaco nifedipina.

Compuestos **MEO 1-3**



Donde  $R_1$  puede ser:



**MEO-5**

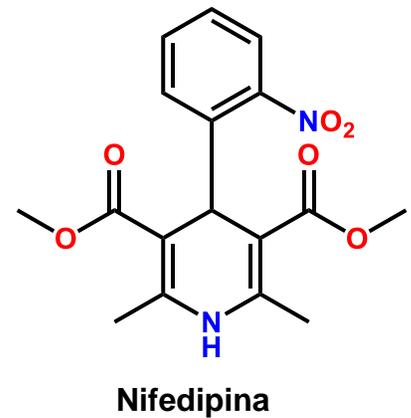
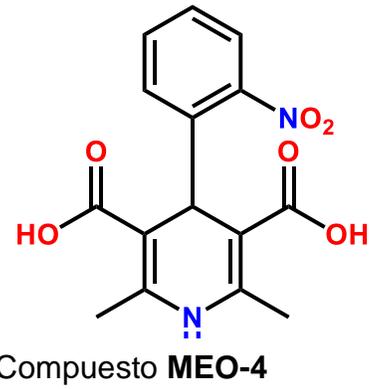
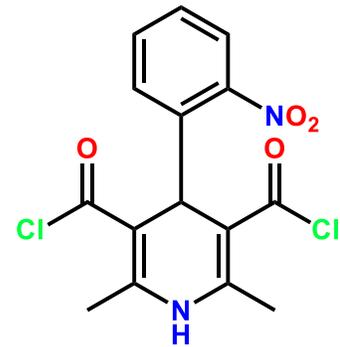
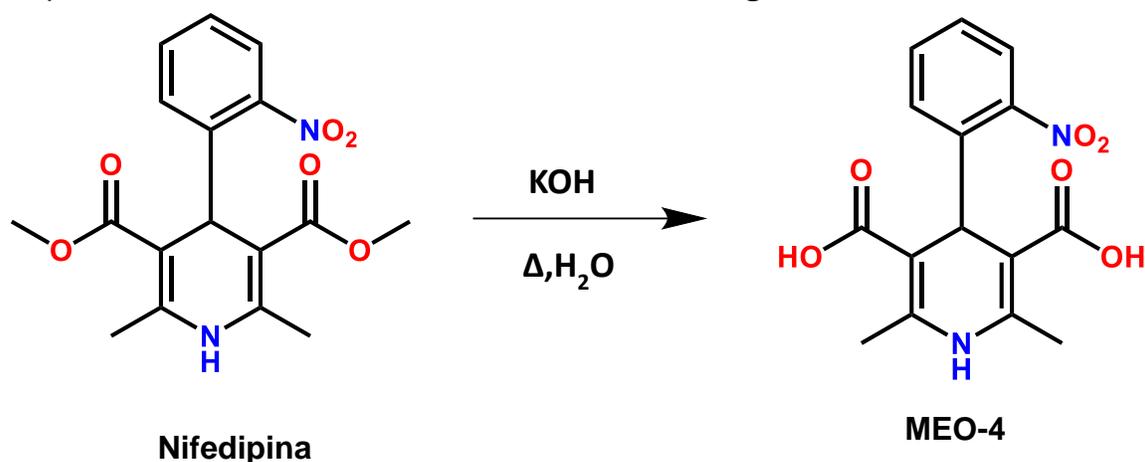


Figura 37.- Esquema general de retrosíntesis para la serie de compuestos diseñados **MEO 1-4**.

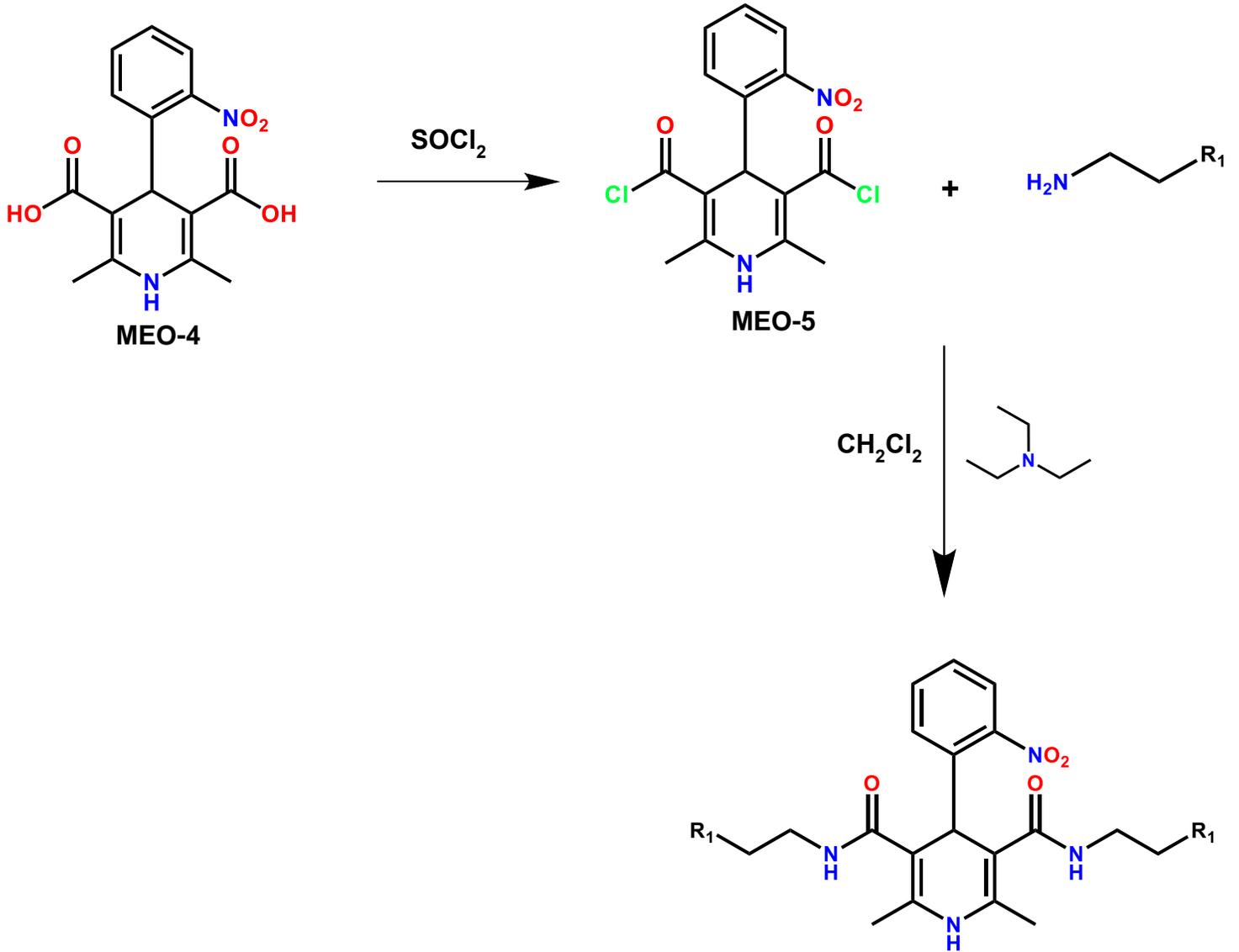
## 8.2.2 PROPUESTA DE LA SÍNTESIS QUÍMICA

Para la síntesis de los compuestos, se realizará primeramente la extracción del principio activo (nifedipina) a partir de tabletas que lo contengan, posteriormente se realizará una reacción de hidrólisis básica con hidróxido de potasio (KOH) en agua/metanol como disolvente, esto en presencia de calor para obtener al compuesto **MEO-4**, dicha síntesis se muestra en la **Figura 38**.



**Figura 38.-** Esquema general de la reacción para la obtención del compuesto **MEO-4**.

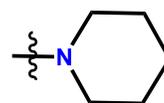
Para generar al precursor **MEO-5** se realizará un cambio de grupo funcional con cloruro de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ) u  $\text{POCl}_3$  para la formación del cloruro de ácido. Una vez generado el precursor, se puede llevar a cabo una reacción de amidación de tipo Schotten-Baumann, en donde se hace reaccionar al respectivo cloruro de ácido (**MEO-5**) con una amina para la formación de la amida y con ello obtener a los compuestos **MEO 1-3**. Dicha reacción se lleva a cabo utilizando diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) como disolvente y trietilamina como base, dicha reacción se representa en la **Figura 39**.



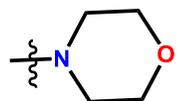
**MEO-1**



**MEO-2**



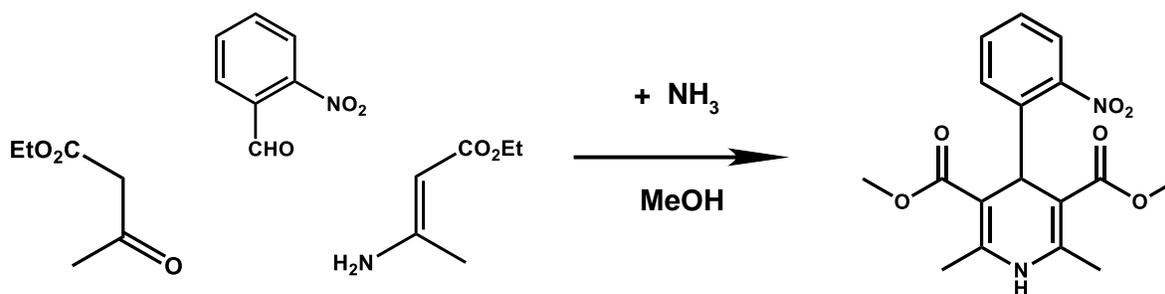
**MEO-3**



**Figura 39.-** Esquema general de la reacción para la obtención de los compuestos **MEO 1-3**.

### 8.2.2.1 SÍNTESIS DE HANTZSCH DE NIFEDIPINA

En caso de no poder extraer el principio activo de las tabletas comerciales, se puede preparar mediante la síntesis de Hantzsch de nifedipina (**Figura 40**), dicha reacción se lleva a cabo empleando 1 equivalente de un aldehído aromático, 2 equivalentes de acetoacetato y 1 equivalente de amoníaco, utilizando metanol como disolvente.<sup>89</sup>



**Figura 40.-** Esquema general de reacción de Hantzsch para nifedipina.

<sup>89</sup> Saunders, J. Top Drugs: Top Synthetic Routes (1ed), *Oxford Chemistry Primers*, UK. (2000).

## 9. CONCLUSIONES

- Se diseñó una serie de compuestos **MEO 1-4** análogos de nifedipina con acción peptidomimética sobre la proteasa 3CLpro.
- Los compuestos **MEO 1-3** presentaron interacciones con los residuos de aminoácidos de interés (Met165, Gln189 e His41) dentro del sitio de unión de la proteasa 3CLpro bloqueando al residuo nucleofílico de Cisteína, también presentaron mejor score que el fármaco de referencia (nifedipina) por tal se espera que dichos compuestos presenten mejor actividad contra SARS-CoV-2.
- En general la serie de compuestos diseñados presentaron propiedades farmacocinéticas adecuadas.
- Los compuestos **MEO-1** y **MEO-4** obtuvieron los mejores valores en los perfiles farmacológicos y toxicológicos calculados por el análisis de consenso farmacológico, seleccionando a ambos como hits computacionales seguros y haciéndolos candidatos para su futura síntesis y su posterior evaluación biológica *in vitro*.

## 10. PERSPECTIVAS

- Priorizar la síntesis química y la asignación estructural de los compuestos **MEO-1** y **MEO-4**.
- Priorizar el ensayo biológico *in vitro* del compuesto **MEO-1** y **MEO-4** contra la proteasa principal de SARS-CoV-2.
- Obtener los modelos de acoplamiento molecular de los compuestos **MEO-1** y **MEO-4** sobre la proteasa principal 3CLpro.

# 11.REFERENCIAS

- (1) Hoffman, R. L.; Kania, R. S.; Brothers, M. A.; Davies, J. F.; Ferre, R. A.; Gajiwala, K. S.; He, M.; Hogan, R. J.; Kozminski, K.; Li, L. Y.; et al. Discovery of Ketone-Based Covalent Inhibitors of Coronavirus 3CL Proteases for the Potencial Therapeutic Treatment of COVID-19. *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (21), 12725.
- (2) Cannalire, R.; Cerchia, C.; Beccari, A. R.; Di Leva, F. S.; Summa, V. Targeting SARS-CoV-2 Proteases and Polymerase for COVID-19 Treatment: State of the Art and Future Opportunities. *J. Med. Chem.* **2022**, 65 (4), 2716-2746.
- (3) Choudhry, N.; Zhao, X.; Xu, D.; Zanin, M.; Chen, W.; Yang, Z.; Chen, J. Chinese Therapeutic Strategy for Fighting COVID-19 and Potential Small-Molecule Inhibitors against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (22), 13205-13227.
- (4) Hoon, S.; Goins, C. M.; Arya, T.; Shin, W. J.; Maw, J.; Hooper, A.; Sonawane, D. P.; Porter, M. R.; Banniester, B. E.; Crouch, R. D.; et al. Structure-Based Optimization of ML300-Derived, Noncovalent Inhibitors Targeting the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3CL Protease (SARS-CoV-2 3CL<sup>pro</sup>). *J. Med. Chem.* **2022**, 65 (4), 2880-2904.
- (5) Tang, T.; Jaimes, J. A.; Bidon, M. K.; Stratus.; Daniel, S.; Whittaker, G. R. Proteolytic Activation of SARS-CoV-2 Spike at the S1/S1 Boundary: Potential Role of Proteases beyond Furin. *J. Med. Chem.* **2021**, 7 (2), 264-272.
- (6) Organización Mundial de la Salud. (23 de junio de **2022**). *Tablero de la OMS sobre el coronavirus (COVID-19)*. <https://covid19.who.int/>
- (7) Holmes, E. C.; Goldstein, S. A.; Rasmussem, A. L.; Robertson, D. L.; Crits-Christoph, A.; Wertheim, J. O.; Anthony, S. J.; Barclay, W. S.; Boni, M. F.; Doherty, P. C.; et al. The Origins of SARS-CoV-2: A Critical Review. *Cell.* **2021**, 184 (19), 4848-4856.
- (8) Domingo, J. L. What We Know and What We Need to Know About the Origin of SARS-CoV-2. *Environental Research.* **2021**, 200, 111785.

- (9) Gil, C.; Ginex, T.; Maestro, I.; Nozal, V.; Barrado-Gil, L.; Cuesta-Geijo, M. A.; Urquiza, J.; Ramírez, D.; Alonso, C.; Campillo, N. E.; Martínez, A. COVID-19: Drug Targets Potential Treatments. *J. Med. Chem.* **2020**, 63 (21), 12359-12386.
- (10) Li, X.; Luk, H. K.; Lau, S. K.; Woo, P. C. Human Coronaviruses: General Features. *Reference Module in Biomedical Sciences*, B978-0-12-801238-3.95704-0. **2019**.
- (11) Bakhshandeh, B.; Jahanafrooz, Z.; Abbasi, A.; Babae, M.; Sadeghi, M.; Sadeq, M.; Zamani, M. Mutations in SARS-CoV-2; Consequences in Structure, Function, and Pathogenicity of the Virus. *Microbial Pathogenesis.* **2021**, 154, 104831.
- (12) Khan, W. H.; Khan, N.; Mishra, A.; Gupta, S.; Bansode, V.; Mehta, D.; Bhambure, R.; Ansari, M. A.; Das, S.; Rathore, A. S. Dimerization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein affects sensitivity of ELISA based diagnostics of COVID-19. *International Journal of Biological Macromolecules.* **2022**, 200, 428-437.
- (13) Peele, K. A.; Kumar, V.; Parate, S.; Srirama, K.; Lee, K. W.; Venkateswarulu. In silico drug repurposing using FDA approved drugs against Membrane protein of SARS-CoV-2. **2021**, 110 (6), 2346-2354.
- (14) Duart, G.; García-Murria, M. J.; Mingarro, I. The SARS-CoV-2 envelope (E) protein has evolved towards membrane topology robustness. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* **2021**, 1863 (7).
- (15) Shokeen, K.; Pandey, S.; Shah, M.; Kumar, S. Insight towards the effect of the multi basic cleavage site of SARS-CoV-2 spike protein on cellular proteases. *Virus Research.* **2022**, 318, 198845.
- (16) Aranda, J.; Wiczór, M.; Terrazas, M.; Brun-Heath, I.; Orozco, M. Mechanism of reaction of RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2. *Chem Catalysis.* **2022**, 2 (5), 1084-1099.
- (17) Kumar, P.; Dipak, P.; Chakravorty, D. Nature's therapy for COVID-19: Targeting the vital non-structural proteins (NSP) from SARS-CoV-2 with phytochemicals from Indian medicinal plants. *Phytomedicine Plus.* **2021**, 1 (1), 100002.

- (18) Protein Data Bank. (junio 2021). *Deposición del grupo de análisis de PanDDA: estructura cristalina de la proteasa principal de COVID-19 en complejo con Z219104216*. <https://www.rcsb.org/structure/5R82> Fecha de consulta marzo **2021**.
- (19) Ravanfar, R.; Sheng, Y.; Shahgholi, M.; Lomenick, B.; Jones, J.; Chou, T. F.; Gray, H. B.; Winkler, J. R. Surface cysteines could protect the SARS-CoV-2 main protease from oxidative damage. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2022**, 234, 111886.
- (20) Reyaz, S.; Tansneem, A.; Prakash, G.; Bairagya, H. R. Investigation of structural analogs of hydroxychloroquine for SARS-CoV-2 main protease (Mpro): A computational drug discovery study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **2021**, 109, 108021.
- (21) Kneller, D.; Phillips, G.; Weiss, K.; O'Neill, H.; Coates, L.; Kovalevsky, A. Unusual zwitterionic catalytic site of SARS-CoV-2 main protease revealed by neutron crystallography. *Journal of Biological Chemistry*. **2020**, 295, P17365-17373.
- (22) Hu, Q.; Xiong, Y.; Zhu, G. H.; Zhang, Y. N.; Zhang, Y. W.; Huang, P.; Ge, G. The SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19. *MedComm*. **2022**, 3 (3), e151.
- (23) Reddy, U.; Routhu, N. K.; Kumar, A. Multifaceted roles of plant derived small molecule inhibitors on replication cycle of SARS-CoV-2. *Microbial Pathogenesis*. **2022**, 168, 105512.
- (24) Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. *Clasificación y definiciones de las variantes de SARS-CoV-2*. <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html> Fecha de consulta enero **2022**.
- (25) Chen, K. W. K.; Huang, D. T. N.; Huang, L. M. SARS-CoV-2 variants – Evolution, spike protein, and vaccines. *Biomedical Journal*. **2022**.
- (26) Gómez, J. J.; Álvarez, M. J.; Martín, S. Javierre, A. P. Papel protector de las actuales vacunas para las variantes del virus SARS-CoV-2 y la COVID

- persistente. FMC - *Formación Médica Continuada en Atención Primaria*. **2022**, 29 (1), 16-25.
- (27) Shao, W.; Zhang, W.; Fang, X.; Yu, D.; Wang, X. Challenges of SARS-CoV-2 Omicron Variant and appropriate countermeasures. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. **2022**, 55 (3), 387-394.
- (28) Callaway, E. (2022) Will Centaurus Be The Next Global Coronavirus Variant. *Nature*, vol. 608.
- (29) Hansen, C.; Friis, N.; Stegger, M.; Fonager, J.; Fomsgaard, A.; Gram, M.; Christiansen, L.; Ethelberg, S.; Legarth, R.; Krause, T.; Ullum, H.; Valentiner-Branth, P. Risk of reinfection, vaccine protection, and severity of infection with the BA.5 omicron subvariant: a nation-wide population-based study in Denmark. *The Lancet. Infectious diseases*. **2023**, 23 (2), 167-176.
- (30) Qu, P.; Evans, J.; Faraone, J.; Zheng, Y.; Carlin, C.; Anghelina, M.; Stevens, P.; Fernandez, S.; Jones, D.; Lozanski, G.; Panchal, A.; Saif, L.; Oltz, E.; Xu, K.; Gumina, R.; Liu, S. Enhanced neutralization resistance of SARS-CoV-2 Omicron subvariants BQ.1, BQ.1.1, BA.4.6, BF.7 and BA.2.75.2. *Cell host & microbe*. **2023**, 31 (1), 9-17.
- (31) Wang, Q.; Iketani, S.; Li, Z.; Liu, L.; Gou, Y.; Huang, Y.; Bowen, A.; Liu, M.; Wang, M.; Yu, J.; Valdez, R.; Lauring, A.; Sheng, Z.; Wang, H.; Gordon, A.; Liu, L.; Ho, D. Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants. *Cell*. **2023**. 186 (2), 279-286.
- (32) Reina, J.; Iglesias, C. Nirmatrelvir plus ritonavir (Paxlovid) a potent SARS-CoV-2 3CLpro protease inhibitor combination. *Official journal of the Spanish Society of Chemotherapy*. **2022**, 35 (3), 236-240.
- (33) Organización Mundial de la Salud. (junio de **2021**). *Más información sobre la pandemia de COVID-19*. [https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#tab=tab\\_3](https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#tab=tab_3)
- (34) Portal CLINIC. (noviembre **2021**) *Diagnóstico del coronavirus SARS-CoV-2*. <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/covid-19/diagnostico>
- (35) Oh, H.; Ahn, H.; Tripathi, A. A Closer Look into FDA-EUA Approved Diagnostic Techniques of Covid-19. *J. Med. Chem*. **2021**, 7 (10), 2787-2800.

- (36) Ribeiro, S. J.; Alves, C. T.; Miranda, K.; Germano, R. P.; Alain, K. P.; Pena, Lindomar. Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. *J. Med. Chem.* **2020**, 6 (9), 2319-2336.
- (37) Salud Digna-COVID-19. (septiembre **2022**). Prueba de Antígenos <https://www.salud-digna.org/antigeno-covid-19/>
- (38) Vacuna COVID-19 (julio **2022**). Información de la vacuna. <http://vacunacovid.gob.mx/wordpress/informacion-de-la-vacuna/>
- (39) Chan, C.; Foster, S. T.; Chan, K. G.; Cacace, M. J.; Ladd, S. L.; Sandum, C. T.; Wright, P. T.; Volmert, B.; Yang, W.; Aguirre, A.; Li, W.; Wright, N. T. Repositioned Drugs for COVID-19-the Impact on Multiple Organs. *SN Compr Clin Med.* **2021**; 3 (7), 1484-1501.
- (40) Guía Clínica para el Tratamiento de la COVID-19 en México 2022. (marzo **2022**). <https://coronavirus.gob.mx/wp-content/uploads/2022/02/2022.02.15-GuiaClinicaTxCOVID.pdf>
- (41) Mendoza-Pinto, C.; García-Carrasco, M.; Munguía, P; Méndez-Martínez, S. Therapeutic Options in Managing the Severity of COVID-19: a Rheumatology Perspective. *Clinical Rheumatology.* **2021**, 17 (8), 431-436.
- (42) DrugBank. (marzo **2022**). *Mecanismo de Acción de la Heparina.* <https://go.drugbank.com/drugs/DB01109>
- (43) DrugBank. (marzo **2022**). *Mecanismo de Acción de la Enoxaparina.* <https://go.drugbank.com/drugs/DB01225>
- (44) Yan, V. C.; Muller, F. L. Advantages of the Parent Nucleoside GS-441524 over Remdesivir for Covid-19 Treatment. *J. Med. Chem.* **2020**, 11 (7), 1361-1366.
- (45) Dubeau, D. Y.; Thomas, C. J. The Remarkable Selectivity of Nirmatrelvir. *ACS Pharmacology & Translational Science.* **2022**, 5 (6), 445-447.
- (46) Coulson, J. M.; Adams, A.; Gray, L. A.; Evans, A. COVID-19 “Rebound” associated with nirmatrelvir/ritonavir pre-hospital therapy. *Journal of Infection.* **2022**.
- (47) Guía rápida de prescripción clínica en el uso de emergencia de Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir) en grupos de riesgo para COVID-19, en Mexico 2022-

2023. (abril 2023) [https://coronavirus.gob.mx/wp-content/uploads/2023/01/Gui%CC%81a-ra%CC%81pida-de-prescripcion-Paxlovid\\_160123.pdf](https://coronavirus.gob.mx/wp-content/uploads/2023/01/Gui%CC%81a-ra%CC%81pida-de-prescripcion-Paxlovid_160123.pdf)

- (48) Wen, W.; Chen, C.; Tang, J.; et al. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis. *Ann. Med.* **2022**, 54 (1), 516-523.
- (49) Valiulin, S. V.; Onischuk, A. A.; Dubtsov, S.N.; et al. Aersol Inhalation Delivery of Triazavirin in Mice: Outlooks for Advanced Therapy Against Novel Viral Infections. *J Pharmaci Sci.* **2021**, 110 (3), 1316-1322.
- (50) Wu, X.; Yu, K.; Wang, Y.; Xu, W.; Ma, H.; et al. The Efficacy and Safety of Triazavirin for COVID-19: A Trial Protocol. *Engineering.* **2020**, 6 (10), 1199-1204.
- (51) Leneva, I.; Kartashova, N.; Poromov, A.; Gracheva, A.; Korchevaya, E; et al. Antiviral Activity of Umifenovir In Vitro against a Broad Spectrum of Coronaviruses, Including the Novel SARS-CoV-2 Virus. *Viruses.* **2021**, 13 (8), 1665.
- (52) Nugroho, C. W.; Suryantoro, S.D.; Yuliasih, Y.; Rosyid, A. N.; Asmarawati, T.P.; et al. Optimal use of tocilizumab for severe and critical COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *F1000Res.* **2021**.
- (53) Cardenas, G.; Chavez-Cardenas, M.; Espinoza, A. M.; et al. Intranasal dexamethasone: a new clinical trial for the control of inflammation and neuroinflammation in COVID-19 patients. *Trials.* **2022**, 23 (1), 148. 2022 Feb 14.
- (54) Hameed, P.; Verspoor, K.; Kusljic, S.; Halgamuge, S. A two-tiered unsupervised clustering approach for drug repositioning throught heterogeneous data integration. *BMC bioinformatics.* **2018**,19 (1), 129.
- (55) Jarada, T.; Rokne, J.; Alhajj, R. A review of computational drug repositioning: strategies, approaches, opportunities, challenges, and directions. *Journal of cheminformatics.* **2020**, 12 (1), 46.
- (56) Manohar, K.; Gupta, R. K.; Gupta, P.; Saha, D.; Gare, S.; et al. FDA approved L-type channel blocker Nifedipine reduces cell death in hypoxic A549 cells

- through modulation of mitochondrial calcium and superoxide generation. *Free Radic Biol Med.* **2021**, 177, 189-200.
- (57) Straus, M. R.; Bidon, K.; Tang, T.; Jaimes, J. A.; Whittaker, G. R.; Daniel, S. Inhibitors of L-type calcium channels show therapeutic potential for treating SARS-CoV-2 infections by preventing virus entry and spread. **2020**.
- (58) Charan, C. Calcium Channel Blockers: A Possible Potential Therapeutics Strategy for the Treatment of Alzheimer's Dementia Patients with SARS-CoV-2 Infection. *ACS Chemical Neuroscience.* 2020, 11 (15), 2145-2148.
- (59) DrugBank. (diciembre **2020**). *Mecanismo de Acción de nifedipina y BBC.* <https://go.drugbank.com/drugs/DB01115>
- (60) Del Gatto, A.; Cobb, S.; Zhang, J.; Zaccaro, L. Peptidomimetics: Synthetic Tools for Drug Discovery and Development. *Front Chem.* **2021**.
- (61) Martínez Conde, Carlos. Síntesis y Evaluación In Silico de Benciloxibencilidenbarbituratos con Afinidad a Múltiples Blancos (multi target) para el Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo II. Tesis de Licenciatura, Facultad de Farmacia UAEM., **2015**.
- (62) Morales Montecinos, Juan. Caracterización Electroquímica y Reactividad con Radicales 3,4 dihidroxifenil, 3,5 dihidroxifenil y C-4 Galato 1,4 Dihidropiridinas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile., **2007**.
- (63) Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. Glossary of Terms Used in. *Pure and Applied Chemistry* **1998**, 70(5), 1129–1143.
- (64) Lipinski, C.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery* **1997**, 23 (1-3), 3–25.
- (65) Molinspiration Cheminformatics disponible en la web: <https://www.molinspiration.com/> . Fecha de consulta: marzo **2021**.
- (66) PASS online disponible en la web: <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/predict.php> Fecha de consulta: diciembre **2020**.

- (67) Torres, P. H.; Sodero, A. C.; Jofily, P.; Silva-Jr, F. P. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci.* **2019**, 20 (18), 4574.
- (68) Miranda Martínez, J. Síntesis de Derivados Del Ácido Ferúlico Afines in Silico a Múltiples Dianas Terapéuticas Relacionadas En El Abordaje Experimental de La DM 2. Tesis de Licenciatura, Facultad de Farmacia, UAEM., **2018**.
- (69) AutoDock disponible en la web: <https://ccsb.scripps.edu/mgltools/> Fecha de consulta enero **2022**.
- (70) MOE (Molecular Operating Environment) disponible en la web: [https://www.chemcomp.com/Download\\_Request.htm](https://www.chemcomp.com/Download_Request.htm) Fecha de consulta enero **2022**.
- (71) PyMOL disponible en la web: <https://pymol.org/2/> Fecha de consulta enero **2022**.
- (72) Swiss ADME disponible en web: <http://www.swissadme.ch/> Fecha de consulta diciembre **2020**.
- (73) AdmetSAR disponible en la web: <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/> Fecha de consulta junio **2022**.
- (74) Pre-ADMET disponible en la web: <https://preadmet.webservice.bmdrc.org/> Fecha de consulta junio **2022**.
- (75) ADMETlab disponible en la web: <https://admetmesh.scbdd.com/> Fecha de consulta junio **2021**.
- (76) Fuat Gatnik, M.; Worth, A. P. Review of Software Tools for Toxicity Prediction. *JRC Sci. Tech. Reports* **2010**, 1–22.
- (77) Organic Chemistry Portal disponible en la web: <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/schotten-baumann-reaction.shtm> Fecha de consulta abril **2023**.
- (78) Opera, TI. Property Distribution of Drug-Related Chemical Databases. *J Comput Aided Mol Des.* **2000**, 14 (3), 251-64.
- (79) Poroikov, V.; Filimonov, D.; Ihlenfeldt, W. D.; Glorizova, A.; Borodina, Y.; Stepanchikova, A.; Nicklaus, M. Pass Biological Activity Spectrum Predictions in the Enhanced Open NCI Database Browser. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, 43, 228-236.

- (80) Protein Data Bank disponible en la web: <https://www.rcsb.org/> Fecha de consulta marzo **2021**.
- (81) PerkinElmer Informatics disponible en la web: <https://perkinelmerinformatics.com/products/research/chemdraw> Fecha de consulta junio **2022**.
- (82) Ghahremanpour, M.; Tirado-Rives, J.; Deshmukh, M.; Ippolito, J. A.; Zhang, C. H.; Cabeza de Vaca, I.; Liosi, M. E.; Anderson, K. S.; Jorgensen, W. Identification of 14 Known Drugs as Inhibitors of the Main Protease of SARS-CoV-2. *Medicinal Chemistry Letters*. **2020**, 11 (12), 2526-2533.
- (83) DockRMSD (Docking Pose Distance Calculation) disponible en la web: <https://zhanggroup.org/DockRMSD/> Fecha de consulta julio **2022**.
- (84) Bernhardt, R. V. The Blood-Brain Barrier and the Pathology of the Central Nervous System: Its Importance for the Inflammatory Response. *Rev Chil Neuro-Psiquiat*. **2004**, 42 (2), 121-130.
- (85) Escobar, L.; Martinez, S.; Del Rio, M. A.; Vaca, L. Nervous System Infection Caused by The SARS-CoV-2 Coronavirus. *Rev. Fac. Med. (Méx)*. **2021**.
- (86) Peralta, G.; Sánchez, M.; Echevarría, S.; Valdizán, E.; Armijo, J. P-glycoprotein and Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Infect Dis*. **2008**, 26 (3), 150-159.
- (87) Quiñones, L.; Rosero, M.; Roco, A.; Moreno, I.; Sasso, J.; Varela, N.; Caceres, D.; Saavedra, I. Role of Cytochrome P450 Enzymes in the Metabolism of Antineoplastic Drugs. *Rev Med Chile*. **2008**, 136, 1327-1335.
- (88) Mitcheson, J. S. hERG Potassium Channels and the Structural Basis of Drug-Induced Arrhythmias. *Chemical Research in Toxicology*. **2008**, 21 (5), 1005-1010.
- (89) Saunders, J. Top Drugs: Top Synthetic Routes (1ed), *Oxford Chemistry Primers, UK*. (**2000**).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**U.A.E.M**  
**PRESENTE**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Secretaría de Docencia

Jefatura de Licenciatura en Farmacia

**Fecha: 14 de marzo del 2023**  
**Asunto: VOTOS APROBATORIOS**  
**Medio de notificación: Electrónico**  
**Folio: FF/D/SD/JLF/42/2023**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis “**Diseño de dihidropiridinas y su estudio farmacológico *in silico* como ligandos virtuales de la proteasa principal (Mpro/3CLpro) de SARS-CoV- 2**” presentado por el pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Mario Estrada Olivera (20171003255)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**Jurado**

**Firma**

Dra. María Crystal Columba Palomares

\_\_\_\_\_

Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

\_\_\_\_\_

Dra. Blanca Iris Colín Lozano

\_\_\_\_\_

Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

\_\_\_\_\_

Dra. Yoshajandith Aguirre Vidal

\_\_\_\_\_



Atentamente

**“Por una humanidad culta  
una Universidad de excelencia”**

**M.P.D. REYNA AMÉRICA SERRANO LÓPEZ**  
**SECRETARIA DE DOCENCIA**

C.c.p.: archivo  
\*BEDM

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, Edificio 61, ala C, 2° piso.  
Tel. (777) 329 7000.



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2023-03-16 17:54:17 | Firmante

RyazYydQtQOmXONv+/aU4wvT20U+EMHGqQez71FwfsR08G9Ec5j677ZfGGuOPtC51HKDHcUdEVIREHBDskQNYt8H8Sk3ZBhcoZ4h3Hdtklij93o0UV8xha3l97YmZ9v0GNJGY/  
LVlgUWu/zbi9EIE78NQFXCoGzmBJAa7Upb3jD+Rflkwn6YKLut5wbxWOTNB5YRCeHmKzmpmTgOtlggFqodQXhTyYqeYzglkHWKsL+srUTKR4lXZgrEZkvbZ5+MGt1/91KiEpFd  
iTDKdJBt4W3ATRylv+RTA/m8lIT60hoK2J1VHk/7q1PJSa271eT8NjlL63PBvdiv+B8eVg++Ag==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[mTlf8hWCx](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/pog4DSeynZNomDYw5j6M1SQ3lnMTclid>



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ** | Fecha:2023-04-17 11:19:22 | Firmante

c2m9/G3F23layGiOKILLuyJVMEjA0UvnBnVMRwm671nGhqvX5ebK8AwezheyUh3b9L1vmrcJeUO3PUsaHptB9f6EN073wLSskvQjgHzd/3faW5UOAtjuYqCXLSiMHfw3lw4HFZT  
RTINaqEce/ZN2PLdYPeY8d/5KUHdMNHqRsdReNfiQHMMVmlZiJGi1Pz4v5Ji60/p/8s03JLptEmah4e9SfhHden7hLYJT/JJZlo+2pJOLxz+kG4nNj+zAXKGJ+8bf9LhixUOY99srFfV  
L2NYPxOhLkPGvKZw3WxNVMWgNH5v7QjgZuP5TExc0UV+/CTU1boQ+BLxrPXVYQ==

**BLANCA IRIS COLÍN LOZANO** | Fecha:2023-04-17 11:19:59 | Firmante

XEc8ZKoiKWIBTBv0yvqHej6+ogVwzEa+cMcHOYwu/zFQWIHQeG0LItI75IFi5zv6HJio22qJAe/gvVgg7ISTv5RcdSyLorQgl7KndpCJC5yMgDSMiCt+Lmuq0beMsRUUPucVAUbdFJ  
v/pMx3SHX0TUA+ypkr8uLdRiZRTORBwZB9BBBUekJtNxiqJ0lxvekJTI4BZ+xl/QSIQ2ws6DcoC5KY6clrhcu3201Wd/8RPEjBh11FyVXR4PXqSCBik/i2RS73e87GNnyDIQdIWOA2  
O9/v3nDNAd+/QdcJcQfjoI4Q3+fY0E7XYLyAzmc1rr6cQ00KS3H6s9NF96bUjw7uA==

**JESSICA NAYELLI SANCHEZ CARRANZA** | Fecha:2023-04-17 11:30:48 | Firmante

hRNt7CQzhwmLS9+HtbW/Jlcfw06TxxPoqG67i/2FYbBB9x+Be5YCrcyy87HTaQS626tVXZlo981WKp22o+ENW5+Se1//gtPncz/9qd/FWEFwH4zvxy6ma7IMyv2WPrYBBjX874F4cf  
r/77p+/5PEQEhno3sCtoy8u7z8msfHLqAAIj52HVPAGZdTZcsXlo5JP1onQaoRpkusYNEezeA8Z4hVcmDKfMuV2cjoFLMRsAKeognCwMrVlj57QXOONki3ZcxH8Yf634+flXVulJ1  
mlXt8fJRf7h4jX9ZAiely+8pcRESiSozJnpfWXZfjmOaxBIAngtAESoKtcf0JR1Jpw==

**YOSHAJANDITH AGUIRRE VIDAL** | Fecha:2023-04-17 11:31:17 | Firmante

QkiJQQO/vCmGn4jqySXTFlIFLjAXZWyhog8ZrC1YFv1WKJ927CrtaGc7bUtkOvkMdN1BRTaxki6Qt4oqf4GoNkFJ92WvuuSh6gWBqOChXYybTWF11W+USfNXm11+n5UCm2K8g  
iya1x0+hEFHMEGL5qApQkdypzkeZt3oWyn2d8FBK1zz81rg46lYoG5D77JQNBDG1mIUw/NBA11FU9GS0FovS3iO6mVhf+u/dcN59BnNkChTBTdGudNgdRYST4dcG32cHFNDd  
yr9kr8R/yMV7Kjn/n4mmjQb/d8O5RkOuCWBN17KxtIUwP98yX2GXaxX1YAxr1YJtlq9g+jEQ==

**MARIA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES** | Fecha:2023-04-17 17:55:29 | Firmante

j4Gk4PUu1O5JsnGw5qlEeQpDOByahmRyurrRathuSTh+C2jt6rQx1tINXYmxw/94Kt1GtNQyFBn21ujxX+KXN9dB2weSLBDvyz8v65GILz84ub9S0TWZQnuSumX46g9RCvrZ2D  
qYe9K8Do8JJjNsBnV3UqbJNA6t4NML3EQK7wUWljCWjh3PlgXHSwiVXlw8WGsBG0Hh4upBiiffscS622XbMvQyf+mpVL6mZhSYkYjtUqAWiPh9/D3rnq4U4NirfyPPZ/C+u824D  
ThYUYbUo6MN76sGhXN/juOR0Wx81YyFqzI3U1DseVkmTEx+mCLKYerMCRdyPPd9DiWMCw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[odrv10Sqc](https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Am1jQ4EI5Byub7ofc9xZP9pY00dtZFsb)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Am1jQ4EI5Byub7ofc9xZP9pY00dtZFsb>