



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE  
FENILETILAMINAS N-SUSTITUIDAS COMO POTENCIALES  
LIGANDOS DE RECEPTORES DE DOPAMINA D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

**DARÍO ALEJANDRO MARTÍNEZ AFANI**

**PATROCINANTE**

Prof. Hernan Pessoa Mahana, PhD  
Depto. De Química Orgánica y Físicoquímica  
Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**DIRECTOR DE MEMORIA**

Prof. Bruce K. Cassels, PhD  
Depto. de Química  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

Santiago, Chile

2019



## AGRADECIMIENTOS

No hay forma de agradecer lo suficiente los grandes aportes realizados por cada una de las personas nombradas a continuación. Pero, aun así, aquí expreso parte de mi agradecimiento.

En primer lugar, agradecer a mi familia, ya que gracias a ellos existo y tengo la oportunidad de realizar mis sueños. A la Clarita, a la Raksha y a la Leia.

Agradecer a mi bonita Catalina Cortes, mi co-pilota en este viaje infinito donde nos ayudamos a surfear las olas de la vida. A la familia de la Cata que me recibieron como parte de la suya.

A mis amigos Sebastián Flores y a Pablo Manns (Kletus) por ser las personas más apañadoras que conozco en la vida y por tantas locuras realizadas.

A Renzo Zanocco, a pesar de no ponerme en su tesis. Igual te agradezco pelao. Por haber pasado tantas historias de las cuales quizás solo la mitad recordamos.

A Lyu-Tanifuji (Lyu-San) por las conversaciones místicas que siempre tenemos, ojalá sigan así.

A Manuel Burgos (Manu) por ayudarme con la practica 240, mil gracias.

Al Profe Bruce, a quien debería escribirle una tesis solo para agradecerle. Estaré eternamente agradecido por haberme recibido y haber depositado su confianza en mí. Por ser más que un profesor, apoyándome en los momentos malos y siempre dando palabras de sabiduría.

Al profesor Hernán Pessoa por acceder a ser mi patrocinante de tesis y por ser el primer profesor con el que trabaje en un laboratorio y por sus conversaciones en árabe.

Agradecer a los grandes maestros pertenecientes a la logia alquímica secreta de los Brucepticons. Dentro de la que destacan grandes exponentes como:

El gran Sir Williams Acevedo (El Xilly), Sebastián Castro (El Seba), Nicolas Lezana (Wena Washito), Cristian Suarez (Maestro Suarez), con sus “como va papi”, Julio Salas (Julius Popper), Cristian Tirapegui por ayudarme a hacer mi primer clorhidrato, Italo (Joven Italob), Matias (Chispita), Martin Becerra y al Demonio (Jorge Saavedra).

Al proyecto FONDECYT N°1150868 por haber otorgado los recursos necesarios para realizar esta investigación.

Eternamente agradecido de todos.

“Cualquier intento de definir limites es y será tomado como un desafío”. Catalina et al.

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE ESQUEMAS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	v
RESUMEN .....	vi
SUMMARY .....	viii
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 La dopamina.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Historia de la dopamina .....	1
1.1.2 Biosíntesis .....	2
1.1.3 Transporte, almacenamiento y liberación .....	3
1.1.4 Terminación de la neurotransmisión dopaminérgica.....	4
1.1.5 Metabolización .....	5
<b>1.2 Receptores de dopamina .....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Clasificación .....	7
1.2.2 Localización y funciones básicas .....	7
1.2.3 Señalización .....	9
<b>1.3 Fisiopatologías asociadas a la neurotransmisión dopaminérgica.....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Adicción a drogas o sustancias .....	12
1.3.2 Esquizofrenia .....	12
1.3.3 Enfermedad de Parkinson .....	13
1.3.4 Trastorno por déficit de atención e hiperactividad.....	14
<b>1.4 Diseño de posibles ligandos dopaminérgicos .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Definición del sitio ortostérico del receptor de dopamina.....	16
1.4.2 Feniletilaminas como ligandos de los receptores 5-HT <sub>2A</sub> .....	17
1.4.3 Interacción de ligandos del tipo NBOMe con el receptor 5-HT <sub>2A</sub> .....	20
1.4.4 Similitud entre los receptores de dopamina y serotonina .....	21
<b>2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Hipótesis.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Objetivos generales.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Objetivos específicos .....</b>	<b>23</b>

<b>3 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Materiales y métodos .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Síntesis.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.1 Preparación de líquido iónico (2-HEAF).....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2 Síntesis general de <math>\beta</math>-nitroestirenos .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.3 Síntesis de feniletilaminas .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.3.1 Síntesis de 3,4-dimetoxifeniletilamina .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.3.2 Síntesis de 4-hidroxi-3-metoxifeniletilamina .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.4 Síntesis de <i>N</i>-bencilfeniletilaminas .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.5 Síntesis de <i>N</i>-bencildopamina .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Datos espectroscópicos .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.1 3,4-Metilendioxi-<math>\beta</math>-nitroestireno (N1).....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.2 4-Hidroxi-3-metoxi-<math>\beta</math>-nitroestireno (N2) .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.3 Clorhidrato de 3,4-metilendioxifeniletilamina (2) .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.4 Clorhidrato de 4-hidroxi-3-metoxi-feniletilamina (3) .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.5 Clorhidrato de <i>N</i>-bencil-3,4-dimetoxifeniletilamina (1a) .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.6 Clorhidrato de 2-hidroxibencil-3,4-dimetoxifeniletilamina (1b).....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.7 Clorhidrato de 2-metoxibencil-3,4-dimetoxifeniletilamina (1c) .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.8 Clorhidrato de <i>N</i>-bencil-3,4-metilendioxifeniletilamina (2a) .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.9 Clorhidrato de 2-hidroxibencil-3,4-metilendioxifeniletilamina (2b)..</b>	<b>33</b>
<b>3.3.10 Clorhidrato de 2-metoxibencil-3,4-metilendioxifeniletilamina (2c)</b>	<b>33</b>
<b>3.3.11 Clorhidrato de <i>N</i>-bencil-4-hidroxi-3-metoxifeniletilamina (3a) .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.12 Clorhidrato de 2-hidroxibencil-4-hidroxi-3-metoxifeniletilamina (3b)</b>	<b>34</b>
<b>3.3.13 Clorhidrato de 2-metoxibencil-4-hidroxi-3-metoxifeniletilamina (3c)</b>	<b>35</b>
<b>3.3.14 Bromhidrato de <i>N</i>-bencildopamina (DA-NB).....</b>	<b>35</b>
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Determinación de afinidad por desplazamiento de radioligando.....</b>	<b>36</b>
<b>5 CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>6 REFERENCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>50</b>
<b>7.1 Ensayos de afinidad por desplazamiento de radioligando.....</b>	<b>50</b>
<b>7.1.1 Receptor humano D<sub>1</sub>.....</b>	<b>50</b>

7.1.2 Receptor humano D <sub>2</sub> .....	50
7.1.3 Receptor humano 5-HT <sub>2A</sub> .....	51
7.1.4 Receptor humano 5-HT <sub>2B</sub> .....	51
7.1.5 Receptor humano 5-HT <sub>2C</sub> .....	52
7.2 Espectros de RMN de las moléculas sintetizadas .....	53

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Ruta biosintética de la dopamina a partir de tirosina. ....	2
<b>Esquema 2:</b> Principal ruta metabólica de la dopamina. ....	5
<b>Esquema 3:</b> Preparación de líquido iónico (2-HEAF).....	25
<b>Esquema 4:</b> Síntesis general de $\beta$ -nitroestirenos.....	25
<b>Esquema 5:</b> Procedimiento de síntesis de 3,4-metilendioxifeniletamina. ....	26
<b>Esquema 6:</b> Procedimiento de síntesis de 3,4-metilendioxifeniletamina. ....	27
<b>Esquema 7:</b> Procedimiento general de síntesis de derivados N-bencilados.....	28
<b>Esquema 8:</b> Síntesis de N-bencildopamina. ....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principales catecolaminas.....	1
<b>Figura 2:</b> Antipsicóticos típicos.....	2
<b>Figura 3:</b> Síntesis de DA y sinapsis dopaminérgica. ....	4
<b>Figura 4:</b> Vías de señalización del receptor de dopamina.....	10
<b>Figura 5:</b> Antipsicóticos de segunda generación (atípicos). ....	13
<b>Figura 6:</b> Fármacos utilizados para la enfermedad de Parkinson. ....	14
<b>Figura 7:</b> Fármaco utilizado para el tratamiento de la TDAH. ....	15
<b>Figura 8:</b> Modelo computacional del sitio de unión del receptor de dopamina. Los residuos se designaron en negrita, las TM en negrita y cursiva. El área de las bolsas de unión ortostéricas y secundarias son de color cian y violeta, respectivamente. ....	16
<b>Figura 9:</b> 5-Hidroxitriptamina/serotonina. ....	17
<b>Figura 10:</b> Feniletilaminas, triptaminas, ergolinas y compuestos representativos de cada familia. ....	18
<b>Figura 11:</b> Familias 2C-X y DOX.....	19
<b>Figura 12:</b> Estructura de 2C-B, feniletilamina agonista de los receptores 5-HT <sub>2</sub> . Estructura de 25B-NBOME, derivado 2-metoxibencilado de 2C-B.....	19

<b>Figura 13:</b> Modo de unión de 25B-NBOMe en 5-HT <sub>2A</sub> . A la derecha esquema simplificado. Las líneas punteadas representan puentes de hidrogeno.....	20
<b>Figura 14:</b> Resumen de moléculas ensayadas.....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Resumen sobre receptores de dopamina, localización y funciones.....	8
<b>Tabla 2:</b> Comparación de residuos aminoacídicos. ....	21
<b>Tabla 3:</b> Porcentajes de desplazamiento de radioligandos de receptores hD1 y hD2 de dopamina por los compuestos ensayados a una concentración 10 $\mu$ M. ....	37
<b>Tabla 4:</b> Porcentajes de desplazamiento de radioligandos de receptores h5-HT <sub>2</sub> de serotonina por los compuestos ensayados a una concentración 10 $\mu$ M y sus constantes de inhibición (K <sub>i</sub> ) en los casos en que se pudieron calcular.....	38

## RESUMEN

La dopamina pertenece a la familia de las catecolaminas y es uno de los neurotransmisores más importantes del sistema nervioso central. Este neurotransmisor ejerce sus funciones a través de los receptores de dopamina. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G y se pueden clasificar en 2 tipos (tipo-D<sub>1</sub> y tipo-D<sub>2</sub>) con un total de 5 subtipos caracterizados (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> y D<sub>5</sub>). Estos receptores se distribuyen tanto en el sistema nervioso central como el periférico.

Debido a la extensa localización de los receptores de dopamina y su rol en un amplio rango de funciones, la disfunción dopaminérgica ha sido implicada en la fisiopatología de diversas enfermedades y trastornos. En este contexto los receptores de DA merecen una especial atención debido a que compuestos químicos que actúan sobre ellos se utilizan actualmente como antiparkinsonianos, antipsicóticos, inhibidores del apetito, etc.

Como antecedentes, existen compuestos del tipo feniletilaminas que actúan sobre los receptores de serotonina que, cuando se les realizan bencilaciones en el átomo de nitrógeno, aumentan su actividad biológica hasta en dos órdenes de magnitud. Pese al gran número de feniletilaminas sintetizadas hasta ahora no existe una clara caracterización del papel que podría desempeñar la N-bencilación, ni en su afinidad ni en su potencia sobre receptores dopaminérgicos. Podríamos obtener el mismo efecto dadas las características estructurales que comparten el receptor de dopamina con el receptor de serotonina en su sitio ortostérico.

Para esto se sintetizaron derivados comunes de feniletilaminas 3,4-dioxigenadas y de sus análogos N-bencilados 2oxigenados con un total de 13 compuestos. De los compuestos sintetizados 2 no eran conocidos y la literatura científica no consigna datos de afinidad por estos receptores para ninguno de estos compuestos.

Mediante una colaboración con el Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS) de la Universidad de Santiago de Compostela, fue posible realizar ensayos de desplazamiento de radioligandos para determinar la afinidad de los derivados sintetizados frente a receptores tanto dopaminérgicos (D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>) como serotoninérgicos (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>).

Los leves aumentos de las afinidades por receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> contrastan con los que se observan para los mismos compuestos en los receptores 5-HT<sub>2</sub> y señalan una diferencia significativa entre los sitios que ocupan los grupos *N*-bencilo en estas dos familias de receptores, diferencia que se podrá explorar a futuro mediante la introducción de otros sustituyentes y mediante estudios de acoplamiento molecular.

## SUMMARY

### SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF N-SUBSTITUTED PHENYLETHYLAMINES AS POTENTIAL LIGANDS OF DOPAMINE D<sub>1</sub> AND D<sub>2</sub> RECEPTORS

Dopamine belongs to the catecholamine family and is one of the most important neurotransmitters in the central nervous system. This neurotransmitter exerts its functions through dopamine receptors. These receptors belong to the superfamily of G-protein coupled receptors and can be classified into 2 types (D<sub>1</sub>-like and D<sub>2</sub>-like) with a total of 5 characterized subtypes (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> and D<sub>5</sub>). These receptors are distributed in both the central and peripheral nervous systems.

Due to the extensive localization of dopamine receptors and their role in a wide range of functions, dopamine dysfunction has been implicated in the pathophysiology of various diseases and disorders. In this context, DA receptors deserve special attention because chemical compounds that act on them are currently used as antiparkinsonians, antipsychotics, appetite suppressants, etc.

As a background, there are compounds of the phenylethylamine type that act on serotonin receptors that, when benzylated to the nitrogen atom, increase their biological activity by up to two orders of magnitude. Despite the large number of phenylethylamines synthesized so far there is no clear characterization of the role that N-benylation could play, neither in their affinity nor in their potency at dopaminergic receptors. We might obtain the same effect given the structural characteristics that the dopamine receptor shares with the serotonin receptor in its orthosteric site.

To test this, common derivatives of 3,4-dioxygenated phenylethylamines and their 2-oxygenated N-benzyl analogs were synthesized totaling 13 compounds. Of the

synthesized compounds 2 were not known and the scientific literature does not record affinity data for these receptors for any of these compounds.

Through a collaboration with the Research Center in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CiMUS) of the University of Santiago de Compostela, we could carry out radioligand displacement assays to determine the affinity of the synthesized derivatives towards both dopaminergic ( $D_1$  and  $D_2$ ) and serotonergic ( $5-HT_{2A}$ ,  $5-HT_{2B}$  and  $5-HT_{2C}$ ) receptors.

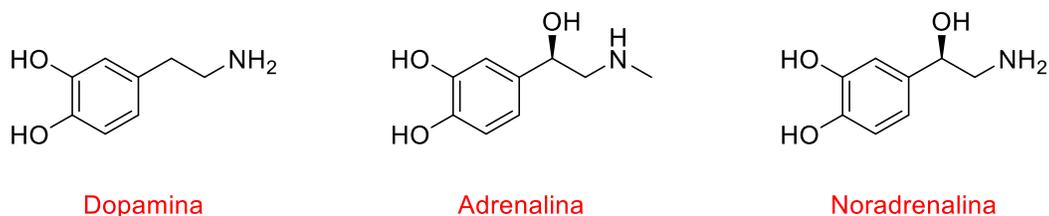
The slight increases in affinities for  $D_1$  and  $D_2$  receptors in contrast to the changes at  $5-HT_2$  receptors point to a significant difference between the sites occupied by N-benzyl groups in both receptor families, a difference that could be explored in the future by introducing other substituents and by molecular docking studies.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 La dopamina

### 1.1.1 Historia de la dopamina

La dopamina (DA), o por su nombre completo 2-(3,4-dihidroxifenil)etilamina, pertenece a la familia de las catecolaminas (Figura 1) y fue sintetizada por primera vez en 1910 por George Barger y James Ewens en los laboratorios Wellcome, Londres. Más tarde, ese mismo año, en el mismo lugar, Henry Dale (quien sugirió el nombre de dopamina en 1952) examinó la actividad biológica de la DA y encontró que era una sustancia simpaticomimética débil, del tipo de la adrenalina. En la década de 1930, la DA fue reconocida como un compuesto de transición en la biosíntesis de adrenalina y noradrenalina, pero se creía que era poco más que un intermediario biosintético.

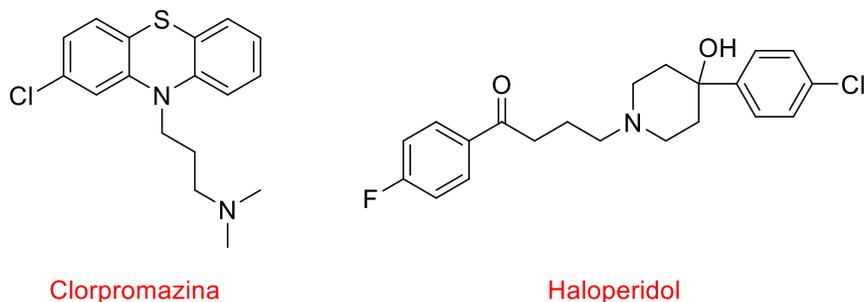


**Figura 1:** Principales catecolaminas.

La función de la DA como un potencial neurotransmisor en vías específicas en el sistema nervioso central (SNC) fue sugerida a fines de la década del 50 por el neurofarmacólogo Arvid Carlsson. La información posterior proporcionada por Paul Greengard sobre los mecanismos de señalización celular desencadenados por la DA les valió a estos investigadores el Premio Nobel de Medicina en el año 2000.<sup>[1]</sup>

Posteriormente en 1963 Arvid Carlsson y Margit Lindqvist presentaron la primera evidencia de la existencia de receptores específicos en el cerebro de ratones, mediante la utilización del grupo más importante de antipsicóticos (Figura 2) en esa

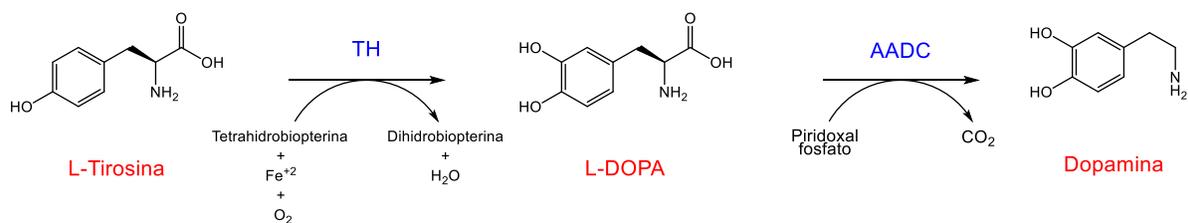
época representados por clorpromazina y haloperidol, bloqueando dichos receptores.<sup>[2]</sup>



**Figura 2:** Antipsicóticos típicos.

### 1.1.2 Biosíntesis

La biosíntesis de dopamina se produce mayoritariamente en la región citoplásmica de las neuronas catecolaminérgicas a partir de L-tirosina. La ruta metabólica primaria implica una síntesis en dos reacciones sucesivas que transforman tirosina (Esquema 1), la cual se forma en el organismo a partir del aminoácido fenilalanina, pero también se obtiene directamente a través de la ingesta de alimentos.<sup>[3]</sup>



**Esquema 1:** Ruta biosintética de la dopamina a partir de tirosina.

Primero, la enzima citosólica tirosina hidroxilasa (TH) cataliza la adición de un grupo hidroxilo en la posición meta de la tirosina y convierte ésta en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA)<sup>[4]</sup> utilizando tetrahidrobiopterina, oxígeno (O<sub>2</sub>) y hierro (Fe<sup>+2</sup>) como cofactores.<sup>[5]</sup> La TH se considera la "enzima limitante" en esta vía debido a su baja actividad.<sup>[3]</sup>

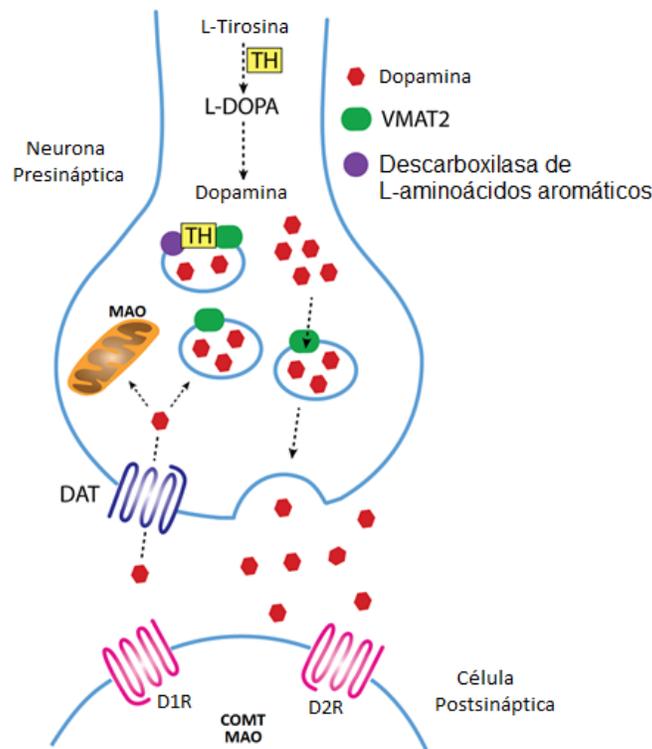
El segundo paso es la descarboxilación de L-DOPA catalizada por la enzima descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (AADC, por su sigla en inglés) utilizando como cofactor piridoxal fosfato. Esta enzima posee una alta eficiencia para transformar rápidamente la L-DOPA en el producto final dopamina mediante la eliminación del grupo carboxilo.<sup>[5,6]</sup>

### **1.1.3 Transporte, almacenamiento y liberación**

Luego de ser sintetizada en las neuronas dopaminérgicas, la DA es secuestrada en el lumen ácido de las vesículas sinápticas donde es almacenada para asegurar la liberación controlada del neurotransmisor. Este transporte se realiza gracias al transportador de monoaminas vesicular 2 (VMAT2)<sup>[7]</sup> (Figura 3), un transportador de alta afinidad constituido por una bomba dependiente del pH que introduce una molécula de dopamina por cada dos protones eliminados, requiriendo de la hidrólisis de ATP.<sup>[8]</sup> El VMAT2 transporta la DA desde el citosol hasta las vesículas especializadas en los botones terminales dendríticos donde se almacena. Además de estas vesículas, la DA también puede ser almacenada en el retículo endoplásmico liso.<sup>[9]</sup> Este almacenaje disminuye la posibilidad de ser degradada en el citoplasma y de su posible difusión fuera de la célula. El entorno ácido en el lumen de la vesícula sináptica estabiliza la DA y previene la oxidación de esta. En un ambiente no ácido la DA es más sensible a la oxidación o posterior metabolismo.<sup>[10]</sup>

En la mayoría de los casos la DA es liberada al espacio sináptico por un mecanismo de exocitosis, el cual se inicia con un potencial de acción que produce la despolarización de la neurona presináptica. Primero se abren los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje presentes en el terminal, lo que conlleva la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular. Esto promueve la fusión de la membrana vesicular con la membrana de la terminal presináptica provocando la descarga del neurotransmisor al espacio sináptico (Figura 3). Este proceso se lleva a cabo de forma controlada, dependiendo de los potenciales sinápticos de las neuronas y de la consiguiente

entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  en los terminales. La concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular regula la cantidad de DA liberada.<sup>[11]</sup>



**Figura 3:** Síntesis de DA y sinapsis dopaminérgica. Imagen modificada a partir de referencia.<sup>[12]</sup>

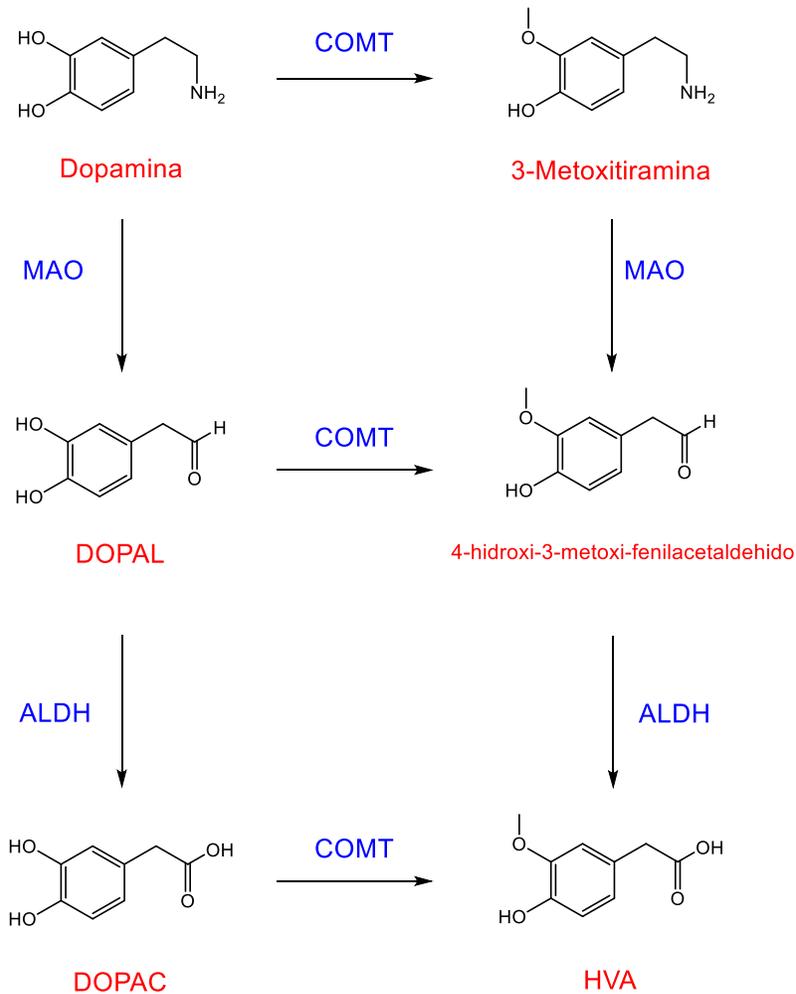
#### 1.1.4 Terminación de la neurotransmisión dopaminérgica

Una vez liberada al espacio sináptico la DA se une a receptores pre y postsinápticos. Aunque existen enzimas extraneuronales que la catabolizan para finalizar su acción y mantener la homeostasis, la DA principalmente es recaptada por las propias terminales nerviosas que la liberaron, para ser metabolizada o almacenada y liberada nuevamente. Esta recaptación se lleva a cabo gracias a un transportador de dopamina (DAT) específico (Figura 3).<sup>[13]</sup> El DAT se localiza en la membrana plasmática del soma, las dendritas, los axones y los terminales axónicos de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y también se puede encontrar periféricamente en el estómago, páncreas y linfocitos.<sup>[14]</sup> El DAT pertenece a la familia de proteínas transportadoras dependientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , que tienen 12

dominios transmembranales. La estequiometría del transportador indica que la dopamina es cotransportada al interior del terminal con 2 iones  $\text{Na}^+$  y un ion  $\text{Cl}^-$ .<sup>[13]</sup> El DAT puede transportar la DA de forma bidireccional en función del gradiente de  $\text{Na}^+$ .<sup>[15]</sup>

### 1.1.5 Metabolización

Dos enzimas son importantes en las etapas iniciales de la transformación metabólica de las catecolaminas: la monoamina oxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Esquema 2). Tanto MAO como COMT se distribuyen ampliamente en todo el cuerpo.<sup>[16]</sup>



**Esquema 2:** Principal ruta metabólica de la dopamina.

Primero, la DA se transforma por la MAO en 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL) que se convierte preferentemente en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH). La COMT puede convertir tanto la dopamina como el DOPAL y DOPAC para formar los metabolitos 3-metoxitiramina, 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacetaldehido y ácido homovanílico (HVA) respectivamente. La 3-metoxitiramina también se puede transformar en dos etapas análogas dando lugar al HVA, un metabolito inactivo.<sup>[9,17]</sup>

## **1.2 Receptores de dopamina**

### **1.2.1 Clasificación**

Para ejercer sus acciones, la dopamina debe unirse a un conjunto particular de receptores, ubicados en las membranas plasmáticas de las células diana respectivas. Los receptores de DA pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por su sigla en inglés). Estos receptores constituyen la familia más grande de proteínas de membrana (más de 800 en el genoma humano). Contienen siete segmentos transmembrana  $\alpha$ -helicoidales relativamente hidrófobos, unidos a segmentos más hidrófilos con un grupo carboxilo intracelular y un extremo amino extracelular. Esta es la conformación típica de los GPCRs que interactúan con muchas moléculas efectoras de membrana o citoplásmicas y regulan las funciones cerebrales correspondientes.<sup>[18,19]</sup>

La primera indicación de la existencia de los receptores de DA se describió en 1972 y se identificaron en 1975.<sup>[20-22]</sup> Los receptores de DA se clonaron por primera vez en 1988-1991. Los cinco subtipos de receptores DA presentes en los mamíferos se clasifican en dos tipos, “tipo-D<sub>1</sub>” (D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>) y “tipo-D<sub>2</sub>” (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>).<sup>[23-29]</sup>

### **1.2.2 Localización y funciones básicas**

Los receptores de DA están ampliamente expresados en el sistema nervioso central pero también se encuentran periféricamente en los vasos sanguíneos, riñones, corazón, retina y glándulas suprarrenales.

D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> son los receptores de dopamina más expresados en el cerebro (D<sub>1</sub> es el más alto), y los dos raramente se coexpresan en las mismas células. Los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub> se ubican en las células postsinápticas y los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> pueden localizarse post y presinápticamente (autoreceptores). En cuanto a los

receptores D<sub>4</sub> se ha demostrado su localización presináptica, aunque no está excluida su posible localización postsináptica.<sup>[30-33]</sup>

A continuación, se muestra un resumen de la localización y las funciones básicas de los receptores de DA (Tabla 1).

Receptores	Localización	Funciones
<b>D1</b>	Se encuentra en alta concentración en áreas mesolímbicas, nigroestriatales y mesocorticales, tales como substantia nigra, bulbo olfatorio, núcleo accumbens, caudado, putamen, estriado. Expresado en niveles bajos en cerebelo, hipocampo, tálamo, hipotálamo, riñón.	Movimientos voluntarios, regulación del crecimiento y desarrollo, regulaciones de alimentación, afecto, atención, recompensa, sueño, control de impulsos, conductas reproductivas, memoria de trabajo, aprendizaje, control de la renina en el riñón.
<b>D2</b>	Expresado en niveles altos en substantia nigra, bulbo olfatorio, caudado, putamen, área tegmental ventral (VTA, por su sigla en inglés), núcleo accumbens. Encontrado en bajo nivel en hipotálamo, septum pellucidum, riñón, corteza, corazón, vasos sanguíneos, glándulas suprarrenales, tracto gastrointestinal, ganglios simpáticos.	Participa en la memoria de trabajo, las funciones de recompensa y motivación. Regula la presión arterial, las funciones renales, la motilidad gastrointestinal, la vasodilatación, la locomoción. Los receptores presinápticos inhiben la locomoción y los postsinápticos la activan.
<b>D3</b>	Se expresa solo en el SNC. Se encuentra en bulbo olfatorio, núcleo accumbens.	Participa en funciones endocrinas, cognitivas, emociones, regulación de funciones locomotoras y modulación de funciones endocrinas.
<b>D4</b>	Substantia nigra, hipocampo, amígdala, tálamo, hipotálamo, riñón, corteza frontal, corazón, vasos sanguíneos, glándulas suprarrenales, tracto gastrointestinal, ganglios simpáticos, globo pálido. El receptor menos abundante encontrado en el SNC de todos los receptores de dopamina.	Regulación de las funciones renales, motilidad gastrointestinal, vasodilatación, presión arterial, modulación de las funciones cognitivas.
<b>D5</b>	Substantia nigra, hipotálamo, hipocampo, giro dentado, riñón, corazón, vasos sanguíneos, glándulas suprarrenales, tracto gastrointestinal, ganglios simpáticos.	Participa en procesos de dolor, funciones afectivas, funciones endocrinas de la dopamina.

**Tabla 1:** Resumen sobre receptores de dopamina, localización y funciones.<sup>[34]</sup>

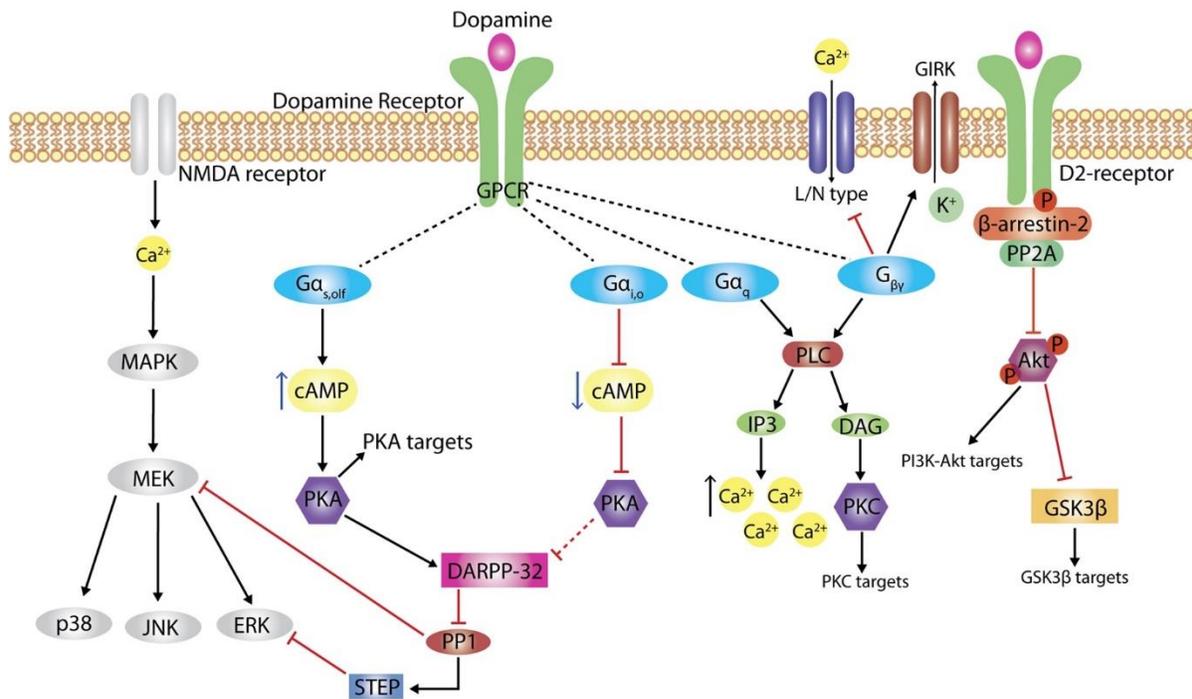
### 1.2.3 Señalización

Tras la unión con el receptor, la DA provoca respuestas intracelulares que dependen del tipo de receptor que se activó. La cascada de señalización de la DA involucra principalmente proteínas G. Sin embargo, la señalización del receptor de DA también puede ejercerse por vías de señalización independientes de las proteínas G.<sup>[35]</sup>

Es comúnmente aceptado que los receptores “tipo-D<sub>1</sub>” se acoplan a la proteína G<sub>as/olf</sub>, activando la adenilil ciclasa para producir niveles más altos del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPC, por su sigla en inglés), que estimula la actividad de la proteína quinasa A (PKA, por su sigla en inglés). En el sentido opuesto, los receptores “tipo-D<sub>2</sub>”, que están acoplados a la proteína G<sub>ai/o</sub>, inhiben la adenilil ciclasa y reducen la concentración intracelular de AMPC, lo que disminuye la actividad de la PKA.<sup>[30,36,37]</sup> Además de regular la actividad de la adenilil ciclasa a través de G<sub>as/olf</sub> o G<sub>ai/o</sub>, los receptores de dopamina pueden acoplarse a la proteína G<sub>αq</sub> y modular la actividad de la fosfolipasa C (PLC, por su sigla en inglés).<sup>[38-40]</sup>

Entre las vías independientes de proteínas G la más reconocida es la vía de señalización dependiente de β-arrestinas. Las β-arrestinas bloquean la activación adicional de las proteínas G al competir por la superposición de los sitios de unión en el receptor <sup>[41]</sup>. Es importante destacar que cuando una arrestina se une a un receptor también inicia la internalización de este y otros eventos. Estos en última instancia conducen al reciclaje del receptor o la retroalimentación negativa. Este mecanismo controla la intensidad de la señalización de GPCR para garantizar que GPCR module adecuadamente la activación de la proteína G, evitando así la sobre-activación de la proteína G.<sup>[42]</sup>

Si bien la DA actúa bajo estos mecanismos, las cascadas de señalización son bastante más complejas, como se puede apreciar en la figura siguiente (Figura 3).



**Figura 4:** Vías de señalización del receptor de dopamina. Imagen modificada a partir de referencia.<sup>[12]</sup>

### **1.3 Fisiopatologías asociadas a la neurotransmisión dopaminérgica**

Existen diversas funciones cerebrales en las que la dopamina tiene una importante función reguladora. Algunas de estas funciones son el movimiento voluntario, la memoria de trabajo, la atención y el aprendizaje. La DA no solo desempeña funciones a nivel central, sino que también desempeña un papel importante en la periferia regulando procesos fisiológicos como la regulación hormonal y la función renal entre otras.

Debido a la extensa localización del receptor de DA y su papel en una amplia gama de funciones, no es sorprendente que la disfunción dopaminérgica haya sido implicada en la progresión de diversas patologías tales como la esquizofrenia, trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), dependencia de sustancias y enfermedad de Parkinson entre otros trastornos. Si bien todas estas enfermedades no son atribuidas únicamente a la disfunción dopaminérgica, sino que más bien son enfermedades multireceptoriales, en el presente trabajo se mencionan los aspectos pertinentes al sistema dopaminérgico.

Aunque una revisión extensa de estos aspectos excede los objetivos del presente trabajo, es conveniente detallar algunos de los trastornos más frecuentes para evidenciar la importancia del estudio de este neurotransmisor

### **1.3.1 Adicción a drogas o sustancias**

Las adicciones a drogas son trastornos crónicos recurrentes caracterizados por tres componentes esenciales: la ingesta compulsiva de drogas, la incapacidad para restringir la ingesta de drogas y el surgimiento del síndrome de abstinencia con la presencia de ansiedad, irritabilidad y disforia.<sup>[43]</sup> Una fuerte evidencia indica que las alteraciones sinápticas en las vías mesolímbicas están relacionadas con la adicción a las drogas y los alimentos. Los adictos a las drogas y las personas obesas tienden a presentar una expresión alterada de los receptores D<sub>2</sub> en las áreas estriatales (niveles bajos de receptores D<sub>2</sub>), y los estudios de tomografía por emisión de positrones (PET) en personas obesas sugieren una disponibilidad reducida de los receptores D<sub>2</sub>.<sup>[43-45]</sup>

La mayoría de las drogas adictivas comparten la propiedad común de aumentar la liberación de dopamina en el estriado ventral (sistema de recompensa), que está involucrado en el refuerzo de los comportamientos y la producción de recuerdos. El bloqueo de la neurotransmisión de dopamina en esta región atenúa los efectos más gratificantes de las drogas adictivas, como la preferencia condicionada de lugar (condicionamiento pavloviano).<sup>[46,47]</sup>

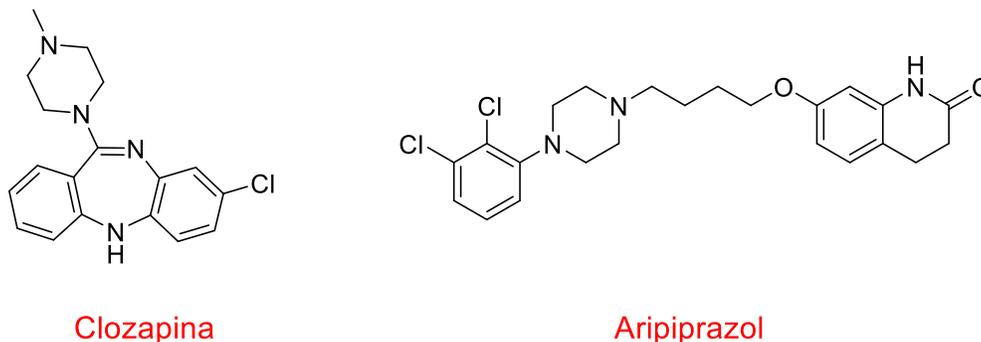
### **1.3.2 Esquizofrenia**

La esquizofrenia es una enfermedad mental grave y se caracteriza por tres tipos de síntomas: positivos (alucinaciones, habla y comportamiento desorganizados), negativos (deterioro de la motivación y retraimiento social) y cognitivos (disfunciones en la memoria).

Aunque la fisiopatología de esta enfermedad no está dilucidada, se han propuesto muchas hipótesis para intentar dilucidar su manifestación. La hipótesis más aceptada es la de la dopamina. Esta hipótesis se originó a partir de dos observaciones. Primero, las anfetaminas, que estimulan la liberación de dopamina,

pueden inducir psicosis y exacerbar la esquizofrenia. En segundo lugar, el grupo de drogas que bloquea la función de la dopamina (neurolépticos), puede reducir los síntomas psicóticos bloqueando específicamente los receptores “tipo-D<sub>2</sub>”.<sup>[48,49]</sup>

Los medicamentos que se usan actualmente para tratar la esquizofrenia se clasifican como antipsicóticos típicos (también conocidos como de primera generación) o atípicos (de segunda generación) como la clozapina y el aripiprazol. Estos últimos tienen una escasa incidencia sobre efectos colaterales extrapiramidales como la discinesia, efecto típico inducido por el uso prolongado de neurolépticos de primera generación.<sup>[50]</sup>



**Figura 5:** Antipsicóticos de segunda generación (atípicos).

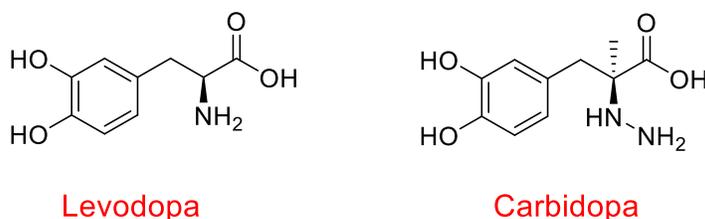
### 1.3.3 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es el trastorno neurodegenerativo de movimiento más común y es causada patológicamente por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la substantia nigra pars compacta y la presencia de agregados intraneuronales llamados cuerpos de Lewy que están enriquecidos en  $\alpha$ -sinucleína. La EP se presenta como un conjunto de síntomas motores llamados parkinsonismo (bradikinesia, temblor, rigidez e inestabilidad postural) que se atribuyen comúnmente a la pérdida de DA estriatal, así como características no motoras (depresión, ansiedad, deterioro cognitivo, insomnio, anosmia, etc).<sup>[51,52]</sup>

Las opciones de tratamiento para los pacientes con EP incluyen medidas no farmacológicas, farmacoterapia y cirugías. El tratamiento actual de la EP está únicamente dirigido al alivio de la sintomatología sin generar cambios en la problemática basal de pérdida neuronal.

Actualmente los medicamentos antiparkinsonianos como levodopa y agonistas dopaminérgicos son la primera línea de tratamiento para la EP. Estos medicamentos pueden mejorar los síntomas tempranos de EP, pero se vuelven inefectivos e incluso producen efectos adversos, como discinesia y síntomas psicóticos, a medida que la enfermedad progresa.

L-DOPA, sigue siendo el agente más efectivo en el tratamiento de la EP. Este fármaco es usualmente administrado con carbidopa, un inhibidor periférico de la AADC el cual inhibe la conversión de L-DOPA en el hígado, así permitiendo una reducción en la dosis y también disminuyendo los efectos adversos como náusea, hipotensión, etc.<sup>[53,54]</sup>

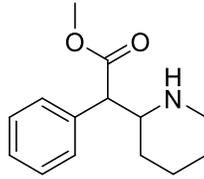


**Figura 6:** Fármacos utilizados para la enfermedad de Parkinson.

#### 1.3.4 Trastorno por déficit de atención e hiperactividad

El trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) es uno de los trastornos psiquiátricos conductuales multifactoriales más prevalentes en la infancia, con una etiología compleja y una base genética sólida. El TDAH se caracteriza por la falta de atención (soñar despierto y distracción), la impulsividad, la actividad motora excesiva con o sin hiperactividad. Aunque la base neurobiológica del TDAH sigue sin estar clara, la eficacia de los fármacos psicoestimulantes en su tratamiento

sugiere un estado hipofuncional del sistema dopaminérgico. El medicamento más utilizado es el metilfenidato. Como un potente inhibidor del DAT, el metilfenidato aumenta la concentración de DA promoviendo su liberación al espacio sináptico y bloqueando su recaptación.<sup>[55-57]</sup>



**Metilfenidato**

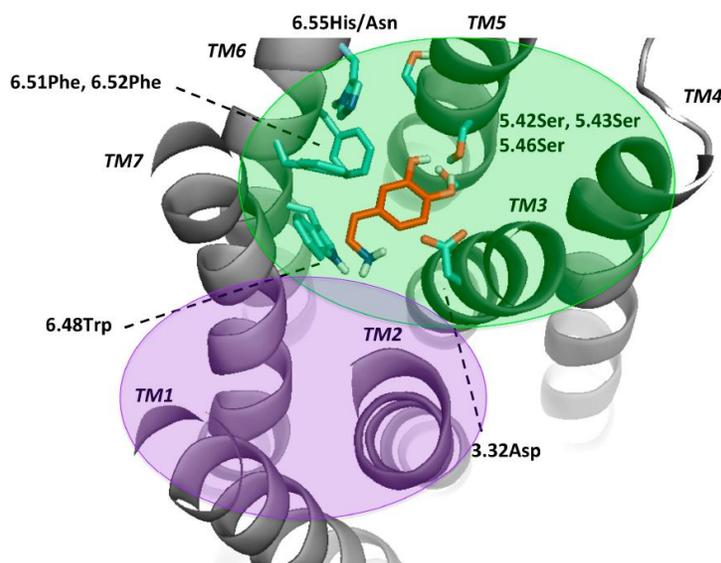
**Figura 7:** Fármaco utilizado para el tratamiento de la TDAH.

## 1.4 Diseño de posibles ligandos dopaminérgicos

### 1.4.1 Definición del sitio ortostérico del receptor de dopamina.

Para definir el bolsillo de unión o sitio ortostérico de los receptores de dopamina es necesario nombrar cuales son los residuos clave, sus posiciones y las interacciones de los residuos con el ligando endógeno dopamina. Para esto se utilizó el esquema de numeración genérico de los aminoácidos propuesto por Ballesteros y Weinstein para hacer más fácil la comparación de la posición de los residuos entre receptores.<sup>[58]</sup>

Estudios de mutación sitio dirigida mostraron que, para la unión de la dopamina al receptor, se forma una interacción de enlace iónico entre la amina protonable de la dopamina y un aspartato cargado negativamente (D3.32) (Figura 8). Además, se demostró que este efecto era crucial para la unión del ligando y que este aminoácido no solo se conservaba en los receptores de DA, sino también en todos los GPCRs de aminas biogénicas.



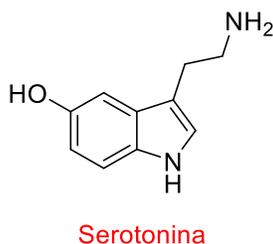
**Figura 8:** Modelo computacional del sitio de unión del receptor de dopamina. Los residuos se designaron en negrita, las TM en negrita y cursiva. El área de las bolsas de unión ortostéricas y secundarias son de color cian y violeta, respectivamente.<sup>[59]</sup>

Además, se consideró un microdominio de serina (S5.42, S5.43, S5.46) como una característica importante para la unión dopaminérgica en todos los receptores de DA. Se cree que las serinas forman enlaces de hidrógeno con los hidroxilos catecólicos de la dopamina, lo que aumenta la afinidad de unión y orienta los ligandos en el sitio ortostérico. Mientras que S5.42 parece ser crítico, S5.43 juega un papel menos importante.

Por último, se informó que otro microdominio, el microdominio aromático, que consiste en W6.48, F6.51, F6.52 y H/N6.55, desencadenó la activación del receptor de dopamina.<sup>[60]</sup>

#### 1.4.2 Feniletilaminas como ligandos de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>

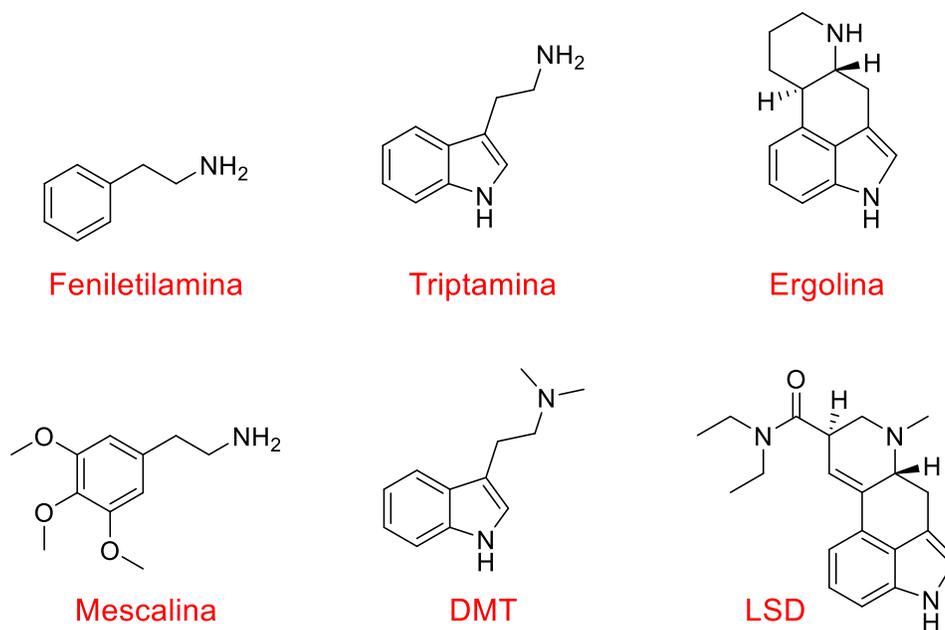
Los receptores de serotonina, o 5-hidroxitriptamina (5-HT), al igual que los receptores de dopamina pertenecen a la familia más grande de GPCRs, a la familia A o familia de la rodopsina. Los receptores serotoninérgicos intervienen en una gran cantidad de procesos periféricos y centrales.<sup>[61]</sup>



**Figura 9:** 5-Hidroxitriptamina/serotonina.

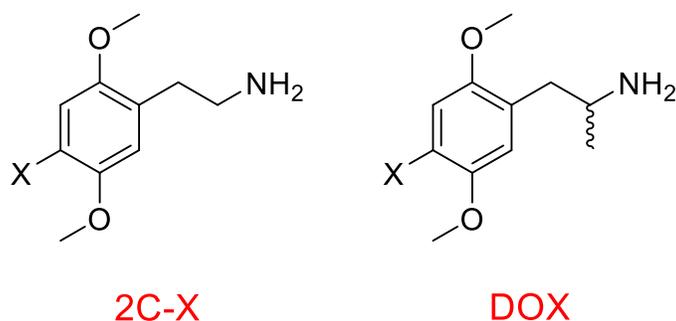
De los 13 subtipos del receptor 5-HT, el 5-HT<sub>2A</sub> es uno de los más estudiados y ha sido blanco de numerosos agonistas con efectos psicodélicos. Los agonistas 5-HT<sub>2A</sub> se clasifican en tres grupos principales: triptaminas, ergolinas y feniletilaminas (Figura 9). Las triptaminas, que incluyen, la serotonina, son derivados del aminoácido triptófano. Las triptaminas naturales se han utilizado durante mucho tiempo por sus efectos psicoactivos. Las ergolinas cuyo esqueleto estructural forma parte de un rango diverso de alcaloides, incluyendo algunas drogas como la

dietilamida del ácido lisérgico (LSD), la cual induce poderosos efectos psicodélicos. Para el grupo de las feniletilaminas, el compuesto modelo es la mescalina, uno de los psicodélicos más antiguos utilizados por el hombre. La mescalina puede encontrarse principalmente en los cactus peyote (*Lophophora williamsii*) y “San Pedro” (*Trichocereus pachanoi*). Se ha sintetizado una gran cantidad de análogos de la mescalina y las relaciones estructura-actividad son bien entendidas.<sup>[62-65]</sup>



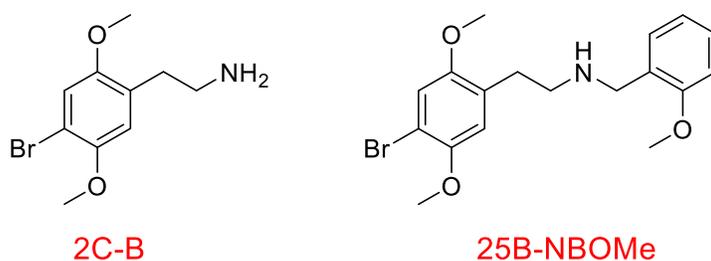
**Figura 10:** Feniletilaminas, triptaminas, ergolinas y compuestos representativos de cada familia.

Durante la década de 1960 hasta mediados de la década de 1990 Alexander Shulgin realizó estudios sobre análogos de mescalina que junto a estudios posteriores permitieron reconocer 2 familias de feniletilaminas especialmente activas: la familia 2C-X y la familia DOX, que presentan una importante actividad agonista sobre receptores del tipo 5-HT<sub>2</sub>. Estas familias corresponden a derivados 2,5-dioxigenados y con un sustituyente adicional, generalmente pequeño e hidrofóbico, en la posición 4 del anillo aromático de la feniletilamina o anfetamina respectivamente (Figura 10).<sup>[66]</sup>



**Figura 11:** Familias 2C-X y DOX.

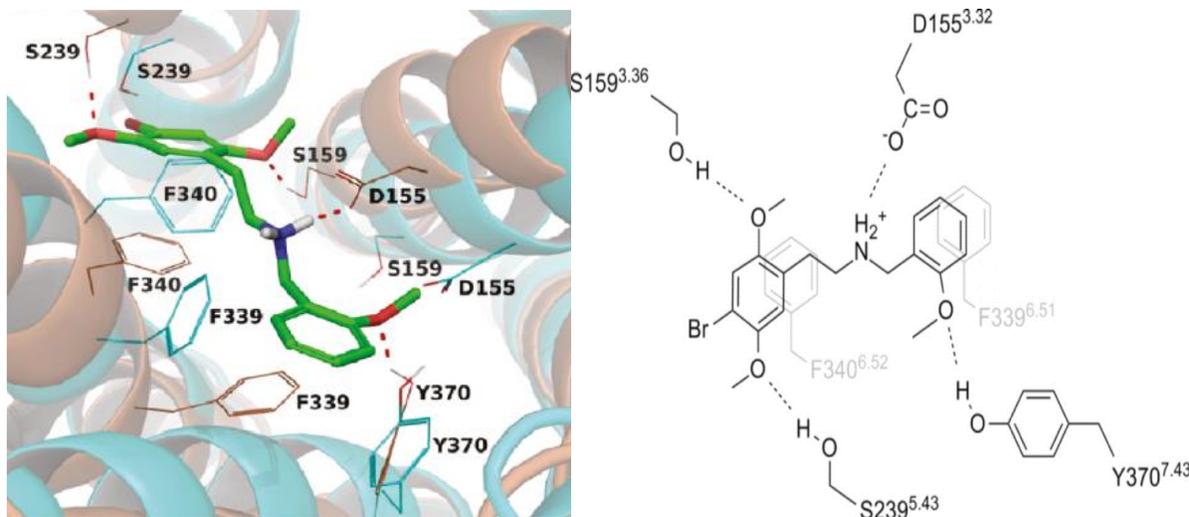
Mas tarde en el año 2003 Heim demostró en su tesis doctoral que realizando *N*-bencilaciones a feniletilaminas agonistas de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, utilizando bencilos preferentemente oxigenados en posición 2 (2-hidroxibencilo, 2-metoxibencilo) la afinidad de estas drogas aumentaba hasta en dos órdenes de magnitud (Figura 11). Esto dio origen a una nueva serie de compuestos superpotentes llamados NBOMes.<sup>[67]</sup>



**Figura 12:** Estructura de 2C-B, feniletilamina agonista de los receptores 5-HT<sub>2</sub>. Estructura de 25B-NBOMe, derivado 2-metoxibencilado de 2C-B.

### 1.4.3 Interacción de ligandos del tipo NBOMe con el receptor 5-HT<sub>2A</sub>

Los residuos importantes involucrados tanto en la afinidad como para la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> por compuestos del tipo NBOMe han sido reconocidos ya sea por mutaciones sitio dirigidas o por modelos teóricos de acoplamiento molecular (Figura 13).



**Figura 13:** Modo de unión de 25B-NBOMe en 5-HT<sub>2A</sub>. A la derecha esquema simplificado. Las líneas punteadas representan puentes de hidrógeno. Imagen modificada a partir de referencia.<sup>[68]</sup>

Las porciones 2-MeO y 5-MeO forma puentes de hidrógeno aceptado hidrógenos desde las serinas S3.36 y S5.43, respectivamente. El grupo amino dona uno o dos hidrógenos al aspartato D3.32 altamente conservado que se encuentra cargado negativamente. Los dos anillos aromáticos del ligando interactúan con las fenilalaninas F6.51 y F6.52 respectivamente. Estas fenilalaninas están altamente conservadas en todos los GPCRs y son importantes para la activación del receptor. Además, el átomo de oxígeno de la porción *N*-bencilo es importante para la afinidad y se ha propuesto que forma un puente de hidrógeno con Y7.43. Los residuos nombrados anteriormente se encuentran conservados en su totalidad en el receptor 5-HT<sub>2C</sub>, por el cual estas drogas tienen afinidades semejantes a las que tienen por los 5-HT<sub>2A</sub>.<sup>[68]</sup>

#### 1.4.4 Similitud entre los receptores de dopamina y serotonina

Los receptores 5-HT y D se asemejan mucho entre sí en cuanto a su estructura molecular, farmacología, rutas de transducción de señales, y su alto grado de identidad aminoacídica, compartiendo características comunes. En el sitio ortostérico las diferencias son muy pocas ya que la mayoría de los residuos están conservados por lo que ligandos similares podrían unirse a ambos receptores.

A continuación, se presenta una tabla comparativa de los residuos que interactúan en el receptor 5-HT<sub>2A</sub> para compuestos del tipo NBOMe y como la gran mayoría de estos se conserva en los receptores dopaminérgicos.

Numero de residuo	3.32	3.36	5.42	5.43	5.46	6.51	6.52	7.43
h5-HT <sub>2A</sub>	D	S	G	S	S	F	F	Y
hD <sub>1</sub>	D	S	S	S	S	F	F	W
hD <sub>2</sub>	D	C	S	S	S	F	F	Y

**Tabla 2:** Comparación de residuos aminoacídicos.<sup>[69]</sup>

Por lo que no es difícil suponer que ligandos N-bencilados de derivados dopaminérgicos se unan con mayores afinidades.

Como se puede apreciar los residuos D3.32, S5.43, S5.46, F6.51 y F6.52 se conservan en los tres receptores. El residuo Y7.43 cambia por un triptófano en el receptor D<sub>1</sub>, por lo que podría esperarse que para compuestos 2-oxigenados no se vea favorecida su afinidad, pero si por compuestosencilados no oxigenados.

Debido a estas claras similitudes es que se origina la hipótesis de esta tesis.

## **2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 Hipótesis**

Se sabe que la afinidad y actividad funcional de agonistas pequeños de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub> (clásicamente feniletilaminas e indoliletilaminas) aumenta notablemente cuando se une a su átomo de nitrógeno básico un grupo bencilo, especialmente cuando éste se encuentra sustituido con un átomo de oxígeno en la posición orto (NBOMes). Se postula que cambios estructurales análogos en ligandos de receptores dopaminérgicos (D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>) y, particularmente, de la dopamina y derivados, también afectarán positivamente su afinidad y potencia, esto con el objeto de encontrar indicios para el nuevo desarrollo de fármacos que involucran estos sistemas.

### **2.2 Objetivos generales**

- Aplicar y profundizar conocimientos sobre relaciones entre estructura química y actividad farmacológica (estructura/afinidad y estructura/actividad), para diseñar posibles ligandos dopaminérgicos.
- Sintetizar diversas familias de ligandos derivados de feniletilaminas 3,4-disustituidas N-benciladas, sobre la base de su analogía estructural con compuestos del tipo NBOMes.
- Evaluar en diferentes líneas celulares la afinidad y actividad funcional de los compuestos sintetizados. Este trabajo se realizó por laboratorio colaborador.

### 2.3 Objetivos específicos

- Sintetizar *N*-bencilfeniletilaminas derivadas de núcleos feniletilaminicos 3,4-di-sustituídos mediante la *N*-bencilación de estos intermediarios con benzaldehídos orto-sustituídos (-H, -OH y -OMe) por medio de la formación de iminas (bases de Schiff) y su posterior reducción.
- Caracterizar los compuestos sintetizados mediante análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y análisis DEPT).
- Interpretar los resultados biológicos obtenidos tanto de los ensayos de afinidad como de los ensayos funcionales para los diversos compuestos a sintetizar en términos de relaciones estructura-afinidad y estructura-actividad.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Materiales y métodos

La eliminación de los disolventes a presión reducida se realizó en evaporador rotatorio. Los disolventes que se emplearon en las extracciones y en las cromatografías son de grado técnico y se destilaron previamente a su utilización. Los reactivos comerciales y los solventes utilizados en reacciones son de calidad para síntesis. Para el producto comercial líquido 3,4-dimetoxifeniletamina comprado en Sigma Aldrich se preparó la sal de clorhidrato (**1**) para realizar los ensayos biológicos.

El seguimiento de las reacciones se efectuó mediante cromatografía en capa fina (CCF) empleando cromatofolios de gel de sílice GF<sub>254</sub> Merck sobre soporte de aluminio. El análisis de los cromatogramas se llevó a cabo iluminándolos con lámparas de UV con emisión a 254 y 365 nm, por revelado con ninhidrina, reactivo de Dragendorff, o una solución de FeCl<sub>3</sub> según el caso.

La purificación y separación de los productos de la mayoría de las reacciones se realizó mediante cristalización, formación de sales y cromatografía en columna, utilizando como fase estacionaria gel de sílice 60 Merck de 230-400 mallas por pulgada cuadrada (37-63 μm). El eluyente empleado se indica para cada caso, así como las proporciones utilizadas de los disolventes.

La síntesis por microondas se llevó a cabo por un reactor de síntesis por microondas en un equipo Anton Paar modelo Monowave 400. Los espectros de RMN fueron determinados en un equipo Bruker modelo AVANCE 400. El software de funcionamiento es XWIN NMR versión 3.1.

## 3.2 Síntesis

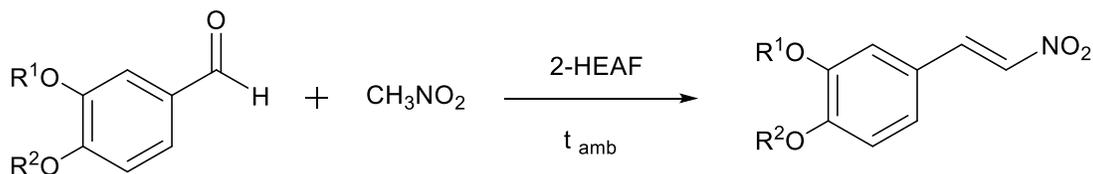
### 3.2.1 Preparación de líquido iónico (2-HEAF)



**Esquema 3:** Preparación de líquido iónico (2-HEAF).

En un balón de dos bocas equipado con un condensador de reflujo y un embudo de adición se adicionó 2-aminoetanol (135 mL, 2.25 mol). El balón estaba montado sobre un baño de agua-hielo. Bajo agitación magnética vigorosa, el ácido fórmico (85 mL, 2.25 mol) fue adicionado gota a gota dentro del balón en cerca de 45 min. Se dejó bajo agitación constante durante 24 h a temperatura ambiente, para obtener (220 mL) un líquido viscoso claro. Método modificado a partir de referencia.<sup>[70]</sup>

### 3.2.2 Síntesis general de $\beta$ -nitroestirenos



**Esquema 4:** Síntesis general de  $\beta$ -nitroestirenos.

**N1** R<sup>1</sup>= R<sup>2</sup>= -CH<sub>2</sub>-

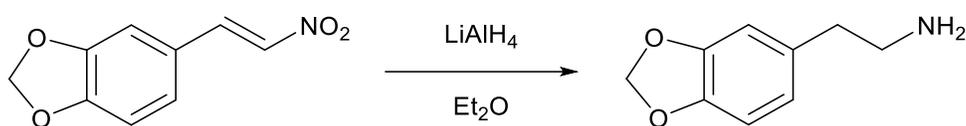
**N2** R<sup>1</sup>= -OMe, R<sup>2</sup>= -OH

Para preparar 3,4-metilendioxi-nitroestireno (**N1**), a una solución de 3,4-metilendioxi-benzaldehído (2.1 g, 13.99 mmol) en 15 mL de 2-HEAF se le adicionó MeNO<sub>2</sub> (760  $\mu$ L, 13.99 mmol). La mezcla de reacción fue dejada a temperatura ambiente con agitación constante durante 30 min. Para el caso del 4-hidroxi-3-

metoxi-nitroestireno (**N2**) se utilizó 20.4 mmol del benzaldehído, 20.4 mmol de  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  en 25 mL de 2-HEAF durante 10 min. Luego de este tiempo, a la mezcla cruda de reacción se le adicionó  $\text{H}_2\text{O}$  y el sólido formado fue filtrado, lavado con  $\text{H}_2\text{O}$  y recristalizado en IPA para dar lugar a 2.65 g del producto puro como unos cristales de color amarillo. Método modificado a partir de referencia.<sup>[71]</sup>

### 3.2.3 Síntesis de feniletilaminas

#### 3.2.3.1 Síntesis de 3,4-dimetoxifeniletilamina

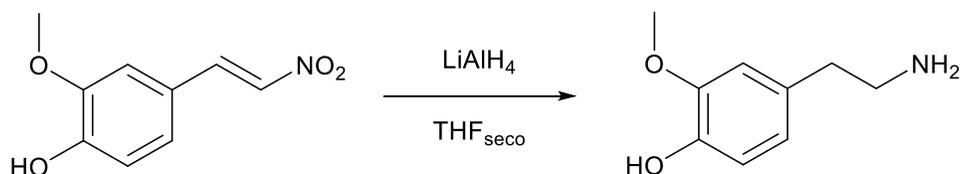


**Esquema 5:** Procedimiento de síntesis de 3,4-metilendioxi-feniletilamina.

A una suspensión de 5.1 g  $\text{LiAlH}_4$  en polvo en 450 mL de  $\text{Et}_2\text{O}$  seco contenida en un balón de 500 mL con agitación magnética vigorosa a temperatura ambiente, se agregaron con precaución y lentamente 4.37 g de 3,4-metilendioxi-β-nitroestireno (**N1**). La mezcla resultante, de color verdoso, se calentó bajo reflujo y con agitación por 48 h. Después de transcurrido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y el exceso de  $\text{LiAlH}_4$  fue destruido por adición gota a gota de 350 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,5 M para convertir los sólidos inorgánicos en una masa filtrable. La mezcla se dejó decantar y se filtró al vacío con matraz de Kitasato y embudo de Büchner a través de una capa de Celite<sup>®</sup>, lentamente y con cuidado de no tapar el filtro. El sólido blanco pastoso obtenido se traspasó a un vaso de precipitados y se resuspendió con 100 mL de THF. Nuevamente se filtró y el sólido obtenido fue lavado tres veces con 50 mL de MeOH para extraer toda la amina ocluída. Luego, los líquidos filtrados se juntaron y se evaporaron los solventes a presión reducida. El residuo obtenido fue resuspendido en el mínimo volumen de  $\text{H}_2\text{O}$ . La suspensión se acidificó con HCl (37 %) gota a gota hasta alcanzar  $\text{pH}=1$  y posteriormente se lavó con 3 porciones de DCM. Luego se llevó a  $\text{pH}=14$  con NaOH al 25 % y se

volvió a extraer con 4 porciones de DCM. Las porciones de DCM extraídas de la solución básica, reunidas, se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para eliminar el agua residual y luego se filtró y eliminó el solvente a presión reducida hasta obtener un aceite translúcido amarillo con la pureza suficiente para poder continuar al siguiente paso de reacción. Sin embargo, para purificar aún más el producto obtenido con el fin de caracterizarlo, éste se destiló a presión reducida en un equipo del tipo “Kugelrohr” para obtener un aceite incoloro. El aceite incoloro resultante fue disuelto en IPA y se agregó una cantidad equivalente de HCl 37 %, y se forzó la precipitación con la adición de  $\text{Et}_2\text{O}$  frío para dar lugar a un sólido blanco. Método modificado a partir de referencia.<sup>[72]</sup>

### 3.2.3.2 Síntesis de 4-hidroxi-3-metoxifeniletilamina

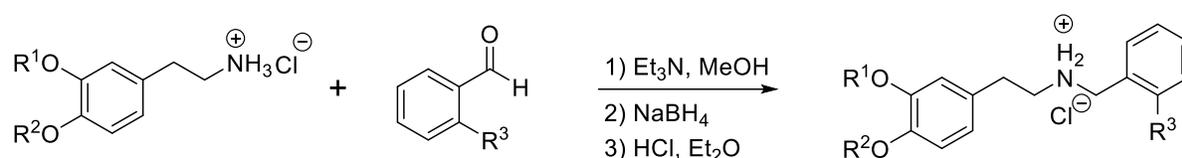


**Esquema 6:** Procedimiento de síntesis de 3,4-metilendioxfeniletilamina.

Primero se instaló un balón de tres bocas sobre un baño de acetona-hielo-sal con corriente continua de  $\text{N}_2(\text{g})$ , equipado con un condensador de reflujo y un embudo de adición. Luego, se adicionó gota a gota a una mezcla agitada vigorosamente de 3.1 g de  $\text{LiAlH}_4$  y 100 mL de THF seco, 3.2 g del nitroestireno **N2** disuelto en 60 mL de THF seco durante un período de 1 h. Terminada la adición se llevó a temperatura ambiente por 20 min y se calentó a reflujo por 24 h. Posterior a esto se dejó enfriar a temperatura ambiente y sobre un baño de acetona-hielo-sal se añadieron gota a gota 175 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.5 N enfriados anteriormente. Luego se eliminó el exceso de THF a presión reducida. El pH se ajustó a 6 con  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  sólido. La solución se calentó a ebullición y las sales de aluminio y litio que precipitaron se separaron por filtración. El filtrado caliente translúcido se mezcló con una solución de 6.24 g de ácido pícrico en 30 mL de EtOH caliente. Al reposar durante la noche a

temperatura ambiente, se obtuvieron 5.34 g de cristales en forma de agujas de color naranja del picrato. Una solución de 5.34 g de picrato en 250 mL de agua hirviendo se mezcló con 25 mL de HCl concentrado. El ácido pícrico que precipitó al enfriar se filtró, el filtrado se extrajo con AcOEt y luego con Et<sub>2</sub>O. La solución acuosa se concentró a presión reducida hasta que aparecieron los cristales del clorhidrato. Se recogieron 1.87 g de cristales de color blanco. Método modificado a partir de referencia.<sup>[73]</sup>

### 3.2.4 Síntesis de *N*-bencilfeniletilaminas



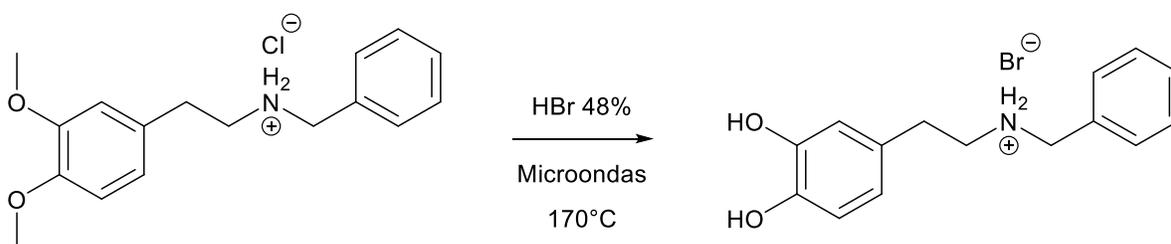
**Esquema 7:** Procedimiento general de síntesis de derivados *N*-bencilados.

- 1a** R<sup>1</sup>= -OMe, R<sup>2</sup>= -OMe, R<sup>3</sup>= -H
- 1b** R<sup>1</sup>= -OMe, R<sup>2</sup>= -OMe, R<sup>3</sup>= -OH
- 1c** R<sup>1</sup>= -OMe, R<sup>2</sup>= -OMe, R<sup>3</sup>= -OMe
- 2a** R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup> -CH<sub>2</sub>-, R<sup>3</sup>= -H
- 2b** R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup> -CH<sub>2</sub>-, R<sup>3</sup>= -OH
- 2c** R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup> -CH<sub>2</sub>-, R<sup>3</sup>= -OMe
- 3a** R<sup>1</sup>= -OMe, R<sup>2</sup>= -OH, R<sup>3</sup>= -H
- 3b** R<sup>1</sup>= -OMe, R<sup>2</sup>= -OH, R<sup>3</sup>= -OH
- 3c** R<sup>1</sup>= -OMe, R<sup>2</sup>= -OH, R<sup>3</sup>= -OMe

Una solución de la correspondiente feniletilamina (1.0 mmol) y del correspondiente benzaldehído (1.1 mmol) en 15 mL de MeOH fue tratada con Et<sub>3</sub>N (140 μL, 1.0 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente y agitación constante durante 24 h. Luego de este tiempo se agregó, lentamente durante 45-60 min, NaBH<sub>4</sub> (152 mg, 4.0 mmol) y se dejó reaccionar por 24 h adicionales (en el caso de la familia de *N*-bencil-3,4-metilendioxfeniletilaminas se dejó reaccionar por 1 semana). Posteriormente, la solución se llevó a sequedad en evaporador rotatorio

y el residuo de color crema se disolvió en 20 mL de DCM y se lavó tres veces con 20 mL de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y fue filtrada y llevada a sequedad. El aceite amarillo formado se disolvió en el mínimo volumen de acetona y sobre esta solución se agregó 146 µL de HCl 37 %. Finalmente, esta mezcla se vertió sobre 50 mL de Et<sub>2</sub>O frío para precipitar la sal del producto como un polvo de color blanco. Método modificado a partir de referencia.<sup>[74]</sup>

### 3.2.5 Síntesis de *N*-bencildopamina

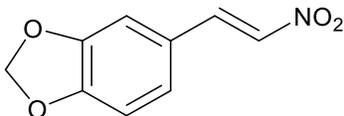


**Esquema 8:** Síntesis de *N*-bencildopamina.

En un tubo de microondas de 6 mL se disolvió 136.9 mg de 3,4-dimetoxi-*N*-bencilfeniletilamina en 2 mL de HBr 48 %, luego la mezcla de reacción se sonicó y burbujeó con N<sub>2(g)</sub>, para desgasificar y eliminar el O<sub>2(g)</sub> disuelto. Luego de haberla desgasificado el tubo fue sellado rápidamente y puesto en horno de microondas a 170 °C por 5 min, tiempo en el cual se completó la reacción. Gran parte del ácido se eliminó a presión reducida, el residuo se resuspendió en la mínima cantidad de acetona y se precipitó el compuesto agregando Et<sub>2</sub>O frío para dar lugar a 125.5 mg de un polvo color blanco. Método modificado a partir de referencia.<sup>[75]</sup>

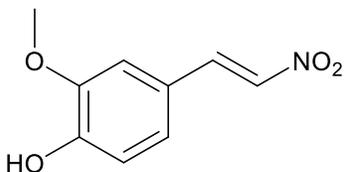
### 3.3 Datos espectroscópicos

#### 3.3.1 3,4-Metilendioxi-β-nitroestireno (N1)



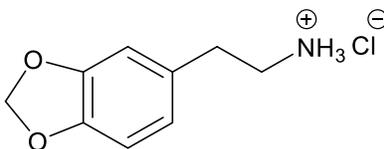
Cristales amarillos en forma de agujas (80 % de rendimiento).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.13 (d,  $J = 13.5$  Hz, 1H), 8.06 (d,  $J = 13.5$  Hz, 1H), 7.53 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 7.39 (dd,  $J = 8.1, 1.6$  Hz, 1H), 7.04 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 6.13 (s, 2H).

#### 3.3.2 4-Hidroxi-3-metoxi-β-nitroestireno (N2)



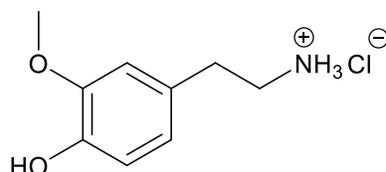
Cristales amarillos en forma de agujas (56 % de rendimiento).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.03 (s, 1H), 8.15 (d,  $J = 13.4$  Hz, 1H), 8.03 (d,  $J = 13.4$  Hz, 1H), 7.48 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J = 8.2, 1.9$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 3.84 (s, 3H).

#### 3.3.3 Clorhidrato de 3,4-metilendioxfeniletilamina (2)



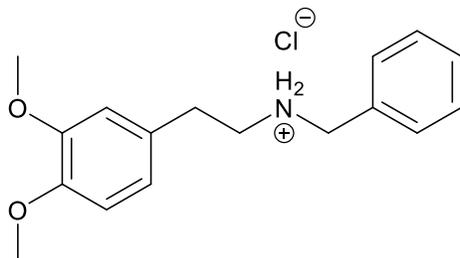
Polvo blanco (50 % de rendimiento).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.05 (s, 3H), 6.85 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.71 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 5.98 (s, 2H), 3.04 – 2.90 (m, 2H), 2.80 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H).

### 3.3.4 Clorhidrato de 4-hidroxi-3-metoxifeniletamina (3)



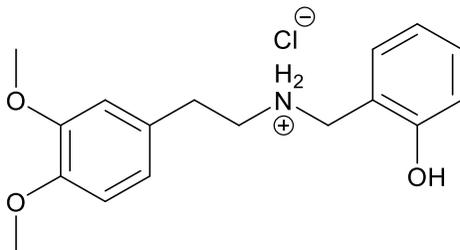
Polvo blanco (56 % de rendimiento).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.89 (s, 1H), 8.17 (s, 3H), 6.82 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 6.74 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.63 (dd,  $J = 8.0, 1.8$  Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.03 – 2.90 (m, 2H), 2.85 – 2.71 (m, 2H).

### 3.3.5 Clorhidrato de *N*-bencil-3,4-dimetoxifeniletamina (1a)



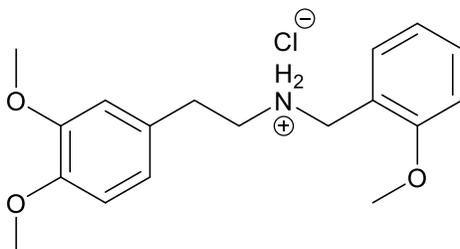
Polvo blanco (79 % de rendimiento).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9.66 (s, 2H), 7.61 (dd,  $J = 7.5, 1.9$  Hz, 2H), 7.51 – 7.34 (m, 3H), 6.94 – 6.80 (m, 2H), 6.74 (dd,  $J = 8.1, 1.8$  Hz, 1H), 4.14 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.20 – 3.04 (m, 2H), 3.02 – 2.87 (m, 2H).

### 3.3.6 Clorhidrato de 2-hidroxibencil-3,4-dimetoxifeniletamina (1b)



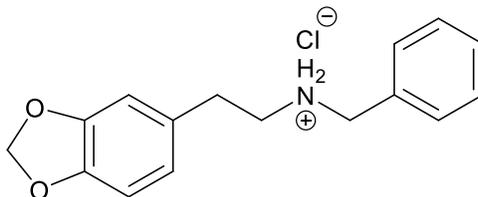
Polvo blanco (93 % de rendimiento).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9.33 (s, 3H), 7.44 (dd,  $J = 7.5, 1.2$  Hz, 1H), 7.27 – 7.19 (m, 1H), 7.01 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.86 – 6.80 (m, 2H), 6.74 (dd,  $J = 8.1, 1.8$  Hz, 1H), 4.10 (s, 2H), 3.75 (s, 4H), 3.72 (s, 4H), 3.15 – 3.03 (m, 2H), 2.99 – 2.89 (m, 2H).

### 3.3.7 Clorhidrato de 2-metoxibencil-3,4-dimetoxifeniletamina (1c)



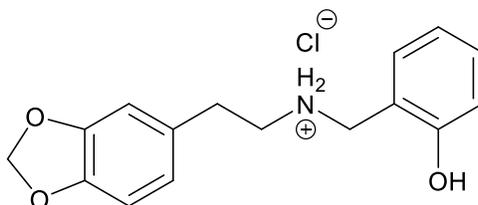
Polvo blanco (86% de rendimiento).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.46 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 7.04 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.98 (dd,  $J = 8.2, 4.8$  Hz, 2H), 6.87 – 6.73 (m, 2H), 4.18 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.25 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.93 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H).

### 3.3.8 Clorhidrato de N-bencil-3,4-metilendioxifeniletilamina (2a)



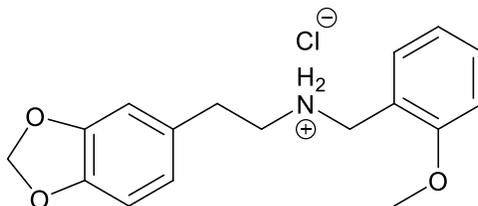
Polvo blanco (37 % de rendimiento).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9.66 (s, 2H), 7.60 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 7.42 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 6.85 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.70 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 5.99 (s, 2H), 4.14 (s, 2H), 3.15 – 3.01 (m, 2H), 3.01 – 2.87 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  147.38, 145.97, 132.05, 130.99, 130.10, 128.81, 128.57, 121.59, 108.96, 108.35, 100.84, 49.79, 47.61, 30.98.

### 3.3.9 Clorhidrato de 2-hidroxibencil-3,4-metilendioxifeniletilamina (2b)



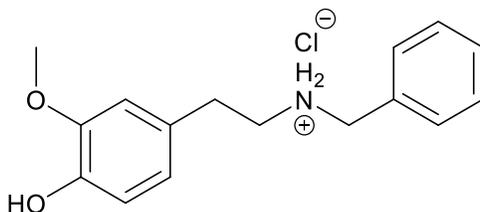
Polvo blanco (95 % de rendimiento).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9.63 (s, 2H), 7.60 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.42 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H), 6.85 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.70 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 5.99 (s, 2H), 4.14 (s, 2H), 3.15 – 3.00 (m, 2H), 3.00 – 2.83 (m, 2H).

### 3.3.10 Clorhidrato de 2-metoxibencil-3,4-metilendioxifeniletilamina (2c)



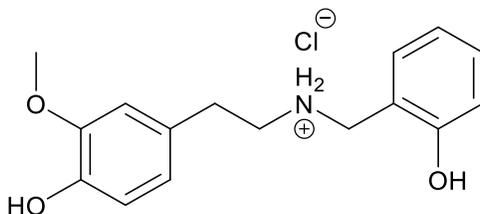
Polvo blanco (71 % de rendimiento).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9.28 (s, 0H), 9.03 (s, 0H), 7.58 – 7.44 (m, 1H), 7.41 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.08 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.99 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 6.70 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 5.98 (s, 2H), 4.10 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.14 – 3.00 (m, 2H), 3.00 – 2.84 (m, 2H).

### 3.3.11 Clorhidrato de N-bencil-4-hidroxi-3-metoxifeniletamina (3a)



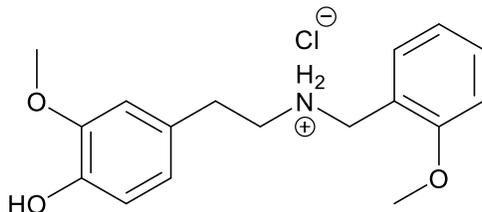
Polvo blanco (61 % de rendimiento).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9.62 (s, 2H), 8.91 (s, 1H), 7.60 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 7.54 – 7.29 (m, 3H), 6.85 – 6.69 (m, 2H), 6.61 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 4.14 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.15 – 3.01 (m, 2H), 2.99 – 2.84 (m, 2H).

### 3.3.12 Clorhidrato de 2-hidroxibencil-4-hidroxi-3-metoxifeniletamina (3b)



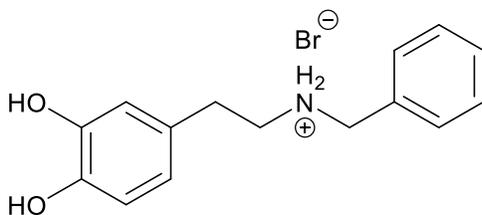
Polvo blanco (70 % de rendimiento).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  10.30 (s, 1H), 9.19 (s, 2H), 8.90 (s, 1H), 7.43 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.23 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.01 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 6.84 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.74 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.61 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 4.09 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.13 – 2.99 (m, 2H), 2.97 – 2.82 (m, 2H).

### 3.3.13 Clorhidrato de 2-metoxibencil-4-hidroxi-3-metoxifeniletamina (3c)



Polvo blanco (46 % de rendimiento).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9.34 (s, 2H), 8.93 (s, 1H), 7.53 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.41 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.08 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.99 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.75 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.61 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.16 – 3.00 (m, 2H), 2.99 – 2.81 (m, 2H).

### 3.3.14 Bromhidrato de *N*-bencildopamina (DA-NB)



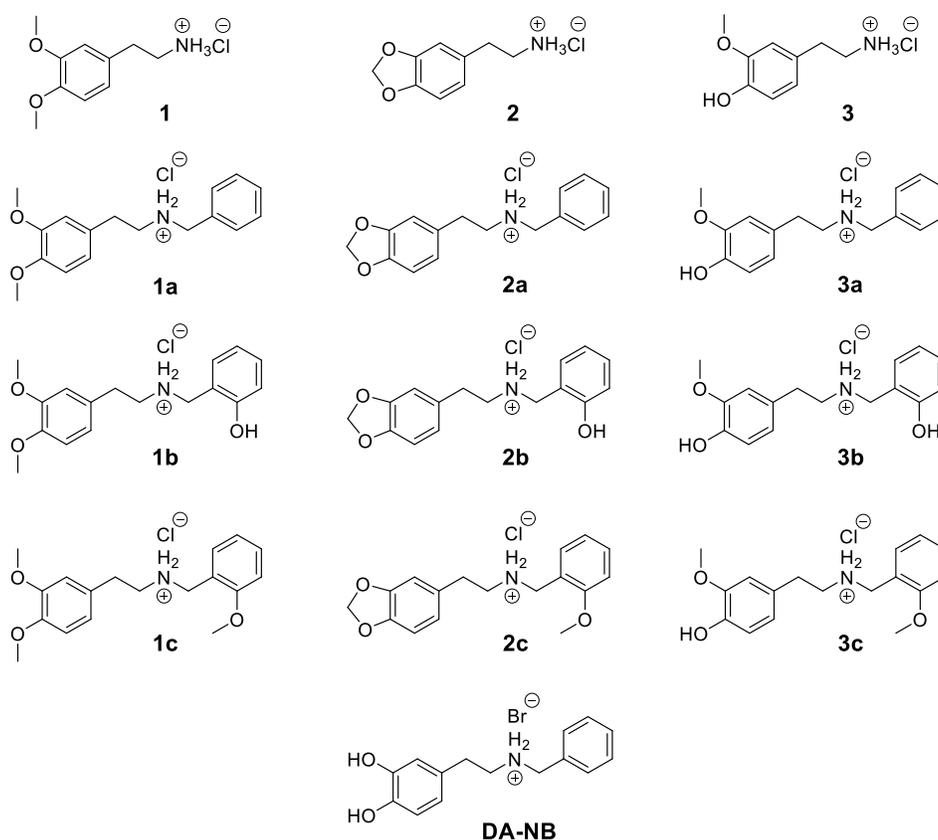
Polvo blanco levemente gris (87 % de rendimiento).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.95 (s, 3H), 8.83 (s, 0H), 7.53 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.48 – 7.35 (m, 3H), 6.68 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.47 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 4.18 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H), 3.14 – 2.98 (m, 2H), 2.86 – 2.73 (m, 2H).

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Determinación de afinidad por desplazamiento de radioligando

Es importante mencionar que los ensayos fueron realizados por el grupo de investigación a cargo de José Brea, del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS) de la Universidad de Santiago de Compostela.

Se realizaron los ensayos biológicos de afinidad por desplazamiento de radioligando para las moléculas que se encuentran dibujadas a continuación (Figura 5).



**Figura 14:** Resumen de moléculas ensayadas.

Compuesto	hD <sub>1</sub>	hD <sub>2</sub>
	% despl. 10 μM	% despl. 10 μM
1	1.31 ± 0.015	9.34 ± 1.51
1a	1.19 ± 2.57	9.56 ± 7.97
1b	5.59 ± 2.37	11.46 ± 1.34
1c	7.42 ± 1.37	20.94 ± 0.00
2	12.75 ± 5.19	5.58 ± 3.23
2a	15.88 ± 1.66	21.51 ± 0.19
2b	15.56 ± 4.33	20.94 ± 4.55
2c	20.18 ± 0.55	25.49 ± 4.55
3	28.75 ± 7.50	22.27 ± 7.78
3a	13.18 ± 0.18	27.96 ± 5.12
3b	17.71 ± 0.60	17.53 ± 5.69
3c	8.52 ± 0.05	23.79 ± 3.98
DA-NB	18.97 ± 1.31	34.98 ± 6.83

**Tabla 3:** Porcentajes de desplazamiento de radioligandos de receptores hD<sub>1</sub> y hD<sub>2</sub> de dopamina por los compuestos ensayados a una concentración 10 μM.

Los resultados de estos ensayos muestran que las afinidades de los compuestos por los dos tipos de receptores de DA (D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>) son demasiado bajas para determinar valores confiables de IC<sub>50</sub> o de K<sub>i</sub>. Sin embargo, de acuerdo con la hipótesis planteada (que la *N*-bencilación mejoraría la actividad de estas moléculas), se observa en las series 1 y 2 una tendencia hacia un aumento de la afinidad por ambos receptores a lo menos con la *N*-sustitución por un grupo 2-metoxibencilo, no así en la serie 3. La *N*-bencildopamina (**DA-NB**) es claramente más afín que su análogo 3,4-dimetoxilado (**1a**) y posiblemente un poco más que **2a** y **3a**, especialmente en el receptor hD<sub>2</sub>. Aunque sería interesante evaluar los análogos de dopamina con grupos *N*-2-hidroxi- y *N*-2-metoxibencilo, su preparación involucraría etapas de síntesis que no fueron previstas para este trabajo de tesis.

Sin embargo, recordando que la idea fue imitar los NBOMes, se ensayaron los compuestos frente a los receptores 5-HT<sub>2</sub>.

Compuestos	h5-HT <sub>2A</sub>		h5-HT <sub>2B</sub>		h5-HT <sub>2C</sub>	
	% despl. 10 $\mu$ M	K <sub>i</sub> ( $\mu$ M)	% despl. 10 $\mu$ M	K <sub>i</sub> ( $\mu$ M)	% despl. 10 $\mu$ M	K <sub>i</sub> ( $\mu$ M)
1	-4.33 $\pm$ 7.07	-	46.05 $\pm$ 2.18	-	38.36 $\pm$ 3.88	-
1a	28.42 $\pm$ 4.26	-	76.45 $\pm$ 0.74	1.54 $\pm$ 0.11	56.13 $\pm$ 4.09	-
1b	69.70 $\pm$ 0.21	2.12 $\pm$ 0.21	95.87 $\pm$ 0.40	0.39 $\pm$ 0.02	75.53 $\pm$ 1.84	1.34 $\pm$ 0.39
1c	70.53 $\pm$ 2.70	0.91 $\pm$ 0.12	97.72 $\pm$ 0.92	0.25 $\pm$ 0.01	79.21 $\pm$ 0.61	0.74 $\pm$ 0.08
2	17.71 $\pm$ 2.29	-	93.79 $\pm$ 0.74	0.35 $\pm$ 0.08	82.27 $\pm$ 1.63	0.79 $\pm$ 0.09
2a	65.95 $\pm$ 0.21	1.12 $\pm$ 0.33	99.44 $\pm$ 0.27	0.17 $\pm$ 0.01	95.96 $\pm$ 1.84	0.41 $\pm$ 0.07
2b	66.99 $\pm$ 1.04	1.17 $\pm$ 0.35	98.80 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.006	93.30 $\pm$ 1.64	0.34 $\pm$ 0.05
2c	91.11 $\pm$ 2.91	0.21 $\pm$ 0.03	101.8 $\pm$ 0.10	0.03 $\pm$ 0.001	98.41 $\pm$ 0.20	0.13 $\pm$ 0.03
3	13.14 $\pm$ 0.21	-	27.07 $\pm$ 0.27	-	43.46 $\pm$ 0.41	-
3a	28.63 $\pm$ 2.60	-	52.77 $\pm$ 1.65	-	51.23 $\pm$ 0.00	-
3b	63.04 $\pm$ 0.42	-	72.79 $\pm$ 2.79	3.03 $\pm$ 0.33	56.94 $\pm$ 9.40	-
3c	62.52 $\pm$ 0.10	-	80.52 $\pm$ 1.44	1.68 $\pm$ 0.19	64.30 $\pm$ 3.23	2.13 $\pm$ 0.47
DA-NB	29.77 $\pm$ 6.44	-	49.71 $\pm$ 1.34	-	49.80 $\pm$ 2.25	-

**Tabla 4:** Porcentajes de desplazamiento de radioligandos de receptores h5-HT<sub>2</sub> de serotonina por los compuestos ensayados a una concentración 10  $\mu$ M y sus constantes de inhibición (K<sub>i</sub>) en los casos en que se pudieron calcular.

Así se encontró que la *N*-bencilación aumenta apreciablemente las afinidades y este efecto es claramente mayor con el grupo *N*-2-metoxibencilo. Además, cómo es posible apreciar en el esquema, las afinidades de los compuestos por los tres subtipos de receptores 5HT<sub>2</sub> aumentan al contar con los grupos 2-hidroxi- o 2-metoxibencilo y son mayores que el del grupo bencilo sin oxigenar, aunque similares entre sí. Esta tendencia ya había sido descrita en la serie de compuestos NBOMes. Algunas de estas afinidades llegan a ser potencialmente interesantes,

especialmente por el “antitarget” 5-HT<sub>2B</sub>, aunque son bajas en relación con las de los NBOMes. Tal como se observa en la serie de N-BOMes, prácticamente no hay selectividad entre los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>.

Estos resultados sugieren estudios funcionales, primero para conocer el carácter agonista total, parcial o potencialmente antagonista en cada uno de los subtipos y después, posiblemente, estudios de selectividad funcional. También estudios de modelamiento molecular para tratar de racionalizar estos datos y compararlos con los de los NBOMes. Los leves aumentos de las afinidades por receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> señalan una diferencia significativa entre los sitios que ocupan los grupos *N*-bencilo en estos receptores y en los 5-HT<sub>2</sub>, diferencia que se podrá explorar mediante la introducción de otros sustituyentes. Resolver los detalles moleculares de las interacciones ligando-receptor también proporcionará una visión general de las diferentes formas en que los GPCR se activan con agonistas (totales o parciales) y se desactivan con antagonistas, y cómo estos eventos moleculares se traducen en una respuesta celular que pueda producir un resultado clínico particular.

## 5 CONCLUSIONES

De acuerdo con todo lo descrito en este trabajo, es posible destacar los siguientes puntos:

1.- Utilizando metodologías sintéticas clásicas que involucran solo 3 pasos, se pudo obtener un total de 13 derivados finales, de los cuales 2 no eran conocidos, pertenecientes a cuatro familias de compuestos para su evaluación biológica.

2.- Se ensayaron los 13 compuestos, en diferentes líneas celulares para determinar sus afinidades por los receptores humanos de dopamina D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> y de serotonina 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>. La literatura científica no consigna datos de afinidad por estos receptores para ninguno de estos compuestos.

3.- No se realizaron estudios funcionales para ninguno de los compuestos debido a que sus afinidades son casi todas mucho menor que las esperadas para que tuvieran algún interés aplicado.

4.- Se obtuvieron afinidades con valores de K<sub>i</sub> submicromolares para algunos compuestos, lo que podría alentar nuevas síntesis para ensayos en el campo serotoninérgico.

Del conjunto de resultados se concluye la debilidad de la hipótesis inicial de que la *N*-bencilación de análogos de dopamina aumentaría de manera importante su afinidad por receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, como sucede en los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub> al modificar de la misma manera compuestos de la serie 2CX (2,5-dimetoxi-4-X-feniletilaminas). No obstante, en algunos casos se observa un leve aumento de la afinidad que sugiere la posibilidad de que otros sustituyentes en el átomo de nitrógeno básico podrían favorecer mucho más la interacción con los receptores. Quedan pendientes la síntesis y el ensayo biológico de derivados catecólicos de

dopamina que se esperaba que interactuaran más eficazmente con el sitio ortoestérico de estos receptores.

## 6 REFERENCIAS

- (1) Hornykiewicz, O. (2002). Dopamine miracle: from brain homogenate to dopamine replacement. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 17(3), 501-508.
- (2) The Nobel Prize, Arvid Carlsson Nobel Lecture. <[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2000/carlsson-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2000/carlsson-lecture.html)>.
- (3) Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A., & Udenfriend, S. (1965). Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 148(1), 1-8.
- (4) Nagatsu, T., Levitt, M., & Udenfriend, S. (1964). Tyrosine hydroxylase the initial step in norepinephrine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 239(9), 2910-2917.
- (5) Christenson, J. G., Dairman, W., & Udenfriend, S. (1970). Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney. *Archives of biochemistry and biophysics*, 141(1), 356-367.
- (6) Musacchio, J. M. (1975). Enzymes involved in the biosynthesis and degradation of catecholamines. In *Biochemistry of Biogenic Amines* (pp. 1-35). Springer, Boston, MA.
- (7) Eiden, L. E., & Weihe, E. (2011). VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1216, 86.
- (8) Njus, D., Kelley, P. M., & Harnadek, G. J. (1986). Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*, 853(3-4), 237-265.
- (9) Elsworth, J. D., & Roth, R. H. (1997). Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 144(1), 4-9.

- (10) Guillot, T. S., & Miller, G. W. (2009). Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. *Molecular neurobiology*, 39(2), 149-170.
- (11) Südhof, T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, 375(6533), 645.
- (12) Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cellular and molecular neurobiology*, 39(1), 31-59.
- (13) Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaño, J. A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, 11(1), 39-60.
- (14) Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton, L. L., Hilal-Dandan, R., & Knollmann, B. C. (2017). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.(13ed.). New York: McGraw-Hill. (pp. 235).
- (15) Amara, S. G., & Kuhar, M. J. (1993). Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annual review of neuroscience*, 16(1), 73-93.
- (16) Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton, L. L., Hilal-Dandan, R., & Knollmann, B. C. (2017). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.(13ed.). New York: McGraw-Hill. (pp. 135).
- (17) Segura-Aguilar, J., Paris, I., Muñoz, P., Ferrari, E., Zecca, L., & Zucca, F. A. (2014). Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 129(6), 898-915.
- (18) Tan, L., Yan, W., McCorvy, J. D., & Cheng, J. (2018). Biased ligands of G protein-coupled receptors (GPCRs): structure-functional selectivity relationships (SFSRs) and therapeutic potential. *Journal of medicinal chemistry*, 61(22), 9841-9878.
- (19) Sibley, D. R., Monsma Jr, F. J., McVittie, L. D., Gerfen, C. R., Burch, R. M., & Mahan, L. C. (1992). Molecular neurobiology of dopamine receptor subtypes. *Neurochemistry international*, 20, 17-22.

- (20) Keibian, J. W., Petzold, G. L., & Greengard, P. (1972). Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "dopamine receptor". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(8), 2145-2149.
- (21) Burt, D. R., Enna, S. J., Creese, I., & Snyder, S. H. (1975). Dopamine receptor binding in the corpus striatum of mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(11), 4655-4659.
- (22) Seeman, P., Chau-Wong, M., Tedesco, J., & Wong, K. (1975). Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(11), 4376-4380.
- (23) Bunzow, J. R., Van Tol, H. H., Grandy, D. K., Albert, P., Salon, J., Christie, M., ... & Civelli, O. (1988). Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature*, 336(6201), 783.
- (24) Dearry, A., Gingrich, J. A., Falardeau, P., Fremeau Jr, R. T., Bates, M. D., & Caron, M. G. (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature*, 347(6288), 72.
- (25) Monsma, F. J., Mahan, L. C., McVittie, L. D., Gerfen, C. R., & Sibley, D. R. (1990). Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(17), 6723-6727.
- (26) Sunahara, R. K., Niznik, H. B., Weiner, D. M., Stormann, T. M., Brann, M. R., Kennedy, J. L., ... & Seeman, P. (1990). Human dopamine D 1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature*, 347(6288), 80.
- (27) Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M. P., Bouthenet, M. L., & Schwartz, J. C. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature*, 347(6289), 146.
- (28) Van Tol, H. H., Bunzow, J. R., Guan, H. C., Sunahara, R. K., Seeman, P., Niznik, H. B., & Civelli, O. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350(6319), 610.

- (29) Sunahara, R. K., Guan, H. C., O'Dowd, B. F., Seeman, P., Laurier, L. G., Ng, G., ... & Niznik, H. B. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, 350(6319), 614.
- (30) Baik, J. H. (2013). Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Frontiers in neural circuits*, 7, 152.
- (31) Svingos, A. L., Periasamy, S., & Pickel, V. M. (2000). Presynaptic dopamine D4 receptor localization in the rat nucleus accumbens shell. *Synapse*, 36(3), 222-232.
- (32) Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*, 78(1), 189-225.
- (33) Beaulieu, J. M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews*, 63(1), 182-217.
- (34) Ayano, G. (2016). Dopamine: receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders: review of literatures. *J Ment Disord Treat*, 2(120), 2.
- (35) Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2002). The role of  $\beta$ -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of cell science*, 115(3), 455-465.
- (36) Keibian, J. W., & Greengard, P. (1971). Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: possible role in synaptic transmission. *Science*, 174(4016), 1346-1349.
- (37) Keibian, J. W., & Calne, D. B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277(5692), 93.
- (38) Felder, C. C., Jose, P. A., & Axelrod, J. U. L. I. U. S. (1989). The dopamine-1 agonist, SKF 82526, stimulates phospholipase-C activity independent of adenylyl cyclase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 248(1), 171-175.

- (39) Jose, P. A., Yu, P. Y., Yamapchi, I., Eisner, G. M., Mouradian, M. M., Felder, C. C., & Felder, R. A. (1995). Dopamine D1 receptor regulation of phospholipase C. *Hypertension Research*, 18(Supplement1), S39-S42.
- (40) Sahu, A., Tyeryar, K. R., Vongtau, H. O., Sibley, D. R., & Undieh, A. S. (2009). D5 dopamine receptors are required for dopaminergic activation of phospholipase C. *Molecular pharmacology*, 75(3), 447-453.
- (41) Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. (2006). The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 110(3), 465-502.
- (42) Gurevich, E. V., & Gurevich, V. V. (2006). Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome biology*, 7(9), 236.
- (43) Koob, G. F., & Le Moal, M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 278(5335), 52-58.
- (44) Baik, J. H. (2013). Dopamine signaling in food addiction: role of dopamine D2 receptors. *BMB reports*, 46(11), 519.
- (45) Wang, G. J., Volkow, N. D., Logan, J., Pappas, N. R., Wong, C. T., Zhu, W., ... & Fowler, J. S. (2001). Brain dopamine and obesity. *The Lancet*, 357(9253), 354-357.
- (46) Wise, R. A. (1996). Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annual review of neuroscience*, 19(1), 319-340.
- (47) Berridge, K. C., Robinson, T. E., & Aldridge, J. W. (2009). Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Current opinion in pharmacology*, 9(1), 65-73.
- (48) Owen, M. J., & Sawa, A. (2016). Mortensen PB. *Schizophrenia Lancet*, 388, 86-97.
- (49) Meyer, N., & MacCabe, J. H. (2016). Schizophrenia. *Medicine*, 44(11), 649-653.
- (50) Ministerio de Salud, División de Rectoría y Regulación Sanitaria, Unidad de Salud Mental: Orientaciones Técnicas: Tratamiento y Rehabilitación de las Personas Afectadas de Esquizofrenia. Noviembre 2000.

- <<https://www.minsal.cl/portal/url/item/71e42e52709a1a53e04001011f010ab3.pdf>>.
- (51) Williams-Gray, C. H., & Worth P. F. (2016). Parkinson's disease, *Medicine*(United Kingdom), 44(9), 542–546
- (52) National Institute on Aging. Parkinson's Disease. <<https://www.nia.nih.gov/health/parkinsons-disease>>.
- (53) Ministerio de Salud, Subsecretaría de Salud Pública, División de Planificación Sanitaria, Departamento Evaluación de tecnologías Sanitarias y Salud Basada en Evidencia: Informe de Evaluación Científica Basada en la Evidencia Disponible. Enfermedad de Parkinson. <<https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/10/parkinson-OK.pdf>>.
- (54) Ministerio de Salud. Guía Clínica Enfermedad de Parkinson. Santiago de Chile: Minsal, 2010.
- (55) Pizzorno, J. E., Murray, M. T., & Joiner-Bey, H. (2016). *The Clinician's Handbook of Natural Medicine E-Book*. Elsevier Health Sciences. (pp. 121-131).
- (56) Matthews, M., Nigg, J. T., & Fair, D. A. (2014). Attention deficit hyperactivity disorder. *Current topics in behavioral neurosciences*, 16, 235–266.
- (57) Jordan, C. J., & Andersen, S. L. (2017). attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): methylphenidate (ritalin) and dopamine.
- (58) Ballesteros, J. A., & Weinstein, H. (1995). [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. In *Methods in neurosciences* (Vol. 25, pp. 366-428). Academic Press.
- (59) Bueschbell, B., Barreto, C. A., Preto, A. J., Schiedel, A. C., & Moreira, I. S. (2019). A complete assessment of dopamine receptor-ligand interactions through computational methods. *Molecules*, 24(7), 1196.
- (60) Floresca, C. Z., & Schetz, J. A. (2004). Dopamine receptor microdomains involved in molecular recognition and the regulation of drug affinity and function. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 24(3), 207-239.

- (61) Nichols, D. E., & Nichols, C. D. (2008). Serotonin receptors. *Chemical reviews*, 108(5), 1614-1641.
- (62) Nichols, D. E. (2004). Hallucinogens. *Pharmacology & therapeutics*, 101(2), 131-181.
- (63) Ray, T. S. (2010). Psychedelics and the human receptorome. *PloS one*, 5(2), e9019.
- (64) Shulgin, A.; Shulgin, A. Shuras voice. In PiHKAL: A chemical love story, 1st ed.; Transform Press: Berkeley, CA, 1991; pp 15-18.
- (65) Blaazer, A. R., Smid, P., & Kruse, C. G. (2008). Structure–activity relationships of phenylalkylamines as agonist ligands for 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*, 3(9), 1299-1309.
- (66) Hansen, M. (2010). *Design and synthesis of selective serotonin receptor agonists for positron emission tomography imaging of the brain*. Det Farmaceutiske Fakultet: Københavns Universitet, 2010.
- (67) Heim, R. (2003). Synthesis and pharmacology of potent 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonists with N-2-Methoxybenzyl partial structure [Ph. D. thesis]. *Free University, Berlin, Germany*.
- (68) Ísberg, V., Balle, T., Sander, T., Jørgensen, F. S., & Gloriam, D. E. (2011). G protein-and agonist-bound serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor model activated by steered molecular dynamics simulations. *Journal of chemical information and modeling*, 51(2), 315-325.
- (69) Pándy-Szekeres G, Munk C, Tsonkov TM, Mordalski S, Harpsøe K, Hauser AS, Bojarski AJ, Gloriam DE. GPCRdb in 2018: adding GPCR structure models and ligands. 2017, *Nucleic Acids Res.*, Nov 16. 10.1093/nar/gkx1109
- (70) Bicak, N. (2005). A new ionic liquid: 2-hydroxy ethylammonium formate. *Journal of Molecular Liquids*, 116(1), 15-18.
- (71) Alizadeh, A., Khodaei, M. M., & Eshghi, A. (2010). Amphiphilic dual activation role of a task-specific ionic liquid: 2-hydroxyethylammonium formate as a recyclable promoter and medium for the green synthesis of  $\beta$ -nitrostyrenes. *The Journal of organic chemistry*, 75(23), 8295-8298.

- (72) Gallardo-Godoy, A., Fierro, A., McLean, T. H., Castillo, M., Cassels, B. K., Reyes-Parada, M., & Nichols, D. E. (2005). Sulfur-substituted  $\alpha$ -alkyl phenethylamines as selective and reversible MAO-A inhibitors: Biological activities, CoMFA analysis, and active site modeling. *Journal of medicinal chemistry*, 48(7), 2407-2419
- (73) Ramirez, F. A., & Burger, A. (1950). The reduction of phenolic  $\beta$ -nitrostyrenes by lithium aluminum hydride. *Journal of the American Chemical Society*, 72(6), 2781-2782.
- (74) Hansen, M., Phonekeo, K., Paine, J. S., Leth-Petersen, S., Begtrup, M., Bräuner-Osborne, H., & Kristensen, J. L. (2014). Synthesis and structure–activity relationships of N-benzyl phenethylamines as 5-HT<sub>2A/2C</sub> agonists. *ACS chemical neuroscience*, 5(3), 243-249.
- (75) Maresh, J. J., Ralko, A. A., Speltz, T. E., Burke, J. L., Murphy, C. M., Gaskell, Z., ... & Krzeszowiec, M. (2014). Chemoselective Zinc/HCl Reduction of Halogenated  $\beta$ -Nitrostyrenes: Synthesis of Halogenated Dopamine Analogues. *Synlett*, 25(20), 2891-2894.

## **7 ANEXOS**

### **7.1 Ensayos de afinidad por desplazamiento de radioligando**

#### **7.1.1 Receptor humano D<sub>1</sub>**

Los experimentos de unión competitiva al receptor de dopamina D<sub>1</sub> se llevaron a cabo en una placa de polipropileno de 96 pocillos. En cada pocillo se incubaron 12 µg de membranas de la línea celular CHO-K1 D1 comprada a PerkinElmer (ES-172-M4000UA, lote: 2296965, concentración de proteína = 4000 µg/mL), junto con [<sup>3</sup>H]SCH23390 0.7 nM (83.2 Ci/mmol, 1 mCi/mL, Perkin Elmer NET930250UC), los compuestos a estudiar o el compuesto utilizado como estándar. La unión no específica se determinó en presencia de butaclamol 1 µM (D033, Sigma Aldrich). La mezcla de reacción (Vt: 250 µl/pocillo) se incubó a 27 °C durante 60 minutos, luego se transfirieron 200 µL a una placa de 96 pocillos GF/C (Millipore, Madrid, España) pretratada con PEI 0,5 % y tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH = 7,4). Luego, se filtró y se lavó cuatro veces con 250 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH = 7,4), antes de agregar 30 µL de Universol. La medición final se realizó en un contador de centelleo beta de microplacas (Microbeta Trilux, PerkinElmer, Madrid, España).

#### **7.1.2 Receptor humano D<sub>2</sub>**

Los experimentos de unión competitiva al receptor de dopamina D<sub>2</sub> se llevaron a cabo en una placa de polipropileno de 96 pocillos. En cada pocillo se incubaron 10 µg de membranas de la línea celular CHO-D2 # S20 previamente preparada (Lote: A003 / 22-07-2015, concentración de proteína = 4185 µg/mL), junto con [<sup>3</sup>H]espiperona 0,15 nM (78.8 Ci/mmol, 1 mCi/mL, Perkin Elmer NET1187250UC), los compuestos a estudiar o el compuesto utilizado como estándar. La unión no específica se determinó en presencia de sulpirida 10 µM (S8010, Sigma Aldrich). La mezcla de reacción (Vt: 250 µl/pocillo) se incubó a 25 °C durante 120 minutos y luego se transfirieron 200 µL a una placa de 96 pocillos GF/C (Millipore, Madrid,

España) pretratada con PEI 0,5 % y tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,4). La mezcla de reacción se filtró y se lavó cuatro veces con 250 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, NaCl al 0,9 %, pH 7,4), antes de agregar 30 µl de Universol. La medición final se realizó en un contador de centelleo beta de microplacas (Microbeta Trilux, PerkinElmer, Madrid, España).

### **7.1.3 Receptor humano 5-HT<sub>2A</sub>**

Los experimentos de unión competitiva al receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> se llevaron a cabo en una placa de polipropileno de 96 pocillos. En cada pocillo se incubaron 80 µg de membranas de la línea celular CHO-5-HT<sub>2A</sub> previamente preparada en el mismo laboratorio (concentración de proteína = 4910 µg/mL), junto con [<sup>3</sup>H]ketanserina 1 nM (47.3 Ci/mmol, 1 mCi/mL, Perkin Elmer) y los compuestos a estudiar o el compuesto utilizado como estándar. La unión no específica se determinó en presencia de metisergida 1 µM (M137, Sigma Aldrich). La mezcla de reacción (Vt: 250 µl/pocillo) se incubó a 37 °C durante 30 minutos, luego se transfirieron 200 µL a una placa de 96 pocillos GF/B (Millipore) pretratada con un PEI 0,5 % y tampón de ensayo. (Tris-HCl 50 mM, pH = 7,4). Luego, se filtró y se lavó seis veces con 250 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH = 6.6), antes de agregar 30 µL de Universol Final. La medición final se realizó en un contador de centelleo beta de microplacas (Microbeta Trilux, PerkinElmer).

### **7.1.4 Receptor humano 5-HT<sub>2B</sub>**

Los experimentos de unión competitiva al receptor 5-HT<sub>2B</sub> se llevaron a cabo en una placa de polipropileno de 96 pocillos. En cada pocillo se incubaron 20 µg de membranas de la línea celular CHO K1-5-HT<sub>2B</sub> preparada en el mismo laboratorio (concentración de proteína = 2775 µg/mL), junto con [<sup>3</sup>H]LSD 0,8 nM (82.9 Ci/mmol, 1 mCi/mL, Perkin Elmer), los compuestos a estudiar o el compuesto utilizado como estándar. La unión no específica se determinó en presencia de

serotonina 10  $\mu\text{M}$  (H9523; Sigma Aldrich). La mezcla de reacción (Vt: 250  $\mu\text{l}$ /pocillo) se incubó a 37 °C durante 30 minutos, luego se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  a una placa de 96 pocillos GF/C (Millipore) pretratada con un PEI 0,5 % y tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM, ácido ascórbico al 0,1 %,  $\text{CaCl}_2$  4 mM, pH = 7,4). Luego, se filtró y se lavó cuatro veces con 250  $\mu\text{l}$  de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH = 7,4), antes de agregar 30  $\mu\text{L}$  de Universol. La medición final se realizó en un contador de centelleo beta de microplacas (Microbeta Trilux, PerkinElmer).

#### **7.1.5 Receptor humano 5-HT<sub>2c</sub>**

Los experimentos de unión competitiva al receptor 5-HT<sub>2c</sub> se llevaron a cabo en una placa de polipropileno de 96 pocillos. En cada pocillo se incubaron 3  $\mu\text{g}$  de membranas de la línea celular HeLa-5-HT<sub>2C</sub> preparada en el mismo laboratorio (concentración de proteína = 2014  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), junto con [<sup>3</sup>H]mesulergina 1.25 nM (84.7 Ci/mmol, 1 mCi/mL, Perkin Elmer), los compuestos a estudiar o el compuesto utilizado como estándar. La unión no específica se determinó en presencia de mianserina 1  $\mu\text{M}$  (M2525, Sigma Aldrich). La mezcla de reacción (Vt: 250  $\mu\text{l}$ /pocillo) se incubó a 37 °C durante 30 minutos, luego se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  a una placa de 96 pocillos GF/C (Millipore) pretratada con PEI 0,5 % y tampón de ensayo. (Tris-HCl 50 mM, pH = 7,4). Luego, se filtró y se lavó cuatro veces con 250  $\mu\text{l}$  de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH = 6.6), antes de agregar 30  $\mu\text{L}$  de Universol. La medición final se realizó en un contador de centelleo beta de microplacas (Microbeta Trilux, PerkinElmer).

## 7.2 Espectros de RMN de las moléculas sintetizadas

