

UCh-FC
MAG-Q
M 722
C. I



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**“Síntesis y evaluación biológica de derivados de
Triptamina como potenciales inhibidores del
transportador de serotonina, SERT”**

Tesis

Entregada a la Universidad De Chile

En cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Químicas

Facultad De Ciencias

Por

JUANA ANDREA MOLINA HIDALGO

Octubre, 2015

Director de Tesis: Dr. Patricio Iturriaga Vásquez.

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

JUANA ANDREA MOLINA HIDALGO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 1 de Octubre de 2015.

Director de Tesis:

Dr. Patricio Iturriaga Vásquez.



Comisión de Evaluación de Tesis:

Dr. Nicolás Yutronic. S.

Dr. Carlos Areche M.

Dr. Carlos Escobar Z.

A blue ink signature of Nicolás Yutronic S. written over a horizontal line.

A blue ink signature of Carlos Areche M. written over a horizontal line.

A blue ink signature of Carlos Escobar Z. written over a horizontal line.

El mundo no está en peligro por las personas malas, sino por aquellas que permiten la maldad y que con su indiferencia apoyan en silencio la injusticia.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer de forma especial a mi profesor guía Patricio Iturriaga por darme la oportunidad de trabajar junto a él y permitirme así ampliar mis conocimientos.

A los amigos y compañeros que encontré en esta bonita etapa: Su, Estefa, Karen, Nicolás, Xilly, Cristian y Willy presentes en los momentos de mayor agobio como también en los de mayor felicidad, y que con sus palabras y risas hicieron más grato el trabajo diario.

A Manuel y Gabriel por la paciencia y disposición a ayudarme cada vez que lo necesité.

A mi apoyo y compañero incondicional en la vida, Rodrigo.

A los miembros de la comisión por sus aportes y orientación para que esta Tesis fuera llevada a cabo con éxito.

A mi familia y amigos de siempre.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Transportadores de monoaminas: aspectos generales, puntos de vista estructurales y funcionales.....	1
1.2. Serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT).....	2
1.2.1. Estructura química.....	2
1.2.2. Actividad de la 5-HT.....	3
1.2.3. Biosíntesis y metabolismo de 5-HT.....	4
1.3. El transportador de serotonina, SERT.....	6
1.3.1. Estructura y características generales.....	6
1.3.2. Localización de SERT.....	8
1.3.3. Regulación farmacológica de SERT.....	9
1.3.3.1. Inhibidor o bloqueador de transportadores.....	9
1.3.3.2. Mecanismo de acción.....	9
1.3.4. Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina, SSRIs.....	10
1.3.4.1. Unión ligando-transportador.....	11
1.4. Ensayo de actividad biológica frente a SERT.....	12
1.4.1. Ensayos de afinidad por desplazamiento de un radioligando, "Binding".....	12
1.4.2. Modelamiento molecular de SERT, "Docking".....	13
1.4.3. Bioensayo de letalidad en <i>Artemia Salina</i>	15
1.5. Hipótesis del trabajo.....	18
1.6. Objetivos.....	18
1.6.1. Objetivo general.....	18
1.6.2. Objetivos específicos.....	18
2. SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	19
2.1. Metodologías seguidas para las síntesis.....	19
2.1.1. Síntesis de Aminas, serie DFT.....	19
2.1.1.1. Método I: Aminación reductiva.....	20
2.1.1.2. Método II: Reacción libre de solvente.....	20
2.1.2. Síntesis de ésteres, serie DFTS.....	21
2.1.2.1. Método I: Utilizando piridina como solvente.....	21

2.1.2.2.	Método II: Utilizando trietilamina y acetato de etilo como solvente.....	22
2.2.	Ensayos de afinidad por desplazamiento de un radioligando.....	23
2.2.1.	Preparación de membranas desde corteza cerebral de ratas.....	23
2.2.2.	Ensayo de unión en SERT.....	24
2.3.	Estudios de modelamiento molecular de los compuestos sintetizados en SERT.....	24
2.4.	Bioensayo de letalidad en <i>Artemia Salina</i>	25
2.4.1.	Eclosión de los quistes.	25
2.4.2.	Pruebas de toxicidad.	25
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1.	Síntesis y datos espectroscópicos de los compuestos.....	26
3.2.	Síntesis de Aminas.....	26
3.2.1.	1,1-DFT.....	26
3.2.2.	1,3-DFT.....	27
3.2.3.	1,5-DFT.....	29
3.3.	Síntesis de ésteres.	30
3.3.1.	1,1-DFTS.....	30
3.3.2.	1,3-DFTS.....	32
3.3.3.	1,5-DFTS.....	34
3.4.	Afinidad de los compuestos sintetizados frente a SERT, Binding.	38
3.4.1.	Valores de IC ₅₀ obtenidos.....	38
3.4.2.	Curva dosis respuesta en SERT de DFTs y DFTSs sintetizadas.....	39
3.5.	Modelamiento molecular, Docking.....	40
3.5.1.	Comparación entre DFTs y DFTSs.....	40
3.6.	Bioensayo de letalidad en <i>Artemia salina</i>	49
4.	CONCLUSIONES.....	50
5.	REFERENCIAS.....	53
6.	ANEXO I.....	58
7.	ANEXO II.....	64
8.	ANEXO III.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura molecular de serotonina	2
Figura 2: Metabolismo de serotonina en células nerviosas.....	5
Figura 3: Transportador de serotonina, SERT	6
Figura 4: Información molecular y estructural de DAT, NET y SERT humanos.....	7
Figura 5: Estructura molecular de fluoxetina.....	11
Figura 6: Estructura molecular de escitalopram.....	11
Figura 7: Algunos inhibidores selectivos de la recaptura de serotoína, SSRIs.....	11
Figura 8: Modelo de SERT basado en la estructura de rayos-X de LEUT.....	14
Figura 9: DFTs y DFTSs ha sintetizar.	17
Figura 10: curva dosis respuesta en SERT de DFTs y DFTSs sintetizadas.....	39
Figura 11: A.- Modo de unión de paroxetina en la cavidad de entrada para SERT, B.- Modo de unión de 1,5-DFTS en la cavidad de entrada para SERT.	40
Figura 12: modelamiento molecular de 1,1-DFT en SERT.....	42
Figura 13: modelamiento molecular de 1,1-DFTS en SERT.....	43
Figura 14: modelamiento molecular de 1,3-DFT en SERT.....	44
Figura 15: modelamiento molecular de 1,3-DFTS en SERT.....	45
Figura 16: modelamiento molecular de 1,5-DFT en SERT.....	46
Figura 17: modelamiento molecular de 1,5-DFTS en SERT.....	47

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Aminación reductiva de cetonas. R= benceno, alquilbenceno.....	20
Esquema 2: Sistema libre de solvente. R= benceno, alquilbenceno.	21
Esquema 3: Síntesis de ácido, con piridina como solvente. R= benceno, alquilbenceno.....	21
Esquema 4: Síntesis de ácido, con trietilamina y acetato de etilo como solvente. R= benceno, alquilbenceno.	22
Esquema 5: Síntesis de ésteres mediante ruta con CDI. R= benceno, alquilbenceno.	23
Esquema 6: Síntesis de dibenzalacetona.	27
Esquema 7: Síntesis de 1,1-DFTS.	31
Esquema 8: Síntesis de 1,3-DFTS.	33
Esquema 9: Síntesis de 1,5-DFTS.	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: rendimientos obtenidos para síntesis de DFTs. Método I y II.....	37
Tabla 2: rendimientos obtenidos para síntesis de DFTSs. Método I y II.	38
Tabla 3: valores de IC ₅₀ obtenidos para cada derivado en ensayos de binding.	38
Tabla 4: resultados energéticos y residuos aminoacídicos involucrados en los Docking.....	41
Tabla 5: Tabla resumen de las energías y longitudes de enlace determinadas para cada molécula mediante docking.....	48
Tabla 6: Clasificación de los puentes de hidrógeno de acuerdo a algunas de sus propiedades. Desiraju and Thomas Steiner.....	48
Tabla 7: valores de CL ₅₀ para familia de DFTSs.	49

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS USADAS

Å: Ångstrom.

AcOEt: acetato de etilo.

DAT: Transportador de dopamina.

5-HT: Serotonina.

CCF: Cromatografía de capa fina.

CDI: carbodiimidazol.

CDCl₃: cloroformo deuterado.

CL₅₀: concentración letal media.

°C: grado centígrado.

C/Pd: carbono paladio (catalizador).

4-DMAP: 4-dimetilaminopiridina.

DCM: diclorometano.

DFTs: familia de aminas.

DFTSs: familias de ésteres.

DMSO: dimetilsulfóxido.

EtOH: etanol.

GABA: ácido gamma-aminobutírico.

HCl: ácido clorhídrico.

³H-paroxetina: paroxetina tritiada.

5-HIAA: ácido 5-hidroxi-indolacético.

Hz: Hertz

IBS: síndrome del colon irritable.

IBD: enfermedad inflamatoria del intestino.

IC₅₀: Concentración que inhibe el 50% de la unión.

IR: Inhibidor de recaptación.

kcal/mol: kilocalorías por mol.

K_i: constante de equilibrio inhibitoria.

LEUT: transportador de Leucina.

MAO: Monoamino oxidasa.

MeOH: metanol

MATs: Transportadores de monoaminas.

MS: Espectrometría de masa.

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido.

NaOH: hidróxido de sodio.

NET: Transportador de norepinefrina.

NMR-¹³C: Resonancia magnética nuclear de carbono 13.

NMR-¹H: Resonancia magnética nuclear de protones.

nM: nano molar

μM: micro molar

PM: peso molecular.

RL: radioligando.

SERT: Transportador de serotonina.

SLC6A4: gen humano para SERT.

SNC: Sistema nervioso central.

SNP: Sistema nervioso periférico.

SSRIs: Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina.

THF: tetrahidrofurano.

Tris: trisaminometano.

RESUMEN

El transportador de serotonina (SERT) se encuentra ampliamente distribuido tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el sistema nervioso periférico (SNP). Debido a su amplia distribución y relación con trastornos mentales y gastrointestinales es que ha sido centro de estudio desde hace ya varias décadas.

Los estudios realizados en este transportador en busca de tratamientos paliativos han revelado características estructurales, tipo de interacciones y funcionamiento tanto del mismo transportador como de moléculas que logran una efectiva unión con este. Dicha información ha permitido la creación y optimización de drogas que actúan inhibiendo SERT y por lo tanto son potenciales fármacos para el tratamiento de los trastornos derivados de su mal funcionamiento.

En el presente trabajo se propone investigar los diversos efectos que generan una serie de aminas (DFTs) y ésteres (DFTSs) derivados de triptamina sobre el transportador de serotonina, SERT.

Se sabe que algunas características estructurales de las moléculas, tales como el aumento de la riqueza de electrones de los anillos aromáticos, el tamaño global y los sustituyentes que componen estas moléculas, podrían mejorar o disminuir su potencia como inhibidor de SERT.

Se determinará la afinidad por SERT generada por esta serie de DFTs y DFTSs, y se buscarán relaciones estructura afinidad por el transportador. Esta evaluación guiará en el diseño racional y la búsqueda de futuros ligandos, que estructuralmente cumplan con los requisitos que determinan la unión selectiva o no selectiva por SERT.

SUMMARY

The serotonin transporter (SERT) is widely distributed in both the central nervous system (CNS) and the peripheral nervous system (PNS). Due to its wide distribution and relation with mental and gastrointestinal disorders that has been the focus of study for decades.

The studies performed on this transporter for the search of palliative treatments have revealed structural characteristics, types of interactions and functioning of both the transporter and molecules that achieve an effective junction with it. Such information has enabled the creation and optimization in the synthesis of drugs that act by inhibiting the serotonin transporter and therefore are potential drugs for the treatment of disorders derived from malfunctioning.

The proposal of this job is to investigate the different effects that are produced by a series of amines (DFTs) and esters (DFTSs) derived from tryptamine on the serotonin transporter (SERT)

It is known that some structural characteristics of the molecules, such as increasing the richness of electrons in aromatic rings, the global size and the substituents that compose this molecules, could improve or diminish its SERT inhibition potential.

The affinity for the serotonin transporter generated by this series of DFTs and DFTSs will be determined, and structure-affinity relations for the transporter will be searched. This evaluation will guide the rational design and the search for future ligands that can structurally fulfill the requirements that determine the selective or non-selective union for the serotonin transporter.

1. INTRODUCCIÓN

Desde los primeros trabajos de Langley y Ehrlich, hace más de un siglo, se ha demostrado que los neurotransmisores en general, y en particular los monoaminérgicos, ejercen sus acciones mediante la interacción con varios receptores y/o proteínas transportadoras presentes en las células (Maehle et al., 2002).

A pesar de que los receptores monoaminérgicos, sus enzimas catabólicas y proteínas transportadoras pertenecen a diferentes familias, con diversa funcionalidad, origen, genética y estructura, se pueden considerar, en conjunto, como receptores diana de neurotransmisores monoaminérgicos.

La interacción de las monoaminas con los receptores y transportadores diana se basa principalmente en la forma y complementariedad electrónica entre el ligando(s) y el(los) sitio(s) de unión(es) del receptor(es). Por lo tanto, parece razonable suponer que aquellas moléculas que estructuralmente sean semejantes, debieran tener ciertas similitudes, o al menos algo en común, en cuanto a respuesta por parte del receptor o transportador respectivo.

1.1. Transportadores de monoaminas: aspectos generales, puntos de vista estructurales y funcionales.

Los transportadores de monoaminas (MATs), son estructuras proteicas que funcionan como transportadores integrales de la membrana plasmática para regular las concentraciones de neurotransmisores monoaminérgicos, estos últimos son neurotransmisores y neuromoduladores que contienen un grupo amino y que derivan de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano.

Existen tres clases principales de MATs: SERT, DAT y NET, y son los responsables de la recaptación de sus neurotransmisores monoaminérgicos correspondientes: serotonina, dopamina y norepinefrina respectivamente. Los MATs están ubicados justo fuera de la hendidura sináptica (peri-

sinápticamente] transportando el exceso de neurotransmisores monoaminérgicos desde la hendidura sináptica devuelta hacia el citoplasma de la neurona presináptica (Torres et al., 2003). La regulación de los MATs ocurre generalmente a través de fosforilación y modificación postransduccional (Ramamoorthy et al., 1993).

Los efectos sinápticos de muchos aminoácidos y neurotransmisores monoaminérgicos, incluida la serotonina, son terminados por la unión de estas moléculas a proteínas específicas de transporte.

En las páginas siguientes, se presenta una revisión de la literatura que da apoyo a los estados antes mencionados tanto desde puntos de vista teórico como experimental. La propuesta y el correspondiente análisis de la literatura se centran en esta oportunidad en el transportador de serotonina, SERT.

1.2. Serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT).

1.2.1. Estructura química.

La Serotonina es un neurotransmisor, específicamente una amina aromática, perteneciente a la familia de las indolaminas que está compuesta de un anillo indol hidroxilado en la posición 5 y una cadena lateral etilamínica, como muestra la figura 1, que comenzó a ser apreciada a mediados de 1930 y caracterizada en 1955 por Page y sus colaboradores (Bumpus and Page, 1955; Gershon et al., 1965; Gershon and Ross, 1966).

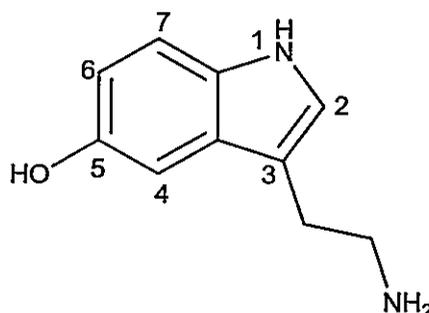


Figura 1: Estructura molecular de serotonina.

Se distribuye ampliamente entre plantas y animales, incluido el hombre y es liberada como consecuencia de diversos estímulos nerviosos, químicos y mecánicos (*Vazquez et al., 2002*).

En los mamíferos se localiza en mastocitos, células enterocromafinas y en plaquetas. En estas últimas es almacenada desde el plasma mediante un mecanismo de transporte activo (*Lorenzo Fernández et al., 2008*). Se sintetiza básicamente en dos zonas: a nivel central en los núcleos localizados en el tronco encefálico, y a nivel periférico en el sistema gastrointestinal (*Furness and Costa, 1982; Martel, 2006*).

1.2.2. Actividad de la 5-HT.

La 5-HT es un mediador clave en la señalización del sistema nervioso central (SNC) (*Raybould et al., 2003*) donde su papel interviene en la regulación de la vigilia, en el proceso activo del sueño (*Martel, 2006*), en los procesos motivacionales, regula la actividad sexual, el apetito, los ritmos circadianos, las funciones neuroendocrinas, la temperatura corporal, el dolor, la actividad motora, las funciones cognitivas, y desarrolla un rol importante en la regulación de los estados de ánimo que desencadenan la depresión (*Griebel, 1995; Jørgensen, 2007*). Este último punto se desarrolló a partir de las hipótesis de *Van Praag* en que "La disminución indolamínica sería responsable de la sintomatología depresiva" (*Van Praag, 1982, 1987*). Actualmente hay evidencias de que las conductas impulsivas se asocian a una disfunción del sistema serotoninérgico central (*Oquendo and Mann, 2000; Carver and Miller, 2006*), específicamente a una disminución generalizada de la actividad serotoninérgica (*Rees et al., 1997*).

Por otro lado la 5-HT en el tracto gastrointestinal ha sido el centro de interés de intensas investigaciones durante varias décadas, desde *Vialli y Erspamer* que en 1937 mostraron que el intestino es una importante fuente de 5-HT alcanzando más del 90% del total presente en el cuerpo (*Vialli and Erspamer, 1937; Erspamer and Asero, 1952*).

A nivel intestinal la 5-HT funciona como un neurotransmisor y una molécula de señalización paracrina. Desarrolla un papel importante regulando la proliferación de células epiteliales e

inhibiendo la absorción intestinal de monosacáridos y aminoácidos (*Arruebo et al., 1989; Salvador et al., 1997*). Se cree que la 5-HT está implicada además en patologías infecciosas e inflamatorias crónicas entre las cuales las más estudiadas han sido el síndrome del colon irritable (Irritable Bowel Syndrome, IBS) y la enfermedad intestinal inflamatoria crónica (Inflammatory Bowel Disease, IBD) (*Beattie and Smith, 2008*).

1.2.3. Biosíntesis y metabolismo de 5-HT.

En cuanto a su síntesis, descrita en la figura 2, la 5-HT es sintetizada mediante una ruta metabólica en la que intervienen dos enzimas: la triptófano-hidroxilasa, que cataliza la conversión del triptófano en 5-hidroxitriptófano (1); y la DOPA-descarboxilasa, que convierte el compuesto anterior en serotonina. La 5-HT puede almacenarse en vesículas (2) y/o liberarse (3). Una vez liberada, puede ocupar receptores postsinápticos (4), recaptarse (5), ocupar autorreceptores (6) o metabolizarse por la MAO mitocondrial (7), este último paso es la ruta catabólica principal para 5-HT y consiste en una desaminación oxidativa por la enzima monoaminoxidasa (MAO). La MAO convierte la serotonina en el intermediario 5-hidroxi indoleacetaldehído, el cual es oxidado por una aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ para formar ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) que es excretado mayormente en la orina. Cabe mencionar que cuando este sistema se satura, el producto intermedio se reduce en el hígado, produciendo 5-hidroxitriptofol, asimismo, en el sistema digestivo la serotonina también puede ser catabolizada por la glucoronil transferasa y otras enzimas intracelulares, al igual que la MAO y la aldehído-deshidrogenasa (*Fuller and Wong, 1977; Gershon and Tack, 2007*).

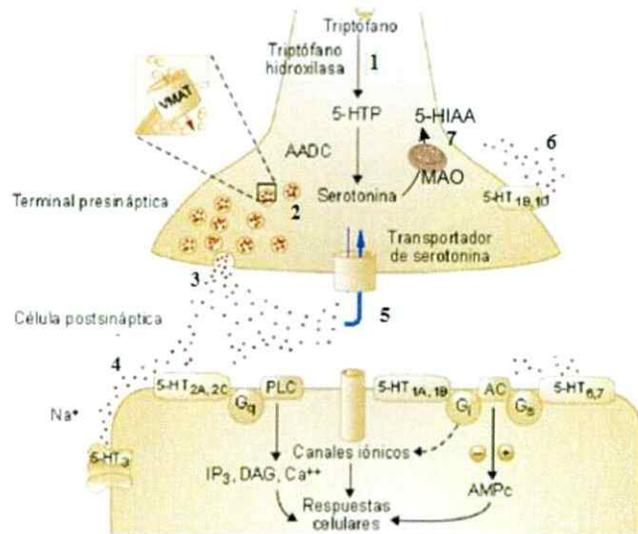


Figura 2: Metabolismo de serotonina en células nerviosas.

Un paso importante en la ruta metabólica de la 5-HT descrita anteriormente es su “recaptación”, esto porque uno de los problemas que enfrenta la transmisión neuronal es que se consumen altas cantidades de neurotransmisores que a las neuronas les cuesta fabricar. Es por ello que para hacer el proceso un poco más viable, una vez que la 5-HT es liberada al espacio intersináptico y ha ejercido su papel como neurotransmisor, es captada por otras proteínas de la sinapsis para su transporte a la neurona de la que fue liberada, que vuelve así a almacenarla (*Laborda, 2006*).

La recaptación es el mecanismo más importante para la finalización de la acción de la 5-HT y es realizada mediante un transportador de alta afinidad por 5-HT, conocido como transportador de serotonina (SERT). El papel de este transportador resulta de gran importancia para la finalización del metabolismo serotoninérgico pues la 5-HT al poseer una carga de disociación de ácido igual a 10, ésta se encuentra altamente cargada a pH fisiológico y no cruza las membranas plasmáticas sin la ayuda de este transportador (*Gershon, 2003*).

1.3.El transportador de serotonina, SERT.

1.3.1. Estructura y características generales.

Como ya se mencionó, la acción de la serotonina finaliza con la recaptación del neurotransmisor hacia la neurona serotoninérgica por medio de SERT mostrado en la figura 3 (Gershon et al., 1990).

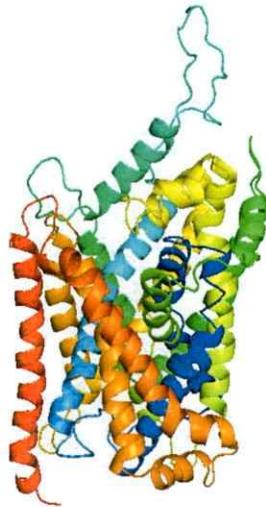


Figura 3: Transportador de serotonina, SERT.

Este transportador es una proteína de transmembrana localizada, entre otros, en la membrana neuronal presináptica, en células del epitelio intestinal (Wade et al., 1996; Bellini, 2003).

El conocimiento más detallado de este transportador se logró, en parte, gracias a la clonación de SERT que se realizó mediante el empleo de oligonucleótidos degenerados correspondientes a zonas de elevada similitud entre los transportadores de noradrenalina y GABA (Blakely et al., 1991, 1994; Hoffman et al., 1991). Las clonaciones realizadas permitieron establecer que los transportadores de dopamina (DAT), norepinefrina (NET) y SERT poseen 12 dominios transmembranas, visualizados en la figura 4, con 20 a 24 residuos hidrofóbicos. Además contiene cinco bucles intracelulares y 6 extracelulares cortos (Hoffman et al., 1991; Pacholczyk et al., 1991), que es dependiente de Na^+ , Cl^- y K^+ para el transporte de 5-HT al interior celular y además posee grupos

amino y carboxi-terminal intracelulares. Uno de los trabajos más importantes fue el desarrollado por Rammamoorthy y sus colaboradores en 1993, cuyos resultados han conducido a la clonación, expresión, y localización cromosómica de SERT humano.

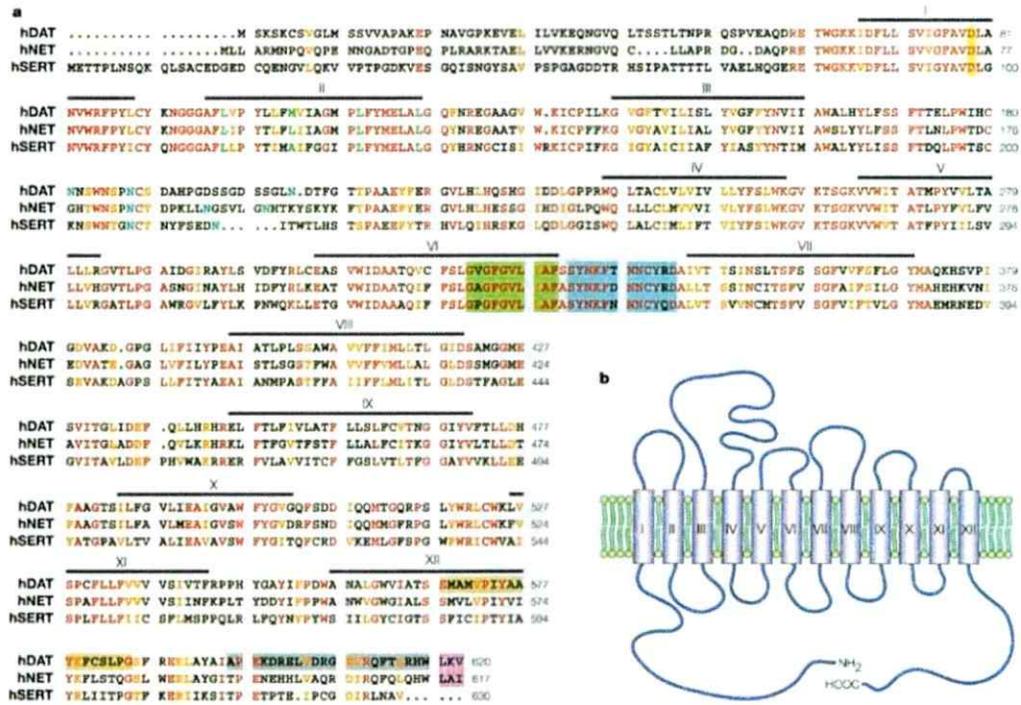


Figura 4: Información molecular y estructural de DAT, NET y SERT humanos. a) secuencia de aminoácidos de los transportadores. En rojo se indican los residuos conservados y en naranja los similares. b) Topología propuesta para los transportadores de monoaminas mostrando los 12 dominios transmembrana conectados por bucles intra y extracelulares. Tomado de Torres et al., 2003.

El gen humano para SERT (SLC6A4) da lugar a una proteína de 630 aminoácidos (*Íceta Echave, 2008*) y presenta una homología del 92% con la de rata (*Lesch et al., 1994*). Es debido a este alto porcentaje de homología que se han desarrollado diversos trabajos investigativos con ratas. Estos estudios en los cuales a las ratas se les ha manipulado genéticamente para que no expresen SERT (ratas knockouts) han permitido establecer la gran importancia que tiene SERT en el metabolismo de

5-HT, pues se ha observado que estas ratas muestran una elevación extracelular de 5-HT de hasta seis veces y una disminución marcada (60-80%) del contenido tisular de 5-HT en diversas regiones del cerebro (*Heils et al., 1998*). Estas notorias alteraciones indican que SERT es crucial en la homeostasis presináptica y que la recaptación dependerá en parte de la cantidad de transportadores presentes. Si hay muchos, estos captarán mucha 5-HT y la eliminarán rápidamente de la sinapsis. Si hay pocos, dejarán más tiempo para que la 5-HT actúe.

1.3.2. Localización de SERT.

La localización de SERT se ha demostrado a nivel central como periférico. En el SNC lo podemos encontrar en la corteza cerebral, cuerpos celulares, dendritas y a lo largo de los axones neuronales, concentrado en los botones terminales del núcleo del rafé mediano y dorsal, tálamo e hipocampo (*Ramamoorthy et al., 1993; Zhou et al., 1998; Torres et al., 2003*). En el SNP éste se encuentra en plaquetas, endotelio pulmonar, mastocitos, linfocitos y tracto gastrointestinal (*Balkovetz et al., 1989*). Además diversos estudios que han tratado de determinar la localización y funcionalidad de SERT han dado como resultado su localización en diversos tejidos de diferentes especies animales, detectándose por ejemplo en cerebro de ratón (*Chang et al., 1996*) y de mono (*Miller et al., 2001*), en placenta (*Ramamoorthy et al., 1993*) y en células cromafines adrenales humanas (*Wade et al., 1996*). Por otro lado, en bóvidos los resultados han mostrado que SERT se expresa además de la placenta y el cerebro, en médula ósea, riñón, corazón, hígado, glándula paratiroidea, intestino delgado, y páncreas (*Mortensen et al., 1999*).

Como se observa la expresión de SERT presenta una amplia distribución, sin embargo, su actividad ha sido estudiada fundamentalmente en el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal.

1.3.3. Regulación farmacológica de SERT.

1.3.3.1. Inhibidor o bloqueador de transportadores.

Un inhibidor de recaptación (IR), también conocido como bloqueador de transportadores, es una molécula que actúa inhibiendo la recaptación mediada por transportadores plasmáticos de un neurotransmisor, desde la sinapsis hacia la neurona presináptica, llevando a un incremento de concentraciones extracelulares del neurotransmisor y por lo tanto un aumento en la neurotransmisión.

Muchos fármacos utilizan la inhibición de la recaptación para ejercer sus efectos psicológicos y fisiológicos, incluyendo varios antidepresivos, ansiolíticos, estimulantes y anorexígenos, entre otros. La mayoría de los inhibidores de la recaptación, afectan a los neurotransmisores monoaminérgicos serotonina, norepinefrina y dopamina, sin embargo, también hay un número de medicamentos y moléculas de investigación que actúan como inhibidores de la recaptación para otros neurotransmisores, tales como adenosina, GABA, glutamato y los endocannabinoides (*Boissard and Gribkoff, 1993; West and Galloway, 1997; Pollack et al., 2005; Costa et al., 2006; Iversen, 2006*).

1.3.3.2. Mecanismo de acción.

Se cree que los IR estándares actúan simplemente como un sustrato competitivo que funciona ligándose directamente al transportador plasmático del neurotransmisor en cuestión (*Blakely et al., 1994; Ravna et al., 2003; Apparsundaram et al., 2008*).

Estos inhibidores ocupan el transportador en lugar del neurotransmisor respectivo, y lo bloquean competitivamente de ser transportado desde el terminal nervioso o sinapsis, hacia la neurona presináptica. Con dosis suficientemente altas de inhibidor, la ocupación del transportador alcanza incluso entre el 80-90%. A este nivel de inhibición, el transportador será considerablemente menos eficiente removiendo el exceso de neurotransmisores de las sinapsis, y esto causaría un incremento sustancial en las concentraciones extracelulares del neurotransmisor, y por lo tanto, un aumento en la neurotransmisión total. Alternativamente, algunos inhibidores de la recaptación se

ligan al sitio alostérico e inhiben la recaptación indirectamente y no competitivamente al ejercer su inhibición mediante la unión a sitios alostéricos vagamente caracterizados aún en los transportadores de monoaminas. Esta unión causaría cambios conformacionales en la proteína transportadora que modularía la afinidad de los sustratos por el sitio activo(Chen et al., 2005).

1.3.4. Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina, SSRIs.

Los SSRIs (por sus siglas en inglés, selective serotonin reuptake inhibitors) fueron descubiertos en los años 70 y aparecieron por primera vez en el mercado farmacéutico a mediados de los 80 (Lorenzo Fernández et al., 2008). Fueron la primera clase de fármacos psicotrópicos diseñados de manera programada, de origen sintético y los antidepresivos más usados en el mundo, estando dentro de los fármacos más prescritos para enfermedades neuropsiquiátricas (Murphy and Moya, 2011).

Los SSRIs ejercen su acción bloqueando SERT, lo que aumenta la concentración de 5-HT en el espacio sináptico. Esto llevaría a un aumento del tono serotoninérgico y a una regulación hacia abajo de los receptores serotoninérgicos post-sinápticos, que estarían relacionados al efecto terapéutico de estos fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento de los pacientes con trastorno de personalidad (Silva I et al., 2010). Múltiples estudios sugieren que la prescripción de este tipo de fármacos puede ser una estrategia efectiva para mejorar los síntomas de este trastorno (Bellino et al., 2008; Díaz-Marsá et al., 2008). Por tal motivo han sido propuestos como medicamentos de primera línea para el control de la ansiedad, la labilidad anímica, la agresividad impulsiva y las conductas de automutilación, entre otros trastornos ligados al sistema serotoninérgico (Soloff, 2000).

Entre los SSRIs más conocidos, la fluoxetina observada en la figura 5 fue el primer SSRI comercializado y es el prototipo del subgrupo de los inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (Lüllmann et al., 2010) y junto con el escitalopram, figura 6, parecen ser inhibidores alostéricos de la recaptación de serotonina, se ligarían al sitio alostérico, causando cambios conformacionales en la proteína transportadora, modulando así la afinidad de los sustratos por el sitio activo(Chen et al., 2005; Mansari et al., 2007).

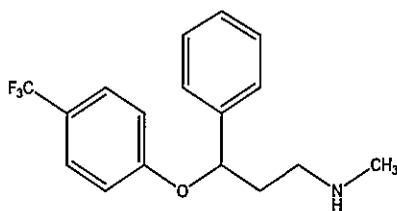


Figura 5: Estructura molecular de fluoxetina.

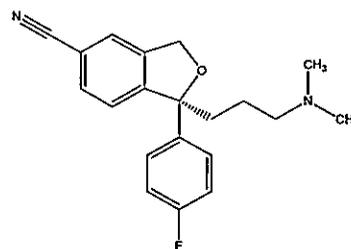


Figura 6: Estructura molecular de escitalopram.

La aparición de la fluoxetina dio paso al desarrollo de muchos otros psicofármacos que hasta la actualidad siguen siendo ampliamente recetados para el tratamiento tanto de los trastornos psicológicos como gastrointestinales, entre estos podemos encontrar la paroxetina, sertralina, fluvoxamina, trazodona, imipramina, entre otros, los cuales se pueden observar en la figura 7.

Cabe mencionar además que la cocaína y las anfetaminas son drogas psicoactivas que también inhiben a SERT (Nestler E, Hyman S, 2001).

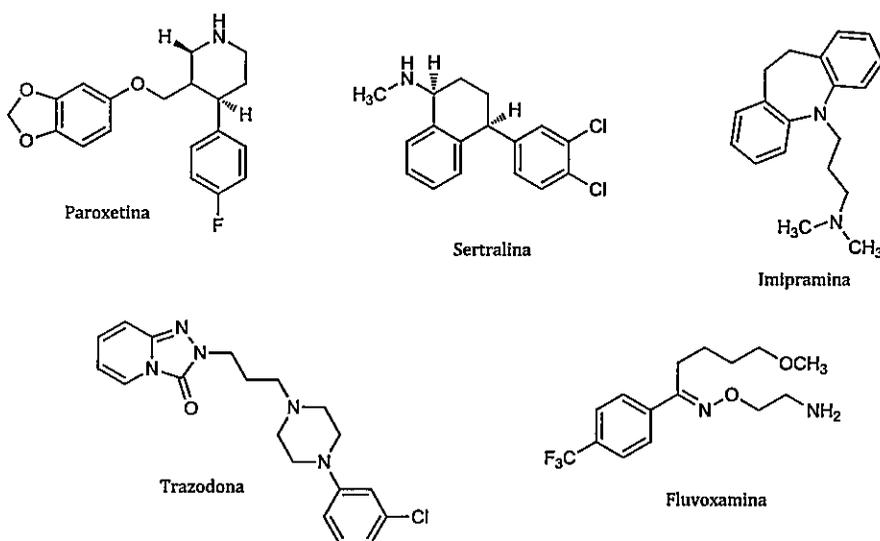


Figura 7: Algunos inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina, SSRIs.

1.3.4.1. Unión ligando-transportador.

El reconocimiento molecular por parte del transportador hacia el ligando (inhibidores) es un evento clave en la recaptación celular. La idea de que compuestos similares deben mostrar

actividades similares frente a cierto tipo de transportadores, se basa en la relación estructura-actividad, que asume que esta similitud radica en características no solo estructurales de las moléculas, sino también características estéricas (forma) y electrónicas (densidad de carga) lo cual claramente es crucial, pero no necesariamente suficiente, para garantizar las interacciones moleculares óptimas con un transportador diana específico y desencadenar así una respuesta biológica (Güner, 2000).

Para determinar la actividad de las moléculas potencialmente inhibitoras o bloqueadoras frente a SERT se realizan ensayos de desplazamiento de radioligando, mediante los cuales se determina la afinidad de una molécula específica por SERT, ensayo que se detalla a continuación.

1.4. Ensayo de actividad biológica frente a SERT.

1.4.1. Ensayos de afinidad por desplazamiento de un radioligando, "Binding".

La técnica de desplazamiento de radioligando es una herramienta muy utilizada para la obtención de información de un receptor y evaluar el efecto que provocan diversos agentes inhibidores y/o bloqueadores cuando estos impiden la interacción de un radioligando (RL) con el receptor. El RL es una droga marcada radioactivamente que se enlaza con el receptor de interés, representado en esta ocasión por SERT.

Los ensayos de desplazamiento de un RL se realizan para determinar la afinidad de un ligando (inhibidor) no marcado por un receptor. La afinidad es definida como la habilidad del ligando en estudio para competir con un ligando radioactivo conocido por la unión con un receptor, y de esta forma inhibir la unión de éste último. En estos experimentos, conocidos también como ensayos competitivos, la concentración del RL es fija, mientras la concentración del ligando no marcado es variada para evaluar la competencia por el sitio de unión del receptor. El parámetro de enlace obtenido a partir de este experimento es la concentración del ligando no marcado que desplaza el 50 % del enlace de RL, lo que se denomina como el valor de IC_{50} . La IC_{50} es influenciada por la concentración y la afinidad del radioligando por el receptor. Si la concentración del RL es muy alta, se

necesitarán concentraciones más altas del ligando no marcado para competir con él. Al mismo tiempo, la concentración no puede ser muy baja ya que los datos obtenidos podrían no ser suficientes para obtener datos confiables. El valor de IC_{50} puede ser convertido a K_i usando la ecuación de Cheng y Prusoff; ver ecuación 1, que es otra forma de evaluar el grado de inhibición.

$$K_i = IC_{50} / (1 + [RL] / KD)$$

Ecuación 1. Ecuación de Cheng y Prusoff donde IC_{50} es la concentración del ligando no marcado que inhibe el 50% de la unión del radioligando, $[RL]$ es la concentración del radioligando usado y KD es la afinidad del radioligando por el receptor.

Donde el valor de K_i es definido como la constante de equilibrio de la disociación para un inhibidor competitivo del receptor. En otras palabras, el valor de K_i para un ligando no marcado debería ser el mismo que el valor de KD obtenido usando la misma droga marcada. Si el valor de K_i es bajo, la afinidad del receptor por el ligando es alta (*Yung-Chi and Prusoff, 1973*).

1.4.2. Modelamiento molecular de SERT, "Docking".

El modelamiento molecular o Docking es un método computacional mediante el cual se predice la conformación que puede adquirir una molécula al unirse a otra para formar un complejo más estable. El conocimiento de la orientación preferida a su vez puede ser usada para predecir la fuerza de la asociación o la afinidad de enlace entre las moléculas (*Lengauer and Rarey, 1996*).

Para el desarrollo de un modelamiento molecular en una proteína se necesita conocer la estructura cristalina de esta. Lamentablemente, y a pesar que los estudios en los MATs se vienen realizando hace ya varios años, la estructura cristalina de SERT aún no ha podido ser cristalizada, es por esta razón que los estudios se han llevado a cabo utilizando una estructura cristalina de alta homología como lo es la estructura del transportador de Leucina, LEUT (*Jarończyk et al., 2012*). Gracias a estos estudios se ha conocido por ejemplo que la cavidad de SERT presenta dos modelos



conformacionales, el primero (figura 8a) cuando el transportador está cerrado en ambos sitios de la membrana (conformación ocluida) y un segundo de conformación abierta (figura 8b).

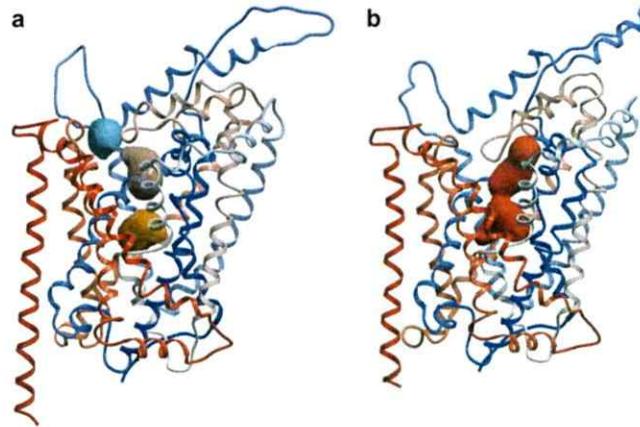


Figura 8: Modelo de SERT basado en la estructura de rayos-X de complejo LEUT con leucina (a) y triptófano (b) (PDB-id: 2A65, PDB-id: 3F3A). (a) Conformación ocluida, (b) conformación abierta. Imagen tomada de Jaronczyk. M et al., 2012.

Los modelos generados han permitido varios estudios de acomodamiento y dinámica molecular que han facilitado el desarrollo de nuevos ligandos para SERT con mayor selectividad por este transportador, así como también han permitido de cierta forma determinar con anterioridad qué tipos de interacciones serían las más probables al momento de interactuar el ligando con transportador.

Un ensayo complementario a los ensayos de desplazamiento de radioligando y modelamiento molecular, es el realizado para determinar la toxicidad de moléculas. Este tipo de ensayo se realiza para determinar la toxicidad de cada una de las moléculas que a su vez servirá para visualizar la ventana de trabajo (concentraciones) que tendrían cada una al momento de trabajar con ellas. Este bioensayo se desarrolla a partir de quistes de *Artemia salina*, pequeño crustáceo que habita y conforma el plancton de aguas salobres e hipersalinas de todo el mundo y que se visualiza en la imagen 1.



Imagen 1: *Artemia salina*, imagen tomada desde www.sciencesediment.com.

1.4.3. Bioensayo de letalidad en *Artemia Salina*.

Este tipo de bioensayo fue desarrollado en 1982 por Meyer y col. Consiste en exponer a cierto número de larvas de *Artemia salina* a determinados compuestos “activos” para determinar así valores de concentración letal media, concentración que provoca la muerte del 50% de las *Artemias salinas* (CL₅₀).

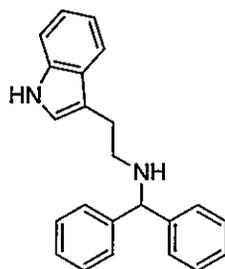
Si bien estos valores son indicadores de toxicidad a nivel celular y pueden orientar investigaciones más específicas, no advierten una actividad fisiológica o biológica en particular (Sánchez y Neira., 2005).

Una de las ventajas de este tipo de ensayos es la facilidad de adquisición y manipulación de larvas de *Artemia salina*, además de ser aplicable a compuestos de variadas estructuras y actividades diversas, lo que le otorga la característica de ser de amplio espectro (Sánchez y Neira., 2005).

Hasta aquí se ha descrito la importancia que tienen los SSRI y el cómo actúan estos sobre SERT, así como también la importancia que tienen sobre el sistema serotoninérgico y sus trastornos en general, por lo cual se está en condiciones de entender el porqué del interés actual en desarrollar nuevas drogas que permitan el control de estas patologías.

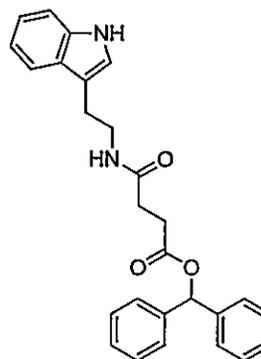
Es por lo anterior que en el presente trabajo se propone establecer qué tipo de respuestas inhibitorias frente a SERT generarán un grupo de moléculas constituido por aminas (DFTs) y ésteres (DFTSs) derivados de triptamina, y a partir de estos resultados guiar el diseño racional de síntesis de futuras moléculas que generen mejores resultados. Esperamos que este análisis pueda revelar características físico-químicas de las moléculas, que serían necesarias al momento de decidir cuál resultaría ser un mejor inhibidor de SERT.

Como primer paso para el desarrollo de estos objetivos, se sintetizarán 6 moléculas de las cuales 3 serán aminas y 3 serán ésteres, estas moléculas descritas en la figura 9 se diferenciarán entre sí en el largo de la cadena alquílica que separa los anillos aromáticos y en el largo de la cadena que las une a la triptamina y que hipotéticamente actuarían como inhibidores. Posteriormente se realizarán estudios basados en la respuesta de SERT frente a concentraciones variadas de estos inhibidores y se determinará así los IC_{50} , que finalmente llevará a identificar si efectivamente están actuando como inhibidores y si es así cuál es el mejor inhibidor.



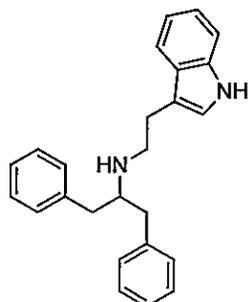
N-bencidril-2-(1*H*-indol-3-il)etanamina.

1,1-DFT



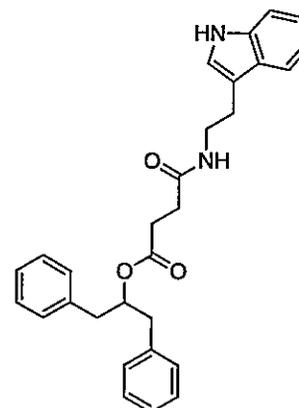
bencidril 4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-4-oxobutanoato.

1,1-DFTS



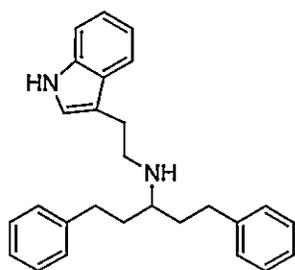
N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-1,3-difenilpropan-2-amina.

1,3-DFT



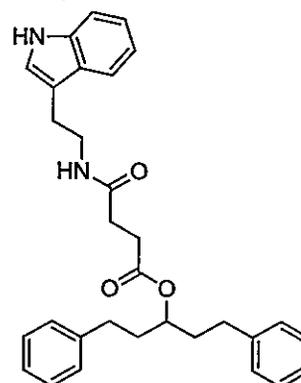
1,3-difenilpropan-2-il-4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-4-oxobutanoato.

1,3-DFTS



N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-1,5-difenilpentan-3-amina.

1,5-DFT



1,5-difenilpentan-3-il-4-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)amino)-4-oxobutanoato.

1,5-DFTS

Figura 9: DFTs y DFTSs ha sintetizar.

1.5. Hipótesis del trabajo.

Las aminas y los ésteres sintetizados se comportarán como inhibidores frente a SERT y mostrarán variados valores de IC₅₀. Las similitudes o diferencias en estos valores tendrán su explicación en el tamaño, largo y la densidad electrónica que poseen estas moléculas.

1.6. Objetivos.

1.6.1. Objetivo general

Sintetizar 6 moléculas, 3 aminas y 3 ésteres, de los cuales se espera obtener buenos rendimientos y pureza, y posteriormente realizar ensayos *in vitro* que permitan comparar su potencia como inhibidores de SERT, respecto a valores de IC₅₀ medidos para cada una de ellas.

Se espera que las moléculas que contengan mayor densidad electrónica debido a múltiples anillos aromáticos, cadenas carbonadas y grupos funcionales, generen mejores respuestas inhibitorias.

1.6.2. Objetivos específicos

- Realizar una metodología de síntesis que permita obtener las moléculas con un alto grado de rendimiento y pureza.
- Alargar la cadena de las aminas (DFTs) para formar ésteres (DFTSs).
- Establecer si se producen diferencias en el grado de reconocimiento por parte de SERT y su inhibición entre DFTs y DFTSs.
- Establecer qué tipo de estructuras generan un mejor reconocimiento por parte de SERT.
- Realizar ensayos de desplazamiento de radioligando (binding).
- Realizar modelamientos moleculares (docking).
- Afinar el análisis teórico original y establecer posibles futuras nuevas estructuras que generen un mejor reconocimiento por parte de SERT.

2. SECCIÓN EXPERIMENTAL

Las aminas y los ésteres se sintetizaron a partir de 4 moléculas base: benzofenona, 1,3-difenil-2-propanona, benzaldehído y triptamina. Todas adquiridas comercialmente en Merck.

Además se utilizaron los siguientes solventes: diclorometano, etanol, metanol, acetato de etilo, acetona, hexano y tetrahidrofurano, adquiridos en Merck.

Entre los reactivos usados se encuentran: anhídrido succínico, carbodiimidazol, carbono/paladio, 4-dimetilaminopiridina, ácido clorhídrico 97%, hidróxido de sodio, trietilamina, piridina, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, $^3\text{[H]}$ -paroxetina, fluoxetina, polietilenimina, borohidruro de sodio y cianoborohidruro de sodio.

Las reacciones y las mezclas de productos fueron rutinariamente monitoreadas por cromatografía en capa fina (CCF) de gel de sílice 60-F₂₅₄ Merck y fueron visualizadas con luz ultravioleta y reactivo de Dragendorff. Los valores de punto de fusión fueron obtenidos con un aparato con platina de Kofler.

Los espectros de NMR- ^1H fueron registrados usando espectrómetro Bruker AMX 400 a 400 MHz, y los de NMR- ^{13}C en el mismo equipo a 100 MHz, usando TMS como patrón interno.

La espectrometría de masa (MS, por sus siglas en inglés) se realizó en un espectrómetro de masa de tipo electrospray-trampa iónica ESI-IT Esquire 4000 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). El control del espectrómetro se realizó a través del programa esquire Control 5.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

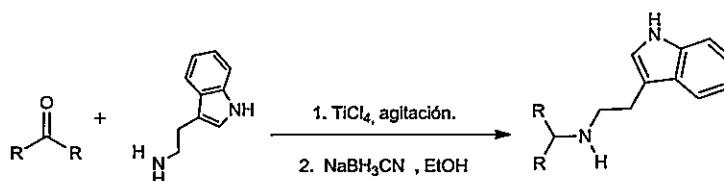
2.1. Metodologías seguidas para las síntesis.

2.1.1. Síntesis de Aminas, serie DFT.

La obtención de las aminas 1,1-DFT, 1,3-DFT y 1,5-DFT de la figura 9 se realizó a partir de cetonas y probando dos metodologías, las cuales son descritas a continuación.

2.1.1.1. Método I: Aminación reductiva.

La aminación reductiva es con frecuencia el método más utilizado para la síntesis de aminas a partir de aldehídos y cetonas. Los agentes reductores utilizados con más frecuencia para este tipo de reacciones son los donantes de hidruro, generalmente borohidruro y cianoborohidruro de sodio (NaBH_4 , NaBH_3CN). Se realizaron aminaciones reductivas de cetonas utilizando NaBH_3CN junto con cloruro de titanio IV (TiCl_4). En una síntesis convencional, la aminación reductiva de cetonas usando TiCl_4 y NaBH_3CN requiere 2 equivalentes de amina. La aminación se llevó a cabo en dos pasos (esquema 1). Primero se añadió el TiCl_4 y triptamina a la cetona a 0°C , dejando reaccionar unos minutos bajo agitación y hasta que alcanzó la temperatura ambiente, posteriormente se añadió NaBH_3CN en etanol y se dejó reaccionar bajo reflujo por unos minutos más siguiendo la reacción mediante CCF (*Rahman et al., 2004*).

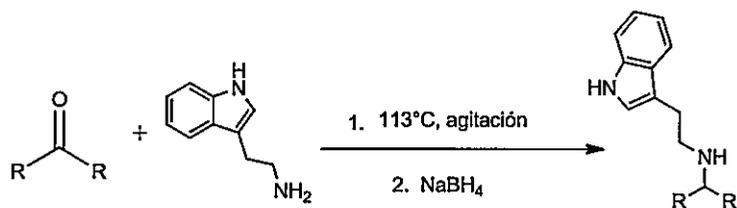


Esquema 1: Aminación reductiva de cetonas. R= benceno, alquilbenceno.

2.1.1.2. Método II: Reacción libre de solvente.

Esta metodología consiste en llevar a su punto de fusión al reactivo que mayor lo tenga entre la cetona y la triptamina, para esto se hace uso de un sistema que genere el calor necesario y a medida que se alcanza el punto de fusión se añade lentamente el segundo reactivo, se genera así el ion iminio el cual da origen a la amina mediante la reducción con NaBH_4 . Con todas las cetonas el reactivo que se fusionó fue la triptamina y las cetonas, algunas en estado sólido y las otras en estado líquido, se añadieron lentamente y bajo constante agitación. Luego de transcurridas 2 horas se añadió NaBH_4 disuelto en un mínimo de etanol (esquema 2).

La reacción es seguida por CCF y finaliza luego de unos minutos.



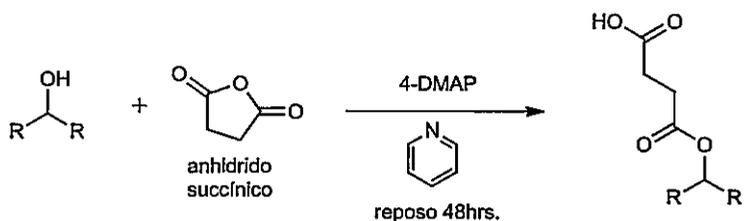
Esquema 2: Sistema libre de solvente. R= benceno, alquilbenceno.

2.1.2. Síntesis de ésteres, serie DFTS.

La síntesis de los ésteres 1,1-DFTS, 1,3-DFTS y 1,5-DFTS de la figura 9 se realiza a partir de alcoholes y mediante dos metodologías, la cuales consisten en que a partir del alcohol (obtenido de la reducción de las cetonas) y anhídrido succínico se obtiene un ácido carboxílico que al reaccionar con la triptamina dará los ésteres correspondientes.

2.1.2.1. Método I: Utilizando piridina como solvente.

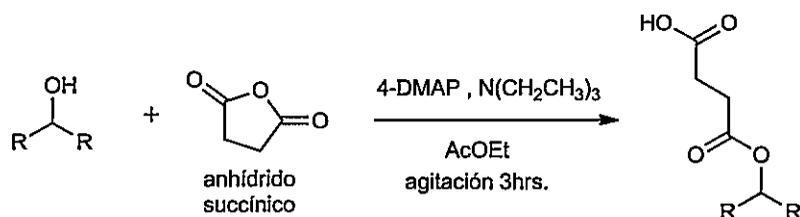
Esta metodología consiste en hacer reaccionar el alcohol con el anhídrido succínico disueltos en piridina y adicionar una cierta cantidad de 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP), dejando la solución en reposo durante 2 días (esquema 3). Luego de este período se destila el solvente y el producto se recoge en acetato de etilo, se lava con una solución de bicarbonato de sodio, luego con salmuera y se seca con sulfato de sodio Na_2SO_4 , se filtra y el solvente se evapora bajo presión reducida hasta sequedad (Miyano *et al.*, 1988).



Esquema 3: Síntesis de ácido, con piridina como solvente. R = benceno, alquilbenceno.

2.1.2.2. Método II: Utilizando trietilamina y acetato de etilo como solvente.

Esta metodología consiste en disolver el alcohol en acetato de etilo seco, luego agitando vigorosamente se le añade el anhídrido succínico, la trietilamina y la 4-DMAP. Este sistema se coloca bajo reflujo utilizando un refrigerante con válvula de CaCl₂, y se mantiene bajo estas condiciones durante unas pocas horas hasta que la reacción se completa (esquema 4). Una vez terminada la reacción esta se enfría a temperatura ambiente y se lava la solución obtenida con una solución diluida de ácido clorhídrico, se separan las fases y la fase orgánica se lava con agua, se seca con sulfato de sodio Na₂SO₄, se filtra y es evaporada bajo presión reducida hasta sequedad (Puricelli, 1999).

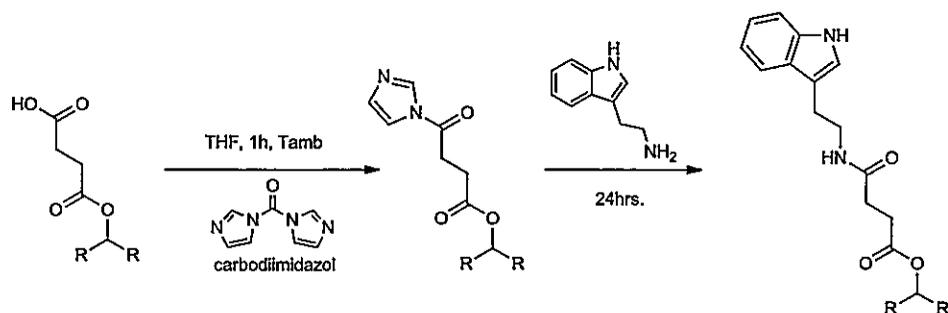


Esquema 4: Síntesis de ácido, con trietilamina y acetato de etilo como solvente. R = benceno, alquilbenceno.

Una vez obtenido el ácido carboxílico, se procede a la obtención del éster final mediante la reacción con triptamina. Esta reacción se lleva a cabo mediante la siguiente metodología.

Ruta con carbodiimidazol, CDI.

La amidación del ácido se inicia mediante la reacción con 1,1-carbodiimidazol en THF seco y a temperatura ambiente durante 1 hora, la imidazolida intermedia formada se hace reaccionar luego con la triptamina por 24 hrs para dar los ésteres requeridos (esquema 5) los cuales son extraídos al lavar la solución con agua y acetato de etilo, la fase orgánica es secada con NaSO₄ y el solvente es evaporado bajo presión reducida (Bu et al, 2001).



Esquema 5: Síntesis de ésteres mediante ruta con CDI. R= benceno, alquibenceno.

2.2. Ensayos de afinidad por desplazamiento de un radioligando (Binding).

2.2.1. Preparación de membranas desde corteza cerebral de ratas.

En estos experimentos fueron utilizadas ratas Sprague Dawley de alrededor de 2 meses de edad, de ambos sexos, obtenidas desde el bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki y con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio adoptada y promulgada por los Institutos Nacionales de Salud, de la Universidad de Chile y de la Universidad de Santiago de Chile.

Las ratas se sacrificaron por decapitación con guillotina sin anestesia, método aprobado por el comité de la Universidad de Emory para el uso y cuidado de animales.

Una vez decapitadas las ratas sus cortezas se diseccionaron rápidamente y se homogeneizaron en 10 mL de sacarosa 0,32 M fría, pH 7,4, en un homogeneizador de tejidos Potter-Elvehjem de teflón-vidrio. Los homogeneizados de corteza se centrifugaron a 1000 g (3500 rpm, rotor Ja-21 de centrifugadora Beckman J2-21) durante 20 min a 4°C obteniendo así el pellet p1. El sobrenadante obtenido se vuelve a centrifugar a 12000 g durante 20 min para producir el pellet sinaptosomal crudo p2 (Gray and Whittaker, 1961). A continuación las membranas sinaptosomales fueron repartidas quedando muestras con 100 mg cada una las cuales se almacenaron a -80°C hasta su uso en los experimentos de unión.

2.2.2. Ensayo de unión en SERT.

Para realizar los ensayos de desplazamiento de radioligando se utilizaron los pellets p2, los cuales una vez descongelados fueron resuspendidos en 10 mL del siguiente buffer: NaCl 120 mM, KCl 5 mM y Tris-HCl 50 mM, pH 7,4.

En una placa Elisa de 96 pocillos se distribuyeron por triplicado las muestras de total de RL ($^3\text{[H]}$ -paroxetina 1 nM), las de RL mas droga inespecífica (Fluoxetina $0,5 \times 10^{-3} \text{M}$) y las drogas sintetizadas a diferentes concentraciones ($2,5 \times 10^{-10}$ - $2,5 \times 10^{-5} \text{M}$). Para el total (T) de RL se utilizaron 100 μL de membrana, 100 μL de buffer y 50 μL de RL. Para la unión inespecífica se utilizaron 100 μL de membrana, 100 μL de Fluoxetina y 50 μL de RL. Para las drogas sintetizadas se utilizaron 100 μL de membrana, 100 μL de las diferentes concentraciones de drogas y 50 μL de RL, una vez completa la placa Elisa esta fue llevada a incubación a 27°C por 60 min.

Terminada la incubación, las muestras fueron traspasadas a una nueva placa con filtros de fibra de vidrio GF/C previamente empapados con 200 μL de polietilenimina 1%, fueron filtradas al vacío y lavadas de 7 a 9 veces con 200 μL de buffer frío. Una vez secos los filtros, estos fueron extraídos y la radioactividad retenida en las membranas es medida en un contador de centelleo Beckmann con 150 μL de líquido de centelleo.

Los datos obtenidos se representan como logaritmo de la concentración vs al porcentaje de unión específica y son analizados con GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) versión 5.0. Los valores de IC_{50} se calculan a partir de cada uno de los experimentos de competición de las muestras por triplicado, utilizando 6 concentraciones diferentes de medicamentos disueltos y diluidos en el buffer de ensayo.

2.3. Estudios de modelamiento molecular de los compuestos sintetizados en SERT

(Docking).

Los átomos de hidrógeno de la proteína transportadora SERT fueron introducidos en los modelos usando Autodocktools y las estructuras de las 6 moléculas sintetizadas fueron dibujadas, optimizadas y cargadas en el programa Spartan10. Los mapas de grilla fueron calculados usando la

opción autogrid4 y fueron centradas en el sitio de unión del transportador. Los volúmenes escogidos para los mapas de grilla fueron construidos de 40 x 40 x 40 puntos con un espaciamento de 0,375 Å. Para realizar los estudios de modelamiento molecular se utilizó el programa Autodock 4.0 usando el Algoritmo Genético Lamarckiano. La visualización de las moléculas acopladas se realizó en el programa PyMOL 1.2.

2.4. Bioensayo de letalidad en *Artemia Salina*.

2.4.1. Eclosión de los quistes.

La eclosión de las larvas de *Artemia salina* se realizó preparando un medio de cultivo a base de sal de mar artificial (sal Instant Ocean®) 30 g de sal/L de agua, al cual posteriormente se agregaron los huevos de *Artemia salina*. Este medio se dejó bajo constante burbujeo de oxígeno, a una temperatura controlada de 25±3 °C y bajo un período de luz/oscuridad controlada utilizando una fuente de luz artificial programada.

La eclosión de las larvas se observó luego de 72 horas después de las cuales se procedió a su utilización en los bioensayos de toxicidad.

2.4.2. Pruebas de toxicidad.

Las pruebas de toxicidad se realizaron en placas multipocillo (Multiwell®), consistiendo cada prueba en el ensayo de seis concentraciones crecientes (1×10^{-3} - 1×10^{-8}) de la familia de DFTS y dos grupo control, uno solo con agua salina y otro con DMSO, realizando cada ensayo por triplicado.

Cada pocillo contenía un volumen total de 1 mL, consistente en agua marina artificial (Instant Ocean®) y DMSO, en el caso de los grupos control, y una solución de 950 µL de agua marina más 50 µL de droga, para cada una de las concentraciones ensayadas. Para la determinación de la CL₅₀ se utilizaron 11 larvas de *Artemia salina* por pocillo. El tiempo de exposición fue de 24 h. Culminado este, se contaron las larvas vivas y muertas y se procedió a determinar las concentraciones letales CL₅₀ correspondiente a cada droga utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) versión 5.0.

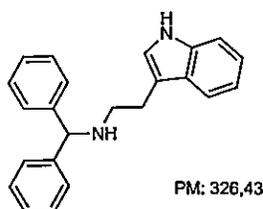
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntesis y datos espectroscópicos de los compuestos.

Las metodologías de síntesis descritas a continuación son las que presentaron mayor rendimiento, sin embargo, más adelante se detalla a modo de resumen todos los rendimientos obtenidos tanto para DFTs y DFTSs por ambas metodologías.

3.2. Síntesis de Aminas.

3.2.1. 1,1-DFT.



Se colocan 100 mg ($5,5 \times 10^{-4}$ mol) de benzofenona (182,217 g/mol) y 150 mg ($9,4 \times 10^{-4}$ mol) de triptamina (160,2157 g/mol) en un vial, el sistema se calientan hasta los 113-114 °C con la ayuda de un baño de vaselina y se deja bajo constante agitación mediante un agitador magnético por 3 horas, durante las cuales la reacción es seguida mediante CCF.

Al término de la reacción se obtiene un aceite denso el cual fue disuelto en un mínimo volumen de EtOH (2 mL) y al cual se le añadieron poco a poco 20,8 mg de NaBH_4 (37,83 g/mol) hasta total disolución dejando reaccionar un par de horas más y siguiendo la reacción mediante CCF.

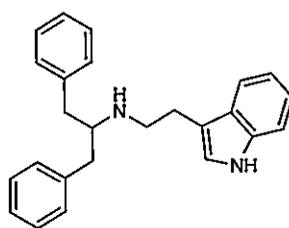
Las placas cromatográficas se eluyen con DCM/MeOH 2,5% y se corrobora la presencia de aminas con reactivo de Dragendorff.

La 1,1-DFT se aísla mediante cromatografía en columna de sílica gel utilizando como sistema eluyente DCM/ MeOH 2,5%, obteniendo como producto un aceite levemente amarillo de olor dulce con un rendimiento promedio de 51,43%. El producto es caracterizado mediante NMR- ^1H y NMR- ^{13}C [adjunto en anexo I] obteniendo las siguientes señales.

δ_H (400 MHz, $CDCl_3$): 1.724 (s, 1H), 2.906 (m, 2H), 2.974 (m, 2H), 4.189 (s, 1H), 6.875 (s, 1H), 7.070-7.352 (m, 13H), 7.559 (d, 1H, $J=7,9\text{Hz}$), 7.93 (s, 1H).

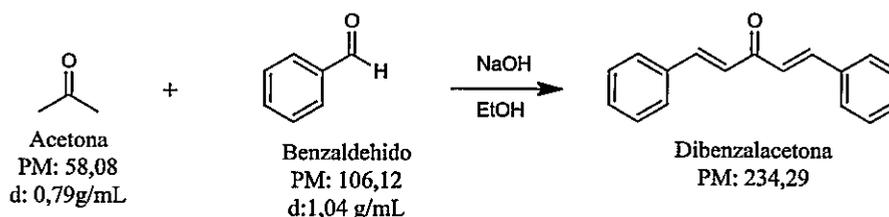
δ_C (100 MHz, $CDCl_3$): 26.34, 48.63, 67.91, 111.67, 114.38, 119.42, 119.67, 122.42, 122.48, 127.46, 127.83, 128.02, 128.98, 136.91, 144.75.

3.2.2. 1,3-DFT.



Esta molécula si bien fue sintetizada en múltiples ocasiones mediante el método I y con aparentemente un buen rendimiento $\sim 45\%$, no fue posible aislarla mediante columna cromatográfica. Al momento de desarrollar la cromatografía el compuesto se perdía, es decir, existe probablemente una descomposición de este con la sílica usada como fase estacionaria. Mediante la metodología II y luego de varias horas, tampoco se observó cambio alguno, no hubo formación de producto.

Para la obtención de la última DFT, la 1,5-DFT, es necesario primero sintetizar 1,5-difenil-3-pentanona a partir de dibenzalacetona, esta última se obtiene a partir de una condensación aldólica entre acetona y benzaldehído en exceso (Esquema 6).

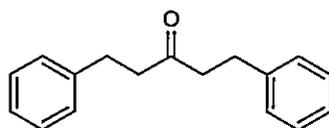


Esquema 6: Síntesis de dibenzalacetona.

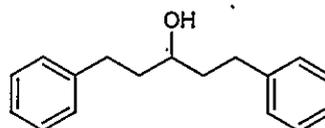
Para esto se disuelven 12 g de NaOH (39,997 g/mol) en 120 mL de agua y 90 mL de etanol. Por otro lado se mezclan 12,11 mL (0,12mol) de benzaldehído y 4,56 mL (0,06mol) de acetona y se agitan hasta obtener una solución homogénea. Se añade la mitad de la solución de benzaldehído a la solución de NaOH con agitación constante. Se agita por 10 minutos y se añade la otra mitad del benzaldehído agitando por 30 minutos más. Se filtra el precipitado amarillo y se lava con una mezcla fría de EtOH/H₂O. La recristalización se realiza en EtOH 95% (Lopardi. L et al., 2012).

La dibenzalacetona obtenida es insoluble en agua y se presenta como cristales amarillos en forma de agujas, con un rendimiento del 95% y un punto de fusión de 110-111°C. Una vez obtenida se procede a su hidrogenación catalítica.

Hidrogenación catalítica de dibenzalacetona, obtención de 1,5-difenil-3-pentanona y 1,5-difenil-3-pentanol.



1,5-difenil-3-pentanona
PM: 238,32



1,5-difenil-3-pentanol
PM: 240,34

Se diluye 1 g (0,00427 mol) de dibenzalacetona en 80 mL de EtOH y se agregan 30 mg de C/Pd. La solución se hidrogena durante 24 h a 70 psi en un hidrogenador catalítico de Parr. El catalizador se elimina por filtración al vacío con celite, y la solución resultante es evaporada a sequedad bajo presión reducida. El producto se purifica por cromatografía en columna de sílica gel usando como eluyente un sistema hexano/AcOEt 15%.

De la hidrogenación catalítica se obtienen dos productos, la 1,5-difenil-3-pentanona que como ya se mencionó se utilizará para obtener la 1,5-DFT, y el 1,5-difenil-3-pentanol que se usará para la síntesis de 1,5-DFTS, ambos alcanzando un 50% de rendimiento. La 1,5-difenil-3-pentanona

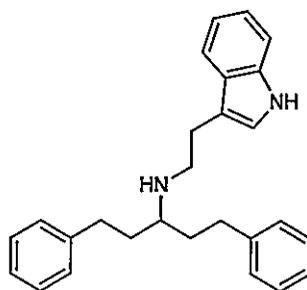
se obtiene como un aceite traslúcido y el 1,5-difenil-3-pentanol como cristales traslucidos en forma de agujas.

Ambos productos fueron caracterizados por NMR-¹H (adjuntos en anexo III) obteniendo las siguientes señales:

1,5-difenil-3-pentanona δ_H (400 MHz, CDCl₃): 2.609 (t, 2H), 2.827 (t, 2H), 7.107 (c, 3H), 7.212 (t, 2H).

1,5-difenil-3-pentanol δ_H (400 MHz, CDCl₃): 1.771 (m, 4H), 2.652 (m, 2H), 2.760 (m2H), 3.620 (q, 1H), 7.166 (d, 6H), 7.245 (t, 4H).

3.2.3. 1,5-DFT.



PM: 382,54

Se colocan 270 mg ($1,7 \times 10^{-4}$ mol) de triptamina (160,2157 g/mol) y 0,2 mL ($8,2 \times 10^{-4}$ mol) de 1,5-difenil-3-pentanona en un vial, el sistema se calienta hasta los 113-114 °C con la ayuda de un baño de vaselina y se deja bajo constante agitación mediante un agitador magnético por 3 horas, durante las cuales la reacción es seguida mediante CCF.

Al término de la reacción se obtiene un aceite denso el cual se disuelve en un mínimo volumen de MeOH (2 mL) y al cual se le añaden poco a poco 6,43 mg ($1,7 \times 10^{-4}$ mol) de NaBH₄ hasta total disolución, dejando reaccionar un par de horas más y siguiendo la reacción mediante CCF.

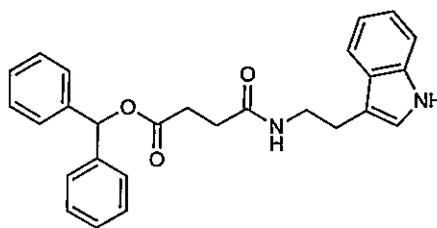
Las placas cromatográficas se eluyen con DCM/MeOH 2,5% y se corrobora la presencia de aminas con reactivo de Dragendorff.

La 1,5-DFT se aísla mediante cromatografía en columna de sílica gel utilizando como sistema eluyente DCM/ MeOH 5%, luego una segunda columna en donde el eluyente es acetona y finalmente cromatografía en placa preparativa utilizando un sistema eluyente DCM/MeOH 2,5%. El producto

obtenido es un aceite levemente amarillo y se obtiene con un rendimiento del 73,67 %. El producto es caracterizado mediante NMR-¹H y NMR-¹³C (adjunto en anexo I) obteniendo las siguientes señales. δ_H (400 MHz, CDCl₃): 1.725 (m, 4H), 1.85 (s, 1H), 2.53 (m, 5H), 2.94 (m, 4H), 7.00-7.24 (m, 13H), 7.33 (d, 1H, J= 8,2Hz), 7.62 (d, 1H, J= 9,9Hz), 8.078 (s, 1H). δ_C (100 MHz, DMSO): 25.86, 31.26, 35.40, 46.67, 55.40, 111.33, 112.65, 118.10, 118.28, 120.80, 122.65, 125.44, 127.27, 128.15, 128.21, 136.29, 142.49.

3.3. Síntesis de ésteres.

3.3.1. 1,1-DFTS.



PM: 426,51

Etapa I: síntesis de ácido 4-(bencidriloxi)-4-oxobutanoico a partir de bencidrol.

El bencidrol se obtiene mediante la reducción de benzofenona con NaBH₄ bajo reflujo y metanol como solvente.

Una vez obtenido el bencidrol se disuelve 1 g (5,4x10⁻³mol) de este en 100 mL de AcOEt, luego se agrega 1mL de trietilamina, 42 mg de 4-DMAPy 1,08 g (0,01 mol) de anhídrido succínico. Este sistema se pone bajo reflujo utilizando una trampa de CaCl₂ y se mantiene bajo agitación constante a una temperatura de 80 °C hasta que la reacción se complete, lo cual se sigue por CCF y ocurre luego de 3 hrs.

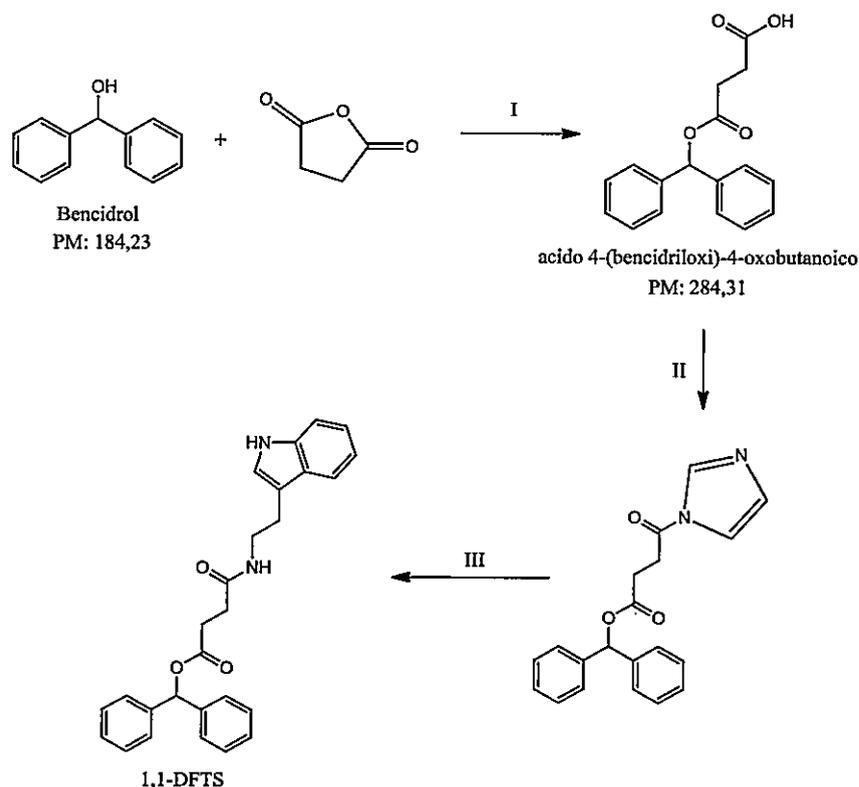
Una vez finalizada la reacción, la solución se enfría a temperatura ambiente y se lava con una solución de HCl al 2% y luego con 100 mL de agua, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y es evaporada a sequedad bajo presión reducida.

El ácido se obtiene con un rendimiento del 95% y es aislado por cromatografía en columna sílica gel utilizando DCM como eluyente.

Etapa II: Síntesis de 1,1-DFTS a partir de ácido 4-(bencidriloxi)-4-oxobutanoico.

Se disuelven 95mg ($3,3 \times 10^{-3}$ mol) de ácido 4-(bencidriloxi)-4-oxobutanoico y 599 mg ($3,7 \times 10^{-3}$ mol) de carbodiimidazol en 10 mL de THF seco, la solución se deja bajo agitación y a temperatura ambiente durante 2h luego de las cuales se agregan 560 mg ($3,5 \times 10^{-3}$ mol) de triptamina, y se deja reaccionar en iguales condiciones por 24 hrs. Finalizada la reacción se agregan 50 mL de agua y se extrae con AcOEt, la fase orgánica es secada con sulfato de sodio anhidro y el solvente es evaporado bajo presión reducida.

Ambas etapas son descritas en el esquema 7.

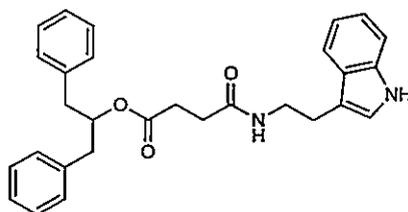


I: Et₃N, 4-DMAP, AcOEt, reflujo, 3h. 95% II: CDI, THF_{seco}, 1h. III: Triptamina, 24h.

Esquema 7: Síntesis de 1,1-DFTS.

La 1,1-DFTS es aislada por cromatografía en columna de silica gel utilizando un sistema eluyente de DCM/MeOH 5% con un rendimiento del 75% y se obtiene un aceite denso de color amarillo. El producto es caracterizado mediante NMR-¹H y NMR-¹³C (adjunto en anexo I) obteniendo las siguientes señales. δ_H (400 MHz, CDCl₃): 2.26 (m, 2H), 2.65 (t, 2H, J= 6,9Hz), 2.77 (t, 2H, J= 6,8Hz), 3.41 (q, 2H, J= 6,6Hz), 5.80 (t, 1H, J= 5,6Hz), 6.73 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 7.00 (t, 1H, J= 7,2Hz), 7.01 (t, 1H, J= 7,4Hz), 7.44(d, 1H, J= 8,3Hz), 8.53 (s, 1H). δ_C (100 MHz, CDCl₃): 25.69, 30.39, 31.36, 40.50, 77.42, 111.97, 112.99, 119.09, 119.75, 122.44, 122.88, 127.56, 127.88, 128.48, 129.06, 137.00, 140.62, 171.87, 172.58. Se adjunta además su espectro de masas en anexo II.

3.3.2. 1,3-DFTS.



PM: 454,56

Etapas I: síntesis de ácido 4-((1,3-difenilpropan-2-il)oxi)-4-oxobutanoico a partir de 1,3-difenil-2-propanol.

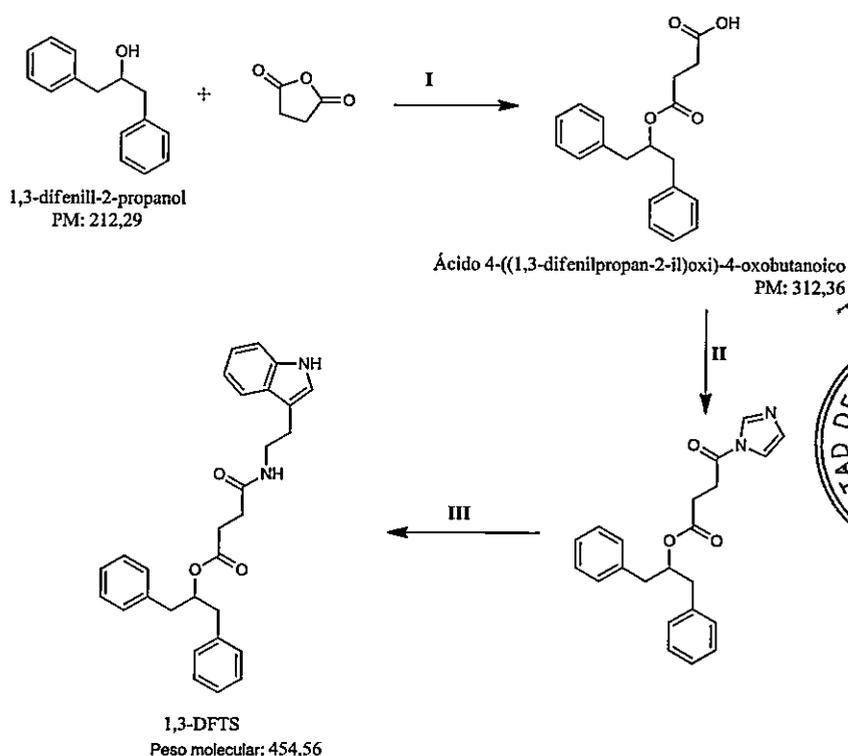
Se disuelven 500 mg ($2,4 \times 10^{-3}$ mol) de 1,3-difenil-2-propanol en 50 mL de AcOEt seco, luego se agregan 0,67 mL de trietilamina, 21 mg de 4-DMAP y 0,50 g ($5,0 \times 10^{-3}$ mol) de anhídrido succínico. Este sistema se pone bajo reflujo utilizando una trampa de CaCl₂ y se mantiene bajo agitación constante a una temperatura de 80 °C hasta que la reacción se complete, lo cual se sigue por CCF y ocurre luego de 3 hrs.

Una vez finalizada la reacción, la solución se enfría a temperatura ambiente y se lava con una solución de HCl al 2% y luego con 100 mL de agua, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y es evaporada a sequedad bajo presión reducida.

El ácido se obtiene con un rendimiento del 87,5% y es aislado por cromatografía en columna silica gel utilizando DCM como eluyente.

Etapa II: síntesis de 1,3-DFTS a partir de ácido 4-((1,3-difenilpropan-2-il)oxi)-4-oxobutanoico.

Se disuelven 430 mg ($1,4 \times 10^{-3}$ mol) de ácido 4-((1,3-difenilpropan-2-il)oxi)-4-oxobutanoico y 227 mg ($1,4 \times 10^{-3}$ mol) de carbodiimidazol en 10 mL de THF seco, la solución se deja bajo agitación y a temperatura ambiente durante 2h luego de las cuales se agregan 225mg ($1,4 \times 10^{-3}$ mol) de triptamina y se deja reaccionar en iguales condiciones por 24 hrs. Finalizada la reacción se agregan 50 mL de agua y se extrae con AcOEt. La fase orgánica es secada con sulfato de sodio anhidro y el solvente es evaporado bajo presión reducida. Ambas etapas son descritas en el esquema 8.



I: Et₃N, 4-DMAP, AcOEt, reflujo 3h, 87,5%. II: CDI, THFseco, 2h, III: Triptamina, 24h.

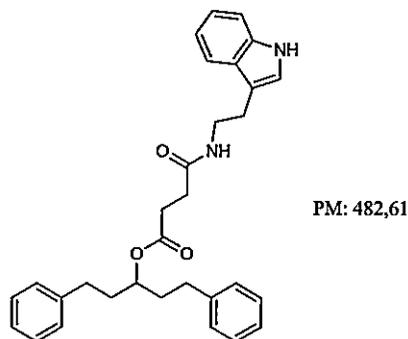


Esquema 8: Síntesis de 1,3-DFTS.

La 1,3-DFTS es aislada por cromatografía en columna de silica gel utilizando un sistema eluyente DCM/MeOH 5% y posteriormente con una nueva cromatografía en placa preparativa utilizando DCM/MeOH 2,5% como eluyente.

El producto se obtiene como un aceite denso amarillo que solidifica después de unas horas, se obtiene con un rendimiento final del 85,2%, es caracterizado por NMR-¹H y NMR-¹³C (adjunto en anexo I) obteniendo las siguientes señales. δ_H (400 MHz, CDCl₃): 2.17 (t, 2H, J= 7,1Hz), 2.49 (t, 2H, J= 7,1Hz), 2.82 (m, 4H), 2.86 (m, 2H), 3.48 (m, 2H, J= 6,7Hz), 5.26 (q, 1H), 5.62 (t, 1H, J= 5,6Hz), 6.89 (s, 1H), 7.54 (d, 1H, J= 7,9Hz), 8.37 (s, 1H), 7.05-7.31 (m, 13H). δ_C (100 MHz, CDCl₃): 25.29, 29.91, 31.12, 40.00, 53.49, 75.72, 111.41, 112.79, 118.68, 119.41, 122.11, 122.24, 126.60, 127.43, 128.44, 129.50, 136.52, 137.48, 171.42, 172.36. Se adjunta además su espectro de masas en anexo II.

3.3.3. 1,5-DFTS.



Etapa I: síntesis de ácido 4-((1,5-difenilpentan-3-il)oxi)-4-oxobutanoico a partir del 1,5-difenil-3-pentanol.

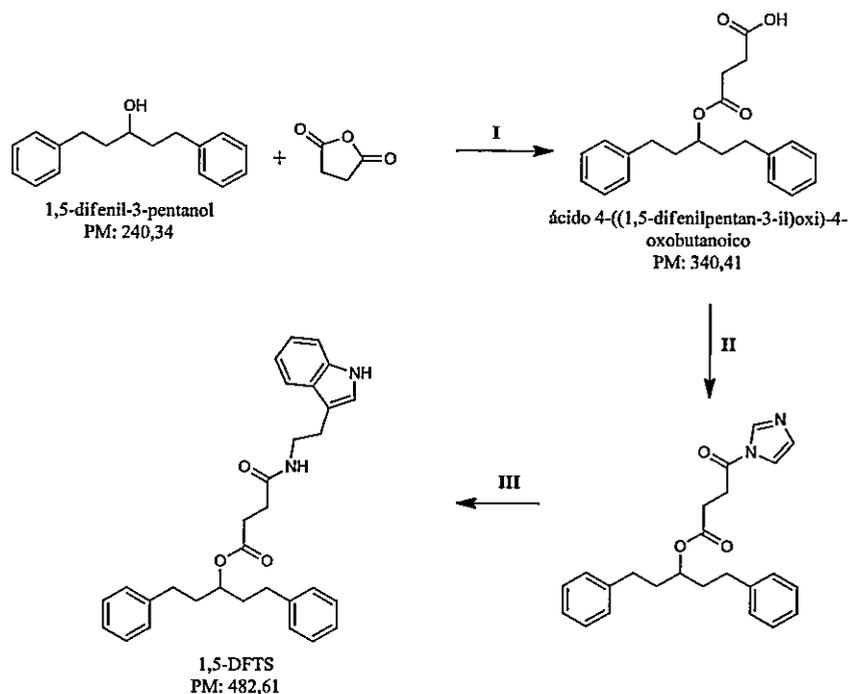
En un balón se disuelve 500 mg ($2,1 \times 10^{-3}$ mol) de 1,5-difenil-3-pentanol en 50 mL de AcOEt seco, luego se agregan 1 mL de trietilamina, 21 mg de 4-DMAP y 0,45 g ($4,5 \times 10^{-3}$ mol) de anhídrido succínico. Este sistema se pone bajo reflujo utilizando una trampa de CaCl₂ y se mantiene bajo agitación constante a una temperatura de 80°C hasta que la reacción se complete, lo cual se sigue por CCF y ocurre luego de 3 hrs.

Una vez finalizada la reacción, la solución se enfría a temperatura ambiente y se lava con una solución de HCl al 2% y luego con 100 mL de agua, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y es evaporada a sequedad bajo presión reducida.

El ácido se obtiene con un rendimiento del 96% y es aislado por cromatografía en columna sílica gel utilizando DCM como eluyente.

Etapa II: síntesis de 1,5-DFTS a partir de ácido 4-((1,5-difenilpentan-3-il)oxi)-4-oxobutanoico.

Se disuelven 450 mg ($1,3 \times 10^{-3}$ mol) de ácido 4-((1,5-difenilpentan-3-il)oxi)-4-oxobutanoico y 210 mg ($1,3 \times 10^{-3}$ mol) de carbodiimidazol en 10 mL de THF seco, la solución se deja bajo agitación y a temperatura ambiente durante 2h luego de las cuales se agregan 208 mg ($1,3 \times 10^{-3}$ mol) de triptamina y se deja reaccionar en iguales condiciones por 24 hrs. Finalizada la reacción se agregan 50 mL de agua y se extrae con AcOEt. La fase orgánica es secada con sulfato de sodio anhidro y el solvente es evaporado bajo presión reducida. Ambas etapas son descritas en el esquema 9.



I: Et₃N, 4-DMAP, AcOEt, refluxo 3h, 96%. II: CDI, THFseco, 2h, III: Triptamina, 24h.

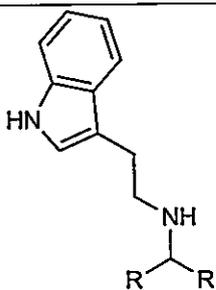
Esquema 9: Síntesis de 1,5-DFTS.

El 1,5-DFTS es aislado por cromatografía en columna de silica gel utilizando un sistema eluyente DCM/MeOH 5% y posteriormente con una nueva cromatografía en placa preparativa utilizando DCM/MeOH 2,5% como eluyente.

El producto se obtiene como un aceite amarillo que solidifica con el tiempo y se obtiene con un rendimiento final del 86,3%. El producto es caracterizado mediante NMR-¹H y NMR-¹³C (adjunto en anexo I) obteniendo las siguientes señales. δ_H (400 MHz, CDCl₃): 1.88 (m, 4H), 2.37 (t, 2H, J= 6,9Hz), 2.61 (m, 6H), 2.95 (t, 2H, J= 6,7Hz), 3.58 (c, 2H, J= 6,6Hz), 4.97 (q, 1H, J= 5,0Hz), 5.67 (t, 1H), 7.003 (s, 1H), 7.09-7.27 (m, 12H), 7.35 (d, 1H, J= 8,1Hz), 7.58 (d, 1H, J= 8,0Hz), 8.059 (s, 1H). δ_C (100 MHz, CDCl₃): 25.68, 30.17, 31.58, 32.05, 36.22, 40.21, 74.27, 111.65, 113.36, 119.12, 119.90, 122.51, 122.60, 126.34, 127.75, 128.76, 128.83, 136.81, 141.94, 171.67, 173.16. Se adjunta además el espectro de masas en anexo II.

A continuación se resumen en las tablas 1 y 2 los rendimientos obtenidos para todas las síntesis.

Tabla 1: rendimientos obtenidos para síntesis de DFTs. Método I y II.

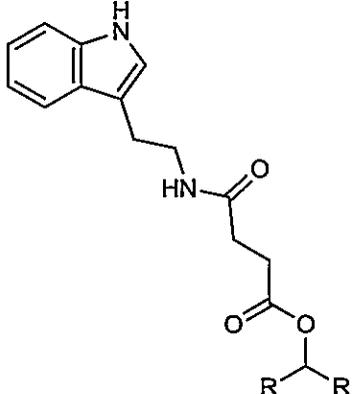
DFT	Sustituyentes	Rendimiento [%]. Método I	Rendimiento [%]. Método II
	1,1-DFT R= -C ₆ H ₅	13,33	51,43
	1,3-DFT R=-CH ₂ -C ₆ H ₅	~ 45*	0
	1,5-DFT R=-CH ₂ -CH ₂ -C ₆ H ₅	56,32	73,67

*rendimiento estimado (por Cromatografía preparativa en placa).

Las síntesis de las DFTs mediante el método I, resulta ser muy poco eficiente sobre todo para la 1,1-DFT, la aparición de producto se observa luego de transcurridas 8 horas y además se observa la presencia de productos secundarios. En cuanto a la utilización de NaBH₃CN y NaBH₄ a pesar de que el primero es un reductor más suave y selectivo no se presentaron diferencias notorias entre ambos, por lo tanto se favoreció la utilización del segundo por su bajo costo y mayor disponibilidad.

En cuanto a la metodología II se obtienen mayores rendimientos, el tiempo de reacción es menor al de la metodología I (solo 4 horas) y se reduce la cantidad de productos secundarios.

Tabla 2: rendimientos obtenidos para síntesis de DFTSs. Método I y II.

DFTS.	Sustituyentes	Rendimiento [%]. Método I.	Rendimiento [%]. Método II.
	1,1-DFTS R= -C ₆ H ₅	2	75
	1,3-DFTS R=-CH ₂ -C ₆ H ₅	5	85,2
	1,5-DFTS R=-CH ₂ -CH ₂ -C ₆ H ₅	9	86,3

La síntesis de las DFTSs mediante el método I se obtiene con rendimientos muy bajos respecto a la metodología II, lo que da señales de que tanto la temperatura como la buena homogenización de los reactivos mediante agitación constante son sumamente determinantes.

3.4. Afinidad de los compuestos sintetizados frente a SERT, Binding.

En los ensayos de afinidad por desplazamiento de radioligando se obtuvieron los siguientes resultados:

3.4.1. Valores de IC₅₀ obtenidos.

Tabla 3: valores de IC₅₀ obtenidos para cada derivado en ensayos de binding.

Molécula	IC ₅₀
1,1-DFT	ND*
1,3-DFT	ND*
1,5-DFT	8,3 ± 2,1 μM
1,1-DFTS	0,98 ± 1,9 μM
1,3-DFTS	98,3 ± 3,1 nM
1,5-DFTS	12,1 ± 1,3 nM

*no determinada.

3.4.2. Curva dosis respuesta en SERT de DFTs y DFTSs sintetizadas.

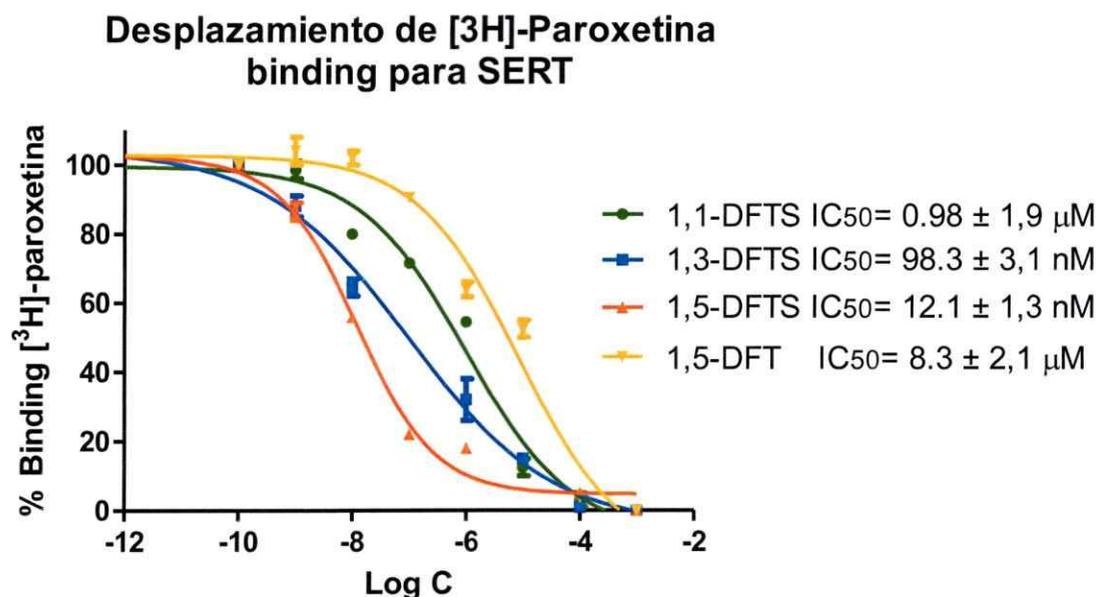


Figura 10: curva dosis respuesta en SERT de DFTs y DFTSs sintetizadas.

La comparación de los resultados de la tabla 3 y figura 10 obtenidos entre las aminas y los ésteres, indican que la presencia del espaciador de succinato en las moléculas aumenta la afinidad de estas por SERT respecto de aquellas moléculas sin espaciador. Es decir, el IC_{50} de los derivados con este espaciador se alcanza con una menor concentración de droga en comparación a las aminas.

Por otro lado las moléculas DFTS con los anillos aromáticos separados por 3 y 5 átomos de carbono (1,3-DFTS y 1,5-DFTS) efectivamente presentan mejor afinidad que la con un solo átomo de carbono (1,1-DFTS).

Resultando entonces que la molécula que logra un mejor desplazamiento es la de mayor tamaño, la 1,5-DFTS.

3.5. Modelamiento molecular, Docking.

3.5.1. Comparación entre DFTs y DFTSs.

Los análisis de modelamiento molecular indican en primera instancia, que aquellas moléculas que contienen al espaciador succinato se unen mejor y en el mismo sitio que los bloqueadores de SERT tal como lo es la paroxetina (figura 11), localizando el anillo indólico de la triptamina en la cavidad de entrada del transportador, sitio de reconocimiento molecular de la serotonina (Jarończyk *et al.*, 2012).

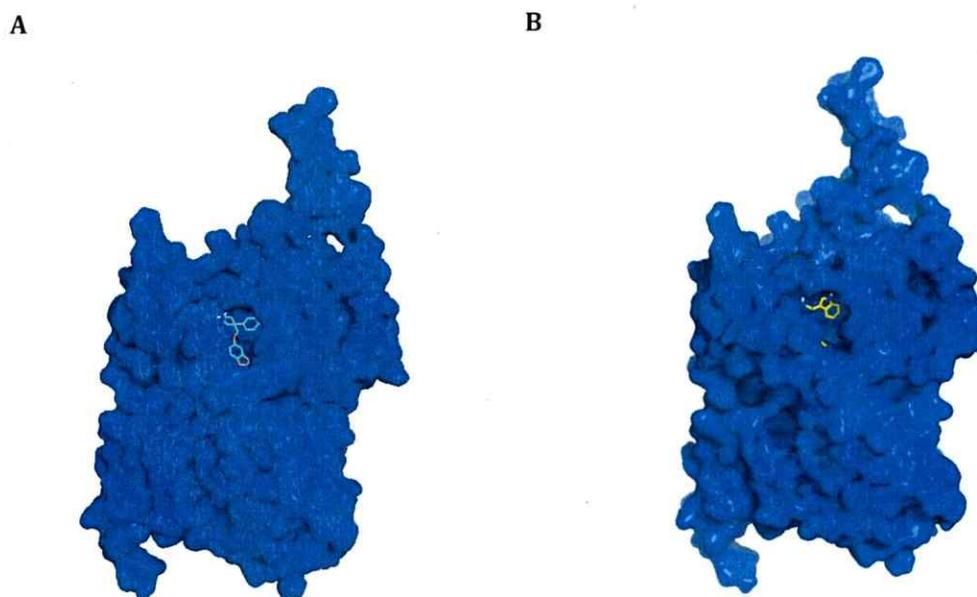


Figura 11: A.- Modo de unión de paroxetina en la cavidad de entrada para SERT, B.- Modo de unión de 1,5-DFTS en la cavidad de entrada para SERT.

Por otro lado al comparar la serie de aminas (1,1-DFT, 1,3-DFT y 1,5-DFT) se observa que de acuerdo a los valores de energía I obtenidos mostrados en la tabla 4, la molécula que mejor se une a SERT es la 1,5-DFT, sin embargo, se puede observar también que quizás no es estrictamente necesario que exista una correlación entre el largo de la cadena y una mejor unión al transportador ya que 1,3-DFT mostró un valor de energía mayor que 1,1-DFT. Debido a esta diferencia energética se realizó un segundo docking cuya única diferencia respecto al primero fueron las dimensiones del mapa de grilla

que esta vez se aumentaron a 120 x 100 x 80, permitiendo que las moléculas se movieran con mayor libertad en SERT, y no estrictamente en el sitio activo como en el primer docking, lo cual resultó en energías que si correlacionan con los datos obtenidos del binding.

Tabla 4: resultados energéticos y residuos aminoacídicos involucrados en los Docking.

Molécula.	Energía I [kcal/mol]		Energía II [kcal/mol]		Residuos enlazados a DFT	Residuos enlazados a DFTS
	DFT	DFTS	DFT	DFTS		
1,1	-5,61	-6,88	-5,1	-5,69	Leu-485, Tyr-490, Asn-491	Asp- 322, Lys-412, Val-319
1,3	-5,31	-5,38	-5,82	-6,01	Asp-322, Val-319	Asp-322, Val-319
1,5	-6,19	-7,69	-6,65	-7,0	Leu-485, Tyr-490, Asn-491	Asp-322, Lys-412, Gly-407

Ahora bien, al comparar la serie de ésteres (1,1-DFTS, 1,3-DFTS y 1,5-DFTS) se observa la misma situación, 1,1-DFTS y 1,5-DFTS resultan ser los derivados de menor energía y por ende los de mayor estabilidad según el primer docking. De acuerdo a lo expuesto, la molécula que se une mejor a SERT es 1,5-DFTS lo que concuerda con los resultados del binding. Ahora a modo de entender los valores de la tabla IV se verán los docking I obtenidos para cada molécula detalladamente, finalizando con una tabla resumen de distancias y energías involucradas en cada sistema.

Docking 1,1-DFT.

El modelamiento molecular de 1,1-DFT en SERT (figura 12) muestra que este compuesto se orienta sobre SERT de tal forma que se establecen interacciones del tipo puentes de hidrógeno, entre los hidrógenos amínicos de la molécula y los oxígenos de los residuos aminoacídicos de SERT. Los hidrógenos amínicos de la cadena interactúan a una distancia de 2.1 Å y 2.2 Å respectivamente con el oxígeno carbonílico del residuo Leu-485 y el oxígeno del grupo hidroxilo del residuo Tyr-490 de SERT, además del mismo tipo de interacción entre el hidrógeno del anillo indólico con el oxígeno carbonílico del residuo Asn-491 que se encuentra a una distancia de 2.2 Å.

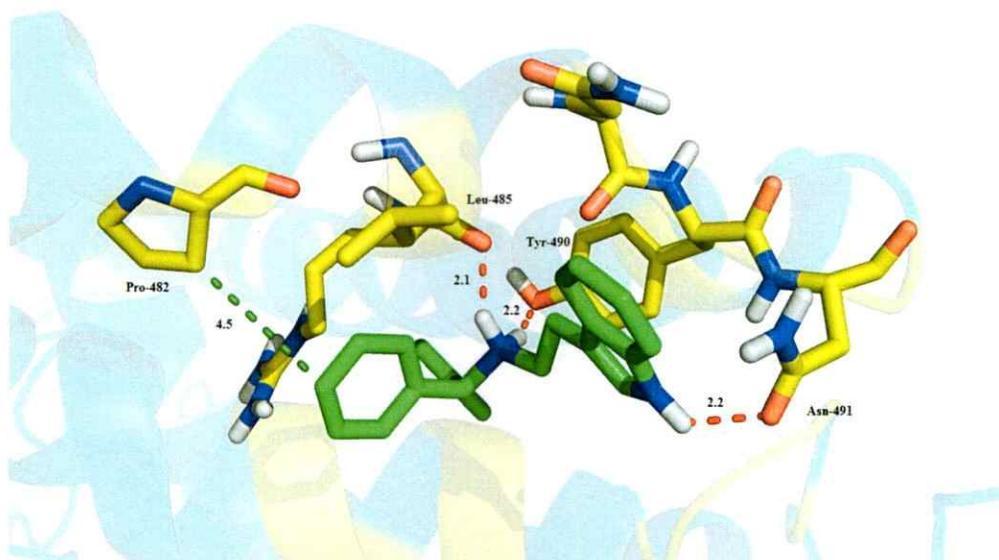


Figura 12: modelamiento molecular de 1,1-DFT (verde) en SERT.

Docking 1,1-DFTS.

Los resultados para el compuesto 1,1-DFTS (figura 13) no son muy distintos en cuanto al número y el tipo de interacciones observadas. Se establecen nuevamente tres puentes de hidrógeno entre el compuesto y SERT, sin embargo, los residuos aminoacídicos involucrados cambian y esta vez los puentes de hidrógenos se forman entre el oxígeno del grupo carbonilo, cercano a los anillos bencílicos de la molécula, con el hidrógeno del residuo Lys-412 a una distancia de 2.1 Å, entre el hidrógeno amínico de la cadena y el oxígeno carbonílico del residuo Asp-322 a una distancia de 1.9 Å y entre el hidrógeno indólico y el oxígeno carbonílico del residuo Val-319 con una distancia de 1.9 Å.

Vemos que la incorporación del grupo succinato además de permitir la formación de otro puente de hidrogeno, facilita la proximidad entre el compuesto y otros residuos aminoacídicos de SERT debido a la flexibilidad que experimenta la molécula al alargar la cadena, lo cual conlleva además a la disminución de las distancias de los puentes de hidrógenos formados y la molécula se estabiliza aún más disminuyendo su energía total.

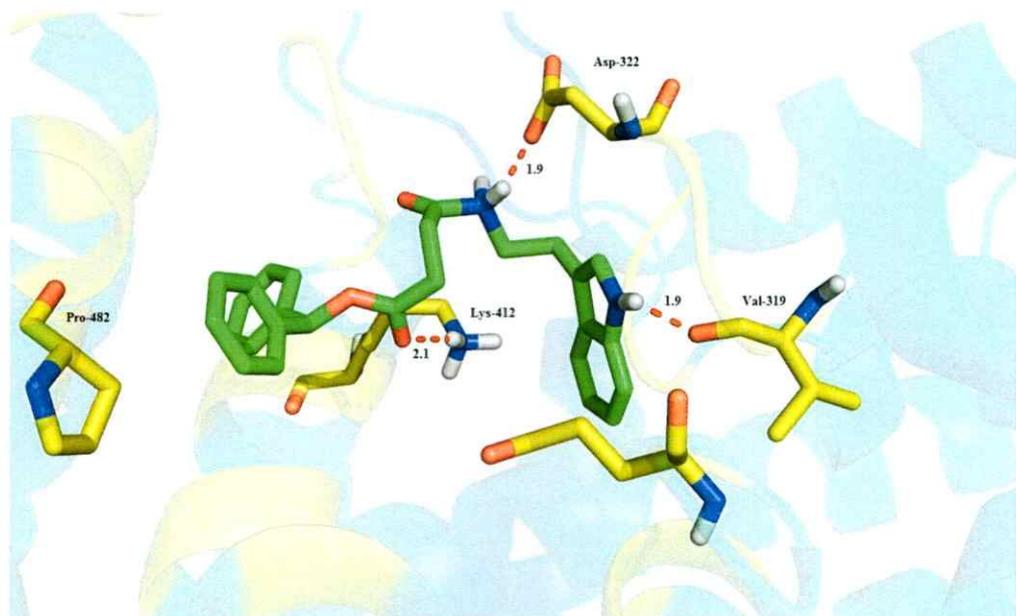


Figura 13: modelamiento molecular de 1,1-DFTS (verde) en SERT.

Docking 1,3-DFT.

En el modelamiento de 1,3-DFT (figura 14) se observa un resultado no esperado, la molécula al ser más larga y por ende más flexible, en comparación con 1,1-DFT, debería presentar una energía total aún más pequeña lo cual no ocurre. Si observamos detenidamente la figura 14 vemos que el tipo de interacción formada siguen siendo los puentes de hidrogeno, pero esta vez se forman tan solo dos, uno con el residuo Asp-322 y otro con Val-319 los cuales participaron en la interacción con 1,1-DFTS pero no en 1,1-DFT. Respecto a esta última comparación se observa que las distancias que involucran los mismos residuos que 1,1-DFT son muy elevadas, 9.8 Å y 10.9 Å, lo cual hace imposible la formación de puentes de hidrogeno.

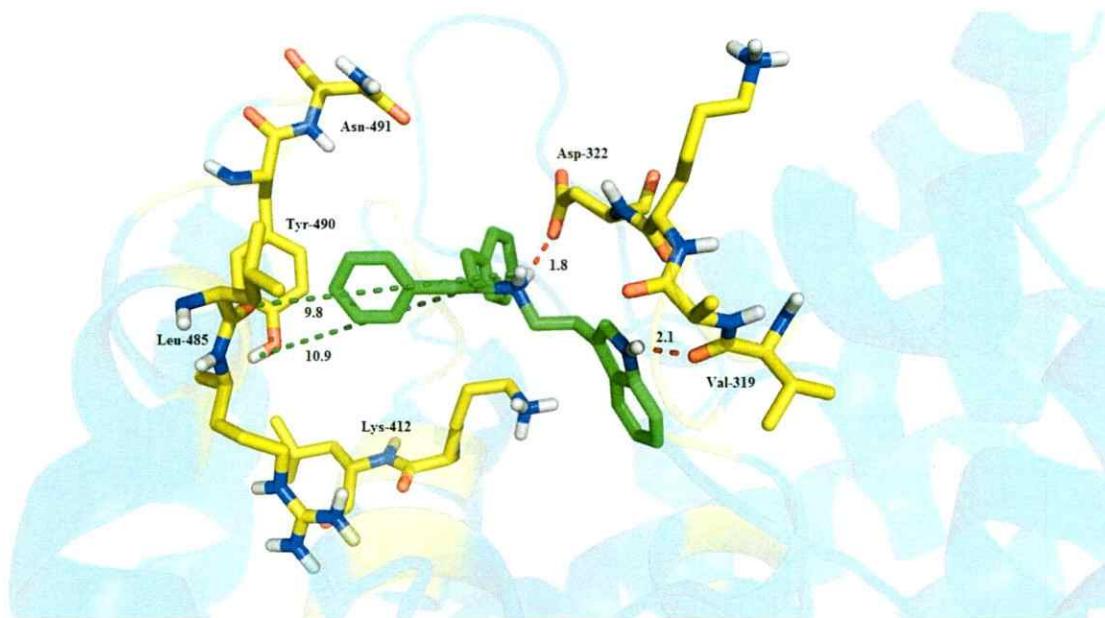


Figura 14: modelamiento molecular de 1,3-DFT (verde) en SERT.

Docking 1,3-DFTS.

Al igual que para 1,3-DFT se esperaba que el modelamiento de 1,3-DFTS diera una energía total menor que para 1,1-DFTS, lo que no sucedió.

En el modelamiento de 1,3-DFTS de la figura 15 se observa la formación de dos puentes de hidrogeno con los mismos residuos Asp-322 y Val-319 y a distancias similares 1.9Å y 2.0Å, sin embargo, el puente entre el oxígeno del grupo carbonilo y el residuo Lys-412 observado en 1,1-DFTS aquí en 1,3-DFTS desaparece, la distancia entre el oxígeno e hidrogeno se triplica pasando de 2.1 Å a 6.9 Å. El alargamiento de la cadena en este caso no implica mayores cambios, pues 1,3-DFT y 1,3-DFTS presentan energía e interacciones muy similares.

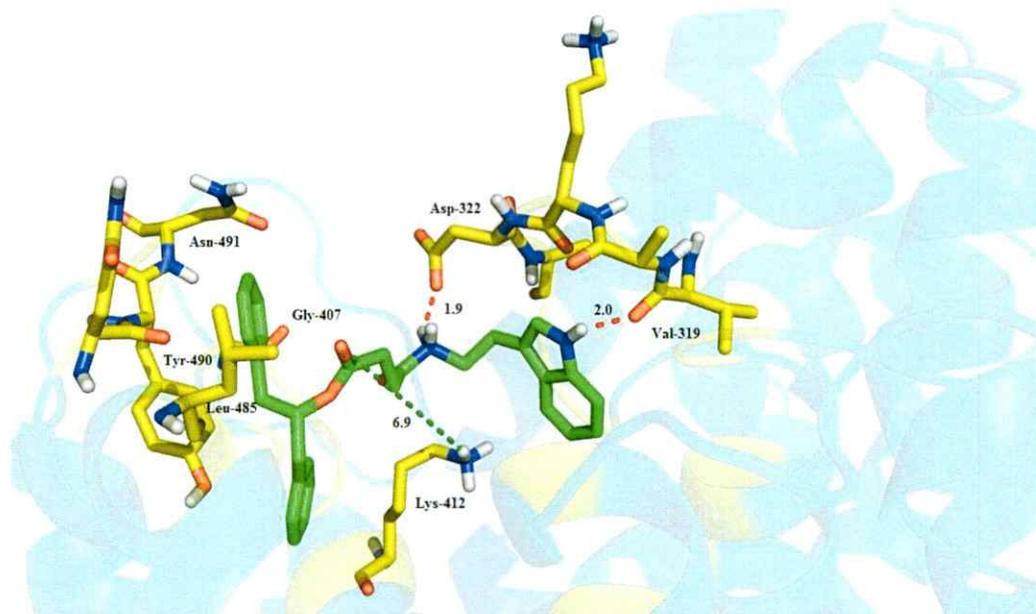


Figura 15: modelamiento molecular de 1,3-DFTS (verde) en SERT.

Docking 1,5-DFT.

Analizando ahora el modelamiento obtenido para 1,5-DFT (figura 16) se observa que nuevamente se establecen los tres puentes de hidrogeno formados en 1,1-DFT con los residuos Leu-485, Tyr-490 y Asn-491, sin embargo, su energía total disminuye. Para tratar de dar explicación a esta disminución energética promedio podemos pensar que al tratarse de una molécula de mayor longitud y mayor flexibilidad quizás se establezcan otro tipo de interacciones transitorias entre el anillo bencílico de la molécula con el anillo de la prolina 482 de SERT, lo cual sería una posibilidad pues se observa que la distancia entre ellos disminuye a 3.4 Å respecto a los 4.5 Å observados en 1,1-DFT.

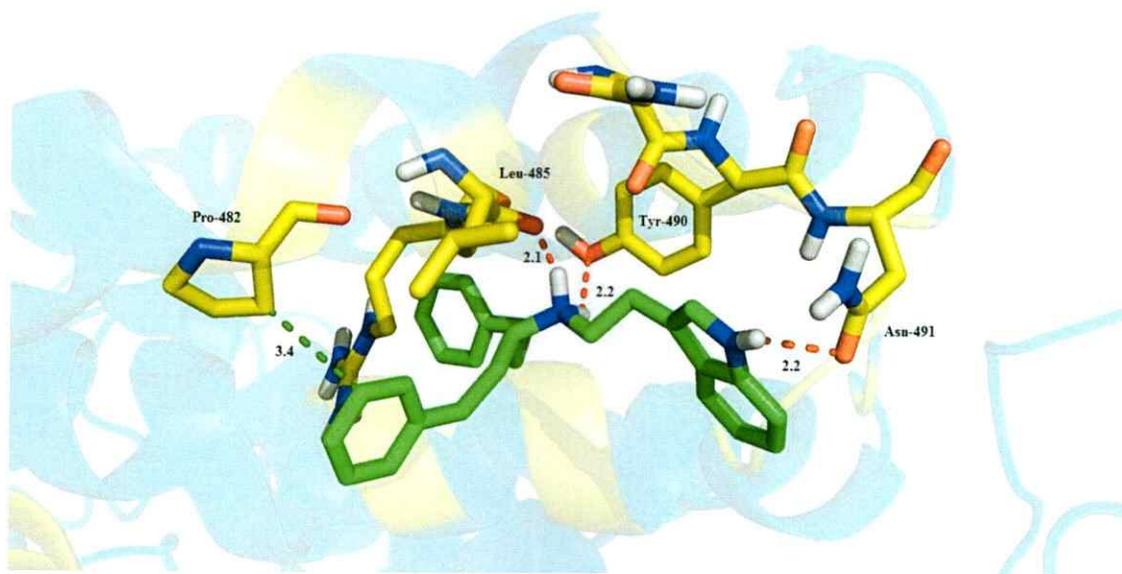


Figura 16: modelamiento molecular de 1,5-DFT (verde) en SERT.

Docking 1,5-DFTS.

Por último el análisis del modelamiento para 1,5-DFTS (figura 17) indica que nuevamente se establecen tres puentes de hidrogeno entre la molécula y SERT. Las interacciones con Asp-322 y Lys-412 son muy similares al comparar con 1,1-DFTS con distancias de 2.0 Å y 1.8 Å, sin embargo, la notable diferencia energética estaría dada por la interacción del anillo indólico con el residuo Gly-407 a una distancia de 2.1 Å en vez de Val-319, que esta vez se encuentra bastante alejada al anillo indol pues la molécula al ser la más larga de todas, es la que tiene mayor flexibilidad y mayor número de conformaciones.

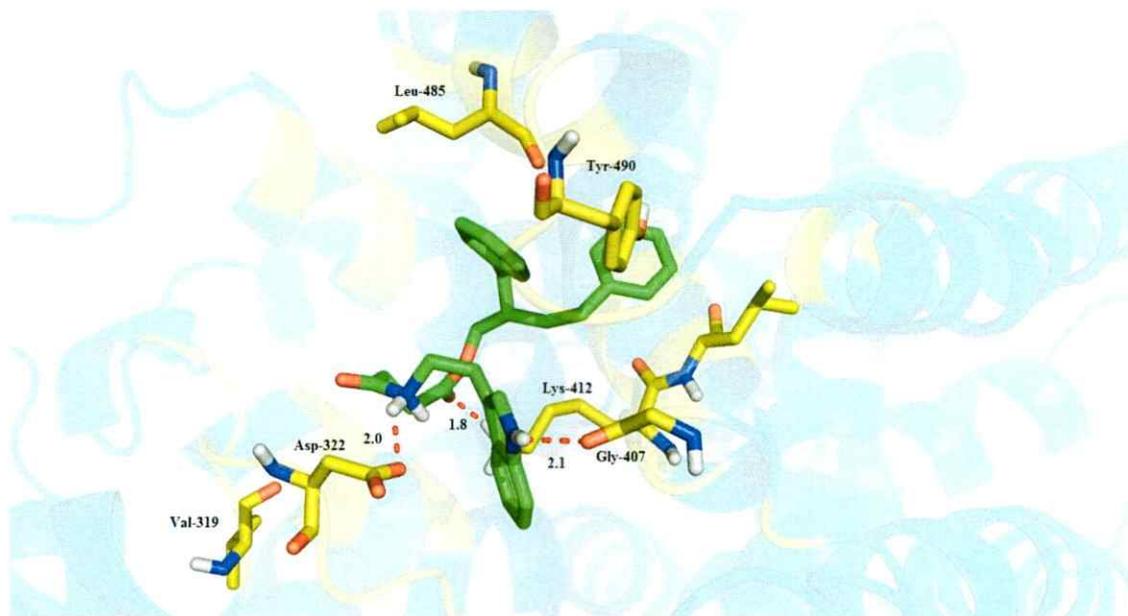


Figura 17: modelamiento molecular de 1,5-DFTS (verde) en SERT.

Como se observa, en todos los compuestos el tipo de interacción predominante es la por puentes de hidrógeno, es por esta razón que en la tabla siguiente (tabla 5) se resumen los valores de las longitudes de enlace y energías de las interacciones para cada una de las moléculas analizadas, para luego ser comparadas con los valores establecidos por Desiraju y Steiner descritos en la tabla 6. Estos valores sirven de guía (mas no para hacer divisiones absolutas) sobre la clasificación de un puente de hidrógeno “fuerte” o “débil”. Donde A y B representan los átomos participantes en los puentes de hidrógenos de la molécula y los residuos aminoácidos respectivamente.

Tabla 5: Tabla resumen de las energías y longitudes de enlace determinadas para cada molécula mediante docking.

Molécula	Energía total estimada del sistema [-kcal/mol]	Longitud de enlace H...B [Å]	Puente de hidrógeno formado.	Energía de enlace [-kcal/mol]
1,1-DFT	5,1	2.1	C=O ... H-N	1,46
		2.2	H-O ... H-N	0,36
		2.2	C=O ... H-N (Indol)	0,76
1,1-DFTS	5,69	1.9	C=O ... H-N (Indol)	0,60
		1.9	C=O ... H-N	0,47
		2.1	N-H ... O=C	1,62
1,3-DFT	5,82	2.1	C=O ... H-N (Indol)	0,38
		1.8	C=O ... H-N	0,51
1,3-DFTS	6,01	2.0	C=O ... H-N (Indol)	0,29
		1.9	C=O ... H-N	1,66
1,5-DFT	6,65	2.1	C=O ... H-N	1,85
		2.2	H-O ... H-N	0,65
		2.2	C=O ... H-N (Indol)	0,19
1,5-DFTS	7,00	2.1	C=O ... H-N (Indol)	0,01
		1.8	C=O ... H-N	1,51
		2.0	C=O ... H-N	4,76

Tabla 6: Clasificación de los puentes de hidrógeno de acuerdo a algunas de sus propiedades. Tabla modificada desde: The Weak Hydrogen Bond. In Structural Chemistry and Biology (Gautam R. Desiraju and Thomas Steiner 1999).

	Muy fuerte	Fuertes.	Débiles.
Energía de enlace (-kcal/mol).	15 - 40	4-15	< 4
Ejemplo.	[F...H...F] ⁻	O-H...O=C	C-H...O
Longitudes de enlace.	H...B ≈ A-H	H...B > A-H	H...B >> A-H
Longitudes (A-H) (Å)	0.05- 0.2	0.01-0.05	≤0.01
D (A...B)(Å)	2.2-2.5	2.5-3.2	3.0-4.0
d (H...B)(Å)	1.2-1.5	1.5-2.2	2.0-3.0
∠ (A-H...B) (°)	175-180	130-180	90-180

De la tabla 5 y haciendo referencia a las distancias de los puentes de hidrógenos formados entre aminoácidos y moléculas, se puede observar que estas comprenden un rango que va desde 1.8 a 2.2 Å, distancia que según la tabla VI corresponde a puentes de hidrógeno fuertes. Por otro lado al

analizar las energías involucradas en estos mismos enlaces esta vez entrarían en la clasificación de puentes de hidrógenos débiles, sin embargo, hay que recordar que existe una energía total que involucra a cada una de las interacciones establecidas en el sistema.

Al analizar las energías más detalladamente, se puede observar que las energías más bajas las alcanzan las interacciones del protón indólico de las moléculas sintetizadas, lo que conlleva si se analiza que este protón se encuentra estabilizado naturalmente por la nube electrónica del anillo indólico por resonancia, por lo cual su tendencia a formar nuevos enlaces es poco o nada probable. Además la 1,5-DFTS que resulta ser la molécula más estable según la energía total estimada para el sistema, es justamente la que presenta la menor energía en este protón indólico.

3.6. Bioensayo de letalidad en *Artemia salina*.

En la tabla 7 se puede observar que de las tres moléculas analizadas (familia DFTS) la que permite trabajar a mayores concentraciones causando menor mortalidad resulta ser la 1,1-DFTS, que presenta un valor de CL_{50} de $574,4 \pm 5,1 \mu\text{M}$. Luego le sigue la 1,3-DFTS con un valor de $141,1 \pm 17,6 \mu\text{M}$ y finalmente la 1,5-DFTS con un valor de $43,73 \pm 9,6 \mu\text{M}$.

Tabla 7: valores de CL_{50} para familia de DFTSs.

Molécula	CL_{50} [μM]
1,1-DFTS	$574,4 \pm 5,1$
1,3-DFTS	$141,1 \pm 17,6$
1,5-DFTS	$43,73 \pm 9,6$

Los resultados obtenidos contrastan con los obtenidos en el binding pues la 1,5-DFTS que resultó ser la de mejor IC_{50} esta vez es la que provoca la mortalidad de las *Artemias salinas* a menores concentraciones, sin embargo, las tres moléculas permiten una ventana de trabajo con un alto % de sobrevivencia $>50\%$ desde concentraciones 1×10^{-5} a 1×10^{-8} M.

4. CONCLUSIONES

Se han logrado sintetizar con éxito las 6 moléculas totales, sin embargo, queda pendiente la purificación de la 1,3-DFT y por ende sus estudios de binding.

La síntesis de las DFTs y en particular de la 1,1-DFT no se puede realizar eficientemente por medio de la primera ruta sintética propuesta. La posible explicación para estos resultados se relacionan con el gran impedimento estérico que presenta esta molécula debido a los anillos aromáticos, que impiden el ataque nucleofílico por parte de la triptamina hacia el carbonilo (aun estando activado con TiCl_4). Los productos secundarios observados derivan probablemente del ataque nucleofílico por parte del EtO- y del agua presente en el sistema, problema que se ve resuelto, en parte, por el no uso de solvente en la metodología II, metodología que resulta ser la más adecuada tanto por el rendimiento promedio alcanzado de 62,49% como por la pureza del producto final obtenido.

La síntesis de los ésteres tampoco se realiza eficientemente mediante la primera ruta sintética, sin embargo, la segunda metodología tiene un rendimiento promedio significativamente alto (82,17%), de lo cual se concluye que tanto la temperatura como la buena homogenización mediante agitación son determinantes.

En cuanto a los ensayos de binding, tanto con las aminas como con los ésteres se logran desplazamientos de radioligando en SERT, aunque son estos últimos los que muestran mayores desplazamientos. Esto en principio tiene su explicación respecto a la mayor cantidad de interacciones entre moléculas y transportador, como también a la mayor flexibilidad de las moléculas, lo cual conlleva un mejor ajuste de estas en el sitio de unión del transportador.

Tanto en las aminas como en los ésteres la potencia inhibitoria aumenta al incrementar el número de átomos de carbono entre los anillos bencílicos como en la cadena unida a la triptamina siendo el orden creciente de capacidad inhibitoria el siguiente: 1,5-DFT, 1,1-DFTS, 1,3-DFTS, 1,5-DFTS.

De acuerdo a esto se comprueba nuevamente que si bien la afinidad tiende a aumentar con el largo de la cadena y su flexibilidad, es sumamente importante el tipo de interacción formada, su estructura química y los residuos aminoacídicos de SERT participantes. De hecho el sitio activo o canal de SERT podría albergar incluso un grupo más voluminoso que 1,5-DFTS, sin embargo, hay que tener presente que si el volumen de los sustituyentes es muy grande se podría provocar una disminución en la actividad debido a impedimentos estéricos entre las moléculas y algún residuo aminoacídico de la proteína transportadora.

De los estudios de binding se concluye entonces que el derivado más potente es 1,5-DFTS, molécula que presenta el mayor tamaño global y mayor densidad de carga debida a grupos funcionales, y posee un valor de IC_{50} en el rango nanomolar, $IC_{50} = 12 \pm 1,3$ nM.

Con los estudios de docking se complementan los resultados obtenidos en el binding, las menores energías obtenidas efectivamente fueron para el modelamiento realizado a 1,5-DFTS.

Finalmente y mediante ambos estudios se puede concluir que la unión a SERT se ve favorecida a mayor tamaño molecular y mayor variedad de grupos funcionales, ya que estos permiten establecer interacciones ya sean del tipo puente de hidrogeno, π - π , entre otras, con los residuos aminoacídicos que conforman SERT lo que disminuye la energía global del sistema y que sistemas rígidos favorecen poco o nada a la actividad bloqueadora-inhibitoria hacia SERT. Si bien el modelamiento molecular da señales del comportamiento de un grupo de moléculas frente a un receptor, son los ensayos de binding los que realmente determinan los buenos o malos inhibidores.

Recursos materiales y financiamiento.

Materiales: La investigación se realiza en el laboratorio de Química Biodinámica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, el cual posee una superficie de aproximadamente 210 m². Esta área se divide en un lugar de trabajo experimental de alrededor de 90 m², una sala de estudio y reuniones de 21 m². La superficie restante se divide en dos oficinas, una sala de computadores y una sala de instrumentos. Se dispone de equipos para síntesis en pequeña escala que incluyen tres evaporadores rotatorios, dos bombas de vacío, equipo para destilación bulbo a bulbo, columnas abiertas para cromatografía, un colector de fracciones, un cromatógrafo de mediana presión y un aparato de hidrogenación catalítica de Parr. El laboratorio también posee una balanza analítica, un aparato para determinar puntos de fusión con platina de Kofler, un pH-metro, lámparas UV para visualizar placas de cromatografía en capa fina, un polarímetro electrónico, un espectrómetro UV-Vis, tres computadores, una impresora láser y una de inyección de tinta, conectadas en línea.

Financiamiento: El financiamiento de esta tesis es otorgado gracias al proyecto Fondecyt 1100542.



5. REFERENCIAS.

- Apparsundaram, S.;** Stockdale, D. J.; Henningsen, R. A.; Milla, M. E.; Martin, R. S. Antidepressants Targeting the Serotonin Reuptake Transporter Act via a Competitive Mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *327*, 982–990.
- Arruebo, M. P.;** Mesonero, J. E.; Murillo, M. D.; Alcalde, A. I. Effect of Serotonin on D-Galactose Transport across the Rabbit Jejunum. *Reprod. Nutr. Développement* **1989**, *29*, 441–448.
- Balkovetz, D. F.;** Tirupathi, C.; Leibach, F. H.; Mahesh, V. B.; Ganapathy, V. Evidence for an Imipramine-Sensitive Serotonin Transporter in Human Placental Brush-Border Membranes. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 2195–2198.
- Beattie, D. T.;** Smith, J. A. M. Serotonin Pharmacology in the Gastrointestinal Tract: A Review. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **2008**, *377*, 181–203.
- Bellini, M.** Platelet Serotonin Transporter in Patients with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome Both before and after Treatment with Alosetron. *Am. J. Gastroenterol.* **2003**, *98*, 2705–2711.
- Bellino, S.;** Paradiso, E.; Bogetto, F. Efficacy and Tolerability of Pharmacotherapies for Borderline Personality Disorder. *CNS Drugs* **2008**, *22*, 671–692.
- Blakely, R. D.;** Berson, H. E.; Fremeau, R. T.; Caron, M. G.; Peek, M. M.; Prince, H. K.; Bradley, C. C. Cloning and Expression of a Functional Serotonin Transporter from Rat Brain. *Nature* **1991**, *354*, 66–70.
- Blakely, R. D.;** De Felice, L. J.; Hartzell, H. C. Molecular Physiology of Norepinephrine and Serotonin Transporters. *J. Exp. Biol.* **1994**, *196*, 263–281.
- Boissard, C. G.;** Gribkoff, V. K. The Effects of the Adenosine Reuptake Inhibitor Soluffazine on Synaptic Potentials and Population Hypoxic Depolarizations in Area CA1 of Rat Hippocampus in Vitro. *Neuropharmacology* **1993**, *32*, 149–155.
- Bu, X.;** Deady, L. W.; Finlay, G. J.; Baguley, B. C.; Denny, W. A. Synthesis and Cytotoxic Activity of 7-Oxo-7 H -Dibenz[F, I] isoquinoline and 7-Oxo-7 H -Benzo[E]perimidine Derivatives. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2004–2014.
- Bumpus, M.;** Page, I. H. Serotonin and Its Methylated Derivatives in Human Urine. *J. Biol. Chem.* **1955**, *212*, 111–116.
- Carver, C. S.;** Miller, C. J. Relations of Serotonin Function to Personality: Current Views and a Key Methodological Issue. *Psychiatry Res.* **2006**, *144*, 1–15.
- Chang, A. S.;** Chang, S. M.; Starnes, D. M.; Schroeter, S.; Bauman, A. L.; Blakely, R. D. Cloning and Expression of the Mouse Serotonin Transporter. *Mol. Brain Res.* **1996**, *43*, 185–192.
- Chen, F.;** Larsen, M. B.; Sánchez, C.; Wiborg, O. The S-Enantiomer of R,S-Citalopram, Increases Inhibitor Binding to the Human Serotonin Transporter by an Allosteric Mechanism. Comparison with Other Serotonin Transporter Inhibitors. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2005**, *15*, 193–198.

Costa, B.; Siniscalco, D.; Trovato, A. E.; Comelli, F.; Sotgiu, M. L.; Colleoni, M.; Maione, S.; Rossi, F.; Giagnoni, G. AM404, an Inhibitor of Anandamide Uptake, Prevents Pain Behaviour and Modulates Cytokine and Apoptotic Pathways in a Rat Model of Neuropathic Pain. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 1022–1032.

Desiraju G. R. and Steiner. T. *The Weak Hydrogen Bond in Structural Chemistry and Biology*, Ed:Oxford University Press, New York, **1999**; p 13.

Díaz-Marsá, M.; González Bardanca, S.; Tajima, K.; García-Albea, J.; Navas, M.; Carrasco, J. L. Psychopharmacological Treatment in Borderline Personality Disorder. *Actas españolas Psiquiatr.* **2008**, *36*, 39–49.

Erspamer, V.; Asero, B. Identification of Enteramine, the Specific Hormone of the Enterochromaffin Cell System, as 5-Hydroxytryptamine. *Nature* **1952**, *169*, 800–801.

Fuller, R. W.; Wong, D. T. Inhibition of Serotonin Reuptake. *Fed. Proc.* **1977**, *36*, 2154–2158.

Furness, J. B.; Costa, M. Neurons with 5-Hydroxytryptamine-like Immunoreactivity in the Enteric Nervous System: Their Projections in the Guinea-Pig Small Intestine. *Neuroscience* **1982**, *7*, 341–349.

Gershon, M. D. Plasticity in Serotonin Control Mechanisms in the Gut. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2003**, *3*, 600–607.

Gershon, M. D.; Ross, L. L. Location of Sites of 5-Hydroxytryptamine Storage and Metabolism by Radioautography. *J. Physiol.* **1966**, *186*, 477–492.

Gershon, M. D.; Tack, J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding to Drug Development for Functional GI Disorders. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 397–414.

Gershon, M. D.; Drakontides, A. B.; Ross, L. L. Serotonin: Synthesis and Release from the Myenteric Plexus of the Mouse Intestine. *Science* **1965**, *149*, 197–199.

Gershon, M. D.; Sherman, D. L.; Pintar, J. E. Type-Specific Localization of Monoamine Oxidase in the Enteric Nervous System: Relationship to 5-Hydroxytryptamine, Neuropeptides, and Sympathetic Nerves. *J. Comp. Neurol.* **1990**, *301*, 191–213.

Gray, B. E. G.; Whittaker, V. P. The Isolation of Nerve Endings from Brain:an Electron-Microscopic Study of Cell Fragments Derived by Homogenization and Centrifugation. **1961**, *1960*, 12–17.

Griebel, G. 5-Hydroxytryptamine-Interacting Drugs in Animal Models of Anxiety Disorders: More than 30 Years of Research. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *65*, 319–395.

Güner, O. F. *Pharmacophore Perception, Development and Use in Drug Design*. Edited by Osman F. Güner; Güner, O. F., Ed.; 1^a ed.; Internationall University Line, **2000**; Vol. 5, pp. 17–43.

Heils, A.; Wichems, C.; Mossner, R.; Petri, S.; Glatz, K.; Bengel, D.; Murphy, D. L.; Lesch, K. Functional Characterization of the Murine Serotonin Transporter Gene Promoter in Serotonergic Raphe Neurons. **1998**.

Hoffman, B.J.; Mezey, E.; Brownstein, M.J. Cloning of a Serotonin Transporter Affected by Antidepressants. *Science*. **1991**, *254*, 579-580.

Iceta Echave, R. Caracterización Del Transportador de Serotonina Humano En Células Caco-2: Estudio de Los Mecanismos de Regulación Fisiológica (Tesis de postgrado). Universidad de Zaragoza, 2008, pp. 20-23.

Iversen, L. Neurotransmitter Transporters and Their Impact on the Development of Psychopharmacology. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147 Suppl*, S82-S88.

Jarończyk, M.; Wołosewicz, K.; Gabrielsen, M.; Nowak, G.; Kufareva, I.; Mazurek, A. P.; Ravna, A. W.; Abagyan, R.; Bojarski, A. J.; Sylte, I.; et al. Synthesis, in Vitro Binding Studies and Docking of Long-Chain Arylpiperazine Nitroquipazine Analogues, as Potential Serotonin Transporter Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *49*, 200-210.

Jørgensen, H. S. Studies on the Neuroendocrine Role of Serotonin. *Dan. Med. Bull.* **2007**, *54*, 266-288.

Laborda, J. *Las Mil Y Una Bases Del ADN Y Otras Historias Científicas*; Feduchi, E.; Irurzun, A., Eds.; 1ª ed.; Madrid, España, **2006**; p. 210.

Lengauer, T.; Rarey, M. Computational Methods for Biomolecular Docking. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 402-406.

Lesch, K. P.; Balling, U.; Gross, J.; Strauss, K.; Wolozin, B. L.; Murphy, D. L.; Riederer, P. Organization of the Human Serotonin Transporter Gene. *J. Neural Transm.* **1994**, *95*, 157-162.

Lorenzo Fernández, P.; Moreno González, A.; Lizasoain Hernández, I.; Leza Cerro, J. C.; Moro Sánchez, M. Á.; Portolés Pérez, A. *Velazquez; Farmacología Básica Y Clínica*; 18ª ed.; Madrid, España, **2008**; p. 621.

Lüllmann, H.; Mohr, K.; Lutz, H. *Farmacología. Texto Y Atlas*; 6ª ed.; Madrid, España., **2010**; p. 403.

Maehle, A.; Prüll, C.; Halliwell, R. F. The Emergence of the Drug Receptor Theory. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 637-641.

Mansari, M. El; Wiborg, O.; Mnie-Filali, O.; Benturquia, N.; Sánchez, C.; Haddjeri, N. Allosteric Modulation of the Effect of Escitalopram, Paroxetine and Fluoxetine: In-Vitro and in-Vivo Studies. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2007**, *10*, 31-40.

Martel, F. Recent Advances on the Importance of the Serotonin Transporter SERT in the Rat Intestine. *Pharmacol. Res.* **2006**, *54*, 73-76.

Meyer BN.; Ferrigni NR.; Jacobsen JE.; Nichols DE.; McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. *Journal of Medicinal Plants Research.* **1982**, *45*:31-34.

Miller, G. M.; Yatin, S. M.; De La Garza II, R.; Goulet, M.; Madras, B. K. Cloning of Dopamine, Norepinephrine and Serotonin Transporters from Monkey Brain: Relevance to Cocaine Sensitivity. *Mol. Brain Res.* **2001**, *87*, 124-143.

Miyano, M.; Deason, J. R.; Nakao, A.; Stealey, M. A.; Villamil, C. I.; Sohn, D. D.; Mueller, R. A. (Acyloxy)benzophenones and (acyloxy)-4-Pyrones. A New Class of Inhibitors of Human Neutrophil Elastase. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1052–1061.

Mortensen, O. V.; Kristensen, A. S.; Rudnick, G.; Wiborg, O. Molecular Cloning, Expression and Characterization of a Bovine Serotonin Transporter. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1999**, *71*, 120–126.

Murphy, D. L.; Moya, P. R. Human Serotonin Transporter Gene (SLC6A4) Variants: Their Contributions to Understanding Pharmacogenomic and Other Functional G×G and G×E Differences in Health and Disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11*, 3–10.

Nestler E, Hyman S, M. R. *Molecular Neuropharmacology*; USA:McGraw-Hill, Ed.; Mood and e; **2001**; pp. 167–190; 191–200; 327–354.

Oquendo, M. A.; Mann, J. J. The Biology of Impulsivity and Suicidality. *Psychiatr. Clin. North Am.* **2000**, *23*, 11–25.

Pacholczyk, T.; Blakely, R. D.; Amara, S. G. Expression Cloning of a Cocaine- and Antidepressant-Sensitive Human Noradrenaline Transporter. *Nature* **1991**, *350*, 350–354.

Pollack, M. H.; Roy-Byrne, P. P.; Van Ameringen, M.; Snyder, H.; Brown, C.; Ondrasik, J.; Rickels, K. The Selective GABA Reuptake Inhibitor Tiagabine for the Treatment of Generalized Anxiety Disorder: Results of a Placebo-Controlled Study. *J. Clin. Psychiatry* **2005**, *66*, 1401–1408.

Van Praag, H. M. Depression, Suicide and the Metabolism of Serotonin in the Brain. *J. Affect. Disord.* **1982**, *4*, 275–290.

Van Praag, H. Denosologization of Biological Psychiatry or the Specificity of 5-HT Disturbances in Psychiatric Disorders. *J. Affect. Disord.* **1987**, *13*, 1–8.

Puricelli, L. Optical Isomers of Cloperastine., **1999**. Publication number EP0894794 A1 .

Rahman, O.; Kihlberg, T.; Långström, B. Synthesis of [¹¹C]/(¹³C)amines via Carbonylation Followed by Reductive Amination. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1612–1616.

Ramamoorthy, S.; Bauman, A. L.; Moore, K. R.; Han, H.; Yang-Feng, T.; Chang, A. S.; Ganapathy, V.; Blakely, R. D. Antidepressant- and Cocaine-Sensitive Human Serotonin Transporter: Molecular Cloning, Expression, and Chromosomal Localization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 2542–2546.

Ravna, A. W.; Sylte, I.; Dahl, S. G. Molecular Mechanism of Citalopram and Cocaine Interactions with Neurotransmitter Transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307*, 34–41.

Raybould, H. E.; Glatzle, J.; Robin, C.; Meyer, J. H.; Phan, T.; Wong, H.; Sternini, C. Expression of 5-HT₃ Receptors by Extrinsic Duodenal Afferents Contribute to Intestinal Inhibition of Gastric Emptying. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2003**, *284*, G367–G372.

Rees, M.; Norton, N.; Jones, I.; McCandless, F.; Scourfield, J.; Holmans, P.; Moorhead, S.; Feldman, E.; Sadler, S.; Cole, T.; et al. Association Studies of Bipolar Disorder at the Human Serotonin Transporter Gene (hSERT; 5HTT). *Mol. Psychiatry* **1997**, *2*, 398–402.

Salvador, M. ; Rodríguez-Yoldi, M. ; Alcalde, A. ; Rodríguez-Yoldi, M. . 5-HT Receptor Subtypes Involved in the Serotonin-Induced Inhibition of L-Leucine Absorption in Rabbit Jejunum. *Life Sci.* **1997**, *61*, 309–318.

Sánchez L y Neira A. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. y *Psidium guineense* Sw. *Cultura Científica.* **2005**, *3*:40-45.

Silva I, H.; Iturra C, P.; Solari I, A.; Villarroel G, J.; Jerez C, S.; Roa V, N.; Bustamante C, M. L. Respuesta a Fluoxetina Y Polimorfismos Del Transportador de Serotonina En Trastorno Límite de Personalidad. *Rev. Chil. Neuropsiquiatr.* **2010**, *48*, 51–53.

Soloff, P. H. Psychopharmacology of Borderline Personality Disorder. *Psychiatr. Clin. North Am.* **2000**, *23*, 169–192.

Torres, G. E.; Gainetdinov, R. R.; Caron, M. G. Plasma Membrane Monoamine Transporters: Structure, Regulation and Function. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 13–25.

Vazquez, J. I. D. A.; Santana, M. L.; Serrano, J. S. *Farmacología Práctica Para Las Diplomaturas En Ciencias de La Salud*; 1ª ed.; Madrid, España, 2002; pp. 105–109.

Vialli, M.; Erspamer, V. Ricerche Sul Secreto Delle Cellule Enterocromaffini. *Zeitschrift für Zellforsch. und Mikroskopische Anat.* **1937**, *27*, 81–99.

Wade, P. R.; Chen, J.; Jaffe, B.; Kassem, I. S.; Blakely, R. D.; Gershon, M. D. Localization and Function of a 5-HT Transporter in Crypt Epithelia of the Gastrointestinal Tract. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 2352–2364.

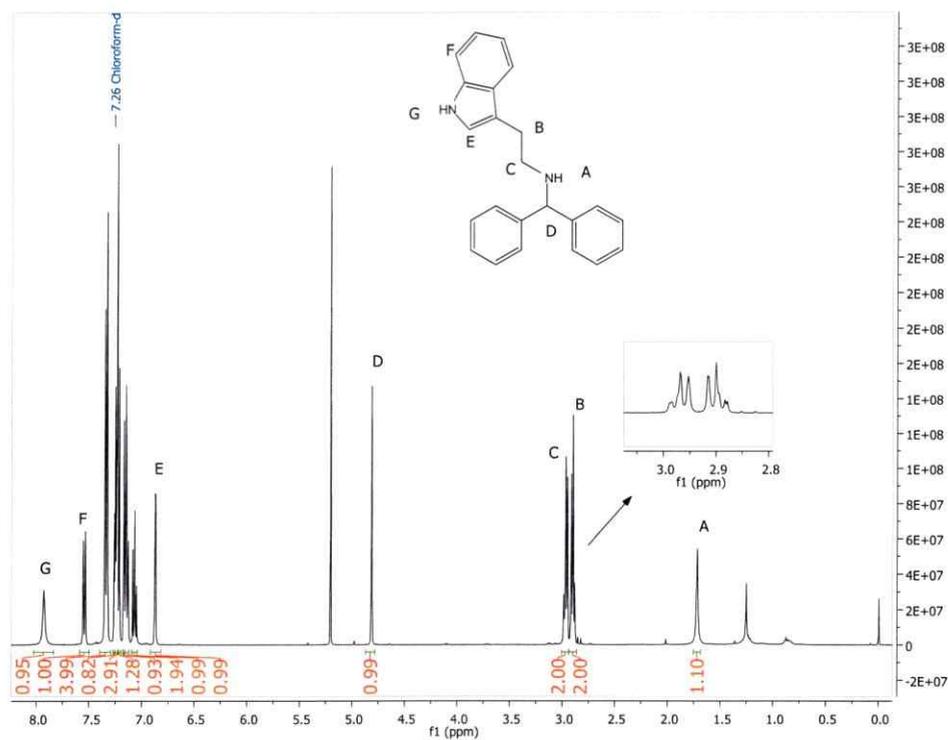
West, A. R.; Galloway, M. P. Inhibition of Glutamate Reuptake Potentiates Endogenous Nitric Oxide-Facilitated Dopamine Efflux in the Rat Striatum: An in Vivo Microdialysis Study. *Neurosci. Lett.* **1997**, *230*, 21–24.

Yung-Chi, C.; Prusoff, W. H. Relationship between the Inhibition Constant (KI) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 per Cent Inhibition (I50) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.

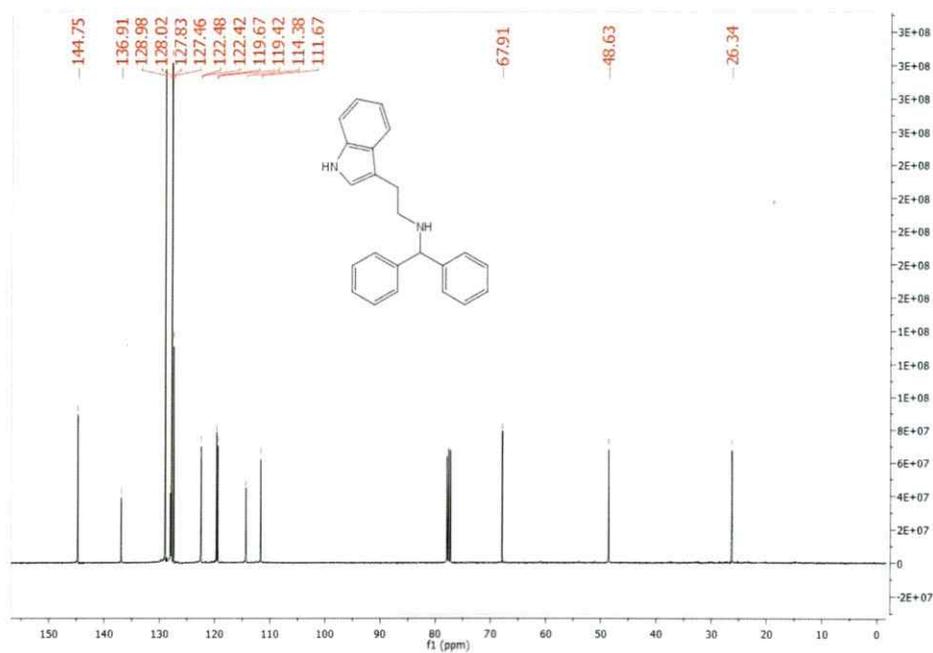
Zhou, F. C.; Tao-Cheng, J.-H.; Segu, L.; Patel, T.; Wang, Y. Serotonin Transporters Are Located on the Axons beyond the Synaptic Junctions: Anatomical and Functional Evidence. *Brain Res.* **1998**, *805*, 241–254.

6. ANEXO I

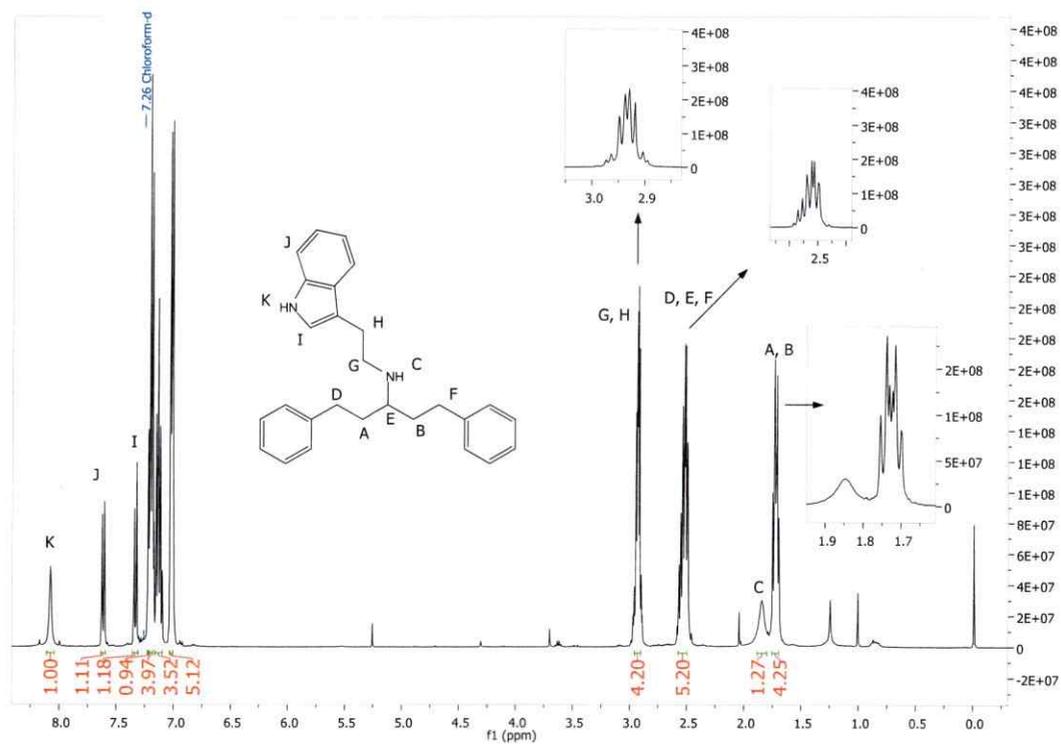
I. RMN-H de 1,1-DFT.



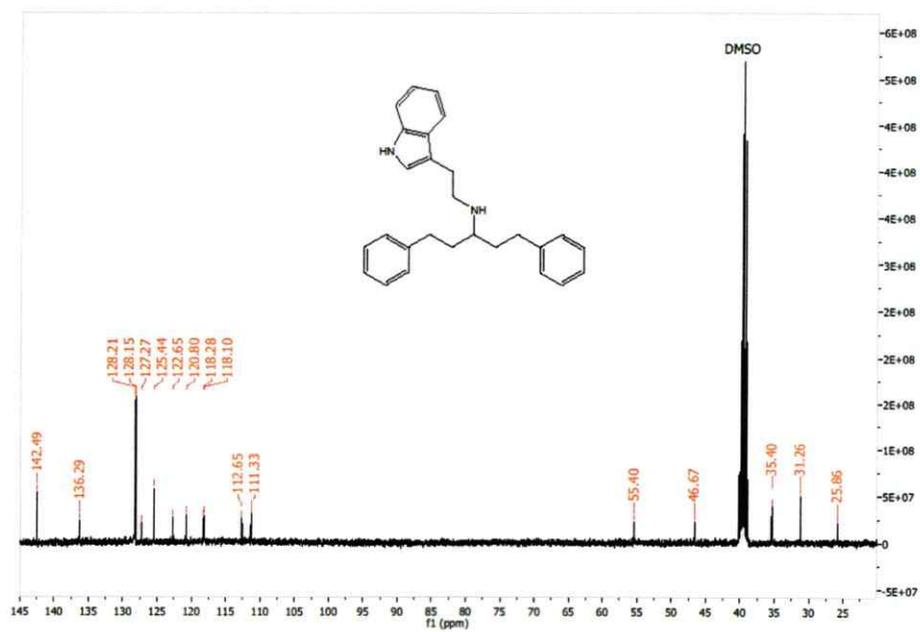
II. RMN-¹³C de 1,1-DFT.



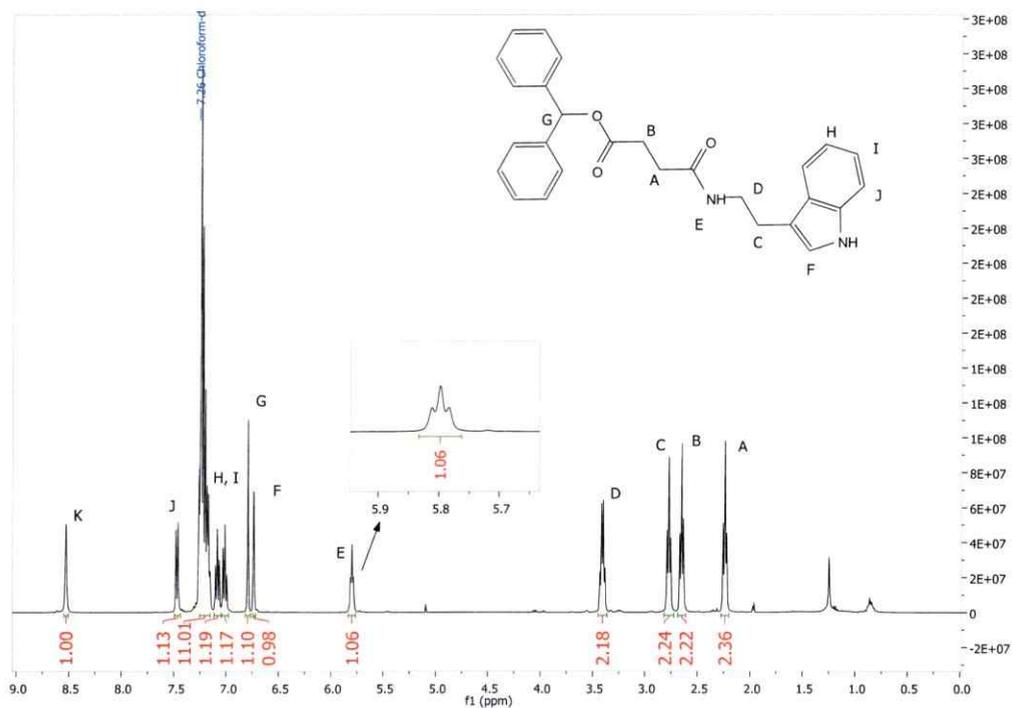
III. RMN-H de 1,5-DFT.



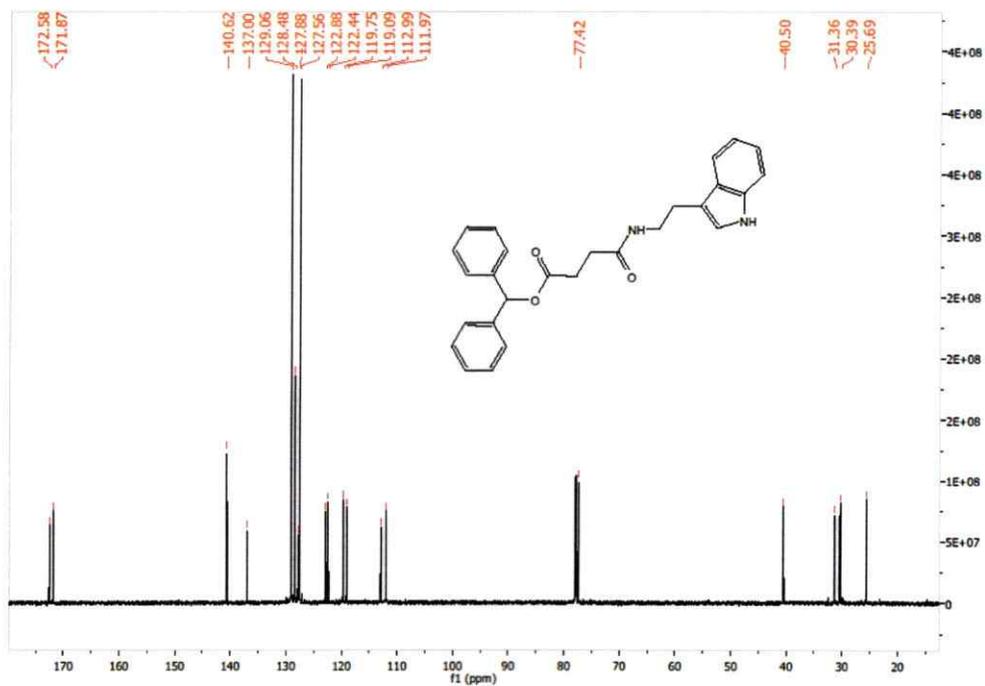
IV. RMN-¹³C de 1,5-DFT.



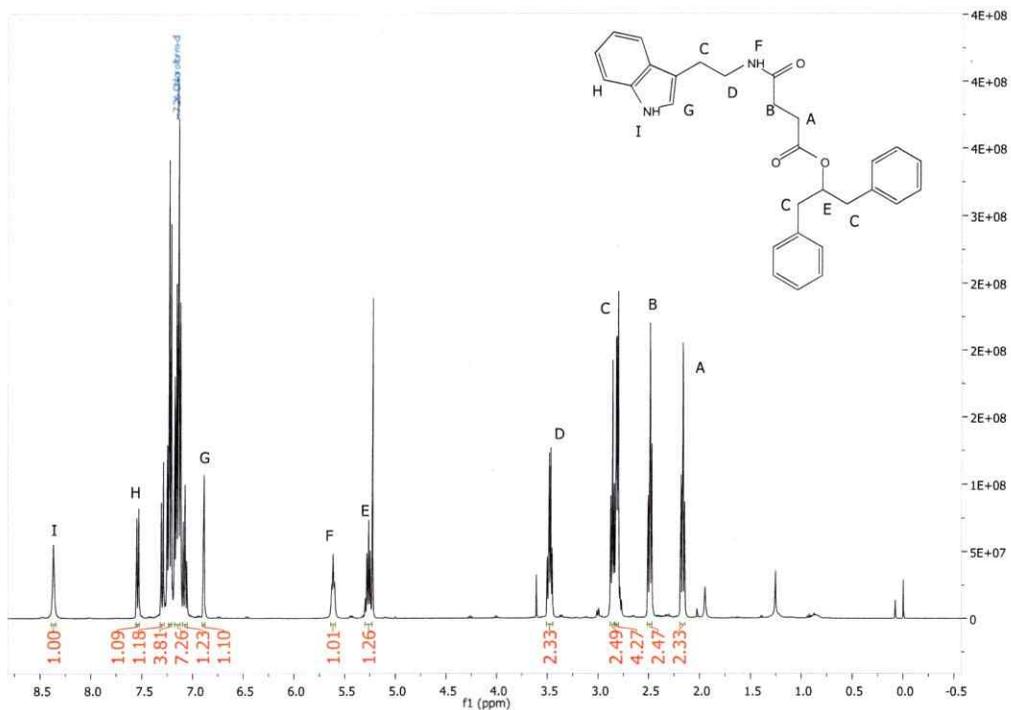
V. RMN-H de 1,1-DFTS.



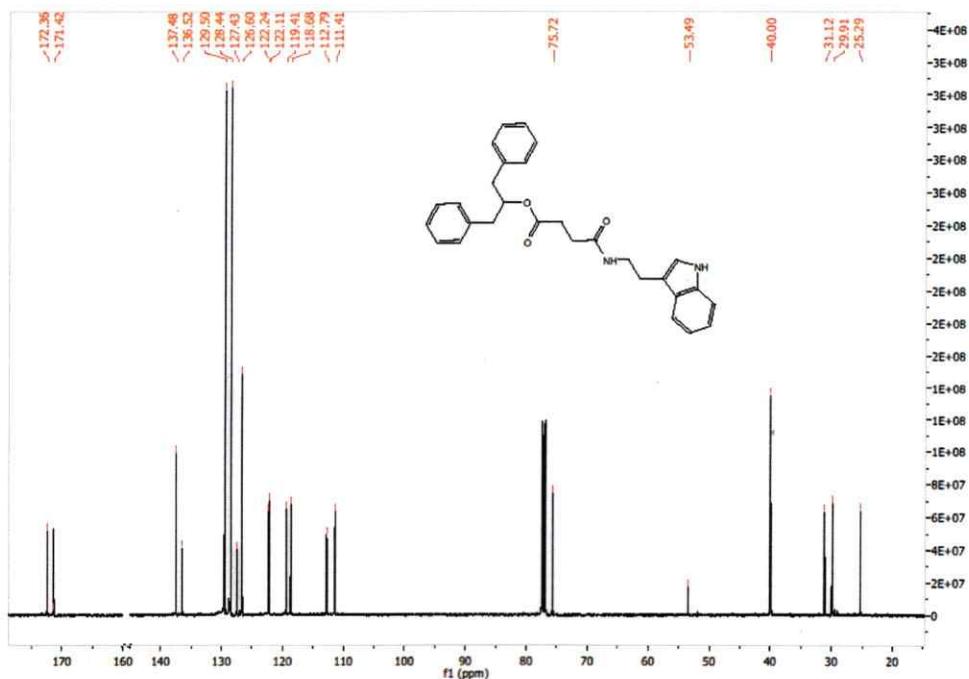
VI. RMN-¹³C de 1,1-DFTS.



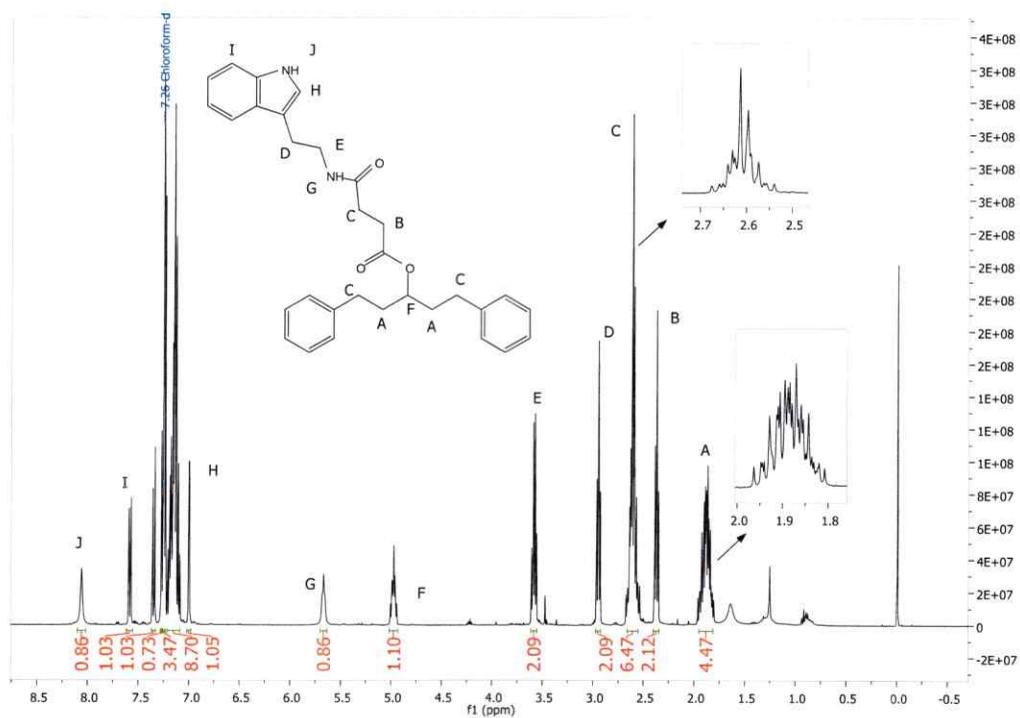
VII. RMN-H de 1,3-DFTS.



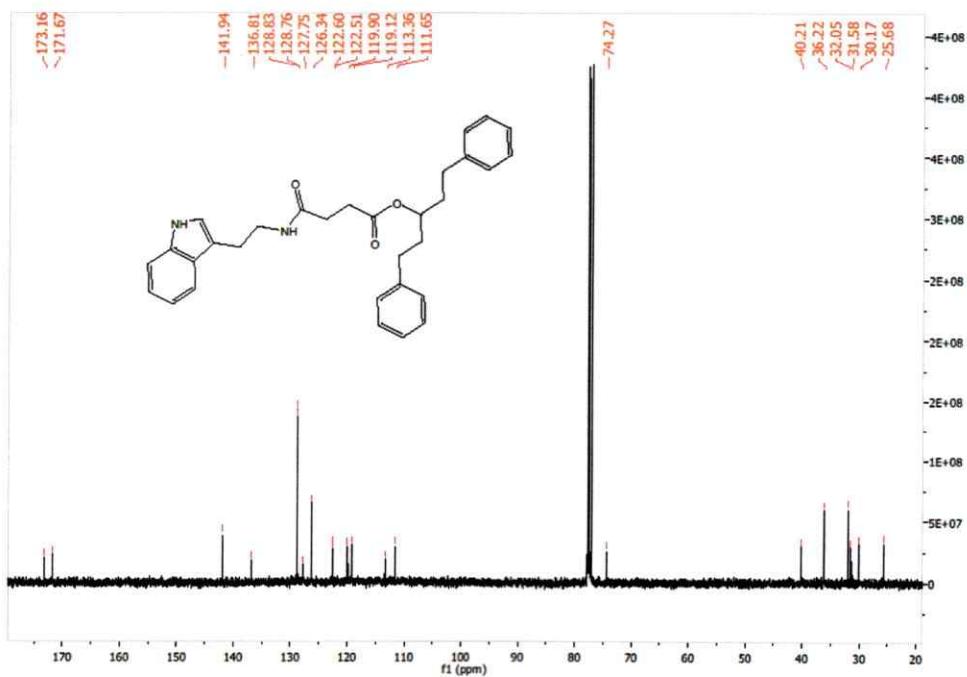
VIII. RMN-¹³C de 1,3-DFTS.



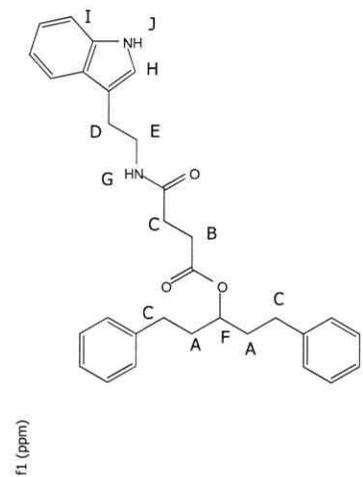
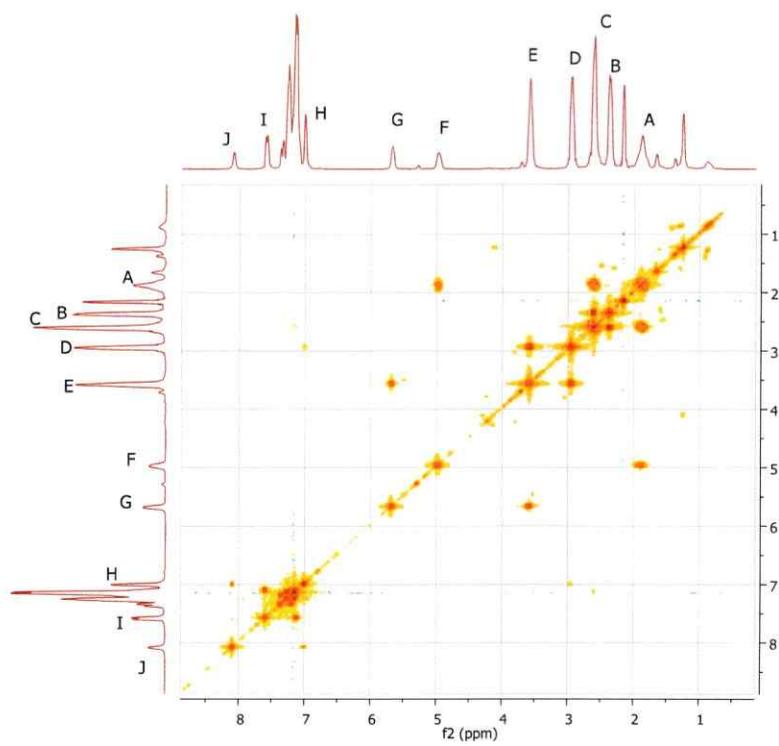
IX. RMN-H de 1,5-DFTS.



X. RMN-¹³C de 1,5-DFTS.



XI. **COSY 1,5-DFTS**



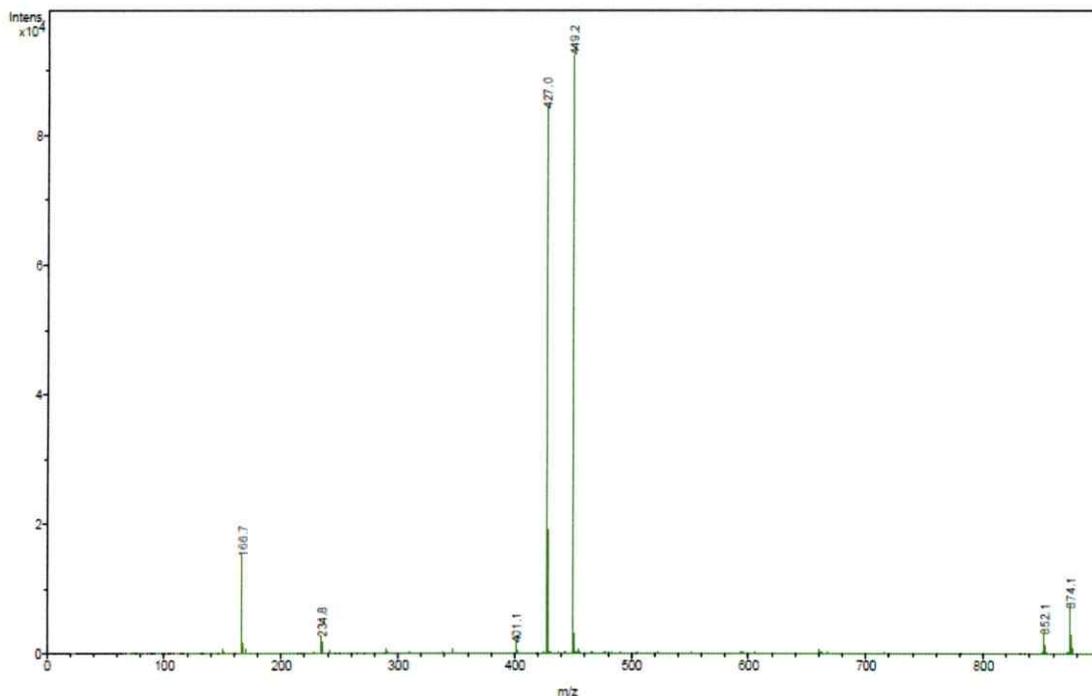
7. ANEXO II

Espectrometría de masa.

I. Preparación de muestras:

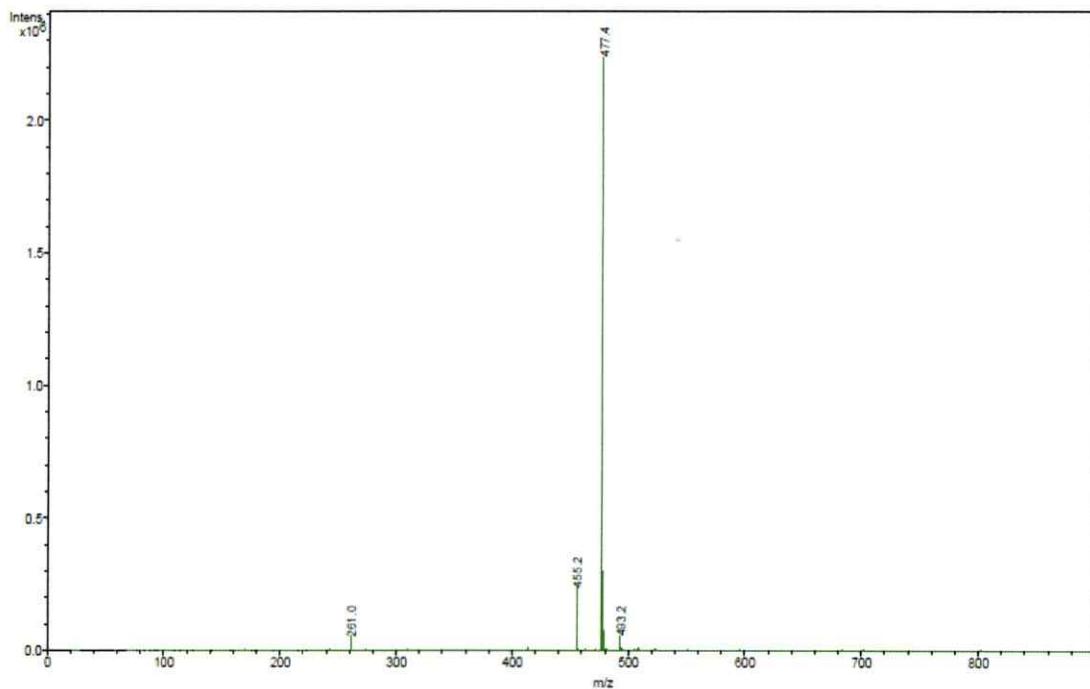
Se prepararon soluciones de stock de 1,1-DFTS en acetona, 1,3-DFTS y 1,5-DFTS en etanol, a partir de las cuales se prepararon las soluciones de trabajo 1 y 2 según las siguientes cantidades: 1 mg/mL de cada compuesto (en acetona o etanol según corresponda) y ácido fórmico 0,1% v/v (preparación 1), y 1 mg/mL de cada compuesto en acetona o etanol 80% v/v, agua 20% v/v y ácido fórmico 0,1% v/v (preparación 2).

Espectro de masas: 1,1-DFTS (modo positivo, preparación 1).



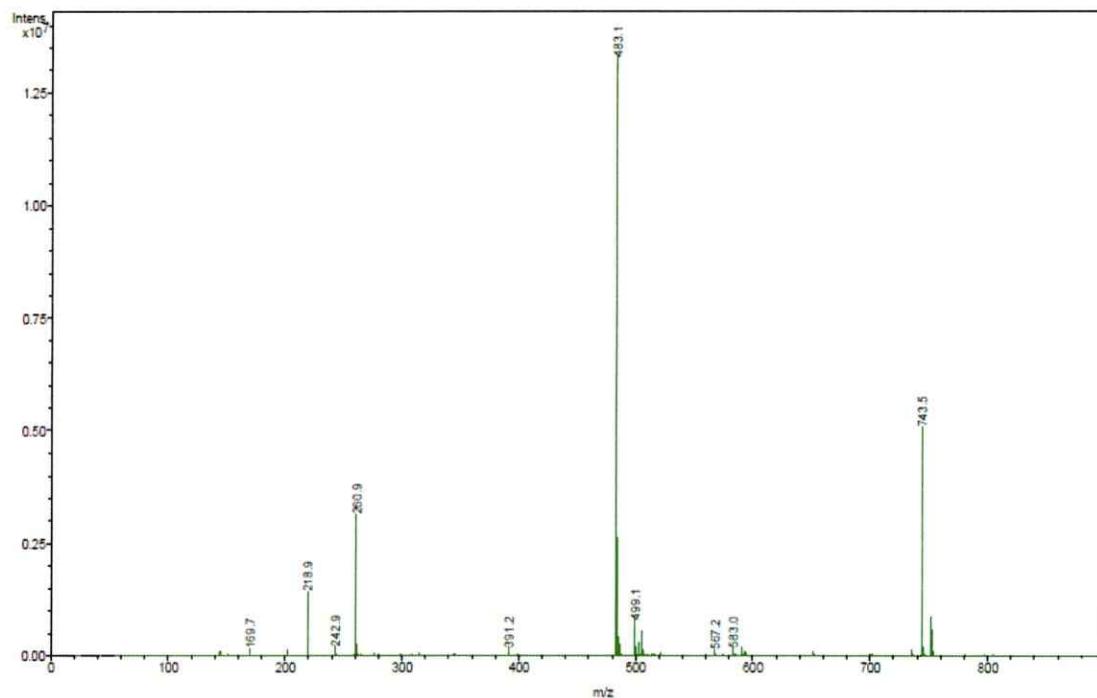
Para la preparación 1 del compuesto 1,1-DFTS (fórmula $C_{27}H_{26}N_2O_2$; masa nominal 426 g/mol) se observó en modo positivo mayoritariamente las señales m/z 427, m/z 449, m/z 852 y m/z 874 que corresponderían a la forma protonada (especie $[M+H]^+$), forma sódica (especie $[M+Na]^+$), dímero protonado (especie $[2M+H]^+$) y dímero sódico (especie $[2M+Na]^+$) respectivamente.

Espectro de masas: 1,3-DFTS (modo positivo, preparación 1).



Para la preparación 1 del compuesto 1,3-DFTS (fórmula $C_{29}H_{30}N_2O_3$; masa nominal 454 g/mol) se observó en modo positivo las señales m/z 455, m/z 477 y m/z 493 correspondientes a las especies protonada ($[M+H]^+$), aducto sódico ($[M+Na]^+$) y potásico ($[M+K]^+$).

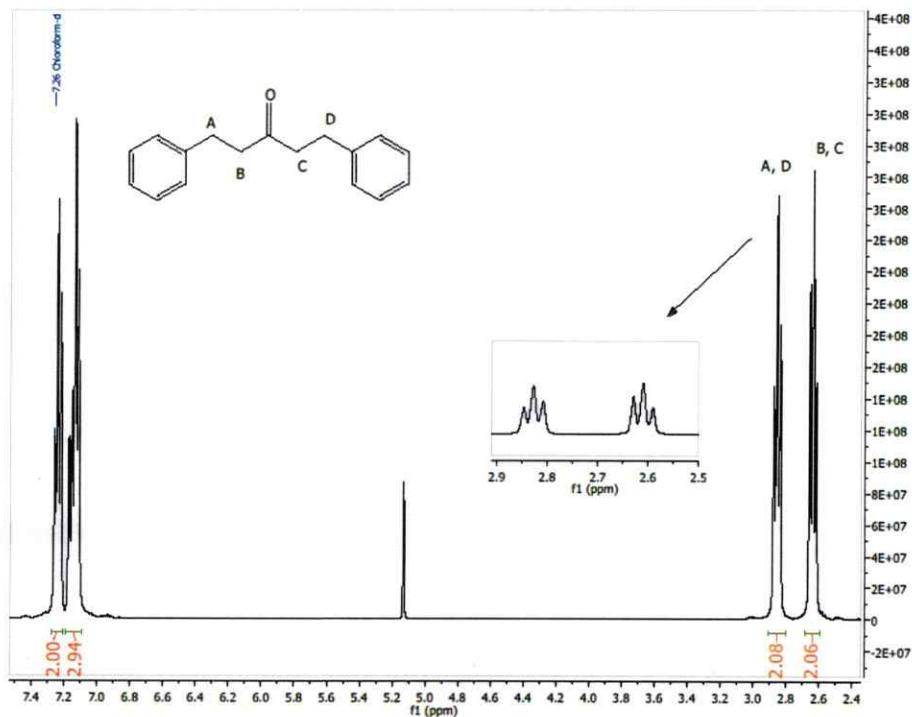
Espectro de masas: 1,5-DFTS (modo positivo, preparación 2).



Para la preparación 2 del compuesto 1,5-DFTS (fórmula $C_{31}H_{34}N_2O_3$; masa nominal 482 g/mol) se observó en modo positivo la señal m/z 483 correspondiente a la especie protonada ($[M+H]^+$) las otras señales observadas no corresponderían a aductos, lo que sugiere la presencia de contaminantes.

8. ANEXO III

I. RMN-H de 1,5-Difenil-3-pentanona.



II. RMN-H de 1,5-Difenil-3-pentanol.

