



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas
"Dr. Alejandro C. Paladini" (IQUIFIB)

**“SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS DE
CHALCONAS Y FLAVANONAS Y SU
POTENCIAL EFECTO SOBRE EL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL”**

Tesista: **MSc. Farm. Josefina Higgs**

Directora: **Prof. Dra. Mariel Marder**

Tesis presentada para optar por el título de Doctora
de la Universidad de Buenos Aires

2016

A mis padres

A Martín

Agradecimientos

A Mariel por la formación y las oportunidades que me brindó. Por su calidez, cariño, comprensión y la bondad que me brindó durante todos estos años. Por su confianza y por creer en mí.

A Cristina, por sus sabios consejos, cariño, ayuda y generosidad.

A Valentina por sus charlas y todos los lindos momentos compartidos.

A Natalia por su música, revolución de pipetas y ayuda.

A todas ellas por su amistad y hacer del laboratorio un segundo hogar.

A Luciana Gavarnet por su amabilidad y ayuda en los estudios de “docking”.

A la UBA, el CONICET y la ANPCyT por financiar los proyectos de los que forma parte este trabajo.

Al MINCYT por financiar el programa de Cooperación Bilateral que me permitió realizar una pasantía de trabajo en Eslovenia.

A la Universidad de Ljubljana, al Dr Stanislav Gobec y sus becarios: Damijan, Matej, Martina, Marko y Kaja, por su cálida estadía y el trabajo realizado.

Al IQUIFIB y al plantel docente de Química Biológica por todo lo compartido en todos estos años.

A Nadia por compartir tareas y ayudarme siempre que lo necesité.

A Leonor, Julieta, Viviana, Maite, José Luis; Nicolás, Verónica por todos los almuerzos e historias compartidas a lo largo de estos años.

A Mariana por su amistad y ayuda de este trabajo.

A mis amigos Flor, Nati, Marga, Yesi, Mechy, Juli, Lula, Maru, Martín, Diego, Martín, Maxi, Marlene, Marie, Gianni, Cande, Leti, Nati, Jime, Andy y Tani por acompañarme en este proceso.

A Paz por estar siempre ahí.

A Hugo y Lito por su apoyo y confianza.

A mis tíos y primos por su ayuda y cariño.

A mis abuelos. A Lilia, por su ejemplo. A Chischis que siempre se interesó en mi trabajo y preguntaba por los ratones. A Oscar, por transmitirme su interés a las ciencias médicas, siempre seré su “boticaria”. Y en especial a Bilo, con quien nos debemos una despedida.

A Maru por ayudarme y acompañarme desde siempre.

A mis padres por la educación y los valores que me brindaron, por su apoyo incondicional, por cuidarme, malcriarme y por todo su cariño.

A mis ahijados Cata y Salvi, por llenar mi vida de alegría y demostrarme el valor de la vida en las pequeñas cosas. Por convertirme en Vina y cambiar mi vida por completo.

A Martín por su ayuda, escucha, consejos, abrazos y el sostén que hizo que este camino sea mucho más fácil. Por alentarme en todos mis proyectos. Por creer en mí, cuidarme y por sobre todo por su amor, que lo es todo.

Publicaciones

Publicaciones en revistas internacionales con referto

“In vitro binding affinities of a series of flavonoids for mu-opioid receptors. Antinociceptive effect of the synthetic flavonoid 3,3-dibromolavanone in mice”. Josefina Higgs, Cristina Wasowski, Leonardo M Loscalzo, Mariel Marder. Neuropharmacol. (ISSN: 0028-3908) 72:9-19 (2013).

Manuscritos en preparación

“Synthetic chalcones with affinity for Central Nervous System receptors related to pain, anxiety and depression”. Josefina Higgs, Cristina Wasowski, Mariel Marder.

“3,3-dibromoflavanone, a novel drug with central antinociceptive effects without the common side-effects of morphine”. Josefina Higgs, Cristina Wasowski, Colettis Natalia Mariel Marder.

Índice

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Abreviaturas | i |
| Resumen | iv |
| Introducción | 1-23 |
| 1 Introducción general..... | 1 |
| 1.1 Trastornos mentales y dolor | 1 |
| 1.1.1 Enfermedad de Alzheimer | 1 |
| 1.1.2 La ansiedad..... | 4 |
| 1.1.3 La depresión | 6 |
| 1.1.4 El dolor..... | 7 |
| 1.2 Comorbilidades..... | 14 |
| 1.3 Fuentes naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos..... | 15 |
| 1.3.1 Los flavonoides | 16 |
| 1.4 Descubrimiento de nuevos fármacos | 19 |
| 1.5 Chalconas y flavanonas: potenciales nuevos fármacos | 20 |
| Objetivos | 24 |
| 2 Objetivos | 24 |
| Materiales y métodos | 25-53 |
| 3 Materiales y métodos..... | 25 |
| 3.1 Compuestos utilizados..... | 25 |
| 3.2 Química | 25 |
| 3.2.1 Síntesis de chalconas | 25 |
| 3.2.2 Síntesis de 6-metil-8-nitroflavanona..... | 26 |
| 3.2.3 Síntesis de 3,3-dibromoflavanona | 27 |
| 3.3 Ensayos de inhibición enzimática y agregación del péptido A β ₁₋₄₂ | 28 |
| 3.3.1 Actividad inhibitoria frente a las colinesterasas | 28 |
| 3.3.2 Actividad inhibitoria frente a la MAO..... | 30 |
| 3.3.2.1 Ensayo de inhibición | 30 |
| 3.3.2.2 Ensayo de reversibilidad..... | 31 |
| 3.3.3 Inhibición de la agregación A β ₁₋₄₂ | 31 |
| 3.4 Ensayos de unión a receptores..... | 32 |
| 3.4.1 su-BDZ del receptor GABA _A | 33 |
| 3.4.1.1 Preparación de membranas sinaptosomales..... | 33 |
| 3.4.1.2 Procedimiento..... | 33 |
| 3.4.2 Receptor 5-HT _{1A} | 33 |
| 3.4.2.1 Preparación de membranas sinaptosomales..... | 33 |
| 3.4.2.2 Procedimiento..... | 34 |
| 3.4.3 Receptor μ -opioide | 34 |
| 3.4.3.1 Preparación de membranas sinaptosomales..... | 34 |
| 3.4.3.2 Procedimiento..... | 35 |
| 3.5 Estudios de acoplamiento (“docking”)..... | 35 |
| 3.6 Ensayos Farmacológicos | 36 |
| 3.6.1 Animales..... | 36 |
| 3.6.2 Disolución de las drogas y vías de administración | 37 |
| 3.6.3 Tratamientos | 37 |
| 3.6.4 Ensayo del laberinto en cruz elevado (“Elevated plus-maze test”)..... | 37 |
| 3.6.5 Ensayo de campo abierto con agujeros (“Hole board test”) | 38 |
| 3.6.6 Ensayo de medición de la actividad locomotora espontánea..... | 40 |
| 3.6.7 Ensayo de suspensión por la cola (“Tail suspension test”)..... | 40 |
| 3.6.8 Laberinto en Y de alternancia espontánea (“Y-maze”) | 41 |
| 3.6.9 Prueba del cilindro rotatorio (“Rotarod test”)..... | 43 |
| 3.6.10 Ensayo de la malla invertida (“Inverted screen test”)..... | 43 |
| 3.6.11 Ensayo del alambre horizontal..... | 44 |
| 3.6.12 Ensayo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético (“Writhing test”) | 45 |
| 3.6.13 Ensayo de la plancha caliente (“Hot plate test”)..... | 45 |
| 3.6.14 Efecto antinociceptivo en el tiempo | 46 |
| 3.6.15 Ensayo de la formalina | 47 |
| 3.6.16 Estudios de bloqueo con antagonistas específicos..... | 47 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 3.6.16.1 Ensayos de bloqueo de la acción de la 3,3-dibromoflavanona | 48 |
| 3.6.16.2 Ensayos de bloqueo de la acción de la 5'-metil-2'-hidroxi-3-nitrochalcona | 49 |
| 3.6.17 Ensayo del carbón activado ("charcoal meal test") | 49 |
| 3.6.18 Dependencia | 49 |
| 3.6.19 Estudio comparativo del tratamiento agudo y crónico de 3,3-dibromoflavanona y morfina en los ensayos de la plancha caliente, actividad locomotora, malla invertida y del carbón activado. | 51 |
| 3.6.20 Administración combinada de 3,3-dibromoflavanona y morfina | 51 |
| 3.7 Análisis de los resultados | 51 |
| 3.7.1 Análisis de los ensayos de inhibición enzimática | 51 |
| 3.7.2 Análisis de los ensayos de unión a receptores | 52 |
| 3.7.3 Análisis de los resultados farmacológicos | 52 |
| Parte I: Síntesis de derivados de flavonoides | 54- 69 |
| 4.1 Química | 54 |
| 4.1.1 Chalconas | 54 |
| 4.1.1.1 Introducción..... | 54 |
| 4.1.1.1.1 Chalconas con actividad inhibitoria sobre AChE | 54 |
| 4.1.1.1.2 Chalconas con actividad inhibitoria sobre BChE | 55 |
| 4.1.1.1.3 Chalconas con actividad inhibitoria sobre la MAO..... | 55 |
| 4.1.1.1.4 Chalconas con actividad anti-agregante del péptido A β | 55 |
| 4.1.1.1.5 Chalconas con actividad ansiolítica..... | 55 |
| 4.1.1.1.6 Chalconas con afinidad por el receptor GABA _A | 56 |
| 4.1.1.1.7 Chalconas con efectos símil-antidepresivos | 56 |
| 4.1.1.1.8 Chalconas con actividad antinociceptiva periférica..... | 56 |
| 4.1.1.1.9 Chalconas con actividad antinociceptiva central | 57 |
| 4.1.1.1.10 Chalconas con afinidad por el receptor μ -opioide | 57 |
| 4.1.1.2 Resultados | 57 |
| 4.1.1.2.1 Chalconas sintetizadas | 57 |
| 4.1.1.2.2 Identificación de los compuestos obtenidos | 58 |
| 4.1.2 Flavanonas | 65 |
| 4.1.2.1 Introducción..... | 65 |
| 4.1.2.2 Resultados | 67 |
| 4.1.2.2.1 Flavanonas sintetizadas | 67 |
| 4.1.2.2.2 Identificación de los compuestos obtenidos | 67 |
| 4.1.3 cLog P de los compuestos sintetizados..... | 68 |
| 4.1.4 Discusión | 69 |
| Parte II: Inhibición enzimática y de la agregación del péptido A β₁₋₄₂..... | 70 – 100 |
| 4.2 Ensayos de inhibición enzimática y de la agregación del péptido A β ₁₋₄₂ | 70 |
| 4.2.1 Estudio <i>in vitro</i> de la capacidad de los compuestos sintetizados de inhibir a la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa..... | 70 |
| 4.2.1.1 Introducción..... | 70 |
| 4.2.1.1.1 Estructura y función de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa..... | 70 |
| 4.2.1.1.2 La AChE y BChE en la EA | 72 |
| 4.2.1.1.3 Flavonoides como inhibidores de la acetilcolinesterasa AChE | 73 |
| 4.2.1.2 Resultados | 74 |
| 4.2.1.2.1 Estudio sobre la μ AChE | 75 |
| 4.2.1.2.1.1 Curvas de inhibición..... | 75 |
| 4.2.1.2.2 Estudio sobre la hBChE..... | 76 |
| 4.2.1.3 Discusión | 77 |
| 4.2.2 Estudio <i>in vitro</i> de la capacidad de los compuestos sintetizados de inhibir a Monoamino oxidasa..... | 79 |
| 4.2.2.1 Introducción..... | 79 |
| 4.2.2.1.1 Estructura y función de la Monoamino Oxidasas | 79 |
| 4.2.2.1.2 La MAO en la depresión y enfermedades neurodegenerativas..... | 81 |
| 4.2.2.1.3 Flavonoides como inhibidores de la MAO | 82 |
| 4.2.2.2 Resultados | 83 |
| 4.2.2.2.1 Estudio sobre la hMAO A | 84 |
| 4.2.2.2.2 Estudio sobre la hMAO B | 84 |
| 4.2.2.2.2.1 Curvas de inhibición..... | 85 |
| 4.2.2.2.2.2 Estudio de reversibilidad de la unión de la 4'-metoxi- 2'-hidroxichalcona (3) y la 4', 5'-dimetil- 2'-hidroxichalcona (11) a la hMAO B..... | 88 |

| | | |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 4.2.2.3 | Discusión | 88 |
| 4.2.3 | Estudio <i>in vitro</i> de la capacidad de los compuestos sintetizados de inhibir la agregación del péptido A β | 93 |
| 4.2.3.1 | Introducción..... | 93 |
| 4.2.3.1.1 | Estructura y función del péptido A β | 93 |
| 4.2.3.1.2 | El péptido A β en la EA..... | 94 |
| 4.2.3.1.3 | Polifenoles como inhibidores de la agregación del péptido A β | 95 |
| 4.2.3.2 | Resultados | 97 |
| 4.2.3.2.1 | Estudio <i>in vitro</i> de la capacidad de los compuestos estudiados de inhibir la agregación del péptido A β ₁₋₄₂ | 97 |
| 4.2.3.3 | Discusión | 98 |
| 4.2.4 | Conclusiones | 100 |
| Parte III: Unión a receptores..... | | 101- 136 |
| 4.3 | Estudios <i>in vitro</i> de la interacción de los compuestos sintetizados con el su-BDZs del GABA _A y con los receptores 5-HT _{1A} y μ -opioide..... | 101 |
| 4.3.1 | Estudio <i>in vitro</i> de la interacción de los compuestos sintetizados con el su-BDZ..... | 101 |
| 4.3.1.1 | Introducción..... | 101 |
| 4.3.1.1.1 | Estructura y función del receptor GABA _A | 101 |
| 4.3.1.1.2 | El receptor GABA _A en la ansiedad..... | 103 |
| 4.3.1.1.3 | Flavonoides como ligandos del su-BDZ..... | 104 |
| 4.3.1.2 | Resultados | 105 |
| 4.3.1.2.1 | Desplazamiento de la unión específica de [³ H] FNZ..... | 105 |
| 4.3.1.2.2 | Curvas de desplazamiento de la unión específica de [³ H] FNZ..... | 106 |
| 4.3.1.3 | Discusión | 109 |
| 4.3.2 | Estudio <i>in vitro</i> de la interacción de los compuestos sintetizados con el receptor 5-HT _{1A} | 111 |
| 4.3.2.1 | Introducción..... | 111 |
| 4.3.2.1.1 | Estructura y función del receptor 5- HT _{1A} | 111 |
| 4.3.2.1.2 | El receptor 5-HT _{1A} en la depresión..... | 113 |
| 4.3.2.1.3 | El receptor 5-HT _{1A} en la ansiedad | 114 |
| 4.3.2.1.4 | Ligandos del receptor 5-HT _{1A} | 114 |
| 4.3.2.1.5 | Compuestos naturales como ligandos del receptor 5-HT _{1A} | 115 |
| 4.3.2.2 | Resultados | 115 |
| 4.3.2.2.1 | Desplazamiento de la unión específica de [³ H] 8-OH-DPAT..... | 115 |
| 4.3.2.2.2 | Curvas de desplazamiento de la unión específica de [³ H] 8-OH-DPAT..... | 116 |
| 4.3.2.3 | Discusión | 119 |
| 4.3.3 | Estudio <i>in vitro</i> de la interacción de los compuestos sintetizados con el receptor μ -opioide | 120 |
| 4.3.3.1 | Introducción..... | 120 |
| 4.3.3.1.1 | Estructura y función del receptor μ -opioide | 120 |
| 4.3.3.1.2 | El receptor μ -opioide en el dolor | 123 |
| 4.3.3.1.3 | Flavonoides como ligandos de los receptores opioide..... | 123 |
| 4.3.3.2 | Resultados | 127 |
| 4.3.3.2.1 | Desplazamiento de la unión específica de [³ H] DAMGO | 127 |
| 4.3.3.2.2 | Curvas de desplazamiento de la unión específica de [³ H] DAMGO | 127 |
| 4.3.3.2.3 | Acoplamiento molecular de la 3,3-dibromoflavanona (25)..... | 130 |
| 4.3.3.3 | Discusión | 133 |
| 4.3.4 | Conclusiones | 136 |
| Parte IV: Ensayos <i>in vivo</i> | | 137-153 |
| 4.4 | Ensayos Farmacológicos | 137 |
| 4.4.1 | Introducción..... | 137 |
| 4.4.1.1 | Modelo experimental de EA..... | 137 |
| 4.4.1.2 | Modelo experimental de ansiedad | 138 |
| 4.4.1.3 | Modelo experimental de depresión..... | 139 |
| 4.4.1.4 | Modelos experimentales de nocicepción | 140 |
| 4.4.2 | Resultados | 143 |
| 4.4.2.1 | Efecto de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (9) y 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (11) en el ensayo de amnesia inducida por escopolamina en la prueba del laberinto en Y de alternancia espontánea | 143 |
| 4.4.2.2 | Efecto de la chalcona (1), la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (9), la 4'-aminochalcona (14), la 4'-metilchalcona (15) y la 3-nitrochalcona en el ensayo del laberinto en cruz elevado..... | 145 |
| 4.4.2.3 | Efecto de la chalcona (1) y de la 6'-metoxi -2'-hidroxichalcona (5) en el ensayo de suspensión por la cola en ratones..... | 146 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 4.4.2.4 Efecto de los compuestos sintetizados en modelos animales de nocicepción..... | 147 |
| 4.4.2.4.1 Ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético | 148 |
| 4.4.2.4.2 Ensayo de la plancha caliente | 148 |
| 4.4.3 Discusión | 149 |
| Parte V: Estudio farmacológico del núcleo chalcona (1)..... | 154- 158 |
| 4.5 Estudio farmacológico del núcleo chalcona (1)..... | 154 |
| 4.5.1 Introducción..... | 154 |
| 4.5.2 Resultados | 154 |
| 4.5.2.1 Ensayo de suspensión por la cola | 154 |
| 4.5.2.2 Ensayo de actividad locomotora espontánea | 154 |
| 4.5.3 Discusión | 156 |
| Parte VI: Estudio farmacológico de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (9)..... | 159- 165 |
| 4.6 Estudio farmacológico de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (9) | 159 |
| 4.6.1 Introducción..... | 159 |
| 4.6.2 Resultados | 160 |
| 4.6.2.1 Ensayo del laberinto en cruz elevado | 160 |
| 4.6.2.2 Ensayo de campo abierto con agujeros | 160 |
| 4.6.2.3 Ensayo de la actividad locomotora espontánea | 161 |
| 4.6.2.4 Ensayo del alambre horizontal..... | 161 |
| 4.6.2.5 Prueba Rotarod | 162 |
| 4.6.3 Discusión | 163 |
| Parte VII: Estudio farmacológico de la 5'-metil -2'- hidroxil-3'-nitrochalcona (12)..... | 166-175 |
| 4.7 Estudio farmacológico de la 5'-metil -2'-hidroxil-3'-nitrochalcona (12)..... | 166 |
| 4.7.1 Introducción..... | 166 |
| 4.7.2 Resultados | 167 |
| 4.7.2.1 Prueba Rotarod | 167 |
| 4.7.2.2 Ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético | 167 |
| 4.7.2.3 Ensayo de la plancha caliente | 168 |
| 4.7.2.4 Bloqueo de la acción antinociceptiva de 5'-metil -2'- hidroxil-3'-nitrochalcona (12) | 169 |
| 4.7.2.5 Actividad locomotora espontánea..... | 170 |
| 4.7.2.6 Ensayo de campo abierto con agujeros | 170 |
| 4.7.2.7 Ensayo de suspensión por la cola | 172 |
| 4.7.2.8 Ensayo del laberinto en cruz elevado | 172 |
| 4.7.3 Discusión | 173 |
| Parte VIII: Estudio farmacológico de la 3,3-dibromoflavanona (25) | 176- 212 |
| 4.8 Estudio farmacológico de la 3,3-dibromoflavanona (25) | 176 |
| 4.8.1 Introducción..... | 176 |
| 4.8.1.1 Ensayos de nocicepción en tratamiento agudo | 176 |
| 4.8.1.2 Estudio de bloqueo | 176 |
| 4.8.1.3 Efecto de la 3,3-dibromoflavanona (25) en las comorbilidades asociadas al dolor..... | 177 |
| 4.8.1.4 Estudio de los efectos adversos más comunes que presentan los opiáceos | 177 |
| 4.8.1.4.1 Sedación | 178 |
| 4.8.1.4.2 Constipación | 178 |
| 4.8.1.4.3 Dependencia | 178 |
| 4.8.1.4.4 Tratamiento crónico y tolerancia | 179 |
| 4.8.1.5 Administración conjunta de morfina con 3,3-dibromoflavanona (25)..... | 179 |
| 4.8.2 Resultados | 180 |
| 4.8.2.1 Ensayo de la malla invertida..... | 180 |
| 4.8.2.2 Prueba de Rotarod | 180 |
| 4.8.2.3 Ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético | 182 |
| 4.8.2.4 Ensayo de la plancha caliente | 182 |
| 4.8.2.5 Curva de tiempo | 184 |
| 4.8.2.6 Ensayo de la formalina | 184 |
| 4.8.2.7 Estudio de bloqueo de la acción in vivo con antagonistas específicos | 186 |
| 4.8.2.8 Ensayo de suspensión por la cola | 187 |
| 4.8.2.9 Ensayo del laberinto en cruz elevado | 188 |
| 4.8.2.10 Ensayo de campo abierto con agujeros y la actividad locomotora espontanea | 189 |
| 4.8.2.11 Ensayo del carbón activado | 190 |
| 4.8.2.12 Dependencia | 191 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 4.8.2.13 Estudio comparativo del tratamiento agudo y crónico | 193 |
| 4.8.2.13.1 Evaluación del desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo | 193 |
| 4.8.2.13.2 Actividad locomotora espontánea..... | 193 |
| 4.8.2.13.3 Ensayo del carbón activado | 195 |
| 4.8.3.13.4 Ensayo de la malla invertida..... | 197 |
| 4.8.2.14 Efecto antinociceptivo de la administración conjunta del compuesto 25 con morfina en el ensayo de la plancha caliente | 197 |
| 4.8.3 Discusión | 200 |
| 4.8.3.1 Pruebas motoras..... | 200 |
| 4.8.3.2 Efecto antinociceptivo | 201 |
| 4.8.3.3 Estudio del mecanismo de acción <i>in vivo</i> | 202 |
| 4.8.3.4 Efecto de la 3,3-dibromoflavanona (25) en las comorbilidades asociadas al dolor crónico | 204 |
| 4.8.3.5 Estudio de los efectos adversos más comunes que presentan los opiáceos | 206 |
| 4.8.3.5.1 Sedación | 206 |
| 4.8.3.5.2 Constipación | 206 |
| 4.8.3.5.3 Dependencia | 207 |
| 4.8.3.5.4 Estudio comparativo del tratamiento agudo y crónico | 209 |
| 4.8.3.5.4.1 Tolerancia | 209 |
| 4.8.3.5.4.2 Efectos motores | 210 |
| 4.8.3.5.4.3 Constipación | 210 |
| 4.8.3.5.4.4 Ventajas del tratamiento crónico con 3,3 dibromoflavanona (25) | 211 |
| 4.8.3.6 Administración conjunta de morfina con 3,3-dibromoflavanona (25)..... | 211 |
| Discusión | 213- 217 |
| 5 Discusión general | 213 |
| Conclusiones..... | 218 |
| 6 Conclusiones | 218 |
| Referencias | 219- 235 |
| 7. Referencias | 219 |
| Anexo | 236- 250 |
| 8 Anexo | 236 |

Abreviaturas

[³H] 8-OH-DPAT: ³H 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina

[³H] DAMGO: ³H [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol⁵] encefalina

[³H] FNZ: ³H-flunitrazepam

3D-QSAR: estudios de relación estructura actividad tridimensional

5-HT: hidroxitriptamina, serotonina

8-OH-DPAT: 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina

ACh: acetilcolina

AChE: acetilcolinesterasa

AINES: antiinflamatorios no esteroideos

ApoE: apolipoproteína E

ATC: antidepresivos tricíclicos

ATCo: yoduro de acetiltiocolina

Aβ: beta amiloide

BChE: butirilcolinesterasa

BDZ: benzodiazepinas

BHE: barrera hematoencefálica

BTC: yoduro de butiriltiocolina

CAS: sitio activo catalítico

CCK: colecistocinina

CDCl₃: cloroformo deuterado

CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CI₅₀: concentración inhibitoria 50

COX: ciclooxigenasa

CPFm: corteza prefrontal medial

DMSO: dimetilsulfóxido

DON: donepecilo

DSM-IV: Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, cuarta edición

DTNB: 5'-ditiobis (ácido 2 nitrobenzoico) (reactivo de Ellman)

EA: Enfermedad de Alzheimer

EL: bucle extracelular

EP: Enfermedad de Parkinson

FAD: flavín adenín dinucleótido

FAP: fibras aferentes periféricas

GABA: ácido γ -aminobutírico
GI: gastrointestinal
GIRKs: canales de K^+ de rectificación interna
GPCR: receptores acoplados a proteína G
h: humana
HAD: hormona antidiurética
HFIP: hexafluoroisopropanol
HVA: ácido homovanílico
IAChE: inhibidores de la acetilcolinesterasa
IASP: Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
IL: bucle intracelular
IMAO: inhibidores de la monoamino oxidasa
IRSN: inhibidores de la re-captación de serotonina y noradrenalina
ISRS: inhibidores de la re-captación de serotonina
Ki: constante de inhibición
M: dominio transmembrana
MAO: monoaminoxidasa
MOR: morfina
mu: murina
NDR: núcleo dorsal el rafe
NGL: N-glicosilación
NMDA: receptores D-aspartato de N-metilo
NMR: resonancia magnética nuclear
NTX: naltrexona
OMS: Organización Mundial de la Salud
ON: óxido nítrico
ONF: ovillos neurofibrilares
P3: proteína 3
PAS: sitio aniónico periférico
PET: tomografía por emisión de positrones
PG: prostaglandinas
PKC: proteína kinasa C
PPA: proteína precursora de amiloide
PS: presenilina

RA: actividad residual

REA: Relación Estructura Actividad

RMN: Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

SAL: salina

SCOP: escopolamina

SNC: Sistema Nervioso Central

su-BDZ: sitio de unión a benzodiazepinas del receptor GABA_A

tr: tiempo de retención

TRPV: canal iónico de potencial receptor transitorio de la subfamilia vainilloide

VEH: vehículo

Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA), la ansiedad, la depresión y el dolor son patologías de alta prevalencia que disminuyen la calidad de vida y limitan la productividad de los individuos y constituyen un importante problema para la salud pública a nivel mundial. A pesar de la existencia de fármacos para el tratamiento de estas patologías, hay una necesidad clínica de hallar nuevos compuestos con menos efectos secundarios y más ventajas terapéuticas.

Los productos naturales, entre los que se encuentran los flavonoides, son un importante reservorio para el descubrimiento de nuevos fármacos. Estos productos son capaces, entre otras acciones a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), de interactuar de manera directa y/o indirecta con los sistemas esenciales de neurotransmisión cerebral y de modular la actividad de diversas enzimas. Debido a su capacidad de actuar sobre múltiples blancos biológicos y/o en modelos animales involucrados en estas patologías, se postula que los flavonoides son compuestos eficaces para el tratamiento de estas enfermedades.

El objetivo de este trabajo fue obtener derivados de flavonoides, del tipo chalcona y flavanona, para desarrollar fármacos más eficaces y/o con menos efectos secundarios que la terapéutica existente para la EA, la ansiedad, la depresión, el dolor y sus comorbilidades asociadas.

Existen antecedentes en la literatura que describen diversos derivados de **chalconas** y **flavanonas** con actividad relacionada a las patologías en estudio. Teniendo en cuenta los requerimientos estructurales compartidos según los datos bibliográficos, se sintetizaron veintiún chalconas mediante condensación aldólica, y dos flavanonas, por bromación del núcleo flavanona o ciclación de la chalcona correspondiente, con altos rendimientos. Las chalconas obtenidas presentaron sustituciones en los anillos A, B o ambos anillos de su estructura (con grupos metoxilo (-OCH₃), hidroxilo (-OH), nitro (-NO₂), metilo (-CH₃), amino (-NH₂), flúor (-F) cloro (-Cl) y bromo (-Br) en distintas posiciones del anillo A y grupos dimetilamino (-N(CH₃)₂), nitro (-NO₂), cloro (-Cl) y bromo (-Br) en distintas posiciones del anillo B).

Se evaluó la capacidad de estos compuestos de inhibir la agregación del péptido beta amiloide (A β ₁₋₄₂) y la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa murina (μ ACH_E), butirilcolinesterasa humana (hBChE), monoaminoxidasa A y B humana (hMAO A y B) y de unirse a distintos receptores cerebrales por el desplazamiento de ligandos específicos marcados: [³H] FNZ (sitio de unión de las benzodiazepinas en el receptor GABA_A (su-

BDZ)), [³H] 8-OH-DPAT (serotonina 5-HT_{1A}) y [³H] DAMGO (μ-opioide). Trece chalconas presentaron actividad inhibitoria por la hMAO B (con CI₅₀ < 10 μM); tres presentaron actividad antiagregante del péptido Aβ₁₋₄₂ (con un porcentaje de inhibición en la agregación > 40 % a 10 μM); dos inhibieron a la muAChE (con CI₅₀ < 10 μM); nueve derivados mostraron afinidad por el receptor μ-opioide (con Ki < 30 μM), siete compuestos por el su-BDZ (con Ki < 30 μM) y solo dos chalconas presentaron afinidad por el receptor 5-HT_{1A} (con Ki < 30 μM).

Los compuestos más activos fueron evaluados en modelos animales murinos relacionados con su efecto *in vitro*. Los resultados mostraron que:

_ La 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) (CI₅₀ muAChE: 10.2 ± 1.7 μM y CI₅₀ hMAO B: 2.4 ± 0.5 μM) y la 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**) (CI₅₀ muAChE: 6.9 ± 1.3 μM, CI₅₀ hMAO B: 0.2 ± 0.02 μM y 41.4 ± 1.7 % de inhibición de la agregación Aβ₁₋₄₂ a 10 μM) no afectaron la memoria de trabajo evaluada en el ensayo de laberinto en Y, y no lograron revertir el deterioro cognitivo inducido por la escopolamina (modelo farmacológico de deterioro cognitivo relacionado a la EA).

_ El núcleo chalcona (**1**) (Ki 5-HT_{1A}: 20.8 ± 1.5 μM) presentó actividad símil-antidepresiva en el ensayo de suspensión por la cola.

_ La 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) (Ki su-BDZ: 6.1 ± 1.5 μM) reveló efectos ansiolíticos en el ensayo en cruz elevado, sin presentar los efectos adversos comunes de las benzodiazepinas, como sedación, miorelajación y ataxia.

_ La 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (**6**) y la 3-nitrochalcona (**17**) presentaron efectos antinociceptivos a nivel periférico.

_ La 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) (Ki μ-opioide: 13.5 ± 6.9 μM) ejerció efectos antinociceptivos a nivel periférico y central (ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético y de la plancha caliente), sin presentar alteraciones de la coordinación motora ni efectos sedativos a las dosis evaluadas. Los estudios *in vitro* e *in vivo* (antagonismo) sugieren que esta acción estaría mediada por el receptor μ-opioide.

_ La 3,3-dibromoflavanona (Ki μ-opioide: 0.8 ± 0.3 μM) mostró actividad antinociceptiva dosis dependiente, a nivel periférico y central, en modelos de nocicepción térmicos (ensayo de la plancha caliente) y químicos (ensayos de contorsiones abdominales y formalina), mediada por el receptor μ-opioide. Además, presentó efectos símil-antidepresivos (ensayo de suspensión por la cola) en las mismas dosis en las que presentó antinocicepción. A diferencia de la droga de referencia morfina, no evidenció sedación,

incoordinación motora, disminución de la motilidad gastrointestinal, tolerancia y dependencia, en las dosis ensayadas.

Por lo tanto, las chalconas obtenidas representan estructuras prometedoras en la química medicinal con actividad sobre múltiples blancos biológicos y con diversos efectos *in vivo*. A su vez, la 3,3-dibromoflavanona surge como un derivado promisorio para el tratamiento del dolor, con la ventaja de presentar efectos símil-antidepresivos, comorbilidad asociada a esta patología, y sin producir los efectos adversos más comunes de la morfina.

Estos resultados contribuyen al desarrollo de nuevas drogas derivadas de flavonoides con acción sobre el SNC, con el objetivo de obtener medicamentos efectivos, con menos efectos secundarios y más ventajas terapéuticas que los utilizados en la actualidad para el tratamiento de los trastornos mentales y el dolor.

Introducción

1 Introducción general

1.1 Trastornos mentales y dolor

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la salud como un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente como la ausencia de afecciones o enfermedades. La salud mental es tan importante como la salud física para el bienestar general de los individuos y las sociedades. Los trastornos mentales y conductuales se consideran afecciones de importancia clínica, caracterizadas por alteraciones de tipo emocional, cognitivo y/o de comportamiento, en la que están afectados diferentes procesos psicológicos como las emociones, la motivación, la conducta, la percepción, las sensaciones, el aprendizaje y el lenguaje, entre otros. Estos no son sólo variaciones dentro de la “normalidad”, sino fenómenos claramente anormales o patológicos responsables, por lo general, de importantes discapacidades. Los más frecuentes son: la ansiedad, la depresión y la enfermedad de Alzheimer (EA) (Organización Mundial de la Salud, 2001).

Por otro lado, el dolor es uno de los principales problemas de salud. El dolor agudo puede ser considerado como un síntoma de una enfermedad o lesión. En cambio, el dolor crónico genera importantes discapacidades físicas y mentales pudiendo convertirse él mismo en enfermedad (Gustorff y col., 2010).

Estas patologías son de alta prevalencia y se encuentran entre las principales causas que limitan la productividad y disminuyen la calidad de vida de los individuos generando un gran impacto a nivel individual, familiar, laboral, social y económico y, a su vez, representan un gasto significativo a los sistemas de salud a lo largo de todo el mundo. A continuación, se describe someramente cada una de las patologías con sus respectivas terapias y las limitaciones de las mismas.

1.1.1 Enfermedad de Alzheimer

La EA es una enfermedad neurodegenerativa y el tipo de demencia más común en todo el mundo. Se caracteriza por el desarrollo gradual de pérdida de memoria y otras funciones cognitivas, como trastornos en el lenguaje, desorientación visoespacial, apraxia ideacional e ideomotora, acinesia, problemas para llevar a cabo actividades conocidas y habituales, cambios en el comportamiento y la personalidad, entre otros (Shah y col., 2008).

Existen dos tipos de EA: la de inicio temprano y la asociada a la edad. En la primera, los síntomas aparecen antes de los 60 años, está relacionada con factores

genéticos y afecta al 5% de los pacientes. Mientras que la asociada a la edad es de aparición tardía (65 años o más), aparece de forma esporádica y la presenta la mayoría de los pacientes (Hung y col., 2016).

Actualmente, la EA afecta al menos a 30 millones de personas en todo el mundo. Debido a los avances en el cuidado de la salud, la esperanza de vida más larga y el continuo aumento de la edad media de la población, se estima que la prevalencia aumentará en los próximos años. Una proyección realizada a nivel mundial sugiere que para el año 2050, una de cada 85 personas tendrá EA. Por ser una causa importante de discapacidad, que implica atención médica a largo plazo, se calcula que el costo de la asistencia sanitaria será de cientos de billones de dólares (Tayeb y col., 2012).

Las principales características patológicas de esta enfermedad son una extensa pérdida sináptica y de neuronas, astrogliosis y acumulación de depósitos de proteínas. Los cerebros de pacientes con EA se caracterizan por la presencia de placas β -amiloides y ovillos neurofibrilares (ONF), los cuales son las características distintivas de esta patología. Las placas β -amiloides son depósitos extracelulares, cuyo componente principal es la proteína β -amiloide ($A\beta$) (García-Ayllón y col., 2011).

La enfermedad de inicio temprano se ha relacionado con factores genéticos, específicamente mutaciones de la proteína precursora del amiloide (PPA) y genes de presenilina 1 y 2 (PS1 y PS2), que afectan el procesamiento, el tráfico y el reciclaje del péptido $A\beta$ (McDonald y col., 2010).

Para explicar la posible etiología de la enfermedad en casos tardíos se han propuesto varias hipótesis. La primera que se desarrolló, a mediados de la década del 70, fue la “Hipótesis colinérgica” que propone que la degeneración de las neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal y la pérdida asociada de la neurotransmisión colinérgica en la corteza cerebral, y en otras áreas, contribuyen significativamente al deterioro de la función cognitiva en pacientes con EA (Francis y col., 1999). Por otro lado, la “Hipótesis de la cascada amiloide” desarrollada en la década del 90, sugiere que el evento inicial en la patogénesis de la EA es el metabolismo aberrante de la PPA, que lleva a la agregación del péptido $A\beta$, específicamente del $A\beta_{1-42}$ (Shah y col., 2008).

La aproximación fisiopatológica actual está basada en un número de mecanismos comunes de neurodegeneración, que incluye la acumulación anormal de proteínas ($A\beta$ y tau), alteraciones mitocondriales, estrés oxidativo, deterioro de las vías de señalización de la insulina, desequilibrio de la homeostasis del calcio, exceso o deficiencia de iones metálicos como el zinc y el cobre, alteraciones en los niveles de neurotransmisores

(glutamato, acetilcolina, dopamina y serotonina), inflamación y alteraciones y pérdida sináptica temprana asociada a muerte celular por apoptosis tardía. Además, la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (ApoE) se ha identificado como un importante factor de riesgo genético para la forma esporádica de EA. El envejecimiento es el factor de riesgo no genético más importante para el desarrollo de la EA y también existen potenciales factores de riesgo ambientales que se encuentran en estudio como: traumatismos cerebrales, hiperlipidemia, obesidad, diabetes mellitus e hipertensión (Hung y col., 2016; McDonald, 2002). Desafortunadamente, ninguna teoría puede explicar adecuadamente todos los aspectos de la enfermedad. Determinar la causa de este trastorno neurodegenerativo es esencial para el desarrollo de tratamientos eficaces.

Los medicamentos aprobados en la actualidad actúan en los sistemas de neurotransmisores colinérgicos o glutamatérgicos. Las terapias diseñadas para revertir el déficit colinérgico están basadas en la importancia de la función colinérgica en la cognición. De hecho, los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) han demostrado ser moderadamente eficaces (García-Ayllón y col., 2011; León y col., 2013). La tacrina fue el primer inhibidor en ser comercializado, pero su uso se prohibió por su efecto hepatotóxico asociado (Shah y col., 2008). La segunda generación de AChE (donepezilo, rivastigmina y galantamina) presenta mayor eficacia y menores efectos adversos (entre los que se encuentran alteraciones gastrointestinales, insomnio y cefalea). Sin embargo, sus efectos terapéuticos no son permanentes y los pacientes evidencian un deterioro cognitivo progresivo (Craig y col., 2011).

Por otro lado, el antagonista de los receptores D-aspartato de N-metilo (NMDA), memantina, es el primer fármaco no colinérgico aprobado para el tratamiento de la EA moderada a severa. Este actúa a través de la neuromodulación del glutamato impidiendo la toxicidad neuronal que provoca el exceso crónico de glutamato, y, también, promueve la actividad fisiológica del receptor NMDA, vinculado a mecanismos de memoria y aprendizaje. Sus principales efectos adversos son los mareos, la confusión y la agresión (Geldmacher, 2007).

Si bien algunos pacientes pueden obtener un alivio temporal de los síntomas con los medicamentos aprobados, hasta el momento, no existen tratamientos capaces de detener por completo o disminuir la progresión de esta enfermedad, por lo que existe una necesidad urgente de encontrar nuevos fármacos con mayor eficacia (Craig y col., 2011).

1.1.2 La ansiedad

El Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, cuarta edición (DSM-IV) define a la ansiedad como una experiencia de miedo o aprehensión en respuesta anticipada a un peligro interno o externo acompañada de algunos, o todos los siguientes síntomas: tensión muscular, inquietud, síntomas autonómicos (simpáticos), hiperactividad (por ejemplo, diarrea, palpitaciones, respiración rápida o nerviosismo), o signos y síntomas cognitivos (por ejemplo, hipervigilancia, confusión, disminución de la concentración o el miedo a perder el control) (American Psychiatric Association, 2000). Existe una ansiedad normal y transitoria, que cumple una función adaptativa y prepara al individuo para la ejecución de tareas o alerta frente a posibles amenazas. Sin embargo, la ansiedad puede ser patológica cuando no se presenta como una respuesta proporcionada frente a un estímulo o si su intensidad y duración exceden los límites aceptables. En tales condiciones pierde su función adaptativa y se convierte en un problema para el individuo.

Dentro de la ansiedad patológica se describen los siguientes trastornos de ansiedad: trastornos de angustia sin agorafobia, trastorno de angustia con agorafobia, agorafobia sin historia de trastorno de angustia, fobia específica, fobia social, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por estrés postraumático, trastorno por estrés agudo, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de ansiedad debido a enfermedad médica, trastorno de ansiedad inducido por sustancias y trastorno de ansiedad no especificado (American Psychiatric Association, 2000).

Los trastornos de ansiedad se asocian con un marcado deterioro psicosocial y funcional a lo largo de la vida de los individuos que los padecen. En general, tienden a tener inicios tempranos y a ser más duraderos con la edad. Estimaciones realizadas en los Estados Unidos sugieren que los trastornos de ansiedad son la clase más común de trastornos mentales, afectando al 8-27 % de los niños y adolescentes en edad escolar y al 29 % de los adultos (Zalta, 2011). También, se ha determinado que las mujeres son dos veces más propensas a sufrir ansiedad que los hombres (Beesdo y col., 2009). Estos trastornos representan un gasto económico significativo a los sistemas de salud a nivel mundial, por ejemplo, un estudio realizado en Europa en 2010 estimó que el costo económico anual fue de 74.4 billones de euros (Gustavsson y col., 2011).

Por otra parte, los trastornos de ansiedad parecen aumentar el riesgo para el desarrollo de condiciones comórbidas, entre las que se destaca la depresión, que pueden aumentar la resistencia al tratamiento y contribuir a malestar psicológico (Zalta, 2011).

La etiología de los trastornos de ansiedad, a menudo, puede deberse a varios factores, que implican una combinación de experiencias de vida, riesgo ambiental familiar, factores psicosociales y genéticos (Pillay y Stein, 2007).

Existen dos tipos de tratamiento para los trastornos de ansiedad: la terapia cognitivo-conductual y la farmacológica, que utilizan ansiolíticos y antidepresivos. Los ansiolíticos como las benzodiazepinas (BDZ) se utilizan durante cortos periodos de tiempo. Para los trastornos de ansiedad crónicos o recurrentes y los trastornos de ansiedad predecibles, se prefieren los antidepresivos tricíclicos (ATC), buspirona o inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO), mientras que los inhibidores de la re-captación de serotonina (ISRS) y los inhibidores de la re-captación de serotonina y noradrenalina (IRSN) son farmacoterapia de primera línea para varios trastornos de ansiedad (Pillay y Stein, 2007).

Aunque estos fármacos suelen ser eficaces, el tratamiento clínico se encuentra muchas veces limitado por la incidencia de pacientes refractarios y también por la mala tolerancia a los efectos adversos de los fármacos utilizados. Los efectos secundarios más comunes de las BDZ son la sedación, la somnolencia y la dependencia física que lleva al síndrome de abstinencia, que incluye la recurrencia de la ansiedad. Por lo que las BDZ no se recomiendan para tratamientos a largo plazo a menos que otras opciones terapéuticas no sean efectivas. La buspirona presenta mayor efecto sobre los síntomas psíquicos que sobre las manifestaciones somáticas, genera menos reacciones adversas que las BDZ pero como desventaja su inicio de acción es más lento y se debe administrar dos veces al día para que las concentraciones plasmáticas se mantengan dentro del rango terapéutico. Los IMAO pueden causar importantes reacciones adversas cuando se administran con ciertos alimentos y con otros medicamentos, lo que puede dificultar su dosificación. Los ATC presentan efectos secundarios cardiovasculares, hipotensión postural, retención urinaria y su sobredosis puede ser mortal. Para los ISRS e IRSN se destacan la disfunción sexual, el insomnio y la ganancia o pérdida peso, entre otros efectos adversos (Arikian y Gorman, 2001).

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar medicamentos para los trastornos de ansiedad que sean mejor tolerados, actúen rápidamente y presenten una mejor respuesta que los fármacos utilizados en la actualidad (Pillay y Stein, 2007).

1.1.3 La depresión

La depresión comprende un amplio grupo de trastornos mentales siendo sus principales síntomas clínicos la pérdida del estado de ánimo, la disminución del disfrute y la apatía, asociados con síntomas somáticos tales como disminución del apetito, disfunción sexual y trastornos del sueño. También, se presentan sentimientos de desvalorización e ideas de muerte o suicidio.

El DSM-IV describe, dentro de los trastornos del ánimo, diferentes formas de trastornos depresivos, entre los que se encuentran: depresión mayor, distimia, depresión menor y el trastorno bipolar, también llamado enfermedad maniaco-depresiva (American Psychiatric Association, 2000).

Actualmente, 350 millones de personas en el mundo presentan depresión, que puede ser mortal si no se trata a tiempo (WHO, 2016). En 2005 la tasa de morbilidad por depresión alcanzó el 10 % de la población mundial. La OMS prevé que para el 2020 la depresión será la segunda causa de incapacidad en el mundo, detrás de enfermedades coronarias como infartos, insuficiencia coronaria o accidentes cerebrovasculares. Los trastornos del estado de ánimo constituyen los trastornos mentales con mayor impacto económico, tal es así que se estimó que el costo económico anual en el 2010 en Europa fue de 113.4 billones de euros (Gustavsson y col., 2011).

Los desórdenes depresivos afectan a personas de todas las edades, géneros y orígenes. Al menos 20 % de las mujeres y 12 % de los hombres se verán afectados en algún momento a lo largo de su vida. Las mujeres son doblemente susceptibles a sufrir depresión y los síntomas generalmente incrementan con la edad, pero a pesar de eso más hombres que mujeres mueren por suicidio (Guadarrama y col., 2006).

A menudo, la depresión es acompañada de ansiedad y además puede exacerbar el dolor, la angustia y la discapacidad asociada a problemas de salud físicos. La combinación de depresión con enfermedades crónicas empeora progresivamente la salud en comparación de la enfermedad física sola o incluso combinaciones de patologías físicas (National Institute for Health & Clinical Excellence (UK), 2010).

La depresión exógena (también llamada reactiva o depresión situacional) surge de un trauma externo o un evento estresante, como por ejemplo la pérdida del empleo o la muerte de un ser querido. En cambio, la depresión endógena se produce sin una causa identificable externa. La patogénesis de la depresión es compleja y aún no se ha establecido. Desde la clásica hipótesis de alteraciones de los neurotransmisores a la más reciente hipótesis de alteraciones neuroendocrinas, la depresión ha sido ampliamente

estudiada con diferentes teorías que se apoyan y se complementan entre sí. Actualmente, los estudios de la patogénesis tienen que ver principalmente con la teoría de los neurotransmisores, la neuroplasticidad, y los cambios funcionales del sistema endocrino (Gong y col., 2014; Guadarrama y col., 2006)

Los fármacos disponibles para tratar esta patología son: ISRS, ATC, IRSN, IMAO A y medicamentos para estabilizar el estado de ánimo (litio, anticonvulsivantes y antipsicóticos atípicos) (National Institute for Health & Clinical Excellence (UK), 2010). A pesar de la existencia de las terapias mencionadas, un tercio de los individuos afectados en tratamiento farmacológico no responden al mismo (Qu, 2014). Además, los efectos adversos, tales como ansiedad, trastornos del sueño, ganancia de peso y la disfunción sexual, generan la necesidad de desarrollar nuevos fármacos más eficaces y con menores efectos secundarios que los medicamentos usados en la actualidad.

1.1.4 El dolor

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), define al dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a una lesión tisular real o potencial, o descrita en términos de dicho daño (IASP, 2015).

Esta definición describe al dolor como una experiencia aversiva perceptual y afectiva compleja, determinada tanto por las respuestas biológicas a los estímulos nociceptivos como por el significado de esos estímulos para cada sujeto. Incluye los aspectos subjetivos del dolor, entendiéndolos como una experiencia codificada y memorizada por el individuo que va más allá de una mera transmisión de los impulsos sensoriales. Ello lleva a considerar el dolor como una experiencia subjetiva de gran complejidad en la que actúan numerosos factores (biológicos, psicológicos y sociales), que hacen del dolor uno de los fenómenos médicos más complicados de estudiar (Sociedad Española del Dolor, 2001).

El dolor es la manifestación clínica más frecuente y la principal causa de consulta médica. Hay distintas formas de clasificar al dolor, de acuerdo a su duración, localización y patogénesis (Tabla 1) (Lautenbacher y Fillingim, 2004; Millan, 1999; Sociedad Española del Dolor, 2001):

Dolor fásico: es de corta duración y refleja el impacto inmediato de la aparición de la lesión.

Dolor tónico: persiste durante un período de tiempo variado hasta que se lleva a cabo la curación de la lesión.

Dolor agudo: comprende el dolor fásico y tónico. Se caracteriza porque remite a medida que lo hace la causa que lo produjo y es de breve duración (menos de seis meses). Generalmente se considera una consecuencia inmediata de la activación del sistema nociceptivo. Su finalidad principal es la protección, alertando al individuo acerca de alguna disfunción en su organismo. El dolor agudo responde a los tratamientos convencionales.

Dolor crónico: tiene los componentes fásicos y tónicos de la presentación aguda, pero la condición tónica continúa incluso después de la reparación del daño tisular. Es un dolor persistente (más de seis meses) que está acompañado - y puede permanecer- con daño tisular inflamatorio y/o lesión del Sistema Nervioso. En general se caracteriza por su naturaleza espontánea (no provocado por estímulos extrínsecos) y por la presencia de hiperalgesia (aumento del dolor provocado por un estímulo nocivo) y/o la alodinia (dolor provocado por estímulos normalmente inocuos). El dolor crónico pierde su sentido protector y se convierte él mismo en enfermedad o en parte importante de la misma.

Dolor somático: es aquel que afecta a la piel, músculos, articulaciones, ligamentos o huesos. Se trata de un dolor bien localizado, circunscrito a la zona dañada y caracterizado por sensaciones claras y precisas.

Dolor visceral: es producido por lesiones que afectan a órganos internos. Este posee una serie de características y propiedades que lo diferencian del dolor somático: no todas las vísceras son sensibles al dolor; puede aparecer sin tener relación directa con la lesión y por otro lado, algunas lesiones viscerales no causan dolor; es un dolor vago, mal localizado que se extiende más allá de los órganos lesionados; a menudo el dolor es referido en la superficie del órgano en zonas distantes de la víscera que lo origina; y por último, va acompañado de intensas reacciones reflejas motoras y vegetativas.

Dolor nociceptivo: es causado por una lesión, que activa los nociceptores específicos. Se considera un dolor agudo, ya que puede durar minutos a meses y desaparece con la reparación de la lesión. Tiene una función protectora que advierte de posibles daños. Puede ser somático o visceral. También se lo conoce como el dolor “fisiológico”.

Dolor neuropático: es un proceso patológico en sí mismo, derivado de una lesión o disfunción del Sistema Nervioso Central (SNC) o Periférico (o causado por una lesión o enfermedad del Sistema Nervioso Somatosensorial). Se lo considera como dolor crónico, ya que dura más de seis meses. Además, permanece después de la reparación de

la lesión (y en algunos casos, se produce en ausencia de cualquier lesión evidente). No posee función protectora y se lo considera como dolor “patológico”.

Tabla 1: Clasificación del dolor

| Tipo | Duración | Características temporales relacionadas a la causa | Características principales | Clase | Valor adaptativo | Respuesta adaptativa | Ejemplos |
|-----------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------------------------------|
| Agudo Fásico | Segundos a 6 meses | Instantáneo Simultáneo Desaparece luego de la reparación del daño | Proporcional a la causa | Nociceptivo | Alto Preventivo | Retirada Escape | Contacto con una superficie caliente |
| Crónico Clínico | 6 meses a años | Persistente Enfermedad de largo tiempo Persiste luego de la resolución del daño | Hiperalgnesia Alodinia Dolor espontáneo Parestesias/ disestesias Componente afectivo pronunciado | Neuropático Nociceptivo | Ninguno Maladaptivo | Psicológica y cognitiva | Artritis Lesión en el SNC o FAP Metástasis |

Clasificación fisiopatológica general de algunas de las características principales del dolor. FAP: fibras aferentes periféricas. Modificada de Millan (1999).

El dolor crónico puede tener un impacto negativo tanto en la salud emocional y física como en otros aspectos de la vida de los individuos que lo padecen. Puede limitar la capacidad de trabajar de forma productiva y de participar plenamente en la vida familiar y social, perjudicando la calidad de vida tanto del enfermo como de su familia. El dolor crónico se asocia con un mayor riesgo de ansiedad, depresión y suicidio y constituye un importante problema clínico, económico y social a nivel mundial (Gustorff y col., 2010; Phillips, 2006).

Las estructuras anatómicas que están involucradas en el dolor son: los nociceptores (receptores del dolor), las fibras nerviosas (vías de transmisión desde los receptores a la médula espinal), la médula espinal, las fibras de conducción ascendente (vías de transmisión desde la médula espinal a la corteza), los centros superiores del dolor (núcleos talámicos, hipotálamo, sistema límbico y corteza) y las fibras de conducción descendente (vías de transmisión desde la corteza a la médula espinal).

Los nociceptores son neuronas sensoriales primarias que se activan por estímulos mecánicos, térmicos y químicos capaces de causar daño a los tejidos. Se encuentran en la piel, vasos, músculos, fascia, articulaciones y vísceras, y se diferencian de otras fibras nerviosas sensoriales por su sensibilidad y umbral característico.

Las fibras aferentes periféricas (FAP) cutáneas se pueden clasificar esencialmente en tres tipos basándose en su diámetro, estructura y la velocidad de conducción: (1) C: diámetro pequeño ($0.4 \pm 1.2 \mu\text{m}$), amielínicas y de lenta conducción ($0.5 \pm 2.0 \text{ m seg}^{-1}$); (2) A δ : diámetro medio ($2 \pm 6 \mu\text{m}$), mielinizadas y de velocidad intermedia ($12 \pm 30 \text{ m seg}^{-1}$) y (3) A β : diámetro grande ($> 10 \mu\text{m}$), mielinizadas y rápidas ($30 \pm 100 \text{ m seg}^{-1}$).

Cada una de esta clase de FAP codifican información sensorial, pero son diferencialmente sensibles a estímulos nocivos e inocuos. Las fibras A δ Tipo I (nociceptores alto umbral de activación) responden a estímulos mecánicos y químicos, pero tienen umbrales térmicos relativamente altos ($> 50 \text{ }^\circ\text{C}$) y las tipo II tienen un umbral térmico más bajo, y un umbral mecánico muy alto. Las fibras C responden a estímulos químicos, térmicos (de frío y calor) y mecánicos. La mayoría de las fibras C son polimodales, es decir, que incluyen una población que es sensible tanto al calor como a estímulos mecánicos. También se clasifican en nociceptores C no peptidérgicos y peptidérgicos, que liberan neuropéptidos como la sustancia P.

La sensación de dolor se suele percibir como un dolor agudo, bien localizado, que es conducido rápidamente por las fibras A δ (primera fase), seguido otro de carácter lento y mal localizado, conducido por las fibras C (segunda fase). A diferencia de estas, las fibras A β no transmiten información nociceptiva y su estimulación puede reducir el dolor (Julius y Basbaum, 2001; Millan, 1999).

Todos los tejidos, con excepción del neuropilo del SNC, están inervados por fibras aferentes, aunque sus propiedades difieren notablemente en función de si son aferentes somáticas o viscerales. Los cuerpos celulares de estos nociceptores se encuentran dentro del ganglio de la raíz dorsal adyacente a la médula espinal. Los nociceptores primarios hacen sinapsis en el asta dorsal con las neuronas de segundo orden, predominantemente dentro de la lámina II (sustancia gelatinosa) de la médula espinal. Las neuronas de segundo orden cruzan la médula espinal para ascender por el tracto espinotalámico con sus fibras terminales predominantemente localizadas en el tálamo. En el tálamo, las neuronas de tercer orden envían axones a través de la cápsula interna a la corteza somatosensorial, donde se produce la localización discreta de los estímulos nocivos, o envían axones a la corteza cingulada y a la amígdala en donde se involucran los componentes emocionales del dolor. También, en la sustancia gris periacueductal se produce la activación del sistema de control descendente del dolor proyectado al asta dorsal de la médula espinal. Los neurotransmisores implicados en las vías descendentes (como los opioides endógenos, serotonina, noradrenalina) parecen inhibir la activación

de las neuronas de segundo orden en presencia de estímulos nocivos. Esta representa la vía clásica, pero existen otras vías que involucran otras estructuras (Calixto y col., 2000) (Figura 1).

La nocicepción no es una sensación uniforme, y tanto la calidad del dolor como la iniciación de las respuestas de protección son determinadas por muchos factores dentro de la médula espinal y en las estructuras superiores, que participan en la integración y la modificación de las señales nociceptivas. La acción directa o indirecta de los mediadores químicos tales como metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas (PG) y leucotrienos), péptidos (sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)), protones, citoquinas, factores de crecimiento, óxido nítrico (ON), entre otros, que pueden ser producidos o liberados después de una lesión tisular o por irritantes exógenos (formalina, ácido acético, la capsaicina, algunos venenos, etc.), son responsables de la multiplicidad de eventos que se producen durante la transmisión del dolor, en el Sistema Nervioso Periférico y Central. Además de la producción local de mediadores y los cambios bioquímicos, la vasodilatación y el edema provocados por la lesión tisular favorecen a la generación de un círculo vicioso, que genera mayor excitación de los nociceptores periféricos.

Las vías del dolor tienen tres niveles de modulación en los que se puede intervenir para el tratamiento del mismo: periférico, a nivel del órgano en que se produce el daño; a nivel medular, en el asta dorsal de la médula espinal; y a nivel superior o encefálico. La terapéutica del dolor incluye terapias físicas (fisioterapia), quirúrgicas (bloqueo de nervios con anestésicos y/o opiáceos, neuroestimulación, etc) y farmacológicas. Los principales medicamentos que se utilizan para el tratamiento del dolor son: los opiáceos, los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los fármacos coadyuvantes (Figura 2). En general, para los casos de dolor crónico, estos fármacos se administran según la escalera analgésica de la OMS, que se basa en la administración gradual de fármacos analgésicos asociada a la evolución e incremento del dolor.

Los AINES se encuentran entre los fármacos más utilizados a nivel mundial; este grupo está constituido por un conjunto de fármacos químicamente heterogéneo con diversos grados de actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética. La acción analgésica de los AINES se produce a nivel periférico (inhibiendo la síntesis de PG), con intensidad moderada o leve, siendo su efecto máximo claramente inferior al que se obtiene con analgésicos opiáceos. Los efectos adversos más frecuentes se producen en el

sistema gastrointestinal entre los que se encuentran: esofagitis, úlceras, lesiones tóxicas y diarrea. También pueden afectar la función renal, entre otros efectos no deseados.

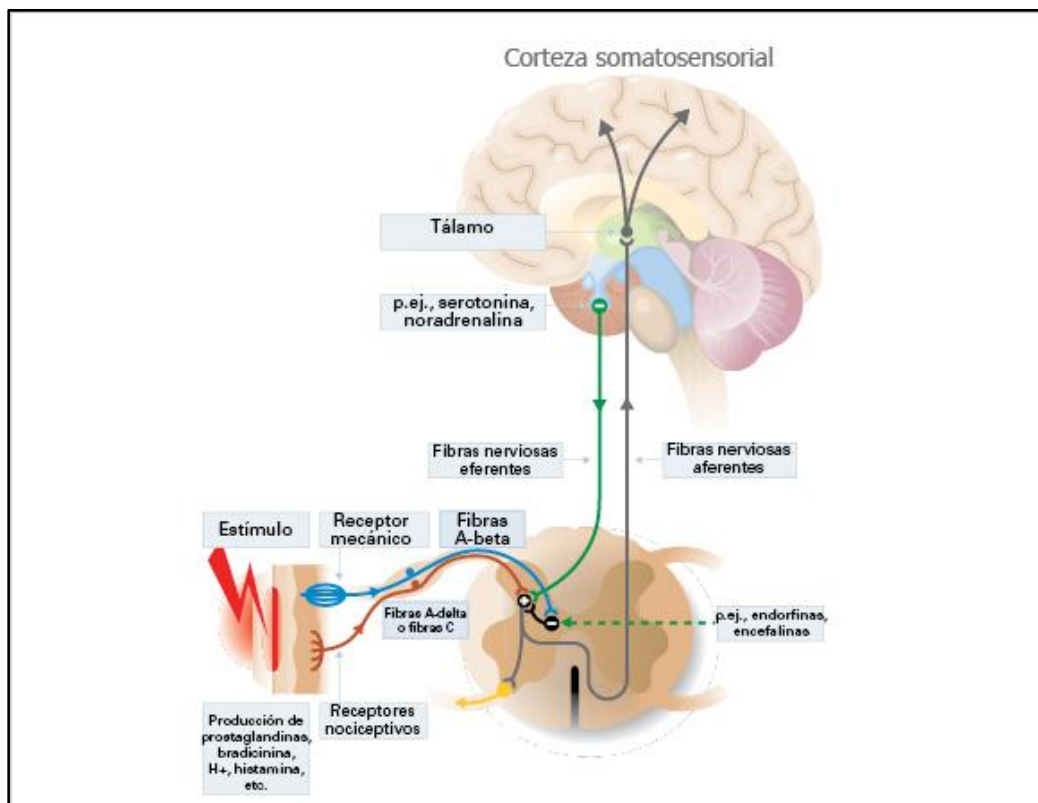


Figura 1. Esquema del sistema nociceptivo. Los nociceptores aferentes primarios A δ y C transmiten información nociva luego de una lesión a las neuronas de proyección dentro asta dorsal de la médula espinal. Mientras que fibras A β reducen el dolor. Un subconjunto de estas neuronas de proyección transmite información a la corteza somatosensorial a través del tálamo, proporcionando información sobre la ubicación y la intensidad del estímulo doloroso. Otras neuronas de proyección se acoplan a la corteza cingulada y la amígdala, lo que contribuye al componente afectivo de la experiencia dolorosa. Esta información ascendente también tiene acceso a las neuronas de la médula rostral ventral y a la sustancia gris periacueductal para participar de la vía descendente de retroalimentación. Los neurotransmisores implicados en las vías descendentes (como los opioides endógenos, serotonina, noradrenalina) inhiben la activación de las neuronas de segundo orden. Modificada de <http://www.changepain.org/grt-change-pain-portal/231100038.jsp>.

Los fármacos coadyuvantes se administran junto a los medicamentos analgésicos para aumentar la eficacia de los analgésicos, tratar los síntomas concurrentes que intensifican el dolor y proporcionar analgesia para tipos específicos de dolor como el dolor neuropático. Entre estos se encuentran los antidepresivos, anticonvulsivos, ansiolíticos, neurolépticos, corticoides y anestésicos locales.

Por último, los opiáceos presentan un intervalo de eficacia más amplio, proporcionando un rápido alivio del dolor de intensidad moderada a severa. Estos actúan a nivel medular y central, uniéndose a los receptores opioides (sección 4.3.3.1.2). Sin

embargo, algunos de sus efectos adversos como constipación, tolerancia y dependencia, entre otros, son importantes limitaciones para su uso terapéutico. Estos pueden afectar profundamente la calidad de vida de los pacientes y en algunos casos pueden ser tan graves que los pacientes prefieren interrumpir la terapia analgésica en lugar de experimentar las molestias que surgen a partir de estos (Holzer, 2015).

También, con acción a nivel central, se encuentran los agonistas α_2 -adrenérgicos. Los efectos sedantes y analgésicos producidos por este receptor son similares a los inducidos por los receptores μ -opioide, debido a que ambos se encuentran en regiones similares del SNC (Sinclair, 2003). Los agonistas α_2 -adrenérgicos causan bradicardia, disminución del gasto cardíaco, bloqueos auriculoventriculares, arritmias sinusales, entre otros efectos adversos.

Por lo tanto, a pesar de la existencia de fármacos para tratar el dolor, sus efectos adversos son importantes limitaciones para su uso terapéutico, por lo que existe un marcado interés en el desarrollo de medicamentos más seguros y eficaces que los utilizados en la actualidad.

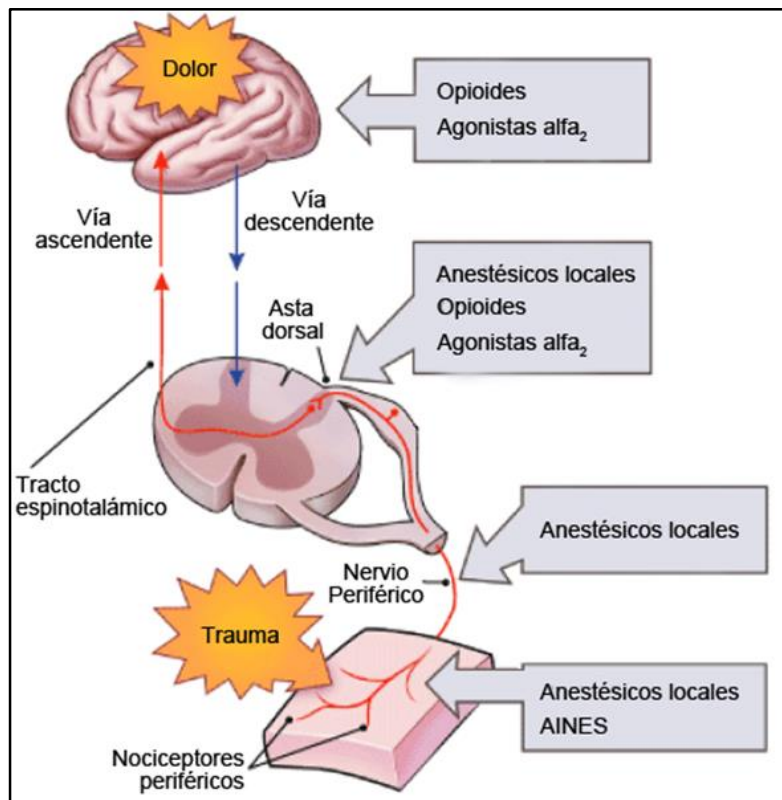


Figura 2. Niveles de modulación de las vías del dolor con sus respectivos fármacos. Modificada de <http://www.changepain.org/grt-change-pain-portal/231100038.jsp>.

1.2 Comorbilidades

La “comorbilidad”, también conocida como “morbilidad asociada”, es un término utilizado para describir la presencia de uno o más trastornos, o enfermedades, además de la enfermedad o trastorno primario.

Las patologías anteriormente descritas se relacionan entre sí porque son comorbilidades una de otras. Es común que pacientes con dolor crónico sufran depresión y ansiedad (Erickson, 2005), pacientes con EA presenten dolor, ansiedad y depresión (Clodomiro y col., 2013) y a su vez, datos epidemiológicos corroboran la alta comorbilidad entre los trastornos de ansiedad y los trastornos depresivos (Agudelo y col., 2007). El manejo de estas comorbilidades es importante para el tratamiento eficaz de la enfermedad o trastorno primario. La combinación de depresión con enfermedades crónicas empeora progresivamente la salud en comparación con la enfermedad física sola. Por otra parte, la ansiedad puede influir en el resultado final de prácticamente todas las enfermedades médicas y psiquiátricas (National Institute for Health & Clinical Excellence (UK), 2010).

En las últimas décadas se han realizado grandes avances en la mejora del diagnóstico y el tratamiento de las diferentes patologías. Sin embargo, la falta de adherencia a los tratamientos continúa siendo un obstáculo para mejorar la salud y la calidad de vida de los pacientes. En los países desarrollados la tasa de adherencia a tratamientos de enfermedades crónicas es de alrededor del 50 %, por lo que la OMS calificó la adherencia como “un problema mundial de gran magnitud”. Por lo tanto, a pesar de la existencia de medicamentos seguros y eficaces, no se logra conseguir una adecuada adherencia terapéutica. En grupos de población determinados este problema es muy prevalente. Por ejemplo, se ha demostrado que los pacientes deprimidos son más propensos a expresar actitudes negativas hacia el uso de medicamentos recetados cuando sufren otras patologías asociadas (Howe y col., 2012). Entre las causas principales de la falta de adherencia se encuentra el olvido de la toma del medicamento y el nivel de complejidad del régimen de tratamiento (Conthe y col., 2014). Por lo tanto, se postula que una droga efectiva para tratar una patología y su comorbilidad representaría una importante ventaja terapéutica, aumentando la eficacia y la adherencia al tratamiento, al disminuir el número de fármacos que el paciente debe consumir y la complejidad del régimen del tratamiento.

1.3 Fuentes naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos

Los compuestos provenientes de fuentes naturales (microorganismos terrestres, plantas superiores, organismos marinos y animales terrestres) poseen un papel muy importante en el descubrimiento de fármacos (Kinghorn y col., 2011).

Las plantas medicinales se han utilizado desde el comienzo de la civilización humana para el tratamiento de diferentes enfermedades. Los primeros registros son de la Mesopotamia y datan de alrededor de 2600 AC. Entre las sustancias que se utilizaron se encuentran los aceites de especies *Cedrus* (Cedro) y *Cupressus sempervirens* (Ciprés), *Glycyrrhiza glabra* (Regaliz) y *Papaver somniferum* (jugo de Amapola), los cuales todavía hoy en día se utilizan para el tratamiento de un amplio rango de dolencias como tos, resfríos, infecciones parasitarias e inflamación. Las plantas medicinales han formado la base de los sofisticados sistemas de medicina tradicionales (ayurvédica, unani, china, etc.) que han existido desde hace miles de años y siguen proporcionándole nuevos medicamentos a la humanidad (Cragg y Newman, 2013).

Los objetivos de la utilización de plantas como fuentes de agentes terapéuticos son (Fabricant y Farnsworth, 2001):

a) aislar los compuestos bioactivos para uso directo como medicamentos, por ejemplo, digoxina, digitoxina, morfina, reserpina, taxol, vinblastina, vincristina.

b) **producir compuestos bioactivos con estructuras novedosas o conocidas como compuestos líderes para la semi síntesis, con el fin de generar entidades patentables de mayor actividad y/o de menor toxicidad**, por ejemplo, metformina, nabilona, oxicodona (y otros analgésicos narcóticos), taxotere, tensiposido, verapamilo, y amiodarona, que se basan, respectivamente, en la galegina, Δ^9 -tetrahidrocannabinol, morfina, taxol, podofilotoxina y khellina.

c) utilizar agentes como herramientas farmacológicas, por ejemplo, dietilamida del ácido lisérgico, mescalina y yohimbina.

d) utilizar la planta entera o parte de ella como medicamento, por ejemplo, el arándano, la equinácea, el ajo, el *Ginkgo biloba* y la hierba de San Juan.

Aproximadamente, la mitad de los medicamentos autorizados que se registraron en todo el mundo entre 1982 y 2007 son productos naturales o sus derivados sintéticos (Kennedy y Wightman, 2011). Una actualización más reciente indicó que durante el período comprendido entre 2005 y 2010 se aprobaron 19 derivados de productos naturales (Barker y col., 2013). La edad de oro de los productos naturales se redujo en la década de 1990, cuando la industria farmacéutica disminuyó la investigación de los mismos debido

a los avances biotecnológicos, diseño racional de fármacos y el énfasis de las industrias en el cribado de alto rendimiento de bibliotecas sintéticas. Sin embargo, estos avances científicos no aumentaron la productividad y no han dado lugar al surgimiento de gran número de nuevos medicamentos o entidades químicas innovadoras como era de esperarse. Es por eso que en el último tiempo varios autores plantean el “redescubrimiento de los productos naturales” ya que la naturaleza ha desempeñado, y seguirá desempeñando, un papel vital en el descubrimiento de fármacos (Chai y Mátyus, 2016; Cragg y Newman, 2013, 2005; Lu y col., 2012; Newman y Cragg, 2007).

El éxito en el desarrollo de fármacos a partir de productos naturales no es sorprendente cuando se tiene en cuenta que los productos naturales han evolucionado para interactuar con el espacio biológico, y, por lo tanto, pueden interactuar con diferentes blancos biológicos. También, se reconoce que los productos naturales con frecuencia presentan nuevas estructuras y/o mecanismos de acción moleculares que rara vez pueden ser sintetizados *de novo* en el diseño de bibliotecas sintéticas (Chai y Mátyus, 2016).

1.3.1 Los flavonoides

Los flavonoides son un extenso grupo de compuestos fenólicos diaril-propánicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal como metabolitos secundarios. El término flavonoide deriva del latín *flavus* que significa amarillo, y que corresponde al color predominante de estos pigmentos vegetales. Estos compuestos se encuentran prácticamente en todas las partes de las plantas, incluyendo los frutos, semillas, hojas, flores y corteza, y son responsables de proveerles color, entre otras funciones (Gurib-Fakim, 2006).

Los flavonoides pertenecen al grupo de compuestos polifenólicos de bajo peso molecular biosintetizados a partir de las vías del ácido shikímico y del ácido acético. Como muestra la Figura 3, los flavonoides son el producto de la condensación de las tres unidades de malonil-CoA (C-2) y una unidad de ácido p-cumárico (C-9), para dar un núcleo básico (C6-C3-C6), compuestos de dos anillos de benceno conectados por una unidad de tres carbonos. Las **chalconas** son tanto el producto final como intermedio en la biosíntesis de los flavonoides. Por medio de la enzima chalcona isomerasa, la unidad de tres carbonos se cicla como un anillo de pireno que contiene oxígeno para formar la estructura característica, que comprenden un esqueleto fundamental de la cromona 2-fenilo, con una variedad de patrones de sustitución en el anillo A (característicamente un patrón de hidroxilación de tipo floriglucinol o resorcinol) y anillo B (por lo general

catecol, pirogalol o 4'-hidroxilado). El nivel de oxidación de la unidad de tres carbonos (anillo C) por medio de hidrolasas y reductasas, da lugar a las diferentes clases de flavonoides, incluyendo flavanos, **flavanonas**, flavonas, flavanonol, flavonoles, catequinas, antocianidinas, y las isoflavonas, entre otros (Figura 4) (Cazarolli y col., 2008).

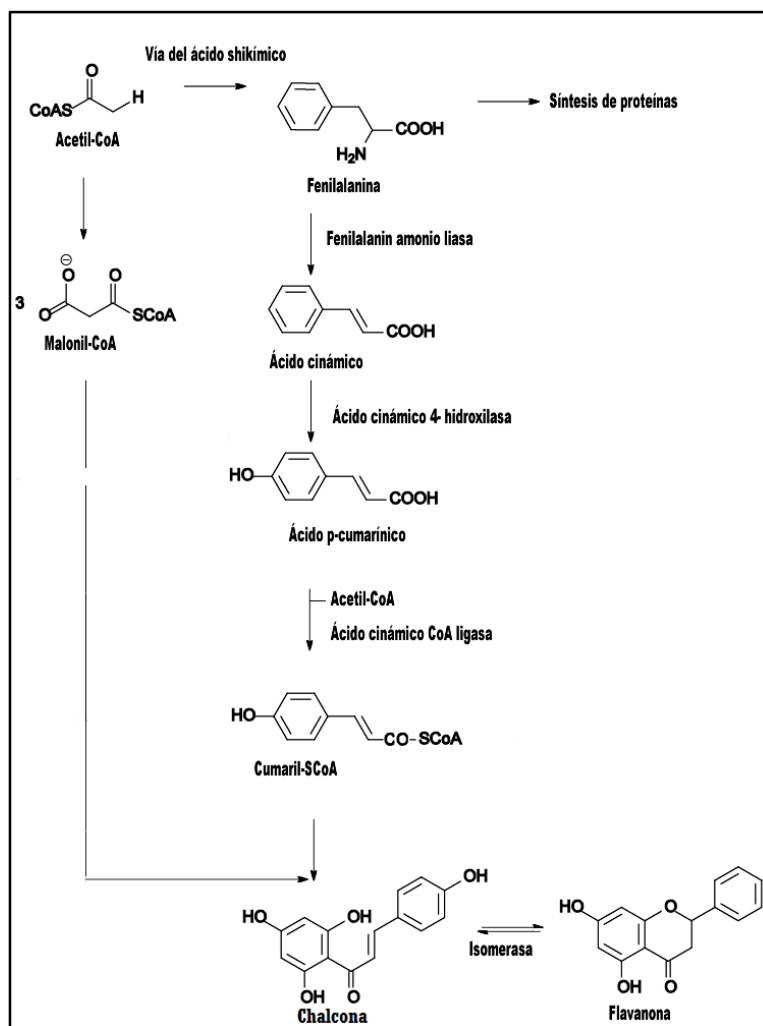


Figura 3. Biosíntesis de flavonoides. Modificada de <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/489428>

En la naturaleza los flavonoides se presentan mayoritariamente como glicósidos, aunque también se los puede encontrar como agliconas libres (Cazarolli y col., 2008).

Hasta los comienzos de 1960 los flavonoides eran considerados como simples productos metabólicos que se almacenaban en las vacuolas de las plantas sin utilidad aparente. Numerosos estudios posteriores permitieron comprender la vital importancia de estos compuestos para la supervivencia de los vegetales. Entre otras funciones, los

flavonoides protegen a las plantas de las radiaciones UV-B, de los microorganismos, y de los ataques de insectos y animales herbívoros y también cumplen un rol importante como pigmentos de las flores favoreciendo la atracción de polinizadores (Harborne y Williams, 2000).

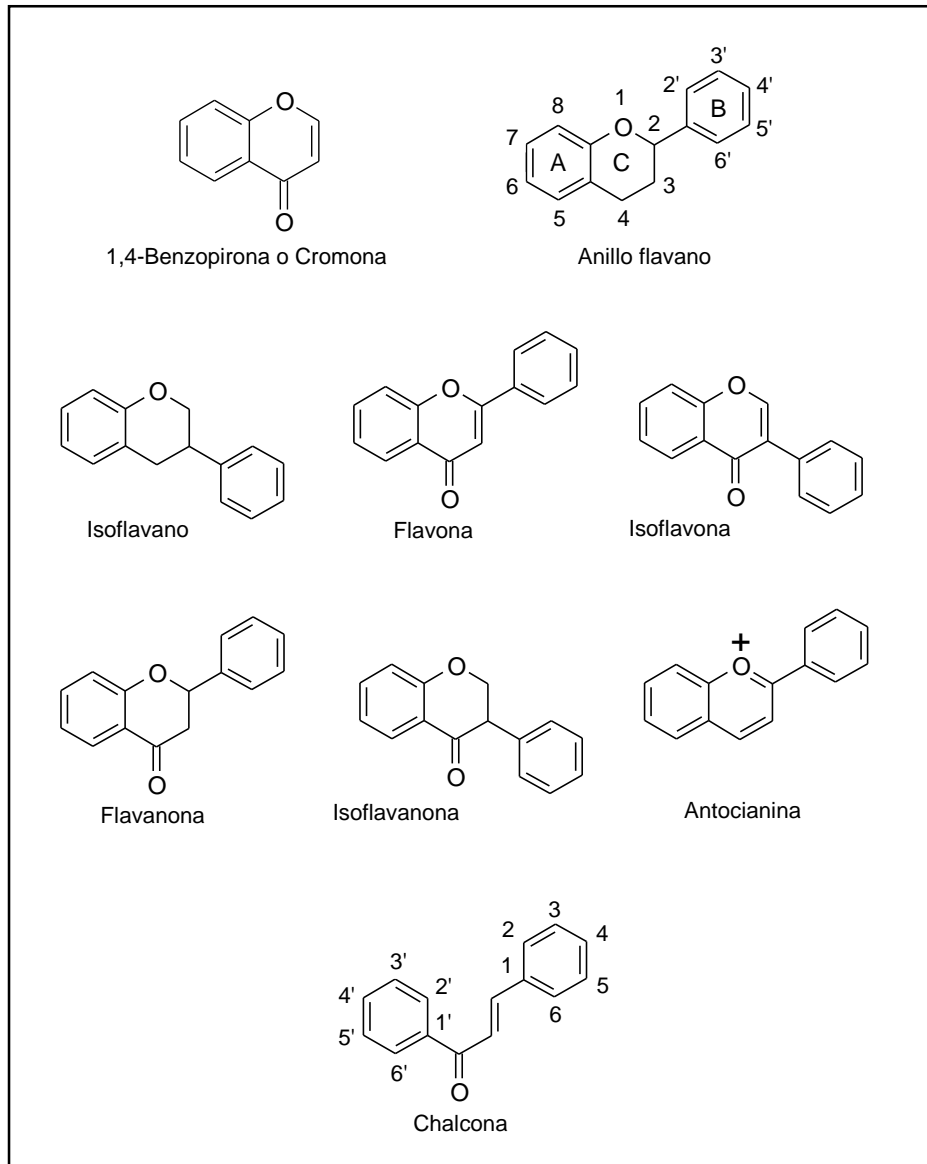


Figura 4. Estructuras de los flavonoides más comunes

Históricamente han formado parte de la dieta del ser humano y en los últimos años, han recibido una mayor atención en la literatura siendo reconocidos en las áreas de salud como contribuyentes a los efectos benéficos del té, vino, frutas, verduras e incluso del chocolate. Además, se han establecido como los principios activos de numerosas plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de distintas patologías que afectan al aparato digestivo, el aparato urinario, el sistema cardiovascular y la piel, entre otras. Las

propiedades biológicas atribuidas a estos compuestos incluyen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, antibacteriana y antiviral, así como también efectos citoprotectores sobre el sistema coronario y vascular, el hígado y el páncreas (Andersen y Markham, 2006; Cazarolli y col., 2008).

También, se ha demostrado que a nivel del SNC, son capaces de interactuar de manera directa y/o indirecta con los sistemas esenciales de la neurotransmisión cerebral, modular la actividad de diversas enzimas en las cascadas de señalización involucradas en la memoria y el aprendizaje, estimular la regeneración neuronal e inducir la neurogénesis, entre otras acciones (Baptista y col., 2014).

El carácter promisorio de estos compuestos para el descubrimiento de nuevos fármacos radica en su capacidad de interactuar sobre múltiples macromoléculas biológicas, quelar metales y presentar baja toxicidad (Uriarte-Pueyo y Calvo, 2011). Además, debido a su estructura química, son potentes agentes contra los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno.

Estas características posicionan a los flavonoides entre las sustancias naturales más atractivas para enriquecer las opciones de tratamientos terapéuticos actuales. Además, ha aumentado el interés de la industria farmacéutica sobre éstos como nuevos compuestos líderes que pueden servir como punto de partida para el desarrollo de derivados optimizados (Havsteen, 2002).

1.4 Descubrimiento de nuevos fármacos

Existen varias estrategias para el descubrimiento de nuevos fármacos. Una de ellas se basa en encontrar un blanco de relevancia clínica para una patología e identificar la “mejor-molécula”, la más activa, mediante una pesquisa de una biblioteca de compuestos. Siguiendo esta estrategia, en este trabajo se utilizaron blancos característicos, que se describirán a lo largo de esta Tesis, para la ansiedad (el receptor GABA_A y el 5-HT_{1A}), la depresión (la monoaminooxidasa A (MAO A) y el receptor 5-HT_{1A}) y el dolor (el receptor μ -opioide). Luego, los compuestos más activos, se estudiaron en modelos animales relacionados con cada patología.

Recientemente ha surgido un cambio de paradigma en el desarrollo de drogas para enfermedades multifactoriales, como son los trastornos neurodegenerativos, entre los que se encuentra la EA. Las drogas que atacan un único blanco pueden ser inadecuadas para este tipo de enfermedades, ya que se genera un efecto conocido como redundancia. Este efecto implica la generación de “sistemas de respaldo” a nivel celular (como expresión

génica, síntesis y degradación de proteínas y receptores, entre otros) que producen un mismo efecto biológico. Las proteínas y los intermediarios implicados en estos sistemas pueden ser completamente diferentes. Por lo tanto, las drogas dirigidas hacia las vías primarias no tendrán ningún efecto sobre estos “sistemas de respaldo”. Una nueva estrategia es el desarrollo de ligandos dirigidos a múltiples blancos, también conocidas como *drogas “multitargets”*. Un fármaco capaz reconocer (con afinidades comparables o no) dos o más blancos diferentes involucrados en la cascada de eventos patológicos que desarrollan determinada enfermedad, podría ser altamente efectivo, ya que haría al sistema biológico más sensible y atenuaría de esta manera el efecto de redundancia (León y col., 2013). En la terapéutica de la EA se han identificado numerosos blancos biológicos que podrían utilizarse para el diseño de *drogas multitargets*, a saber: el péptido A β , la proteína tau, receptores (colinérgicos, glutamatérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos, histaminérgicos) y enzimas (acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BChE), α , β y γ -secretasa, MAO A, MAO B).

Por lo tanto, para la búsqueda de derivados activos para tratar la EA se utilizó la estrategia de buscar fármacos *multitargets*, utilizando como blancos biológicos a las enzimas AChE, BChE, MAO B y la agregación del péptido A β . Luego, los compuestos más activos se estudiaron en un modelo animal de EA.

1.5 Chalconas y flavanonas: potenciales nuevos fármacos

Existe bibliografía que describe **chalconas** y **flavanonas** con actividad *in vitro* sobre la MAO, la AChE, algunos receptores cerebrales o con efectos *in vivo* en modelos animales relacionados con las patologías de nuestro estudio. El número de trabajos científicos que muestran **flavanonas** activas es menor al número de trabajos que estudian la síntesis y/o aislamiento y actividad de **chalconas**. Un resumen de los datos bibliográficos existentes, hasta el momento, para las chalconas se muestra en la Tabla 2, mientras que un análisis detallado de cada grupo, chalconas y flavanonas, se realizará en las secciones 4.1.1 y 4.1.2, respectivamente. De forma resumida se puede mencionar que algunas flavanonas naturales y sintéticas (ver sección 4.1.2.1) han sido reportadas con efectos inhibitorios *in vitro* sobre la MAO A (Mathew y col., 2014; Pan y col., 2000), MAO B (Chimenti y col., 2010), AChE (Uriarte-Pueyo y Calvo, 2011) y con actividad *in vivo* como símil-antidepresivas (Gong y col., 2014; Wang y col., 2008), ansiolíticas (Ognibene y col., 2008) y antinociceptivas (Loscalzo y col., 2011). Entre estos antecedentes se encuentra la **3,3-DIBROMOFLAVANONA**, una flavanona sintetizada

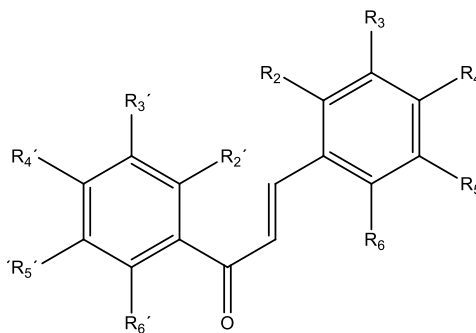
en nuestro laboratorio, que presenta elevada afinidad por el receptor μ -opioide y que en ensayos preliminares *in vivo* mostró un efecto antinociceptivo central promisorio.

Por todo lo mencionado anteriormente, la EA, la ansiedad, la depresión y el dolor, constituyen un importante problema para la salud pública y los individuos que las padecen. Si bien existen tratamientos, hay una necesidad de desarrollar fármacos más eficaces, con menores efectos secundarios que los medicamentos utilizados en la actualidad.

Los productos naturales son un importante reservorio para el descubrimiento de nuevos fármacos con capacidad de actuar sobre múltiples blancos biológicos (Lu y col., 2012). Se ha demostrado que los flavonoides son capaces, entre otras acciones a nivel del SNC, de actuar sobre blancos involucrados en estas patologías.

En este trabajo postulamos que pueden diseñarse derivados de flavonoides del tipo **chalcona** y **flavanona** teniendo en cuenta requerimientos estructurales compartidos, según los antecedentes bibliográficos, con actividad sobre sistemas de neurotransmisión (gabaérgico, serotoninérgico, opiáceo), enzimas (colinesterasas y monoaminooxidasas) y la agregación del péptido A β , y con efecto en modelos animales de dolor, ansiedad, depresión y/o la enfermedad de Alzheimer.

Tabla 2. Chalconas reportadas en bibliografía con actividad en blancos biológicos o en modelos animales de las patologías que se estudian en este trabajo



Chalcona

| Nombre | R _{2'} | R _{3'} | R _{4'} | R _{5'} | R _{6'} | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ |
|------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|----------------|
| Chalconas con actividad inhibitoria sobre AChE | | | | | | | | | | |
| 4,5-dimetoxi-2'-hidroxichalcona ¹ | OH | H | H | H | H | H | H | OCH ₃ | OCH ₃ | H |
| 4',5'-dimetoxi-2'-hidroxi-4-pirrolidin-1-ilchalcona ² | OH | H | OCH ₃ | OCH ₃ | H | H | H | pirrolidin-1-il | H | H |
| 4',5'-dimetoxi-2'-hidroxi-3-pirrolidin-1-ilchalcona ² | OH | H | OCH ₃ | OCH ₃ | H | H | pirrolidin-1-il | H | H | H |
| 4',6'-dimetoxi-2'-hidroxi-3'-dimetilaminochalcona ³ | OH | (-N(CH ₃) ₂) | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | H | H | H |
| 4',6'-dimetoxi-2'-hidroxi-3'-dietilaminochalcona ³ | OH | dietilamino | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | H | H | H |
| 4',6'-dimetoxi-2'-hidroxi-3'-piperidinchalcona ³ | OH | piperidina | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | H | H | H |
| 4',6'-dimetoxi-2'-hidroxi-3'-pirrolidinchalcona ³ | OH | pirrolidina | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | H | H | H |
| Chalconas con actividad inhibitoria sobre BChE | | | | | | | | | | |
| 2-hidroxichalcona ¹ | H | H | H | H | H | OH | H | H | H | H |
| Chalconas con actividad inhibitoria sobre la MAO | | | | | | | | | | |
| Isoliquiritigenina ⁴ | OH | H | OH | H | H | H | H | OH | H | H |
| 2', 4'-dihidroxichalcona ⁵ | OH | H | OH | H | H | H | H | H | H | H |
| 4-cloro-4'-metoxi-2'-hidroxichalcona ⁶ | OH | H | OCH ₃ | H | H | H | H | Cl | H | H |
| 4-cloro-2', 4'-dihidroxichalcona ⁶ | OH | H | OH | H | H | H | H | Cl | H | H |
| 3-bromo-4,5'-dimetoxi-2'-hidroxichalcona ⁷ | OH | H | OCH ₃ | OCH ₃ | H | H | Br | H | H | H |

| Nombre | R ₂ ' | R ₃ ' | R ₄ ' | R ₅ ' | R ₆ ' | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|--------------------------------------|----------------|----------------|
| Chalconas utilizadas como sondas para detección de placas Aβ | | | | | | | | | | |
| 4'-iodo-4-dimetilaminochalcona ⁸ | H | H | [¹²⁵ I] | H | H | H | H | (-N(CH ₃) ₂) | H | H |
| 4'-fluor-4-dimetilaminochalcona ⁹ | H | H | ¹⁸ F(CH ₂ CH ₂ O) ₃ | H | H | H | H | (-N(CH ₃) ₂) | H | H |
| Chalconas naturales con efecto ansiolítico | | | | | | | | | | |
| Isoliquiritigenina ¹⁰ | OH | H | OH | H | H | H | H | OH | H | H |
| Buteína ¹⁰ | OH | H | OH | H | H | H | OH | OH | H | H |
| Chalconas naturales con afinidad por el receptor GABA_A | | | | | | | | | | |
| Isoliquiritigenina ¹¹ | OH | H | OH | H | H | H | H | OH | H | H |
| Chalconas con actividad símil-antidepresiva | | | | | | | | | | |
| Isoliquiritigenina ¹² | OH | H | OH | H | H | H | H | OH | H | H |
| Buteína ¹³ | OH | H | OH | H | H | H | OH | OH | H | H |
| 4, 2', 4', 6'- tetrahidroxichalcona ¹⁴ | OH | H | OH | H | OH | H | H | OH | H | H |
| 2-bromo-2',4',6'-trihidroxichalcona ¹⁴ | OH | H | OH | H | OH | Br | H | H | H | H |
| 3,4, 2',4',6'-pentahidroxichalcona ¹⁴ | OH | H | OH | H | OH | H | OH | OH | H | H |
| 2,6-dicloro-2',4'-dihidroxichalcona ¹⁵ | OH | H | OH | H | H | Cl | H | H | H | Cl |
| 3-bromo-2',4'-dihidroxichalcona ¹⁵ | OH | H | OH | H | H | H | Br | H | H | H |
| Chalconas con actividad antinociceptiva periférica | | | | | | | | | | |
| Chalcona ¹⁶ | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| 4'-clorochalcona ¹⁶ | H | H | Cl | H | H | H | H | H | H | H |
| 3',4'-diclorochalcona ¹⁶ | H | Cl | Cl | H | H | H | H | H | H | H |
| 3'-bromo-4',6'-dimetoxi-2'-hidroxichalcona ¹⁷ | OH | Br | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | H | H | H |
| 4',6'-dimetoxi-2'-hidroxi-3-nitrochalcona ¹⁷ | OH | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | NO ₂ | H | H | H |
| Chalconas con actividad antinociceptiva central | | | | | | | | | | |
| 2',4',4,5-tetrahidroxichalconas ¹⁸ | OH | H | OH | H | H | H | H | OH | OH | H |
| 2',4'-dimetoxi-6'-hidroxichalcona ¹⁹ | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | OH | H | H | H | H | H |
| 4-cloro-4',6'-dimetoxi-2'-hidroxichalcona ²⁰ | OH | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | H | H | Cl | H | H |
| Chalconas con afinidad por el receptor μ-opioide | | | | | | | | | | |
| Chalcona ²¹ | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |

Chalconas reportadas en bibliografía: ¹ (Hasan y col., 2005); ² (Sheng y col., 2009); ³ (Liu y col., 2015); ⁴ (Pan y col., 2000); ⁵ (Tanaka y col., 1987); ⁶ (Chimenti y col., 2009); ⁷ (Morales-Camilo y col., 2015); ⁸ (Ono y col., 2007b); ⁹ (Ono y col., 2009); ¹⁰ (Jamal y col., 2008); ¹¹ (Cho y col., 2011); ¹² (Wang y col., 2008); ¹³ (Guan y col., 2014); ¹⁴ (Sui y col., 2012); ¹⁵ (Guan y col., 2013); ¹⁶ (Corrêa y col., 2001); ¹⁷ (de Campos-Buzzi y col., 2006); ¹⁸ (Viana y col., 2003); ¹⁹ (Kamaldin y col., 2013); ²⁰ (Cechinel-Filhol y col., 1996); ²¹ (Loscalzo, 2011).

Objetivos

2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo es obtener compuestos derivados de flavonoides para el desarrollo de fármacos más eficaces y/o con menores efectos adversos que la terapéutica existente para el tratamiento del dolor, la ansiedad, la depresión y/o la EA y sus comorbilidades.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- 1a) Diseñar y sintetizar, en base a bibliografía y los antecedentes del laboratorio, una serie de derivados de chalconas y flavanonas sustituidas en los anillos A y/o B con grupos: metoxilo (-OCH₃), hidroxilo (-OH), nitro (-NO₂), cloro (-Cl), bromo (-Br) y dimetilamino (-N(CH₃)₂), entre otros.
- 1b) Purificar e identificar todos los compuestos sintetizados.

Estudiar los compuestos sintetizados con el fin de:

- 2a) Evaluar su afinidad a los receptores cerebrales: su-BDZ en el receptor GABA_A, receptor serotoninérgico 5HT_{1A} y receptor μ -opioide.
 - 2b) Estudiar su potencial efecto sobre la actividad enzimática de AChE, BChE y MAO A y B.
 - 2c) Evaluar su efectividad sobre la inhibición de la agregación del péptido β amiloide.
 - 2d) Realizar un análisis de relación estructura actividad para cada blanco de acción estudiado.
-
- 3a) Estudiar el efecto de los compuestos más promisorios en modelos animales de dolor, ansiedad, depresión y memoria.
 - 3b) Estudiar el mecanismo de acción, *in vivo*, de los compuestos más promisorios, mediante el uso de antagonistas específicos.
-
- 4) Establecer la posible ventaja terapéutica de los compuestos promisorios con los de uso en clínica.

Materiales y Métodos

3 Materiales y métodos

3.1 Compuestos utilizados

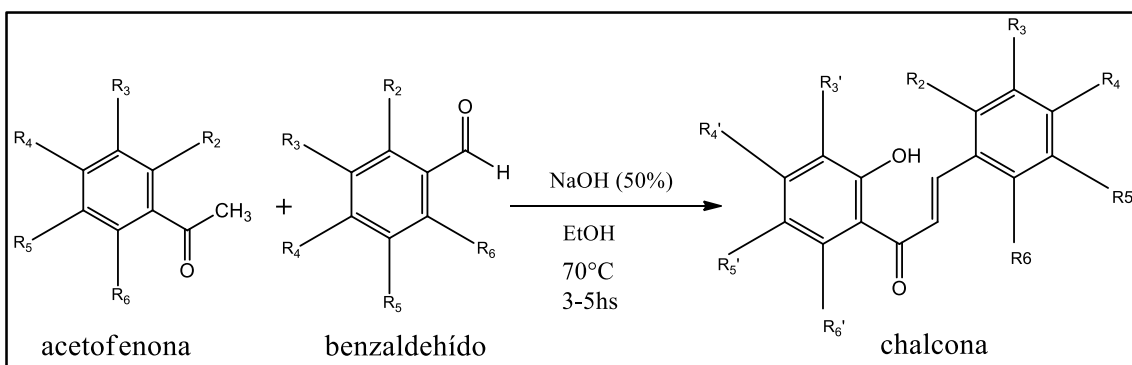
El diazepam y el flunitrazepam fueron provistos por Roche Diagnostics (Argentina). El tartrato de ketanserina; los clorhidratos de prazosina, naltrexona, norbinaltorfimina, yohimbina, serotonina, clorgilina, pargilina, tacrina y *p*-tiramina; la isatina; el 5'-ditiobis (ácido 2 nitrobenzoico) (reactivo de Ellman, DTNB); los ioduros de butiriltiocolina (BTC) y acetiltiocolina (ATCo); el resveratrol; hidrobromuro de escopolamina; la peroxidasa de rábano picante; las enzimas microsomales recombinantes humanas MAO A (M7316) y B (M7441); la 2'-hidroxiacetofenona, la 2'-hidroxi-4'-metoxiacetofenona, la 2'-hidroxi-5'-metoxiacetofenona, la 2'-hidroxi-6'-metoxiacetofenona, la 5'-cloro-2'-hidroxiacetofenona; la 5'-fluor-2'-hidroxiacetofenona, la 5'-bromo-2'-hidroxiacetofenona, la 2'-hidroxi-5'-metilacetofenona, la 2'-hidroxi-3',5'-dibromoacetofenona, la 2'-hidroxi-4',5'-dimetilacetofenona, la 2'-hidroxi-5'-metil-3'-nitroacetofenona, la 4'-aminoacetofenona y el 4-dimetilaminobenzaldehído fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Chemical Company (EE.UU.). La chalcona fue obtenida en Indofine Chemical Company (EE.UU.) y la flavanona en Extrasynthese (Francia). El clorhidrato de morfina fue adquirido en Gramon (Argentina) y la indometacina en Montpellier (Argentina). El ácido fórmico 40% fue obtenido en Carlo Erba (Francia), el benzaldehído en Mallinckrodt Pharmaceuticals, el 4-nitrobenzaldehído en Acros Organics y la acetofenona y el 4-clorobenzaldehído en Fluka. El clorhidrato de donepecilo fue donado por Laboratorios Richmond (Argentina). El péptido A β ₁₋₄₂ recombinante humano pretratado con HFIP se compró en Merck Millipore (Alemania). El [³H] DAMGO (³H-[D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol⁵] encefalina), el [³H] FNZ (³H-flunitrazepam) y el [³H] 8-OH-DPAT (³H-8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina) fueron adquiridos en PerkinElmer (EE.UU.). El 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (reactivo Amplex Red) se sintetizó como se ha descrito previamente en el literatura (Von der Eltz, H. y col. USP Patent No. 4900822, Feb. 13, 1990). La muAChE y la hBChE fueron provistas por Florian Nachon y Xavier Brazzolotto del Instituto de Investigación Biomédica del Ejército (Francia).

3.2 Química

3.2.1 Síntesis de chalconas

La síntesis de chalconas se realizó como detalla Kachadourian y col. (2012) con algunas modificaciones (Esquema 1).

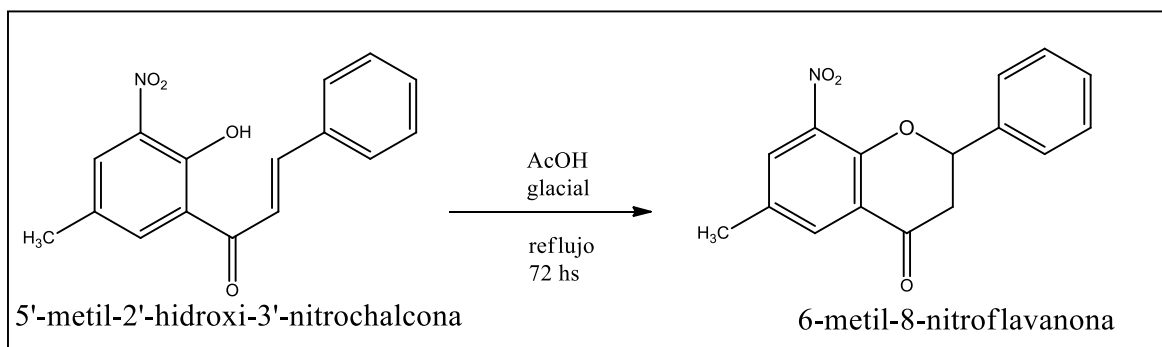
A una solución en agitación de la acetofenona correspondiente (1 mmol) y benzaldehído (3 mmol) en MeOH (10 ml) se le agregó NaOH (50% solución acuosa, 1 ml). La solución se calentó a 70 °C durante 3 a 5 hs. Luego, se agregó HCl 10% hasta neutralización y se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 20 ml). Posteriormente se agregó Na₂SO₄ anhidro a la fase orgánica, se dejó en reposo hasta observar una solución límpida, se filtró y se evaporó bajo presión reducida en un evaporador rotatorio. El sólido resultante se recrystalizó de MeOH/H₂O. En el caso de las chalconas fluoradas se utilizó NaOH al 25%.



Esquema 1. Síntesis de chalconas

3.2.2 Síntesis de 6-metil-8-nitroflavanona

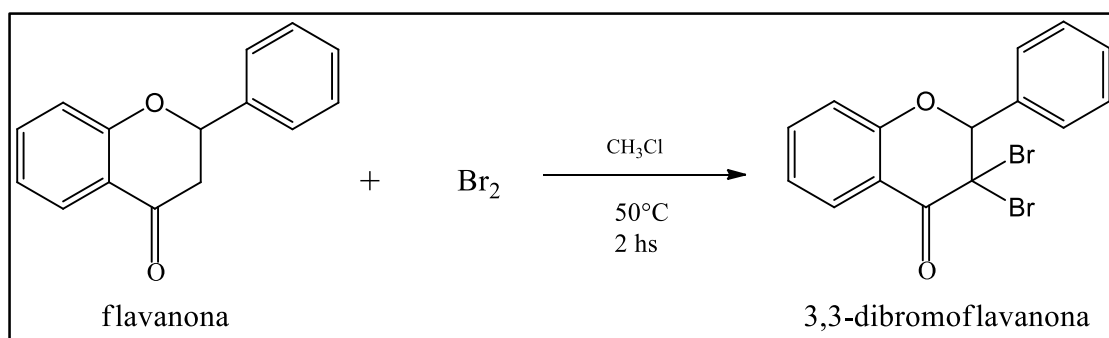
Para la síntesis de 6-metil-8-nitroflavanona (Esquema 2), un mmol de 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona en 25 ml de AcOH glacial se calentó a reflujo durante 72 hs. A continuación, la mezcla se vertió en agua y se extrajo 2 veces con 40 ml de CH₂Cl₂. La fase orgánica resultante se lavó 2 veces con 30 ml de agua, se le agregó Na₂SO₄ anhidro, se dejó en reposo hasta observar solución límpida, posteriormente se filtró y se llevó a sequedad bajo presión reducida en un evaporador rotatorio. El sólido obtenido se recrystalizó de EtOH/H₂O (Cabrera y col., 2007).



Esquema 2. Síntesis de 6-metil-8-nitroflavanona

3.2.3 Síntesis de 3,3-dibromoflavanona

La síntesis de la 3,3-dibromoflavanona (Esquema 3) se realizó mediante el agregado, gota a gota, de bromo (7.8 mmol) a una solución de flavanona (2.2 mmol) en CH_3Cl (10 ml) a 25°C . La mezcla se dejó reaccionar, con agitación, durante 2 hs a 50°C . Finalizado este tiempo, y luego de enfriar, se extrajo 2 veces con 10 ml de una solución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, luego se lavó 2 veces con 10 ml de agua y la fase orgánica resultante se llevó a sequedad bajo presión reducida en un evaporador rotatorio. El sólido obtenido se recrystalizó de $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (De Diesbach y Kramer, 1945).



Esquema 3. Síntesis de la 3,3-dibromoflavanona

En todos los casos, el producto de reacción se analizó por TLC sobre láminas de poliéster de sílica gel, con indicador de fluorescencia a 254 nm (Sigma, EE.UU.) y por HPLC utilizando columnas C18 Vydac de fase reversa (The Separation Group, Hesperia, CAL, EE.UU.). Las eluciones se llevaron a cabo con un gradiente lineal de ACN 30-80% en agua, en 30 min, para las flavanonas y un gradiente lineal escalonado de ACN 30-50% en agua, en 20 min y de 50-80% ACN en agua, en 10 min, para las chalconas. Dichas eluciones se realizaron a una velocidad de flujo de 1 ml/min y a una longitud de onda de 280 nm.

Los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN de las chalconas y de la 6-metil-8-nitroflavanona se registraron en un espectrómetro Criomagneto Bruker-Oxford BZH 300/89 de 7.05 Tesla, frecuencia de resonancia del ^1H 300 MHz, frecuencia de resonancia del ^{13}C 75 MHz. Probe de 5 mm multinuclear Z3150/0006. Sistema de control y adquisición de datos Bruker Avance III. Software de administración y procesado Bruker Topspin 3.2. (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA). Los espectros de masa de las chalconas se realizaron en un espectrómetro de masas LCQ-Duo (ESI-IT) de ThermoFisher con Bomba Surveyor de ThermoFisher utilizando la técnica es electrospray

con trampa de iones (ESI TRAP) con inyección directa por loop (solvente: Metanol 50%, Acido acetico 2%) (LANAIS-PROEM-IQUIFIB). Para la 6-metil-8-nitroflavanona se utilizó el equipo 4800 MALDI TOF/ TOF plus, utilizando la técnica de ionización MALDI y a la matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinamico (CHCA) (solvente: ACN 60% TFA 0.1%) (LANAIS-PROEM-IQUIFIB). Para la 3,3-dibromoflavanona los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker AMX 400 y el espectro de masa de impacto electrónico (EIMS) se determinó en un espectrómetro de masas Shimadzu GC-MS-QP-1000 a 70 eV, con introducción de muestra directa (UMYMFOR, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA). Los análisis elementales de C, H, N y S se realizaron en un equipo Carlo Erba EA 1108 y Exeter CE 440 (UMYMFOR, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA). El porcentaje de O se calculó por diferencia, aceptándose un error de $\pm 0.4\%$ respecto a los valores calculados a partir de las estructuras propuestas.

Los reactivos y disolventes fueron de grado analítico y fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y Fluka.

El cLog P de los compuestos se calculó utilizando el programa ChemDraw Ultra 12.

3.3 Ensayos de inhibición enzimática y agregación del péptido A β ₁₋₄₂

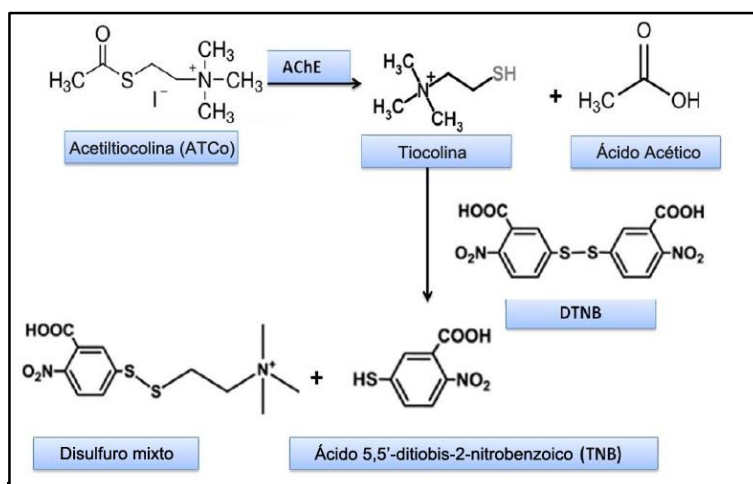
Los ensayos de inhibición enzimática y de agregación del péptido A β ₁₋₄₂ se realizaron en el Departamento de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia, Universidad de Ljubljana, Ljubljana, Eslovenia. Los compuestos ensayados fueron: chalcona, 2'-hidroxichalcona, 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona, 5'-metoxi-2'-hidroxichalcona, 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona, 5'-cloro-2'-hidroxichalcona, 5'-fluor-2'-hidroxichalcona, 5'-bromo-2'-hidroxichalcona, 5'-metil-2'-hidroxichalcona, 3',5'-dibromo-2'-hidroxichalcona, 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona, 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona, 4'-aminochalcona, 4-dimetilaminochalcona, flavanona y 3,3-dibromoflavanona.

3.3.1 Actividad inhibitoria frente a las colinesterasas

Se determinó la capacidad de inhibición de los compuestos sintetizados utilizando el método de Ellman (Ellman y col., 1961). Este método detecta la aparición de tiocolina tras la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina (ATC) y butiriltiocolina (BTC) por la AChE murina (μ AChE) y la BChE humana (hBChE), respectivamente. La tiocolina formada reacciona con el cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), para producir

un compuesto de color amarillo, el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, que puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 412 nm (Esquema 4).

En primer lugar, los polvos liofilizados de muAChE y hBChE recombinante se disolvieron en buffer MES 10 mM, pH 6.5 para obtener una solución stock de enzima de 4 mg/ml. Las soluciones de enzima se prepararon por dilución de la solución madre en buffer fosfato 0.1 M, pH 8.0. Para realizar este ensayo, los compuestos en estudio o los inhibidores de referencia se añadieron a cada pocillo a una concentración final de 10 μ M junto con 0.05 nM de mAChE o 1 nM de hBChE y fueron preincubados durante 300 seg para permitir el completo equilibrio de los complejos enzima-inhibidor. Posteriormente se inició la reacción mediante el agregado del sustrato a temperatura ambiente. Las reacciones se llevaron a cabo, por triplicado, en un volumen final de 300 μ l buffer fosfato 0.1 M, pH 8.0 con 333 μ M DTNB y 0.5 mM de ATCo o BTC para la muAChE y hBChE, respectivamente. El contenido final de dimetilsulfóxido (DMSO) fue del 1%. La formación del color amarillo del anión 5-tio-2-nitrobenzoato de metilo como resultado de la reacción de DTNB con las tiocolinas, se monitoreó durante 1 min a 412 nm, usando un lector de microplaca de 96 pocillos (Synergy™ H4, BioTek Instruments, Inc., EE.UU.). Para determinar el valor del blanco (b), la solución de enzima fue sustituida por buffer fosfato. La velocidad inicial (V_o) se calculó a partir de la pendiente obtenida. Todas las reacciones fueron monitoreadas cuidadosamente para detectar la posible precipitación o aglomeración de los compuestos. Se calculó la velocidad inicial en presencia del compuesto a ensayar (V_i). La actividad residual (RA) se calculó como: $RA = V_i - b / V_o - b$. La potencia inhibitoria se expresó como porcentaje de inhibición calculado como % inhibición = 100 – RA.



Esquema 4. Detección de tiocolina mediante la reacción de Ellman

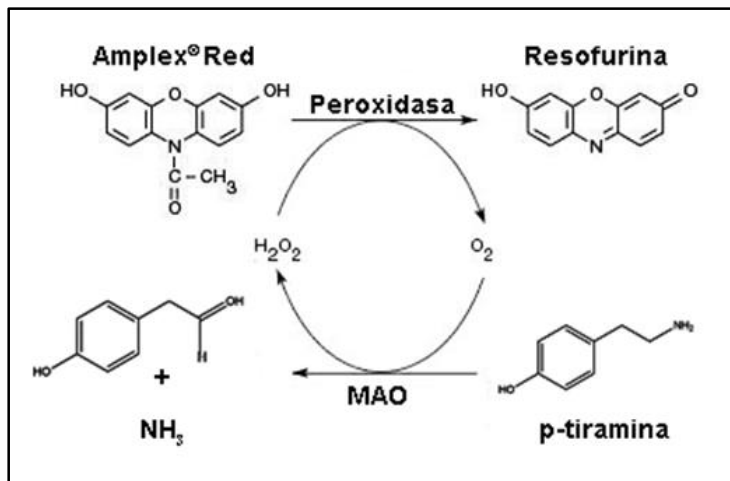
3.3.2 Actividad inhibitoria frente a la MAO

3.3.2.1 Ensayo de inhibición

Se estudió la capacidad de los compuestos de inhibir a la MAO A y B humana (hMAO A y B) utilizando el método fluorométrico propuesto por Bautista-Aguilera con algunas modificaciones (Bautista-Aguilera y col., 2014). El fundamento de este método implica la detección de H₂O₂, formado durante la oxidación enzimática de la *p*-tiramina (un sustrato común tanto para hMAO A y hMAO B), en una reacción acoplada a la peroxidasa de rábano picante y al reactivo Amplex Red que produce en cantidad estequiométrica un producto fluorescente de alta sensibilidad denominado resorufina (Esquema 5). El reactivo Amplex Red es una sonda muy sensible y estable para la detección del H₂O₂. Además, el producto de reacción, resorufina, presenta estabilidad y poca posibilidad de interferencia de autofluorescencia en la mayoría de las muestras biológicas (la resorufina tiene máximos de absorción y emisión de fluorescencia de aproximadamente 571 nm y 585 nm, respectivamente).

Para realizar las determinaciones se adicionó 100 µl de una solución del compuesto a evaluar (en una concentración final 100 µM) o de los inhibidores de referencia (clorgilina, pargilina e isatina) en buffer fosfato de sodio 50 mM (pH 7.4, 0.05% (v/v) de Triton X-114) junto con la hMAO A o la hMAO B requeridas para oxidar 15 pmol de *p*-tiramina/min aproximadamente (0.3 µg de proteína para la hMAO A y 1.4 µg de proteína para la hMAO B) en microplacas de 96 pocillos de fondo plano de paredes negras, y luego se incubó durante 15 min a 37 °C en la oscuridad. Después de la pre-incubación, se inició la reacción mediante la adición del reactivo Amplex Red, peroxidasa de rábano picante y *p*-tiramina en concentraciones finales de 250 µM, 2 U/ml y 1 mM, respectivamente en un volumen final de 200 µl. La producción de resorufina se cuantificó sobre la base de la fluorescencia generada ($\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) a 37 °C durante un período de 15 min, en el que la fluorescencia aumentó linealmente. Para los experimentos control se utilizó DMSO. Para determinar el valor del blanco (b), se sustituyó la solución de enzima por buffer fosfato. Las velocidades iniciales se calcularon a partir de la tendencia obtenida, realizando cada medición por triplicado. La fluorescencia de emisión específica se calculó luego de restar la actividad del blanco (b). Las potencias de inhibición se expresaron como porcentaje de inhibición (% inhibición = $100 - ((V_i - b) / (V_0 - b))$), donde V_i es la velocidad en presencia del compuestos evaluados y V_0 es la velocidad del control en presencia de DMSO.

Previamente, se analizó que los compuestos ensayados y los inhibidores de referencia no fueran capaces de reaccionar directamente con el reactivo Amplex Red. No se detectó interferencia significativa para ninguno de los compuestos evaluados ni de los inhibidores de referencia.



Esquema 5. Detección de la oxidación enzimática de la p-tiramina mediante el reactivo Amplex Red.

3.3.2.2 Ensayo de reversibilidad

La reversibilidad de la inhibición de la hMAO B se determinó midiendo la recuperación de la actividad enzimática después de una dilución rápida del complejo enzima-inhibidor. Para este ensayo se incubó la hMAO B a una concentración final 100 veces mayor a la del ensayo anterior (ver 3.3.2.1), junto con el inhibidor (chalconas o pargilina) a una concentración 10 veces mayor al valor de sus CI₅₀ (volumen final: 50 µl) a 37 ° C. Después de 15 min la mezcla se diluyó 100 veces con el buffer de reacción que contiene el reactivo Amplex Red, la peroxidasa de rábano picante y p-tiramina. Las concentraciones finales de estos los reactivos fueron los mismos que en el ensayo anterior (ver 3.3.2.1). La reacción se monitoreó durante 30 min. El control se llevó a cabo de la misma manera reemplazando la solución del inhibidor por DMSO.

3.3.3 Inhibición de la agregación Aβ₁₋₄₂

La capacidad de los compuestos sintetizados de inhibir la agregación del péptido Aβ se estudió mediante un método fluorométrico utilizando tioflavina T. El fundamento de la técnica consiste en que la tioflavina T se acopla a las láminas β presentes en los agregados Aβ (ensamblados espontáneamente *in vitro*), aumentando la fluorescencia del colorante de manera proporcional a la agregación del péptido Aβ₁₋₄₂ (LeVine, 1993). El

péptido A β ₁₋₄₂ recombinante humano pre-tratado con hexafluoroisopropanol (HFIP) se disolvió en DMSO para obtener una solución 100 μ M. Antes de la incubación la solución del péptido se diluyó en buffer HEPES 150 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 hasta obtener una concentración final de 15 μ M. Se mezclaron 10 μ l de la solución del péptido A β ₁₋₄₂ con 10 μ l del compuesto a ensayar o el control resveratrol (concentración final de 10 μ M). La mezcla se añadió inmediatamente a una placa de 96 pocillos de paredes negras y se añadió buffer HEPES hasta obtener un volumen final de 100 μ l (la concentración final del péptido A β ₁₋₄₂ fue de 1.5 μ M). Cada muestra se estudió por quintuplicado y el contenido de DMSO fue de 2 %. La placa se selló y se colocó en un lector de placas Synergy™ H4 a temperatura ambiente. Después de 48 hs de incubación y agitación continua, se añadió 50 μ l de la solución de tioflavina T (concentración de la solución madre en HEPES fue de 15 μ M, concentración final 5 μ M) a cada pocillo utilizando el inyector incorporado de Synergy™ H4 para cuantificar la formación de fibrillas de amiloide. Después de incubar durante 5 min, se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 446 nm y de emisión de 490 nm en el lector de placas. Se calculó el promedio de las intensidades de fluorescencia en el *plateau* y se le restó el promedio de fluorescencia de los blancos (buffer y DMSO solos, o buffer más el compuesto ensayado). Para cuantificar la inhibición de la agregación de A β ₁₋₄₂ se utilizó la ecuación: $(F_i / F_0) \times 100 \%$, donde F_i es la fluorescencia de A β ₁₋₄₂ tratado con el compuesto ensayado, y F_0 es la fluorescencia de A β ₁₋₄₂ solo.

Antes de realizar el ensayo, se evaluó el espectro de emisión y excitación de los compuestos estudiados a la misma concentración usada en el mismo (10 μ M) para evaluar la existencia de alguna interferencia. No se detectaron interferencias para ninguno de los compuestos evaluados.

3.4 Ensayos de unión a receptores

Para estudiar si los compuestos sintetizados son capaces de unirse al sitio de unión a benzodiazepinas (su-BDZ) del receptor GABA_A, al receptor 5-HT_{1A} y al receptor μ -opioide primero se prepararon membranas sinaptosomales de cerebro de rata y luego se evaluó la capacidad de los compuestos de desplazar la unión de ligandos tritados específicos para cada receptor: [³H] FNZ para su-BDZ, [³H] 8-OH-DPAT para el receptor 5-HT_{1A} y [³H] DAMGO para el receptor μ -opioide.

Para la preparación de las membranas sinaptosomales se utilizaron ratas Wistar macho entre 200-300 g de peso obtenidas en el Bioterio Central de la Facultad de

Farmacología y Bioquímica (UBA) (CICUAL de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA EXP-UBA N° 0031682/2014 y EXP-FYB N° 0058084/2015). Las ratas se sacrificaron mediante guillotina y los cerebros fueron rápidamente removidos y disecados separando la corteza, el cerebelo y el hipocampo. Estos fueron utilizados el mismo día para el receptor μ -opioide y congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso en el caso del su-BDZ del receptor GABA_A y el receptor 5-HT_{1A} .

3.4.1 su-BDZ del receptor GABA_A

3.4.1.1 Preparación de membranas sinaptosomales

Las cortezas fueron homogeneizadas en 10 volúmenes de una solución de sacarosa 0.32 M a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, empleando un homogeneizador mecánico Pro Scientific INC. 200, seguido de una centrifugación a 900 x g durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante fue centrifugado a 100000 x g durante 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el pellet fue lavado 2 veces con 30 volúmenes de buffer Tris-HCl 25 mM pH 7.4 . Se centrifugó 30 min a 100000 x g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para recuperar el pellet cada vez. La re-suspensión final se realizó con el mismo buffer de forma tal que la concentración de proteína, medida por técnica de Bradford, fue de entre 2 y 4 mg/ml . Las membranas obtenidas se fraccionaron y se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.1.2 Procedimiento

En el día del ensayo las membranas se descongelaron y se diluyeron 10 veces con buffer Tris-HCl 25 mM pH 7.4 de manera tal que la concentración final fue de 0.2 a 0.4 mg/ml .

Para los ensayos de competición una mezcla de $20\text{ }\mu\text{l}$ de las muestras disueltas en DMSO (0.1%) y etanol absoluto se incubaron por duplicado en presencia de 0.32 nM [^3H] FNZ (81.8 Ci/mmol), agonista específico tritiado para el su-BDZ del receptor GABA_A , durante 1 h a 4°C , en un volumen final de 1 ml . La unión inespecífica se determinó incubando paralelamente FNZ a una concentración de $10\text{ }\mu\text{M}$. Una vez alcanzado el equilibrio, las reacciones se terminaron por disolución con 3 ml de buffer frío y la solución resultante fue rápidamente filtrada al vacío a través de papel Whatman GF/A de fibra de vidrio, lavando 2 veces con 3 ml del mismo buffer.

3.4.2 Receptor 5-HT_{1A}

3.4.2.1 Preparación de membranas sinaptosomales

La preparación de las membranas sinaptosomales del receptor 5-HT_{1A} se realizó de acuerdo a Nénonéné y col. (1994) con algunas modificaciones. Las cortezas fueron

homogeneizadas mecánicamente en 30 volúmenes de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 frío utilizando un homogeneizador mecánico Pro Scientific INC. 200. El homogenato obtenido fue centrifugado a 40000 x g durante 15 min a 4°C. El pellet fue re-suspendido en 30 volúmenes del mismo buffer e incubado a 37 °C durante 20 min. Se repitió dos veces la centrifugación de 40000 x g durante 15 min. Por último, el pellet fue re-suspendido en 30 volúmenes de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4. La concentración de proteína en las membranas sinaptosomales, determinada por la técnica de Bradford, fue de 2-3 mg/ml. Las membranas se fraccionaron y conservaron a -80 °C.

3.4.2.2 Procedimiento

En el día del ensayo se descongelaron las membranas y se diluyeron con el buffer Tris-HCl 50 mM, 1mM de MnCl₂ pH 7.4 hasta una concentración final de 0.50-0.55 mg/ml. Se empleó [³H] 8-OH-DPAT, agonista selectivo del receptor 5-HT_{1A}, como radioligando marcado. Para el ensayo de competición se incubaron por duplicado, 20 µl de las muestras disueltas en DMSO (hasta no superar el 0.1 %) y etanol absoluto, 1 ml de membranas, y 10 µl de una solución de [³H] 8-OH-DPAT (170.2 Ci/mmol) hasta concentración final de 0.25 nM. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La unión inespecífica se determinó utilizando serotonina 10 µM. Las reacciones se terminaron por dilución mediante el agregado de 3.5 ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 frío, y filtración por vacío a través de filtros Whatman GF/A, que se lavaron dos veces con 3.5 ml del mismo buffer.

3.4.3 Receptor µ-opioide

3.4.3.1 Preparación de membranas sinaptosomales

La preparación de las membranas sinaptosomales se realizó de acuerdo a Ioja y col. (2007) con algunas modificaciones. El cerebro fue rápidamente removido y lavado varias veces con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 frío. Los cerebros fueron homogeneizados en 10 volúmenes de una solución de sacarosa 0.32 M a 4 °C, empleando un homogeneizador mecánico Pro Scientific INC. 200. El homogenato fue centrifugado a 900 x g durante 10 min, y el sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 100000 x g durante 30 min a 4 °C. El pellet obtenido fue re-suspendido en 30 volúmenes de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 e incubado a 37 °C durante 30 min para remover péptidos opioides endógenos. Luego, se centrifugó a 100000 x g durante 30 min a 4 °C, y el pellet fue re-suspendido en 10 volúmenes de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4. La concentración

de proteína en las membranas sinaptosomales, determinada por la técnica de Bradford, fue de 1-3 mg/ml. Las membranas se fraccionaron y conservaron a -80 °C.

3.4.3.2 Procedimiento

En el día del ensayo las membranas sinaptosomales se descongelaron y diluyeron con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 a una concentración final de 0.25-0.30 mg/ml. Para el ensayo de competición se incubó, por duplicado, una mezcla de 20 µl de las muestras disueltas en DMSO y etanol absoluto, la suspensión de membranas sinaptosomales, y 10 µl de una solución de [³H] DAMGO (56.8 Ci/mmol, péptido sintético agonista selectivo del receptor µ-opioide) de manera tal que la concentración final del mismo fue de 1 nM. El volumen final de las mezclas fue de 1 ml y la concentración de DMSO en ninguno de los casos superó el 0.1 % (una concentración de DMSO de hasta el 5 % no inhibe la unión específica de [³H] DAMGO (Zernig y col., 1996)). La incubación se realizó durante 1 h a temperatura ambiente. La unión inespecífica se determinó incubando en paralelo una mezcla similar conteniendo naltrexona en una concentración 10 µM. Las reacciones se terminaron por dilución mediante el agregado de 3 ml de buffer Tris-HCl 50 mM frío, y la solución resultante fue rápidamente filtrada por succión de vacío a través de filtros Whatman GF/A, y se lavaron una vez con 3 ml del mismo buffer.

En todos los casos, los filtros fueron disueltos en 1.5 ml de líquido de centelleo (Optiphase “Hisafe” 3 Wallac Company, Turku, Finland). Luego de 24 a 48 hs, se realizó el conteo de radioactividad en un contador de centelleo líquido Wallac Rackbeta 1214.

Para la búsqueda de compuestos con afinidad por el su-BDZ del receptor GABA_A, receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} y el receptor µ-opioide, primero se realizó la evaluación de los compuestos sintetizados en una concentración de 300 µM. En los casos en que la inhibición de la unión específica del ligando marcado fue mayor al 60-70 %, se realizaron las curvas de desplazamiento y el cálculo de la constante de inhibición (K_i) utilizando diferentes concentraciones de los compuestos activos.

3.5 Estudios de acoplamiento (“docking”)

Se utilizó el programa de acoplamiento molecular (“docking”) AutoDock Vina (Trott y Olson, 2009) para analizar el modo de unión de la 3,3-dibromoflavanona y las agliconas naturales (diosmetina, hesperetina, naringenina y apigenina) que mostraron cierta afinidad por el receptor µ-opioide. La estructura tridimensional de este receptor se obtuvo de la base de datos protein data bank (PDB). Particularmente se utilizó la

estructura obtenida por cristalografía provista por Manglik y col. (2012) (código PDB 4DKL, resolución 2,8 Å). El ligando y las moléculas/iones cocrystalizados fueron quitadas, así como las moléculas de agua cristalográficas con excepción de dos, que se consideran importantes para la unión del ligando.

Se utilizaron los parámetros establecidos por defecto por Autodock Vina para la realización del docking. Las estructuras se acoplaron usando el algoritmo genético Lamarckiana (LGA), en el sitio activo definido para el cálculo a través de una grilla ubicada en la región originalmente ocupada por el ligando de la estructura cristalográfica. Las cargas Gasteiger-Marsili se calcularon para los ligandos y el receptor (Gasteiger y Marsili, 1980). Los ligandos fueron tratados como flexibles y el sitio activo definido para el docking se consideró rígido para todos los residuos, excepto para TRP293, TYR326, ASP147, TYR148, LYS233. Se analizaron los 20 modos de unión energéticamente más favorables para cada ligando.

3.6 Ensayos Farmacológicos

3.6.1 Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa Swiss de aproximadamente 2 meses y medio de edad y con un peso de 25-30 g. Los mismos fueron obtenidos en el Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Todos los ensayos farmacológicos se realizaron en un cuarto de experimentación aislado de ruidos, con ventilación apropiada, iluminación tenue y temperatura regulada entre 20-23 °C. Los animales fueron separados en grupos de cuatro o cinco por jaula con libre acceso a agua y comida, y mantenidos bajo un ciclo de 12 hs luz/12 hs oscuridad, con encendido de las luces a las 7 a.m.

En todos los experimentos, los ratones fueron colocados en el cuarto de experimentación por lo menos 72 hs antes de realizar los ensayos para permitir la adaptación al nuevo ambiente y reducir el estrés. Los ensayos farmacológicos se realizaron entre las 10:00 y las 14:00 hs del día. Los animales fueron asignados a los distintos tratamientos de forma aleatoria y se usaron solo una vez.

Los procedimientos experimentales y el cuidado y la manipulación de los animales fueron realizados de acuerdo a las recomendaciones de la Directiva 86/609/CEE de la Comunidad Europea para el uso de animales de experimentación y el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL EXP-UBA N° 0031682/2014 y EXP-FYB N° 0058084/2015) Facultad de Farmacia y Bioquímica de la

Universidad de Buenos Aires, Argentina. Se tomaron todos los recaudos para minimizar el sufrimiento de los animales y el número de animales empleados por ensayo fue el mínimo necesario para el correcto análisis estadístico de los resultados.

3.6.2 Disolución de las drogas y vías de administración

Para las administraciones parenterales los compuestos sintetizados y el diazepam fueron disueltos por el agregado sucesivo de DMSO, una solución 0.25 % de Tween 80 en agua y solución fisiológica (0.9 % NaCl) en porcentajes finales de 5, 20 y 75 %, respectivamente. La mezcla de estos disolventes constituyó el vehículo (VEH). La imipramina, morfina, naltrexona, nor-binaltorfimina, ketanserina, naltrindol, indometacina, escopolamina y donepecilo fueron disueltos en solución fisiológica.

Las soluciones de droga fueron administradas por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de inyección de 0.15-0.60 ml/25 g de peso corporal, a excepción de la solución de nor-binaltorfimina que fue administrada por vía subcutánea (s.c.) en un volumen de inyección de 3 µl/g de peso corporal. En todos los ensayos se evaluó un grupo de animales control administrados con VEH o solución fisiológica.

3.6.3 Tratamientos

Tratamiento agudo: los ratones recibieron una única administración de VEH o solución de droga. Los ensayos se realizaron 30 min luego de la administración i.p..

Tratamiento crónico: los ratones recibieron administraciones i.p., una por día, de VEH o solución de droga durante un periodo de 12 días. El último día se aplicó la última administración y 30 min después se realizaron los ensayos.

Curva de tiempo de la 3,3-dibromoflavanona: los ratones recibieron una única administración de VEH o solución de droga. El ensayo de la plancha caliente se realizó a los 0, 5, 20, 30, 60 y 120 min luego de la administración i.p.

Desarrollo de dependencia: los ratones recibieron dos administraciones i.p. por día (una por la mañana y otra por la tarde) de VEH o solución de droga durante 3 días consecutivos.

3.6.4 Ensayo del laberinto en cruz elevado (“Elevated plus-maze test”)

Se basa en el estudio del comportamiento exploratorio de los ratones, combinado con su aversión innata a los espacios abiertos y expuestos. Se utiliza para evaluar efectos ansiolíticos o ansiogénicos de una droga sobre la actividad exploratoria (Lister, 1987). El

aparato consiste en una cruz de dos ramas abiertas, 25 cm x 5 cm, atravesado por dos ramas cerradas de las mismas dimensiones, con acceso libre a todas las ramas a través del punto de cruce. Los brazos cerrados poseen paredes de 15 cm de alto. El laberinto se encuentra suspendido a 50 cm del piso (Figura 5). Para realizar este ensayo se utilizó luz roja de intensidad tenue. Los ratones se colocaron en la parte central del punto de cruce frente a un brazo abierto. El número de entradas en las ramas abiertas y en las ramas cerradas, y el tiempo pasado en las ramas abiertas, se contaron durante 5 min. También se determinó la actividad exploratoria total, como el número de entradas en las ramas abiertas más el número de entradas en las ramas cerradas. Compuestos con efecto ansiolítico producen un incremento en el porcentaje de entradas en las ramas abiertas y/o el porcentaje de tiempo pasado en estas ramas, mientras que drogas con efecto ansiogénico producen una reducción de los mismos. La prueba se realizó 30 min después de la administración i.p. de los compuestos sintetizados, diazepam (1 mg/kg) o VEH.

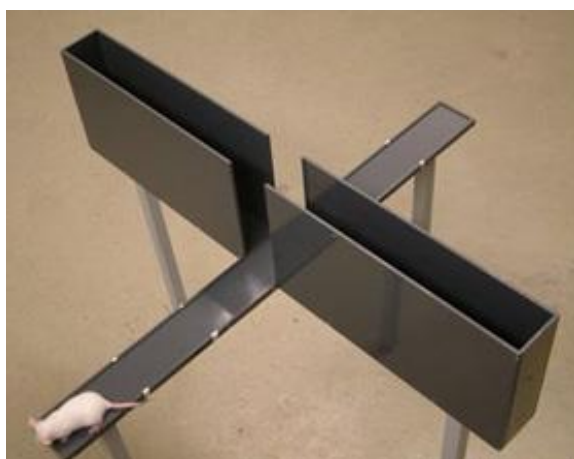


Figura 5. Aparato utilizado para realizar el ensayo del laberinto en cruz elevado. Obtenida de <http://physiologicalresearch.weebly.com/t-maze-test.html>

3.6.5 Ensayo de campo abierto con agujeros (“Hole board test”)

Este ensayo se utiliza para medir el comportamiento exploratorio de los ratones al ser expuestos a un ambiente novedoso. El aparato empleado consiste en una caja de plexiglás negro de 60 x 60 cm de lado, con paredes de 30 cm de altura (sin superficies reflectantes), cuyo piso posee 4 agujeros equidistantes de 2 cm de diámetro (figura 6). Cada agujero tiene un par “emisor/detector” de luz infrarroja, opuestos y perfectamente alineados. Las interrupciones de los haces de luz por un ratón, así como la duración de las mismas, fueron registradas en la computadora conectada al aparato y analizadas por

un programa Visual Basic. Interrupciones de duración menor a 100 mseg no fueron registradas.

El ensayo se realizó 30 min después de la administración i.p. de los compuestos a ensayar o VEH. La duración de la prueba fue de 5 min y al comienzo los ratones se colocaron en el centro del piso del aparato. Durante la prueba, se evaluó el comportamiento exploratorio del animal mediante la cuantificación automática y por observación directa de parámetros característicos. Mediante el registro automático se determinó el número de veces que los animales introdujeron la cabeza en los agujeros (“N° de holes”) y el tiempo total de permanencia de la cabeza en los agujeros (“Tiempo de head-dipping”), representando la exploración inquisitiva y la inspección detallada, respectivamente. Y por observación directa, se registró el número de veces que se alzaron sobre las dos patas traseras (“N° de rearings”).

En este ensayo la conducta exploratoria de los ratones está influenciada por muchos factores fundamentales, incluyendo tendencias exploratorias y estados de ansiedad. Por ello, drogas con efecto ansiolítico producen un incremento en los parámetros de exploración de los animales, mientras que drogas con efecto sedativo o ansiogénico producen la reducción de los mismos (Kliethermes y Crabbe, 2006; Pellow y col., 1985; Takeda y col., 1998).



Figura 6. Aparato utilizado para realizar el ensayo de Hole Board

3.6.6 Ensayo de medición de la actividad locomotora espontánea

El aparato consiste en una caja de plexiglás transparente de 15 cm x 30 cm, con paredes de 15 cm de altura. La caja posee 15 pares “emisor/detector” de luz infrarroja ubicados en paredes opuestas, perfectamente alineados y a 3 cm del piso (Figura 7). El ratón se introdujo en el centro de la caja y se lo dejó explorar libremente durante 5 min. El desplazamiento horizontal del animal produce las interrupciones de los haces de luz que son detectadas y registradas por un programa Visual Basic en una computadora. Se registró el número total de interrupciones como “cuentas”. El ensayo se realizó 30 min después de la administración i.p. de los compuestos a ensayar, morfina (6 mg/kg) o VEH.

La actividad locomotora espontánea abarca muchas funciones de comportamiento y fisiológicas, y está influenciada por factores externos (luz, temperatura, ruido y novedad del entorno) e internos (ciclo circadiano, privación de agua o comida, manipuleo, edad, etc.). También, se utiliza como un ensayo estándar para evaluar el potencial sedativo de drogas (Vogel, 2008).



Figura 7. Equipo utilizado para la evaluación de la actividad locomotora espontánea de ratones

3.6.7 Ensayo de suspensión por la cola (“Tail suspension test”)

El ensayo de suspensión de cola se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Steru y col. (1985). Esta prueba se utiliza para identificar compuestos con actividad símil-antidepresiva. Los ratones se suspendieron de forma individual por la cola a un gancho de metal (distancia desde el suelo: 18 cm) con cinta adhesiva (distancia desde

la punta de la cola: 2 cm) durante 6 min (Figura 8). Por lo general, los ratones realizan movimientos de escape intercalados con episodios de inmovilidad crecientes. La duración de la inmovilidad se registró manualmente durante el intervalo final de 4 min. Los ratones se consideran inmóviles sólo cuando se encuentran pasivos, es decir sin realizar ningún tipo de movimiento de escape. El ensayo se basa en que los animales sometidos al estrés de ser suspendidos por sus colas sin poder escapar, desarrollan a corto plazo una postura de inmovilidad. Varios medicamentos antidepresivos revierten la postura de inmovilidad y promueven la conducta relacionada al escape (Duarte y col., 2008).

La prueba se realizó 30 min después de la inyección i.p. de los compuestos sintetizados, imipramina (30 mg/kg) o VEH.

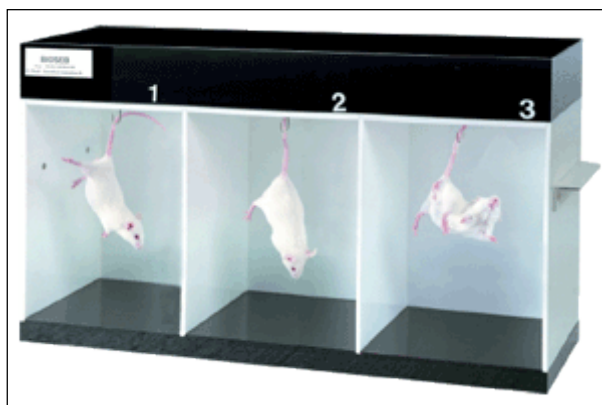
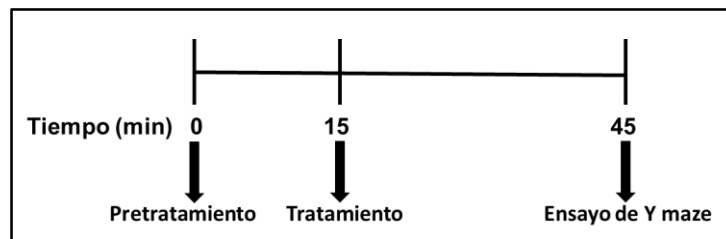


Figura 8. Aparato utilizado para realizar el ensayo de suspensión por la cola. Obtenida de www.slideshare.net/urchauhan/in-vivo-model-of-depression

3.6.8 Laberinto en Y de alternancia espontánea (“Y-maze”)

Este ensayo es utilizado para evaluar la memoria de trabajo espacial. Se utilizó un laberinto en Y de madera color gris de tres brazos de igual tamaño (32.5 cm de largo, 8.5 cm de ancho y 15.0 cm de altura) denominados A, B, y C, con un área equilateral triangular ubicada en el centro. El protocolo de inyección de los ratones se muestra en el Esquema 6. Se realizó un pretratamiento vía i.p. de los compuestos a ensayar, VEH o el control donepecilo (5 mg/kg) y 15 min después se inyectó el tratamiento que corresponde a la administración i.p. escopolamina (1 mg/kg) o solución salina. Luego de 30 min los ratones se colocaron en el brazo A del laberinto y se los dejó explorar libremente los tres brazos del aparato durante 8 min. La escopolamina es un antagonista de los receptores colinérgicos muscarínicos que provoca un deterioro cognitivo observable en este ensayo, por lo que este es uno de los modelos farmacológicos de EA más utilizado (McDonald y

Overmier, 1998). Para cada ratón se registró manualmente la secuencia (por ej, ACBACBC...) y el número total de entradas a cada brazo. Se considera una entrada cuando el animal coloca sus cuatro patas dentro de uno de los brazos del laberinto. Luego, se calculó el índice de alternancia, que es una medida de memoria de trabajo espacial, según la siguiente fórmula: $[\text{N}^\circ \text{ total de alternancias}/(\text{N}^\circ \text{ total de entradas}-2)]*100$. Alternancia se define como la entrada a tres brazos diferentes en forma consecutiva (por ej, ABC; CAB, BCA). Una disminución en el índice de alternancia respecto al grupo control vehículo indica un efecto de deterioro de la memoria. Si el compuesto estudiado es capaz de impedir la disminución del índice de alternancia ocasionada por la escopolamina, se considera que mejora la transmisión colinérgica mediante la inhibición de las enzimas AChE, y/o BChE protegiendo al animal del deterioro cognitivo inducido por escopolamina.



Esquema 6. Protocolo de inyección realizado para el ensayo del laberinto en Y de alternancias espontáneas (Y maze). El pretratamiento de los ratones corresponde a la inyección i.p. de vehículo, compuestos a estudiar o donepecilo (5 mg/kg). El tratamiento corresponde a la inyección i.p. de escopolamina (1 mg/kg) o salina.



Figura 9. Aparato utilizado para realizar el laberinto en Y de alternancia espontánea

3.6.9 Prueba del cilindro rotatorio (“Rotarod test”)

Este ensayo permite evaluar la coordinación motora, balance y ataxia de los ratones, al medir la habilidad de los mismos para mantener el equilibrio sobre un cilindro en rotación (Karl y col., 2003). El equipo consiste en un eje cilíndrico de 3 cm de diámetro y 50 cm de longitud, ubicado de forma horizontal en un soporte y conectado a un motor por medio de una polea. Dicho eje está separado por medio de discos en cinco compartimentos donde se colocan los ratones (Figura 10).

El ensayo se realizó 30 min después de la inyección i.p. de los compuestos sintetizados o VEH. Para ello, se empleó una velocidad de 6 rpm (revoluciones por minuto) y se registró el tiempo de permanencia (seg) del animal sobre el eje. La duración del ensayo fue de 2 min. Previamente, los ratones sin inyectar fueron sometidos a 3 entrenamientos sucesivos, y sólo se utilizaron en el ensayo aquellos animales que mantuvieron el equilibrio durante 2 min en al menos dos de tres sesiones.



Figura 10. Equipo utilizado para el ensayo de Rotarod

3.6.10 Ensayo de la malla invertida (“Inverted screen test”)

Este ensayo permite evaluar la coordinación motora del ratón para trepar una malla metálica y constituye una alternativa al ensayo de Rotarod (Coughenour y col., 1977). Consiste en una malla metálica de 13 x 13 cm de lado, con orificios de 5 mm y un espesor de alambre de 1 mm, y ubicada a una altura 40 cm del piso por medio de un soporte (Esquema 7). En cada sesión el ratón se colocó sobre la parte superior de la malla e inmediatamente la misma se rota 180°, quedando el animal en la cara inferior. Se registró el número de ratones que trepan a la cara superior colocando sobre la misma las

cuatro patas, el tiempo (seg) que tardan en lograrlo y el número de ratones que no superó la prueba.

El ensayo se realizó 30 min después de la administración i.p. de la máxima dosis utilizada de los compuestos a ensayar o VEH, y se registró el tiempo (seg) requerido por los ratones para trepar a la cara superior de la malla. Se considera que el animal no supera la prueba cuando no alcanza la cara superior en 120 seg (tiempo de corte), se tira o se cae.



Esquema 7. Esquema del equipo utilizado para realizar el ensayo de malla invertida

3.6.11 Ensayo del alambre horizontal

El ensayo del alambre horizontal se utiliza para medir el tonismo muscular. El aparato consiste en un soporte que posee, a 15 cm de altura, un alambre de 1 mm de diámetro y 28 cm de largo dispuesto horizontalmente. Se realizaron dos sesiones de entrenamiento con intervalos de 5 min, que consisten en colocar al ratón en el centro del alambre permitiendo que se agarre con sus patas delanteras, descartando aquellos que no consiguen sostenerse durante por lo menos 5 seg y al menos con una pata. Luego, se inyectó i.p. los compuestos sintetizados o VEH y a los 30 min se realizó de nuevo el experimento y se determinó el número de animales que no cumple con el criterio anterior.

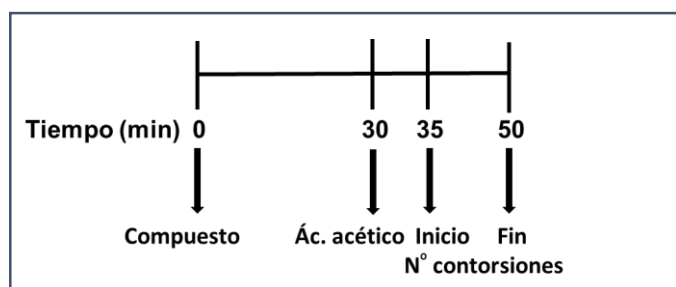
Se considera que un ratón está miorelajado si no consigue sostenerse durante por lo menos 5 seg (Bonetti y col., 1982).

3.6.12 Ensayo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético (“Writhing test”)

El ensayo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético es un modelo de dolor visceral ampliamente utilizado para la evaluación de compuestos con actividad antinociceptiva periférica (Koster y col., 1959).

Las contorsiones abdominales, consideradas como la contracción del músculo abdominal seguido de un estiramiento de las patas traseras, fueron inducidas por la inyección i.p. de una solución de ácido acético 0.75 % v/v (0.2 ml/ 30 gramos de peso corporal). Luego de esta última, los ratones se colocaron individualmente dentro de una cámara de vidrio de observación (15 x 15 cm de lado y 40 cm de altura), donde se realizó el recuento de las contorsiones durante un periodo de 15 min a partir del minuto 5 posterior a la administración del ácido acético.

Los ratones fueron administrados vía i.p. con los compuestos sintetizados, morfina (6 mg/kg) o VEH 30 min antes de la inyección del agente irritante (Esquema 8).



Esquema 8. Protocolo de inyección realizado para el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético. Los ratones se inyectaron i.p. con los compuestos a estudiar, 30 min más tarde se administró una solución de ácido acético 0.75 % y luego de 5 min se comenzó a registrar el número de contorsiones abdominales durante 15 min.

3.6.13 Ensayo de la plancha caliente (“Hot plate test”)

El ensayo de la plancha caliente es una de las pruebas más utilizadas para determinar la eficacia antinociceptiva de fármacos en roedores (Carter, 1991). Es un método adecuado para el estudio de fármacos que actúan a nivel central mediante la evaluación de la sensibilidad al dolor agudo originado por un estímulo térmico. El equipo consta de una plancha metálica delimitada por un cilindro plástico transparente de 10 cm de diámetro y 18 cm de altura.

Este ensayo se realizó, primero, utilizando una bomba de agua circulante termo-regulada a 55.0 ± 0.1 °C (ensayos ejecutados con la 3,3-dibromoflavanona). Luego, se adquirió un equipo cuya temperatura fue regulada por un ultra-termostato a 52.5 ± 0.1 °C

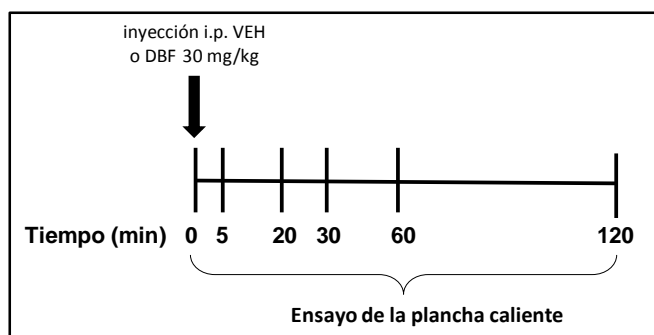
(Figura 11) (ensayo realizado con los derivados de chalconas). Los animales, 30 min después de ser inyectados i.p. con los compuestos a ensayar, morfina (6 mg/kg) o VEH, fueron colocados en el centro de la plancha a la temperatura constante seleccionada. Se registró manualmente el tiempo de latencia (en seg) desde que se coloca al animal en la plancha hasta que se observa la respuesta al estímulo térmico. Para incrementar la especificidad del ensayo se midió el tiempo de latencia a la primera respuesta observada, pudiendo ser: lamida, retirada o golpeteo (“flutter”) de las patas traseras, o reacción de disconformidad por salto (Carter, 1991). El tiempo máximo de exposición de los animales en la plancha caliente fue de 45 seg para evitar el daño tisular. La prolongación del tiempo de latencia comparada con los valores del grupo control indica un efecto antinociceptivo por parte de la droga evaluada (Eddy y Leimbach, 1953).



Figura 11. Equipo utilizado para realizar el ensayo de la plancha caliente. Figura obtenida de <http://tmc.sinica.edu.tw/hotcold.html>

3.6.14 Efecto antinociceptivo en el tiempo

Se realizó una curva temporal del efecto antinociceptivo de la 3,3-dibromoflavanona en el ensayo de la plancha caliente. Para ello, se administró 30 mg/kg i.p de 3,3-dibromoflavanona o VEH y luego de 0, 5, 20, 30, 60 o 120 min se colocó al ratón en la plancha caliente y se procedió como se detalla en 3.6.13 (Esquema 9).



Esquema 9. Protocolo de inyección realizado para el ensayo curva temporal del efecto antinociceptivo de la 3,3-dibromoflavanona (DBF) en el ensayo de la plancha caliente

3.6.15 Ensayo de la formalina

El ensayo de la formalina mide la respuesta a un estímulo nociceptivo moderado y continuo por lo que puede presentar una mayor similitud con el dolor clínico (Abbott y col., 1982; Murray y col., 1988). No sólo se utiliza como un modelo de dolor tónico, sino también como un modelo de dolor inflamatorio.

Los animales se habituaron en una cámara de observación de acrílico transparente (20 cm x 20 cm con paredes de 18 cm de altura) durante 10 min. Luego de 30 min de la administración i.p. de los compuestos a evaluar, morfina (6 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) o VEH, se inyectó (utilizando una microjeringa con aguja de calibre 30 gauge) 20 µl de solución de formalina al 1 %, disuelta en buffer fosfato (pH 7.4), en la superficie dorsal de la pata trasera derecha de los ratones. Inmediatamente después de la inyección de formalina los ratones se colocaron individualmente en la cámara de observación. El tiempo que el animal se lame la pata inyectada se considera como indicativo de dolor. La respuesta nociceptiva se registró en dos fases: primera (5 min después de la inyección de formalina) y segunda (15-50 min después de la inyección de formalina).

El porcentaje de la reducción del tiempo de lamida se calculó como:

$$\% \text{ de reducción del tiempo de lamida} = 100\% - (A \times 100\% / B)$$

A: El tiempo de lamida de los ratones inyectados con los compuestos a evaluar

B: El tiempo de lamida de los ratones control

3.6.16 Estudios de bloqueo con antagonistas específicos

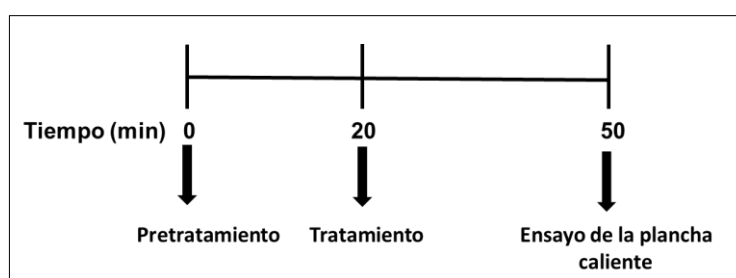
Estos ensayos se realizaron para evaluar la participación de diferentes receptores cerebrales en el mecanismo de acción de la de 3,3-dibromoflavanona y la 5'-metil-2'-hidroxi-3-nitrochalcona. Las dosis, las vías de administración y los tiempos de pre-tratamiento de los antagonistas fueron seleccionados en base a información de literatura

(Jürgensen y col., 2005; Kaur y col., 2005) y ensayos previos realizados en el laboratorio (Loscalzo y col., 2008), con el fin de asegurar el bloqueo de los receptores en estudio. Para todos los animales, primero se realizó el pretratamiento mediante la administración de distintos antagonistas o solución fisiológica; luego el tratamiento con los compuestos a ensayar, o VEH; y finalmente se procedió a realizar el ensayo farmacológico.

3.6.16.1 Ensayos de bloqueo de la acción de la 3,3-dibromoflavanona

Para evaluar la posible participación del sistema opioide en el efecto antinociceptivo producido por la 3,3-dibromoflavanona, los ratones fueron pretratados con naltrexona (5 mg/kg, i.p., un antagonista del receptor opioide no selectivo), naltrindol (5 mg/kg, i.p., un antagonista selectivo del receptor δ -opioide) o norbinaltorfimina (10 mg/kg, por vía subcutánea, s.c., un antagonista selectivo del receptor κ -opioide), y después de 20 min o 24 h (para norbinaltorfimina), los animales recibieron la administración i.p. de la 3,3-dibromoflavanona (30 mg/kg) o VEH. El ensayo de la plancha caliente se realizó 30 min más tarde (Esquema 10).

Para examinar la posible participación de los receptores serotoninérgicos y adrenérgicos en el efecto antinociceptivo de la 3,3-dibromoflavanona, los ratones fueron pretratados con ketanserina (0,5 mg /kg, i.p., un antagonista selectivo del receptor 5-HT_{2A/C}), prazosina (0,2 mg / kg, i.p., antagonista α_1 -adrenérgico) o yohimbina (2 mg / kg, i.p., antagonista α_2 -adrenérgico). Luego de 20 min, los animales recibieron la administración de la 3,3-dibromoflavanona (30 mg/kg) o VEH y fueron evaluados en el ensayo de la plancha caliente 30 min más tarde (Esquema 10).



Esquema 10. Protocolo de inyección realizado para el ensayo de bloqueo. El pretratamiento de los ratones corresponde a la inyección i.p. de solución salina o naltrexona (5 mg/kg), naltrindol (5 mg/kg, i.p), ketanserina (0,5 mg /kg, i.p), prazosina (0,2 mg / kg, i.p.) o yohimbina (2 mg / kg, i.p.). El tratamiento corresponde a la inyección i.p. de vehículo o los compuestos estudiados.

3.6.16.2 Ensayos de bloqueo de la acción de la 5'-metil-2'-hidroxi-3-nitrochalcona

Para evaluar la participación del sistema opioide en el efecto antinociceptivo de la 5'-metil-2'-hidroxi-3-nitrochalcona, los ratones fueron pretratados con naltrexona y después de 20 min recibieron la administración i.p. de 5'-metil-2'-hidroxi-3-nitrochalcona (30 mg/kg) o VEH. El ensayo de la plancha caliente se realizó luego de 30 min (según el Esquema 10).

3.6.17 Ensayo del carbón activado (“charcoal meal test”)

Los efectos de la 3,3-dibromoflavanona sobre el tránsito gastrointestinal en ratones se evaluó mediante el ensayo del carbón activado (charcoal meal) (Manara y col., 1986; Schulz y col., 1979). Los ratones se mantuvieron en ayunas, con agua disponible *ad libitum*, durante 18 hs previas al ensayo. Treinta min después de la administración i.p. de de la 3,3-dibromoflavanona, morfina (6 mg/kg) o VEH se administró por vía oral una suspensión de carbón (10% de carbón vegetal en 5% de goma arábica) en un volumen de 0.25 ml/ratón. Treinta min después de la administración del carbón los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se retiró cuidadosamente el estómago y el intestino delgado. Luego, se midió la longitud del intestino delgado (desde el esfínter pilórico hasta la unión ileocecal) y la máxima distancia alcanzada por el carbón. Para cada animal, el porcentaje del tránsito gastrointestinal se calculó como la distancia recorrida por el preparado de carbón respecto a la longitud total del intestino delgado. La inhibición del tránsito gastrointestinal (%) se calculó como: Inhibición de tránsito gastrointestinal (%) = [(tránsito gastrointestinal del VEH - tránsito gastrointestinal de la droga) / (tránsito gastrointestinal del VEH)] x 100.

3.6.18 Dependencia

Se generó dependencia a la morfina en base a los protocolos de dependencia descriptos por Broseta y col. (2002), Raehal (2005) y Yamaguchi y col. (2001) con algunas modificaciones.

Se dividieron los ratones en seis grupos:

-MOR-SAL: se le administró morfina (MOR) i.p. dos veces al día, a las 9 y 19 hs, durante tres días con dosis crecientes de 15 mg/kg (día 1), 30 mg/kg (día 2) y 60 mg/kg (día 3). El día del ensayo (día 4), se les inyectó solución salina (SAL).

-MOR-NTX: se les administró morfina (MOR) i.p. dos veces al día, a las 9 y 19 hs, durante tres días con dosis crecientes de 15 mg/kg (día 1), 30 mg/kg (día 2) y 60 mg/kg (día 3). El día del ensayo (día 4), se les inyectó naltrexona (NTX) 1 mg/kg.

-3,3-dibromoflavanona-SAL: se les administró 3,3-dibromoflavanona i.p. dos veces al día, a las 9 y 19 hs, durante tres días con dosis crecientes de 25 mg/kg (día 1), 50 mg/kg (día 2) y 100 mg/kg (día 3). El día del ensayo (día 4), se les inyectó solución salina (SAL).

-3,3-dibromoflavanona -NTX: se les administró 3,3-dibromoflavanona i.p. dos veces al día, a las 9 y 19 hs, durante tres días con dosis crecientes de 25 mg/kg (día 1), 50 mg/kg (día 2) y 100 mg/kg (día 3). El día del ensayo (día 4), se les inyectó naltrexona (NTX) 1 mg/kg.

-VEH-SAL: El grupo control recibió el mismo volumen de la solución vehículo i.p. dos veces al día, a las 9 y 19 hs, durante tres días. El día del ensayo (día 4), se les inyectó solución salina (SAL).

-VEH-NTX: El grupo control, recibió el mismo volumen de la solución vehículo i.p. dos veces al día, a las 9 y 19 hs, durante tres días. El día del ensayo (día 4), se les inyectó naltrexona (NTX) 1 mg/kg.

Previo a que los ratones reciban la administración de la solución salina o NTX 1 mg/kg, en el día 4, fueron habituados por 30 min en la caja observación de acrílico transparente (20 cm x 20 cm con paredes de 18 cm de altura), donde se realizó la medición. Luego, se pesaron e inmediatamente después se les inyectó salina o NTX i.p., para precipitar el síndrome de abstinencia y se colocaron en la caja de observación durante 30 min para evaluar los signos de este síndrome. Una hora después de la administración de NTX o salina se volvieron a pesar a los ratones para calcular el porcentaje de pérdida de peso.

Para evaluar los signos de retirada se utilizó la escala de Gellert y Holtzman modificada por Broseta y col. (2002), en la que se distinguen dos clases de signos: cuantificables y observables. Los primeros se cuantifican de la siguiente manera: pérdida de peso (cada 1% de pérdida de peso se cuantificó como 1), el número de saltos (de 1-4 saltos se cuantificaron como 1, de 5-9 saltos como 2, y > 10 como 3), el número de sacudidas del cuerpo (1-2 se cuantifican como 2, > 3 como 4). Para los siguientes signos observables sólo se evaluó su presencia o su ausencia: diarrea (2), ptosis (2), la postura anormal (3), y la erección o la eyaculación (acicalamiento genital) (3). Los saltos fueron, también, evaluados por separado.

3.6.19 Estudio comparativo del tratamiento agudo y crónico de 3,3-dibromoflavanona y morfina en los ensayos de la plancha caliente, actividad locomotora, malla invertida y del carbón activado.

Se estudiaron los efectos de la administración aguda y crónica de 3,3-dibromoflavanona y morfina en los ensayos de la plancha caliente, actividad locomotora, malla invertida y del carbón activado en un tratamiento crónico. El tratamiento crónico consistió en una administración diaria de 3,3-dibromoflavanona en una dosis de 30 mg/kg (i.p.), morfina 6 mg/kg (i.p.) o VEH a las 12:00 hs durante 12 días consecutivos. El día 10 se realizaron los ensayos de actividad locomotora y malla invertida, el día 11 el ensayo de la plancha caliente, y el día 12 se evaluó el tránsito gastrointestinal mediante el ensayo del carbón activado.

3.6.20 Administración combinada de 3,3-dibromoflavanona y morfina

Estos ensayos se realizaron para evaluar el efecto de la administración conjunta de 3,3-dibromoflavanona con morfina sobre la nocicepción. Se inyectó a los animales con VEH, 3,3-dibromoflavanona 10 mg/kg, morfina 1 y 3 mg/kg y combinaciones de 3,3-dibromoflavanona + morfina de (10 + 1) mg/kg y (10 + 3) mg/kg, respectivamente. Luego de 30 min, se realizó el ensayo de la plancha caliente.

3.7 Análisis de los resultados

Para el análisis estadístico de todos los datos se empleó el programa GraphPad Prism para Windows versión 5.00.

3.7.1 Análisis de los ensayos de inhibición enzimática

Para el cálculo de la CI_{50} , se utilizaron varias concentraciones de cada compuesto para obtener entre el 5% y el 90% de la actividad enzimática. Los valores de CI_{50} se obtuvieron graficando los porcentajes de inhibición de la actividad enzimática en función de las concentraciones del inhibidor utilizadas, con los datos experimentales ajustados a la ecuación: $Y = \text{parte inferior} + (\text{parte superior} - \text{parte inferior}) / (1 + 10^{(\text{LogI } CI_{50} - X)}) \times \text{Hillslope}$, donde X es el logaritmo de la concentración de inhibidor e Y es el porcentaje de inhibición. El porcentaje de inhibición se calculó como: % inhibición= 100-RA.

3.7.2 Análisis de los ensayos de unión a receptores

Para la obtención de las curvas de desplazamiento se graficó el porcentaje de unión específica de los compuestos tritados [³H] DAMGO, [³H] FNZ y [³H] 8-OH-DPAT en función del logaritmo de la concentración de inhibidor. Los datos se ajustaron mediante regresión no lineal de acuerdo con la ecuación:

$$Y = \text{Mínimo} + \frac{(\text{Máximo} - \text{Mínimo})}{1 + 10^{(X - \text{Log CI}_{50})}}$$

Donde Y es el % de unión específica; Mínimo es la menor respuesta obtenida; Máximo es la respuesta en ausencia de inhibidor (100%); CI_{50} es la concentración de droga que produce un 50% de inhibición; X es el logaritmo de la concentración de inhibidor.

El cálculo de la K_i se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$K_i = \text{CI}_{50} / (1 + [X]/K_d)$$

Donde X es la concentración usada de radioligando; CI_{50} es la concentración de droga que produce un 50% de inhibición; K_d es la constante de disociación del radioligando. Se empleó una K_d : 2.0 nM para el [³H] FNZ (Regan y col., 1981), K_d : 2.4 nM para [³H] 8-OH-DPAT (Arro y col., 2001) y K_d : 0.5 nM para el [³H] DAMGO (Zernig y col., 1996).

3.7.3 Análisis de los resultados farmacológicos

Los resultados fueron expresados como la media \pm E.S.M. del: N° de entradas a las ramas abiertas, porcentaje del tiempo pasado en las ramas abiertas y N° total de entradas para el ensayo de laberinto en cruz elevado; N° de rearings, N° de holes y Tiempo de head-dipping (seg) para el ensayo de campo abierto con agujeros; N° de cuentas para el ensayo de actividad locomotora espontánea; tiempo de inmovilidad para el ensayo de suspensión por la cola; índice de alternancia para el laberinto en Y de alternancia espontánea; N° de contorsiones abdominales para el ensayo del ácido acético; tiempo de latencia (seg) para el ensayo de la plancha caliente; tiempo de lamida (seg) para el ensayo de la formalina; porcentaje de inhibición del tránsito gastrointestinal para el ensayo del carbón activado; escala de Gellert y Holtzman y N° de saltos para el ensayo de dependencia; tiempo de permanencia (seg) para el ensayo de Rotarod; tiempo que tarda en trepar (seg) para el ensayo de la malla invertida.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de t de Student no apareada (para comparar la respuesta de un grupo de ratones tratados respecto al control VEH) y

por ANOVA de un factor (tratamiento) seguido del test de comparación múltiple de Dunnet (para comparar las respuestas de más de un grupo de ratones tratados con las de los controles VEH) o del test de comparación múltiple de Newman-Keuls (para comparar todos los tratamientos entre sí).

En el caso de que no se cumpla la homogeneidad de varianzas se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la comparación múltiple de Dunn.

Los resultados obtenidos en el ensayo de la malla invertida, en la prueba del Rotarod y en el ensayo del alambre horizontal se agruparon en tablas de contingencia y se analizaron mediante el Test de Chi-square.

Los experimentos de bloqueo y de deterioro cognitivo inducido por escopolamina en la prueba del laberinto en Y, se analizaron por ANOVA de dos vías (pre-tratamiento vs. tratamiento) y la comparación post hoc fue realizada con la prueba de Bonferroni. Si se evidenció una interacción significativa entre el pretratamiento y el tratamiento, se realizó ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple post-hoc Newman-Keuls.

Para el estudio de tratamientos agudos vs. crónicos los resultados fueron analizados también mediante ANOVA de dos vías (tratamiento vs. duración del tratamiento) y la comparación post hoc fue realizada con la prueba de Bonferroni. Si se evidenció una interacción significativa entre el pre-tratamiento y el tratamiento, se realizó ANOVA de una vía y la prueba de t de Student no apareado.

Resultados

Parte I

Síntesis de derivados de flavonoides

4.1 Química

4.1.1 Chalconas

4.1.1.1 Introducción

Las chalconas son pequeñas moléculas no quirales que tienen un peso molecular en el rango de 300 - 600 g/mol, con relativamente alta lipofilia (Log P ~ 5-7).

Químicamente, tienen una estructura común de 1,3-diaril-2-propen-1-ona, de dos anillos aromáticos unidos por un sistema de tres carbonos α , β -insaturados. Son considerados como flavonoides de cadena abierta, que pueden ser fácilmente ciclados para formar flavanonas a través de una adición de Michael. Las chalconas pueden existir como isómeros, cis y trans, siendo el isómero trans el más estable termodinámicamente.

Las chalconas se pueden obtener por aislamiento a partir de extractos de plantas y por una variedad de rutas sintéticas, siendo la más común la condensación de Claisen-Schmidt en presencia de ácido o base.

Se ha reportado una amplia gama de actividades farmacológicas de derivados de chalconas como: antiinflamatorias, antioxidantes, antibacteriales, antivirales, antifúngicas, citotóxicas y antitumorales, entre otras. Se ha demostrado que la eliminación del sistema carbonílico α , β -insaturado podría disminuir, e incluso eliminar, sus actividades biológicas (Katsori y Hadjipavlou-Litina, 2011; Matos y col., 2015).

Como se mencionó en la sección 1.5 y en la Tabla 2 las chalconas presentan, además, la capacidad de actuar en diferentes blancos biológicos tanto *in vitro* como en modelos animales de patologías estudiadas en este trabajo. A continuación, se describen los antecedentes reportados en bibliografía.

4.1.1.1.1 Chalconas con actividad inhibitoria sobre AChE

No existen evidencias de chalconas naturales que inhiban a la AChE, pero derivados sintéticos como la 4,5-dimetoxi-2'-hidroxichalcona, 4',5'-dimetoxi-2'-hidroxil-4-pirrolidin-1-ilchalcona, 4',5'-dimetoxi-2'-hidroxil-3-pirrolidin-1-ilchalcona, 4',6'-dimetoxi-2'-hidroxil-3'-dimetilaminochalcona, 4',6'-dimetoxi-2'-hidroxil-3'-dietilaminochalcona, 4',6'-dimetoxi-2'-hidroxil-3'-piperidinichalcona y 4',6'-dimetoxi-2'-hidroxil-3'-pirrolidinichalcona mostraron actividad inhibitoria sobre la enzima (Hasan y col., 2005; Liu y col., 2015; Sheng y col., 2009; Uriarte-Pueyo y Calvo, 2011). Estos trabajos revelaron que la sustitución del grupo hidroxilo (-OH) en la posición 2' del anillo A es necesaria para la inhibición de la AChE, y que mejoran la actividad inhibitoria las sustituciones con el grupo metoxilo (-OCH₃) en las posiciones 4 y 5 del anillo B o en las

posiciones 4' y 5' o 4' y 6' en el anillo A junto a la sustitución de grupos amino alquilo: piperidina, pirrolidina, dietilamino y dimetilamino en las posiciones 3 o 4 del anillo B o en la posición 3' del anillo A.

4.1.1.1.2 Chalconas con actividad inhibitoria sobre BChE

Se sugirió que la sustitución del grupo hidroxilo (-OH) en la posición 2 del anillo B es necesaria para inhibir a la BChE (Hasan y col., 2005).

4.1.1.1.3 Chalconas con actividad inhibitoria sobre la MAO

La chalcona natural isoliquiritigenina (2',4',4-trihidroxichalcona) inhibe a ambas isoformas de la MAO, presentando mayor actividad sobre la MAO B (Pan y col., 2000).

Se ha demostrado que las chalconas, en general, inhiben selectivamente a la MAO B y han sido utilizadas en la química medicinal como estructuras líderes en la búsqueda de nuevos inhibidores. Los derivados más activos fueron la 2', 4'-dihidroxichalcona, 4-cloro-4'-metoxi-2'-hidroxichalcona, 4-cloro-2',4'-dihidroxichalcona y 3-bromo-5',4'-dimetoxi-2'-hidroxichalcona (Chimenti y col., 2009; Morales-Camilo y col., 2015; Tanaka y col., 1987). Algunos autores predicen que la sustitución en la posición 2' del anillo A por el grupo hidroxilo (-OH) es fundamental para la inhibición de la MAO y que sustituciones por grupos hidroxilo (-OH) y metoxilo (-OCH₃) en las posiciones 2' y 4' del anillo aromático A y de sustituyentes hidrofóbicos en el anillo B como cloro (-Cl) y bromo (-Br) aumentan la actividad inhibitoria de las chalconas sobre la MAO B.

4.1.1.1.4 Chalconas con actividad anti-agregante del péptido A β

Se ha establecido que los compuestos que poseen como estructura al menos dos anillos aromáticos son capaces de inhibir la agregación del péptido A β (Armstrong y col., 2011; Gazit, 2002).

La estructura chalcona se ha utilizado para el desarrollo de agentes para la detección de placas amiloides, sustituidas con flúor etoxi o yodo radiactivo en la posición 4' y el grupo dador de electrones dimetilamino (-N(CH₃)₂) en la posición 4 del anillo B, con altas afinidades por las placas A β (Ono y col., 2009).

4.1.1.1.5 Chalconas con actividad ansiolítica

Las chalconas naturales isoliquiritigenina y buteína (2',4',3,4-tetrahidroxichalcona) poseen efectos ansiolíticos *in vivo* (Jamal y col., 2008).

4.1.1.1.6 Chalconas con afinidad por el receptor GABA_A

Se ha reportado que la acción ansiolítica de la isoliquiritigenina estaría mediada por los receptores GABA_A (Cho y col., 2011).

4.1.1.1.7 Chalconas con efectos símil-antidepresivos

Además, las chalconas naturales isoliquiritigenina y buteína han demostrado tener efectos símil-antidepresivos en modelos animales de depresión (Wang y col., 2008).

Por otro lado, derivados sintéticos de la 2',4'-dihidroxicalcona y la 2',4',6'-trihidroxicalcona fueron utilizados para la obtención de compuestos con actividad símil-antidepresiva. Los derivados más activos fueron la 2,6-dicloro-2',4'-dihidroxicalcona, la 3-bromo-2',4'-dihidroxicalcona, la 2-bromo-2',4',6'-trihidroxicalcona y la 3,4,2',4',6'-pentahidroxicalcona (Guan y col., 2013; Sui y col., 2012). El análisis de la relación estructura actividad de estos trabajos reveló que las sustituciones con halógenos bromo (-Br) y cloro (-Cl) en el anillo B y grupos hidroxilo (-OH) en el anillo A favorecería la actividad antidepresiva de este tipo de derivados (Guan y col., 2013; Sui y col., 2012).

4.1.1.1.8 Chalconas con actividad antinociceptiva periférica

Varios trabajos científicos han demostrado la capacidad de las chalconas de ejercer efectos antiinflamatorios. En particular, las hidroxicalconas inhiben a la 12-lipoxigenasa y a la ciclooxigenasa (COX) en la epidermis de ratón (Heidari y col., 2009b). Tanto el núcleoalcona y algunos de sus derivados sintéticos presentaron actividad antinociceptiva a nivel periférico *in vivo*. La introducción de sustituyentes cloro (-Cl) en la posición 4' o en la 3',4' del anillo A generó los compuestos más activos (Corrêa y col., 2001). También, derivados de la 4',6'-dimetoxi-2'-hidroxicalcona con sustituciones del halógeno bromo (-Br) en la posición 3' del anillo A y el grupo nitro (-NO₂) en la posición 3 del anillo B aumentaron la actividad antinociceptiva del núcleoalcona en modelos animales de nocicepción a nivel periférico (de Campos-Buzzi y col., 2006).

Por lo tanto, sustituciones con los grupos hidroxilo (-OH), metoxilo (-OCH₃) y halógenos bromo (-Br) y cloro (-Cl) en el anillo A y el grupo nitro (-NO₂) anillo B del núcleoalcona favorecerían el aumento de la actividad antinociceptiva de estos compuestos.

4.1.1.1.9 Chalconas con actividad antinociceptiva central

Un extracto enriquecido de chalconas diméricas (2',4',4,5-tetrahidroxichalconas) aisladas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Viana y col., 2003), la chalcona natural flavokawina B (2',4'-dimetoxi-6'-hidroxichalcona) (Mohamad y col., 2010) y el derivado sintético 4-cloro-4',6'-dimetoxi-2'-hidroxichalcona (Cechinel-Filhol y col., 1996) evidenciaron efectos antinociceptivos a nivel central en modelos animales de nocicepción. Por lo que, las sustituciones hidroxilo (-OH) y metoxilo (-OCH₃) en el anillo A y el halógeno cloro (-Cl) en el anillo B aumentarían la actividad antinociceptiva del núcleo chalcona.

4.1.1.1.10 Chalconas con afinidad por el receptor μ -opioide

En nuestro laboratorio se determinó que el núcleo chalcona presenta afinidad moderada por el receptor μ opioide *in vitro* (Loscalzo, 2011).

Consecuentemente, se puede evidenciar la capacidad de las chalconas de interactuar *in vitro* con blancos relevantes o de actuar en modelos animales relacionados con las patologías estudiadas en el presente trabajo. También, se puede observar que existen requerimientos estructurales compartidos, entre los que se destacan en primer lugar, la sustitución por el grupo hidroxilo (-OH) en la posición 2' del núcleo chalcona y las sustituciones con el grupo metoxilo (-OCH₃) en la posición 4' y 6' del anillo A. Además, en algunos casos, se ha reportado la importancia de sustituciones con halógenos bromo (-Br) y cloro (-Cl) y el grupo nitro (NO₂) en ambos anillos y del grupo dimetilamino (-N(CH₃)₂) en la posición 4 del anillo B.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se han sintetizado una serie de chalconas con sustituciones de los grupos metoxilo (-OCH₃), hidroxilo (-OH), nitro (-NO₂), cloro (-Cl) y bromo (-Br) en distintas posiciones del anillo A y de los grupos dimetilamino (-N(CH₃)₂), nitro (-NO₂), cloro (-Cl) y bromo (-Br) en distintas posiciones del anillo B del núcleo chalcona. Además, con el objetivo de estudiar el efecto de otros sustituyentes se sintetizaron derivados con grupos metilo (-CH₃), amino (-NH₂) y flúor (-F) en el anillo A.

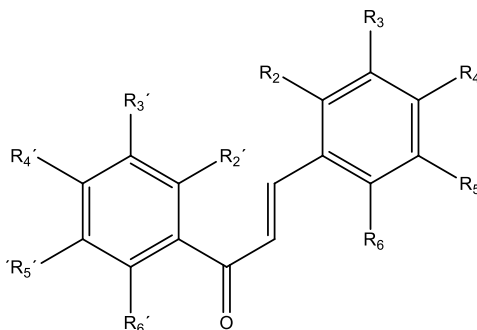
4.1.1.2 Resultados

4.1.1.2.1 Chalconas sintetizadas

Se sintetizaron veintidós chalconas (Tabla 3) sustituidas en el anillo A, B o ambos anillos (compuestos **2** a **22**) por condensación aldólica entre un benzaldehído y una

acetofenona en medio básico, con altos rendimientos. La chalcona (compuesto **1**) es comercial.

Tabla 3. Estructura de las chalconas sintetizadas



Chalcona

| N° | Nombre | R ₂ ' | R ₃ ' | R ₄ ' | R ₅ ' | R ₆ ' | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ |
|----|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------------------------|----------------|----------------|
| 1 | chalcona | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | OH | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| 3 | 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona | OH | H | OCH ₃ | H | H | H | H | H | H | H |
| 4 | 5'-metoxi-2'-hidroxichalcona | OH | H | H | OCH ₃ | H | H | H | H | H | H |
| 5 | 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona | OH | H | H | H | OCH ₃ | H | H | H | H | H |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | OH | H | H | Cl | H | H | H | H | H | H |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | OH | H | H | F | H | H | H | H | H | H |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | OH | H | H | Br | H | H | H | H | H | H |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | OH | H | H | CH ₃ | H | H | H | H | H | H |
| 10 | 3',5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | OH | Br | H | Br | H | H | H | H | H | H |
| 11 | 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | OH | H | CH ₃ | CH ₃ | H | H | H | H | H | H |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | OH | NO ₂ | H | CH ₃ | H | H | H | H | H | H |
| 13 | 3'-metoxi-4'-hidroxichalcona | H | OCH ₃ | OH | H | H | H | H | H | H | H |
| 14 | 4'-aminochalcona | H | H | NH ₂ | H | H | H | H | H | H | H |
| 15 | 4'-metilchalcona | H | H | CH ₃ | H | H | H | H | H | H | H |
| 16 | 2'-bromochalcona | Br | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| 17 | 3-nitrochalcona | H | H | H | H | H | H | NO ₂ | H | H | H |
| 18 | 4-nitrochalcona | H | H | H | H | H | H | H | NO ₂ | H | H |
| 19 | 3-clorochalcona | H | H | H | H | H | H | Cl | H | H | H |
| 20 | 4-clorochalcona | H | H | H | H | H | H | H | Cl | H | H |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | H | H | H | H | H | H | H | N(CH ₃) ₂ | H | H |
| 22 | 4'-amino-3-nitrochalcona | H | H | NH ₂ | H | H | H | NO ₂ | H | H | H |

4.1.1.2.2 Identificación de los compuestos obtenidos

Todos los compuestos sintetizados fueron identificados por ¹H-NMR y ¹³C NMR, alternativamente también por EM. Los Tiempos de retención (t_r) de HPLC son los obtenidos bajo las condiciones descriptas en el ítem **3.2.1 Síntesis de chalconas**, de la

presente Tesis. Se realizó el análisis elemental solo para aquél compuesto aún no descrito en la literatura. Todos los espectros se muestran en el ANEXO I.

2'-hidroxichalcona (2)

(E)-1-(2'-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 85 %; t_r (HPLC): 26.5 min, cristales amarillos (de etanol-agua). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 12.85 (s, 1H, OH), 7.98-7.93(m, 2H, H β , 6'-H), 7.72-7.67 (m, 3H, H α , 2-H, 6-H), 7.56-7.45 (m, 4H, 3-H, 4-H, 5-H, 4'-H), 7.07-6.95 (m, 2H, 3'-H, 5'-H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 193.76 (C=O), 163.62 (C2'), 145.50 (C β), 136.43 (C4'), 134.62 (C1), 130.95 (C4), 129.66 (C6'), 129.06 (C3), 129.06 (C5), 128.68 (C2), 128.68 (C6), 120.03 (C1'), 120.03 (C α), 118.87 (C3'), 118.67 (C5').

4'-metoxi-2'-hidroxichalcona (3)

(E)-1-(4'-metoxi-2'-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 34 %; t_r (HPLC): 25.3 min, cristales de color naranja (de etanol-agua). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 13.46 (s, 1H, OH), 7.90 (d, $J = 15.58$ Hz, 1H, H β), 7.85 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 6'-H), 7.67-7.62 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.59 (d, $J = 15.48$ Hz, 1H, H α), 7.45-7.44 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 6.52-6.49 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 3.88 (s, 3H, OCH $_3$). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 191.85 (C=O), 166.72 (C 4'), 166.24 (C2'), 144.41 (C β), 134.79 (C1), 131.24 (C4), 130.66 (C6'), 128.99 (C3), 128.99 (C5), 128.53 (C2), 128.53 (C6), 120.33 (C α), 114.09 (C1'), 107.78 (C5'), 101.08 (C3'), 55.61 (CH $_3$).

5'-metoxi-2'-hidroxichalcona (4)

(E)-1-(5'-metoxi-2'-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 76 %; t_r (HPLC): 25.5 min, aceite de color naranja. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 12.39 (s, 1H, OH), 7.95 (d, $J = 15.45$ Hz, 1H, H β), 7.71-7.66 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.63 (d, $J = 15.48$ Hz, 1H, H α), 7.48-7.42(m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 7.39-7.38(m, 1H, 4'-H), 7.19-7.12 (m, 2H, 3'-H, 6'-H), 3.87 (s, 3H, OCH $_3$). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 193.40 (C=O), 157.97 (C2'), 151.75 (C5'), 145.61 (C β), 134.61 (C1), 130.96 (C4), 129.06 (C3), 129.06 (C5), 128.67 (C2), 128.67 (C6), 124.14 (C α), 120.20 (C3'), 119.65 (C6'), 113.56 (C1'), 56.02 (OCH $_3$).

6'-metoxi-2'-hidroxichalcona (5)

(E)-1-(6'-metoxi-2'-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 70 %; tr (HPLC): 25.3 min, aceite de color naranja. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 13.15 (s, 1H, OH), 7.87-7.85 (m, 2H, H_β, 4'-H), 7.65-7.62 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.45-7.35 (m, 4H, H_α, 3-H, 4-H, 5-H), 6.64 (d, *J* = 8.37 Hz, 1H, 5'-H), 6.45 (d, *J* = 8.29 Hz, 1H, 3'-H), 3.97 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 194.49 (C=O), 164.86 (C2'), 160.99 (C6'), 142.94 (C_β), 135.92 (C1), 135.34 (C4'), 130.30 (C4), 128.92 (C3), 128.92 (C5), 128.47 (C2), 128.47 (C6), 127.60 (C_α), 112.00 (C5'), 110.97 (C3'), 101.54 (C1'), 55.96 (CH₃). EM m/z 255.0 [M+1H]⁺ (C₁₆H₁₄O₃).

5'-cloro-2'-hidroxichalcona (6)

(E)-1-(5'-cloro-2'-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 86 %; tr (HPLC): 28.8 min, cristales amarillos (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.75 (s, 1H, OH), 7.97 (d, *J* = 15.46 Hz, 1H, H_β), 7.89 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 6'-H), 7.72-7.70 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.60 (d, *J* = 15.49 Hz, 1H, H_α), 7.48-7.46 (m, 4H, 3-H, 4-H, 5-H, 4'-H), 7.01 (d, *J* = 8.88 Hz, 1H, 3'-H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 192.77 (C=O), 161.73 (C2'), 146.52 (C_β), 136.15 (C1), 134.32 (C4'), 131.27 (C5'), 129.11 (C3), 129.11 (C5), 128.85 (C2), 128.85 (C6), 123.60 (C4), 120.62 (C6'), 120.25 (C3'), 120.15 (C1'), 119.50 (C_α). EM m/z 260.1/262.3 (rel. 3/1) [M+1H]⁺ (C₁₅H₁₁ClO₂).

5'-fluor-2'-hidroxichalcona (7)

(E)-1-(5'-fluor-2'-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 85 %; tr (HPLC): 26.6 min, cristales amarillos (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.56 (s, 1H, OH), 7.98 (d, *J* = 15.43 Hz, 1H, H_β), 7.71-7.68 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.63-7.59 (m, 1H, 6'-H), 7.57 (d, *J* = 15.54 Hz, 1H, H_α), 7.49-7.46 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 7.30-7.24 (m, 1H, 4'-H), 7.03 (dd, 1H, 3'-H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 192.90 (C=O), 159.76 (C2'), 156.45 (C5'), 146.38 (C_β), 134.35 (C1), 131.22 (C4), 129.11 (C3), 129.11 (C5), 128.79 (C2), 128.79 (C6), 124.09 (C_α), 119.93 (C1'), 119.83 (C3'), 119.56 (C4'), 114.39 (C6'). EM m/z 243.1 [M+1H]⁺ (C₁₅H₁₁FO₂).

5'-bromo-2'-hidroxichalcona (8)

(E)-1-(5'-bromo-2'-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 62 %; tr (HPLC): 25.8 min, cristales amarillos (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.77 (s, 1H, OH), 8.03 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, 6'-H), 7.97 (d, *J* = 15.40 Hz, 1H, H_β), 7.72-

7.71 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.61-7.56(m, 2H, H α , 4'-H), 7.49-7.48 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 6.96 (d, $J = 8.90$ Hz, 1H, 3'-H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 192.75 (C=O), 162.51 (C2'), 146.60 (C β), 138.97 (C1), 134.31 (C4'), 131.85 (C6'), 131.29 (C4), 129.12 (C3), 129.12 (C5), 128.87 (C2), 128.87 (C6), 121.26 (C3'), 120.67 (C α), 119.42 (C1'), 110.46 (C5'). EM m/z 303.9/305.9 (rel. 1/1) $[\text{M}+1\text{H}]^+$ ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BrO}_2$).

5'-metil-2'-hidroxichalcona (9)

(E)-1-(5'-metil-2'-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 88 %; tr (HPLC): 27.6 min, cristales naranja (de etanol-agua) ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 12.66 (s, 1H, OH), 7.94 (d, $J = 15.49$ Hz, 1H, H β), 7.71-7.66 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.69 (d, $J = 15.51$ Hz, 1H, H α), 7.49-7.45 (m, 4H, 3-H, 4-H, 5-H, 6'-H), 7.35 (dd, $J = 8.49$ Hz, 1.77 Hz, 1H, 4'-H), 6.96 (d, $J = 8.46$ Hz, 1H, 3'-H), 2.38 (s, 3H, Me). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 193.66 (C=O), 161.54 (C-OH), 145.26 (C β), 137.51 (C1), 134.69 (C5'), 130.87 (C4'), 129.35 (C4), 129.03 (C3), 129.03 (C5), 128.67 (C6), 128.67 (C2), 127.93 (C6'), 120.27(C α), 119.68 (C3'), 118.39 (C1'), 20.63 (CH $_3$). EM m/z 239.0 $[\text{M}+1\text{H}]^+$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_2$).

3', 5'-dibromo -2'-hidroxichalcona (10)

(E)-1-(3', 5'-dibromo-2'-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 81 %; tr (HPLC): 31.5 min, cristales naranjas (de etanol-agua). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 13.56 (s, 1H, OH), 8.02 (d, $J = 15.36$ Hz, 1H, H β), 8.01 (d, $J = 2.10$ Hz 1H, 6'-H), 7.91(d, $J = 2.00$ Hz, 1H, 4'-H), 7.72-7.70 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.68 (d, $J = 15.36$ Hz, 1H, H α), 7.50-7.48 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 192.45 (C=O), 159.24 (C2'), 147.70 (C β), 141.33 (C4'), 134.08 (C1), 131.62(C6'), 131.13(C4), 129.18(C3), 129.18 (C5), 129.02(C2), 129.02 (C6), 118.83 (C α), 110.34 (C5'), 109.50 (C3'). EM m/z 381.8/383.8/385.8 (rel.1/2/1) $[\text{M}+1\text{H}]^+$ ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{O}_2$).

4',5'-dimetil -2'-hidroxichalcona (11)

(E)-1-(4',5'-dimetil-2'-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 45 %; tr (HPLC): 29.0 min, cristales naranjas (de etanol-agua). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 12.71 (s, 1H, OH), 7.92 (d, $J = 15.55$ Hz, 1H, H β), 7.71-7.69 (m, 4H, 2-H, 6-H, 6'-H, H α), 7.47-7.45 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 6.85 (s, 1H, 3'-H), 2.29 (s, 6H, Me). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 193.08 (C=O), 161.99 (C2'), 147.11 (C β), 144.76 (C4'), 134.80 (C5'), 130.72(C1), 129.72 (C4), 129.00 (C3), 129.00 (C5), 128.61 (C6'), 127.13 (C2),

127.13 (C6), 120.45(C α), 119.16 (C3'), 117.97 (C1'), 20.56 (CH₃), 19.04 (CH₃). EM m/z 253.0 [M+1H]⁺ (C₁₇H₁₆O₂).

5'-metil-2'-hidroxi-3-nitrochalcona (12)

(E)-1-(5'-metil-3'-nitro-2'-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 83 %; tr (HPLC): 25.9 min, polvo amarillo (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 13.08 (s, 1H, OH), 8.07 (s ancho, 1H, 4'-H), 7.96-7.91 (m, 2H, H β , 6'-H), 7.70-7.68 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.60 (d, J = 15.54 Hz, 1H, H α), 7.49-7.47 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 2.45 (s, 3H, Me). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 192.19 (C=O), 154.38 (C2'), 146.68 (C β), 136.92 (C3'), 136.60 (C5'), 134.28 (C1), 131.35(C4), 130.94 (C6'), 129.12 (C3), 129.12 (C5), 128.88 (C2), 128.88 (C6), 128.38 (C4'), 124.93 (C α), 121.37 (C1), 20.35 (CH₃). EM m/z 283.9 [M+1H]⁺. Análisis elemental: %C: 67.2, %H: 4.9, %N: 4.8, %O: 22.9 (C₁₆H₁₃NO₄).

3'-metoxi-4'-hidroxichalcona (13)

(E)-1-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 68 %; tr (HPLC): 18.7 min, cristales amarillo (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (d, J = 15.57 Hz, 1H, H β), 7.69-7.66 (m, 4H, 2'-H, 6'-H, 2-H, 6-H), 7.57 (d, J = 15.63 Hz, 1H, H α), 7.45-7.43 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 7.0.2 (d, J = 8.00Hz, 1H, 5'-H), 4.02 (s, 3H, Me). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 188.55 (C=O), 150.37 (C4'), 146.88 (C3'), 143.96 (C β), 135.10 (C1), 130.34 (C1'), 129.27 (C3), 129.27 (C5), 128.36 (C2), 128.36 (C6), 123.70 (C α), 121.70 (C2'), 113.79 (C3'), 110.50 (C6'), 56.16 (CH₃).

4'-aminochalcona (14)

(E)-1-(4'-aminofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 70 %; tr (HPLC): 17.4 min, cristales amarillos (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.96 (d, J = 8.49 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.81 (d, J = 15.66 Hz, 1H, H β), 7.67-7.65 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.57(d, J = 15.63 Hz, 1H, H α), 7.43-7.42 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 7.73 (d, 2H, 3'-H, 5'-H), 4.18 (s, 2H, NH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 188.10 (C=O), 151.08 (C4'), 143.13 (C β), 135.35 (C1), 131.09 (C2'), 131.09 (C6'), 130.07 (C4), 128.87 (C4), 128.87 (C5), 128.60 (C1'), 128.27 (C2), 128.27 (C6), 122.07 (C α), 113.94 (C3'), 113.94 (C5').

4'-metilchalcona (15)

(E)-1-(4'-metilfenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 35 %; tr (HPLC): 25.4 min, cristales blancos (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (d, *J* = 8.10 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.83 (d, *J* = 15.66 Hz, 1H, H_β), 7.68-7.66 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.56 (d, *J* = 15.72 Hz, 1H, H_α), 7.45-7.43 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 7.33 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 2.44 (s, 3H, Me). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 190.04 (C=O), 144.39 (C_β), 143.64 (C4'), 135.67 (C1'), 135.04 (C1), 130.42 (C3'), 130.42 (C5'), 129.25 (C4), 128.94 (C3), 128.94 (C5), 128.66 (C2'), 128.66 (C6'), 128.40 (C2), 128.40 (C6), 122.15 (C_α), 21.67 (CH₃).

2'-bromochalcona (16)

(E)-1-(2'-bromofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 36 %; tr (HPLC): 24.1 min, cristales amarillos (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (m, 1H, 6'-H), 7.65 (m, 1H, 3'-H), 7.55 (m, 1H, 4'-H), 7.45 (m, 1H, 5'-H), 7.45-7.42 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 7.36-7.33 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.51 (d, *J* = 15.68 Hz, 1H, H_β), 6.72 (d, *J* = 15.69 Hz, 1H, H_α). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 185.03 (C=O), 144.26 (C_β), 140.77 (C1'), 134.71 (C1), 133.80 (C3'), 130.58 (C4'), 128.92 (C4), 128.74 (C3), 128.74 (C5), 128.60 (C6'), 127.50 (C5'), 127.33 (C2), 127.33 (C6), 122.07 (C_α), 119.30 (C2').

3-nitrochalcona (17)

(E)-3-(3-nitrofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona: Rendimiento 78 %; tr (HPLC): 21.8 min, cristales blancos (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.80 (s ancho, 1H, 2-H), 8.34-8.26 (m, 1H, 4-H), 8.23-8.20 (m, 2H, H_β, 6-H), 7.78-7.68 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 5-H), 7.44-7.41 (m, 3H, H_α, 2'-H, 6'-H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 189.54 (C=O), 148.91 (C3), 141.92 (C_β), 137.69 (C1'), 137.06 (C1), 135.57 (C4'), 133.91 (C6), 130.82 (C5), 129.34 (C3'), 129.30 (C5'), 129.20 (C2'), 129.20 (C6'), 125.28 (C4), 125.15 (C2), 123.54 (C_α).

4-nitrochalcona (18)

(E)-3-(4-nitrofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona: Rendimiento 53 %; tr (HPLC): 23.3 min, cristales blanquecinos (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.31-8.13 (m, 7H, H_β, 3'-H, 5'-H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H), 7.84 (d, *J* = 15.50 Hz, 1H, H_α), 7.73-7.71 (m, 1H, 4'-H), 7.63-7.58 (m, 2H, 2'-H, 6'-H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 189.52 (C=O), 148.58 (C_β), 141.60 (C4), 137.61 (C1'), 134.00 (C2), 134.00 (C6), 130.36 (C3'),

130.36 (C5'), 129.35 (C2'), 129.35 (C6'), 129.18 (C4'), 126.55 (C1), 124.40 (C3), 124.40 (C5), 123.33 (C α).

3-clorochalcona (19)

(E)-3-(3-clorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 76 %; tr (HPLC): 26.0 min, aceite rojizo. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.06 (d, J = 15.80 Hz, 1H, H β), 8.00-7.96 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.59-7.49(m, 4H, H α , 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7.19-7.00 (m, 4H, 1-H, 2-H, 4-H, 5-H.); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 189.55 (C=O), 142.75 (C β), 137.41 (C1'), 137.24 (C1), 133.81 (C4'), 133.10 (C3), 131.16 (C5), 129.29 (C4), 29.17(C6), 129.12 (C3'), 129.12 (C5'), 128.47 (C2), 128.39 (C6'), 128.39 (C6'), 128.29 (C α).

4-clorochalcona (20)

(E)-3-(4-clorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona: Rendimiento 73 %; tr (HPLC): 25.9 min, cristales blancos (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.17 (d, J = 7.3 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.99 (d, J = 15.40 Hz, 1H, H β), 7.95 (d, J = 7.80 Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.75 (d, J = 15.80 Hz, 1H, H α), 7.70-7.40 (m, 5H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 3-H, 5-H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 189.58 (C=O), 143.00 (C β), 137.90 (C1'), 135.59 (C4), 134.12 (C4'), 133.72 (C1), 131.08 (C3), 131.08 (C5), 129.43 (C2), 129.43 (C6), 129.28 (C3'), 129.28 (C5'), 129.03 (C2'), 129.03 (C6'), 123.28 (C α).

4-dimetilaminochalcona (21)

(2E)- 3-(4-(dimetilamino) fenil)-1-fenil-2-propen-1-ona: Rendimiento 62 %; tr (HPLC): 25.1 min, cristales amarillos (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.78-7.74 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.57-7.56 (m, 2H, 2-H, 6-H), 7.55-7.54 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7.48-7.47 (m, H β), 7.33 (d, J = 15.51 Hz, 1H, H α), 6.73 (d, J = 8.79 Hz, 2H, 3-H, 5-H), 3.1 (s, 6H, NCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 190.29(C=O), 154.36(C4), 145.76 (C β), 139.09 (C1'), 131.98 (C4'), 130.40 (C2), 130.40 (C6), 128.32 (C2'), 128.32 (C6'), 125.24 (C1), 112.06 (C α), 111.02 (C3), 111.02 (C5), 40.02 (NCH₃).

4'-amino-3-nitrochalcona (22)

(2E)-1-(4'-aminofenil)-3-(3-nitrofenil) prop-2-en-1-ona: Rendimiento 60 %; tr (HPLC): 17.9 min, cristales marrones. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.53 (s, 1H, 2-H), 8.26 (d, J = 8.19 Hz, 1H, 4-H), 7.98 (d, J = 8.58 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.92(d, J = 7.92 Hz, 1H, 6-H), 7.82 (d, J = 15.75 Hz, 1H, H β), 7.68 (d, J = 15.82 Hz, 1H, H α), 7.60 (d, J

= 7.90 Hz, 1H, 5-H), 6.74 (d, $J = 8.58$ Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 4.24 (s, 2H, NH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 186.10 (C=O), 154.62 (C4'), 148.91 (C3), 139.40 (C β), 137.57 (C1), 135.23 (C6), 131.88 (C1'), 131.88 (C6'), 130.76 (C5), 125.80 (C1'), 125.52 (C4), 124.57 (C2), 123.07 (C α), 113.24 (C3'), 113.24 (C5').

4.1.2 Flavanonas

4.1.2.1 Introducción

Las flavanonas (también llamadas dihidroflavonas) son flavonoides que carecen del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C de su estructura básica. Existen, por lo tanto, dos estereoisómeros, ya que el C-2 es un centro de asimetría. En consecuencia, el anillo B puede estar en configuración (2S) o (2R). La gran mayoría de las flavanonas naturales, aisladas de plantas, son levorrotatorias (-) o (2S)-flavanonas, debido a que la reacción enzimática que cataliza la conversión de chalconas a flavanonas es estereoespecífica (Andersen y Markham, 2006).

Biogénicamente, las chalconas son los precursores inmediatos de las flavanonas, y algunas flavanonas durante su aislamiento a partir de plantas o después del tratamiento químico con una base pueden isomerizarse a chalconas por apertura de anillo. A su vez, las flavanonas son intermediarios en la biosíntesis de la mayoría de los demás grupos de flavonoides, incluyendo flavonas, flavonoles e isoflavonoides (Andersen y Markham, 2006). En general, las flavanonas que se encuentran en la naturaleza están glicosiladas por un disacárido en la posición 7.

Entre las actividades farmacológicas descritas para las flavanonas pueden mencionarse propiedades antiinflamatorias, antinociceptivas, antivirales, hipolipemiantes, sedativas y antifúngicas, entre otras (Lee y col. 1999; Nahmias y col. 2008; Loscalzo y col. 2008).

Las flavanonas han sido consideradas durante varios años como “flavonoides menores”, pero en el último tiempo ha aumentado el interés por este tipo de estructura (Andersen y Markham, 2006). Existe poca bibliografía que describa actividad de flavanonas relacionada con los blancos biológicos o con modelos animales que se estudian en este trabajo. Entre los antecedentes reportados se encuentran las flavanonas sintéticas 6-bromoflavanona y 5-metoxi-6,8-dibromoflavanona, que evidenciaron efectos ansiolíticos en ratones, pero se desconoce el mecanismo de acción de las mismas (Ognibene y col., 2008). Las flavanonas naturales hesperidina (3',5-dihidroxi-4'-

metoxiflavanona-7-(6-O- α -L-ramnosil-D-glucósido)) (Gong y col., 2014) y liquiritina (7-hidroxi-flavanona-4-O- β -D-glucopiranosido) (Wang y col., 2008) presentaron efectos símil-antidepresivos *in vivo*. También, la liquiritigenina (4',7-dihidroxi-flavanona) (Pan y col., 2000), la naringenina (4',5,7-trihidroxi-flavanona) y la 5-hidroxi-flavanona inhibieron *in vitro* a la MAO A (Mathew y col., 2014). Algunos derivados sintéticos de flavanona, también, presentaron actividad inhibitoria para la MAO B y la AChE. Los derivados más activos fueron la 7-metil-4'-fluorflavanona para la MAO B (Chimenti y col., 2010), flavanonas sustituidas con piperidina (como la 6,7-dimetoxi-4-piperidin-1-ilmetilflavanona) (Anand y Singh, 2013; Baptista y col., 2014; Pinho y col., 2013; Uriarte-Pueyo y Calvo, 2011) o por la sustitución con el resto fenil carbamato para la AChE (Anand y Singh, 2013).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que los receptores opioides están involucrados en las acciones antinociceptivas, a nivel periférico y central, de la hesperidina. A partir de una evaluación de distintos flavonoides naturales y sintéticos, se observó que agliconas naturales como la naringenina y la hesperetina actúan como ligandos del receptor μ -opioide con afinidad moderada, mientras que la **3,3-DIBROMOFLAVANONA**, una flavanona sintética, presentó la mayor afinidad por este receptor. Además, estudios preliminares *in vivo* demostraron que esta flavanona posee efecto antinociceptivo en el ensayo de la plancha caliente. La elevada afinidad de la **3,3-dibromoflavanona** a dicho receptor y su efecto antinociceptivo central *in vivo* justifican continuar su estudio como un compuesto promisorio, por lo que en este trabajo se plantea la necesidad de sintetizar, en cantidad suficiente, esta flavanona para continuar con su estudio farmacológico (Loscalzo, 2011).

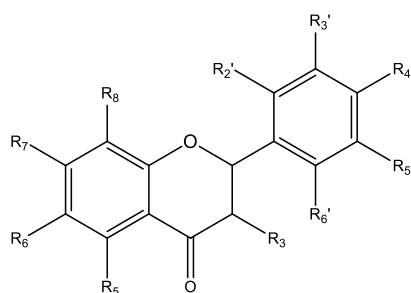
En el caso de las flavanonas, a diferencia de lo que pudo observarse para las chalconas, no pueden inferirse requerimientos estructurales compartidos que puedan tenerse en cuenta para la síntesis de nuevos derivados activos. Por otro lado, debido a que la 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (chalcona **12**) fue la chalcona sintética que ha presentado la mayor afinidad por el receptor μ -opioide en este trabajo de Tesis (ver Tabla 19, sección **4.3.3.2.2 Curvas de desplazamiento de la unión específica de [³H] DAMGO**) y teniendo en cuenta que algunas flavanonas naturales y la flavanona sintética 3,3-dibromoflavanona (**25**) presentan buena afinidad por este receptor, se decidió realizar la ciclación de la chalcona **12** para obtener la flavanona **24**.

4.1.2.2 Resultados

4.1.2.2.1 Flavanonas sintetizadas

Se sintetizaron dos flavanonas (compuestos **24** y **25**), con altos rendimientos, mediante dos métodos distintos: bromación de la flavanona y ciclación de la chalcona correspondiente. La Tabla 4 muestra las estructuras de las flavanonas obtenidas. La flavanona (compuesto **23**) es comercial.

Tabla 4. Estructura de las flavanonas sintetizadas



Flavanona

| N° | Nombre | R ₂ ' | R ₃ ' | R ₄ ' | R ₅ ' | R ₆ ' | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ | R ₇ | R ₈ |
|-----------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 23 | flavanona | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H |
| 24 | 6-metil-8-nitroflavanona | H | H | H | H | H | H | H | H | H | CH ₃ | H | NO ₂ |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | H | H | H | H | H | H | Br ₂ | H | H | H | H | H |

4.1.2.2.2 Identificación de los compuestos obtenidos

Los dos compuestos sintetizados fueron identificados por ¹H-NMR y ¹³C NMR, alternativamente también por EM. Los tiempos de retención (t_r) de HPLC son los obtenidos bajo las condiciones descritas en los ítems 3.2.2 y 3.2.3 Síntesis de flavanonas de la presente Tesis. Se realizó el análisis elemental solo para aquél compuesto aún no descrito en la literatura. Todos los espectros se muestran en el ANEXO I.

6-metil-8-nitroflavanona (**24**)

6-metil-8-nitro -2-fenil-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ona: Rendimiento 60 %; tr (HPLC): 19.8 min, cristales amarillo claros (de etanol-agua). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.11(d, *J* = 1.72 Hz, 1H, 7-H), 7.94 (d, *J* = 1.72 Hz, 1H, 5-H), 7.55 (d, *J* = 7.20 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.46-7.38 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'H), 5.89 (dd, *J* = 2.7 Hz, 12.6 Hz, 1H, 2-H), 3.45-3.37 (m, 1H, H_β), 3.03 (dd, *J* = 2.9 Hz, 17.0 Hz, 1H, H_α), 2.51 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 190.50 (C=O), 152.11 (C₉), 139.50 (C₈), 138.56 (C₁'), 131.99 (C₆), 131.83 (C₅), 131.16 (C₄'), 129.37 (C₁₀), 129.11 (C₃'), 129.11 (C₅'),

126.78 (C2'), 126.78 (C6'), 123.10 (C7), 80.36 (C2), 43.37 (C3), 20.00 (CH₃). EM m/z 284.07 [M+H]⁺ (C₁₆H₁₃NO₄).

3,3-dibromoflavanona (25)

3,3-dibromo-2-fenil-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ona: Rendimiento 66 %; tr (HPLC): 24.5 min, cristales blancos (de etanol-agua). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.09 (dd, *J* = 1.4 Hz, 6.7 Hz, 5-H), 7.76 (m, 2'-H, 6'-H), 7.61 (td, *J* = 1.8 Hz, 7.4 Hz, 7-H), 7.49 (m, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 6-H), 7.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 8-H), 5.30 (s, 2-H). ¹³C NMR (CDCl₃, 300 Mhz) δ 86.3 (C2), 69.4 (C3), 180.7 (C4), 115.6 (C10), 123.3 (C5), 129.6 (C6), 137.0 (C7), 117.9 (C8), 160.0 (C9), 133.5 (C1'), 129.5 (C2'/C6'), 127.7 (C3'/C5'), 129.9 (C4'). EM m/z 380/382/384 (rel. 1/2/1) M⁺, 301/303 (rel. 1/1), 260/262/264 (rel. 1/2/1), 221, 120. Análisis elemental correspondiente a C₁₅H₁₀O₂Br₂.

4.1.3 cLog P de los compuestos sintetizados

Se calculó el valor de cLog P que es una estimación del valor del coeficiente de partición octanol-agua que proporciona la preferencia de una molécula para insertarse en membranas lipofílicas. Como muestra la Tabla 5, los valores de cLog P de los compuestos estudiados en esta Tesis se encuentran entre 2.50 y 4.85.

Tabla 5. cLog P de los compuestos sintetizados

| N° | Nombre | cLog P |
|----|--------------------------------------|--------|
| 1 | chalcona | 3.59 |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | 3.20 |
| 3 | 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona | 3.07 |
| 4 | 5'-metoxi-2'-hidroxichalcona | 3.07 |
| 5 | 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona | 3.07 |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | 3.75 |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | 3.35 |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | 4.02 |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | 3.68 |
| 10 | 3',5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | 4.85 |
| 11 | 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | 4.17 |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | 3.34 |
| 13 | 3'-metoxi-4'-hidroxichalcona | 3.07 |
| 14 | 4'-aminochalcona | 2.78 |
| 15 | 4'-metilchalcona | 4.07 |
| 16 | 2'-bromochalcona | 4.41 |
| 17 | 3-nitrochalcona | 3.31 |
| 18 | 4-nitrochalcona | 3.31 |
| 19 | 3-clorochalcona | 4.14 |
| 20 | 4-clorochalcona | 4.14 |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | 3.87 |
| 22 | 4'-amino-3-nitrochalcona | 2.50 |
| 23 | flavanona | 2.80 |
| 24 | 6-metil-8-nitroflavanona | 2.68 |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | 4.30 |

4.1.4 Discusión

Se sintetizaron veintiún chalconas mediante condensación aldólica, y dos flavanonas, por bromación del núcleo flavanona o ciclación de la chalcona correspondiente, con altos rendimientos.

Para que una droga pueda actuar en el SNC, tiene que presentar la capacidad de penetrar la barrera hematoencefálica (BHE). En general, la lipofilicidad, el tamaño, las propiedades de ionización, y la flexibilidad molecular de un compuesto son factores que influyen en el transporte a través de la BHE. Los fármacos moderadamente lipofílicos atraviesan la BHE por difusión pasiva, mientras que las moléculas polares son menos capaces a penetrar la BHE, a menos que se sometan a transporte activo (Pajouhesh y Lenz, 2005). Los valores de cLog P obtenidos para los compuestos sintetizados se encuentran entre 2.50 y 4.85. Esto indica que son lipofílicos, por lo que podrían atravesar la BHE y tener acción a nivel del SNC.

Parte II

Inhibición enzimática y de la agregación del péptido $A\beta_{1-42}$

4.2 Ensayos de inhibición enzimática y de la agregación del péptido A β ₁₋₄₂

En el presente capítulo se describe la capacidad de algunos de los compuestos sintetizados de inhibir a las enzimas AChE, BChE, MAO A y MAO B, y la agregación del péptido A β ₁₋₄₂. En una primera instancia, de muestreo, se determinaron los porcentajes de inhibición y luego, para los compuestos más activos, se realizaron las curvas de inhibición utilizando concentraciones crecientes de los derivados para calcular la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀).

4.2.1 Estudio *in vitro* de la capacidad de los compuestos sintetizados de inhibir a la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

4.2.1.1 Introducción

4.2.1.1.1 Estructura y función de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

Las enzimas AChE y BChE, también conocida como colinesterasa plasmática o pseudocolinesterasa, son serín esterases que constituyen el grupo de las colinesterasas. Pertenecen a la familia de proteínas α/β -plegadas, que contienen una lámina β central rodeada de α hélices (Darvesh y col., 2003). Las principales diferencias entre ambas enzimas son su especificidad de sustrato y su localización. La AChE hidroliza a la acetilcolina (ACh) rápidamente, a la propionilcolina más lento, y muestra una marcada pérdida de la actividad hidrolítica hacia la butirilcolina. Se asocia principalmente al Sistema Nervioso y a los músculos, y se encuentra típicamente en la hendidura sináptica. En cambio, la BChE es menos selectiva por el tamaño o la naturaleza del grupo acilo de la colina a hidrolizar, e hidroliza de manera eficiente a la butirilcolina, benzoilcolina y otros ésteres (no de colina) como el ácido acetilsalicílico, cocaína y heroína. También, es importante en la metabolización de anticolinesterásicos de origen natural (fisostigmina) o sintéticos (organofosforados). Está presente predominantemente en el plasma y también se expresa en el hígado, pulmón y corazón (Delfino y col., 2009; Pinho y col., 2013). Si bien, antes se pensaba que la presencia de la BChE en el SNC no poseía relevancia, estudios recientes han demostrado que se expresa en distintas poblaciones de neuronas, siendo un co-regulador de la neurotransmisión colinérgica y pareciera estar implicada en algunos aspectos del desarrollo del Sistema Nervioso (Darvesh y col., 2003).

A partir de la cristalización de las colinesterasas se pudo conocer su estructura, las cuales resultaron ser similares entre distintas especies como *Torpedo californica*, ratón, *Drosophila* y humana (Soreq y Seidman, 2001).

Las tres partes principales de la subunidad catalítica de estas enzimas son el sitio activo catalítico (CAS, del inglés “catalytic active site”), el sitio activo en forma de garganta y el sitio aniónico periférico (PAS, del inglés “peripheral anionic site”) que se representan en la Figura 12 (Kračmarová y col., 2015).

El sustrato se une inicialmente al borde exterior de las colinesterasas, en la región PAS, pero la hidrólisis se produce en el interior de la enzima, en el CAS ubicado en la parte inferior de la garganta (de 15-20 Å de largo aproximadamente). El CAS se divide en cuatro subsitios principales: el esterático, el orificio oxianión, subsitio aniónico y el bolsillo acilo. El sitio esterático contiene la maquinaria catalítica de la enzima e incluye residuos de serina, histidina y glutamato (conocido como triada catalítica): (1) el residuo de serina induce el ataque nucleófilico al carbono del grupo carbonilo del sustrato éster; (2) la histidina estabiliza el intermediario de serina mediante enlaces de hidrógeno fuertes; (3) la carga negativa de glutamato estabiliza al catión histidina. El orificio del oxianión contiene dadores de hidrógeno que estabilizan el intermediario tetraédrico del sustrato que se forma durante el proceso catalítico. El subsitio aniónico (subsitio de unión a la colina o subsitio hidrofóbico) contiene varios residuos aromáticos, que son importantes para la unión de ligandos de amonio cuaternario por interacciones π -catión. El número de aminoácidos aromáticos difiere de acuerdo con la enzima: algunos residuos de aminoácidos aromáticos presentes en el bolsillo de acilo y en el PAS de la AChE se sustituyen por aminoácidos alifáticos en la BChE. Como los aminoácidos alifáticos son más pequeños que los aromáticos, estas diferencias permiten que sustratos más grandes puedan entrar en el sitio activo de la BChE. Esto explica las diferentes especificidades de estas enzimas. El sitio activo de la BChE puede acomodar grupos acilo más grandes, como los que tienen cuatro carbonos (por ejemplo, butirilcolina) o anillos aromáticos (por ejemplo, benzoilcolina) (Pinho y col., 2013).

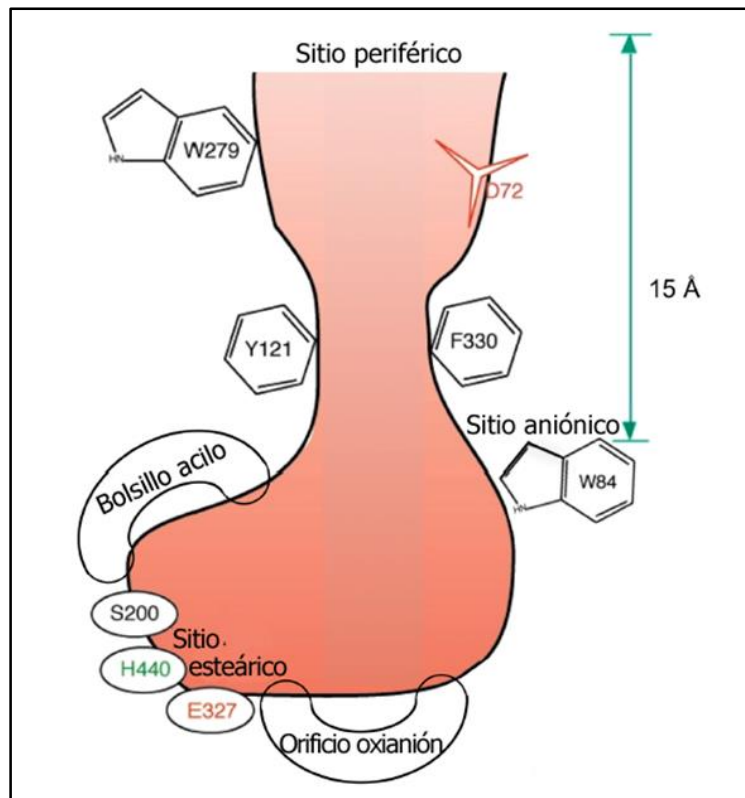


Figura 12. Vista esquemática de la subunidad catalítica de la AChE del *Torpedo californica*. El CAS ubicado en la parte inferior de la garganta está caracterizado por varios sub-sitios: el sitio aniónico, con el que interactúa el resto de colina de la ACh; el sitio esteárico, que contiene los tres residuos de la triada catalítica; el orificio oxianión, y el bolsillo acilo, que le confieren especificidad de sustrato. El PAS está situado a ~ 15 Å por encima de la zona activa, cerca de la desembocadura de la garganta. Modificada de Dvir y col. (2010).

La principal función biológica de la AChE es la terminación de la transmisión excitatoria en las sinapsis colinérgicas por la rápida hidrólisis del neurotransmisor ACh. A pesar de que el sustrato tiene que atravesar una distancia relativamente larga para llegar al sitio activo, la AChE es una de las enzimas más rápidas (Soreq y Seidman, 2001).

4.2.1.1.2 La AChE y BChE en la EA

La neurotransmisión mediada por ACh es un proceso vital para la supervivencia: su interrupción abrupta es letal, y su reducción gradual está asociada al deterioro progresivo de las funciones cognitivas y neuromusculares. A su vez, la AChE no se puede considerar simplemente como una enzima del Sistema Nervioso colinérgico, ya que podría estar involucrada en procesos biológicos tales como la neuritogénesis, la adhesión y la diferenciación celular, el desarrollo del Sistema Nervioso junto con la BChE, entre otros procesos (Darvesh y col., 2003; Delfino y col., 2009).

Según la hipótesis “colinérgica” de la EA, el deterioro en la función colinérgica es de suma importancia, especialmente en áreas del cerebro como el neocórtex y el hipocampo, asociadas a fenómenos de aprendizaje y memoria (Kása y col., 1997). Esta hipótesis se sustenta en evidencias clínicas de una notoria disminución en la transmisión colinérgica. Además, se ha demostrado que la AChE ejerce funciones no colinérgicas secundarias que incluyen la promoción de depósitos del péptido A β en forma de placas seniles en el cerebro de los individuos afectados (Guzior y col., 2015). Por lo tanto, la inhibición de la AChE se ha establecido como un blanco fundamental para el tratamiento de la EA, ya que aumenta y prolonga la disponibilidad de ACh en las regiones del cerebro y disminuye los depósitos de A β , mejorando así los procesos cognitivos como la memoria y la atención (Anand y Singh, 2013; Darvesh y col., 2003; Francis y col., 1999).

El papel fisiológico de la BChE una vez finalizado el desarrollo del Sistema Nervioso aún no se ha establecido. En los últimos años, se la ha estudiado en numerosos trabajos, ya que también ejerce un rol importante en la neurotransmisión colinérgica, y podría tener un papel compensatorio en la hidrólisis de ACh en aquellos cerebros que se encuentran atravesando procesos neurodegenerativos. En condiciones normales, la actividad de la BChE en el cerebro humano es menor que la de la AChE, pero en la EA la actividad de la BChE se incrementa significativamente (Darvesh y col., 2003). Es posible que estos cambios estén relacionados tanto con la pérdida de sinapsis como de neuronas colinérgicas, y con el aumento de células de la glía que sufren los cerebros en la EA. Por lo que se ha establecido que la acción inhibitoria sobre ambas enzimas podría conducir a mejores beneficios terapéuticos (Kozurkova y col., 2011).

4.2.1.1.3 Flavonoides como inhibidores de la acetilcolinesterasa AChE

Los IChE son la mejor farmacoterapia disponible para el tratamiento de los síntomas de la EA. De hecho, el aumento de los niveles de ACh que resulta de la inhibición de la AChE se acompaña de una mejora en las funciones cognitivas de los pacientes (Darvesh y col., 2003).

Se han reportado gran número de productos naturales como inhibidores de la AChE. Los alcaloides (por ejemplo, la galantamina) son los principales inhibidores, pero presentan importantes efectos secundarios (García-Ayllón y col., 2011; León y col., 2013). Los flavonoides han surgido como una alternativa promisoriosa, ya que además de su capacidad de inhibir a la AChE, presentan baja toxicidad.

Una revisión de trabajos científicos detalla la actividad de 128 flavonoides naturales y sintéticos derivados de flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas y chalconas (Uriarte-Pueyo y Calvo, 2011). Establecer una relación estructura actividad de estos flavonoides resulta difícil, debido a la amplia gama de estructuras químicas que presentan. Se sugirió que la presencia de un grupo metoxilo (-OCH₃) en las posiciones 4', 6 o 7 de los flavonoides de núcleo cerrado (posiciones 4', 5' o 4 del núcleo chalcona) o sustituyentes pirrolidin-1-metil o piperidin-1-metil en posición 4' (equivalente a la posición 4 en la chalcona) presentan un papel relevante en la actividad inhibidora de los flavonoides sobre la AChE (Uriarte-Pueyo y Calvo, 2011). Los derivados de isoflavona fueron los compuestos más potentes, seguidos por las chalconas y por último las flavanonas.

Con respecto a las chalconas, un estudio realizado con una serie de hidroxilo, metoxi y cloro chalconas reveló que la sustitución con un grupo hidroxilo (-OH) en el anillo A es necesaria para la inhibición de la AChE y que la sustitución con el halógeno cloro (-Cl), en el anillo A, perjudica esta actividad (Hasan y col., 2005). Además, sustituciones del grupo metoxilo (-OCH₃) en posiciones para y meta en el anillo B la favorecen. El compuesto más activo de esa serie fue la 4,5-dimetoxi-2'-hidroxichalcona, con un valor de CI₅₀ de 28.2 ± 0.5 μM (Hasan y col., 2005).

También, se determinó que la sustitución en el anillo B por el grupo hidroxilo (-OH) en posición 2 es necesaria para inhibir a la BChE, y en menor medida la sustitución con un grupo metoxilo (-OCH₃) en posición 3 y 4. La chalcona más activa fue la 2-hidroxichalcona, con un valor de IC₅₀ de 16.0 ± 0.3 μM (Hasan y col., 2005).

Por último, un dato relevante es que los flavonoides naturales y sintéticos poseen efectos neuroprotectores, ya sea mediante la prevención de la aparición o retardando la progresión de enfermedades neurodegenerativas. Se ha documentado actividad anti-amnésica y restauración de la memoria en diferentes modelos animales de amnesia (Anand y Singh, 2013; Baptista y col., 2014). Un ejemplo es la flavanona natural naringenina, que tiene actividad inhibitoria *in vitro* de la AChE y también revierte la amnesia inducida por la escopolamina en ratones (Heo y col., 2004).

4.2.1.2 Resultados

Se estudió la capacidad de los compuestos **1-12**, **14**, **21**, **23** y **25**, a una concentración de 10 μM, de inhibir a la muAChE y hBChE utilizando el método de

Ellman. Luego, se realizaron curvas de inhibición y se calculó la CI_{50} para los compuestos más activos de la serie.

4.2.1.2.1 Estudio sobre la muAChE

La Tabla 6 muestra los porcentajes de inhibición obtenidos para los compuestos ensayados. Los compuestos **1**, **2**, **7**, **10**, **12**, **14**, **21**, **23** y **25** no fueron capaces de inhibir a la muAChE. Las chalconas **3-6** y **8** la inhibieron moderadamente (entre un 20 % y 40 %) y los derivados **9** y **11** presentaron los mayores porcentajes de inhibición, con valores entre 40 y 60 %.

Tabla 6. Capacidad de los compuestos estudiados de inhibir a la muAChE

| Número | Compuesto (10 μ M) | % de inhibición muAChE |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------|
| 1 | Chalcona | - |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | - |
| 3 | 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona | + |
| 4 | 5'-metoxi-2'-hidroxichalcona | + |
| 5 | 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona | + |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | + |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | - |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | + |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | ++ |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | - |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | ++ |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | - |
| 14 | 4'-aminochalcona | - |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | - |
| 23 | flavanona | - |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | - |

Capacidad de los compuestos, a 10 μ M, de inhibir a la muAChE, se indica como: inhibición > 90 % (++++); inhibición 60-90 % (+++); inhibición 40-60 % (++); inhibición 20-40 % (+) e inhibición < 20 % (-).

4.2.1.2.1.1 Curvas de inhibición

Se realizaron curvas de inhibición para los compuestos más activos de la serie y se calculó la CI_{50} como se muestra en la Figura 13. La 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**), la 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**) y el compuesto de referencia tacrina presentaron valores de CI_{50} de $10.2 \pm 1.7 \mu$ M, $6.9 \pm 1.3 \mu$ M y $0.14 \pm 0.008 \mu$ M, respectivamente.

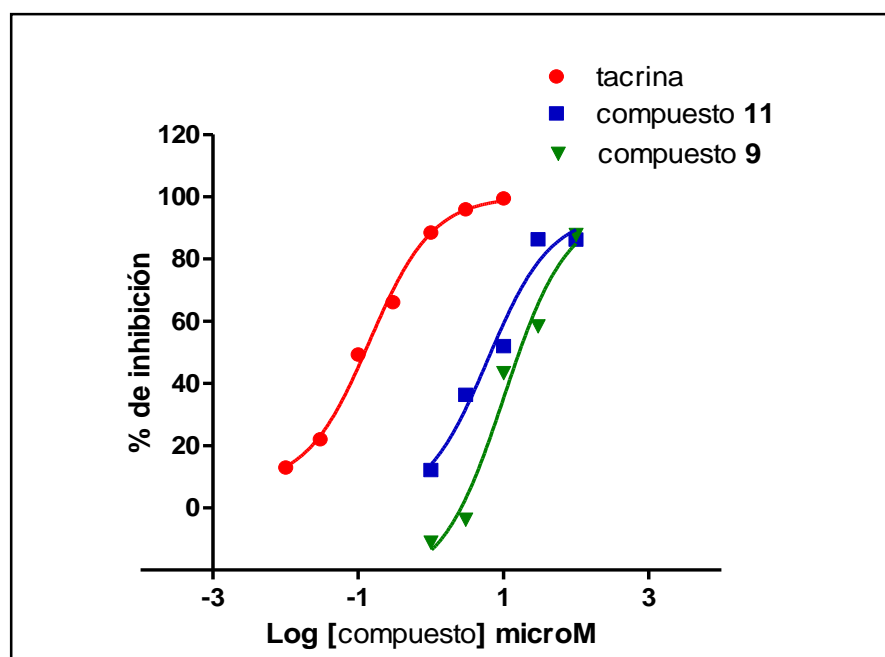


Figura 13. Curva de inhibición de la actividad colinesterasa sobre la muAChE de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) (▼), la 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**) (■) y la tacrina (●). Cada punto representa la media \pm E.S.M de tres determinaciones expresada como porcentaje de inhibición.

4.2.1.2.2 Estudio sobre la hBChE

La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos del estudio *in vitro* de la capacidad de los compuestos sintetizados de inhibir a la hBChE.

Los núcleos chalcona (**1**), flavanona (**23**) y los derivados de chalconas **2-12**, **14** y **21** no fueron capaces de inhibir a la hBChE (porcentajes menores al 20%). La 3,3-dibromoflavanona (**25**) inhibió a esta enzima en un porcentaje entre un 20% y 40%. Los resultados indican que los compuestos ensayados no presentan actividad inhibitoria sobre esta colinesterasa.

Tabla 7. Capacidad de los compuestos estudiados de inhibir a la hBChE

| Número | Compuesto (10 μ M) | % de inhibición hBChE |
|--------|--------------------------------------|--------------------------|
| 1 | chalcona | - |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | - |
| 3 | 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona | - |
| 4 | 5'-metoxi-2'-hidroxichalcona | - |
| 5 | 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona | - |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | - |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | - |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | - |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | - |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | - |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | - |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | - |
| 14 | 4'-aminochalcona | - |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | - |
| 23 | flavanona | - |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | + |

Capacidad de los compuestos, a 10 μ M, de inhibir la a la hBChE se indica como: inhibición > 90 % (++++); inhibición 60-90 % (+++); inhibición 40-60 % (++); inhibición 20-40 % (+) e inhibición < 20 % (-).

4.2.1.3 Discusión

De todos los compuestos estudiados, la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) y la 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**) inhibieron a la muAChE presentando una CI_{50} de $10.2 \pm 1.7 \mu$ M y $6.9 \pm 1.3 \mu$ M, respectivamente, sin presentar actividad frente a la hBChE. Estas chalconas presentaron mayor actividad que la 4,5-dimetoxi-2'-hidroxichalcona, una de las chalcona más activas descritas hasta el momento (CI_{50} : $28.2 \pm 0.5 \mu$ M) (Hasan y col., 2005). El resto de los compuestos ensayados presentaron baja o nula capacidad de inhibir a ambas colinesterasas.

Puede inferirse, por lo tanto, que un aumento de sustituciones con grupos metilo (-CH₃) en el anillo A, sin sustituciones en el anillo B incrementa la actividad inhibitoria sobre la AChE.

Por otro lado, a pesar de que se ha sugerido que sustituciones con grupos metoxilo (-OCH₃) en el anillo A del flavonoide son necesarias para inhibir la AChE (Uriarte-Pueyo y Calvo, 2011), las chalconas **3**, **4** y **5** no presentaron actividad.

Las colinesterasas pueden mostrar propiedades no clásicas asociadas con el péptido A β , y por lo tanto son importantes en la patogénesis de la EA. Se demostró que la AChE puede co-localizar con el péptido A β en placas neuríticas y puede aumentar la

velocidad de formación de fibrillas A β , formando complejos estables con ella. El sitio PAS de la AChE estaría implicado en estos procesos. Los compuestos que son capaces de interactuar con el sitio CAS y PAS de la enzima, son llamados inhibidores del sitio de unión dual, y son potenciales inhibidores de la AChE y agregación del péptido A β . Por lo tanto, son potenciales ligandos *multitarget* (Bag y col., 2013; Guzior y col., 2015). Algunos estudios revelaron que los flavonoides tienen la capacidad de inhibir a la AChE, y que son potenciales estructuras para la inhibición dual de la enzima interactuando en CAS y PAS.

Estudios realizados con una serie de flavonoides sustituidos con (Liu y col., 2015; Sheng y col., 2009):

- i) grupos metoxilo en el anillo A
- ii) grupos amino alquilo (dimetilamina, dietilamina, piperidina y pirrolidina) en ambos anillos
- iii) grupos amino alquilo con longitud de cadena carbonada variable en la posición 3' del anillo A del núcleo chalcona

Mostraron que:

- i) el anillo A se uniría a la parte PAS de la enzima a través de interacciones π - π con restos aromáticos mientras que el átomo de nitrógeno del grupo amino alquilo interaccionaría con el CAS mediante interacciones π -catión
- ii) los grupos amino alquilo cíclicos tienen mayor actividad
- iii) no sólo las variaciones de grupos alquilo amino son importantes para aumentar la actividad inhibitoria de las chalconas, sino que también la longitud de la cadena de carbonos que separa la estructura chalcona de los grupos amino alquilos, ya que el CAS se encuentra atravesando la garganta de la enzima

Por lo tanto, la 4'-aminochalcona (**14**) y la 4-dimetilaminochalcona (**21**) deberían unirse a la enzima mediante el CAS, ya que presentan grupos amino alquilo, capaces de generar interacciones π -catión con el sitio activo de la enzima. Sin embargo, estas chalconas no fueron activas. Esto podría explicarse por: (1) la falta de sustituyentes en el anillo A que favorezcan la unión a receptor en el PAS; (2) tener grupos amino alquilo alifáticos y no cíclicos y/o (3) porque la cadena carbonada que une el grupo amino alquilo a la chalcona no es lo suficientemente larga. Por lo tanto, si bien en este trabajo no se priorizó el diseño de inhibidores del sitio de unión dual, estas consideraciones serían necesarias para el desarrollo en el futuro de este tipo de inhibidores.

En la mayoría de las publicaciones científicas los flavonoides naturales o sintéticos evaluados presentan selectividad por la AChE. Los derivados obtenidos en este trabajo de tesis concuerdan con estos resultados. Recientemente, se han sintetizado derivados de chalcona con mayor inhibición para la BChE que para la AChE. Estos compuestos, sustituidos con grupos amino de tipo cíclicos o alifáticos, poseen igual o mayor actividad que el inhibidor control galantamina. La chalcona más activa fue la sustituida en el anillo A con una amina terciaria, y en el anillo B con el grupo metoxifenilo (IC₅₀ de 8.27 μM) (Bag y col., 2013). Por lo que también es posible la síntesis de derivados de flavonoides con actividad inhibitoria sobre la BChE.

En resumen, puede observarse que la sustitución con el grupo metilo (-CH₃) en el anillo A favorece la actividad, ya que la sustitución de la 2'-hidroxichalcona (**2**) con el grupo metilo (-CH₃) en la posición 5' o 4' y 5' aumenta la capacidad de inhibir a la muAChE (**2** vs **9** y **11**). Si bien es necesario realizar estudios de modelado molecular ("docking"), podría estimarse que esta unión sería a través de interacciones π-π con restos aromáticos de la región PAS de la enzima.

4.2.2 Estudio *in vitro* de la capacidad de los compuestos sintetizados de inhibir a Monoamino oxidasas

4.2.2.1 Introducción

4.2.2.1.1 Estructura y función de la Monoamino Oxidasas

La MAO es una flavoproteína unida a la membrana mitocondrial externa que pertenece a la familia de las amino-oxidasas que contienen flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor. Esta enzima cataliza la biotransformación, por desaminación oxidativa, de monoaminas endógenas (adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina) y diversas aminas exógenas en el SNC y en los tejidos periféricos. Esta enzima presenta un rol primordial en el mantenimiento de la homeostasis y el control de la concentración de las monoaminas y catecolaminas, especialmente a nivel de las vesículas sinápticas. A su vez, interviene en la desintoxicación, incluyendo el metabolismo de las monoaminas dietarias (Chimenti y col., 2010; Helguera y col., 2012; Pomilio y col., 2013).

Existen dos isoformas de esta enzima, denominadas A y B, que se diferencian por su distribución en los tejidos y especificidad de sustrato e inhibidores. La MAO A desamina preferentemente a la 5-hidroxitriptamina (5-HT), noradrenalina y adrenalina, y es inhibida irreversiblemente por la clorgilina. Mientras que la MAO B desamina

principalmente a la dopamina, β -feniletilamina, y bencilamina, y es inhibida irreversiblemente por la pargilina y reversiblemente por la isatina. Algunos sustratos, como la dopamina y tiramina, son comunes a las dos isoformas y se metabolizan con la misma eficiencia (Chimenti y col., 2010).

Ambas isoformas, se encuentran prácticamente en todos los mamíferos y tejidos humanos. La MAO A se expresa especialmente en el hígado, placenta y en neuronas catecolaminérgicas y sitios de localización de catecolaminas como el núcleo locus coeruleus (región que contiene neuronas noradrenérgicas). Mientras que la MAO B se localiza esencialmente en el hígado, plaquetas, linfocitos, células gliales, astrocitos y en neuronas serotoninérgicas e histaminérgicas localizadas en el núcleo dorsal del rafe y el hipotálamo. Su expresión diferencial sugiere que poseen roles independientes en la neurotransmisión y en el metabolismo de las aminas (Abell y Kwan, 2000).

La purificación y cristalización de las MAO ha dado lugar a nuevos conocimientos sobre su sitio activo. La MAO B humana cristaliza como dímero y presenta dos cavidades: “de entrada” y “de sustrato”, separadas por una cadena lateral de isoleucina que sirve como “puerta” entre ambas cavidades. Dependiendo del sustrato o el inhibidor unido, puede existir en forma abierta o cerrada. Al final de la “cavidad del sustrato” se encuentra la coenzima FAD. El sitio activo es muy hidrofóbico e involucra dos residuos paralelos de tirosina localizados frente al centro flavín que forman lo que se conoce como “jaula aromática” que tiene gran importancia en la función catalítica. A diferencia de la cavidad alargada bipartita de la MAO B, la isoforma A humana cristaliza como un monómero y sólo tiene una “cavidad sustrato” de forma “redonda” de mayor volumen (Figura 14) (Lira-Navarrete y col., 2011).

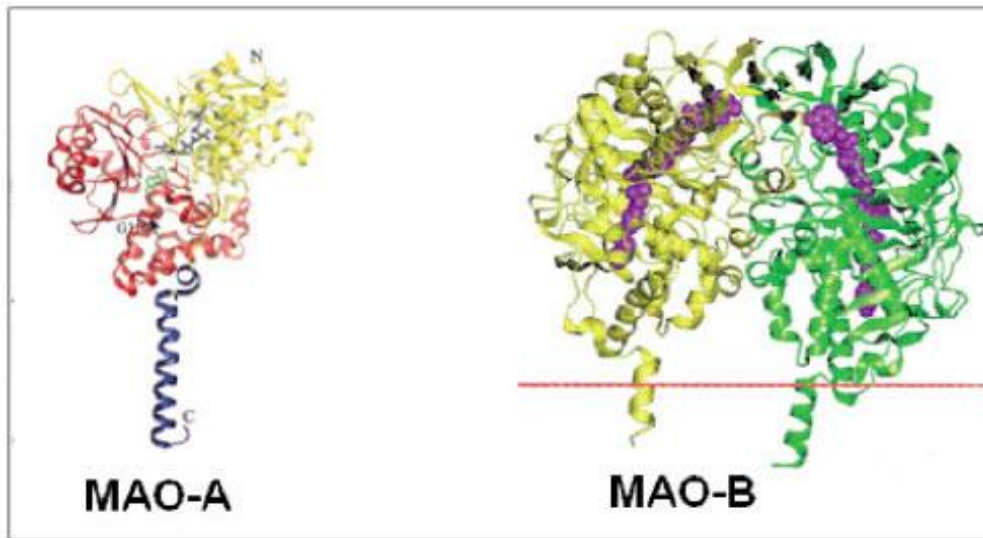


Figura 14. Estructura cristalográfica de la MAO humana. La MAO A cristaliza bajo forma monomérica. El dominio extra-membrana se muestra en amarillo y rojo, y el dominio de unión a la membrana en azul. El dominio extra-membrana se divide en dos regiones: la región de unión a FAD (amarillo) y la región de unión al sustrato/inhibidor (rojo). La MAO B: Cristaliza en forma dimérica. Los dos monómeros están representados en verde y en amarillo; el cofactor FAD se muestra en violeta. Obtenida de Pomilio y col. (2013).

4.2.2.1.2 La MAO en la depresión y enfermedades neurodegenerativas

Debido al rol fisiológico fundamental de la MAO A y B humanas se han estudiado como blancos para el tratamiento de la depresión mayor, distimia, depresión atípica resistente, ansiedad, trastornos depresivos mayores y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (EP) y la EA (Carradori y col., 2014).

La serotonina y la noradrenalina poseen una fuerte influencia en los patrones de conducta y en la función mental. La “hipótesis de las monoaminas en la depresión” se ha utilizado para explicar los efectos benéficos de los ATC y de los IMAO. En su forma original, esta hipótesis propuso que la depresión es causada por un déficit funcional de las monoaminas noradrenalina y serotonina en áreas claves del cerebro, y los agentes antidepresivos ejercen su efecto facilitando la neurotransmisión monoaminérgica por medio del incremento de los niveles de las monoaminas en las terminales sinápticas (Chimenti y col., 2010; Guadarrama y col., 2006; Schildkraut, 1965).

Si bien tradicionalmente se ha relacionado a la noradrenalina y serotonina en la fisiopatología de la depresión, en el último tiempo, se han asociado síntomas característicos de la depresión como anhedonia y desmotivación con disfunciones en el sistema dopaminérgico (Grace, 2016).

Por otro lado, con respecto a las enfermedades neurodegenerativas, la MAO B actúa en el clivaje de la dopamina, así como en la desaminación de la β -feniletilamina,

una amina endógena que estimula la liberación e inhibe la recaptación neuronal de la dopamina. Los niveles de expresión de la MAO B en el tejido neuronal se incrementan 4 veces con el envejecimiento, especialmente en las células gliales, lo que resulta en un mayor nivel de metabolización de la dopamina con un respectivo aumento en los niveles celulares de los productos de metabolización: dopanal (aldehído correspondiente), H₂O₂ (fuente de daño oxidativo) y amonio. El incremento estas especies químicas, con potencial neurotóxico, promueven la señal de eventos apoptóticos. Además, el dopanal ha sido implicado en la agregación de α -sinucleína (proteína clave en el desarrollo de la EP, cuya agregación anormal constituye los llamados cuerpos de Lewy). Se cree que estos sucesos desempeñan un papel importante en la etiología de las enfermedades neurodegenerativas como la EP y la EA (Helguera y col., 2012; Robinson y col., 2013).

La primera generación de IMAOs fue desarrollada hace sesenta años y se utilizaron como fármacos antidepresivos. Los primeros IMAOs comerciales eran irreversibles y no específicos de una isoforma de MAO (fenelzina, iproniazida, tranilcipromina). Su administración provocó efectos secundarios importantes, tales como hepatotoxicidad y riesgos de interacción con otros antidepresivos del tipo de los tricíclicos o los opiáceos. Además, debido a su unión irreversible a la enzima, su uso ha dado lugar a crisis hipertensivas denominadas “efecto queso”, inducidas por el consumo de alimentos ricos en tiramina entre los cuales se encuentran el queso, la cerveza y el chocolate. Luego, se desarrollaron los inhibidores reversibles, que no presentaron restricciones dietarias ni interacciones con otros fármacos (Pomilio y col., 2013).

En la actualidad, la MAO y sus inhibidores son nuevamente un blanco de interés científico y farmacológico. Los inhibidores selectivos de la isoforma A (IMAO A) han demostrado ser eficaces antidepresivos, mientras que algunos IMAO B resultaron ser beneficiosos en el tratamiento de la EP y la EA (Drozak y Kozłowski, 2006).

4.2.2.1.3 Flavonoides como inhibidores de la MAO

A pesar de la considerable evolución en la comprensión de las interacciones de las isoformas de la MAO con sus sustratos o inhibidores específicos, no existen reglas disponibles para el diseño racional de nuevos inhibidores potentes y selectivos. Diferentes familias de heterociclos oxigenados, entre los que se encuentran los flavonoides naturales, son capaces de inhibir a la MAO en un amplio rango de concentraciones (Carradori y col., 2014; Helguera y col., 2012).

Respecto a las estructuras de interés de este trabajo, la chalcona y la flavanona natural isoliquiritigenina y liquiritigenina, inhibieron a la MAO obtenida de la fracción mitocondrial de hígado de rata con valores de CI_{50} de 17.3 μM y 2.09 mM, respectivamente. Este resultado sugirió que el doble enlace conjugado con una cetona adyacente juega un papel fundamental en la capacidad de inhibir a la enzima (Tanaka y col., 1987). Otras flavanonas naturales aisladas de plantas, 5-hidroxi-flavanona y la naringenina inhibieron ambas isoformas de la enzima. La 5-hidroxi-flavanona fue más activa, con valores de CI_{50} de 39.6 μM para la MAO A y 3.8 μM para la MAO B, obtenidas de la fracción mitocondrial de cerebro de rata (Mathew y col., 2014).

A diferencia de las flavanonas, las chalconas han sido utilizadas en la química medicinal como estructuras líderes en la búsqueda de nuevos inhibidores de la MAO. Estas, en general, inhiben selectivamente a la MAO B. Los derivados sintéticos más activos reportados en bibliografía son: la 4-cloro-4'-metoxi-2'-hidroxichalcona (CI_{50} : $0.004 \pm 0.0003 \mu\text{M}$), la 4-cloro-2',4'-dihidroxichalcona (CI_{50} : $0.005 \pm 0.0002 \mu\text{M}$) (Chimenti y col., 2009) y la 3-bromo-4,5'-dimetoxi-2'-hidroxichalcona (CI_{50} : $2.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$) (Morales-Camilo y col., 2015).

Recientemente, estudios de relación estructura actividad tridimensional (3D-QSAR) identificaron el farmacóforo responsable de la inhibición de la MAO (Morales-Camilo y col., 2015). Se determinó que las características que debe presentar son: un grupo aceptor de puente de H (A), dos anillos aromáticos (R) y un sustituyente hidrofóbico (H). Además, en este estudio se remarcó la importancia de la estructura abierta de la chalcona para inhibir a la MAO, y también se sugirió la incorporación de un sustituyente hidrofóbico en el anillo B (Morales-Camilo y col., 2015).

4.2.2.2 Resultados

Se estudió la capacidad de los compuestos **1-12**, **14**, **21**, **23** y **25**, a una concentración de 100 μM , de inhibir a ambas isoformas de la MAO. Luego, para aquellos compuestos más activos de la serie se realizaron curvas de inhibición y se calculó la CI_{50} . Para ello, se evaluó la actividad de estos compuestos frente a la hMAO A y hMAO B mediante un método fluorométrico.

Previamente, se analizó que los compuestos estudiados no reaccionen directamente con el reactivo Amplex Red, a las concentraciones utilizadas. No se detectó interferencia significativa para ninguno de los compuestos evaluados, ni para los inhibidores de referencia.

4.2.2.2.1 Estudio sobre la hMAO A

La Tabla 8 muestra los porcentajes de inhibición de los compuestos evaluados. Los compuestos **1**, **2**, **6**, **7**, **9-12**, **14** y **23** no mostraron porcentajes de inhibición significativos. Las chalconas **3-5**, **8** y **21** inhibieron moderadamente (entre un 20 % y 40 %) y solo la flavanona **25** inhibió en un porcentaje de 40 a 60 % a la hMAO A.

Tabla 8. Capacidad de los compuestos estudiados de inhibir a la hMAO A

| Número | Compuesto (100 µM) | % de inhibición hMAO A |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------|
| 1 | chalcona | - |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | - |
| 3 | 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona | + |
| 4 | 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona | + |
| 5 | 6'-metoxi -2'-hidroxichalcona | + |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | - |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | - |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | + |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | - |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | - |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | - |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | - |
| 14 | 4'-aminochalcona | - |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | + |
| 23 | flavanona | - |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | ++ |

Capacidad de los compuestos, a 100 µM, de inhibir a la hMAO A se indica como: inhibición > 90 % (++++); inhibición 60-90 % (+++); inhibición 40-60 % (++); inhibición 20-40 % (+) e inhibición < 20 % (-).

4.2.2.2.2 Estudio sobre la hMAO B

Se estudió la capacidad de los compuestos, de inhibir a la hMAO B. La Tabla 9 muestra los porcentajes de inhibición de los compuestos evaluados a 100 µM.

Los compuestos mostraron altos porcentajes de inhibición de la actividad enzimática de la hMAO B, con excepción de la flavanona **25**, que presentó valores de inhibición comprendidos entre el 20 y el 40 %. Los compuestos **12** y **23** inhibieron a esta enzima entre un 40 y 60 % y las chalconas **2**, **5**, **8** y **9** entre un 60 y 90 %. Los derivados más activos fueron **1**, **3**, **4**, **6**, **7**, **10**, **11**, **14** y **21**, presentando porcentajes de inhibición superiores al 90 %.

Tabla 9. Capacidad de los compuestos estudiados de inhibir a la hMAO B

| Número | Compuesto (100 μ M) | % de inhibición hMAO B |
|--------|--------------------------------------|---------------------------|
| 1 | chalcona | ++++ |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | +++ |
| 3 | 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona | ++++ |
| 4 | 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona | ++++ |
| 5 | 6'-metoxi -2'-hidroxichalcona | +++ |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | ++++ |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | ++++ |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | +++ |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | +++ |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | ++++ |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | ++++ |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | ++ |
| 14 | 4'-aminochalcona | ++++ |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | ++++ |
| 23 | flavanona | ++ |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | + |

Capacidad de los compuestos, a 100 μ M, de inhibir a la hMAO B se indica como: inhibición > 90 % (++++); inhibición 60-90% (+++); inhibición 40-60 % (++); inhibición 20-40 % (+) e inhibición < 20 % (-).

4.2.2.2.1 Curvas de inhibición

Se determinó la CI_{50} para los compuestos que superaron el 80 % de inhibición de la hMAO B en 4.2.1.2.2. En la Tabla 10, se representan los valores calculados de CI_{50} para los compuestos estudiados y las drogas de referencia: clorgilina (inhibidor selectivo de la MAO A), pargilina (inhibidor selectivo de la MAO B) e isatina (inhibidor reversible de la MAO B).

Los compuestos evaluados presentan media a elevada actividad inhibitoria sobre la hMAO B. Las chalconas más activas fueron la 4'-metoxi- 2'-hidroxichalcona (**3**) y la 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**), con valores de CI_{50} de $0.05 \pm 0.002 \mu$ M y $0.2 \pm 0.02 \mu$ M, respectivamente. Los siguientes compuestos revelaron valores sub micromolares de CI_{50} en el siguiente orden decreciente de actividad: 5'-fluor-2'-hidroxichalcona (**7**) (CI_{50} : $0.4 \pm 0.02 \mu$ M), 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (**6**) (CI_{50} : $0.5 \pm 0.1 \mu$ M) y 4-dimetilaminochalcona (**21**) (CI_{50} : $0.7 \pm 0.05 \mu$ M). Los demás compuestos presentaron actividades micromolares: 5'-bromo-2'-hidroxichalcona (**8**) (CI_{50} : $1.1 \pm 0.1 \mu$ M), chalcona (**1**) (CI_{50} : $1.8 \pm 0.2 \mu$ M), 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona (**4**) (CI_{50} : $2.1 \pm 0.2 \mu$ M), 5'-metil -2'-hidroxichalcona (**9**) (CI_{50} : $2.4 \pm 0.5 \mu$ M), 2'-hidroxichalcona (**2**) (CI_{50} : $3.1 \pm 0.6 \mu$ M) y 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona (**10**) (CI_{50} : $3.6 \pm 0.8 \mu$ M). La

6'-metoxi -2'-hidroxichalcona (**5**) fue el compuesto con menor actividad, presentando un valor de CI_{50} de $7.5 \pm 1.2 \mu M$.

Tabla 10. Actividad de los compuestos estudiados sobre la hMAO B

| Número | Compuesto | CI_{50} (μM) |
|-----------|--------------------------------------|--------------------------|
| 3 | 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona | 0.05 ± 0.002 |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | 0.2 ± 0.02 |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | 0.4 ± 0.02 |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | 0.5 ± 0.1 |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | 0.7 ± 0.05 |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | 1.1 ± 0.1 |
| 1 | chalcona | 1.8 ± 0.2 |
| 4 | 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona | 2.1 ± 0.2 |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | 2.4 ± 0.5 |
| 14 | 4'-aminochalcona | 2.5 ± 0.1 |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | 3.1 ± 0.6 |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | 3.6 ± 0.8 |
| 5 | 6'-metoxi -2'-hidroxichalcona | 7.5 ± 1.2 |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | ND |
| 23 | flavanona | ND |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | ND |

$CI_{50} \pm E.S.M$ de 2 mediciones independientes de la inhibición de la hMAO B, por orden decreciente de actividad. El valor de CI_{50} de los controles son: clorgilina: $13.6 \pm 1.1 \mu M$; pargilina: $0.2 \pm 0.02 \mu M$ e isatina: $19.8 \pm 1.1 \mu M$.

Las Figuras 15 y 16 muestran las curvas de inhibición de todos los compuestos y de las chalconas más activas, respectivamente.

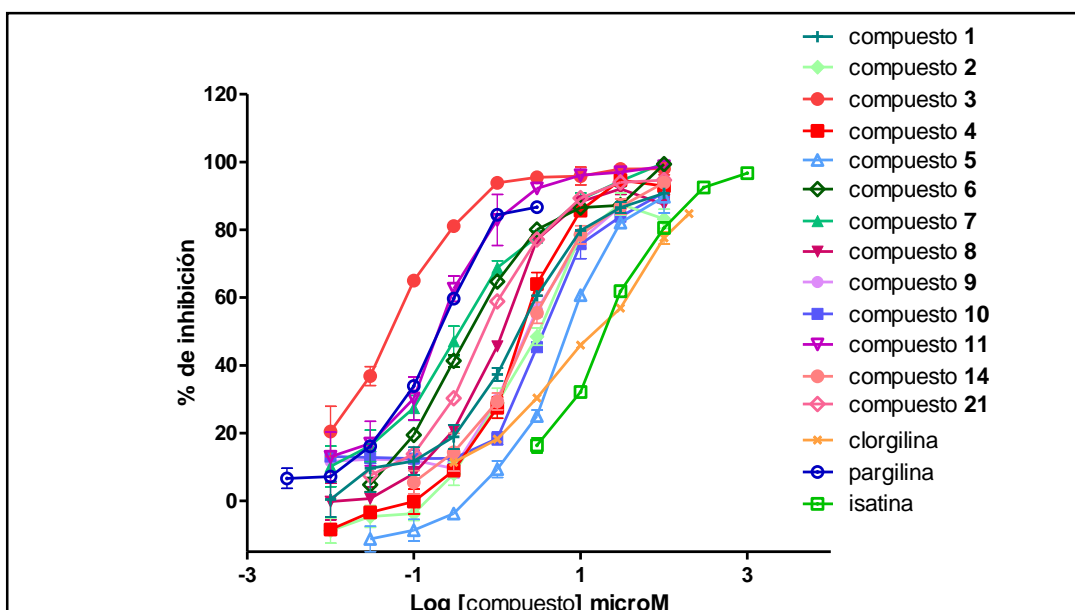


Figura 15. Curva de inhibición de chalcona (1) (+), 2'-hidroxichalcona (2) (◆), 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona (3) (●), 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona (4) (■), 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona (5) (△), 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (6) (◇), 5'-flor-2'-hidroxichalcona (7) (▲), 5'-bromo-2'-hidroxichalcona (8) (▼), 5'-metil -2'-hidroxichalcona (9) (●), 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona (10) (■), 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (11) (▽), 4'-aminochalcona (14) (●), 4-dimetilaminochalcona (21) (◇), clorgilina (x), pargilina (○) e isatina (□). Cada punto representa la media ± E.S.M de la inhibición de la hMAO B de dos mediciones independientes realizados por duplicado.

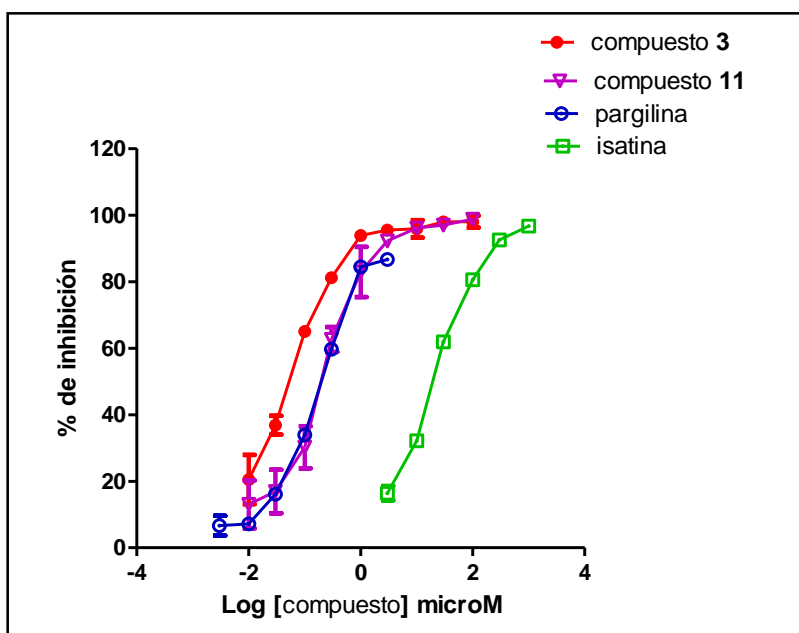


Figura 16. Curva de inhibición de las chalconas más activas y los controles. 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona (3) (●), 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (11) (▽), pargilina (○) e isatina (□). Cada punto representa la media ± E.S.M de la inhibición de la hMAO B de dos mediciones independientes realizados por duplicado.

4.2.2.2.2 Estudio de reversibilidad de la unión de la 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**3**) y la 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**) a la hMAO B

Se realizó un ensayo de reversibilidad para evaluar el tipo de unión entre los compuestos más activos de la serie y la enzima. La Figura 17 muestra el porcentaje de actividad de la hMAO B luego de la dilución del complejo enzima-inhibidor para las chalconas **3**, **11** y del control pargilina (inhibidor irreversible de la MAO B).

El control pargilina, no fue capaz de restablecer la actividad enzimática, mientras que las chalconas **3** y **11** recuperaron dicha actividad, con valores de porcentajes de 78.7 ± 0.51 y 83.0 ± 2.1 , respectivamente (respecto al control DMSO). Esto demuestra que los compuestos **3** y **11** se unen de manera reversible a la hMAO B.

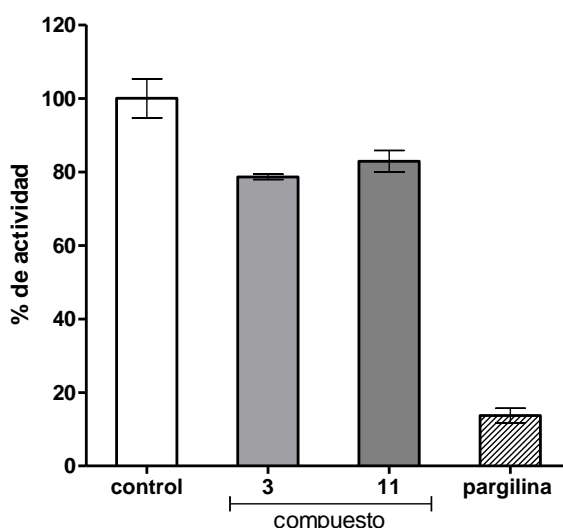


Figura 17. Recuperación de la actividad enzimática de la hMAO B. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del porcentaje de actividad de la hMAO B de dos ensayos independientes. La reversibilidad de la inhibición se determinó midiendo la recuperación de la actividad enzimática después de una dilución del complejo enzima-inhibidor. Para este ensayo se incubó 140 μ g de hMAO B junto con DMSO (control), 0.5 μ M de la 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**3**), 2.0 μ M de la 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**) y 2.0 μ M del control pargilina a 37 °C. Después de 15 min la mezcla se diluyó 100 veces con el buffer de reacción que contiene el reactivo Amplex Red, la peroxidasa de rábano picante y el sustrato *p*-tiramina.

4.2.2.3 Discusión

Se analizó la capacidad de los compuestos estudiados de inhibir ambas isoformas de la MAO. Ninguno de los compuestos estudiados presentó porcentajes significativos de inhibición para la hMAO A, mientras que la mayoría de ellos mostró una contundente capacidad de inhibir a la hMAO B. Los valores de CI_{50} obtenidos revelan actividades micromolares a sub micromolares, en un rango entre 0.05 μ M y 7.5 μ M, siendo más

activos que el inhibidor reversible de referencia de la MAO B, isatina (CI_{50} : $19.8 \pm 1.1 \mu\text{M}$). Los compuestos más activos de la serie fueron la 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**3**) y la 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**). La chalcona **11** presentó una actividad similar al inhibidor selectivo de la MAO B, pargilina (CI_{50} : $0.2 \pm 0.02 \mu\text{M}$), mientras que el compuesto **3** resultó ser 4 veces más activo que este inhibidor.

Aunque resulta difícil comparar los valores de CI_{50} de diversos flavonoides descritos en la literatura, debido a la variabilidad de las condiciones de los ensayos realizados para determinar la inhibición de la MAO (origen de la enzima y técnica utilizada para la cuantificación), se pueden realizar algunas observaciones.

Nuestros resultados mostraron que las flavanonas **23** y **25** no presentaron porcentajes de inhibición superiores al 60% para ambas isoformas, en una concentración alta de $100 \mu\text{M}$. Si bien algunas flavanonas han demostrado capacidad de inhibir a la MAO, existe una controversia entre autores por la actividad de las mismas. Algunos trabajos científicos predicen que la inhibición de la MAO por flavonoides parecería ser dependiente de la presencia de un doble enlace en la posición 2 y 3 del anillo C del núcleo flavonoide. La ausencia del mismo (característico de las flavanonas) elimina la planaridad que sería necesaria para la inhibición de la MAO B. Se cree que las interacciones hidrofóbicas y la planaridad de anillo pueden tener un papel crítico en la eficacia de los flavonoides para inhibir la actividad MAO mitocondrial, porque esta enzima debería estar situada en las bicapas de fosfolípidos hidrofóbicas que constituyen las membranas externas (Brahmachari y Gorai, 2006; Carradori y col., 2014; Lee y col., 2000; Mathew y col., 2014). Sin embargo, de una serie de flavonas, isoflavonas, y flavanonas sintetizadas por Chimenti y col. (2010), las flavanonas resultaron ser las más activas, con mayor selectividad por la MAO B. Estas flavanonas poseen sustituyentes fluor (-F), metilo (-CH₃) o metoxilo (-OCH₃) en las posiciones 7 y 4', siendo la 7-metil-4'-fluorflavanona la flavanona más activa (Chimenti y col., 2010).

A diferencia de las flavanonas, las chalconas reportadas presentaron altos porcentajes de inhibición para la hMAO B. Estudios de "docking" mostraron que el sitio activo de hMAO B está formado por una "cavidad de entrada" y una "cavidad de unión del sustrato", con residuos de aminoácidos aromáticos alineados de tal manera que los inhibidores con sistemas de anillos planos largos son capaces de desarrollar interacciones de apilamiento de π - π con estos residuos y se acomodan adecuadamente dentro del sitio activo. Debido a que la hMAO A no posee un sitio activo con estas características, esta

puede ser la razón por la cual las chalconas serían inhibidores selectivos de la isoforma B (Morales-Camilo y col., 2015).

Varios derivados de chalconas sustituidas con el grupo hidroxilo (-OH) en distintas posiciones de ambos anillos han sido sintetizados y se ha estudiado la relación estructura actividad. Tanaka y col. (1987) sugirieron que la sustitución 2'-hidroxi mejora la actividad inhibitoria sobre la MAO mediante la formación de coplanaridad entre el anillo A y la cetona conjugada adyacente a través de la formación de un enlace de hidrógeno entre ambos grupos. Los compuestos que presentaron una sola sustitución del grupo hidroxilo en la posición 4' o 4 del anillo A o B, respectivamente potenciaron la actividad con respecto al núcleo chalcona, mientras que la chalcona que tenía ambas sustituciones con el grupo hidroxilo (-OH) en las posiciones 4 y 4' resultó menos activa que las anteriores. Las sustituciones más favorables se ubicaron en las posiciones 2' y 4' en el anillo A, siendo la 2',4'-dihidroxi-chalcona 450 veces más activa que el inhibidor estándar, clorhidrato de harmalina, en inhibir la oxidación de la bencilamina por la MAO mitocondrial obtenida de hígado de rata (Tanaka y col., 1987). Chimenti y colaboradores (2009) estudiaron el efecto de una serie de 16 chalconas sintéticas sobre la MAO humana utilizando la técnica del Amplex Red. Estas chalconas inhibieron selectivamente a la hMAO B, con actividades en el rango de micromolar a nanomolar. Los compuestos más activos fueron la 4-cloro-4'-metoxi-2'-hidroxi-chalcona (CI_{50} : $0.004 \pm 0.0003 \mu M$) y la 4-cloro-2',4'-dihidroxi-chalcona (CI_{50} : $0.005 \pm 0.0002 \mu M$), uniéndose de forma irreversible a la enzima. Solo una chalcona fue capaz de inhibir a la MAO A, con una CI_{50} de $4.9 \pm 0.3 \mu M$ (Chimenti y col., 2009). Estos autores propusieron la importancia de la sustitución en posición 2' y 4' en el anillo aromático A, con grupos hidroxilo (-OH) y metoxilo (-OCH₃), y de un átomo de cloro (-Cl) en posición 4 del anillo aromático B, para aumentar la actividad inhibitoria de las chalconas sobre la MAO B. Tanto Tanaka y col. (1987) como Chimenti y col. (2009) concuerdan en la importancia de la sustitución en las posiciones 2', 4' y 4 en el núcleo chalcona. Nuestros resultados coinciden con lo expuesto por ambos autores, ya que la mayor actividad se obtuvo con los derivados, **3** y **11**, que presentan sustituciones en las posiciones 2' y 4' del anillo A. La mayor actividad se obtuvo para la 4'-metoxi -2'-hidroxi-chalcona (**3**), siendo incluso más activa que la pargilina (en nuestros ensayos). Un estudio de "docking" ha señalado, además, la importancia de estas sustituciones. Este estudio predijo que el anillo hidroxifenilo de la chalcona puede orientarse hacia el cofactor FAD y su posicionamiento en el sitio activo de la hMAO estaría estrictamente relacionado con los sustituyentes, siendo los grupos

más pequeños, como el metoxilo (-OCH₃) e hidroxilo (-OH), los que permiten una interacción exitosa en la catálisis que involucra al FAD y los restos de residuos tirosina de la “caja aromática”, mientras que los grupos voluminosos la perjudican. Los enlaces de hidrógeno con el FAD y los residuos de tirosina estabilizan el reconocimiento de los ligandos y contribuyen a explicar la actividad de este tipo de inhibidores (Chimenti y col., 2009).

Al igual que Chimenti y col. (2009), otros autores han sugerido que las sustituciones en el anillo B de la chalcona con grupos aceptores de electrones mejora su actividad (Morales-Camilo y col., 2015; Robinson y col., 2013). Se planteó que un aceptor de electrones fuerte, en la posición 4 del anillo B, podría reducir significativamente la densidad de electrones, lo que permitiría formar interacciones de apilamiento π - π con los anillos aromáticos de las tirosinas presentes en “la jaula aromática” en el sitio activo en la MAO B (Mathew y col., 2015). Sin embargo, en este trabajo hemos mostrado que la sustitución del anillo B por el grupo dador de electrones, dimetilamino (-N(CH₃)₂), en la posición 4 (**21**) también mejora la inhibición de la hMAO B con respecto al núcleo chalcona (**1**).

Al comparar los resultados obtenidos pueden observarse algunas características estructurales que favorecen, o desfavorecen, la actividad inhibitoria de los compuestos sobre la MAO B:

-Si se considera la sustitución en el anillo B del núcleo chalcona:

a) la sustitución en la posición 4 por el grupo dimetil amino (-N(CH₃)₂) aumenta levemente la actividad (**1** vs. **21**).

-Si se consideran las sustituciones en el anillo A del núcleo chalcona:

a) la sustitución por un grupo hidroxilo (-OH) en la posición 2' del núcleo chalcona disminuye la actividad (**1** vs. **2**). La actividad de **2** mejora si se incorpora el grupo dador de electrones metoxilo (-OCH₃) en el anillo A (**2** vs. **3** y **4**).

b) la sustitución con un grupo metoxilo (-OCH₃) en la 2'-hidroxichalcona (**2**) produce en la actividad un aumento de alrededor de 60 veces si se ubica en la posición 4' (**2** vs. **3**), un aumento de 1.5 veces en la posición 5' (**2** vs. **4**) o una disminución de 2.4 veces en la posición 6' (**2** vs. **5**).

c) la actividad inhibitoria de 2'-hidroxichalcona (**2**) se ve favorecida a medida que disminuye el radio de Van der Waals de los sustituyentes en la posición 5': F > Cl > Br > CH₃ (**7** vs. **6** vs. **8** vs. **9**).

d) la incorporación de un átomo de bromo (-Br) en la posición 3' de la 5'-bromo-2'-hidroxichalcona (**8**) disminuye la actividad inhibitoria sobre la MAO B (**8** vs. **10**).

e) la sustitución con el grupo amino (-NH₂) en la posición 4' disminuyó levemente la actividad respecto de la chalcona (**14** vs. **1**).

f) la incorporación de un grupo metilo (-CH₃) en la posición 4' de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) aumenta 12 veces la actividad inhibitoria (**11** vs. **9**).

g) la incorporación de un grupo atractor de electrones (-NO₂) en la posición 3' de la chalcona **9** disminuye la capacidad de inhibir a la MAO B (**9** vs. **12**).

- Núcleo chalcona vs núcleo flavanona

a) el núcleo chalcona (**1**) presentó mayor capacidad de inhibir a la MAO B que el núcleo flavanona (**23**) (**1** vs. **23**).

-Si se consideran las sustituciones núcleo flavanona

a) la doble sustitución con el grupo bromo (-Br) en la posición 3 de la flavanona disminuye la capacidad de inhibir a la MAO B (**23** vs. **25**).

Por último, la inhibición irreversible de la MAO se asocia con reacciones adversas potencialmente fatales, ya que en el tejido periférico estos fármacos modifican la presión sanguínea cuando se consumen con ciertos alimentos (Minders y col., 2015). Se han reportado algunas chalconas sintéticas como inhibidores reversibles de isoforma MAO B, entre las que se encuentran la 4'-metoxi-4-trifluorometilchalcona y análogos heterocíclicos de chalcona, reemplazando el anillo A por grupos tiofeno y pirrol, 5-metil-tiofeno, 5-clorotiofeno y 6-metilpiridina (Mathew y col., 2015; Minders y col., 2015). El estudio de reversibilidad realizado demostró que las chalconas más activas de nuestra serie, **3** y **11**, se unen de forma reversible a la hMAO B y son más potentes que los derivados mencionados, e incluso más activas que el inhibidor reversible de la MAO B isatina.

En conclusión, las chalconas son estructuras líderes en la búsqueda de nuevos inhibidores selectivos, potentes y reversibles de la MAO B. Las chalconas 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**3**) y 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**) cumplen con estas características por lo que son compuestos promisorios como IMAO B.

4.2.3 Estudio *in vitro* de la capacidad de los compuestos sintetizados de inhibir la agregación del péptido A β

4.2.3.1 Introducción

4.2.3.1.1 Estructura y función del péptido A β

El péptido A β se genera a partir del procesamiento anormal de la PPA por las enzimas α , β y γ secretasa. La PPA es una proteína integral de membrana con un largo segmento amino terminal extracelular y un corto segmento carboxilo terminal intracelular. Mediante *splicing* alternativo de la transcripción PPA se generan ocho isoformas, de las cuales las tres más comunes poseen 695, 751 y 770 aminoácidos. La primera se expresa predominantemente en el SNC, y las otras dos en numerosas células y tejidos incluidas neuronas, células musculares lisas de la pared vascular y plaquetas (Baptista y col., 2014; Delacourte, 2002). Si bien, su función biológica no está del todo establecida, se ha reportado que participan en múltiples procesos celulares incluyendo el crecimiento y la supervivencia neuronal (Thapa y Chi, 2015).

La PPA se sintetiza en el retículo endoplásmico y luego es transportada a través del aparato de Golgi a la red del trans Golgi donde puede seguir dos vías: la amiloide o la no amiloide. En la primera, la PPA puede ser re internalizada en vesículas revestidas de clatrina en otro compartimiento endosomal que contiene las proteasas β y γ -secretasa. La escisión de la PPA por la β secretasa produce un fragmento soluble de PPA (sPPA β) y un fragmento C-terminal con 99 aminoácidos. El fragmento C-terminal se vuelve a cortar por la γ - secretasa para generar las isoformas del péptido A β con 40 o 42 residuos de aminoácidos dependiendo del sitio de escisión y el dominio intracelular PPA correspondiente. Las dos isoformas, A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂, sufren agregación espontánea y sus depósitos son causal de enfermedades. En cambio, en la vía no amiloide la PPA es proteolíticamente escindida por las secretasas produciendo el fragmento A β ₁₇₋₄₂ que se conoce como proteína 3 (P3) que no sufre agregación espontánea, y se ha descrito como neurotrófico y neuroprotector (Baptista y col., 2014; Thapa y Chi, 2015).

Los péptidos A β son monómeros anfipáticos con una masa molecular de 4 kDa. Más de la mitad de los residuos de los aminoácidos del péptido A β son altamente hidrofóbicos, en particular el C-terminal y la parte central del péptido, mientras que el N-terminal contiene residuos hidrofílicos cargados. Estos son propensos a la agregación espontánea, sufriendo cambios conformacionales de monómeros no estructurados para formar intermediarios mal plegados altamente inestables, debiendo someterse a otra

agregación para formar estructuras de orden superior como oligómeros, protofibrillas y fibrillas que son ricos en láminas β . Las fibrillas $A\beta$ consisten en 5-6 hebras de protofibrillas agrupados en paralelo como se muestra en la Figura 18 (Thapa y Chi, 2015).

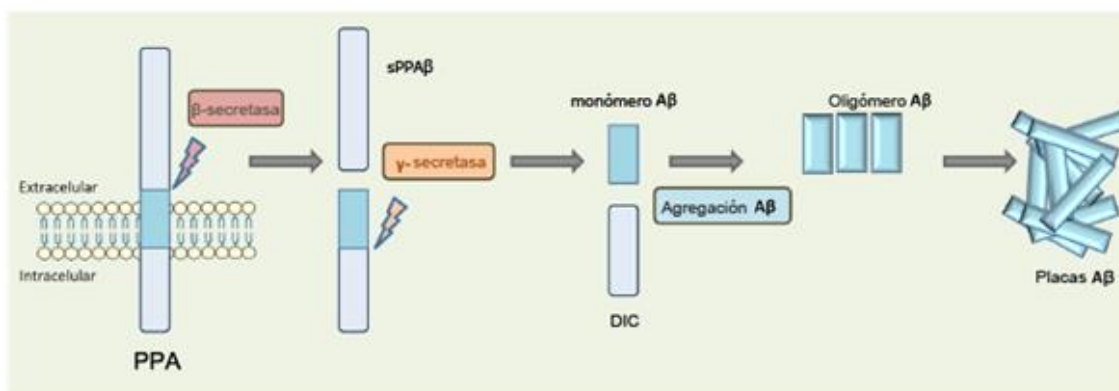


Figura 18. Generación de péptidos $A\beta$ y su posterior agregación. La PPA es escindida por la β -secretasa generando el fragmento soluble (sPPA β) y un fragmento intracelular que se vuelve a escindir por la γ -secretasa generando el dominio intracelular (DIC) y los monómeros $A\beta$, que luego se agregan en oligómeros $A\beta$ para su posterior formación de placas $A\beta$. Modificada de Baptista y col. (2014).

4.2.3.1.2 El péptido $A\beta$ en la EA

La agregación del péptido $A\beta$ a oligómeros prefibrilares tóxicos se considera el evento patogénico clave en el comienzo de la EA, siendo responsable tanto de la iniciación como de la progresión de la enfermedad. Los oligómeros $A\beta$ pueden inducir directamente disfunción sináptica, neurotoxicidad y muerte neuronal, así como desencadenar eventos de daño oxidativo e inflamación que contribuyen a la progresión de la enfermedad (Choi y col., 2014).

En cerebros de pacientes con EA se evidenciaron fragmentos N- o C-terminal de péptidos $A\beta$, siendo la mayoría $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$. La isoforma más abundante es la $A\beta_{1-40}$, que es menos tóxica y forma fibrillas más lentamente que la $A\beta_{1-42}$. La generación de $A\beta_{1-42}$ es favorecida por mutaciones genéticas relacionadas con la forma familiar de EA. La presencia de dos aminoácidos adicionales, isoleucina y alanina, en la $A\beta_{1-42}$ aumenta la predisposición a la agregación de péptidos y a la toxicidad neuronal.

La modulación de la actividad de las secretasas podría ser una estrategia prometedora para la prevención y el tratamiento de la EA. Sin embargo, los compuestos químicos basados en esta estrategia no fueron aprobados en los ensayos clínicos, ya que sus efectos secundarios, entre los que se encuentran hipomielinización en los nervios periféricos, mala diferenciación de linfocitos y alteración la estructura de células

caliciformes intestinales, son inevitables por ser los sustratos de las secretasas fisiológicamente esenciales (Baptista y col., 2014; Nie y col., 2011; Thapa y Chi, 2015).

A pesar de que la generación de monómeros A β es, en sí mismo, un hecho fisiológico relevante, su agregación en oligómeros solubles y fibrillas A β es patogénico. Por lo tanto, la estrategia de la inhibición de la agregación de A β , más específicamente a la isoforma A β ₁₋₄₂, sin afectar la generación de A β ha surgido como un blanco válido para la terapia de la EA (Nie y col., 2011). En los últimos años se han desarrollado pequeñas moléculas que son capaces de inhibir a la agregación del péptido A β . Sin embargo, hasta la fecha, ninguno de estos compuestos se utiliza en la clínica.

4.2.3.1.3 Polifenoles como inhibidores de la agregación del péptido A β

En un primer momento se propuso que las interacciones aromáticas de apilamiento π - π de las cadenas laterales de los residuos de los aminoácidos aromáticos del péptido A β estabilizan la conformación fibrilar A β y esa fuerza conduce a la formación de fibrillas amiloide (Gazit, 2002). Luego, se demostró que estas interacciones no son críticas para la agregación y se postuló que el ensamblaje de residuos hidrófobos son los que la promueven (Armstrong y col., 2011). A pesar de que existen diferencias en los mecanismos de agregación postulados hasta el momento, existe un acuerdo en que los compuestos que poseen en su estructura al menos dos anillos aromáticos son capaces de inhibir la agregación A β . Los mecanismos de acción propuestos para este tipo de compuestos implican: (1) inhibición de las interacciones de tipo π - π de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos aromáticos del péptido; (2) por su estructura plana, pueden intercalarse entre las capas del monómero A β o (3) ser como una especie de tapa en los extremos fibrilares del péptido A β inhibiendo su agregación (Armstrong y col., 2011; Gazit, 2002).

La mayoría de los polifenoles, entre los que se encuentran los flavonoides, presentan este tipo de estructura: poseen dos anillos aromáticos y presentan grupos hidroxilo que forman enlaces de hidrógeno con residuos hidrofílicos de aminoácidos del péptido A β . Además, la estructura de resonancia de los polifenoles proporciona suficiente planaridad para penetrar en el ambiente hidrofóbico de las fibrillas A β , perturbando así la estructura fibrilar. Se estima que cuando los polifenoles entran en la ranura hidrofóbica de las fibrillas A β , sus anillos aromáticos interrumpen su organización debido a la atracción y repulsión que se genera entre el polifenol y el péptido A β . Estas interacciones podrían dar lugar a cambios conformacionales que favorecen la ampliación de la ranura

de fibrillas de amiloide, a través de la reducción del efecto hidrofóbico, que sería la fuerza impulsora que estabiliza la estructura de fibrilla, lo que conduce a la desagregación de fibrillas A β (Lakey-Beitia y col., 2015). Algunos polifenoles como el resveratrol y la curcumina (Figura 19) han demostrado propiedades de anti-agregación A β .

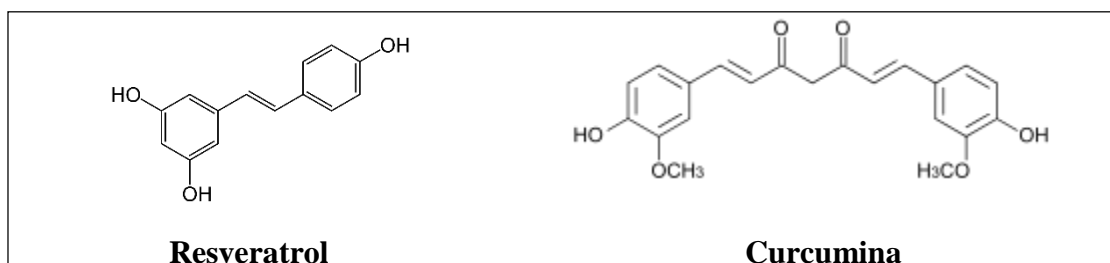


Figura 19. Estructura de polifenoles que inhiben la agregación del péptido A β

La curcumina, ((1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadien-3,5-diona), es un colorante natural procedente de la cúrcuma, que se encuentra en la segunda fase de ensayos clínicos. Presenta una alta permeabilidad de la barrera hematoencefálica, potente actividad para inhibir la toxicidad y la agregación del péptido A β y, además, mejora las funciones cognitivas. Estudios de relación estructura actividad indicaron que las características fundamentales de la curcumina para inhibir la agregación son: dos grupos fenilo terminales, capacidad de los sustituyentes de los grupos aromáticos de formar enlaces hidrógeno y una cadena enlazadora rígida de una longitud óptima de 6-19 Å (Thapa y Chi, 2015).

Mientras que derivados de curcumina han sido estudiados como inhibidores de la agregación A β , la estructura chalcona se ha utilizado para el desarrollo de agentes para la detección de placas amiloides. Una serie de chalconas fueron sintetizadas como sondas para estudiar la formación *in vivo* de placas A β en el cerebro, a través de imágenes como la tomografía por emisión de positrones (PET). Este estudio se basó en la similitud estructural que existe entre la chalcona y la curcumina (Bag y col., 2013; Ono y col., 2007a; Thapa y Chi, 2015). Dado que en varios trabajos se ha demostrado que grupos dadores de electrones como los grupos amino, metilamino, dimetilamino, metoxilo o hidroxilo tienen un papel importante en la afinidad de unión a los agregados A β , Ono y colaboradores (2007a y 2009) sintetizaron chalconas con flúor o yodo radiactivo en la posición 4' y el grupo dador de electrones dimetilamino (-N(CH₃)₂) en la posición 4 del anillo B (Ono y col., 2009). Los resultados demostraron que estas chalconas tienen altas afinidades de unión superior a las placas A β , y, además, poseen un sitio de unión a los

agregados A β diferente al de las sondas prototipo, tioflavina T y rojo congo, utilizadas para la detección de placas amiloides. Un dato relevante de estos trabajos, es que estudios de biodistribución realizado en ratones, demostraron la capacidad de las chalconas de ser rápidamente captadas por el cerebro y atravesar la barrera hematoencefálica tras su administración i.v. (Ono y col., 2009, 2007a).

Por otro lado, mediante una pesquisa virtual se evaluó la capacidad de unión a agregados A β de 32.364 compuestos naturales obtenidos de hierbas y plantas medicinales utilizadas en Oriente. De estos resultados, se concluyó que los diez mejores compuestos contienen al menos dos anillos aromáticos que favorecen la unión de alta afinidad y entre ellos se encuentra la dihidrochalcona (estructura similar a la chalcona sin el doble enlace entre el carbono 2 y 3 de la propanona). Este compuesto tiene una estructura similar en un 67.12% a la curcumina. Estudios *in vitro* demostraron la capacidad de la dihidrochalcona de inhibir la toxicidad y la agregación A β , con potencia similar a la curcumina y resveratrol (Viet y col., 2013).

4.2.3.2 Resultados

Se estudió la capacidad compuestos **1-5**, **7-12**, **14** y **25** de inhibir la agregación del péptido A β ₁₋₄₂, a 10 μ M, por quintuplicado, mediante un método fluorométrico utilizando a la tioflavina T.

Antes de realizar el ensayo, y, debido a que compuestos que presentan absorbancias significativas o fluorescencia, en el intervalo utilizado en la medición de fluorescencia de la tioflavina T (máximo de excitación a 440 nm y emisión a 490 nm), pueden causar resultados falsos positivos de inhibición, se evaluó el espectro de emisión y excitación de los compuestos estudiados a la misma concentración usada en el ensayo (10 μ M). Los resultados revelaron que no existe interferencia significativa para ninguno de los compuestos evaluados.

4.2.3.2.1 Estudio *in vitro* de la capacidad de los compuestos estudiados de inhibir agregación del péptido A β ₁₋₄₂

Los compuestos evaluados presentaron una capacidad entre media a baja de inhibir la agregación del péptido A β ₁₋₄₂ (Tabla 11). Los compuestos **1**, **2**, **4**, **7-9** y **25** no inhibieron la agregación del péptido. Las chalconas **5** y **14** inhibieron levemente la agregación, sin superar el 15%. Los derivados **3**, **10**, **11** y **12** impidieron la agregación

A β ₁₋₄₂, presentado valores de 36.5 \pm 5.6 % (**10**), 41.4 \pm 1.7 % (**11**), 42.5 \pm 4.3 % (**3**) y 47.2 \pm 3.1 % (**12**).

Tabla 11. Porcentaje de inhibición de la agregación del péptido A β ₁₋₄₂

| Número | Compuesto (10 μ M) | % de inhibición de la agregación del péptido A β ₁₋₄₂ |
|-----------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | chalcona | 0.0 \pm 5.9 |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | 0.0 \pm 5.6 |
| 3 | 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona | 42.5 \pm 4.3 |
| 4 | 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona | 3.2 \pm 1.9 |
| 5 | 6'-metoxi -2'-hidroxichalcona | 15.6 \pm 1.1 |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | 0.0 \pm 2.6 |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | 6.8 \pm 7.9 |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | 1.2 \pm 2.7 |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | 36.5 \pm 5.6 |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | 41.4 \pm 1.7 |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | 47.2 \pm 3.1 |
| 14 | 4'-aminochalcona | 11.7 \pm 5.4 |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | 0.0 \pm 26.3 |

Los resultados se expresan como media \pm E.S.M del % de inhibición de la agregación del péptido A β ₁₋₄₂ de cinco mediciones de los compuestos estudiados a 10 μ M. El control resveratrol (10 μ M) presentó una inhibición del 96.1 \pm 2.4 %.

4.2.3.3 Discusión

Las estructuras moleculares de los compuestos estudiados en este trabajo, cumplen con las características necesarias para ser potenciales inhibidores de la formación de fibrillas A β : la presencia de anillos aromáticos en su estructura química, la capacidad de formar interacciones no covalentes con residuos de aminoácidos de la secuencia del péptido A β y tienen estructura plana que permite aumentar la superficie de contacto con el péptido. Los derivados ensayados presentaron entre baja a media capacidad de inhibir la agregación del péptido A β ₁₋₄₂. Los compuestos más activos fueron las chalconas: 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona (**3**), 3',5'-dibromo-2'-hidroxichalcona (**10**), 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**) y 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**), que presentaron una inhibición de alrededor del 50 % en una concentración de 10 μ M. Futuros estudios con los compuestos más activos son necesarios para determinar la CI₅₀ y la potencia de los mismos.

Si bien algunos polifenoles se han descrito como inhibidores de la agregación A β , hasta el momento no se había determinado la inhibición de la estructura de tipo

flavanona. En este trabajo se demostró que el derivado **25** no presenta la capacidad de inhibir la agregación del péptido A β ₁₋₄₂.

Las chalconas han sido estudiadas como sondas para la detección de placas amiloide por imágenes (Fuchigami y col., 2014; Ono y col., 2009, 2007a). Existen pocos trabajos en la bibliografía que describan el efecto de las chalconas sobre la agregación del péptido A β . En uno de ellos se estudió la capacidad de derivados de chalconas y curcuminas, con sustituciones amino de tipo cíclicas o alifáticas complejas, de inhibir la agregación del péptido amiloide. Se evidenció que estos compuestos son inhibidores de la fibrilogénesis en un porcentaje de 30 a 70%, a una concentración de 100 μ M (Bag y col., 2013). Nuestros resultados demuestran que los derivados de chalconas, además de actuar como sondas para la detección de las placas A β , pueden actuar como inhibidores moderados de la agregación A β , a una concentración 10 veces menor.

Al comparar los resultados obtenidos con los compuestos ensayados se pueden observar algunas características estructurales que favorecen o perjudican la actividad inhibitoria de los compuestos en la agregación del péptido A β :

- a) la sustitución en la posición 2' por un grupo hidroxilo (-OH) en el anillo A no logró modificar la nula actividad de la chalcona (**1** vs. **2**).
- b) la sustitución por el grupo amino (-NH₂) en la posición 4' en el anillo A no aumentó significativamente la actividad de la chalcona (**1** vs. **14**).
- c) la sustitución en la posición 5' de la 2'-hidroxichalcona (**2**) por halógenos fluor y bromo (-F y -Br) no modifico la actividad (**2** vs. **7** y **8**).
- d) la incorporación del grupo metoxilo (-OCH₃) en el anillo A mejora relativamente la capacidad de inhibición de la 2'-hidroxichalcona (**2** vs. **3**, **4** y **5**). La posición de la sustitución del metoxilo incrementa la actividad inhibitoria en el siguiente orden 5' < 6' < 4' (**4** vs. **5** vs. **3**).
- e) la sustitución con el grupo bromo (-Br) en la posición 3' de la 5'-bromo-2'-hidroxichalcona (**8**) aumenta la actividad (**8** vs. **10**).
- f) la sustitución con un grupo metilo (-CH₃) en la posición 4' o con un grupo nitro (-NO₂) en la posición 3' de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) genera derivados más activos, siendo los compuestos con mayor actividad inhibitoria en esta serie (**9** vs. **11** y **12**).

4.2.4 Conclusiones

1) La mayoría de las chalconas estudiadas presentó actividad por la hMAO B (13 compuestos con $CI_{50} < 10 \mu M$); 3 compuestos presentaron actividad antiagregante del péptido $A\beta_{1-42}$ con un porcentaje de inhibición de la agregación $> 40\%$; 2 chalconas inhibieron a la muAChE con $CI_{50} < 10 \mu M$.

2) El mayor número de compuestos y los valores más altos de actividad se obtuvieron para la inhibición de la hMAO B.

i) La chalcona (1), 2'-hidroxichalcona (2), 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona (3), 5'-metoxi-2'-hidroxichalcona (4), 5'-metoxi-2'-hidroxichalcona (5), 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (6), 5'-fluor-2'-hidroxichalcona (7), 5'-bromo-2'-hidroxichalcona (8), 5'-metil-2'-hidroxichalcona (9), 3',5'-dibromo-2'-hidroxichalcona (10), 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (11), 4'-aminochalcona (14) y 4-dimetilaminochalcona (21), presentaron actividad inhibitoria sobre la hMAO B. Siendo la chalcona 3 el compuesto más activo.

ii) Los compuestos más activos, 3 y 11, se unieron de manera reversible a la enzima.

5) La 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (9) y la 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (11) presentaron actividad inhibitoria sobre la muAChE.

6) La 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona (3), la 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (11) y la 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (12) presentaron moderada actividad antiagregante del péptido $A\beta_{1-42}$.

7) La 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona (3) presentó actividad inhibitoria tanto sobre la hMAO B como en la agregación del péptido $A\beta_{1-42}$.

8) La 5'-metil-2'-hidroxichalcona (9) presentó actividad inhibitoria sobre la muAChE y la hMAO B.

9) La 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (11) presentó actividad inhibitoria sobre la muAChE, hMAO B y la agregación del péptido $A\beta_{1-42}$.

Parte III

Unión a receptores

4.3 Estudios *in vitro* de la interacción de los compuestos sintetizados con el su-BDZs del GABA_A y con los receptores 5-HT_{1A} y μ -opioide

En el presente capítulo se describe la capacidad de unión de los compuestos sintetizados al su-BDZ y a los receptores 5-HT_{1A} y μ -opioide, presentes en membranas sinaptosomales de cerebro de rata.

En una primera instancia, de muestreo, pesquisa o “screening”, se estudió si los derivados de flavonoides, a una concentración de 300 μ M, eran capaces de desplazar la unión de los ligandos tritiados específicos para cada receptor: [³H] FNZ (³H-flunitrazepam) para su-BDZ, [³H] 8-OH-DPAT (³H-8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina) para el receptor 5-HT_{1A} y [³H] DAMGO (³H-[D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol⁵] encefalina) para el receptor μ -opioide.

Seguidamente, se realizaron curvas de desplazamiento y se calculó la constante de inhibición (K_i). para aquellos compuestos que desplazaron la unión de los radioligandos en un porcentaje mayor al 60%.

4.3.1 Estudio *in vitro* de la interacción de los compuestos sintetizados con el su-BDZ

4.3.1.1 Introducción

4.3.1.1.1 Estructura y función del receptor GABA_A

Existen tres tipos de receptores GABA denominados GABA_A, GABA_B y GABA_C. Los receptores GABA_A y GABA_C son de tipo ionotrópico, mientras que el GABA_B es metabotrópico (Olsen y Sieghart, 2008). El receptor GABA_A pertenece a la superfamilia de receptores pentaméricos de canales iónicos activados por ligando. Está compuesto por 5 subunidades proteicas dispuestas alrededor de un poro central que constituye el canal iónico de cloruro (Cl⁻). Cada subunidad está formada por cuatro segmentos hidrofóbicos transmembrana (M1-4) de aproximadamente 50 kD. La región extracelular posee un dominio N-terminal que forma parte del sitio de unión de agonista/antagonista, seguido de tres dominios transmembrana (M1-3), un bucle intracelular de longitud variable y un cuarto dominio que atraviesa la membrana (M4), con el extremo C-terminal extracelular. Cada subunidad se dispone de tal manera que el segundo dominio que atraviesa la membrana (M2) forma la pared del poro del canal iónico de cloruro. El bucle citoplasmático, entre el tercer y cuarto dominio transmembrana (M3 y M4), se cree que es el blanco de las proteínas quinasas, requerido para la orientación subcelular y el agrupamiento del receptor a la membrana (Figura 20) (Johnston, 2005).

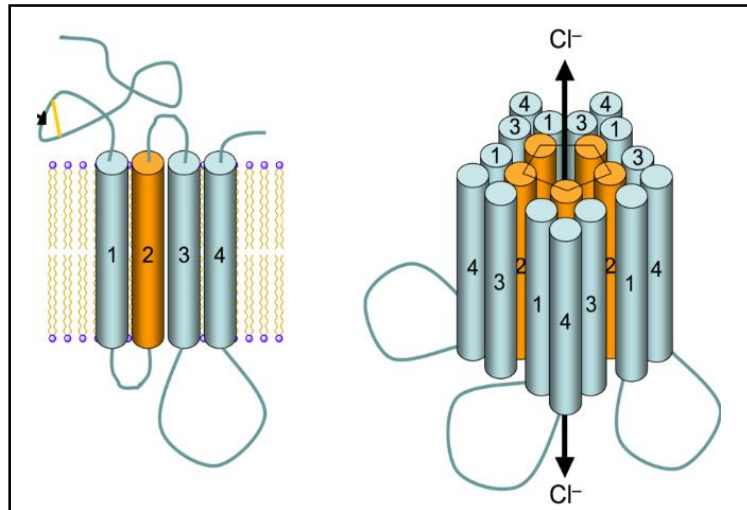


Figura 20. Estructura esquemática del receptor GABA_A. Izquierda: Los cilindros representan los cuatro segmentos hidrofóbicos transmembrana de cada subunidad (M1-4). Derecha: cinco subunidades dispuestas simétricamente alrededor del poro central.

Los distintos tipos de receptores GABA_A surgen de la asociación de las combinaciones de las cinco subunidades para formar el canal iónico. Las subunidades del receptor están codificadas por 19 genes, que se han agrupado en las siguientes ocho subclases en base a la homología de su secuencia: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π , ρ 1-3. A su vez, el corte y empalme alternativo contribuye a la heterogeneidad de estos receptores (Wasowski y Marder, 2012). La importancia de la diversidad de receptores GABA_A radica en que la distinta composición de subunidades le confiere distintas propiedades funcionales, farmacológicas y de compuerta del canal; expresiones en el cerebro durante el desarrollo y en la adultez; localizaciones en células neuronales y regiones del cerebro; y regulación por señales extracelulares (Krall y col., 2015).

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC de los mamíferos. Durante la neurotransmisión, el GABA actúa postsinápticamente mediante la interacción alostérica con los receptores GABA_A y permite la apertura de los canales iónicos de Cl⁻, aumentando la conductancia de este anión. Una vez que los receptores GABA_A se activan, se establece la hiperpolarización de la membrana neuronal, disminuyendo la excitabilidad de la célula que conduce a las acciones inhibitorias del GABA (Brambilla y col., 2003). La inhibición GABAérgica se encuentra presente en todos los niveles del SNC, incluyendo el hipotálamo, el hipocampo, la corteza cerebral y el cerebelo. Además, las interneuronas GABAérgicas son abundantes en el SNC, modulando el circuito de neuronas noradrenérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas (Brambilla y col., 2003; Olsen y Sieghart, 2008).

Los receptores GABA_A se pueden modular alostéricamente por fármacos como barbitúricos, esteroides, anestésicos, anticonvulsivantes y BZD, entre otros. Las BZD presentan acciones ansiolíticas, sedante-hipnóticas, anticonvulsivas y miorelajantes, con desarrollo de tolerancia y dependencia física como efectos adversos (Olsen y Sieghart, 2009). Estos compuestos no interactúan directamente con el sitio de unión del GABA, pero ejercen sus acciones mediante la unión a sitios alostéricos en el receptor GABA_A que influyen las propiedades de unión de otros sitios presentes en este receptor y así modulan la afluencia de iones Cl⁻ inducida por el GABA. El su-BDZ se encuentra en la interface entre una subunidad α y la subunidad γ . La unión de alta afinidad de BZD en este sitio requiere la presencia de un residuo de histidina conservado en el dominio N-terminal de la subunidad α . Esta histidina conservada se encuentra presente en las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$, pero no en la $\alpha 4$ ni en la $\alpha 6$ (Ralvenius y col., 2015).

Los fármacos que aumentan la inhibición sináptica mediada por el GABA, como las BZD, se conocen como moduladores positivos. Mientras que los que reducen la acción del GABA en los receptores y tienen las acciones opuestas a las de las BZD clásicas son conocidos como moduladores alostéricos negativos. Por último, los agentes que bloquean las acciones tanto positivas como negativas se denominan antagonistas, como por ejemplo el flumazenil (Johnston, 2005).

4.3.1.1.2 El receptor GABA_A en la ansiedad

Se ha demostrado que el neurotransmisor GABA es fundamental para controlar los estados de ansiedad. En humanos, el aumento de la transmisión GABAérgica inducido por drogas como las BDZ, genera efectos ansiolíticos. Por el contrario, la reducción de la transmisión GABAérgica mediante la administración de un agonista inverso al su-BDZ, precipita la ansiedad. A su vez, a través de estudios de PET se observó que pacientes con trastornos de pánico y veteranos de guerra con estrés post traumático presentan déficit de receptores GABA (Möhler, 2012). Por otro lado, la reducción parcial de la función del receptor GABA_A durante el desarrollo del cerebro de ratón, genera mayor vulnerabilidad a desarrollar comportamiento de tipo ansioso en la adultez de estos roedores (Earnheart y col., 2007).

La relevancia funcional de los subtipos de receptores se ha puesto de manifiesto mediante la combinación de técnicas de genética molecular y farmacológicas. La inactivación completa del gen heterocigoto de la subunidad $\gamma 2$ ($\gamma 2^{+/-}$) dio lugar a una disminución parcial de receptores GABA_A principalmente en el hipocampo y la corteza

cerebral, generando animales con comportamiento similar al desorden de ansiedad generalizada de los seres humanos, que fue revertido por la administración de la BDZ clásica diazepam (Earnheart y col., 2007). Por otro lado, la generación de líneas de ratones con mutaciones puntuales en los genes que codifican las subunidades α mostraron distintas respuestas del receptor GABA_A a las BDZ. Estos estudios revelaron que los receptores compuestos de subunidades $\alpha 2/3\beta 2$ median los efectos ansiolíticos del diazepam, los $\alpha 1\beta 2$ los efectos sedantes, de amnesia anterógrada y anticonvulsivantes, mientras que el efecto miorrelajantes depende de la subunidad $\alpha 2$. Las subunidades $\alpha 5\beta 2$ parecen influir en la memoria y el aprendizaje. Por otro lado, el efecto de abstinencia del clonazepam depende de la subunidad $\alpha 3$ (Smith y Rudolph, 2012).

4.3.1.1.3 Flavonoides como ligandos del su-BDZ

Las primeras referencias de flavonoides como ligandos para el su-BDZ fueron las isoflavonas aisladas de orina bovina, las cuales presentaron baja afinidad por este receptor. Posteriormente, se descubrió que el biflavonoide amentoflavona posee afinidad comparable al diazepam, siendo el primer compuesto descrito con alta afinidad al su-BDZ que no contiene nitrógeno en su estructura química (Medina y col., 1998).

Nuestro grupo de trabajo comenzó la búsqueda de ligandos naturales para el su-BDZ utilizando plantas medicinales tradicionalmente usadas por sus propiedades tranquilizantes. De los extractos de *Passiflora coerulea* (pasionaria) y *Matricaria recutita* (manzanilla), se aisló e identificó a la crisina (5,7-dihydroxiflavona) y la apigenina (4',5,7-trihydroxiflavona), respectivamente, las cuales resultaron ser ligandos competitivos con afinidad media-alta por el su-BDZ con valores de K_i de 3 μM (Medina y col., 1998). Por otro lado, Häberlein y col. (1994) y Shen y col. (1994) aislaron una serie de flavonas sustituidas con grupos hidroxilo (-OH) y metoxilo (-OCH₃) con afinidades en el rango de 1 a 50 μM de plantas medicinales utilizadas en Nueva Zelanda y Egipto. Estudios *in vivo* revelaron que la crisina y la apigenina presentan acciones ansiolíticas a dosis similares a las utilizadas para el diazepam, sin generar los efectos no deseados de las BDZ clásicas como sedación, miorrelajación o amnesia (Salgueiro y col., 1997; Viola y col., 1995; Wolfman y col., 1994).

Los resultados de estas investigaciones impulsaron el estudio de los flavonoides, como agliconas y del núcleo estructural flavona, como drogas ansiolíticas que no causan efectos sedativos o miorrelajantes, y por lo tanto tienen potenciales ventajas terapéuticas sobre las BDZ. El siguiente paso fue la síntesis química de derivados de flavona, insertando en este núcleo sustituyentes electronegativos. Los derivados bromados, clorados, fluorados

y nitrados de la flavona presentaron alta afinidad por el su-BDZ. Algunos ejemplos son la 6-bromo-3'-nitroflavona (Ki: 0.001 μ M), 6-cloro-3'-nitroflavona (Ki: 0.008 μ M), 6,3'-dibromoflavona (Ki: 0.019 μ M), la 6-nitro-3'-bromoflavona (Ki: 0.025 μ M) y 6,3'-dinitroflavona (Ki: 0.026 μ M) (Paladini y col., 1999). Posteriormente, se realizaron estudios de relación estructura-actividad, los cuales revelaron que la incorporación de grupos electronegativos en el C6 y el C3' de la estructura flavona aumenta significativamente la unión al receptor. También, se demostró que la sustitución en posición 2' por el grupo hidroxilo (-OH) en los flavonoides es crítica para la afinidad al receptor GABA_A en el sitio de unión BZD (Marder y col., 2001).

Por otro lado, ensayos en ratones mostraron que los compuestos sintetizados con mayor afinidad por el su-BDZ presentan actividad *in vivo*, siendo tanto agonistas (Medina y col., 1998; Paladini y col., 1999; Wolfman y col., 1998) como antagonistas (Viola y col., 2000, 1999) de este receptor. La más activa fue la 6,3'-dinitroflavona, la cual presentó una potencia ansiolítica *in vivo* 30 veces mayor a la del diazepam. También fue activa por vía oral y presentó una mayor selectividad farmacológica, es decir, mayor separación entre su máxima dosis ansiolítica y su mínima acción sedativa (Marder y col., 1995; Medina y col., 1998; Viola y col., 1997; Wolfman y col., 1996).

Con respecto a la estructura flavanona, en general, ha demostrado baja actividad en los estudios de unión a receptores GABA_A en el sitio de unión a BDZ. Las flavanonas naturales naringenina, (2S)-5,7,8,4'-tetrahidroxiflavanona y 2,5-dihidroxi-7-metoxi-6,8-dimetilflavan-3-ona inhiben la unión de flunitrazepam (CI₅₀ de 2.0 mM, 21 y 1 μ M respectivamente) (Hanrahan y col., 2011; Jäger y col., 2007; Wang y col., 2002).

En cuanto a la estructura abierta, la chalcona natural isoliquiritigenina presentó afinidad por este receptor con un valor de Ki de 0.45 μ M (Cho y col., 2011).

4.3.1.2 Resultados

4.3.1.2.1 Desplazamiento de la unión específica de [³H] FNZ

Se estudió la capacidad de los compuestos sintetizados, del núcleo chalcona (**1**) y de la flavanona (**23**) de unirse al su-BDZ, en membranas sinaptosomales de corteza de cerebro de rata, por medio del desplazamiento del agonista específico tritiado [³H] FNZ.

Se realizó el ensayo de unión, en el cual se evaluó si los compuestos, a una concentración de 300 μ M, por duplicado, desplazan la unión específica de [³H] FNZ. En la Tabla 12 se representan los porcentajes promedio de desplazamiento.

Los compuestos **5**, **10**, **18**, **21** y **25** no modificaron la unión específica del [³H] FNZ al su-BDZ, revelando que no presentan afinidad por este receptor. Las chalconas **11**, **12** y **20** desplazaron al radioligando entre un 20 % y 40 %, y los compuestos **6-8**, **13**, **16**, **19** y **22-24** entre el 40 y el 60%. Las chalconas **2-4**, **9**, **14** y **15** inhibieron la unión de [³H] FNZ en mayor medida (entre el 60 % y el 90 %). Los compuestos que presentaron la mayor actividad, superando el 90 % el desplazamiento de la unión del [³H] FNZ fueron los derivados **1** (chalcona) y **17** (3-nitrochalcona).

4.3.1.2.2 Curvas de desplazamiento de la unión específica de [³H] FNZ

Se realizaron curvas de desplazamiento y se calcularon las constantes de inhibición (K_i) para los compuestos **1-4**, **9**, **14**, **15** y **17**. Los resultados se muestran en la Tabla 13. En la Figura 21 se exponen, a modo de ejemplo, las curvas de desplazamiento obtenidas para el diazepam, la chalcona (**1**), la 2'-hidroxichalcona (**2**), la 2'-hidroxi-4'-metoxichalcona (**3**) y la 3-nitrochalcona (**17**).

Los compuestos evaluados presentan de media a baja afinidad por el su-BDZ. La 3-nitrochalcona (**17**) presenta la mayor afinidad con un valor de K_i de $0.2 \pm 0.05 \mu\text{M}$, seguido por el núcleo chalcona (**1**) (K_i: $2.8 \pm 1.0 \mu\text{M}$). La 4'-aminochalcona (**14**), 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) y 4'-metilchalcona (**15**) presentaron valores semejantes, de K_i de $6.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$, $6.1 \pm 1.5 \mu\text{M}$ y $6.3 \pm 0.8 \mu\text{M}$, respectivamente y la 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**3**) presentó un valor similar de $9.0 \pm 1.2 \mu\text{M}$. Valores superiores de K_i se obtuvieron para la 2'-hidroxichalcona (**2**) ($17.1 \pm 1.3 \mu\text{M}$) y la 5'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**4**) ($45.7 \pm 1.3 \mu\text{M}$).

Tabla 12. Desplazamiento de la unión específica de [³H] FNZ de los compuestos estudiados

| Número | Compuesto (300 μM) | Desplazamiento de la unión de [³ H] FNZ |
|--------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1 | chalcona | ++++ |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | +++ |
| 3 | 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona | +++ |
| 4 | 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona | +++ |
| 5 | 6'-metoxi -2'-hidroxichalcona | - |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | ++ |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | ++ |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | ++ |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | +++ |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | - |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | + |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | + |
| 13 | 3'-metoxi-4'-hidroxichalcona | ++ |
| 14 | 4'-aminochalcona | +++ |
| 15 | 4'-metilchalcona | +++ |
| 16 | 2'-bromochalcona | ++ |
| 17 | 3-nitrochalcona | ++++ |
| 18 | 4-nitrochalcona | - |
| 19 | 3-clorochalcona | ++ |
| 20 | 4-clorochalcona | + |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | - |
| 22 | 4'-amino-3-nitrochalcona | ++ |
| 23 | flavanona | ++ |
| 24 | 6-metil-8-nitroflavanona | ++ |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | - |

Capacidad de los compuestos, a 300 μM, de inhibir la unión de [³H] FNZ al su-BDZ se indica como: inhibición > 90 % (++++); inhibición 60-90 % (+++); inhibición 40-60 % (++); inhibición 20-40 % (+) e inhibición < 20 % (-).

Tabla 13. Afinidad de los compuestos sintetizados por el su-BDZ presente en membranas sinaptosomales de corteza cerebro de rata

| Número | Compuesto | Afinidad Ki (μM) |
|--------|--------------------------------------|------------------|
| 17 | 3-nitrochalcona | 0.2 ± 0.05 |
| 1 | chalcona | 2.8 ± 1.0 |
| 14 | 4'-aminochalcona | 6.1 ± 0.2 |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | 6.1 ± 1.5 |
| 15 | 4'-metilchalcona | 6.3 ± 0.8 |
| 3 | 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona | 9.0 ± 1.2 |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | 17.1 ± 1.3 |
| 23 | flavanona | 40* |
| 4 | 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona | 45.7 ± 1.3 |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | >100* |
| 22 | 4'-amino-3-nitrochalcona | - |
| 19 | 3-clorochalcona | - |
| 13 | 3'-metoxi-4'-hidroxichalcona | - |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | - |
| 20 | 4-clorochalcona | - |
| 16 | 2'-bromochalcona | - |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | - |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | - |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | - |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | - |
| 24 | 6-metil-8-nitroflavanona | - |
| 5 | 6'-metoxi -2'-hidroxichalcona | - |
| 18 | 4-nitrochalcona | - |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | - |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | - |

Ki ± E.S.M. de 2 mediciones independientes de la inhibición en la unión de [³H] FNZ al su-BDZ presentes en membranas sinaptosomales de cortezas de cerebro de rata. El valor de Ki del compuesto de referencia diazepam es de 3.5 ± 1.2 nM; -: no determinado, por orden decreciente de actividad; *: (Medina y col., 1998);

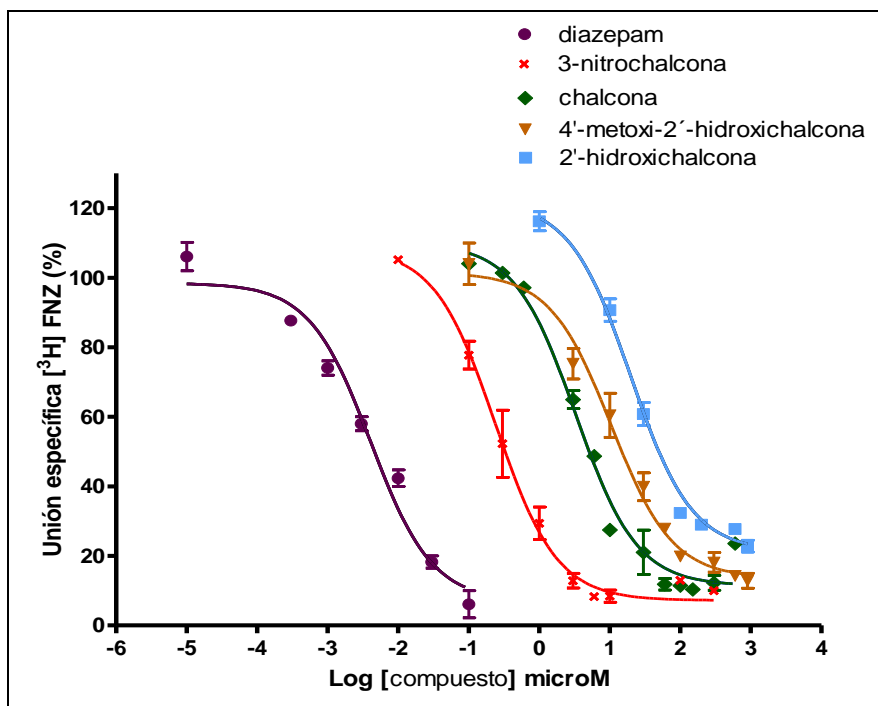


Figura 21. Curvas de desplazamiento de la unión específica [^3H] FNZ por la chalcona (**1**) (\blacklozenge), 2'-hidroxichalcona (**2**) (\blacksquare), 2'-hidroxi-4'-metoxichalcona (**3**) (\blacktriangledown), 3-nitrochalcona (**17**) (\times) y diazepam (\bullet), al su-BDZ presentes en membranas sinaptosomales de cerebro de rata Wistar. Cada punto representa la media \pm E.S.M, expresada como el porcentaje de radioligando unido, en dos experimentos independientes realizados por duplicado. K_i diazepam: 3.5 ± 1.2 nM.

4.3.1.3 Discusión

De los tres tipos de receptores GABA, solo el GABA_A es modulado por BDZ. Este receptor se encuentra en mayor concentración en la corteza frontal, la capa granular del cerebelo, el bulbo olfatorio y el cuerpo geniculado medial del tálamo (Bowery y col., 1987). Se ha determinado en numerosas especies animales las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos que componen las subunidades del receptor y se ha determinado que tienen un alto grado de identidad de secuencia entre sí, lo que sugiere que han evolucionado a partir de una secuencia ancestral común (Olsen y Tobin, 1990). En este trabajo se realizaron ensayos de desplazamiento de la unión específica de [^3H] FNZ al su-BDZ utilizando membranas sinaptosomales de corteza de cerebro de rata. Los resultados mostraron que ocho compuestos desplazaron en un porcentaje mayor al 60% la unión del radioligando específico para este receptor. El estudio de afinidad de los mismos reveló que presentan media a baja afinidad por dicho receptor.

El compuesto más activo fue la 3-nitrochalcona (**17**) con un valor de K_i de 0.2 ± 0.05 μM , siendo 14 veces más activa que el núcleo chalcona (**1**) (K_i : 2.8 ± 1.0 μM). El resto de los compuestos presentaron valores de K_i mayores a 1 μM .

El número de compuestos estudiados no es lo suficientemente grande como para poder establecer una Relación Estructura Actividad (REA) considerable. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos pueden observarse algunas características estructurales que favorecen, o desfavorecen, la afinidad de los compuestos al su-BDZ:

-Si se consideran las sustituciones en el anillo B del núcleo chalcona:

a) la sustitución en la posición 3 por el grupo atractor de electrones nitro (-NO₂) favorece la actividad con respecto al núcleo chalcona (**1** vs. **17**), mientras que en la posición 4 anula la actividad (**1** vs. **18**).

b) la sustitución con el grupo cloro (-Cl) en las posiciones 3 o 4 disminuye la capacidad de desplazar la unión específica de [³H] FNZ al su-BDZ con respecto al núcleo chalcona (**1** vs. **19** y **20**).

c) la sustitución con el grupo dimetilamino (-N(CH₃)₂) en la posición 4 anula la actividad con respecto al núcleo chalcona (**1** vs. **21**).

-Si se consideran las sustituciones en el anillo A del núcleo chalcona:

a) la incorporación de grupos amino (-NH₂), hidroxilo (-OH), metoxilo (-OCH₃) y metilo (-CH₃) disminuye la actividad con respecto a la chalcona (**1** vs. **2-4**, **9**, **14** y **15**), por lo que grupos dadores de electrones en el anillo A del núcleo chalcona (en la posición 2', 4' y/o 5') perjudicaría su unión al su-BDZ.

b) la sustitución en la posición 2' por un grupo hidroxilo (-OH) disminuyó la actividad con respecto a la chalcona (**1** vs. **2**). Sin embargo, la incorporación de nuevas sustituciones en la 2'-hidroxichalcona (**2**) en la posición 5' con el grupo metilo (-CH₃) y en la posición 4' con el grupo metoxilo (-CH₃O) mejoró parcialmente la afinidad por el receptor (**2** vs. **9** y **3**).

c) al comparar los compuestos **2**, **3**, **4** y **5** se puede inferir que la sustitución con un grupo metoxilo (-OCH₃) en la posición 4' en la 2'-hidroxichalcona mejora la actividad (**2** vs. **3**), mientras que dicha sustitución en la posición 5' y en mayor medida la posición 6' perjudican la actividad (**2** vs. **4** y **5**).

d) la sustitución del grupo hidroxilo (-OH) en la posición 4' y metoxilo (-OCH₃) en la posición 3' disminuye la capacidad de desplazar la unión específica de [³H] FNZ al su-BZD del núcleo chalcona (**1** vs. **13**).

e) las sustituciones en la posición 5' de la 2'-hidroxichalcona (**2**) por fluor (-F), cloro (-Cl) y/o bromo (-Br) disminuyen la capacidad de desplazar la unión específica de [³H] FNZ al su-BZD del compuesto (**2** vs. **6-8**). La doble sustitución con bromo (-Br) en las posiciones 3' y 5' anula esta capacidad (**2** vs. **10**).

f) las sustituciones en la posición 2' por bromo (-Br) perjudica la capacidad de desplazar la unión específica de [³H] FNZ al su-BZD del núcleo chalcona (**1** vs. **16**).

g) la incorporación de un grupo metilo (-CH₃) en la posición 4' (**11**) y/o de un grupo nitro (-NO₂) en la posición 3' (**12**) de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) anulan la actividad del compuesto (**9** vs. **11** y **12**).

- *Si se consideran sustituciones en los anillos A y B de la chalcona*

a) la doble sustitución en la posición 4' por el grupo amino (-NH₂) y en la posición 3 por el grupo nitro (-NO₂) (**22**) disminuye la actividad con respecto de las chalconas monosustituidas (**22** vs. **14** y **17**).

- *Núcleo chalcona vs núcleo flavanona*

a) el núcleo chalcona (**1**) presenta una inhibición de la unión específica de [³H] FNZ mayor a la del núcleo flavanona (**23**) (**1** vs. **23**).

- *Si se considera la estructura flavanona*

a) la incorporación del grupo metilo (-CH₃) en la posición 6 y del grupo nitro (-NO₂) de la flavanona (**24**) no modifica la capacidad de la flavanona (**23**) de desplazar la unión específica de [³H] FNZ al su-BZD (**23** vs. **24**).

b) la incorporación de dos átomos de bromo (-Br) en la posición 3 de la flavanona (**25**) anula la capacidad de la flavanona (**23**) de desplazar la unión específica de [³H] FNZ al su-BZD (**23** vs. **25**).

4.3.2 Estudio *in vitro* de la interacción de los compuestos sintetizados con el receptor 5-HT_{1A}

4.3.2.1 Introducción

4.3.2.1.1 Estructura y función del receptor 5- HT_{1A}

El sistema serotoninérgico está compuesto por 14 subtipos de receptores de serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) denominados: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ y 5-HT₇. Los receptores serotoninérgicos pertenecen a la familia de receptores metabotrópicos, con excepción del subtipo 5-HT₃ que pertenecen a la familia de receptores ionotrópicos. Cada subtipo de receptor 5-HT presenta características estructurales y farmacológicas únicas y una distribución diferente en el SNC (Hoyer y col., 1994). En este trabajo, nos vamos a referir al el receptor 5- HT_{1A}, el cual está implicado en la depresión y en los trastornos de ansiedad (Köhler y col., 2015).

El receptor 5-HT_{1A} consta de 422 aminoácidos tanto en humanos como en ratas, presentando una homología del 89% entre ambas especies. Pertenece al grupo de receptores acoplados a proteína G (GPCR, del inglés “G protein-coupled receptors”) con siete dominios transmembrana. La cadena N-terminal extracelular contiene tres sitios putativos de glicosilación, mientras que los bucles internos contienen tres sitios de fosforilación, uno en el segundo bucle y dos en el tercer bucle. La corta cadena C-terminal intracelular está implicada en el acoplamiento del receptor con la proteína G (Figura 22) (Schechter y col., 2002)

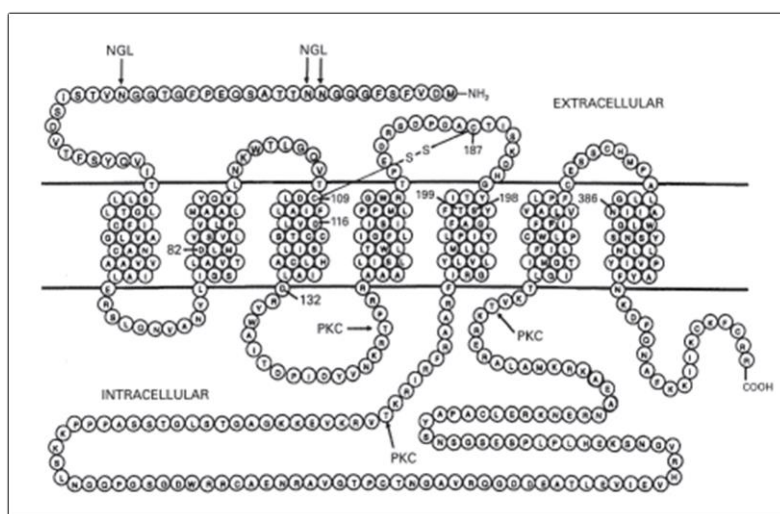


Figura 22. Modelo de la topología de receptor 5- HT_{1A} transmembrana de rata. Se muestran los sitios para la fosforilación por la proteína quinasa C (PKC) y N-glicosilación (NGL). Adaptado de Olivier y col. (1999).

La estimulación del receptor 5-HT_{1A} por sus agonistas, serotonina o 8-OH-DPAT (8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina), inhibe a través de la interacción con la proteína G $\alpha_{i/o}$ a la adenil ciclasa y en consecuencia la producción del segundo mensajero AMPc. También, provoca la apertura de los canales de K⁺, generando hiperpolarización y disminución de la actividad neuronal (Olivier y col., 1999). Además, la activación de los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos reduce la entrada de Ca²⁺ presináptica, por lo tanto, pueden inhibir la liberación de neurotransmisores. De hecho, se ha demostrado que la serotonina participa en la modulación de múltiples sistemas de transmisión como el noradrenérgico, colinérgico y glutamatérgico, en diferentes regiones del cerebro (Schechter y col., 2002).

El receptor 5-HT_{1A} se expresa tanto como autorreceptor presináptico en neuronas serotoninérgicas localizadas en los núcleos del rafe (NDR) y como receptor postsináptico en la corteza prefrontal medial (CPFm) y en otras áreas como el septum lateral, CA1 del hipocampo y giro dentado, la corteza entorrinal y frontal, el hipotálamo y la amígdala

(Celada y col., 2013). La activación de los autorreceptores 5-HT_{1A} disminuye la neurotransmisión de 5-HT mediante la activación de un sistema de retroalimentación negativo a nivel presináptico, que reduce la tasa de síntesis, recambio y la liberación de 5-HT (Akimova y col., 2009). Mientras que la activación del receptor 5-HT_{1A} en la corteza frontal facilita la liberación de catecolaminas en el prosencéfalo. La 5-HT se une al receptor 5-HT_{1A} postsináptico en las neuronas piramidales glutamatérgicas, reduciendo en consecuencia la actividad del glutamato, que a su vez disminuye la actividad de las interneuronas GABAérgicas generando un aumento en la actividad de las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas en el área tegmental ventral. Por lo tanto, la estimulación de receptores postsinápticos 5-HT_{1A} aumenta la liberación de catecolaminas en el cerebro anterior (Köhler y col., 2015).

4.3.2.1.2 El receptor 5-HT_{1A} en la depresión

Distintos trabajos han estudiado la participación de los receptores 5-HT_{1A} en la depresión y en el tratamiento de dicha patología. Se ha evidenciado que individuos con una elevada densidad o actividad de autorreceptores presinápticos 5-HT_{1A} son más susceptibles a los trastornos del estado de ánimo y al suicidio, y no responden a fármacos antidepresivos. El mecanismo de retroalimentación negativa está involucrado en la acción retardada y posiblemente limite la eficacia de los ISRS, IRSN o agonistas 5-HT_{1A}. El pindolol (antagonista mixto de los receptores adrenérgicos β /5-HT_{1A}) potencia y precipita los efectos clínicos de los ISRS, ya que, al bloquear parcialmente la retroalimentación negativa mediada por el autorreceptor, imita la desensibilización de los receptores 5-HT_{1A} presinápticos producida por el tratamiento crónico con antidepresivos aumentando la liberación de 5-HT en el prosencéfalo. Además, se ha demostrado que la reducción de la expresión de los receptores 5-HT_{1A} presinápticos en ratones, sin alterar los postsinápticos, es suficiente para evocar efectos de símil-antidepresivos. Estas evidencias, demuestran el papel fundamental que desempeñan los autorreceptores 5-HT_{1A} en el tratamiento de trastornos del estado de ánimo (Celada y col., 2013).

Por otro lado, la activación de los receptores postsinápticos en el hipocampo posee un papel importante en el trastorno depresivo mayor. El efecto antidepresivo del tratamiento crónico con agonistas selectivos 5-HT_{1A} puede estar relacionado con la inducción de neurogénesis en el hipocampo, la cual depende de la activación de receptores 5-HT_{1A}, pero también de la remodelación funcional de circuitos corticolímbicos involucrados en la depresión mayor.

Además, se ha determinado la participación de otros receptores 5-HT postsinápticos en los efectos antidepresivos. Estudios en roedores demostraron que ratones *knock out* para el receptor 5-HT_{1A} luego del tratamiento con ISRS presentan efectos símil-antidepresivos y neurogénesis en el hipocampo. A su vez, el bloqueo de receptores 5-HT_{1A} en pacientes con trastorno depresivo mayor no modifica el efecto antidepresivo de la fluoxetina, lo que sugiere la participación de otros receptores 5-HT como por ejemplo el 5-HT₄ (Celada y col., 2013).

4.3.2.1.3 El receptor 5-HT_{1A} en la ansiedad

Estudios en humanos y roedores han demostrado que la ansiedad se encuentra asociada a una reducción en la expresión/función de los receptores 5-HT_{1A}.

La disminución en los niveles del receptor 5-HT_{1A} en la amígdala, la corteza cingulada y núcleos del rafe en humanos está asociada a trastorno de ansiedad social. Además, individuos con una baja densidad cortical del receptor 5-HT_{1A} presentan trastornos de pánico y su reducción en voluntarios normales esta correlacionada con respuestas ansiosas (Celada y col., 2013).

El desarrollo de ratones modificados genéticamente ha permitido un mayor conocimiento sobre el papel de los receptores 5-HT_{1A} en la ansiedad. Se ha determinado que un adecuado nivel de señalización de estos receptores es necesario durante el desarrollo del cerebro para evitar fenotipos de ansiedad en la edad adulta (Gross y col., 2002). Ratones *knock out* para el receptor 5-HT_{1A} presentan fenotipo ansioso con disfunción de la CPF y alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica (Celada y col., 2013).

Por otro lado, la administración de agonistas del receptor 5-HT_{1A} tanto en seres humanos como en roedores presenta efectos ansiolíticos (Gross y col., 2002).

4.3.2.1.4 Ligandos del receptor 5-HT_{1A}

EL 8-OH-DPAT se considera el agonista prototípico en los receptores 5-HT_{1A} y ha sido utilizado en gran medida para la caracterización *in vitro* e *in vivo* de los efectos mediados por el receptor 5-HT_{1A}. Por consiguiente, el [³H] 8-OH-DPAT representa el radioligando agonista de referencia para estudiar los receptores 5-HT_{1A}, ya que es potente, selectivo y tiene un alto porcentaje de unión específica (Olivier y col., 1999). Si bien en un principio se creía que no tenía otras propiedades, luego se descubrió que puede unirse al subtipo 5-HT₇ y a sitios de re-captación de 5-HT en el cuerpo estriado de rata. Además,

posee moderada a baja afinidad para los receptores α_1 y α_2 -adrenérgicos y dopaminérgicos D2 (Assié y Koek, 2000; Heusler y col., 2010).

Las azapironas, tales como buspirona, gepirona e ipsapirona, son un grupo de fármacos que actúan como agonistas parciales de los receptores 5-HT_{1A}. Los agonistas parciales difieren en su respuesta funcional a los receptores 5-HT_{1A} pre y post sinápticos, pudiendo activar débilmente los receptores postsináptico o antagonizar las acciones de agonistas como el 8-OH DPAT (Schechter y col., 2002). Algunas azapironas son eficaces para el tratamiento de la ansiedad y la depresión (Caliendo y col., 2002).

4.3.2.1.5 Compuestos naturales como ligandos del receptor 5-HT_{1A}

En la actualidad existen pocos trabajos científicos que muestren la capacidad de compuestos naturales de unirse a los receptores 5-HT_{1A}. Se ha demostrado que los alcaloides O-metil dauricina y popisidina presentan moderada afinidad hacia los receptores 5-HT_{1A} corticales (Chung y col., 2009). Algunos polifenoles, como las procianidinas B1, B2 y B3 y la epigalocatequina (Figura 23) fueron capaces de unirse a este receptor, siendo el compuesto más activo la procianidina B3 (Zhu y col., 1997).

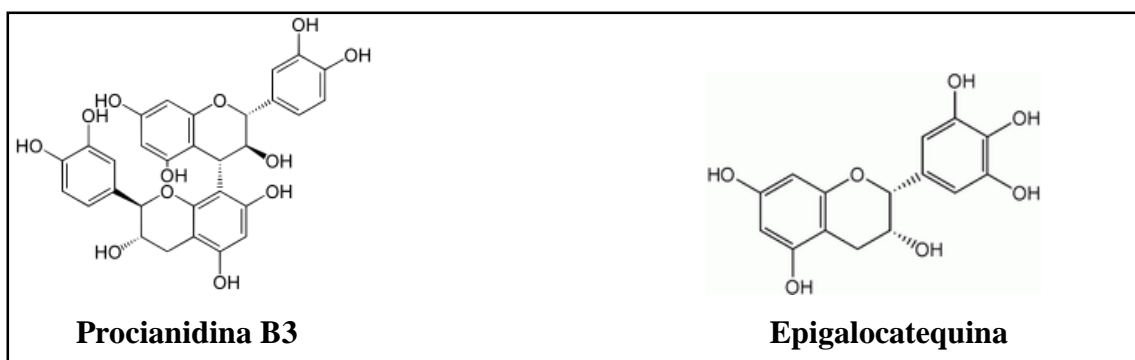


Figura 23. Estructura de polifenoles que presentaron afinidad por los receptores 5-HT_{1A}.

4.3.2.2 Resultados

4.3.2.2.1 Desplazamiento de la unión específica de [³H] 8-OH-DPAT

Con el objetivo de estudiar si otros polifenoles presentan afinidad por el receptor 5-HT_{1A}, en esta sección se describe la capacidad de los compuestos sintetizados, del núcleo chalcona (**1**) y de la flavanona (**23**) de unirse a este receptor en membranas sinaptosomales de corteza de cerebro de rata utilizando el radioligando [³H] 8-OH-DPAT.

Se evaluó si los compuestos sintetizados, a una concentración de 300 μM , desplazan la unión específica de [^3H] 8-OH-DPAT al receptor 5HT $_{1A}$. La Tabla 14 muestra los porcentajes promedios de desplazamiento del radioligando en el ensayo de unión al receptor.

Los compuestos **12**, **18**, **20** y **25** no desplazaron la unión específica del [^3H] 8-OH-DPAT al receptor 5HT $_{1A}$, por lo que estos compuestos no presentan afinidad por este receptor. Las chalconas **3**, **16** y **19** y el núcleo flavanona (**23**) fueron capaces de desplazar moderadamente al ligando específico tritiado entre el 20 % y el 40 %. Las chalconas **6**, **8**, **9**, **13-15** y **17** inhibieron entre un 40 % y 60 % la unión del [^3H] 8-OH-DPAT, mientras que los compuestos **1**, **2**, **4**, **7**, **10**, **11**, **21** y **24** lo hicieron en mayor medida, entre el 60 % y 90 %. Las chalconas **5** (6'-metoxi-2'-hidroxichalcona) y **22** (4'-amino-3-nitrochalcona) presentaron los mayores porcentajes de desplazamiento (superior al 90 %).

4.3.2.2.2 Curvas de desplazamiento de la unión específica de [^3H] 8-OH-DPAT

Se realizaron curvas de desplazamiento para los compuestos **1**, **2**, **4**, **5**, **7**, **10**, **11**, **13**, **21**, **22** y **24** y se calculó la K_i para cada compuesto (Tabla 15). La Figura 24 muestra las curvas obtenidas para los compuestos más activos, **1**, **2**, **5** y **21**.

Los compuestos evaluados presentaron baja afinidad por el receptor 5-HT $_{1A}$. La 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**5**) fue el compuesto que presentó la mayor afinidad por este receptor con un valor de K_i de $13.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$, seguido por el núcleo chalcona (**1**) (K_i : $20.8 \pm 1.5 \mu\text{M}$). El resto de los compuestos evaluados (**4**, **7**, **10**, **11**, **13**, **22** y **24**) mostraron valores significativamente superiores. En tanto que las chalconas **2** y **21** presentaron baja afinidad con valores de K_i de $71.4 \pm 1.4 \mu\text{M}$ y $59.6 \pm 1.5 \mu\text{M}$, respectivamente.

Tabla 14. Desplazamiento de la unión específica de [³H] 8-OH-DPAT de los compuestos estudiados

| Número | Compuesto (300 μM) | Desplazamiento de la unión de [³ H] 8-OH-DPAT |
|--------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1 | chalcona | +++ |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | +++ |
| 3 | 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona | + |
| 4 | 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona | +++ |
| 5 | 6'-metoxi -2'-hidroxichalcona | ++++ |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | ++ |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | +++ |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | ++ |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | ++ |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | +++ |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | +++ |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | - |
| 13 | 3'-metoxi-4'-hidroxichalcona | ++ |
| 14 | 4'-aminochalcona | ++ |
| 15 | 4'-metilchalcona | ++ |
| 16 | 2'-bromochalcona | + |
| 17 | 3-nitrochalcona | ++ |
| 18 | 4-nitrochalcona | - |
| 19 | 3-clorochalcona | + |
| 20 | 4-clorochalcona | - |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | +++ |
| 22 | 4'-amino-3-nitrochalcona | ++++ |
| 23 | flavanona | + |
| 24 | 6-metil-8-nitroflavanona | +++ |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | - |

La capacidad de los compuestos, a 300 μM, de inhibir la unión de [³H] 8-OH-DPAT al receptor 5HT_{1A} se indica como: inhibición > 90 % (++++); inhibición 60-90 % (+++); inhibición 40-60 % (++); inhibición 20-40 % (+) e inhibición < 20 % (-).

Tabla 15. Afinidad de los compuestos sintetizados por el receptor 5HT_{1A} presente en membranas sinaptosomales de corteza cerebro de rata

| Número | Compuesto | Afinidad Ki (μM) |
|--------|--------------------------------------|---------------------|
| 5 | 6'-metoxi -2'-hidroxichalcona | 13.3 ± 0.3 |
| 1 | chalcona | 20.8 ± 1.5 |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | 59.6 ± 1.5 |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | 71.4 ± 1.4 |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | 129 ± 2.7 |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | 164 ± 1.47 |
| 13 | 3'-metoxi-4'-hidroxichalcona | 287.8 ± 1.9 |
| 4 | 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona | 303 ± 1.2 |
| 22 | 4'-amino-3-nitrochalcona | 473 ± 7.3 |
| 24 | 6-metil-8-nitroflavanona | 967 ± 11.7 |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | 1221 ± 469 |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | - |
| 14 | 4'-aminochalcona | - |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | - |
| 18 | 4-nitrochalcona | - |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | - |
| 15 | 4'-metilchalcona | - |
| 17 | 3-nitrochalcona | - |
| 19 | 3-clorochalcona | - |
| 3 | 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona | - |
| 16 | 2'-bromochalcona | - |
| 23 | flavanona | - |
| 20 | 4-clorochalcona | - |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | - |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | - |

Ki ± E.S.M. de 2 mediciones independientes de la inhibición en la unión de [³H] 8-OH-DPAT al receptor 5HT_{1A} presentes en membranas sinaptosomales de cortezas de cerebro de rata. El valor de Ki del compuesto de referencia serotonina es de 2.2 ± 0.01 nM. -: no determinado, por orden decreciente de actividad.

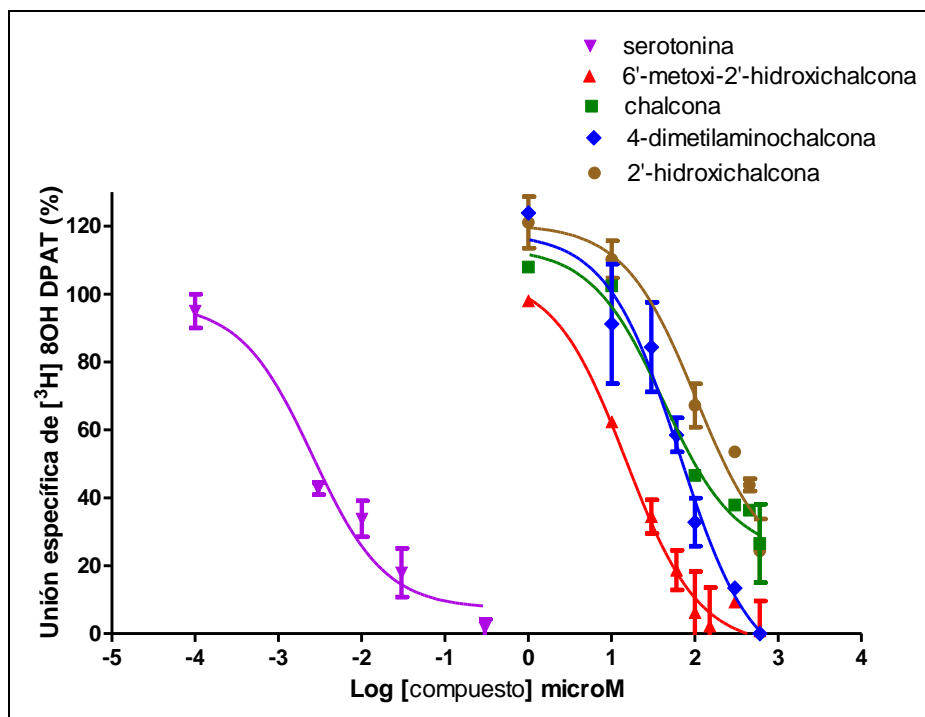


Figura 24. Curvas de desplazamiento de la unión específica de [³H] 8-OH-DPAT al receptor 5-HT_{1A} por la chalcona (1) (■), 2'-hidroxichalcona (2) (●), 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona (5) (▲), 4-dimetilaminochalcona (21) (◆) y serotonina (▼) presentes en membranas sinaptosomales de corteza de cerebro de rata Wistar. Cada punto representa la media ± E.S.M., expresada como el porcentaje de radioligando unido, en dos experimentos independientes realizados por duplicado. K_i serotonina: 2.2 ± 0.01 nM.

4.3.2.3 Discusión

La mayor densidad de sitios de reconocimiento del receptor 5-HT_{1A} se encuentra en el hipocampo, la amígdala, núcleos del rafe, el septo lateral y corteza entorrinal. Se demostró que su distribución es la misma tanto en el cerebro de rata como en el de humanos, y que el ligando [³H]-8-OH-DPAT se une a estos sitios (Olivier y col., 1999). En este trabajo se utilizó la corteza de cerebro de rata ya que es utilizada en muchos trabajos científicos para determinar afinidad de compuestos por el receptor 5-HT_{1A} (Nénonéné y col. 1994; Arro y col. 2001; Carli y col. 1996; Caliendo y col. 2002, entre otros). Además, debe tenerse en cuenta que el receptor 5-HT_{1A} presenta una homología del 89% entre humanos y ratas.

Los resultados del ensayo de desplazamiento de la unión específica de [³H] 8-OH-DPAT a los receptores 5HT_{1A} presentes en membranas sinaptosomales de corteza de cerebro de rata mostraron que la mayoría de los compuestos estudiados no presentan afinidad por dicho receptor. Si bien varios de los compuestos fueron capaces de desplazar en altos porcentajes la unión del radioligando a una concentración elevada de 300 μM, los valores de K_i no se correlacionaron con altas afinidades de unión al receptor.

De la lista de compuestos evaluados, el núcleo chalcona (**1**) y la 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**5**) presentaron la mayor afinidad, con valores de K_i de $13.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$ y $20.8 \pm 1.5 \mu\text{M}$, respectivamente. En tanto que las chalconas **2** y **21** presentaron baja afinidad, con K_i de $71.4 \pm 1.4 \mu\text{M}$ y $59.6 \pm 1.5 \mu\text{M}$, respectivamente. De los resultados obtenidos puede inferirse que la sustitución con los grupos hidroxilo (-OH) y metoxilo (-OCH₃) en la posición 2' y 6', respectivamente, en la chalcona **5** incrementó 6 veces la actividad presentada por la 2'-hidroxichalcona (**2**) y levemente a la del núcleo chalcona (**1**). Por lo que la posición 6' podría tener un rol relevante para la unión al receptor 5-HT_{1A}.

4.3.3 Estudio *in vitro* de la interacción de los compuestos sintetizados con el receptor μ -opioide

4.3.3.1 Introducción

4.3.3.1.1 Estructura y función del receptor μ -opioide

Los receptores opioides pertenecen a la superfamilia de GPCR, en particular a la familia de la clase A (receptores semejantes a rodopsina) de proteínas heterotriméricas G_i/G_o sensibles a la toxina pertussis. Se han descrito tres tipos de receptores opioides “clásicos”: mu (μ), delta (δ) y kappa (κ) y un receptor “huérfano” denominado receptor símil-opioide 1 (ORL-1), o receptor nociceptina/orfanina FQ (Waldhoer y col., 2004). A su vez, basándose en estudios farmacológicos, se ha propuesto la existencia de al menos tres subtipos de receptores μ : μ_1 , μ_2 y μ_3 ; dos subtipos de receptores δ : δ_1 y δ_2 ; y tal vez hasta cuatro subtipos de receptores κ : κ_{1a} , κ_{1b} , κ_2 y κ_3 (Smith y Lee, 2003).

En la Tabla 16 se describen las características de los receptores opioides clásicos.

A nivel estructural, los receptores opioides presentan un dominio N-terminal extracelular, siete dominios transmembrana helicoidales conectados por tres dominios extracelulares y tres intracelulares y una cola C-terminal intracelular (Figura 25). Estos poseen sitios potenciales para la fosforilación a través de la proteína quinasa A y C en el segundo y tercer bucle intracelular, así como en el dominio la C terminal.

Los receptores opioides presentan una homología del 60 % aproximadamente, donde las mayores similitudes se encuentran en las regiones transmembrana (73-76 %) y las regiones intracelulares (63-66 %) (Minami y Satoh, 1995).

Tabla 16. Características de los receptores opioides clásicos

| Receptor | mu (μ) | delta (δ) | kappa (κ) |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Subtipo | μ_1, μ_2, μ_3 | δ_1, δ_2 | $\kappa_{1a}, \kappa_{1b}, \kappa_2, \kappa_3$ |
| Ligando endógeno | β -endorfinas | encefalinas | dinorfinas |
| Acción sobre canales | Abre K^+ | Abre K^+ | Cierra Ca^{2+} |
| Proporción en la médula espinal en ratas | 70% | 24% | 6% |
| Otras localizaciones | Cerebro: corteza (lamina III y IV), tálamo, sustancia gris periacueductal, bulbo rostral ventromedial Médula espinal: sustancia gelatinosa Neuronas sensoriales periféricas Tracto intestinal | Cerebro: núcleo pontino, amígdala, bulbos olfatorios, corteza profunda Médula espinal: sustancia gelatinosa Neuronas sensoriales periféricas | Cerebro: hipotálamo, sustancia gris periacueductal, claustrum Médula espinal: sustancia gelatinosa Neuronas sensoriales periféricas |
| Funciones | μ_1 : analgesia, dependencia física μ_2 : depresión respiratoria, miosis, euforia, reduce la motilidad GI, dependencia física μ_3 : desconocido | analgesia, efectos antidepresivos, dependencia física | analgesia, sedación, miosis, inhibición de la liberación de HAD, disforia |

Receptores opioides clásicos. GI: gastrointestinal; HAD: hormona antidiurética. Modificada de Serpell y col. (1998).

La estimulación de los receptores opioides por ligandos endógenos y exógenos genera múltiples efectos entre los que se destaca la acción analgésica. Tras su activación, ambas subunidades de la proteína G, α y $\beta\gamma$, interactúan con múltiples sistemas efectores celulares, entre los que se destacan: (1) la inhibición de la adenil ciclasa, la cual disminuye el AMPc y en consecuencia reduce la actividad de la proteína quinasa A, la cual fosforila numerosas proteínas afectando procesos neuronales adicionales (Nestler, 2001); (2) la inhibición de canales iónicos dependientes de voltaje como el TRPV (canal iónico de potencial receptor transitorio de la subfamilia vainilloide) y de Na^+ producen analgesia mediante la disminución de la excitabilidad neuronal y la inhibición de los canales de Ca^{2+}

dependientes de voltaje presinápticos impiden la liberación de neurotransmisores que transmiten el impulso doloroso (Ocaña y col., 2004; Waldhoer y col., 2004) y (3) la apertura de los canales de K^+ de rectificación interna (GIRKs) y los K_{ATP} inducen la hiperpolarización de la membrana neuronal a través de la salida del flujo de K^+ , reduciendo la excitabilidad neuronal (Ikeda y col., 2002).

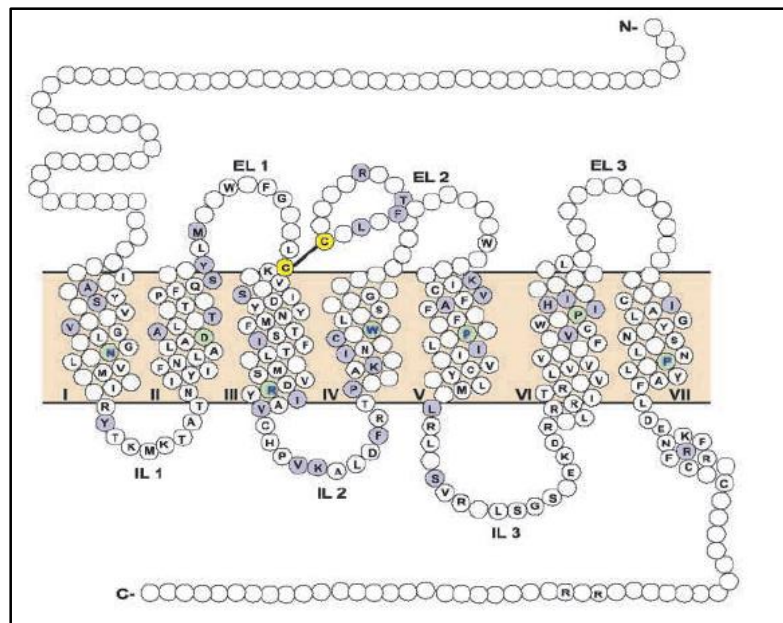


Figura 25. Esquema de la estructura de los receptores opioides. Modelo serpentina del receptor opioide. Cada dominio transmembrana está numerado con un número romano. Los círculos blancos vacíos representan los aminoácidos no conservados entre los receptores μ , δ y κ y nociceptina/orfanina. Los círculos blancos con una letra representan los aminoácidos que son idénticos entre los cuatro receptores opioides y los círculos violetas representan la similitud de aminoácidos entre los receptores clásicos. Los círculos verdes destacan los restos altamente conservados de los receptores de la familia A de GPCR y los amarillos representan dos cisteínas conservadas que forman puente disulfuro entre el EL 1 y 2. EL: bucle extracelular; IL: bucle intracelular. Obtenido de Waldhoer y col. (2004).

De los tres tipos de receptores opioides clásicos, se cree que el receptor μ -opioide es el principal responsable de la mediación de la antinocicepción y la tolerancia. Aunque los receptores δ y κ también pueden mediar la antinocicepción en algunas regiones del SNC, en estudios donde se evaluaron los efectos antinociceptivos de la morfina y otros analgésicos clínicamente eficaces, los receptores δ y κ no desempeñaron un papel primordial en la mediación de los efectos antinociceptivos. Además, algunos trabajos científicos sugieren que los agonistas opioides, incluso selectivos para los receptores δ , pueden mediar la antinocicepción actuando a través de los receptores μ (Smith y Lee, 2003).

4.3.3.1.2 El receptor μ -opioide en el dolor

Los receptores μ -opioide están ampliamente distribuidos en el SNC, incluyendo las regiones que participan en la transmisión del dolor, como el asta dorsal de la médula espinal, la médula, la sustancia gris periacueductal, el tálamo o la corteza. En base a la distribución de los receptores μ -opioide y de estudios funcionales de sus agonistas, se han propuesto dos mecanismos principales para producir el efecto analgésico: la supresión de la transmisión del dolor en el asta dorsal de la médula, tálamo y corteza, y la activación del sistema de control descendente del dolor proyectado al asta dorsal de la médula espinal. Para suprimir la transmisión del dolor, los agonistas estimulan a este receptor en la región terminal de la neurona aferente primaria en el asta dorsal de la médula espinal o en la región terminal de la neurona de segundo orden en el tálamo, generando una inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores. También, a nivel postsináptico, los agonistas estimulan a los receptores μ -opioide en el cuerpo celular de la neurona de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal y el cuerpo celular de la neurona de tercer orden en el tálamo para generar una hiperpolarización postsináptica de las neuronas excitatorias (Figura 26). Por el contrario, para activar el sistema de control descendente del dolor, los agonistas de los receptores μ -opioide estimulan a los receptores situados en las neuronas GABAérgicas en la médula espinal y la sustancia gris periacueductal para causar la desinhibición de las neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas proyectadas al asta dorsal de la médula espinal. La liberación de noradrenalina y serotonina por la desinhibición de las neuronas que las contienen estimulan los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos y serotoninérgicos, respectivamente, en la región de la neurona aferente primaria y el soma de la neurona de segundo orden en el asta dorsal de la médula para suprimir la transmisión de la señal dolorosa (Mizoguchi y col., 2012). A su vez, la activación de los receptores μ -opioide que se encuentran en las terminales periféricas de neuronas aferentes primarias produce antinocicepción a nivel local (Ocaña y col., 2004).

4.3.3.1.3 Flavonoides como ligandos de los receptores opioide

Si bien se ha demostrado que los receptores opioides están involucrados en el mecanismo de acción de algunos flavonoides mediante la reversión de su efecto antinociceptivo en modelos animales de dolor, por la administración previa del antagonista naloxona (Heidari y col., 2009a; Loscalzo y col., 2008; Loscalzo y col., 2011; Lovell y col., 2009; Martínez-Vázquez y col., 1996; Viana y col., 2003), existen escasos trabajos

científicos que estudien la unión de los flavonoides a los receptores opioides (Ruiu y col., 2015).

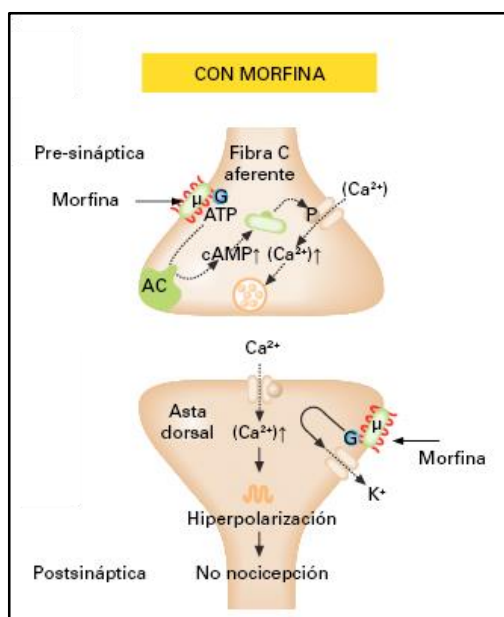


Figura 26. Mecanismo de acción de los receptores μ-opioide en el asta dorsal de la médula espinal. La activación de los receptores μ-opioides por el agonista morfina. a nivel pre sináptico, disminuye la liberación de neurotransmisores que transmiten el impulso doloroso. A nivel post sináptico la apertura de los canales de K⁺ induce la hiperpolarización de la membrana disminuyendo de la excitabilidad neuronal. Modificada <http://www.changepain.org/grt-change-pain-portal/231100038.jsp>.

Un estudio realizado con *Hypericum perforatum* (Hierba de San Juan) evidenció que sus extractos inhiben *in vitro* la unión de [³H] naloxona y [³H] delforfina a los receptores opioides (Katavic y col., 2007). Luego, se aisló e identificó a la amentoflavona como responsable de dicha actividad, presentando afinidad por el receptor δ-opioide con un valor de Ki de 36.5 ± 14 nM (Butterweck y col., 2002). Y se demostró *in vitro* que este flavonoide, junto con el hiperósido, son antagonistas del receptor κ (Katavic y col., 2007; Lovell y col., 2009).

Posteriormente, se evidenció que el extracto metanólico de los frutos de *Vitex agnus-castus* (planta utilizada en el síndrome premenstrual) contiene agonistas no competitivos del receptor μ-opioide. El aislamiento y purificación de los compuestos activos del extracto reveló que los flavonoides casticina (4',3,6,7-tetrametoxi-3',5-dihydroxiflavanona), apigenina (4',5,7-trihydroxiflavanona) y luteolina (3',4',5,7-tetrahydroxiflavanona) son los componentes que presentan afinidad por el receptor μ-opioide con valores de Ki de 1.1 ± 0.2 μM, 16.2 ± 3.2 μM, 13.4 ± 4.1 μM, respectivamente (Webster y col., 2011).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado, mediante ensayos *in vivo*, que los receptores opioides están involucrados en las acciones sedativas y antinociceptivas de la hesperidina (Loscalzo y col., 2008; Loscalzo y col., 2011), un glicósido de hesperetina (4'-metoxi-3',5,7-trihidroxi-flavanona) aislado del extracto etanólico de la *Valeriana wallichii*. Ensayos *in vitro* de unión al receptor μ -opioide mostraron que la hesperidina no es capaz de desplazar la unión del ligando específico tritiado DAMGO (péptido opiáceo sintético con alta especificidad por el receptor μ -opioide) en membranas sinaptosomales de cerebro de rata, pero en cambio sí lo hace su aglicona hesperetina (Loscalzo y col., 2011).

Luego, hemos estudiado la capacidad de unión a los receptores μ -opioide de una serie de flavonoides naturales, de derivados sintéticos (elaborados en nuestro laboratorio) y de compuestos relacionados, mediante el desplazamiento de la unión específica de [³H] DAMGO. Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 17.

Los resultados obtenidos revelaron que la mayoría de los compuestos evaluados no inhibieron de manera significativa la unión específica de [³H] DAMGO a membranas sinaptosomales de cerebro de rata. Las agliconas hesperetina, naringenina, apigenina y diosmetina fueron capaces de desplazar al [³H] DAMGO, sin embargo, la afinidad de estos compuestos por el receptor μ -opioide fue baja. Los compuestos que presentaron mayor afinidad por el receptor μ -opioide fueron la chalcona y la quercetina, con valores de K_i de $28.2 \pm 9.9 \mu\text{M}$ y $11.3 \pm 2.3 \mu\text{M}$, respectivamente. Un resultado inesperado fue que la flavanona sintética **3,3-dibromoflavanona**, presentó la mayor afinidad por el receptor, 46 veces superior al valor hallado para la flavanona natural hesperetina, con un valor de K_i de $0.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ (Loscalzo, 2011). Más aún, estudios preliminares demostraron que la **3,3-dibromoflavanona**, a 30 mg/kg, posee efectos antinociceptivos *in vivo*, al aumentar el tiempo de latencia de reacción de los ratones en el ensayo de la plancha caliente.

Recientemente, se evaluó la afinidad de flavonas aisladas de partes aéreas de *Stachys glutinosa* por los receptores μ y δ opioide. El xantomicrool (6,7,8-trimetoxi-4',5-dihidroxi-flavona) presentó afinidad por el receptor μ -opioide con un valor de K_i de $0.8 \pm 0.02 \mu\text{M}$, similar al obtenido para el compuesto sintético **3,3-dibromoflavanona**. Estudios realizados *in vivo* indicaron que este flavonoide actuaría como antagonista de los receptores opioides (Rui y col., 2015).

Tabla 17. Desplazamiento de la unión específica de [³H] DAMGO

| Compuesto (300 μM) | Desplazamiento de la unión de [³ H] DAMGO | Compuesto (300 μM) | Desplazamiento de la unión de [³ H] DAMGO |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Flavonoides glicosilados | | Flavonoides sintéticos | |
| hesperidina | - | 6-nitroflavona | - |
| neohesperidina | - | 6-fluorflavona | + |
| naringina | - | 6-cloroflavona | - |
| diosmina | + | 6,3'-dimetilflavona | + |
| rutina | + | 6-metil-3'-bromoflavona | - |
| gospipina | + | 2'-nitroflavona | + |
| Agliconas | | 3'-cloroflavona | + |
| flavanona | ++ | 3'-bromoflavona | + |
| hesperetina | +++ | 3'-metilflavona | +++ |
| naringenina | +++ | 4'-nitroflavona | - |
| flavona | ++ | 4'-fluorflavona | - |
| diosmetina | +++ | 4'-bromoflavona | - |
| quercetina | +++ | 3-bromo-3'-nitroflavona | - |
| apigenina | +++ | 3,6-dibromoflavona | - |
| crisina | ++ | 3,3-dibromoflavanona | +++ |
| 6-metilflavona | +++ | | |
| Chalconas | | | |
| chalcona | +++ | | |
| hesperidina metil | - | | |
| chalcona | | | |
| Compuestos relacionados | | | |
| ácido cinámico | - | | |
| ácido cafeico | - | | |
| cromona | - | | |
| ipriflavona | - | | |
| α-naftoflavona | - | | |
| β-naftoflavona | - | | |

El desplazamiento de la unión específica de [³H] DAMGO al receptor μ-opioide indicado como: desplazamiento > 70 % (+++); desplazamiento de 40-70 % (++); desplazamiento de 20-40 % (+); y desplazamiento < 20 % (-). Hesperidina (3',5-dihidroxi-4'-metoxiflavanona-7-(6-O-α-L-ramnosil-D-glucósido), neohesperidina (3',5-dihidroxi-4'-metoxiflavanona-7-[2-O-(α-L-ramnopiranosil)-β-D-glucopiranosido]), naringina (4',5-dihidroxi-4'-metoxiflavanona-7-[2-O-(6-Deoxi-α-L-mannopiranosil)-β-D-glucopiranosiloxi]), diosmina (3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona-7-il-6-O-(6-deoxi-α-L-mannopiranosil)-β-D-glucopiranosido), rutina (3',4',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona-3-(6-O-α-L-mannopiranosil)-β-D-glucopiranosido), gospipina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-8-O-β-D-glucopiranosido), hesperetina (4'-metoxi-3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona), naringenina (4',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona), diosmetina (3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona), quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-4'-metoxiflavona), apigenina (4',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona), crisina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona), hesperidina metil chalcona (4,6'-dimetoxi-3,2'-dihidroxi-4'-metoxiflavona-4'-6-O-(6-deoxi-α-L-mannopiranosil)-β-D-glucopiranosido), ácido cinámico (ácido (2E)-3-fenilprop-2-enoico), ácido cafeico (ácido (2E)-3-(3,4-dihidroxi-2-fenil)-2-propenoico), cromona (1,4-benzopirano), ipriflavona (7-isopropiloxi-isoflavona), α-naftoflavona (2-fenil-4H-benzo[h]chromen-4-ona), β-naftoflavona (3-fenil-1H-benzo[f]chromen-1-ona).

4.3.3.2 Resultados

4.3.3.2.1 Desplazamiento de la unión específica de [³H] DAMGO

En esta sección se describe el estudio de la capacidad de los compuestos sintetizados, el núcleo chalcona (**1**) y las flavanonas **23**, **24** y **25** de unirse al receptor μ -opioide presente en membranas sinaptosomales de cerebro de rata.

Los compuestos sintetizados fueron evaluados a una concentración de 300 μ M, por duplicado, en el ensayo de unión al receptor μ -opioide. En la Tabla 18 se representan los porcentajes promedio de desplazamiento de la unión específica de [³H] DAMGO a los receptores presentes en membranas sinaptosomales de cerebro de rata.

El compuesto **17** no modificó la unión específica del [³H] DAMGO al receptor μ -opioide, indicando que este compuesto no presenta afinidad por este receptor. Las chalconas **2**, **3**, **8**, **15**, **16**, **18-20** y el núcleo flavanona (**23**) fueron medianamente capaces de desplazar al ligando específico tritiado DAMGO a su receptor, con porcentajes de desplazamiento de entre 20% y 40%. Las chalconas **13** y **22** inhibieron entre un 40 % y 60 % la unión del [³H] DAMGO. Mientras que los compuestos **1**, **4-7**, **9-12**, **14**, **21**, **24** y **25** fueron los derivados que presentaron los mayores porcentajes de desplazamientos, superiores al 60 %. Dentro de este grupo de compuestos la chalcona **12** (5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona) y la flavanona **25** (3,3-dibromoflavanona) mostraron la mayor capacidad de desplazar la unión específica de [³H] DAMGO al receptor μ -opioide, en un 100 %.

4.3.3.2.2 Curvas de desplazamiento de la unión específica de [³H] DAMGO

Se realizaron curvas de desplazamiento y se calcularon las constantes de inhibición (K_i) para los compuestos **1**, **4-7**, **9-14**, **21**, **22**, **24** y **25** (Tabla 19). La Figura 27 muestra las curvas de desplazamiento obtenida para los compuestos más activos, **1**, **6**, **12** y **25**, y para la naltrexona.

Los compuestos evaluados presentan de media a baja afinidad por el receptor μ -opioide. De las chalconas sintetizadas, las que mostraron mayor afinidad que el núcleo chalcona *per se* (K_i de $28.2 \pm 9.9 \mu$ M) fueron la 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**), con un valor de K_i de $13.5 \pm 6.9 \mu$ M, seguida por la 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (**6**) (K_i : $19.4 \pm 3.5 \mu$ M), la 4-dimetilaminochalcona (**21**) (K_i : $23.8 \pm 3.1 \mu$ M) y la 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**5**) (K_i : $26.7 \pm 1.6 \mu$ M). El resto de las chalconas sintetizadas mostraron valores superiores al del núcleo chalcona.

La 6-metil-8-nitroflavanona (**24**) desplazó la unión específica de [³H] DAMGO con un valor de K_i de $22.1 \pm 2.1 \mu$ M, similar al obtenido para las chalconas. El compuesto

sintético 3,3-dibromoflavanona (**25**) presentó la mayor afinidad por el receptor μ -opioide, con una K_i de $0.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$.

Tabla 18. Desplazamiento de la unión específica de [³H] DAMGO de los compuestos estudiados

| Número | Compuesto (300 μM) | Desplazamiento de la unión de [³ H]DAMGO |
|--------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1 | chalcona | +++ |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | + |
| 3 | 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona | + |
| 4 | 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona | +++ |
| 5 | 6'-metoxi -2'-hidroxichalcona | +++ |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | +++ |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | +++ |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | + |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | +++ |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | +++ |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | +++ |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | ++++ |
| 13 | 3'-metoxi-4'-hidroxichalcona | ++ |
| 14 | 4'-aminochalcona | +++ |
| 15 | 4'-metilchalcona | + |
| 16 | 2'-bromochalcona | + |
| 17 | 3-nitrochalcona | - |
| 18 | 4-nitrochalcona | + |
| 19 | 3-clorochalcona | + |
| 20 | 4-clorochalcona | + |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | +++ |
| 22 | 4'-amino-3-nitrochalcona | ++ |
| 23 | flavanona | + |
| 24 | 6-metil-8-nitroflavanona | +++ |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | ++++ |

La capacidad de los compuestos, a 300 μM , de inhibir la unión de [³H] DAMGO al receptor μ -opioide se indica como: inhibición > 90 % (++++); inhibición 60-90 % (+++); inhibición 40-60 % (++); inhibición 20-40 % (+) e inhibición < 20 % (-).

Tabla 19. Afinidad de los compuestos sintetizados por el receptor μ -opioide presente en membranas sinaptosomales de cerebro de rata

| Número | Compuesto | Afinidad Ki (μ M) |
|--------|--------------------------------------|---------------------------|
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | 0.8 \pm 0.3* |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | 13.5 \pm 6.9 |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | 19.4 \pm 3.5 |
| 24 | 6-metil-8-nitroflavanona | 22.1 \pm 2.1 |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | 23.8 \pm 3.1 |
| 5 | 6'-metoxi -2'-hidroxichalcona | 26.7 \pm 1.6 |
| 1 | chalcona | 28.2 \pm 9.9* |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | 29.1 \pm 8.5 |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | 29.5 \pm 6.6 |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | 32.5 \pm 9.3 |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | 46.3 \pm 1.6 |
| 4 | 5'-metoxi -2'-hidroxichalcona | 54.6 \pm 2.9 |
| 14 | 4'-aminochalcona | 59.4 \pm 1.5 |
| 13 | 3'-metoxi-4'-hidroxichalcona | 101 \pm 21 |
| 22 | 4'-amino-3-nitrochalcona | 107 \pm 17.6 |
| 15 | 4'-metilchalcona | - |
| 20 | 4-clorochalcona | - |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | - |
| 23 | flavanona | - |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | - |
| 16 | 2'-bromochalcona | - |
| 18 | 4-nitrochalcona | - |
| 3 | 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona | - |
| 19 | 3-clorochalcona | - |
| 17 | 3-nitrochalcona | - |

Ki \pm E.S.M. de 2 mediciones independientes de la inhibición en la unión de [3 H] DAMGO al receptor μ -opioide presentes en membranas sinaptosomales cerebro de rata. El valor de Ki del compuesto de referencia naltrexona es de 0.2 \pm 0.01 nM; -: no determinado, por orden decreciente de actividad; *(Loscalzo, 2011).

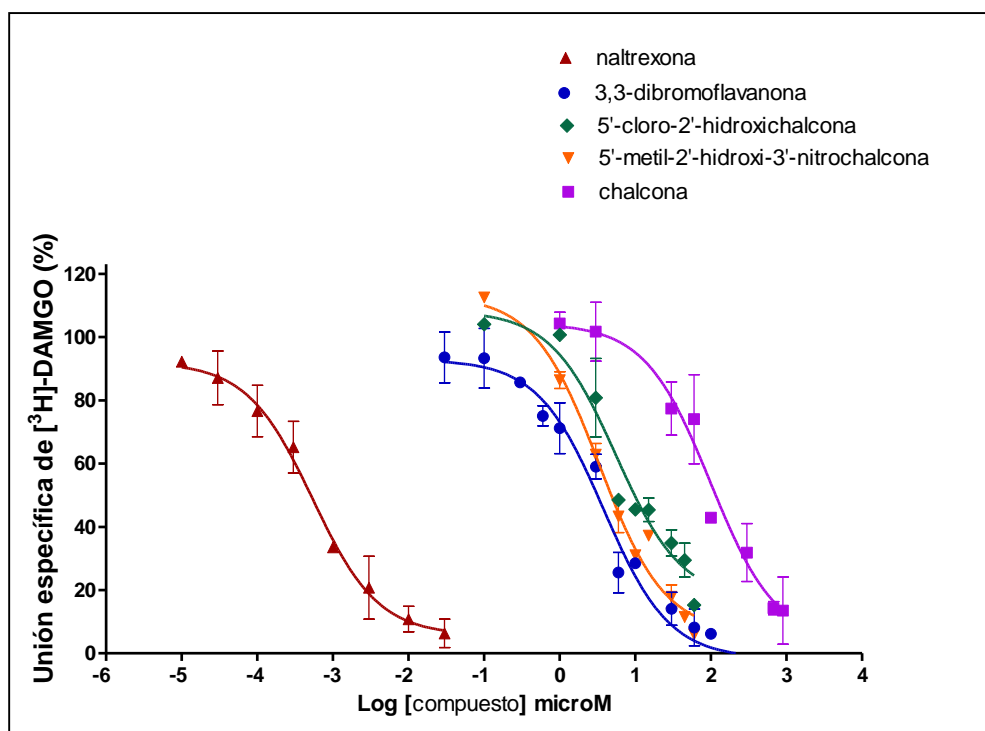


Figura 27. Curvas de desplazamiento de la unión específica de [³H] DAMGO por la chalcona (**1**) (■), 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (**6**) (◆), 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) (▼), 3,3-dibromoflavanona (**25**) (●) y naltrexona (▲) al receptor μ -opioide presentes en membranas sinaptosomales de cerebro de rata Wistar. Cada punto representa la media \pm E.S.M, expresada como el porcentaje de radioligando unido, en dos experimentos independientes realizados por duplicado. K_i naltrexona: 0.21 ± 0.01 nM.

4.3.3.2.3 Acoplamiento molecular de la 3,3-dibromoflavanona (**25**)

Por último, dado el reciente descubrimiento de la estructura cristalográfica del receptor μ -opioide, se realizaron estudios de acoplamiento molecular (“docking”) para determinar la posible orientación e interacción de la flavanona **25** con el receptor. En una primera instancia se observó que el programa AutoDock fue capaz de predecir la orientación activa del ligando cristalográfico (Figura 28).

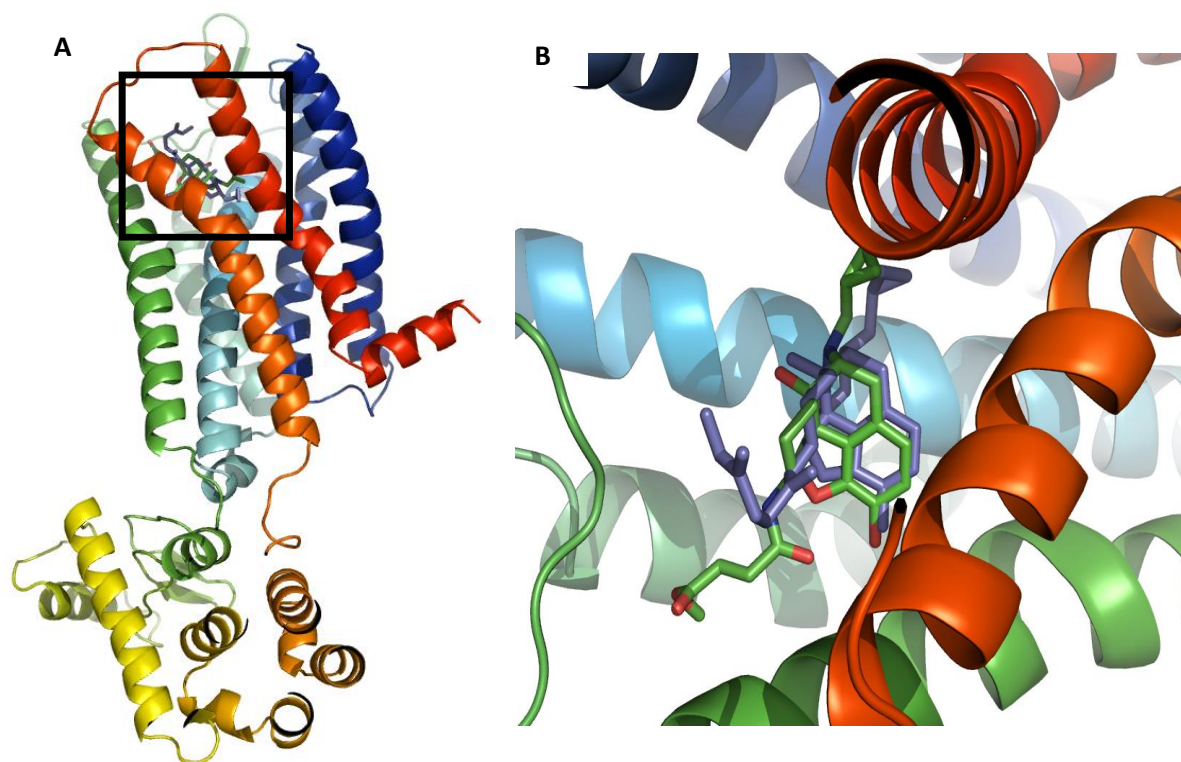


Figura 28. A. Estructura del receptor μ -opioide. El sitio activo se indica con un cuadrado. B. La superposición del ligando cristalográfico (en violeta) y la conformación de acoplamiento (átomos de carbono en color verde y átomos de oxígeno en color rojo) en el sitio activo. Para simplificar, se han omitido los átomos de hidrógeno.

La flavanona de partida (comercial), utilizada para sintetizar a la 3,3-dibromoflavanona (**25**) era una mezcla racémica de la 2R- y 2S- flavanona, por lo que el producto final también resultó ser racémico. Con el objeto de evaluar cuál de los estereoisómeros (2R- ó 2S- 3,3-dibromoflavanona) sería el responsable de la unión al receptor μ -opioide, primero se realizó el estudio de modelado con un conjunto de agliconas naturales de estructura cerrada (flavonas y flavanonas) que tienen afinidad por el receptor μ -opioide (diosmetina, hesperetina, naringenina y apigenina) (Loscalzo, 2011). Estas se acoplaron al sitio activo del receptor, mostrando una orientación similar al derivado de morfina descrito por (Manglik y col., 2012) (Figura 29).

Luego, se determinó que la conformación R, entre los isómeros 2R- y 2S- de la 3,3-dibromoflavanona (**25**), presenta una orientación similar al de las agliconas naturales y pareciera ser el isómero más activo (Figura 30).

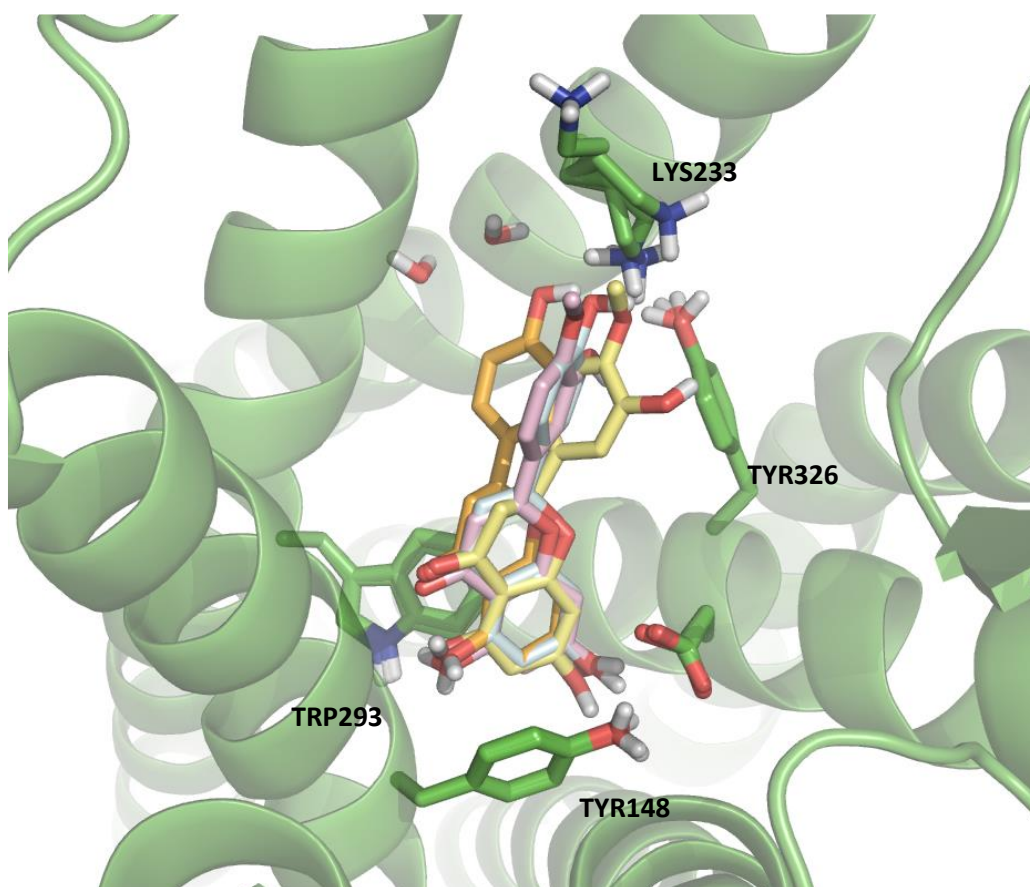


Figura 29. Superposición de las agliconas naturales. Residuos flexibles del receptor (TRP293, TYR326, ASP147, TYR148 y LYS233) se muestran en verde. Sus átomos de oxígeno e hidrógeno unidos a heteroátomos se muestran en rojo y blanco, respectivamente. Se muestra a la diosmetina (átomos de carbono en color rosa), hesperetina (átomos de carbono en color amarillo), naringenina (átomos de carbono en naranja) y apigenina (átomos de carbono en color azul).

El estudio de *docking* sugiere dos interacciones de apilamiento π - π : (1) el anillo aromático B de la 3,3-dibromoflavanona (**25**) con el grupo aromático del residuo TYR326 y (2) el anillo A de la flavanona **25** con TRP293. También, se detectan interacciones lipófilicas positivas entre los átomos de bromo del compuesto **25** y la cavidad del receptor.

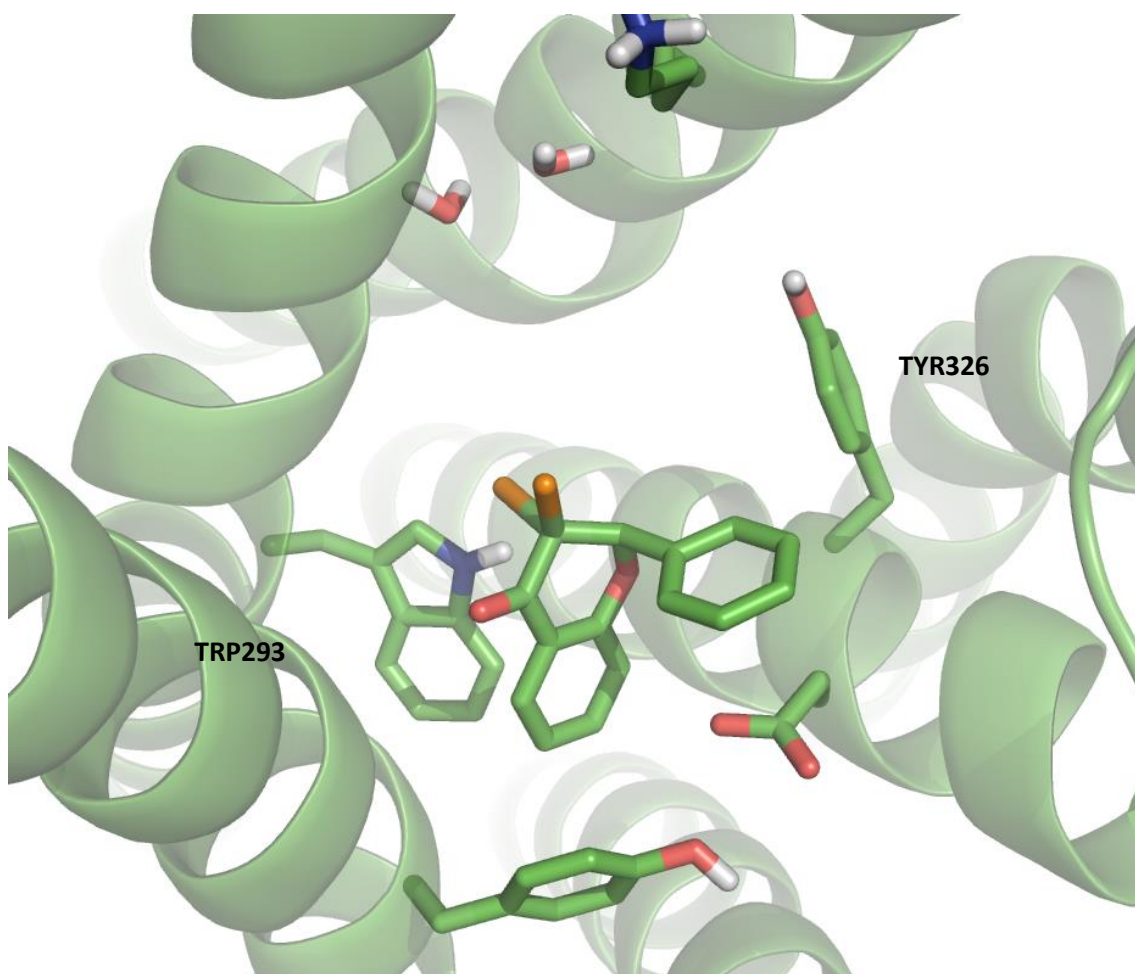


Figura 30. El acoplamiento molecular del isómero 2R de la 3,3-dibromoflavanona (**25**). Se muestran las posibles interacciones con los residuos representativos.

4.3.3.3 Discusión

La secuencia de los receptores μ -opioide está altamente conservada en humanos, rata y ratón. La corteza de cerebro de rata presenta la mayor proporción de receptores opioides siendo 56 % para el μ , 40 % para el δ y sólo un 4 % para el κ (Thomasy y col., 2007). A su vez, los sitios de localización de los receptores μ y δ en ratón son muy similares a los descritos en rata (Moskowitz y Goodman, 1985). Además, se ha demostrado que el DAMGO, el ligando específico del receptor μ -opioide, posee similar especificidad en homogenatos de cerebros de rata y de ratón y que tampoco existen diferencias en la densidad y afinidad de los sitios de DAMGO entre ambas especies (Yoburn y col., 1991).

Los resultados obtenidos en el ensayo de desplazamiento de la unión específica de [3 H] DAMGO al receptor μ -opioide mostraron que quince de los veinticinco compuestos evaluados desplazaron en un porcentaje mayor al 60% la unión del radioligando a este

receptor. El estudio de afinidad de los mismos reveló que presentan media a baja afinidad por dicho receptor presente en membranas sinaptosomales de cerebro de rata.

A pesar de que el número de compuestos estudiados no es lo suficientemente amplio para poder realizar una REA considerable, se puede establecer el siguiente análisis preliminar:

-Si se consideran las sustituciones en el anillo B del núcleo chalcona:

a) la sustitución en la posición 4 por un grupo dimetil amino (-N(CH₃)₂) no modifica la afinidad del núcleo chalcona por el receptor (**1** vs. **21**), en tanto que grupos nitro (-NO₂) (**1** vs. **18**) y cloro (-Cl) (**1** vs. **20**) disminuyen la actividad del núcleo. Esto sugeriría que sustituciones con grupos atractores de electrones (-Cl, -NO₂) en esta posición anularían la actividad, en tanto que grupos dadores de electrones no la modifican.

b) la sustitución en la posición 3 por grupos atractores de electrones, nitro (-NO₂) y cloro (-Cl), canceló y disminuyó la capacidad de desplazar la unión específica de [³H] DAMGO al receptor μ-opioide del núcleo chalcona, respectivamente (**1** vs. **17** y **19**).

-Si se consideran las sustituciones en el anillo A del núcleo chalcona:

a) la sustitución en la posición 2' por un grupo hidroxilo (-OH) disminuyó la capacidad de desplazar la unión específica de [³H] DAMGO al receptor μ-opioide con respecto a la chalcona (**1** vs. **2**). Sin embargo, la incorporación de las sustituciones en la posición 5' de la 2'-hidroxichalcona (**2**) con grupos metoxilo (-CH₃O), metilo (-CH₃), fluor (-F) y cloro (-Cl) mejoró parcialmente la afinidad por el receptor (**2** vs. **4**, **5**, **6**, **7** y **9**), excepto para la sustitución con bromo (-Br) (**8**) en donde dicha capacidad no se modificó.

b) al comparar los compuestos **3**, **4** y **5** se puede inferir que la sustitución con un grupo metoxilo (-OCH₃) en la 2'-hidroxichalcona (**2**) mejora la actividad de los compuestos en el siguiente orden decreciente posición 6' > posición 5' > posición 4'.

c) la sustitución en la posición 4' por grupos amino (-NH₂) y metilo (-CH₃) y en la posición 2' por un grupo bromo (-Br) disminuyó la capacidad de desplazar la unión específica de [³H] DAMGO con respecto a la chalcona (**1** vs. **14-16**).

d) la sustitución con un grupo bromo (-Br) en la posición 3' favorecería la afinidad de 5'-bromo-2'-hidroxichalcona (**8**) por el receptor μ-opioide (**8** vs. **10**).

e) la sustitución con un grupo metilo (-CH₃) en la posición 4' (**11**) y con un grupo nitro (-NO₂) en la posición 3' (**12**) de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) genera derivados más activos, siendo el compuesto **12** el compuesto sintetizado con más actividad en esta serie (**9** vs. **11** y **12**).

- Si se consideran sustituciones en los anillos A y B de la chalcona

a) la sustitución en la posición 3 por el grupo nitro (-NO₂) perjudica la actividad de la 4'-aminochalcona (**14** vs. **22**).

b) la sustitución en posición 4' por el grupo amino (-NH₂) de la 3-nitrochalcona (**17**) aumenta la capacidad de desplazar la unión específica de [³H] DAMGO (**17** vs. **22**).

- *Núcleo chalcona vs núcleo flavanona*

a) se puede observar que el núcleo flavanona (**23**) presenta una inhibición de la unión específica de [³H] DAMGO al receptor μ-opioide menor que el núcleo chalcona (**1**), teniendo en consideración el mismo tipo de sustituciones (**1** vs. **23** y **12** vs. **24**).

Se evidenció que la ciclación de la chalcona más activa no aumentó significativamente la afinidad por el receptor (**12** vs. **24**).

- *Si se considera la estructura flavanona*

a) la incorporación del grupo metilo (-CH₃) en la posición 6 y del grupo nitro (-NO₂) (**24**) y de dos átomos de bromo (-Br) en la posición 3 (**25**) del núcleo flavanona aumentan capacidad de desplazar la unión específica de [³H] DAMGO al receptor μ-opioide (**23** vs. **24** y **25**).

b) la incorporación de dos átomos de bromo (-Br) incrementó significativamente la actividad de la flavanona (**23** vs. **25**).

Este es el primer reporte de afinidad *in vitro* de derivados de chalcona al receptor μ-opioide. Se observó que ciertas modificaciones estructurales como la suma de sustituciones en el anillo A con grupos metilo (-CH₃), cloro (-Cl) y nitro (-NO₂) mejoran la afinidad, y que la estructura ciclada no parecería ser determinante para aumentar la actividad (chalcona vs. flavanona). Por lo tanto, el núcleo chalcona es una estructura promisorio para el desarrollo de compuestos capaces de unirse a dicho receptor. Futuras síntesis con combinaciones de las sustituciones mencionadas y análisis de modelado molecular son necesarias para completar el estudio de estos compuestos para la búsqueda de estructuras más afines al receptor μ-opioide.

De los resultados obtenidos, cabe destacar que la 3,3-dibromoflavanona (**25**) representa el derivado sintético con mayor actividad, con valores de K_i submicromolares, siendo el flavonoide agonista con mayor afinidad por el receptor μ-opioide descrito hasta el momento. El xantomicrol posee un valor de K_i similar a la flavanona **25**, pero estudios realizados en ratones en el modelo animal de latigazo de la cola, sugieren que este flavonoide actuaría como un antagonista de los receptores opioides (Ruiu y col., 2015). Por otro lado, la casticina (K_i: 1.1 ± 0.2 μM), mediante ensayos *in vitro* de unión de [³⁵S]GTPγS,

demonstró no ser agonista de este receptor pero si del receptor δ opioide a altas concentraciones (Webster y col., 2011).

El ensayo de *docking* determinó las posibles orientaciones e interacciones de agliconas naturales y la flavanona **25** con el receptor. Como resultado preliminar se puede concluir que todos ellos presentan una orientación similar y que la (2R)-3,3-dibromoflavanona pareciera ser la conformación más activa.

4.3.4 Conclusiones

- 1) Del conjunto total de chalconas obtenidas, el mayor número de ellas presentaron afinidad por el receptor μ -opioide (9 compuestos con $K_i < 30 \mu\text{M}$), luego, una menor cantidad presentó actividad por el su-BDZ (7 chalconas con $K_i < 30 \mu\text{M}$) y por último por el receptor 5-HT_{1A} (2 chalconas con $K_i < 30 \mu\text{M}$).
- 2) Las actividades más altas se obtuvieron para el su-BDZ. Siendo los compuestos más activos: 3-nitrochalcona (**17**), chalcona (**1**), 4'-aminochalcona (**14**), 4'-aminochalcona (**9**) y 4'-metilchalcona (**15**) presentando valores de $K_i < 7 \mu\text{M}$.
- 3) La 3,3-dibromoflavanona (**25**), 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) y 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (**6**) fueron los compuestos con mayor actividad para el receptor μ -opioide con valores de $K_i < 20 \mu\text{M}$.
- 4) El número de compuestos y los valores más bajos de afinidad se obtuvieron para el receptor 5-HT_{1A}. La chalcona (**1**) y la 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**5**) presentaron valores de $K_i \leq 20 \mu\text{M}$.
- 5) La chalcona (**1**) presentó afinidad por los tres receptores.
- 6) La 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**5**) mostró afinidad por los receptores 5-HT_{1A} y μ -opioide

Parte IV

Ensayos *in vivo*

4.4 Ensayos Farmacológicos

4.4.1 Introducción

En la siguiente sección se describe un muestreo (“screening”) de la evaluación *in vivo* de los compuestos más activos de la serie para la muAChE, el su-BDZ y los receptores 5-HT_{1A} y μ -opioide en modelos animales de cognición, ansiedad, depresión y nocicepción, respectivamente.

El animal de laboratorio es una de las herramientas fundamentales en las ciencias biomédicas. Son utilizados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Se puede determinar la validez de un modelo animal en la medida en que: (1) recree los procesos etiológicos que causan una enfermedad en los seres humanos (validez de constructo); (2) contenga las características anatómicas, bioquímicas, neuropatológicas o de comportamiento de los seres humanos (validez aparente); (3) que responda a los mismos tratamientos que resulten eficaces en seres humanos (validez predictiva) (Nestler y Hyman, 2010). También, es importante que el modelo sea reproducible entre investigadores.

A continuación, se realiza una descripción breve de los modelos animales elegidos que fundamenta la elección de los mismos.

4.4.1.1 Modelo experimental de EA

Los modelos animales utilizados para la EA se pueden dividir en tres grandes categorías: naturales, genéticos y de intervención. En los primeros se utilizan animales como perros, gatos, cabras, ovejas y algunos primates no humanos que desarrollan espontáneamente algunos rasgos neuropatológicos relacionados con la EA. En los modelos genéticos, diferentes líneas de ratones transgénicos reproducen características de esta patología basándose en mutaciones de la PPA, PS, proteína Tau y ApoE, que facilitan la comprensión de los mecanismos moleculares asociados con la síntesis, agregación, depósito y eliminación del péptido A β . Por último, la introducción de sustancias químicas o la inducción de lesiones en regiones específicas del cerebro puede reproducir algunos de los rasgos característicos de la EA. Estos modelos implican la introducción del péptido A β en el cerebro de roedores o mono Rhesus y la generación de amnesia o inflamación por la administración de escopolamina o endotoxinas, respectivamente. A pesar de que estos modelos inducen algunos de los signos clínicos de la EA, ninguno de los mencionados presenta validez predictiva ni de constructo. Por lo que, hasta el momento, no existe un buen

modelo animal de EA y solo es posible estudiar algunos de los signos característicos (Laurijssens y col., 2013; Manzano y col., 2009).

En esta Tesis se trabajó con un modelo de intervención que utiliza a la escopolamina, un antagonista muscarínico que perjudica los procesos de aprendizaje y de adquisición de la memoria a corto plazo, en los que está involucrado el sistema colinérgico. Existen claras evidencias de que roedores y humanos administrados con escopolamina, al igual que los pacientes con EA, presentan menos capacidad de recordar eventos recientes, por lo que la administración de escopolamina es el modelo más utilizado de la alteración de la memoria de la EA y se ha utilizado como un modelo para detectar fármacos anti-amnésicos (Heo y col., 2004; Mc Donald y Bruce, 1997).

Para evaluar el efecto de la escopolamina sobre la memoria de trabajo se utilizó el laberinto en Y de alternancias espontáneas, y también se usó donepecilo, un inhibidor de AChE utilizado en la clínica, como control positivo. Muchas regiones del cerebro, incluyendo el hipocampo, el septo, prosencéfalo basal, y la corteza prefrontal, están involucrados en este ensayo. A lo largo de múltiples entradas a los brazos, el roedor mostrará la tendencia de entrar al brazo menos explorado recientemente. El número de entradas a los brazos y el número de trías se registran con el fin de calcular el porcentaje de alternancia. Si el número de alternancias disminuye con respecto al control, se considera que el roedor presenta déficits cognitivos (Stanford Neurosciences Institute, 2016).

4.4.1.2 Modelo experimental de ansiedad

En esta Tesis se utilizó el ensayo de laberinto en cruz elevado, ya que es uno de los modelos animales más utilizados para evaluar ansiedad. Está basado en el estudio de conductas no condicionadas o espontáneas, dado que emplea estímulos “naturales” presentando “validez de constructo”. El aparato consiste en una cruz de dos ramas abiertas y dos ramas cerradas, elevado a 50 cm del piso. Las ramas abiertas combinan el miedo que experimentan los animales ante un espacio novedoso y abierto junto con el hecho de que se encuentran situadas a una considerable altura. Se ha determinado que el estímulo ansiogénico predominante es el temor que poseen los roedores a los espacios abiertos. Por el contrario, los brazos cerrados presentan paredes altas que ofrecen protección ante posibles depredadores. Los fármacos ansiolíticos aumentan el número de entradas y el tiempo de permanencia de los roedores en las ramas abiertas, mientras que los ansiogénicos disminuyen estos parámetros. Además, las entradas totales (ramas abiertas más cerradas del laberinto) se consideran un índice de la actividad locomotora general (Dawson y

Tricklebank, 1995). Como los estímulos utilizados pueden inducir ansiedad en humanos, se ha hipotetizado que el temor al espacio abierto novedoso y a la altura, podrían ser similares a la agorafobia y al vértigo, respectivamente (Dawson y Tricklebank, 1995).

Este ensayo presenta una serie de ventajas: es rápido, simple y no necesita un equipamiento sofisticado. Además, está basado en la conducta espontánea del animal, evitando la necesidad de entrenamiento, privación de agua y/o comida y el uso de estimulación nociva como por ejemplo el electro shock. Posee la capacidad de identificar efectos ansiolíticos agudos de fármacos benzodiazepínicos y, además, bajo las mismas condiciones, es capaz de identificar tanto efectos ansiolíticos como ansiogénicos de los fármacos. En nuestros estudios se utilizó diazepam (una BDZ clásica) como control positivo en este ensayo. Una desventaja es que no presenta alta sensibilidad para detectar fármacos serotoninérgicos, como los agonistas parciales del receptor 5-HT_{1A} o de antagonistas del receptor 5-HT₃ (Cárdenas y Navarro, 2002; Pellow y col., 1985).

4.4.1.3 Modelo experimental de depresión

El ensayo de suspensión por la cola se utiliza para la detección primaria de drogas símil-antidepresivas y para predecir la eficacia de tratamientos antidepresivos. El principio subyacente de medición es la falta de un comportamiento activo de afrontamiento a la situación estresante de ser colgados de la cola. El tiempo de inmovilidad observado en este ensayo refleja un estado de desesperanza o la falta de adaptación al estrés. Originalmente, se la llamó conducta de desesperanza aprendida en base a la suposición de que los animales “pierden la esperanza de escapar” y desarrollan la postura de inmovilidad que representa la renuncia a realizar comportamientos persistentes de escape. Posteriormente, se sugirió que esta respuesta es una estrategia de afrontamiento al estrés que ha sido conservada a lo largo de la evolución y se ha hipotetizado que presenta similitudes con las observaciones clínicas de los pacientes deprimidos como hipoactividad y disminución de la motivación. Por otro lado, se ha determinado que la inmovilidad no se debe al desarrollo de hipoactividad generalizada, ya que los animales pueden adoptar esta postura de forma rápida y, además, ciertos fármacos, como es el caso de muchas clases de antidepresivos, contrarrestan esta respuesta (Cryan y col., 2005).

Este ensayo tiene como ventajas el hecho de ser un modelo animal de bajo costo, rápido y de alto valor predictivo para evaluar el potencial de una droga antidepresiva en humanos, por lo que representa una de las herramientas más utilizadas para la detección preclínica de potenciales agentes antidepresivos (Cryan y col., 2005; Sui y col., 2012).

Además, existe el modelo animal de nado forzado para el descubrimiento de compuestos símil-antidepresivos. En este ensayo se somete a los animales a una situación estresante de inmersión en un recipiente con agua a temperatura templada y, también, se mide el tiempo de inmovilidad, que es el tiempo en el cual el animal apenas realiza movimientos mínimos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua. Ambos modelos son ampliamente utilizados para determinar efectos de fármacos antidepresivos y los dos se sustentan en la conducta de desesperanza aprendida o la falta de adaptación al estrés. Las diferencias más importantes entre estos dos ensayos son: la respuesta a los fármacos, la sensibilidad farmacológica y que el ensayo de suspensión por la cola no genera hipotermia. Tradicionalmente, el ensayo de nado forzado no ha sido un modelo sensible para la detección de ISRS en ratones, mientras que se ha reportado actividad para este tipo de antidepresivos en el ensayo de suspensión por la cola. Además, el ensayo de suspensión por la cola es sensible a dosis más bajas de fármacos antidepresivos y proporciona una clara relación dosis-efecto (por ejemplo, la imipramina, la droga de referencia utilizada en nuestros estudios, presenta una curva dosis respuesta en forma de U en el ensayo de nado forzado mientras que presenta una respuesta lineal en el ensayo de suspensión por la cola). La variabilidad en las respuestas a ciertos antidepresivos indica que estos ensayos son potencialmente diferentes, tanto los sustratos como las vías neuroquímicas que median el rendimiento en cada uno (Cryan y col., 2005; Machado y col., 2009; Steru y col., 1985). Teniendo en cuenta las ventajas mencionadas para el ensayo de suspensión por la cola, se utilizó este modelo para evaluar la capacidad de las chalconas activas en el receptor 5HT_{1A} de ejercer efectos símil-antidepresivos.

4.4.1.4 Modelos experimentales de nocicepción

El dolor es una experiencia subjetiva de gran complejidad en la que actúan interrelacionalmente numerosos factores (biológicos, psicológicos y sociales), que hacen del dolor uno de los fenómenos médicos más complejos de estudiar. En la práctica clínica el dolor es evaluado y cuantificado por la expresión verbal de los pacientes utilizando escalas de medición que engloban e intentan sistematizar aspectos verbales, conductuales y fisiológicos del dolor. Estos métodos son imposibles de llevar a cabo en roedores, por lo que la evaluación preclínica de dolor es un desafío para este campo de estudio. Como alternativa se utilizan modelos animales de nocicepción.

La nocicepción es el proceso neuronal inconsciente mediante el que se codifican y procesan los estímulos nocivos. Esto comprende la transducción, transmisión y modulación

de la sensación dolorosa y la generación de respuestas reflejas para proteger el organismo. Se diferencia del dolor, en que este es una experiencia consciente que requiere de un procesamiento cortical y la interpretación aversiva de la información nociceptiva. Aunque la nocicepción y el dolor están estrechamente vinculados, existen evidencias clínicas que demuestran que pueden dissociarse uno del otro. Por lo tanto, lo que se conoce comúnmente como “ensayos de dolor” en roedores son ensayos de nocicepción (Barrot, 2012).

Para poder obtener un perfil completo de las propiedades antinociceptivas de un nuevo fármaco es necesario realizar más de un ensayo con estímulos de distinto tipo, intensidad y duración, debido a que dicha variedad reconoce diferentes tipos de dolor y revela la capacidad de acción del fármaco antinociceptivo en estudio (Tjølsen y col., 1992; Vidyalakshmi y col., 2010). Los estímulos pueden ser eléctricos, térmicos, mecánicos o químicos; de corta duración o de larga duración, representando el dolor fásico o tónico, respectivamente. Los de corta duración, implican un corto período de estimulación y la medición de umbrales de nocicepción. Generalmente se estimula a nivel somático y no a nivel visceral y se los puede clasificar por la naturaleza del estímulo. Mientras que los de larga duración implican la administración intradérmica o intraperitoneal de agentes químicos irritantes que modificarán su potencia a lo largo del tiempo. En este caso se realiza una medición cuantitativa del comportamiento observado (Le Bars y col., 2001). También, existen distintos modelos animales de dolor crónico, relacionados con el dolor neuropático, los cuales se basan en generar lesiones de los nervios periféricos (Barrot, 2012; Wang y Wang, 2003).

En esta Tesis se utilizaron los ensayos de la plancha caliente y contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético, ya que de esta manera se aplican dos estímulos de distinto tipo, intensidad y duración, para obtener el perfil de acción de los compuestos. Como control positivo se utilizó morfina. Es conocido que los opiáceos producen antinocicepción a nivel central, ya que agonistas opioides ejercen antinocicepción en los ensayos de la plancha caliente y del latigazo de la cola luego de su administración intracerebroventricular o intratecal (Zhao y col., 2003). También, la activación de los receptores μ -opioide en las regiones espinales y supraespinales inhiben el dolor agudo e inflamatorio. Además, los agonistas de los receptores μ -opioide afectan las respuestas nociceptivas por estímulos químicos a nivel visceral cuando se los administra periféricamente o centralmente (Al-Khrasani y col., 2012).

El ácido acético es un agente irritante que se utiliza como un estímulo químico de baja intensidad, que permite identificar compuestos con leve actividad antinociceptiva,

incluyendo a los analgésicos de acción periférica (Barrot, 2012). En el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético la administración i.p. del ácido genera un comportamiento estereotipado que se caracteriza por contorsiones abdominales (movimiento del cuerpo en su conjunto con torsión de los músculos dorsales y estiramiento de las patas traseras, acompañado de una reducción de la actividad locomotora). A este comportamiento se lo considera un reflejo que evidencia dolor visceral (Le Bars y col., 2001). Es un método muy sensible, ya que empleando un mínimo estímulo nocivo puede detectar incluso analgésicos débiles que actúan a nivel periférico. A nivel celular, los protones despolarizan las neuronas sensoriales mediante la activación directa de canales catiónicos no selectivos que se encuentran localizados a nivel cutáneo, visceral y en los nociceptores C. Además, el ácido acético provoca un aumento de PG en el líquido peritoneal, así como la liberación de bradiquinina y citocinas por los macrófagos peritoneales residentes y mastocitos, induciendo permeabilidad capilar y generando dolor inflamatorio (de Souza y col., 2009; Jürgensen y col., 2005). Esta prueba tiene poca especificidad, ya que la respuesta observada, contorsión abdominal, puede ser inhibida por relajantes musculares y otros fármacos, llevando a una incorrecta interpretación de los resultados (Jürgensen y col., 2005). Esto puede evitarse complementando este ensayo con otros modelos de nocicepción y con pruebas motoras, como el ensayo de la malla invertida o el Rotarod.

Por otro lado, el ensayo de la plancha caliente involucra un estímulo térmico de corta duración. Se lo considera un ensayo selectivo ya que el calor estimula receptores cutáneos específicos como las fibras periféricas termo sensibles (Le Bars y col., 2001). En este ensayo se determina el umbral de dolor registrando la latencia de la respuesta del animal al estímulo térmico. Las patas de los roedores son sensibles al calor a temperaturas que no dañan la piel. Como punto final se puede utilizar la reacción de lamida de las patas traseras, pero debido a que algunos fármacos pueden inducir ésta reacción, para minimizar la detección de actividades no analgésicas, además, se mide el reflejo de retirada o golpeteo en forma de abanico de sus patas traseras o la reacción de salto (Carter, 1991). Las reacciones observadas son consideradas respuestas supraespinales integradas, por lo que este método se utiliza para evaluar fármacos con acción antinociceptiva a nivel central, pero no a nivel periférico. Por lo tanto, los compuestos que presentan un efecto antinociceptivo significativo en este ensayo son considerados analgésicos potentes (Bannon y Malmberg, 2007; Vidyalakshmi y col., 2010).

4.4.2 Resultados

4.4.2.1 Efecto de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) y 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**) en el ensayo de amnesia inducida por escopolamina en la prueba del laberinto en Y de alternancia espontánea

Las chalconas **9** y **11** son candidatos promisorios para la EA ya que inhiben a la muAChE (CI₅₀: 10.2±1.7 μM y 6.9 ± 1.3 μM, respectivamente) y a la hMAO B (CI₅₀: 2.4 ± 0.5 μM y 0.2 ± 0.02 μM, respectivamente). Además, el compuesto **11** inhibe la agregación del péptido Aβ (41.4 ± 1.7 % de inhibición de la agregación Aβ₁₋₄₂ a 10 μM).

Primero, se evaluó el potencial efecto de estos compuestos sobre la memoria de trabajo en la prueba del laberinto en Y de alternancia espontánea. Luego, se evaluó la posibilidad de que estos derivados puedan revertir el deterioro cognitivo ocasionado por la administración de escopolamina, en esta misma prueba (Mugwagwa y col., 2015).

La Figura 31 muestra el efecto de 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) y 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**), solos o bajo el efecto de la amnesia inducida por la escopolamina, en la prueba del laberinto en Y de alternancia espontánea. Se administró a los ratones con los compuestos **9** y **11** (10 mg/kg, i.p.), con donepecilo (5 mg/kg, a modo de control positivo) o salina y luego se generó el deterioro de la memoria inyectando escopolamina (1 mg/kg, i.p.). Los ratones control (vehículo/salina) presentaron un índice de alternancias espontáneas de 65 ± 2 %. El tratamiento con escopolamina disminuyó significativamente este índice (53.5 ± 1.6) %, respecto a los ratones control, evidenciándose el deterioro de la memoria inducida por este fármaco. El pretratamiento de los ratones con las chalconas **9** y **11** no presentó cambios significativos con respecto al grupo control vehículo en el índice de alternancias espontáneas, por lo que se puede inferir que estas chalconas no afectan la memoria de trabajo. Por otro lado, el pretratamiento de los ratones con estos flavonoides no logró revertir la disminución del índice de alternancias generada por la escopolamina (Figura 31 A).

Para evaluar si el deterioro ocasionado por la dosis de escopolamina utilizada es plausible de ser revertida por un pretratamiento, en nuestras condiciones experimentales, se administró donepecilo, un inhibidor de AChE utilizado en la clínica, a modo de control positivo (Sugimoto y col., 2002). El pretratamiento de los ratones con este inhibidor no presentó cambios significativos con respecto al grupo control vehículo en el índice de alternancias espontáneas, pero sí pudo revertir el efecto perjudicial de la escopolamina (Figura 31 B).

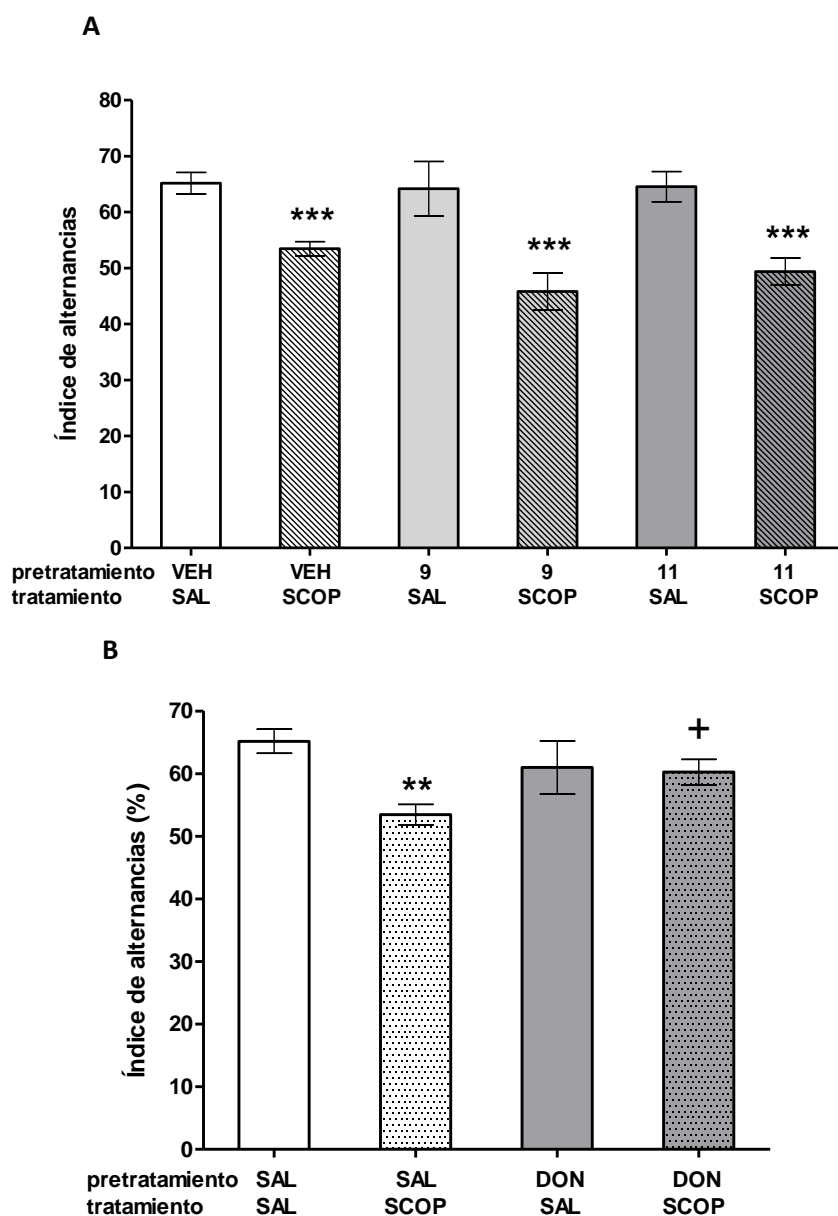


Figura 31. Efecto de **A**) 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**), 4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**) y **B**) donepecilo (DON) en la prueba del laberinto en Y de alternancia espontánea, solos o en combinación con escopolamina (SCOP). Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del índice de alternancia registrados en sesiones de 8 min, 45 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH) o de los compuestos **9** (10 mg/kg), **11** (10 mg/kg) y DON (5 mg/kg); y 30 min después de ser inyectados con escopolamina (SCOP) (1 mg/kg) o salina (SAL). *** p <0.001, ** p <0.01 respecto a los grupos controles (VEH/SAL o SAL/SAL); ANOVA seguido por prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls (n = 9-15 ratones/grupo). + p <0.05 respecto al grupo SAL/SCOP; ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Bonferroni (n = 5-10 ratones/grupo).

4.4.2.2 Efecto de la chalcona (1), la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (9), la 4'-aminochalcona (14), la 4'-metilchalcona (15) y la 3-nitrochalcona en el ensayo del laberinto en cruz elevado

Para evaluar si los compuestos que mostraron mayor afinidad por el su-BZD en el receptor GABA_A presentan acciones *in vivo*, se realizó el ensayo de laberinto en cruz elevado, ya que posee un fuerte valor predictivo para el descubrimiento de fármacos ansiolíticos (Komada y col., 2008).

Se realizó este ensayo con los compuestos que presentaron una K_i menor a 7 μM en el ensayo de desplazamiento de la unión específica de [³H] FNZ al su-BZD presente en homogenatos de corteza cerebral de rata. Estos compuestos fueron: chalcona (**1**) (K_i : $2.8 \pm 1.0 \mu\text{M}$), 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) (K_i : $6.1 \pm 1.5 \mu\text{M}$), 4'-aminochalcona (**14**) (K_i : $6.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$), 4'-metilchalcona (**15**) (K_i : $6.3 \pm 0.8 \mu\text{M}$) y 3-nitrochalcona (**17**) (K_i : $0.2 \pm 0.05 \mu\text{M}$). Para derivados de flavonoides con valores de K_i en este rango de actividad (en μM), y, basados en nuestra amplia experiencia (ver reviews Medina y col. 1997; Wasowski y Marder, 2012) si el compuesto presentara actividad *in vivo* (en ratones), esta actividad se evidencia en un rango de dosis entre 1 mg/kg y 30 mg/kg. Para este muestreo se eligió una dosis de 10 mg/kg, i.p., y los ratones fueron inyectados 30 min antes de realizar el ensayo.

Como se puede observar en la Figura 32, el comportamiento de los ratones administrados con los compuestos **1**, **14** y **15** a 10 mg/kg no mostró diferencias significativas en los parámetros medidos en este laberinto (porcentaje del número de entradas a las ramas abiertas, porcentaje del tiempo pasado en las ramas abiertas y el número total de entradas) respecto de los ratones control (inyectados con vehículo). La administración de la chalcona **17** aumentó significativamente el número total de entradas a las ramas del laberinto, sin modificar la proporción de entradas a los brazos abiertos respecto al grupo control vehículo. Por el contrario, el compuesto **9** incrementó significativamente el porcentaje del número de entradas a las ramas abiertas y el porcentaje del tiempo pasado en las ramas abiertas, sin modificar el número total de entradas a las ramas del laberinto con respecto al control. El compuesto de referencia, diazepam (1 mg/kg) incrementó significativamente los tres parámetros evaluados en este ensayo con respecto al vehículo (Figura 32, inset). Por lo tanto, el tratamiento con la chalcona **9** (10 mg/kg) ejerció efectos ansiolíticos.

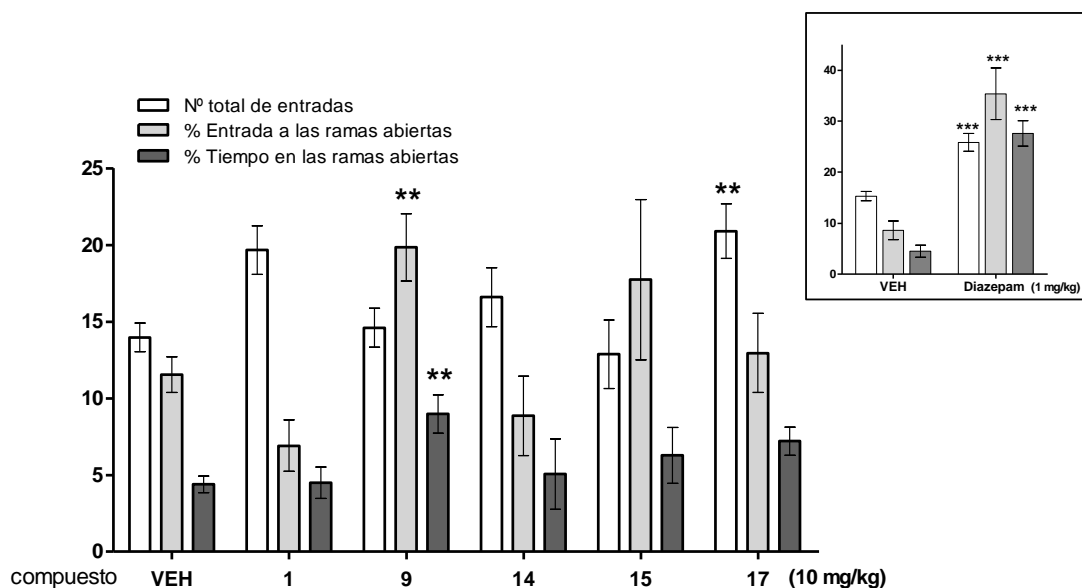


Figura 32. Efecto de la administración i.p. de chalcona (**1**), 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**), 4'-aminochalcona (**14**), 4'-metilchalcona (**15**) y 3-nitrochalcona (**17**) en el ensayo del laberinto en cruz elevado. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del porcentaje del número de entradas a las ramas abiertas, porcentaje del tiempo pasado en las ramas abiertas y el número total de entradas; registrados en sesiones de 5 min, 30 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH) o de los compuestos **1**, **9**, **14**, **15** y **17** a 10 mg/kg. ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo control VEH. Prueba de comparación múltiple de Dunnett luego de ANOVA ($n = 8-16$ ratones/grupo). Inset: *** $p < 0.001$ diazepam (1 mg/kg) significativamente diferente del VEH; prueba t de Student no apareada ($n = 6-7$ ratones/grupo).

4.4.2.3 Efecto de la chalcona (**1**) y de la 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**5**) en el ensayo de suspensión por la cola en ratones

Para determinar si los compuestos que presentaron mayor afinidad *in vitro* por el receptor 5-HT_{1A}, con valores de K_i menores a 20 μ M, poseen actividad símil-antidepresiva *in vivo*, se realizó el ensayo de suspensión por la cola en ratones.

Los compuestos seleccionados para realizar este ensayo fueron el núcleo chalcona (**1**) (K_i: $20.8 \pm 1.5 \mu$ M) y la 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**5**) (K_i: $13.3 \pm 0.3 \mu$ M). Estos compuestos fueron evaluados a una dosis de 10 mg/kg i.p., y los ratones fueron inyectados 30 min antes de realizar la medición (Figura 33). Los resultados muestran que la administración i.p. de 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**5**) a 10 mg/kg no disminuyó significativamente el tiempo de inmovilidad de los ratones con respecto al grupo control vehículo. Mientras que los ratones administrados tanto con la chalcona (**1**) (10 mg/kg, i.p.) como con el control positivo utilizado para este ensayo, imipramina (30 mg/kg, i.p.), disminuyeron significativamente el tiempo de inmovilidad de estos ratones respecto al

grupo control vehículo. De modo que el tratamiento con el compuesto **1** presentó efectos símil-antidepresivos a la dosis evaluada.

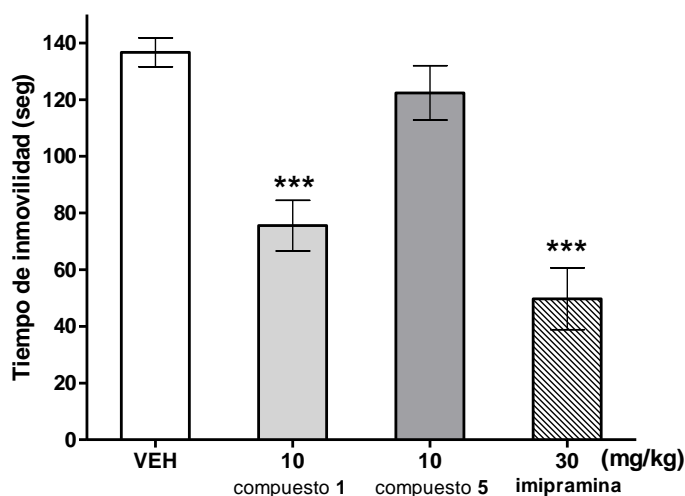


Figura 33. Efecto del núcleo chalcona (**1**), 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**5**) e imipramina en el ensayo de suspensión por la cola. Se registró el tiempo de inmovilidad, 30 minutos después de administración i.p. de vehículo (VEH), de los compuestos **1** y **5** (10 mg/kg) e imipramina (30 mg/kg), durante los últimos 4 min de sesiones de 6 min. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del tiempo de inmovilidad. *** $p < 0.001$ en comparación con el grupo control VEH. Prueba de comparación múltiple de Dunnett luego del ANOVA (n = 8-11 ratones/grupo).

4.4.2.4 Efecto de los compuestos sintetizados en modelos animales de nocicepción

Aquellos compuestos que presentaron actividad por el receptor μ -opioide con una K_i menor de 20 μ M fueron seleccionados para ser evaluados en dos modelos animales de nocicepción, la prueba de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético y el ensayo de la plancha caliente.

Para evaluar el potencial efecto antinociceptivo a nivel periférico/visceral de la 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (**6**) (K_i : $19.4 \pm 3.5 \mu$ M), 5'-metil -2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) (K_i : $13.5 \pm 6.9 \mu$ M) y 3,3-dibromoflavanona (**25**) (K_i : $0.85 \pm 0.2 \mu$ M) estos derivados fueron ensayados en la prueba de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético. Debido a que es un método sensible, se utilizó una dosis de 10 mg/kg. Mientras que para estudiar la acción antinociceptiva a nivel central de las chalconas **6** y **12** se utilizó una dosis 30 mg/kg en el ensayo de la plancha caliente.

Además, debido a la existencia de antecedentes bibliográficos que indican que el núcleo chalcona *per se* presenta actividad en el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético y que la introducción del grupo nitro (-NO₂) en el anillo B y de bromo (-Br) en el anillo A del núcleo chalcona (Corrêa y col., 2001; de Campos-Buzzi y

col., 2007, 2006) mejora el efecto antinociceptivo, se decidió, también, estudiar el efecto de los compuestos **1**, **8**, **10** y **17** a 10 mg/kg i.p. en este mismo ensayo.

4.4.2.4.1 Ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético

La Figura 34 muestra los resultados obtenidos para los compuestos **1**, **6**, **8**, **10**, **12**, **17** y **25** luego de 30 min de su administración i.p. en los ratones, a 10 mg/kg, en el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético. Se observó una disminución significativa del número de contorsiones abdominales de los ratones, respecto al grupo control vehículo, para los compuestos **6**, **12**, **17** y **25**. Los ratones administrados i.p. con el compuesto de referencia, morfina (6 mg/kg), no presentaron ninguna contorsión abdominal (dato no mostrado).

Entonces, las chalconas **6**, **12**, **17** y **25** presentaron efectos antinociceptivos a nivel periférico/ visceral a la dosis evaluada.

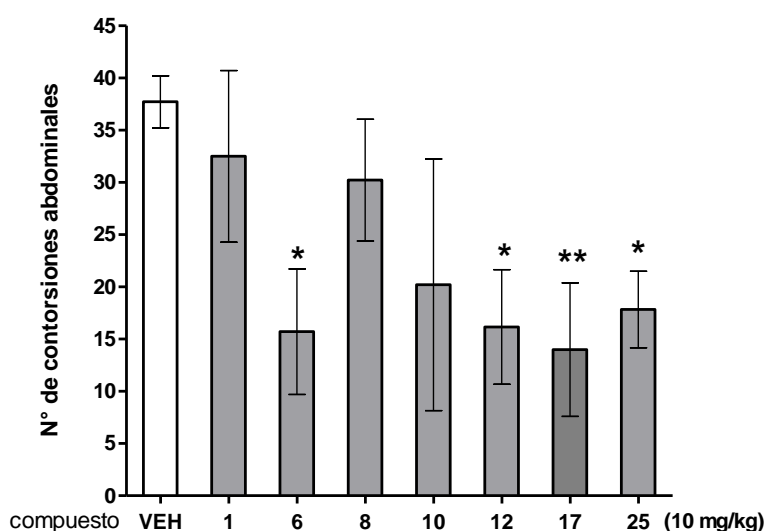


Figura 34. Efecto de chalcona (**1**), 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (**6**), 5'-bromo-2'-hidroxichalcona (**8**), 3',5'-dibromo-2'-hidroxichalcona (**10**), 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**), 3-nitrochalcona (**17**) y 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M. del número de contorsiones abdominales durante los últimos 15 min de sesiones de 20 min. La prueba se realizó 30 min después de la administración i.p. de los compuestos a 10 mg/kg o vehículo (VEH). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ diferencia significativa con respecto al control VEH, prueba de comparación múltiple de Dunnett luego de ANOVA (n= 6-29 ratones/grupo).

4.4.2.4.2 Ensayo de la plancha caliente

El efecto de 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (**6**) y 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) en el ensayo de la plancha caliente se muestra en la Figura 35. La administración de la chalcona **6** a 30 mg/kg i.p. no aumentó significativamente el tiempo de latencia en

comparación al grupo control. Mientras que el compuesto **12** (30 mg/kg, i.p.) incrementó significativamente el tiempo de reacción de los ratones ante el estímulo nociceptivo térmico respecto a los ratones inyectados con vehículo. La administración del compuesto de referencia, morfina (6 mg/kg, i.p.) aumentó significativamente el tiempo de latencia en la plancha caliente (Figura 35, in set). Por lo tanto, la chalcona **12** mostró un efecto antinociceptivo a nivel central a la dosis evaluada.

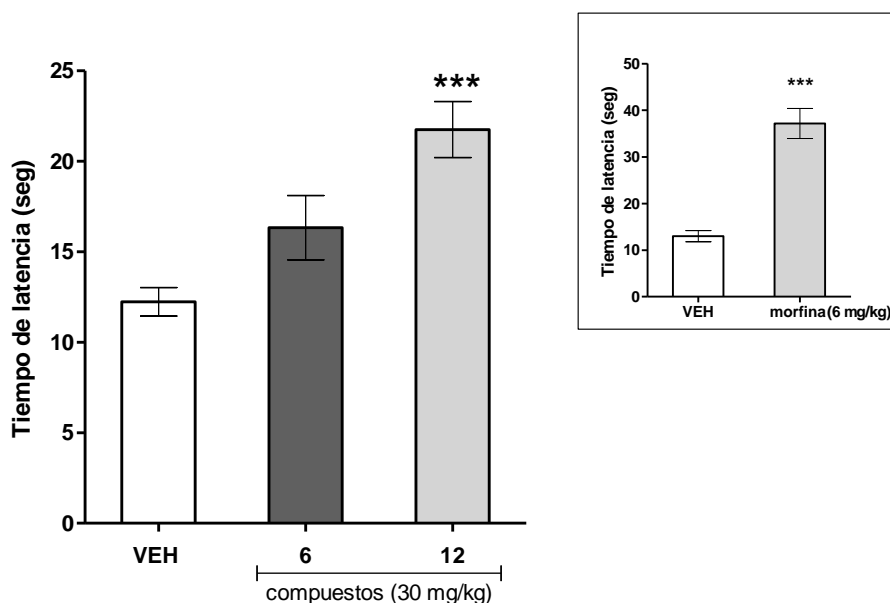


Figura 35. Efecto de 5'-cloro -2'-hidroxichalcona (**6**) y 5'-metil -2'- hidroxil-3'-nitrochalcona (**12**) en el ensayo de la plancha caliente. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M. del tiempo de latencia (seg) en la prueba de la plancha caliente, 30 minutos después de la administración i.p. de vehículo (VEH) o de los compuestos a 30 mg/kg. *** $p < 0.001$ significativamente diferente de VEH; prueba de comparación múltiple de Dunnett luego de ANOVA. Inset: *** $p < 0.05$ morfina (6 mg/kg) significativamente diferente del VEH; prueba t de Student no apareada ($n = 6-14$ ratones/grupo).

4.4.3 Discusión

En este capítulo se determinó si los compuestos más activos de la serie para muAChE, el su-BDZ y los receptores 5-HT_{1A} y μ -opioide presentan actividad *in vivo* en modelos animales.

Debido a que el sistema colinérgico posee un rol importante en la adquisición de la memoria de trabajo en seres humanos y animales, aquellas chalconas capaces de inhibir la actividad de la muAChE *in vitro*, fueron evaluadas, solas o en combinación con escopolamina, en el ensayo de la prueba del laberinto en Y de alternancia espontánea. Las chalconas **9** y **11**, a 10 mg/kg, no produjeron cambios en el índice de alternancia con respecto

al control vehículo, por lo que estas chalconas, *per se*, no afectan la memoria espacial evaluada en este ensayo. Por otro lado, no lograron prevenir la disminución del índice de alternancias generado por la escopolamina, por lo que no pudieron revertir el déficit cognitivo generado por este compuesto.

A pesar de que estas chalconas no revirtieron la alteración de la memoria inducida por la escopolamina, estos derivados no deberían descartarse como futuros compuestos líderes para el tratamiento de la EA. El diseño de drogas para esta enfermedad se basa en drogas con acción en múltiples blancos biológicos, y el compuesto **11**, aparte de inhibir a la AChE, es un potencial inhibidor de la MAO B y también es capaz de inhibir la agregación A β . Por lo tanto, sería necesario llevar a cabo otros ensayos *in vivo* que involucren otros blancos en los que este compuesto presentó actividad como, por ejemplo, en ensayos que involucren la introducción del péptido A β y/o en ratones transgénicos que estudian la síntesis, agregación, depósito y eliminación del péptido A β , para confirmar o descartar la acción *in vivo* de este compuesto.

El ensayo del laberinto en cruz elevado se utilizó para evaluar potenciales efectos ansiolíticos *in vivo* de aquellos derivados sintéticos con actividad sobre el su-BDZ del receptor GABA_A. De los compuestos que presentaron mayor afinidad por el su-BDZ, solo la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) aumentó el porcentaje de entradas a las ramas abiertas y el porcentaje del tiempo pasado en las ramas abiertas laberinto en cruz elevado, sin modificar el número total de entradas, por lo que presentó efectos ansiolíticos. La 3-nitrochalcona (**17**) aumentó el número de entradas totales, al igual que lo hace el fármaco de referencia diazepam, por lo que su efecto hiperlocomotor podría asociarse a su actividad sobre GABA_A. El resto de las chalconas evaluadas no modificaron los parámetros medidos en este ensayo en comparación al grupo control vehículo.

Por otro lado, los compuestos que presentaron mayor afinidad por el receptor 5-HT_{1A} *in vitro* fueron evaluados en el ensayo de suspensión por la cola en ratones. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona (**5**) no posee efecto símil-antidepresivo a la dosis ensayada, mientras que el núcleo chalcona (**1**), a 10 mg/kg, aumentó el tiempo en que los ratones realizan movimientos de escape, por lo que presenta actividad símil-antidepresiva. A pesar de que varios autores han utilizado la estructura chalcona para sintetizar nuevos derivados con actividad símil-antidepresiva, en ningún trabajo se había estudiado el efecto *per se* de este núcleo (Guan y col., 2013; Sui y col., 2012). Entre estos derivados sintéticos se encuentran la 2,6-dicloro-2',4'-dihidroxichalcona, 3-bromo-2',4'-dihidroxichalcona y 2-bromo-2',4',6'-trihidroxichalcona, que presentaron

efectos símil-antidepresivos en los ensayos de suspensión por la cola y de nado forzado, similares a los del control fluoxetina, pero no se ha descrito su mecanismo de acción (Guan y col., 2013; Sui y col., 2012).

Varias líneas de evidencias preclínicas sugieren que la actividad de los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos son importantes para el efecto antidepresivo. Modelos animales de depresión han demostrado que la activación postsináptica de receptores 5-HT_{1A} produce cambios similares al de los antidepresivos convencionales (Blier y Ward, 2003). El agonista de los receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, demostró actividad símil-antidepresiva en el ensayo de suspensión por la cola, mientras que los agonistas parciales buspirona y gepirona no lo hicieron (Olivier y col., 1999; Porsolt y col., 1991). Teniendo en cuenta estos resultados, se podría pensar que la chalcona **5** es un agonista parcial de los receptores 5-HT_{1A} por lo que sería necesario realizar más estudios para poder determinar el tipo de unión al receptor.

Se ha reportado que los agonistas del receptor 5-HT_{1A}, preferentemente de los receptores postsinápticos, pueden ser efectivos en los trastornos de ansiedad (Celada y col., 2013). Aunque el ensayo de laberinto en cruz elevado es un método sensible para la detección de drogas ansiolíticas, no es efectivo para determinar efectos ansiolíticos de agonistas del receptor 5-HT_{1A}. Por lo tanto, sería necesario llevar a cabo otros ensayos para evaluar si los compuestos **1** y **5** tienen la capacidad de ejercer efectos ansiolíticos a través del receptor 5-HT_{1A}, como por ejemplo el ensayo de luz oscuridad o el de miedo/defensa (Arrant y col., 2013; Cárdenas y Navarro, 2002).

Por último, los compuestos que presentaron mayor afinidad por el receptor μ -opioide *in vitro* fueron evaluados en dos modelos animales agudos de nocicepción, con distinto tipo, intensidad y duración de estímulo: el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético y el de la plancha caliente.

Varios trabajos postulan a la estructura chalcona como un líder potencial para el desarrollo de drogas antiinflamatorias. Algunos derivados del núcleo chalcona demostraron ser capaces de inhibir las vías más importantes de la pro inflamación: la síntesis de ON y PG, que constituyen los blancos más utilizados en el desarrollo de drogas antiinflamatorias y antinociceptivas (Batovska y Todorova, 2010; Heidari y col., 2009b; Kim y col., 2004; Madan y col., 2000; Nowakowska, 2007). Chalconas sintetizadas con diferentes sustituciones en ambos anillos A y B (Cechinel-Filhol y col., 1996; Corrêa y col., 2008, 2001; de Campos-Buzzi y col., 2007, 2006) presentaron efectos antinociceptivos a nivel periférico *in vivo*, incluso, algunos derivados fueron más activos que los fármacos antiinflamatorios de referencia. Es por eso que, los compuestos sintetizados en este trabajo

que presentan estructuras similares a chalconas que han sido reportadas con acción antinociceptiva periférica/visceral, también fueron evaluados en el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético. De los compuestos evaluados, los derivados **6**, **12**, **17** y **25**, a 10 mg/kg, disminuyeron significativamente el número de contorsiones abdominales respecto a los ratones control vehículo. Estos resultados indican que estos compuestos presentan actividad antinociceptiva a nivel periférico/visceral y se considera que presentan una acción antinociceptiva débil.

Aunque Corrêa y col. (2001) han descrito que la chalcona (**1**) posee actividad en el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético, nosotros no hemos observado este efecto en la dosis evaluada. Otras chalconas sintetizadas por este grupo, sustituidas en las posiciones 4' o 3' y 4' con átomos de cloro en el anillo A, resultaron ser 14 veces más activas que fármacos estándar, como el ácido acetilsalicílico y paracetamol, y aproximadamente 4 veces más potentes que el diclofenac. La evaluación del efecto de la 3',4'-diclorochalcona en roedores en el ensayo de la formalina sólo mostró efectos antinociceptivos en la segunda fase del ensayo, lo cual indica que esta chalcona actúa a nivel periférico/antiinflamatorio pero no a nivel central (Corrêa y col., 2008, 2001). Este trabajo, junto con nuestros resultados obtenidos para la 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (**6**) demuestran la importancia de la sustitución con grupos cloro en el anillo A para la obtención de derivados de chalconas con actividad antiinflamatoria/o exclusivamente periférica.

A su vez, de Campos-Buzzi y col. (2006) sintetizaron derivados de 4',6'-dimetoxi-2'-hidroxichalcona con diversas sustituciones en el anillo B y observaron que la incorporación de un grupo nitro en la posición 3 del anillo B incrementa la actividad. Además, sugirieron que la sustitución con bromo en el anillo A podría aumentar la actividad antinociceptiva de estos compuestos (de Campos-Buzzi y col., 2006). Nuestros resultados coinciden en que la incorporación del grupo nitro en la posición 3 del anillo B de la chalcona (**17**) incrementa la actividad antinociceptiva, aunque la incorporación de bromo en la posición 5' (**8**) y en 3' y 5' (**10**) no generó compuestos con actividad.

Por lo tanto, el efecto antinociceptivo producido por las chalconas **6** y **17** en el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético podría explicarse por una supuesta actividad antiinflamatoria.

Por último, en el ensayo de la plancha caliente el compuesto **12** (30 mg/kg) aumentó significativamente el tiempo de latencia de los ratones al ser expuestos a este estímulo térmico. A su vez, resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo indican que la 3,3-dibromoflavanona (**25**) es activa en el ensayo de la plancha caliente a 30 mg/kg. Por lo tanto,

los compuestos **12** y **25** presentan acción antinociceptiva a nivel central y pueden ser considerados compuestos con un efecto antinociceptivo potente.

Por ende, teniendo en cuenta los resultados obtenidos de los ensayos *in vivo* se pudo determinar que algunos de los compuestos más activos de los ensayos de unión a receptores *in vitro* presentaron efectos *in vivo*.

En resumen, la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) reveló efectos ansiolíticos en el ensayo de cruz elevado, el núcleo chalcona (**1**) acciones símil-antidepresivas en el modelo animal de suspensión por la cola y la 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) junto con la 3,3-dibromoflavanona (**25**) presentaron efectos antinociceptivos a nivel periférico y central. Estos compuestos fueron seleccionados para continuar con su estudio farmacológico.

Parte V

Estudio farmacológico del núcleo chalcona (1)

4.5 Estudio farmacológico del núcleo chalcona (1)

4.5.1 Introducción

Como se evidenció en las secciones 4.3 y 4.2.2.2.2 el núcleo chalcona (1) presentó afinidad por el su-BDZ y los receptores 5-HT_{1A} y μ -opioide y actividad inhibitoria sobre la hMAO B, siendo el compuesto de la serie, con la mayor capacidad de actuar en distintos blancos.

Sus potenciales efectos *in vivo* fueron estudiados en la sección 4.4, revelando que presenta actividad símil-antidepresiva, por lo que se decidió continuar con su estudio farmacológico.

Para ello, se realizó el ensayo de suspensión por la cola a distintas dosis y se realizaron pruebas motoras para descartar resultados falsos positivos, que implicarían que la disminución en el tiempo de inmovilidad se deba meramente a efectos psicoestimulantes (Machado y col., 2009).

4.5.2 Resultados

4.5.2.1 Ensayo de suspensión por la cola

Se estudió el efecto de la administración i.p. en ratones del núcleo chalcona (1) a 3, 10 y 30 mg/kg en el ensayo de suspensión por la cola. A 3 mg/kg, no se observaron cambios significativos en el tiempo de inmovilidad respecto al grupo control vehículo. En cambio, a 10 y 30 mg/kg disminuyó significativamente este parámetro con respecto a los ratones administrados con vehículo (Figura 36).

4.5.2.2 Ensayo de actividad locomotora espontánea

La administración i.p. del núcleo chalcona (1) a 10 mg/kg no mostró cambios en el número de cuentas con respecto al grupo control vehículo, por lo que esta dosis no modificó la actividad locomotora de los roedores. Mientras que a 30 mg/kg si aumentó significativamente el número de cuentas con respecto al grupo control (Figura 37).

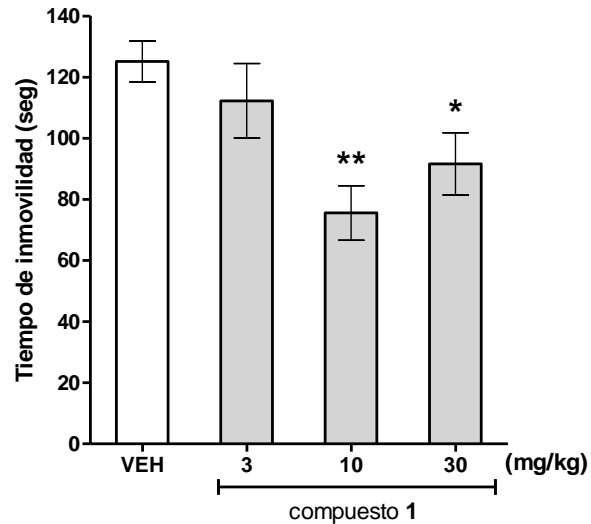


Figura 36. Efecto del núcleo chalcona (**1**) en el ensayo de suspensión por la cola. Se registró el tiempo de inmovilidad, 30 minutos después de administración i.p. de vehículo (VEH) y del compuesto **1** (3, 10 y 30 mg/kg), los últimos 4 min de sesiones de 6 min. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del tiempo de inmovilidad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo control. Prueba de comparación múltiple de Dunnett luego del ANOVA (n= 9-12 ratones/grupo).

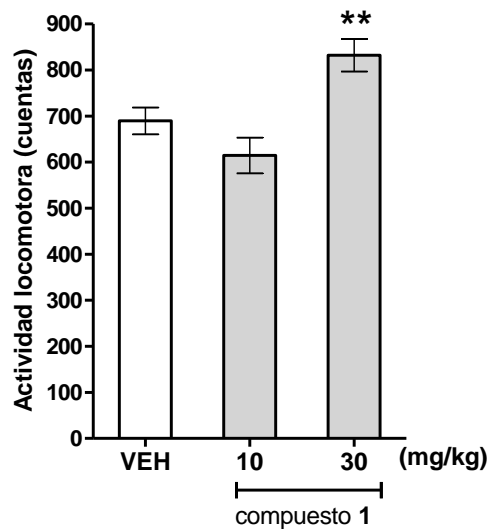


Figura 37. Efecto de la administración i.p. del núcleo chalcona (**1**) en la actividad locomotora. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del número de cuentas, registrados en sesiones de 5 min, 30 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **1** (10 y 30 mg/kg). ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo control. Prueba de comparación múltiple de Dunnett luego del ANOVA (n= 6-11 ratones/grupo).

4.5.3 Discusión

Para ampliar el perfil farmacológico del núcleo chalcona (**1**), se realizó el ensayo de suspensión por la cola a distintas dosis. El núcleo chalcona (**1**) a 10 y 30 mg/kg, al igual que lo hacen los fármacos antidepresivos, disminuyó el tiempo de inmovilidad de los ratones. Sin embargo, se evidenció que a 30 mg/kg aumenta la actividad locomotora de los roedores por lo que el efecto observado podría deberse a efectos psicoestimulantes y no a una actividad símil-antidepresiva. En cambio, a la dosis de 10 mg/kg, al no evidenciar cambios en la actividad locomotora, se puede confirmar que presenta efecto símil-antidepresivo.

Si bien, para la recuperación de los pacientes que sufren depresión se requieren tratamientos crónicos con antidepresivos, se ha demostrado que cambios de comportamiento que se producen al inicio del tratamiento pueden predecir, o al menos ser relevantes, para el resultado positivo a largo plazo. Se especula que la inmovilidad en el ensayo de suspensión por la cola puede ser sensible a algunos de estos cambios iniciales. Este hecho explicaría por qué este ensayo es una prueba sensible a la acción antidepresiva de fármacos a corto plazo (Cryan y col., 2005). A pesar del efecto observado en el tratamiento agudo del núcleo chalcona (**1**), sería importante completar el estudio realizando un tratamiento crónico para evaluar si se modifica la actividad símil-antidepresiva luego del mismo.

Por otro lado, para confirmar *in vivo*, la participación de este receptor en el mecanismo de acción del núcleo chalcona (**1**), se planea realizar ensayos de bloqueo con antagonistas para el receptor 5-HT_{1A} como por ejemplo el WAY 100635.

Los flavonoides pueden actuar como antidepresivos por diferentes mecanismos: incrementando los neurotransmisores noradrenalina, serotonina y dopamina, disminuyendo la recaptación de bioaminas en sinaptosomas, inhibiendo la actividad de la MAO e influenciando el sistema neuroendocrino (Gong y col., 2014). Algunos ejemplos de flavanonas naturales que presentaron efectos símil-antidepresivos en modelos animales de nado forzado y/o de suspensión por la cola son: hesperidina, liquiritina y isoliquiritina (Gong y col., 2014; Wang y col., 2008; Zhao y col., 2010). El estudio de la administración crónica de hesperidina sobre el efecto de los neurotransmisores reveló que aumenta los niveles de serotonina y noradrenalina en el suero de ratones expuestos al ensayo de suspensión por la cola (Gong y col., 2014). Además, la administración aguda de liquiritina y isoliquiritina incrementó los niveles de estos neurotransmisores en el

hipotálamo, hipocampo y corteza de ratones, al igual que lo hace la fluoxetina utilizada como control (Wang y col., 2008). A su vez, las chalconas naturales isoliquiritigenina y buteína (Wang y col., 2008) y derivados sintéticos (4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona, 3,4,2',4',6'-pentahidroxichalcona, 2,6-dicloro-2',4'-dihidroxichalcona, 3-bromo-2',4'-dihidroxichalcona y 2-bromo-2',4',6'-trihidroxichalcona (Guan y col., 2013; Sui y col., 2012)) presentaron efectos símil-antidepresivos *in vivo* (ver 4.4.3) pero no se ha descrito, aún, su mecanismos de acción, con excepción de la isoliquiritigenina que inhibe a ambas isoformas de la MAO, presentando mayor actividad sobre la MAO B (Pan y col., 2000). Los resultados *in vitro* de la sección 4.2.2.2 demostraron que el compuesto **1** no inhibe a la MAO A, pero presenta actividad inhibitoria sobre la MAO B con un valor de IC₅₀ 1.8 ± 0.1 μM, por lo que podría aumentar los niveles de dopamina.

Algunos trabajos han determinado bajos niveles de dopamina y de su principal metabolito, el ácido homovanílico (HVA), en el fluido cerebrospinal de pacientes con algunos tipos de depresión (entre los que se encuentran la depresión geriátrica, la estacional y el trastorno bipolar). Durante décadas, el estudio de la fisiopatología de la depresión se ha focalizado en la serotonina sin considerar a la dopamina, a quien tradicionalmente se le ha otorgado un rol fundamental en la locomoción y la cognición (Grace, 2016). Sin embargo, se cree que una disfunción del sistema mesocorticolímbico de la dopamina podría agravar los síntomas de anhedonia, apatía, y pérdida de interés y también puede contribuir al estado de ánimo deprimido (Brown y Gershon, 1993; Skolnick, 2005). A su vez, los fármacos que elevan las concentraciones sinápticas de dopamina presentan efectos antidepresivos (Klimek y col., 2002).

Por otro lado, existe una controversia sobre el rol del receptor 5-HT_{1A} en la modulación del dolor. El sistema serotoninérgico está involucrado en las vías del dolor a través de los receptores 5-HT₂ y 5-HT₃. Algunos autores han demostrado que la activación del receptor 5-HT_{1A} genera acciones antinociceptivas (Courade y col., 2001), mientras que otros trabajos han evidenciado acciones pronociceptivas (Millan, 1994). El núcleo chalcona presentó moderada afinidad tanto por el receptor 5-HT_{1A}, como por el μ-opioide (secciones 4.3.2.2.2 y 4.3.3.2.2). El ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético es un método muy sensible que evalúa efectos antinociceptivos de fármacos tanto de acción periférica como central. En este se demostró que el compuesto **1** no presenta actividad antinociceptiva en la dosis ensayada (sección 4.4.2.4.1).

Por otra parte, en la sección 4.4.2.2 se determinó que a pesar de que el compuesto **1** presenta afinidad por el su-BDZ, no ejerció acciones ansiolíticas en el ensayo de cruz elevado a la dosis evaluada.

En resumen, la administración aguda i.p. del núcleo chalcona (**1**) presenta actividad símil-antidepresiva en el ensayo de suspensión por la cola. Este efecto podría estar mediado por el receptor 5-HT_{1A} y/o la inhibición de la MAO B. Futuros ensayos que estudien su mecanismo de acción y el efecto tras su administración crónica son necesarios para obtener el perfil farmacológico completo del núcleo chalcona (**1**), que podría resultar un compuesto promisorio para el tratamiento de la depresión.

Parte VI

Estudio farmacológico de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (9)

4.6 Estudio farmacológico de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (9)

4.6.1 Introducción

Debido a que la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (9) presentó efectos ansiolíticos (sección 4.4.2.2), se continuó estudiando su perfil farmacológico.

Para ello, se evaluó este compuesto a distintas dosis en el ensayo de laberinto en cruz elevado y se estudió si presenta los efectos adversos más comunes de las BDZ: sedación, miorrelajación y ataxia.

El efecto sedativo se investigó realizando el ensayo de campo abierto con agujeros junto con la actividad locomotora. El ensayo del campo abierto con agujeros es un método simple para evaluar la respuesta de un animal a un entorno desconocido y estudiar su comportamiento exploratorio. La ventaja que presenta este ensayo es que pueden cuantificarse varios parámetros (“Nº de holes”, “Tiempo de head-dipping”, “Nº de rearings”), lo que hace posible una descripción completa del comportamiento (File y Pellow, 1985; Takeda y col., 1998). Los cambios en estos comportamientos, dado por sus tendencias exploratorias y de retirada frente a un ambiente novedoso, pueden proporcionar información sobre el estado emocional de los animales. Se considera que una disminución de la conducta exploratoria, refleja un alto nivel de ansiedad (ansiógeno) y un aumento de los parámetros evaluados representa un bajo nivel de ansiedad del animal (Karl y col., 2003).

Por otro lado, se ha demostrado que este ensayo es sensible a los efectos depresores de una variedad de compuestos con diferentes mecanismos de acción, incluidos los efectos sedantes de varios compuestos que actúan a través del su-BDZ (File y Pellow, 1986). Por lo tanto, la disminución de la conducta exploratoria en este ensayo, junto con la reducción de la actividad locomotora, se utilizan para evaluar el potencial sedativo de las drogas.

Para evaluar la fuerza muscular de los ratones administrados con el compuesto 9 se realizó el ensayo del alambre horizontal. Este ensayo mide la capacidad de los ratones de permanecer agarrados al alambre durante un breve intervalo de tiempo. Si los animales no pueden mantenerse colgados del alambre se considera que el compuesto genera relajación muscular.

Por último, se realizó la prueba de Rotarod que permite evaluar la coordinación motora, balance y ataxia de los ratones al medir la habilidad de los mismos para mantener el equilibrio sobre un cilindro en movimiento (Karl y col., 2003).

4.6.2 Resultados

4.6.2.1 Ensayo del laberinto en cruz elevado

El efecto de la administración i.p. de la chalcona **9**, a 3, 10 y 30 mg/kg, en el ensayo del laberinto en cruz elevado se muestra en la Figura 38. El compuesto **9** a 3 mg/kg, no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control, en ninguno de los parámetros evaluados. En cambio, a 10 mg/kg incrementó significativamente los porcentajes de entradas a las ramas abiertas y del tiempo de permanencia en las ramas abiertas respecto al control vehículo, mientras que a 30 mg/kg aumentó significativamente el número total de entradas a ambos brazos. Por lo que se evidenció un efecto ansiolítico únicamente tras la administración del compuesto **9** a 10 mg/kg.

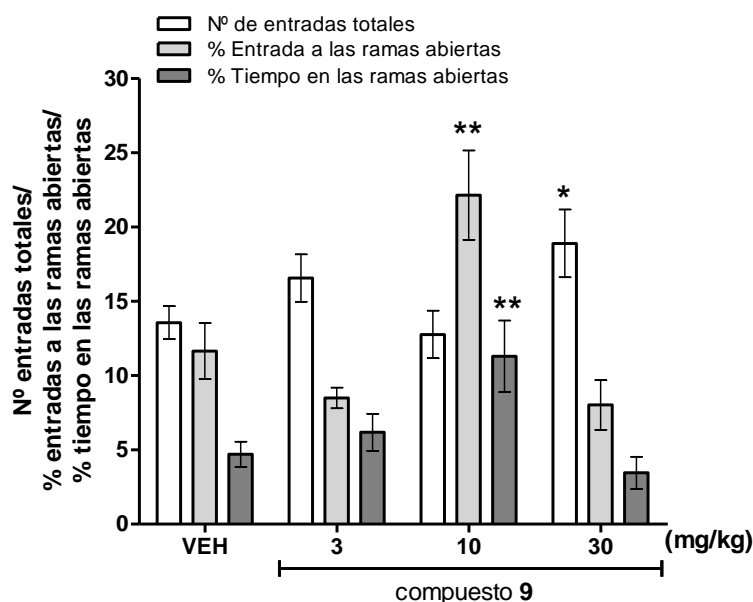


Figura 38. Efecto de la administración i.p. de 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) en el ensayo del laberinto en cruz elevado. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del porcentaje del número de entradas a las ramas abiertas, porcentaje del tiempo pasado en las ramas abiertas y el número total de entradas; registrados en sesiones de 5 min, 30 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **9** (3, 10 y 30 mg/kg). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ diferencia significativa con respecto al control VEH, prueba de comparación múltiple de Dunnett luego de ANOVA (n= 7-21 ratones/grupo).

4.6.2.2 Ensayo de campo abierto con agujeros

La administración i.p. de 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) a 10 mg/kg, 30 min antes de la medición, no modificó respecto de los ratones control vehículo los parámetros que se evalúan en el ensayo de campo abierto con agujeros: "Nº de holes", "Tiempo de head-dipping" y "Nº de rearings" (Figura 39).

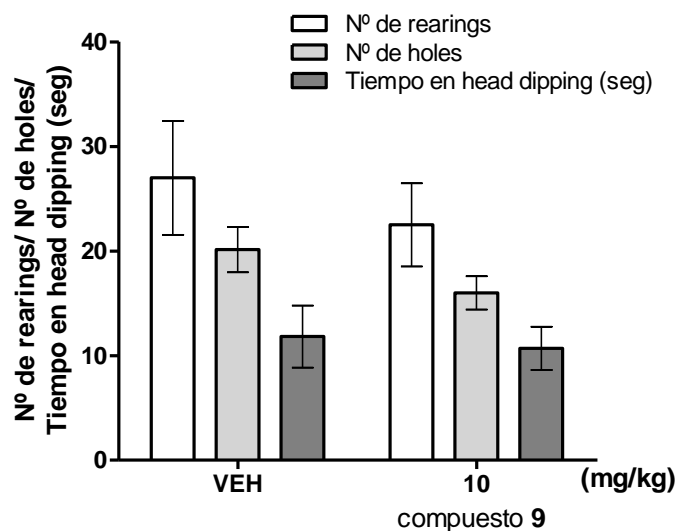


Figura 39. Efecto de la administración i.p. de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) en el ensayo del campo abierto con agujeros. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. de los parámetros medidos en el ensayo del campo abierto con agujeros, registrados en sesiones de 5 min, 30 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **9** (10 mg/kg). Prueba de t de Student no apareada (n = 8 ratones/grupo).

4.6.2.3 Ensayo de la actividad locomotora espontánea

La administración i.p. de chalcona **9** a 10 y 30 mg/kg, no mostró efectos significativos en las cuentas registradas en la actividad locomotora con respecto al grupo vehículo (Figura 40). Por lo que la administración de este compuesto a 10 y 30 mg/kg no afecta la actividad locomotora de los roedores.

Teniendo cuenta este resultado y el del campo abierto con agujeros (4.6.2.2), se puede inferir que la administración de la chalcona **9** a 10 mg/kg, no genera efectos sedativos.

4.6.2.4 Ensayo del alambre horizontal

La Figura 41 muestra el efecto de la administración i.p. de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) a 10 mg/kg en el ensayo del alambre horizontal. El número de animales que supera la prueba no presentó diferencias significativas respecto al control vehículo. Por lo tanto, la administración de este compuesto a 10 mg/kg no produce miorrelajación.

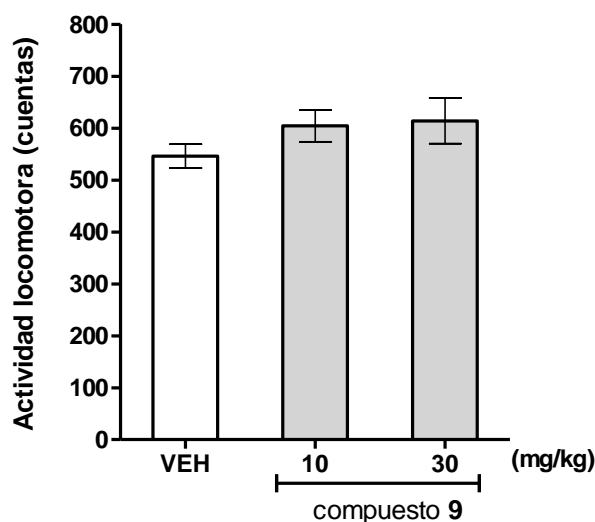


Figura 40. Efecto de la administración i.p. de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) en la actividad locomotora espontánea. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. de la actividad locomotora (número de cuentas), registrados en sesiones de 5 min, 30 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **9** (10 y 30 mg/kg). Prueba de comparación múltiple de Dunnett luego de ANOVA (n = 8-18 ratones/grupo).

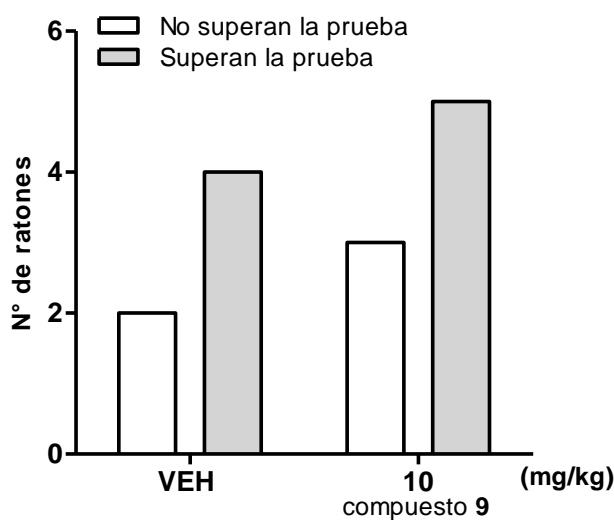


Figura 41. Efecto de la administración i.p. de la 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) en el ensayo del alambre horizontal. Los animales fueron entrenados dos veces y luego de 30 min de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **9** (10 mg/kg) fueron evaluados. Los resultados se expresan como el número ratones que supera o no la prueba. Prueba de Chi-Square (n= 6-8 ratones/grupo).

4.6.2.5 Prueba Rotarod

El efecto de la administración i.p. del compuesto **9** a 10 mg/kg en el ensayo del Rotarod se muestra en la Tabla 20. La 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) no presentó diferencias significativas respecto al grupo control vehículo en el tiempo de permanencia

(seg) del animal sobre el eje ni en el número de animales que superan la prueba. Consecuentemente, la administración del compuesto **9** a 10 mg/kg no afecta la coordinación motora, el balance y la ataxia de los ratones.

Tabla 20. Efecto de 5'-metil-2'-hidroxichalcona (9**) en el ensayo de Rotarod**

| Tratamiento | Dosis (mg/kg; i.p.) | n | Tiempo de permanencia (seg) | % de caídos |
|----------------------------------------------|---------------------------|---|--------------------------------|----------------|
| VEH | - | 6 | 120 ± 0.0 | 0 |
| 5'-metil-2'- hidroxichalcona (9) | 10 | 6 | 120 ± 0.0 | 0 |

Media ± E.S.M. del tiempo de permanencia (seg) de los ratones en el Rotarod y % de animales que se cayeron. El ensayo se realizó 30 min después de la administración de vehículo (VEH) o del compuesto **9** (10 mg/kg). La duración fue de 2 min. Prueba de Chi- Square (n= 6-8 ratones/grupo).

4.6.3 Discusión

La evaluación de la administración i.p. de 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) en ratones reveló que este compuesto presenta acción ansiolítica a 10 mg/kg en el ensayo de laberinto en cruz elevado. Se puede afirmar que el resultado observado en el ensayo de laberinto en cruz elevado se debe a un efecto ansiolítico siempre y cuando no se observen cambios en la actividad locomotora de los roedores. Las entradas a las ramas abiertas y cerradas se consideran un índice de la actividad locomotora general, sin embargo, es una medida relativamente insensible (debido a que no tiene en cuenta el número de veces que el animal atraviesa una rama o si camina al extremo de la rama o brazo en cada visita) por lo que se debe realizar otros ensayos de locomoción (Dawson y col., 1995), como la prueba de la actividad locomotora espontánea. Este ensayo demostró que el compuesto **9** a 10 mg/kg no modifica la actividad locomotora espontánea de los ratones tratados, por lo que se descarta que el efecto ansiolítico observado se deba a efectos motores.

A la dosis de 30 mg/kg, se observa que el compuesto indujo un aumento en el número total de entradas en las ramas del laberinto, efecto compartido por el diazepam, una BDZ clásica (ver Figura 32). Sin embargo, utilizando una medición más sensible como lo es el ensayo de la actividad locomotora espontánea, la mayor dosis evaluada no modificó la motricidad de los ratones.

A pesar de que las BZD son psicofármacos seguros, y ampliamente prescritos como ansiolíticos, poseen efectos adversos como sedación, miorelajación, amnesia, ataxia y tolerancia, entre otros. Las acciones sedantes y miorelajantes se consideran, a menudo, efectos no deseados que limitan su uso (Medina y col., 1998). Se decidió estudiar si la chalcona **9**, a la dosis ansiolítica, presenta algunos de los efectos adversos.

El efecto sedativo se evaluó realizando el ensayo de campo abierto con agujeros junto con la actividad locomotora. El compuesto **9** no modificó la conducta exploratoria de los ratones ni la actividad locomotora espontánea, por lo que se deduce que no genera efecto sedativo a la dosis ensayada.

Debido al efecto ansiolítico de este compuesto podría esperarse que los ratones administrados aumenten los parámetros exploratorios en el ensayo de campo abierto con agujeros. Sin embargo, esto no se evidenció por lo que es importante mencionar que los ensayos del laberinto en cruz elevado y el ensayo del campo abierto con agujeros evalúan distintos tipos de ansiedad. Es más, se ha reportado que los efectos de fármacos ansiolíticos en el laberinto en cruz elevado no se correlacionan con sus efectos en el campo abierto con agujeros (Cárdenas y Navarro, 2002).

El compuesto **9**, no afectó la tonicidad muscular ni la coordinación motora, el balance y la ataxia de los ratones en la prueba del alambre horizontal y Rotarod, respectivamente. Por lo que tampoco se observan efectos miorelajantes ni de incoordinación motora de este compuesto a la dosis ensayada.

Las chalconas naturales isoliquiritigenina y buteína, demostraron efectos similares a esta chalcona sintética. La administración (i.p.) de isoliquiritigenina a 15 y 25 mg/kg y de buteína a 25 mg/kg aumentó significativamente el número de entradas en las ramas abiertas y tiempo pasado en las ramas abiertas en el ensayo de laberinto en cruz elevado, sin presentar efectos sedativos ni miorelajantes (Jamal y col., 2008). Luego, se demostró que la isoliquiritigenina a 45 mg/kg presenta efectos hipnóticos en el ensayo de sueño inducida por el fentobarbital. Además, por medio de ensayos de bloqueo *in vivo* se demostró que sus efectos son inhibidos por el flumazenil. El estudio de su mecanismo de acción *in vitro* reveló que la isoliquiritigenina potencia las corrientes evocadas por GABA en neuronas aisladas NDR, siendo un modular positivo del receptor GABA_A (Cho y col., 2011).

Futuros estudios para completar el perfil farmacológico de la chalcona **9** contemplan la realización de los ensayos del alambre horizontal y campo abierto con agujeros a dosis mayores, ya que ligandos que actúan mediante el su-BDZ pueden

producir efectos sedantes, miorrelajantes a dosis más altas. También, sería adecuado realizar estudios que evalúen otras acciones mediadas por los receptores GABA_A como la acción anticonvulsivante e hipnótica, junto con la evaluación de otros efectos adversos como el desarrollo de tolerancia, dependencia y amnesia. Además, para confirmar que su efecto *in vivo* está mediado por los receptores GABA_A, se deberían efectuar estudios de bloqueo de su acción *in vivo* mediante el uso de un antagonista del su-BDZ de los receptores GABA_A, como el flumazenil.

Por otro lado, estudios en roedores y humanos afirman que la ansiedad se asocia con una reducción en la expresión y función de los receptores 5-HT_{1A} en el prosencéfalo, y en menor medida, en los NDR (Celada y col., 2013). Además, el sistema opioide endógeno también participa en respuestas asociadas con el estrés y la ansiedad. Los procesos mediados por opioides en la amígdala parecen jugar un papel en el control de la ansiedad y los efectos ansiolíticos de BDZ, aunque no son claros los péptidos opioides y subtipos de receptores opioides que median tales efectos (Wilson y Junor, 2008). Por los datos obtenidos en los ensayos *in vitro*, el compuesto **9** presenta nula y baja actividad para los receptores 5-HT_{1A} y μ -opioide, respectivamente, por lo que estos receptores no estarían implicados en el efecto ansiolítico observado.

En resumen, la administración i.p. de 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) a 10 mg/kg presenta efectos ansiolíticos en el ensayo de laberinto en cruz elevado, sin presentar los efectos adversos comunes de las BDZ como sedación, miorrelajación y ataxia. Por lo que es un compuesto promisorio para el tratamiento de la ansiedad.

Parte VII

Estudio farmacológico de la 5'-metil -2'- hidroxí-3'- nitrochalcona (12)

4.7 Estudio farmacológico de la 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (12)

4.7.1 Introducción

La chalcona **12** presentó afinidad a los receptores μ -opioide (sección 4.3.3.2.2) y efectos antinociceptivos a nivel periférico y central (sección 4.4.2.4). Con el objetivo de ampliar su perfil farmacológico se decidió continuar estudiando sus acciones en los ensayos de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético y de la plancha caliente a distintas dosis.

Debido a que los ensayos de nocicepción se basan en la evaluación de respuestas motoras ante un estímulo nocivo, antes de continuar estudiando las propiedades antinociceptivas, se realizó la prueba de Rotarod, a la máxima dosis utilizada de la chalcona **12** (30 mg/kg sección 4.4.2.4.2), para evitar la interpretación errónea de los resultados.

Luego, para confirmar, *in vivo*, que la acción de la chalcona **12** este mediada por los receptores opioides se realizó un estudio de bloqueo utilizando naltrexona, un antagonista opioide no selectivo, que tiene mayor afinidad por los receptores μ , luego por los κ y en menor medida por los δ (Peng y col., 2007; Takemori y Portoghese, 1984). Para realizar este estudio, se utilizó el ensayo de la plancha caliente porque es una prueba rápida y sencilla para distinguir las acciones antinociceptivas a nivel central. Además, estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la naltrexona revierte completamente la acción antinociceptiva de la morfina administrada i.p. a 6 mg/kg en el ensayo de la plancha caliente (Loscalzo y col., 2011).

Por último, pacientes con dolor crónico a menudo presentan trastornos de ansiedad y depresión. Esta combinación puede exacerbar el dolor, la angustia y la discapacidad asociada a la patología física. Es por ello que los especialistas clínicos sugieren que el dolor no puede ser eficazmente tratado si no se controlan, también, dichas comorbilidades (National Institute for Health & Clinical Excellence (UK), 2010). Por lo tanto, fármacos que además de su acción analgésica presenten efectos antidepresivos o ansiolíticos tendrían un beneficio adicional en el tratamiento del dolor. Los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* (sección 4.3.1.2.2, 4.3.2.2.2 y 4.2.2.2) revelaron que chalcona **12** no presenta afinidad al su-BDZ y al receptor 5HT_{1A} y no inhibe a la MAO A y B. De todos modos, debido a que algunas chalconas descritas en bibliografía presentan efectos similar-antidepresivos y ansiolíticos en roedores, involucrando a otros blancos o bien a través de mecanismos de acción desconocidos (sección 4.4.3), se estudió si el compuesto **12**

además de su acción antinociceptiva presenta estos efectos *in vivo*. Como se explicó en la sección 4.5.1, para realizar estos ensayos conductuales es importante que el compuesto en estudio no altere la locomoción de los roedores, y, además, dado que algunos agonistas de los receptores opioide, como la morfina, puede generar sedación y efectos sobre la actividad locomotora (Calpe y López, 1997), primero se evaluó a la chalcona **12** en los ensayos del campo abierto con agujeros y actividad locomotora espontánea antes de realizar las pruebas de suspensión por la cola y del laberinto en cruz elevado.

4.7.2 Resultados

4.7.2.1 Prueba Rotarod

El efecto de la administración i.p. del compuesto **12** en el ensayo del Rotarod se muestra en la Tabla 21. La 5'-metil -2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) inyectada i.p a 30 mg/kg no presentó diferencias significativas con el grupo control vehículo en el tiempo de permanencia (seg) del animal sobre el eje y el número de animales que superan la prueba. Por lo que el tratamiento con la chalcona **12** no afecta la coordinación de los animales a la dosis estudiada.

Tabla 21. Efecto de 5'-metil -2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (12**) en el ensayo de Rotarod**

| Tratamiento | Dosis (mg/kg; i.p.) | n | Tiempo de permanencia (seg) | % de caídos |
|-----------------------------------------------------|---------------------|---|-----------------------------|-------------|
| VEH | - | 6 | 120 ± 0.0 | 0 |
| 5'-metil -2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (12) | 30 | 6 | 120 ± 0.0 | 0 |

Media ± E.S.M. del tiempo de permanencia (seg) de los ratones en el Rotarod y % de animales que se cayeron. El ensayo se realizó 30 min después de la administración de vehículo (VEH) o del compuesto **12** (30 mg/kg). La duración fue de 2 min. Prueba de Chi-Square (n = 6 ratones/grupo).

4.7.2.2 Ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético

La Figura 42 muestra el número de contorsiones abdominales inducidas por el agente irritante ácido acético en ratones administrados i.p. con 5'-metil -2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) a 0.3, 3, 10, 30 mg/kg o vehículo. La administración de la chalcona **12** a 0.3 mg/kg no redujo significativamente el número de contorsiones abdominales en comparación al grupo control vehículo. Mientras que a 3, 10 y 30 mg/kg disminuyó significativamente, y de manera dosis dependiente, el número de contorsiones

abdominales con respecto a los ratones tratados con vehículo. Por lo tanto, se observa un efecto antinociceptivo periférico/visceral para esta chalcona a 3, 10 y 30 mg/kg.

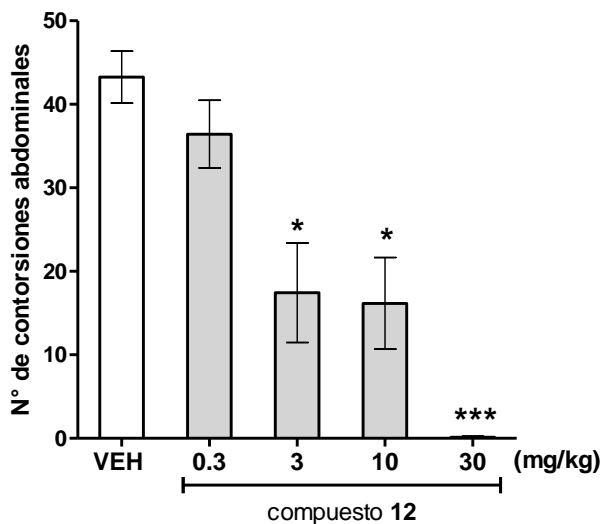


Figura 42. Efecto de 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) en el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M. del número de contorsiones abdominales. La prueba se realizó 30 min después de la administración i.p. del compuesto **12** (0.3, 3, 10 y 30 mg/kg) o vehículo (VEH). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ diferencia significativa con respecto al control VEH, prueba de comparación múltiple de Dunn luego de la prueba de Kruskal-Wallis ($n = 7-16$ ratones/grupo).

4.7.2.3 Ensayo de la plancha caliente

La 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) fue evaluada en el ensayo de la plancha caliente luego de la administración i.p. de 10 y 30 mg/kg. El tratamiento de los ratones con la chalcona **12** a 10 mg/kg no aumentó significativamente el tiempo de latencia con respecto al grupo control vehículo, pero sí lo hizo el tratamiento con la dosis de 30 mg/kg (Figura 43). Por ende, el compuesto **12** presenta efectos antinociceptivos a nivel central que se evidencian a la máxima dosis ensayada.

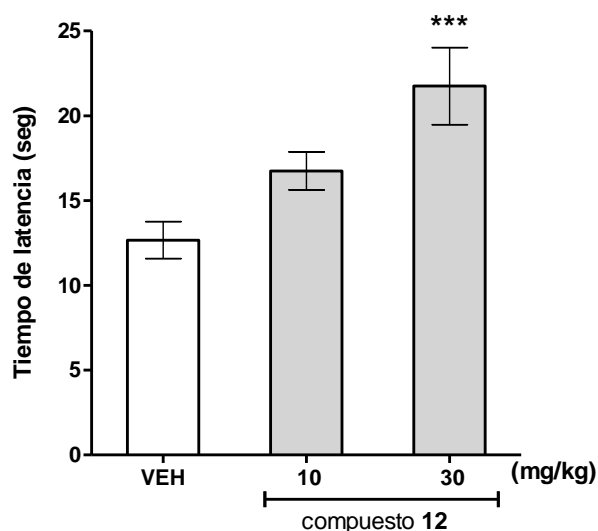


Figura 43. Efecto de 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) en el ensayo de la plancha caliente. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M. del tiempo de latencia de los ratones en la prueba de la plancha caliente, 30 minutos después de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **12** (10 y 30 mg/kg). *** $p < 0.001$ significativamente diferente de VEH; prueba de comparación múltiple de Dunnett luego de ANOVA ($n = 8-12$ ratones/grupo).

4.7.2.4 Bloqueo de la acción antinociceptiva de 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**)

Se realizó un pretratamiento administrando naltrexona (antagonista no selectivo de los receptores opioides) a 5 mg/kg, i.p. o el control solución salina 20 min antes (Loscalzo y col., 2011b) de inyectar el compuesto **12** (30 mg/kg, i.p.) o el control vehículo. Luego, se realizó el ensayo de la plancha caliente y se evaluó si se revierte la actividad antinociceptiva de la chalcona **12**.

La Figura 44 muestra que los grupos de ratones control salina/vehículo y naltrexona/vehículo presentaron tiempos de latencia similares, por lo que el antagonista no generó efectos intrínsecos en este ensayo a la dosis utilizada. Los ratones que fueron administrados i.p. con salina/compuesto **12** a 30 mg/kg aumentaron significativamente el tiempo de latencia con respecto al grupo control salina/vehículo, demostrando el efecto antinociceptivo a nivel central de este compuesto. Por último, los ratones que recibieron el pretratamiento con naltrexona (5 mg/kg, i.p.) y el tratamiento con el compuesto **12** mostraron una disminución significativa del tiempo de latencia con respecto al grupo salina/compuesto **12**. Por lo tanto, se evidencia la inhibición del efecto antinociceptivo generado por la chalcona **12**, revelando que este efecto está mediado por los receptores opioides.

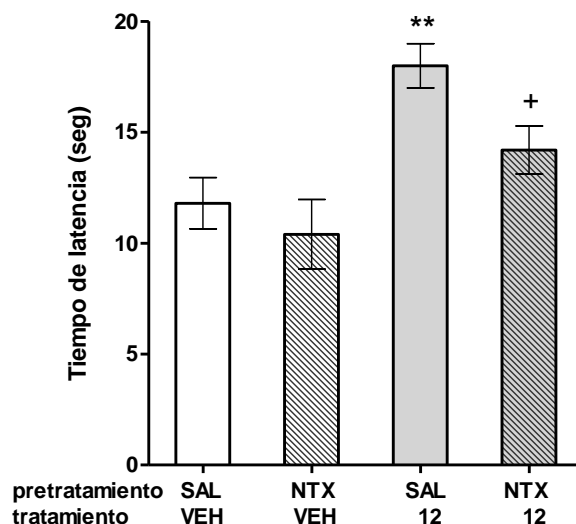


Figura 44. Efecto del pre-tratamiento con naltrexona en el efecto antinociceptivo de 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) en el ensayo de la plancha caliente. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M. del tiempo de latencia. Los ratones fueron pre-tratados con solución salina (SAL) o naltrexona (NTX, 5 mg/kg) 20 min de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **12** (30 mg/kg) y luego de 30 min se realizó la prueba de la plancha caliente. ** $p < 0.01$ significativamente diferente de VEH-VEH, + $p < 0.05$ significativamente diferente de VEH-**12**, ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni (n= 6-12 ratones/grupo).

4.7.2.5 Actividad locomotora espontánea

Se evaluó el efecto de 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) a 10 y 30 mg/kg sobre la actividad locomotora espontánea. La administración i.p. de la chalcona **12** a 10 y 30 mg/kg, no modificó el número de cuentas con respecto al vehículo (Figura 45), por lo que no genera cambios en la actividad locomotora de los ratones a las dosis evaluadas.

4.7.2.6 Ensayo de campo abierto con agujeros

La administración i.p. 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) a 10 mg/kg no mostró efectos significativos en el número de veces que los ratones introducen la cabeza en los agujeros ("N° de holes"), el tiempo total de permanencia de la cabeza en los agujeros ("Tiempo de head-dipping"), ni en el número de veces que se alzan sobre las dos patas traseras ("N° de rearings"), con respecto al grupo control vehículo a la dosis evaluada (Figura 46).

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados la actividad locomotora espontánea y del ensayo de campo abierto con agujeros, el tratamiento con 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) no genera efectos sedativos a 10 mg/kg.

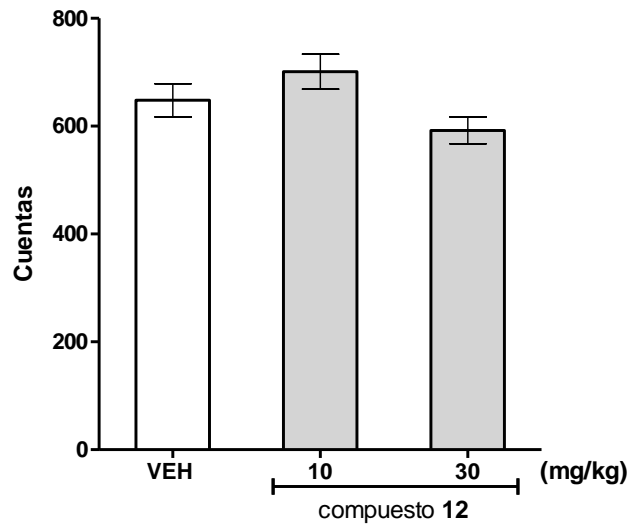


Figura 45. Efecto de la administración i.p. de 5'-metil -2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) en la actividad locomotora. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. de cuentas de la actividad locomotora espontánea, registrados en sesiones de 5 min, 30 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **12** (10 y 30 mg/kg). Prueba de comparación múltiple de Dunnett luego de ANOVA (n= 7-9 ratones/grupo).

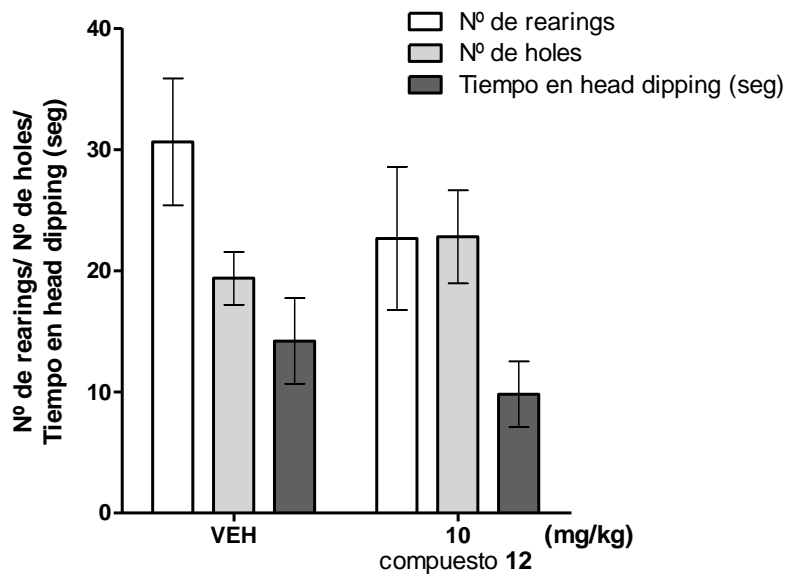


Figura 46. Efecto de la administración i.p. de 5'-metil -2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) en el ensayo del campo abierto con agujeros. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. de Nº de head-dips, tiempo en head-dipping y Nº de rearings registrados en sesiones de 5 min, 30 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **12** (10 mg/kg). Prueba de t de Student no apareado (n= 6-8 ratones/grupo).

4.7.2.7 Ensayo de suspensión por la cola

El efecto de 5'-metil -2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) en el ensayo de suspensión por la cola se muestra en la Figura 47. La administración i.p. del compuesto **12** a 10 mg/kg, no disminuyó significativamente el tiempo de inmovilidad respecto al grupo control vehículo, por lo que no presenta actividad símil-antidepresiva a la dosis ensayada.

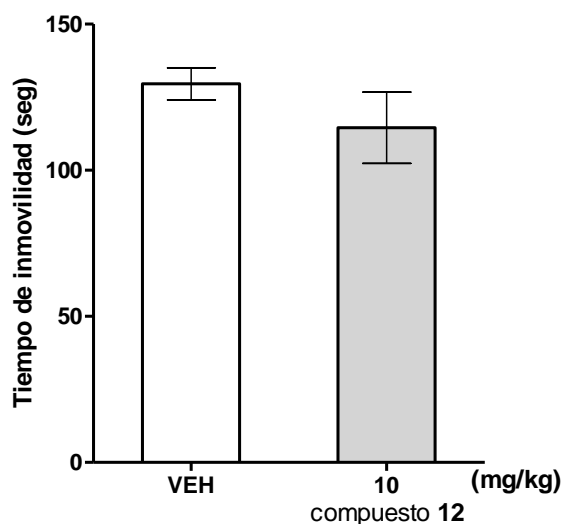


Figura 47. Efecto de 5'-metil -2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) en el ensayo de suspensión por la cola. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del tiempo de inmovilidad. Se registró el tiempo de inmovilidad, 30 minutos después de administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **12** (10 mg/kg). Prueba de t de Student no apareado (n= 7-12 ratones/grupo).

4.7.2.8 Ensayo del laberinto en cruz elevado

La administración i.p. de 5'-metil -2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) a 10 mg/kg no mostró diferencias significativas en los parámetros medidos en el ensayo del laberinto en cruz elevado: número de entradas a las ramas abiertas, tiempo pasado en las ramas abiertas y número total de entradas con respecto al grupo control vehículo (Figura 48), por lo tanto, no presentó efecto ansiolítico a la dosis evaluada.

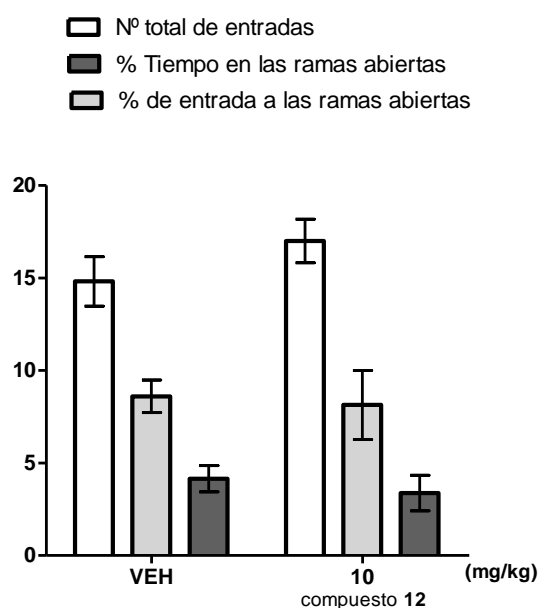


Figura 48. Efecto de la administración i.p. de 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) en el ensayo del laberinto en cruz elevado. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del porcentaje del número de entradas a las ramas abiertas, porcentaje del tiempo pasado en las ramas abiertas y el número total de entradas; registrados en sesiones de 5 min, 30 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **12** (10 mg/kg). Prueba de t de Student no apareado (n= 8-12 ratones/grupo).

4.7.3 Discusión

Con el objetivo de ampliar el perfil farmacológico de 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) se realizaron la prueba de Rotarod, ensayos de nocicepción, estudios de bloqueo con el antagonista de los receptores opioide naltrexona y, además, se llevaron a cabo ensayos conductuales para evaluar si este compuesto presenta efectos sedativos, símil-antidepresivos y ansiolíticos.

En primer lugar, se comprobó que este compuesto no altera la coordinación motora de los animales a la máxima dosis evaluada, descartando que la acción antinociceptiva observada en el muestreo (sección 4.4.2.4.) se deba a efectos motores.

Este resultado permitió continuar con su estudio en ensayos de nocicepción utilizando estímulos químicos y térmicos. En el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético, la chalcona **12** disminuyó el número de contorsiones abdominales (3, 10 y 30 mg/kg), demostrando su acción antinociceptiva a nivel periférico/visceral. Mientras que en el ensayo de la plancha caliente el compuesto **12** aumentó significativamente el tiempo de latencia de los ratones a la mayor dosis evaluada

(30 mg/kg), indicando su efecto antinociceptivo a nivel central. Los resultados demuestran mayor actividad antinociceptiva a nivel periférico para esta chalcona. Esto puede explicarse porque el ensayo de contorsiones abdominales es un método muy sensible, que es capaz de detectar efectos antinociceptivos de los AINEs y de fármacos de acción central a dosis que son inactivas en otros métodos, como la prueba de retirada de la cola o de la plancha caliente (Mohamad y col., 2010). Además, como se mencionó en 4.4.3, varios derivados de chalconas presentan actividad antiinflamatoria (Batovska y Todorova, 2010; Heidari y col., 2009; Kim y col., 2004; Madan y col., 2000; Nowakowska, 2007) siendo el núcleo chalcona una potencial estructura líder para el desarrollo de drogas antiinflamatorias.

Por el contrario, existen pocos trabajos científicos que evalúen el efecto antinociceptivo de chalconas a nivel central y la participación del sistema opioide. Entre ellos, se encuentra la chalcona sintética 4-cloro-4',6'-dimetoxi-2'-hidroxichalcona (Cechinel-Filhol y col., 1996) y la chalcona natural flavokawina B (2',4'-dimetoxi-6'-hidroxichalcona) aislada de la planta acuática *Alpinia nutans* Ros (Mohamad y col., 2010) que presentaron actividad antinociceptiva a nivel periférico y central. Para la chalcona sintética se desconoce el mecanismo de acción, en tanto que el efecto antinociceptivo de la flavokawina B no pudo ser revertido con el pretratamiento del antagonista no selectivo de los receptores opioides, naloxona.

Las primeras evidencias de la participación del sistema opioide como responsable del efecto antinociceptivo de derivados de chalcona fueron reportadas para un extracto enriquecido de chalconas diméricas (con sustituciones hidroxilo en las posiciones 2',4',5 y 4) aisladas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (planta medicinal utilizada en el noreste de Brasil como antiinflamatoria en los trastornos ginecológicos), y luego, para la chalcona rígida derivada de la 4'-metoxi-3,4-dihidroxichalcona. El efecto anticonceptivo del extracto en el ensayo de la plancha caliente y de la chalcona rígida en esta prueba y en la de la formalina fue bloqueado por el pretratamiento con naloxona (Heidari y col., 2009a; Viana y col., 2003).

En este trabajo se comprobó *in vivo* la acción de un derivado sintético, 5'-metil-2'-hidroxio-3'-nitrochalcona (**12**), a través de los receptores opioides, ya que el pretratamiento con naltrexona revirtió el aumento del tiempo de latencia en el ensayo de la plancha caliente. A diferencia de la morfina, el compuesto **12** no generó cambios en la actividad locomotora ni provocó efectos sedativos en los roedores, en la dosis ensayada.

En cuanto a las comorbilidades asociadas al dolor crónico, la chalcona **12** no presentó efectos ansiolíticos ni símil-antidepresivos *in vivo* a la dosis evaluada. Por lo que solo presenta efecto antinociceptivo.

En resumen, la administración sistémica (i.p.) de 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) ejerce efectos antinociceptivos en ratones expuestos a estímulos dolorosos, tanto químicos como térmicos, evidenciando acciones a nivel periférico/visceral y central, por lo que este compuesto podría considerarse como un analgésico potente. Además, no presenta alteraciones de la coordinación motora ni efectos sedativos a las dosis evaluadas. Por los estudios *in vitro* y de bloqueo, esta acción estaría mediada por el receptor μ -opioide.

Por lo tanto, los derivados de chalcona además de ser potencial estructuras líderes para el desarrollo de drogas antiinflamatorias también pueden considerarse como potenciales estructuras para el desarrollo de fármacos analgésicos a nivel central.

Parte VIII

Estudio farmacológico de la 3,3-dibromoflavanona (25)

4.8 Estudio farmacológico de la 3,3-dibromoflavanona (25)

4.8.1 Introducción

Debido a su promisorio actividad *in vitro* por el receptor μ -opioide y su acción antinociceptiva *in vivo* se estudió exhaustivamente al compuesto **25**, como se detalla a continuación, con el fin de obtener su perfil farmacológico.

4.8.1.1 Ensayos de nocicepción en tratamiento agudo

Al igual que se realizó en la sección 4.7, se efectuaron las pruebas motoras de la malla invertida y el cilindro rotatorio para descartar la obtención de resultados falsos positivos en los ensayos de nocicepción. Luego, se realizó el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético y el de la plancha caliente a distintas dosis en tratamiento agudo. Y, además, se evaluó el efecto antinociceptivo a lo largo del tiempo en el ensayo de la plancha caliente.

Dado que la variedad de estímulos reconoce diferentes tipos de dolor y revela la capacidad de acción de los fármacos antinociceptivos, también se realizó el ensayo de la formalina. Esta prueba mide la capacidad de un compuesto de atenuar el dolor moderado y continuo generado por un tejido lesionado. El agente químico irritante, formalina, se inyecta por vía intradérmica en la superficie plantar de la pata trasera del ratón, generando la respuesta refleja cuantificable de lamerse la pata inyectada. En roedores, la administración de formalina produce un dolor bifásico, con una fase inicial dentro los primeros 5 min post-inyección, que representa el dolor neurogénico, seguido de un período de reposo de alrededor de 10 min y una segunda fase de comportamiento nociceptivo que dura de 20 a 40 min, que representa el dolor inflamatorio. Los fármacos que actúan a nivel central disminuyen el tiempo de lamida en ambas fases del ensayo, mientras que los fármacos que actúan a nivel periférico sólo inhiben la segunda fase.

4.8.1.2 Estudio de bloqueo

Con el objetivo de determinar el mecanismo de acción *in vivo* del compuesto **25**, se realizaron ensayos de bloqueo de su acción antinociceptiva utilizando antagonistas específicos de receptores que están involucrados en las vías del dolor como: receptores α_1 y α_2 adrenérgicos, 5-HT_{2A/C} y μ , δ y κ opioides. La dosis y los tiempos de administración de los antagonistas fueron seleccionados en base a datos descritos en la literatura (Dailly y col., 2006; Miranda y col., 2003; Tabarelli y col., 2004) y

experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio (Loscalzo y col., 2011), para prevenir la acción intrínseca de los antagonistas.

Para realizar este estudio se utilizó la prueba de la plancha caliente, debido a que este ensayo distingue las potentes acciones antinociceptivas a nivel central de los agonistas μ - opioide y α 2-adrenérgicos, de las débiles acciones periféricas de los AINES (Le Bars y col., 2001). A su vez, en este ensayo pueden ser detectadas propiedades antinociceptivas de los agonistas κ opioides, α 1-adrenérgicos y serotoninérgicos (Millan, 1994), y es un método más simple y más rápido que el ensayo de la formalina para determinar una respuesta supraespinal.

4.8.1.3 Efecto de la 3,3-dibromoflavanona (25) en las comorbilidades asociadas al dolor

El dolor crónico normalmente es acompañado de comorbilidades mentales como alteraciones del sueño, ansiedad y depresión. Se ha demostrado que la depresión y la ansiedad son 1.5 a 4 veces más frecuentes en personas con dolor, en comparación con aquellos que no lo padecen (Sánchez, 2014). El manejo de estas comorbilidades es importante para el tratamiento eficaz del dolor, por lo que un fármaco que pueda actuar en el dolor y en algunas de estas comorbilidades, presentaría una gran ventaja terapéutica. Es por eso que se evaluó si la flavanona **25** presenta, además de su efecto antinociceptivo, actividad símil-antidepresiva en el ensayo de suspensión por la cola y/o efectos ansiolíticos en el ensayo del laberinto en cruz elevado.

4.8.1.4 Estudio de los efectos adversos más comunes que presentan los opiáceos

La eficacia es el resultado más importante en la evaluación de los analgésicos, sin embargo, es igualmente relevante tener en cuenta que los agonistas de los receptores opioides no están desprovistos de efectos secundarios no deseados. Por ejemplo, el analgésico opiáceo “estándar” morfina, a dosis que genera una respuesta eficaz analgésica, puede producir efectos secundarios que limitan su uso clínico como: sedación, constipación, dependencia y tolerancia, entre otros. En esta Tesis, se decidió estudiar si el compuesto **25** presenta los mencionados efectos no deseados y se lo comparó con la droga de referencia morfina, realizando los correspondientes ensayos.

4.8.1.4.1 Sedación

Como se ha explicado anteriormente (sección 4.6.1), para evaluar sedación se realizaron los ensayos de campo abierto con agujeros junto con el ensayo de medición de la actividad locomotora espontánea.

4.8.1.4.2 Constipación

La constipación es uno de los efectos no deseados más relevantes de los opiáceos. Incluso representa una de las principales causas de interrupción de la terapia analgésica por parte de los pacientes (Holzer, 2015). Para estudiar si la flavanona **25** produce constipación se realizó el ensayo del carbón activado, que es una prueba ampliamente utilizada y confiable para la medición de tránsito gastrointestinal en pequeños roedores (Evangelista, 2013).

4.8.1.4.3 Dependencia

La dependencia refleja el desarrollo de adaptaciones neuronales complejas en respuesta a la administración repetida y/o prolongada de drogas. La dependencia se pone en descubierto cuando al interrumpir el consumo de sustancias aparece un síndrome de abstinencia asociado a signos físicos (o somáticos) con un intenso estado emocional aversivo también llamado síndrome de retirada motivacional (Le Merrer y col., 2009).

En modelos animales de dependencia física el experimentador observa y califica varios signos somáticos luego de la retirada espontánea (interrupción del tratamiento) o precipitada (administración de un antagonista farmacológico) del fármaco que genera dependencia. La mayoría de los fármacos opiáceos, entre ellos la morfina, muestran una intensidad máxima de los signos generales de la retirada entre 24 y 72 horas después de la última administración. La abstinencia precipitada con la administración de antagonistas es normalmente más dramática e intensa que la espontánea y está limitada a la duración de la actividad del antagonista. En roedores dependientes, la administración de naloxona, o naltrexona, induce un síndrome de abstinencia en pocos minutos (de 3 a 5), dónde aparecen rápidamente los primeros síntomas, los cuales van intensificándose progresivamente hasta alcanzar un pico máximo hacia los 30 min (Rodríguez-Arias y col., 1999). Existen una variedad de comportamientos que pueden ser observados y cuantificados, tales como sacudida como perro mojado, castañeteo de dientes, diarrea, temblores, ptosis, pérdida de peso, acicalamiento de diferentes partes del cuerpo y saltos (Cicero y col., 2002; Sepúlveda y col., 1999). Una de las herramientas más utilizadas para

medir dependencia es la escala de Gellert-Holtzman, que ha sido validada para medir el síndrome de retirada en ratas, y también, es específica para evaluar el síndrome abstinencia producido por la morfina en ratones (Broseta y col., 2002). Además, el número de saltos es una de las medidas más utilizadas para cuantificar la intensidad de la abstinencia a la morfina. En muchas ocasiones, se utiliza como el único parámetro para la evaluación de la dependencia de opiáceos en ratones, ya que es una medida muy específica del comportamiento de éstos en el síndrome de abstinencia y es considerado una expresión de fuerte dependencia (Broseta y col., 2002). En este trabajo se estudió si el compuesto **25** genera dependencia evaluando los signos correspondientes a la escala modificada de Gellert-Holtzman, descrita por Broseta y col. (2002) y el número de saltos.

4.8.1.4.4 Tratamiento crónico y tolerancia

La tolerancia se define como la disminución de los efectos de un compuesto tras la administración repetida del mismo. Para determinar si la administración repetida de 3,3-dibromoflavanona (**25**) genera tolerancia al efecto antinociceptivo, se llevó a cabo un tratamiento crónico durante 12 días y, luego, se realizó el ensayo de la plancha caliente. Además, se evaluó la actividad locomotora, la coordinación motora y el tránsito gastrointestinal de los ratones luego del tratamiento crónico y se comparó con la droga de referencia morfina, para establecer sus potenciales ventajas terapéuticas.

4.8.1.5 Administración conjunta de morfina con 3,3-dibromoflavanona (25)

Por último, se investigó el efecto antinociceptivo de la administración conjunta de morfina con 3,3-dibromoflavanona (**25**) para evaluar su interacción farmacológica.

Se denomina interacción farmacológica a la acción que un fármaco ejerce sobre otro, de modo que éste experimente un cambio cuantitativo o cualitativo en sus efectos. Las interacciones pueden ser de carácter: farmacéutico (de tipo físico-químico), farmacocinético (procesos de absorción, distribución, metabolismo o eliminación) y farmacodinámico (efecto biológico). Estas últimas aparecen entre fármacos que actúan en el mismo sitio de acción o mediante distintos mecanismos de acción (De Cos, 2010).

La combinación de los fármacos puede producir tres tipos de efecto: sinérgico, aditivo o antagonista.

En las interacciones de tipo sinérgicas, también denominadas de potenciación, el efecto resultante es mayor que la suma de los efectos de cada droga por separado. En

general, este tipo de interacción se observa más frecuentemente entre drogas de distinta clase o que presentan diferentes mecanismos de acción para producir un mismo efecto.

El efecto aditivo genera un efecto resultante igual a la suma de los efectos de cada droga por separado. Se considera que el grado de interacción es cero ya que cada droga no ejerce ninguna acción sobre la otra (Berenbaum, 1989).

El efecto de antagonismo produce un efecto menor al esperado. Esta interacción se puede dar a nivel farmacocinético; a nivel fisiológico, donde los efectos de los fármacos son opuestos y se contraponen; o a nivel de los receptores, donde los fármacos compiten por un mismo sitio de unión de forma reversible.

Un tipo adicional de la combinación de fármacos es una combinación coalística, en el que la totalidad de los fármacos implicados son inactivos individualmente, pero son activos en combinación (Jia y col., 2009).

4.8.2 Resultados

4.8.2.1 Ensayo de la malla invertida

La 3,3-dibromoflavanona (**25**) fue evaluada a 30 mg/kg en el ensayo de la malla invertida (Figura 49). El análisis estadístico de los resultados mostró que la proporción de ratones que trepa a la cara superior de la malla (Figura 49 A) y el tiempo requerido por los animales para trepar (Figura 49 B) no presentan diferencias significativas con el grupo control vehículo.

4.8.2.2 Prueba de Rotarod

El efecto de la administración la i.p. de 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el ensayo del Rotarod se muestra en la Tabla 22. La flavanona **25** a 30 mg/kg no presenta diferencias significativas con el grupo control vehículo en el tiempo de permanencia (seg) del animal sobre el eje del cilindro ni el número de animales que supera la prueba.

Por lo tanto, la flavanona **25** a 30 mg/kg, la dosis más alta utilizada en todos los ensayos farmacológicos, no alteró la coordinación motora de los ratones.

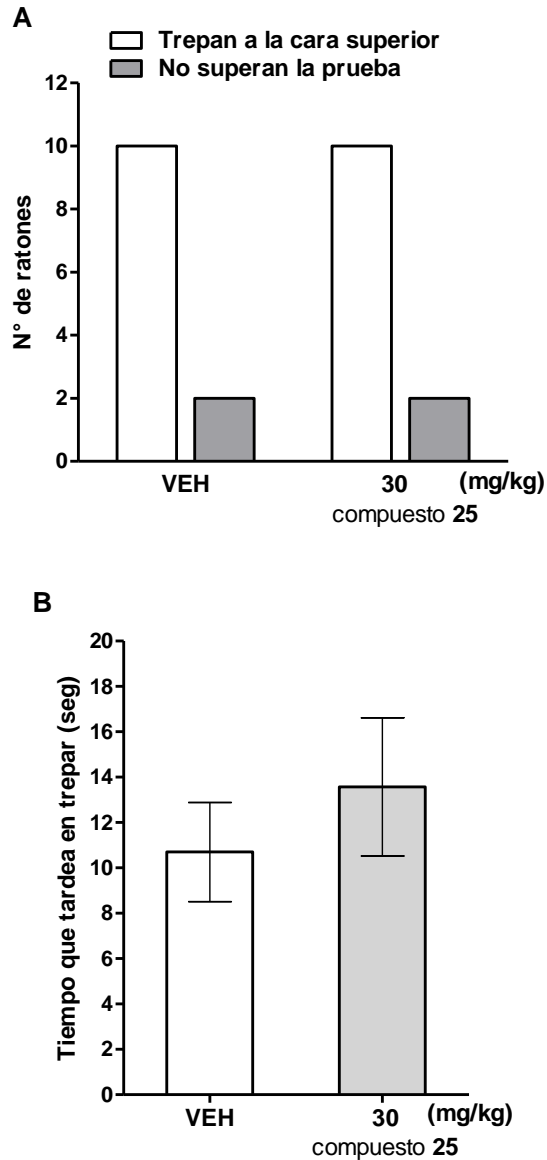


Figura 49. Efecto de la administración i.p. de 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el ensayo de la malla invertida. Los animales fueron sometidos al ensayo 30 min después de la administración i.p. de vehículo (VEH) y el compuesto **25** (30 mg/kg). El límite de tiempo para alcanzar la cara superior de la malla fue de 120 seg. (A) Número ratones que trepan a la cara superior de la malla o que no superan la prueba. Los resultados fueron analizados por la prueba de Chi-Square. (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del tiempo (seg) que tardan los ratones en trepar, 30 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **25** (30 mg/kg). Prueba de t de Student no apareado (n= 7-10 ratones/grupo).

Tabla 22. Efecto de la 3,3-dibromoflavanona en el ensayo de Rotarod

| Tratamiento | Dosis (mg/kg; i.p.) | n | Tiempo de permanencia (seg) | % de caídos |
|------------------------------------|---------------------|---|-----------------------------|-------------|
| VEH | - | 6 | 119.1 ± 0.3 | 0 |
| 3,3-dibromoflavanona (25) | 30 | 6 | 112.0 ± 8.0 | 0 |

Media ± E.S.M. del tiempo de permanencia (seg) de los ratones en el Rotarod y % de animales que no superaron la prueba. El ensayo se realizó 30 min después de inyectar los ratones con vehículo (VEH) o el compuesto **25** (30 mg/kg), la duración del mismo fue de 2 min. Prueba de Chi-Square y prueba de t de Student no apareado (n= 6 ratones/grupo).

4.8.2.3 Ensayo de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético

El efecto de 3,3-dibromoflavanona (**25**) sobre las contorsiones abdominales inducidas por la solución de ácido acético en ratones se muestra en las Figura 50. La administración del compuesto **25** a 3 mg/kg no disminuyó significativamente el número de contorsiones con respecto a los ratones tratados con vehículo. En cambio, a 10 y 30 mg/kg redujo significativamente el número de contorsiones con respecto al grupo control. Por lo tanto, se evidencia un efecto antinociceptivo a nivel visceral de la flavanona **25** a 10 y 30 mg/kg.

4.8.2.4 Ensayo de la plancha caliente

El efecto de la flavanona **25** en el ensayo de la plancha caliente se muestra en la Figura 51. Los ratones que recibieron una dosis i.p. de 3 mg/kg no aumentaron significativamente el tiempo de latencia en comparación al grupo control vehículo. La administración del compuesto **25** a 10 y 30 mg/kg, incrementó significativamente el tiempo de latencia en comparación al grupo control (Figura 51). Por lo que se demostró el efecto antinociceptivo a nivel central de 3,3-dibromoflavanona (**25**) a 10 y 30 mg/kg.

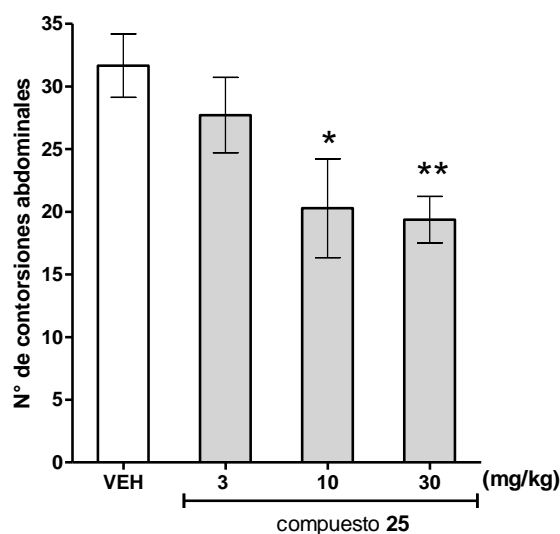


Figura 50. Efecto de 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el ensayo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M. del número de contorsiones abdominales. La prueba se realizó 30 min después de la administración i.p. del compuesto **25** (3, 10 y 30 mg/kg) o vehículo (VEH), las contorsiones se cuentan durante 15 min a partir del min 5 luego de la administración del ácido acético. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ diferencia significativa con respecto al control VEH, prueba de comparación múltiple de Dunnett luego de ANOVA (n= 7-13 ratones/grupo).

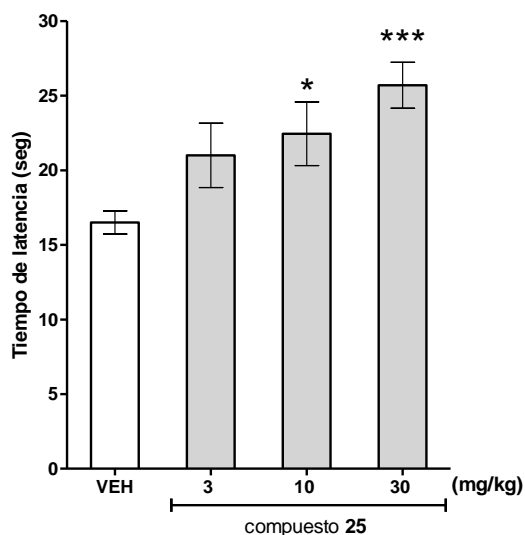


Figura 51. Efecto de 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el ensayo de la plancha caliente. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M. del tiempo de latencia de los ratones en la prueba de la plancha caliente a 55 °C, 30 minutos después de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **25** (3, 10 y 30 mg/kg). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significativamente diferente de VEH; prueba de comparación múltiple de Dunnett luego de ANOVA (n= 8-13 ratones/grupo).

4.8.2.5 Curva de tiempo

La Figura 52 muestra la curva de tiempo del efecto de 3,3-dibromoflavanona (**25**) a 30 mg/kg en la prueba de la plancha caliente. Se obtuvieron efectos antinociceptivos significativos a los 5, 20, 30 y 60 min, sin alcanzar a los valores del grupo control hasta los 120 min. Por lo tanto, la flavanona **25** ejerce su máximo efecto antinociceptivo entre los 20 y 60 min. post administración.

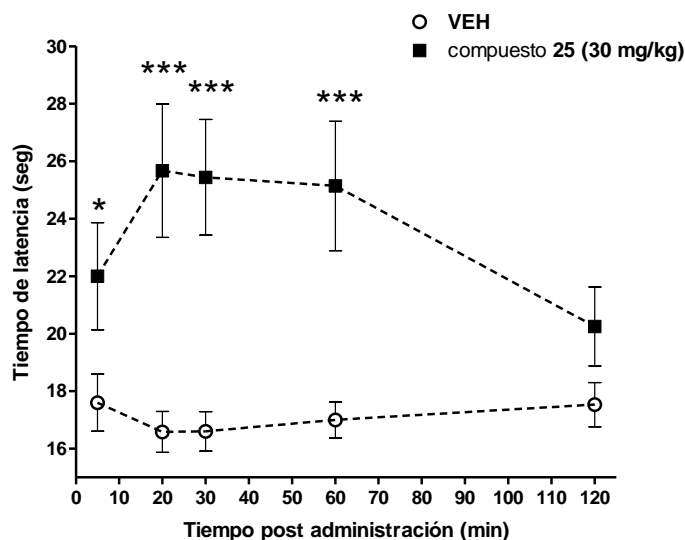


Figura 52. Efecto de la administración i.p. de 3,3-dibromoflavanona (**25**) (30 mg/kg) en el tiempo. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M. del tiempo de latencia en la prueba de la plancha caliente a 55 °C. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ significativamente diferente del VEH; prueba t de Student no apareado (n = 6-15 ratones/grupo).

4.8.2.6 Ensayo de la formalina

En la primera fase del ensayo de la formalina, la 3,3-dibromoflavanona (**25**) a 3, 10 y 30 mg/kg inhibió la nocicepción inducida por la formalina en un 29.8 %, 60.5 % y 45.2 % respectivamente. Los ratones que fueron administrados i.p. con el compuesto **25** a 10 y 30 mg/kg disminuyeron de manera significativa el tiempo de lamida con respecto al grupo control vehículo (Figura 53 A). El control positivo, indometacina (un AINES), no mostró efecto antinociceptivo en esta fase.

En la segunda fase, la administración i.p. de la flavanona **25** a 3, 10 y 30 mg/kg provocó una reducción del tiempo de lamida de 34.1 %, 70.4 % y 78.4 %, respectivamente. La comparación entre el grupo control vehículo y los grupos experimentales indicó que 3,3-dibromoflavanona (**25**) a 10 y 30 mg/kg y la indometacina a 10 mg/kg, disminuyen significativamente el tiempo de lamida de los ratones (Figura 53

B). Los ratones administrados i.p. con morfina (6 mg/kg) no se lamieron sus patas en ninguna fase del ensayo. Por ende, se observó efecto antinociceptivo a nivel periférico y central de la flavanona **25** a 10 y 30 mg/kg.

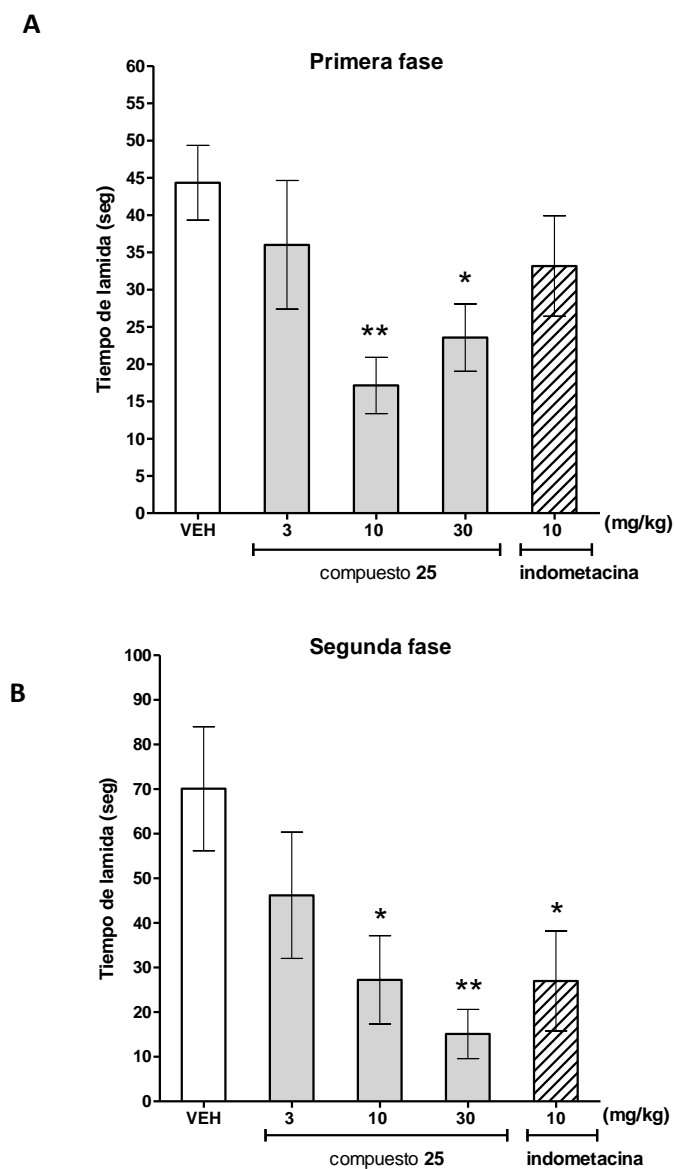


Figura 53. Efecto antinociceptivo de la 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el ensayo de la formalina. Vehículo (VEH) y el compuesto **25** (3, 10 y 30 mg/kg) fueron administrados i.p. 30 min antes de la inyección de formalina en la superficie dorsal de la pata trasera derecha del ratón. El tiempo de lamida se midió durante un período de 5 min (primera fase, Figura A) o 15-50 min (segunda fase, Figura B) después de la inyección de formalina. La indometacina (10 mg/kg, i.p.) se utilizó como droga de referencia. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M del tiempo de lamida. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significativamente diferente de VEH; prueba de comparación múltiple de Dunnett luego de ANOVA ($n = 6-18$ ratones/grupo).

4.8.2.7 Estudio de bloqueo de la acción in vivo con antagonistas específicos

La Tabla 23 muestra los resultados obtenidos para el estudio de bloqueo de la acción antinociceptiva del compuesto **25** en el ensayo del plato caliente, utilizando varios antagonistas específicos. En primer lugar, se evidenció el efecto antinociceptivos del grupo de ratones pretratados con salina y tratados con la flavanona **25** (30 mg/kg, i.p.) (salina/compuesto **25**) respecto al grupo control pretratado con solución salina y tratado con solución vehículo (salina/vehículo).

El pretratamiento de los ratones con ketanserina (0.5 mg/kg, i.p., antagonista selectivo del receptor 5-HT_{2A/C}), prazosina (0.2 mg/kg, i.p., antagonista de los receptores adrenérgicos α 1) y yohimbina (2 mg/kg, i.p., antagonista de los receptores adrenérgicos α 2) administrados 20 min antes de la inyección de vehículo no modificaron el tiempo de latencia con respecto al grupo control (salina/vehículo). Por lo que el pretratamiento con estos antagonistas por sí mismos, no provocó ninguna respuesta en este ensayo. La administración del compuesto **25** (30 mg/kg, i.p.) luego del pretratamiento con estos antagonistas, aumentó significativamente el tiempo de latencia con respecto al grupo salina/ vehículo, demostrando su efecto antinociceptivo. Por lo que los antagonistas no lograron revertir el efecto antinociceptivo de este compuesto en la prueba de la plancha caliente (Tabla 23).

Para estudiar la participación del sistema opioide, los ratones fueron pretratados con naltrexona, naltrindol (antagonista selectivo de los receptores δ -opioide) y nor-binaltorfimina (antagonista selectivo de los receptores κ -opioide). También, se evidenció que los antagonistas no generan efectos intrínsecos en este ensayo a la dosis utilizada, al no presentar diferencias significativas en el tiempo de latencia respecto el grupo control (salina/vehículo) cuando los ratones fueron pretratados con estos antagonistas y tratados con la solución vehículo (Tabla 23).

El tratamiento con naltrindol (5 mg/kg, i.p.) inyectado 20 min antes de la administración de la 3,3-dibromoflavanona (**25**) (30 mg/kg, i.p.) y con nor-binaltorfimina (10 mg/kg, s.c.), inyectada 24 hs antes de la administración de este flavonoide, aumentó significativamente el tiempo de latencia con respecto al grupo salina/vehículo. Por lo tanto, no antagonizaron su acción antinociceptiva en el ensayo de la plancha caliente.

En cambio, el pretratamiento con naltrexona (5 mg/kg, i.p.) administrado 20 min antes de la inyección del compuesto **25** (30 mg/kg, i.p.) no presentó diferencias significativas en el tiempo de latencia respecto el grupo control (salina/vehículo) y mostró una disminución significativa en el tiempo de latencia respecto el grupo salina/compuesto

25 (Tabla 23). Por lo que provocó la inhibición del efecto antinociceptivo inducido por esta flavanona en el ensayo de la plancha caliente, evidenciando la participación del receptor μ -opioide en el mecanismo de acción de la flavanona **25**.

Tabla 23. Estudios de bloqueo con antagonistas específicos.

| Pre-tratamiento | Tratamiento | Tiempo de latencia (seg) |
|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| Salina | Vehículo | 17.9 ± 0.7 |
| Salina | Compuesto 25 (30 mg/kg) | 25.1 ± 1.1*** |
| Yohimbina (2 mg/kg) | Vehículo | 19.6 ± 1.4 |
| Yohimbina (2 mg/kg) | Compuesto 25 (30 mg/kg) | 23.2 ± 2.4* |
| Ketanserina (0.5 mg/kg) | Vehículo | 20.0 ± 2.0 |
| Ketanserina (0.5 mg/kg) | Compuesto 25 (30 mg/kg) | 24.4 ± 2.2** |
| Prazosina (0.2 mg/kg) | Vehículo | 18.0 ± 2.1 |
| Prazosina (0.2 mg/kg) | Compuesto 25 (30 mg/kg) | 25.0 ± 2.0** |
| Naltrindol (5 mg/kg) | Vehículo | 20.5 ± 1.2 |
| Naltrindol (5 mg/kg) | Compuesto 25 (30 mg/kg) | 23.2 ± 0.5* |
| Naltrexona (5 mg/kg) | Vehículo | 20.0 ± 1.6 |
| Naltrexona (5 mg/kg) | Compuesto 25 (30 mg/kg) | 18.3 ± 1.4 ⁺⁺ |
| Salina (s.c.) | Vehículo (i.p.) | 17.8 ± 0.6 |
| Salina (s.c.) | Compuesto 25 (30 mg/kg) | 25.0 ± 1.3*** |
| Nor-binaltorfimina (10 mg/kg, s.c.) | Vehículo (i.p.) | 20.0 ± 1.5 |
| Nor-binaltorfimina (10 mg/kg, s.c.) | Compuesto 25 (30 mg/kg) | 26.7 ± 2.3*** |

Los resultados se expresan como media ± E.S.M. del tiempo de latencia. Los ratones fueron pre tratados con vehículo, yohimbina, ketanserina, prazosina, naltrexona, naltrindol o nor-binaltorfimina. La prueba de la plancha caliente se realizó 30 minutos después de la administración i.p. del compuesto **25** (30 mg/kg) o vehículo. Los símbolos denotan los niveles de significancia: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significativamente diferente del grupo salina-vehículo (ANOVA de dos vías, seguido por Bonferroni); ⁺⁺ $p < 0.01$ significativamente diferentes de salina-compuesto **25** (ANOVA de una vía seguido por la prueba de Newman-Keuls) (n= 6-22 ratones/grupo).

4.8.2.8 Ensayo de suspensión por la cola

El efecto de 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el ensayo de suspensión por la cola se muestra en la Figura 54. La administración i.p. del compuesto **25** a 1 y 30 mg/kg no disminuyó significativamente el tiempo de inmovilidad de los ratones al ser colgados de sus colas con respecto al control vehículo. Mientras que a 3 y 10 mg/kg redujo

significativamente este parámetro respecto al grupo control. Entonces, la flavanona **25** ejerce efectos símil-antidepresivos a 3 y 10 mg/kg.

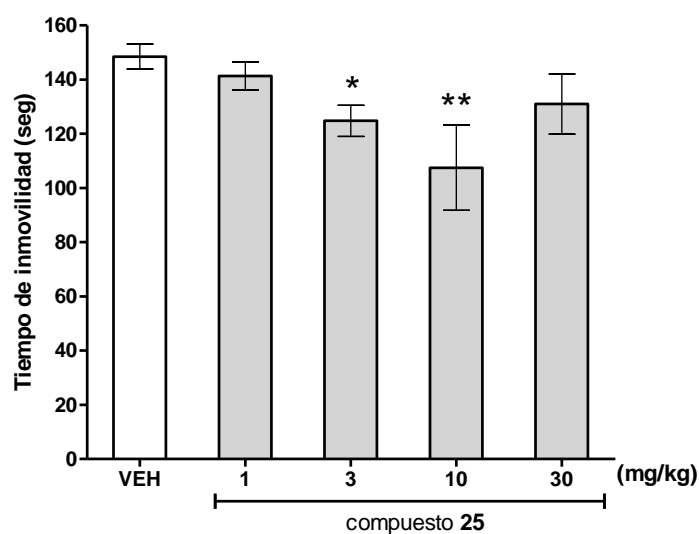


Figura 54. Efecto de 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el ensayo de suspensión por la cola. Se registró el tiempo de inmovilidad los últimos 4 min en sesiones de 6 min, 30 minutos después de administración i.p. de vehículo (VEH) y del compuesto **25** (1, 3, 10 y 30 mg/kg). Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del tiempo de inmovilidad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo control. Prueba de comparación múltiple de Dunnett luego del ANOVA (n= 6-16 ratones/grupo).

4.8.2.9 Ensayo del laberinto en cruz elevado

La 3,3-dibromoflavanona (**25**) a 1, 3 10 y 30 mg/kg, no mostró diferencias significativas en el número de entradas a las ramas abiertas, el tiempo pasado en las ramas abiertas y el número total de entradas en el ensayo del laberinto en cruz elevado respecto al grupo control vehículo (Figura 55). Por lo tanto, el compuesto **25** no presenta efectos ansiolíticos a las dosis ensayadas.

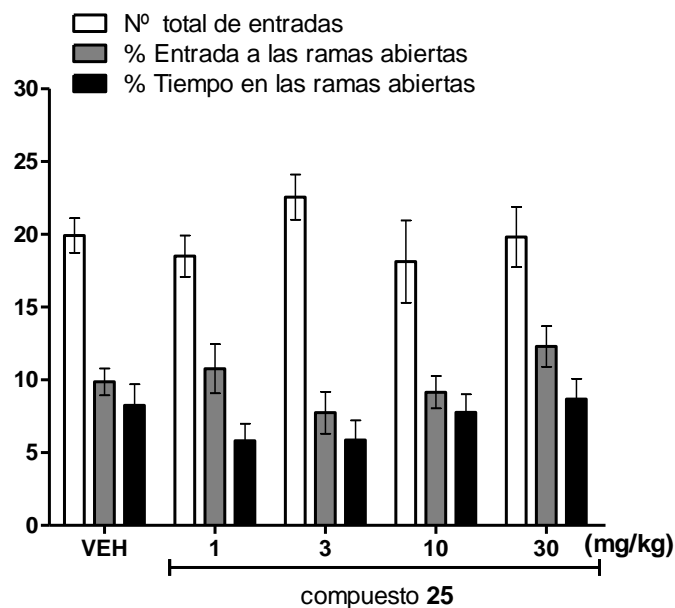


Figura 55. Efecto de la administración i.p. de 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el ensayo del laberinto en cruz elevado. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del porcentaje del número de entradas a las ramas abiertas, porcentaje del tiempo pasado en las ramas abiertas y el número total de entradas; registrados en sesiones de 5 min, 30 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **25** (1, 3, 10 y 30 mg/kg). Prueba de comparación múltiple de Dunnett luego de ANOVA (n= 8-12 ratones/grupo).

4.8.2.10 Ensayo de campo abierto con agujeros y la actividad locomotora espontanea

La administración i.p. de la flavanona **25** a 1, 10 y 30 mg/kg, no modificó significativamente, respecto del grupo control vehículo, los parámetros que se evalúan en el ensayo de campo abierto con agujeros: “Nº de holes”, “Tiempo de head-dipping” y “Nº de rearings” (Figura 56 A); ni en las cuentas medidas en el ensayo de la actividad locomotora (Figura 56 B). Por ende, no se observa un efecto sedativo de 3,3-dibromoflavanona (**25**) en las dosis ensayadas.

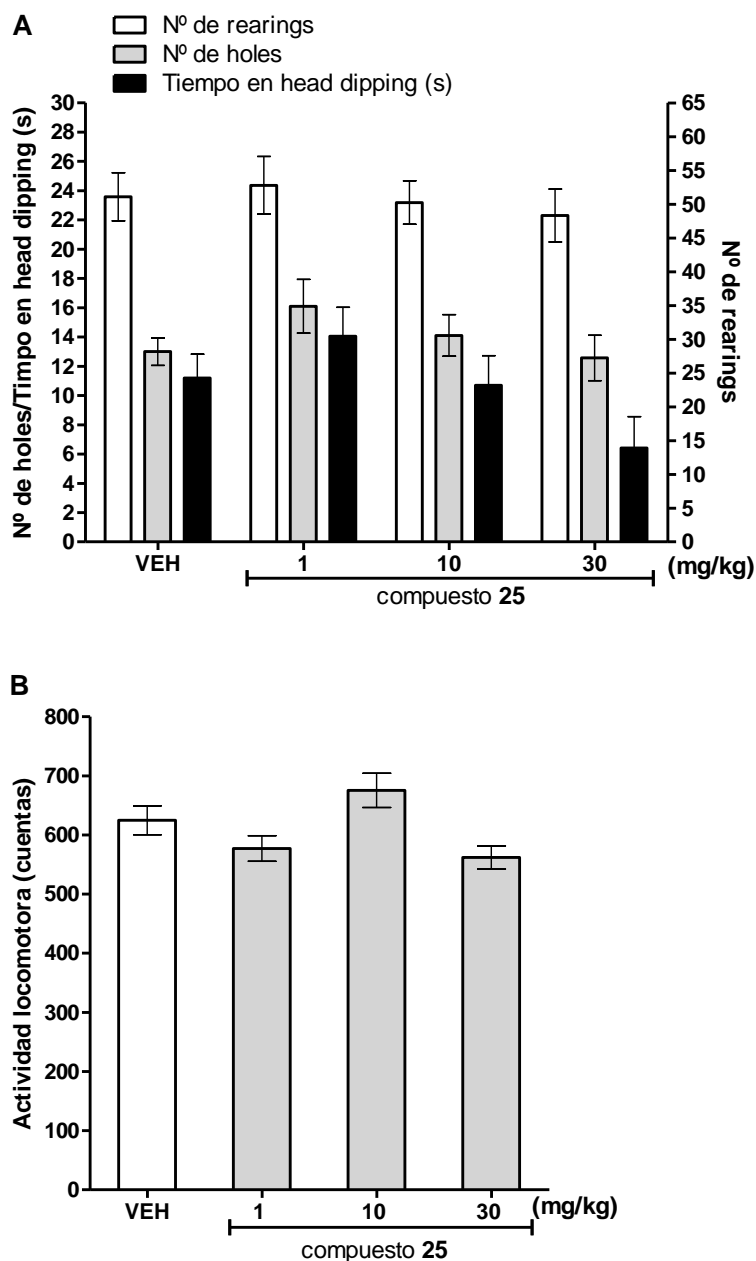


Figura 56. Efecto de la administración i.p. de la 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el ensayo del campo abierto con agujeros y la actividad locomotora. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. de (A) parámetros medidos en el ensayo del campo abierto con agujeros y (B) cuentas de la actividad locomotora espontánea, registrados en sesiones de 5 min, 30 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH) o del compuesto **25** (1, 10 y 30 mg/kg). Prueba de comparación múltiple de Dunnett luego de ANOVA (n = 7-12 ratones/grupo).

4.8.2.11 Ensayo del carbón activado

El efecto del compuesto **25** en el ensayo del carbón activado se muestra en la Figura 57. La 3,3-dibromoflavanona (**25**), a 30 mg/kg, no modificó el tránsito gastrointestinal de los ratones en comparación con los ratones tratados con vehículo (media del porcentaje de la distancia alcanzada por el carbón \pm E.S.M: 62.5 % \pm 4.5 % y

62.1 % \pm 3.6 %, respectivamente). Por otro lado, la morfina, a 6 mg/kg, disminuyó el tránsito gastrointestinal con una inhibición del 60.4 % (media del porcentaje de la distancia alcanzada por el carbón \pm E.S.M: 24.6 % \pm 3.2 %). Entonces, la flavanona **25** a la máxima dosis utilizada en los ensayos farmacológicos no genera constipación.

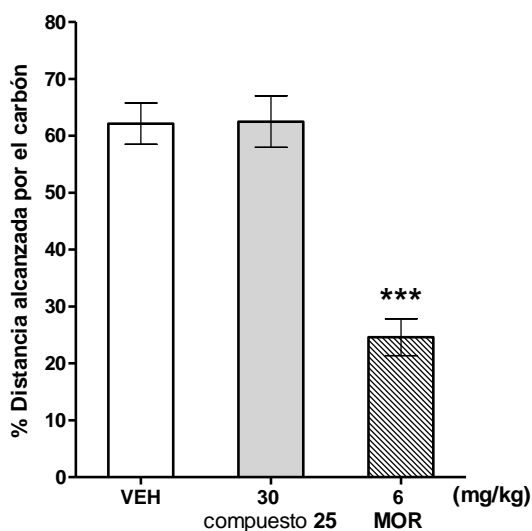


Figura 57. Efecto de la 3,3-dibromoflavanona (**25**) y la morfina en el ensayo del carbón activado. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del porcentaje de la distancia alcanzada por el carbón, 30 min luego de la administración i.p. de vehículo (VEH), morfina (MOR, 6 mg/kg) o del compuesto **25** (30 mg/kg). *** p <0.001 en comparación con el grupo control. Prueba de ANOVA seguido por prueba de comparación múltiple de Dunnett (n = 6 ratones/grupo).

4.8.2.12 Dependencia

En este trabajo se estudió si el compuesto **25** genera dependencia por medio de la evaluación de los signos correspondientes a la escala modificada de Gellert-Holtzman, descrita por Broseta y col. (2002) (Figura 58) y mediante el recuento en el número de saltos (Figura 59) producidos por la administración de naltrexona. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos por la administración de morfina, en roedores.

En primer lugar, se demostró que el grupo vehículo-naltrexona (VEH-NTX) no genera efectos significativos en los parámetros evaluados en la escala modificada de Gellert-Holtzman y en el número de saltos respecto al grupo control vehículo-salina (VEH-SAL). Los ratones dependientes de morfina, luego de la administración de naltrexona 1 mg/kg (MOR-NTX), aumentaron significativamente el valor en la escala de Gellert-Holtzman (Figura 58) y el número de saltos (Figura 59) con respecto al grupo ratones dependientes de morfina que recibió solución salina (MOR-SAL). En cambio, los

ratones pretratados con el compuesto **25** y luego tratados con vehículo (**25-SAL**) o naltrexona (**25-NTX**), no presentaron diferencias significativas. Por lo tanto, a diferencia de la morfina la administración de 3,3-dibromoflavanona (**25**) no desarrolla dependencia.

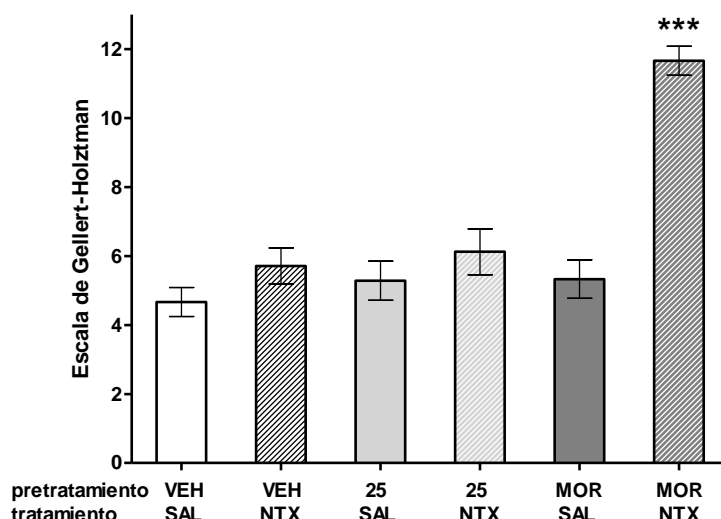


Figura 58. Efecto de 3,3-dibromoflavanona (**25**) y morfina en el ensayo de síndrome de abstinencia. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. de la escala de Gellert-Holtzman. Vehículo (VEH), morfina (MOR; 15, 30 y 60 mg/kg, i.p.) y compuesto **25** (25, 50 y 100 mg/kg, i.p.) fueron administrados dos veces por día, durante tres días. Luego se administró salina (SAL) o naltrexona (NTX; 1 mg/kg, i.p.). *** $p < 0.001$ significativamente diferente MOR-NTX vs MOR-SAL. Prueba de ANOVA seguida por prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls ($n = 6-8$ ratones/grupo).

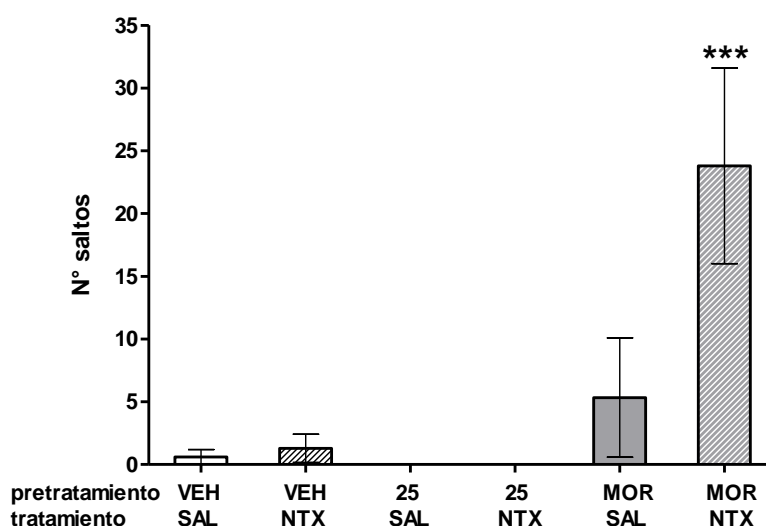


Figura 59. Efecto de 3,3-dibromoflavanona (**25**) y morfina en el ensayo de síndrome de retirada. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del número de saltos. Vehículo (VEH), morfina (MOR; 15, 30 y 60 mg/kg, i.p.) y compuesto **25** (25, 50 y 100 mg/kg) fueron administrados dos veces por día durante tres días. Luego se administró salina (SAL) o naltrexona (NTX; 1 mg/kg, i.p.). *** $p < 0.001$ significativamente diferente MOR-NTX vs. MOR-SAL. Prueba de ANOVA seguido por prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls ($n = 6-8$ ratones/grupo).

4.8.2.13 Estudio comparativo del tratamiento agudo y crónico

4.8.2.13.1 Evaluación del desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo

La Figura 60 muestra el efecto de la administración aguda y crónica del compuesto **25** (30 mg/kg) (A) y morfina (6 mg/kg) (B) en el ensayo de la plancha caliente. El análisis estadístico indicó un aumento significativo en el tiempo de latencia en comparación al grupo control vehículo para el tratamiento agudo (única administración) y crónico (durante 12 días) de 3,3-dibromoflavanona (**25**) a 30 mg/kg y de morfina a 6 mg/kg. Por lo que se evidencia el efecto antinociceptivo para ambos compuestos en los distintos tratamientos.

A su vez, la administración crónica de morfina disminuyó significativamente el tiempo de latencia con respecto a la administración aguda, lo que evidencia el desarrollo de tolerancia al efecto antinociceptivo luego de la administración repetida de la misma, pero no para la flavanona **25**.

4.8.2.13.2 Actividad locomotora espontánea

El efecto de la administración aguda y crónica del compuesto **25** y morfina sobre la actividad locomotora de los ratones se muestra en la Figura 61. La administración aguda y crónica de 3,3-dibromoflavanona (**25**) (Figura 61 A) y el tratamiento agudo de morfina (Figura 61 B) no presentaron cambios significativos en el número de cuentas con respecto al grupo control. Por lo que no afectan la actividad locomotora de los roedores.

En cambio, el tratamiento crónico con morfina aumentó de manera significativa la actividad locomotora con respecto al grupo control vehículo (Figura 61 B). Por lo tanto, se observa un efecto sobre la actividad locomotora de los ratones tras la administración crónica de morfina, pero no de la flavanona **25**.

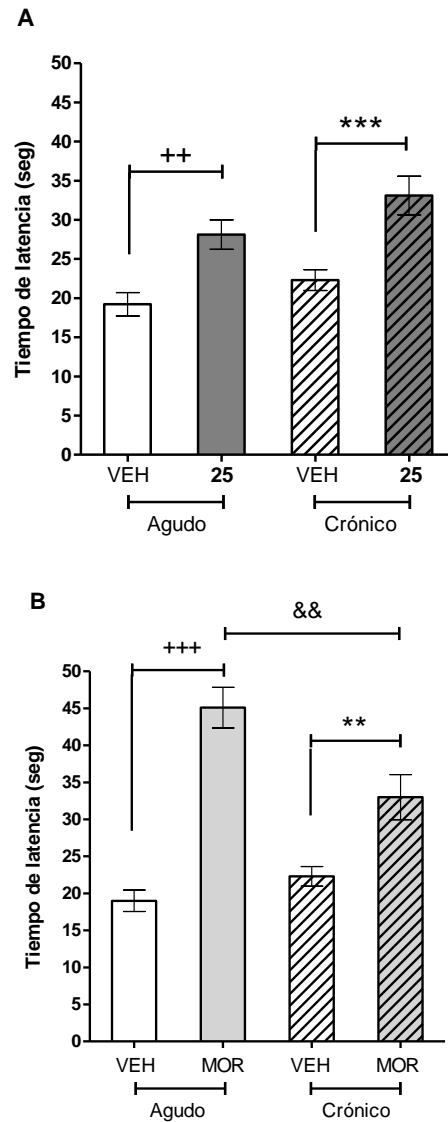


Figura 60. Efecto de la administración de (A) 3,3-dibromoflavanona (**25**; 30 mg/kg, i.p.) y (B) morfina (MOR; 6 mg/kg, i.p.) en el ensayo de la plancha caliente a 55 °C. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M del tiempo de latencia y fueron analizados por ANOVA de dos vías (tratamiento agudo vs. tratamiento crónico) seguido por la prueba de Bonferroni. Luego, cada tratamiento individual (agudo o crónico) fue analizado por la prueba de t de Student no apareado. $\&\&p < 0.01$ significativamente diferente tratamiento agudo vs. tratamiento crónico. $^+p < 0.05$, $^{++}p < 0.01$, $^{+++}p < 0.001$ significativamente diferente de VEH agudo; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ significativamente diferente de VEH crónico (n= 6-17 ratones/grupo).

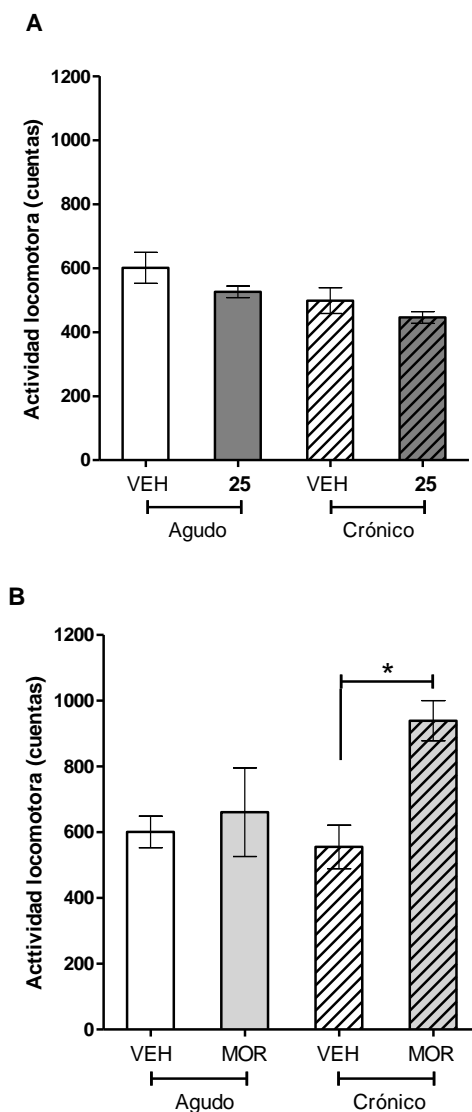


Figura 61. Efecto de la administración crónica de (A) 3,3-dibromoflavanona (**25**) y (B) morfina (MOR) en la actividad locomotora espontánea. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M de cuentas y fueron analizados por ANOVA de dos vías (tratamiento agudo vs. tratamiento crónico) seguido por la prueba de Bonferroni. Luego, cada tratamiento individual (agudo o crónico) fue analizado por la prueba de t de Student no apareado. * $p < 0.05$ significativamente diferente de VEH crónico (n= 6-17 ratones/grupo).

4.8.2.13.3 Ensayo del carbón activado

El tratamiento agudo y crónico de 3,3-dibromoflavanona (**25**) (Figura 62 A) no modificó el tránsito gastrointestinal de los ratones en comparación con los ratones tratados con vehículo (media del porcentaje de la distancia alcanzada por el carbón \pm E.S.M: compuesto **25** en tratamiento agudo 62.5 % \pm 4.5 % y en tratamiento crónico 67.24 % \pm 3.2 %; vehículo en tratamiento agudo 62.1 % \pm 3.6 % y en tratamiento crónico 68.71 % \pm 1.85 %). Por otro lado, la morfina (Figura 62 B) disminuyó el tránsito gastrointestinal tanto en tratamiento agudo como crónico con una inhibición del 60.4 %

y 52.5 %, respectivamente (media del porcentaje de la distancia alcanzada por el carbón \pm E.S.M: 24.6 % \pm 3.2 % en tratamiento agudo y 32.68 % \pm 2.9 % en tratamiento crónico). Entonces, tanto la administración aguda y crónica de morfina genera constipación en los roedores, pero este efecto no se observa para la flavanona **25** bajo ningún tratamiento.

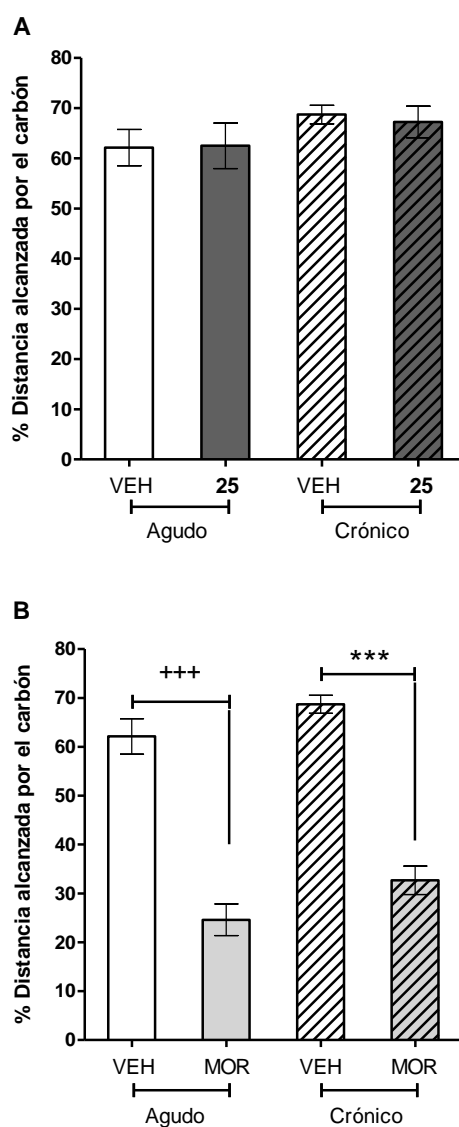


Figura 62. Efecto de la administración crónica de 3,3-dibromoflavanona (**25**) (A) y morfina (MOR) (B) en el ensayo del carbón activado. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M del porcentaje de la distancia alcanzada por el carbón y fueron analizados por ANOVA de dos vías (tratamiento agudo vs. tratamiento crónico) seguido por la prueba de Bonferroni. Luego, cada tratamiento individual (agudo o crónico) fue analizado por la prueba de t de Student no apareado. $^{+++}p < 0.001$ significativamente diferente de VEH agudo; $^{***}p < 0.001$ significativamente diferente de VEH crónico (n= 6-17 ratones/grupo).

4.8.3.13.4 Ensayo de la malla invertida

Algunos autores han reportado que la administración de morfina aumenta el número de animales que no supera la prueba en la prueba de la malla invertida (Ginski y Witkin, 1994; Koek y col., 2012). Es por ello que se evaluó si la administración crónica del compuesto **25** provoca incoordinación motora en el mismo ensayo.

La administración aguda y crónica de 3,3-dibromoflavanona (**25**) no presentó diferencias significativas en la proporción de ratones que trepa a la cara superior de la malla (Figura 63 A) y en el tiempo requerido por los animales para trepar (Figura 63 B) respecto al grupo control vehículo y entre ambos tratamientos. Por lo que el compuesto **25** no altera la coordinación motora de los ratones luego de su administración aguda y crónica.

4.8.2.14 Efecto antinociceptivo de la administración conjunta del compuesto 25 con morfina en el ensayo de la plancha caliente

Para evaluar el efecto de la administración conjunta de la flavanona **25** y morfina, se co-inyectó la flavanona a la mínima dosis que generó efecto antinociceptivo a nivel central junto con una dosis sub-analgésica (1 mg/kg) y analgésica de morfina (3 mg/kg), y luego se realizó el ensayo de la plancha caliente.

En la Figura 64 se muestra que el tratamiento i.p. con 3,3-dibromoflavanona (**25**) a 10 mg/kg aumentó significativamente el tiempo de latencia de los ratones con respecto al grupo control vehículo. Mientras que la administración i.p. de morfina a 1 mg/kg produjo un aumento en el tiempo de reacción de los ratones, pero sin presentar diferencias significativas respecto al control vehículo. La administración conjunta de ambos compuestos (10 + 1 mg/kg) incrementó significativamente el tiempo de latencia respecto al control vehículo, con una actividad que es aproximadamente la suma de los efectos de cada compuesto por separado.

Por otro lado, al aumentar la dosis de morfina, se observó un aumento significativo del tiempo de latencia para el grupo de ratones tratados i.p. con 3,3-dibromoflavanona (**25**) a 10 mg/kg, con morfina a 3 mg/kg y su administración conjunta (10 + 3 mg/kg) con respecto al grupo control vehículo. A su vez, se observaron diferencias significativas entre la administración conjunta (10 + 3 mg/kg) y el tratamiento de cada uno de los compuestos por separado (Figura 65).

Por lo tanto, se puede observar la suma de efectos para la administración del compuesto **25** a 10 mg/kg y su co-inyección con morfina 1 mg/kg (Figura 64) y 3 mg/kg (Figura 65).

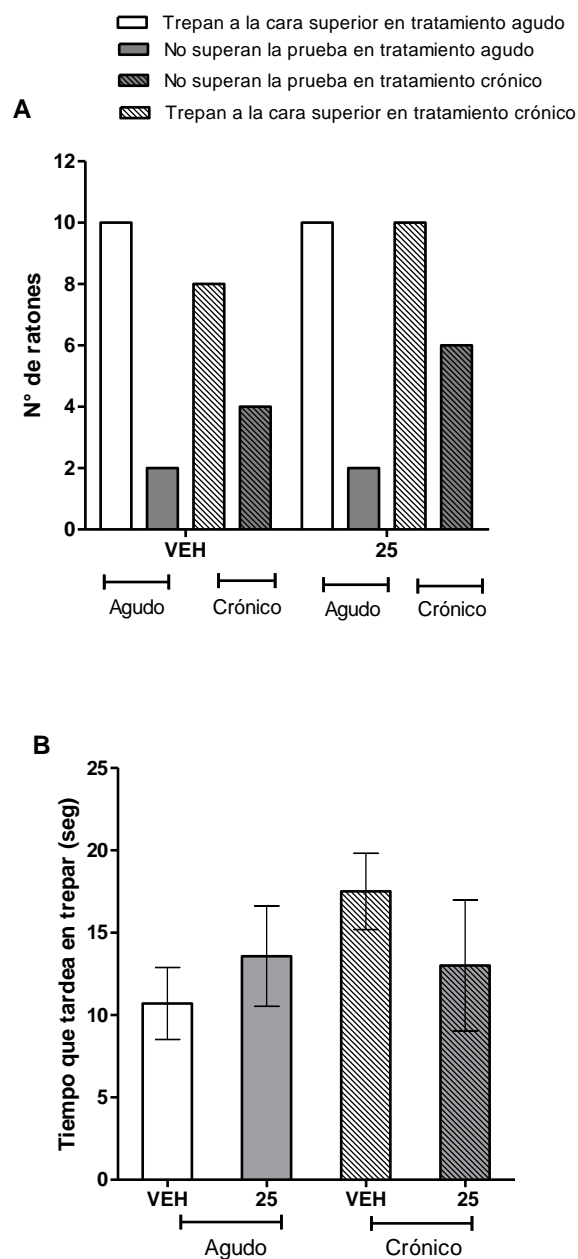


Figura 63. Efecto de la administración aguda y crónica de 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el ensayo de la malla invertida. (A) Número ratones que trepan a la cara superior de la malla o que no superan la prueba. Prueba de Chi- Square (B). Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del tiempo (seg) que tardan los ratones en trepar y fueron analizados por ANOVA de dos vías (tratamiento agudo vs. tratamiento crónico) seguido por la prueba de Bonferroni. Cada tratamiento individual (agudo o crónico) fue analizado por la prueba de t de Student no apareado (n= 6-10 ratones/grupo).

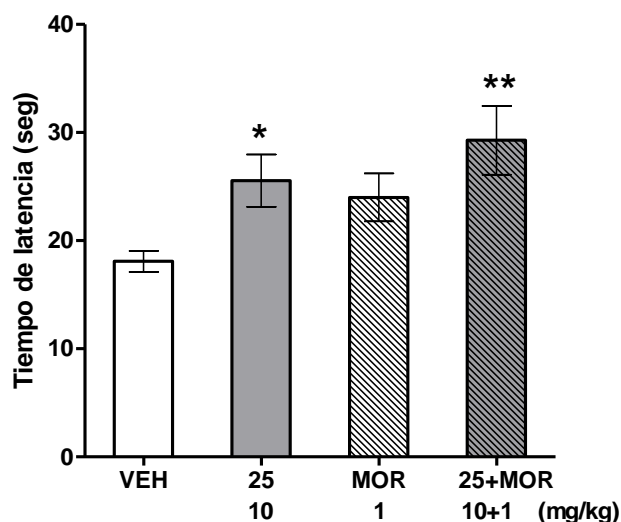


Figura 64. Efecto de 3,3-dibromoflavanona (**25**) combinada con morfina en el ensayo de la plancha caliente. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M. del tiempo de latencia en la prueba de la plancha caliente, 30 minutos después de la administración i.p. de vehículo (VEH), del compuesto **25** a 10 mg/kg (**25**), morfina 1 mg/kg (MOR) y su co-inyección (**25** + MOR). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significativamente diferente de VEH. Test de comparación múltiple de Newman-Keuls luego del ANOVA (n= 6-12 ratones/grupo).

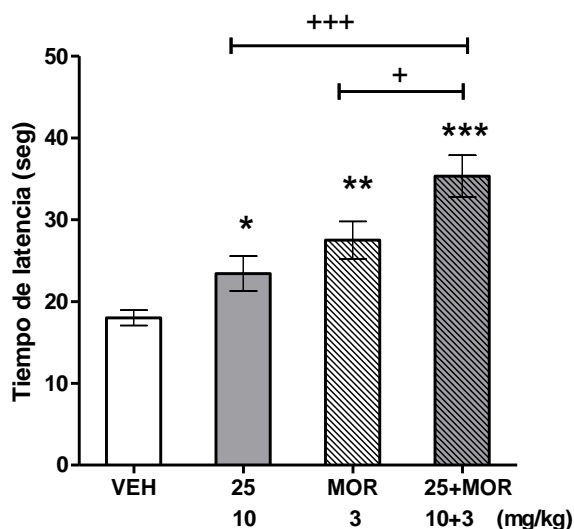


Figura 65. Efecto de 3,3-dibromoflavanona (**25**) combinada con morfina en el ensayo de la plancha caliente. Los resultados se expresan como media \pm E.S.M. del tiempo de latencia en la prueba de la plancha caliente, 30 minutos después de la administración i.p. de vehículo (VEH), del compuesto **25** a 10 mg/kg (**25**), morfina 3 mg/kg (MOR) y su co-inyección (**25**+MOR). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significativamente diferente de VEH; + $p < 0.05$ significativamente diferente de morfina 3 mg/kg, +++ $p < 0.001$ significativamente diferente de compuesto **25** 10 mg/kg. Test de comparación múltiple de Newman-Keuls luego del ANOVA (n = 6-12 ratones/grupo).

4.8.3 Discusión

De todos los compuestos sintetizados y estudiados, la 3,3-dibromoflavanona (**25**) presentó la mayor afinidad por el receptor μ -opioide. Esta flavanona, junto con la flavona xantomicrool (6,7,8-trimetoxi-4',5-dihidroxi-flavona), son los flavonoides descritos en la literatura con mayor afinidad por este receptor (Ruiu y col., 2015). A diferencia de esta flavona, que actúa como antagonista, el compuesto **25** presentó efectos antinociceptivos en el ensayo de la plancha caliente y de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético, por lo que se trata de un agonista de dicho receptor.

Los opiáceos naturales se encuentran clínicamente limitados por su mala biodisponibilidad, incapacidad de atravesar la BHE y por su rápida degradación enzimática *in vivo* (Lee y col., 2011). El aumento de la lipofilicidad de un fármaco puede aumentar la biodisponibilidad, dado que la lipofilicidad es un factor clave para penetrar la BHE con un aumento concomitante de su efecto analgésico. La metilación y la halogenación incrementan la lipofilicidad y la permeabilidad celular (Lee y col., 2011). Las flavanonas se unen a la albúmina en la sangre y luego de la absorción se distribuyen rápidamente a ciertos tejidos como el cerebro, los pulmones, el hígado, el corazón, el bazo y los riñones. Después de su ingestión, los principales metabolitos en plasma y tejidos son los glucurónidos y luego predomina la aglicona, aunque algunos productos de metabolización de flavanonas también podrían estar presentes en los tejidos. Varios estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las flavanonas son capaces de atravesar la BHE (Spencer y Crozier, 2012). También, se ha evidenciado que los flavonoides bromados pueden difundirse fácilmente a través de las membranas aumentando la concentración intracelular de estos compuestos. La 3,3-dibromoflavanona (**25**), que presentó un valor de cLogP de 4.30, ha demostrado *in vivo* la capacidad de penetrar la BHE y presentar efectos antinociceptivos a nivel central.

Para obtener el perfil farmacológico de la flavanona **25** se realizaron ensayos antinociceptivos, motores y conductuales en ratones. Debido a su promisorio actividad antinociceptiva, se la comparó con el fármaco de referencia morfina y se establecieron sus potenciales ventajas terapéuticas.

4.8.3.1 Pruebas motoras

En primer lugar, se realizaron pruebas de coordinación motora, malla invertida y Rotarod, donde se verificó que los resultados obtenidos en el muestreo (sección 4.4.2.4) se deben a efectos exclusivamente antinociceptivos y no a efectos motores.

4.8.3.2 Efecto antinociceptivo

Una vez que se confirmó su efecto analgésico, se amplió su estudio utilizando tres ensayos de nocicepción aplicando distinto tipo, intensidad y duración del estímulo doloroso con el fin de obtener el perfil completo de las propiedades antinociceptivas de la 3,3-dibromoflavanona (**25**).

Como ya se ha mencionado previamente, el ácido acético es un agente irritante que se utiliza como estímulo químico para generar dolor y evaluar preclínicamente drogas analgésicas de baja potencia (Barrot, 2012). El compuesto **25**, a 10 y 30 mg/kg, disminuyó el número de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético, por lo que se evidenció su acción antinociceptiva a nivel periférico/visceral. Por otro lado, en el ensayo de la plancha caliente, que se utiliza para detectar drogas analgésicas potentes empleando un estímulo térmico de corta duración, la flavanona **25** aumentó significativamente el tiempo de latencia a 10 y 30 mg/kg, demostrando su acción a nivel central. El efecto antinociceptivo máximo se alcanzó a los 20 min, se mantuvo relativamente estable hasta los 60 min y fue disminuyendo lentamente después de este tiempo, sin llegar a los valores del control hasta los 120 min. Este comportamiento es similar al presentado por la morfina (Kim y col., 2016; Popik y col., 2003).

El ensayo de nocicepción inducida por el agente irritante formalina es el ensayo más parecido al dolor clínico, ya que mide la respuesta a un estímulo nociceptivo moderado y continuo. La formalina actúa principalmente a través del receptor de potencial transitorio anquirina 1 (un miembro de la familia de canales iónicos del receptor de potencial transitorio (TRP)) presentes en los nociceptores. El agente irritante se inyecta por vía intradérmica en la superficie dorsal o plantar de una pata trasera, generando la respuesta refleja cuantificable de lamer la pata inyectada. La primera fase (primeros 5 min luego de la administración de formalina) es aguda y representa la estimulación química directa de los nociceptores (fibras C sensoriales seguido de liberación de la sustancia P), mientras que la segunda fase (del min 20 al min 40) es tónica y parece ser dependiente de la combinación de una reacción inflamatoria en el tejido periférico (diversos mediadores inflamatorios como el aumento de los niveles de las PG, la inducción de la COX y la liberación de ON) y la sensibilización central generada por cambios funcionales en el asta dorsal de la médula espinal. La facilitación del procesamiento nociceptivo a nivel central (como es el aumento de la sensibilidad en neuronas de la médula espinal) se cree que es consecuencia de la continua estimulación de los mediadores inflamatorios que generan un aumento de los canales iónicos en los

nociceptores, alterando la expresión o el transporte de los canales en la membrana. Los fármacos de acción central disminuyen el tiempo de lamida en ambas fases del ensayo, mientras que los fármacos que actúan a nivel periférico, tales como el ácido acetilsalicílico o la indometacina, sólo inhiben la segunda fase (Bannon y Malmberg, 2007; Tjølsen y col., 1992). Wu y col. (2001) y Wu (2002) demostraron que los receptores μ -opioides localizados a nivel supraespinal, así como los μ y $\delta 1$, en la médula espinal, participan en la mediación de las propiedades antinociceptivas del sistema opioide endógeno en las respuestas nociceptivas inducidas por la formalina. La administración i.p. de 10 y 30 mg/kg de 3,3-dibromoflavanona (**25**) disminuyó significativamente el tiempo de lamida en ambas fases de la prueba de la formalina, lo que demuestra su acción a nivel central.

Por lo tanto, la flavanona **25** ha demostrado actividad antinociceptiva ante diferentes tipos de estímulos dolorosos, revelando su alta capacidad de acción antinociceptiva. Para ampliar el perfil de las propiedades antinociceptivas de este compuesto, se contempla realizar otros modelos animales relacionados con el dolor neuropático.

4.8.3.3 Estudio del mecanismo de acción *in vivo*

Para investigar el mecanismo de acción del compuesto **25** se realizaron experimentos de bloqueo *in vivo* de receptores que están implicados en el mecanismo de dolor.

El sistema adrenérgico es uno de los sistemas de neurotransmisión más importante en el SNC de los mamíferos. Los receptores α -adrenérgicos juegan un papel crítico en la regulación de muchos procesos, incluyendo la contracción del músculo liso, cambios ionotrópicos y cronotrópicos a nivel del miocardio y el metabolismo de la glucosa hepática (Tanoue y col., 2002). También, se describió la participación del receptor $\alpha 1$ -adrenérgico en la etiología del dolor (Perl, 1999) y en las respuestas nociceptivas en ratones (Tanoue y col., 2002). Por otro lado, los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos centrales median acciones sedantes-hipnóticas, analgésicas, hipotensoras y ansiolíticas (Lakhiani y col., 1997). Los tres subtipos de receptores $\alpha 2$ ($\alpha 2A$, $\alpha 2B$, y $\alpha 2C$) están implicados en la regulación de la percepción del dolor (Philipp y col., 2002). La prazosina y la yohimbina son antagonistas selectivos de los receptores $\alpha 1$ y $\alpha 2$ adrenérgicos, respectivamente, pero no diferencian entre los subtipos de receptores (Bourin y col., 2005; Yue y col., 2007). Ambos antagonistas, prazosina y yohimbina, no fueron capaces de bloquear la acción

antinociceptiva del compuesto **25** en el ensayo de la plancha caliente a las dosis ensayadas, lo que demuestra que los receptores α_1 y α_2 adrenérgicos no están involucrados en la actividad antinociceptiva de este compuesto.

El sistema serotoninérgico está implicado en la regulación de muchas funciones fisiológicas y de comportamiento, incluyendo el estado de ánimo, el sueño y el apetito (Schloss y Williams, 1998). Los múltiples tipos de receptores de 5-HT presentes a nivel espinal cumplen distintas funciones en la modulación de la nocicepción (Millan, 1994). Las actividades de los receptores de 5-HT son complejas y a veces incluso opuestas, dependiendo de (1) el subtipo de receptor que se activa, (2) la relación de las acciones pre o postsinápticas de los receptores, (3) la calidad e intensidad del estímulo el nociceptivo y (4) el efecto dosis dependiente de los agonistas o antagonistas de los subtipos de receptores serotoninérgicos pudiendo generar efectos pro o anti nociceptivos (Millan, 2002). Varios trabajos demostraron que los receptores 5-HT₂ están implicados en la modulación de la percepción del dolor, actuando a nivel espinal y supraespinal (Ormazábal y col., 1999). Los subtipos 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} predominan en el SNC. Entre otras funciones, el subtipo 5-HT_{2C} posee un papel importante en la ansiedad y la depresión (Millan, 2005). El pretratamiento de los ratones con ketanserina, un antagonista del receptor 5-HT_{2A/C}, no logró inhibir la acción antinociceptiva de la flavanona **25** en las dosis ensayadas, lo que evidenció que los receptores 5-HT_{2A/C} no están implicado en esta acción.

El sistema opioide endógeno es crítico para muchas funciones fisiológicas y del comportamiento. Desempeña un rol fundamental en la modulación del dolor y los comportamientos afectivos (Bodnar y Klein, 2006). La mayoría de los fármacos opiáceos utilizados en la clínica, como la morfina, son relativamente selectivos para los receptores de tipo μ . Sin embargo, existe una controversia entre los autores en el papel de los tres tipos de receptores opioides en la modulación del dolor. Por un lado, Porreca y col (1987), sugirieron que los agonistas de los receptores μ -opioide son analgésicos potentes frente a estímulos nocivos térmicos y químicos a nivel supraespinal y espinal; los receptores δ opioide solamente están implicados en la atenuación de la nocicepción espinal inducida térmicamente, mientras que los receptores κ opioide modulan la nocicepción generada químicamente a nivel espinal. Por otro lado, otros autores postulan que los receptores κ opioide presentes en el cerebro y en la médula espinal antagonizan la analgesia inducida por morfina y otros agonistas del receptor μ -opioide (Gray y col., 2006; Pan, 1998).

Para el estudio de la participación de los receptores opioides en el efecto antinociceptivo de 3,3-dibromoflavanona (**25**) se utilizaron los antagonistas naltrexona y los antagonistas selectivos de los receptores κ y δ opioides, norbinaltorfimina y naltrindol respectivamente. Sólo la naltrexona logró bloquear la acción antinociceptiva de la 3,3-dibromoflavanona (**25**), reforzando la participación de los receptores μ -opioide en su mecanismo de acción.

4.8.3.4 Efecto de la 3,3-dibromoflavanona (25) en las comorbilidades asociadas al dolor crónico

Pacientes con dolor crónico persistente generalmente presentan varias comorbilidades. Entre un 50% y 87% de estos individuos sufren depresión, que, si no es tratada, puede afectar negativamente el tratamiento del dolor y la calidad de vida generando dolores más intensos, de larga duración y en mayores localizaciones que los pacientes que no la padecen (Erickson, 2005). El dolor y la depresión, a menudo, están emparentados, presentando mecanismos neuroquímicos en común. Anteriormente, se pensaba que la relación recíproca entre el dolor y la depresión se debía principalmente a factores psicológicos más que a biológicos. Actualmente se estableció que su anatomía compartida contribuye a esta interacción. La corteza somatosensorial interactúa con la amígdala, el hipotálamo, y la circunvolución del cíngulo anterior (zonas que regulan las emociones y la respuesta al estrés) para generar la experiencia física y mental de dolor. Estas mismas regiones también contribuyen a la ansiedad y la depresión. Además, ambas enfermedades poseen vías fisiopatológicas compartidas, como procesos inflamatorios, anomalías de los ejes hipotálamo-hipofisario-suprarrenal y alteración de neurotransmisores, principalmente serotonina y noradrenalina (Gerrits y col., 2012; Schreiber y col., 2002). Fármacos antidepresivos (principalmente ATC, pero también los ISRS) son ampliamente prescritos como analgésicos para el tratamiento del dolor severo en pacientes no deprimidos, dado que bloquean la recaptación de serotonina y noradrenalina, que participan en la modulación del dolor. Sin embargo, su mecanismo de acción antinociceptivo todavía no está determinado. Aparentemente involucraría una potenciación directa del sistema opioide central endógeno o la activación de un efecto antinociceptivo mixto mediada por vías serotoninérgicas y/o noradrenérgicas o combinaciones de estos mecanismos. Se ha informado que el efecto antinociceptivo de los ATC clomipramina y amitriptilina, y su potenciación de la antinocicepción inducida

por la morfina, parece estar relacionado a una activación del sistema opioide endógeno mediado por la serotonina (Schreiber y col., 2002).

Por otro lado, investigaciones sobre adherencia a tratamientos han demostrado que los pacientes deprimidos son más propensos a expresar actitudes negativas hacia el uso de medicamentos, y que son menos propensos a adherirse a los regímenes de medicamentos recetados a través de una variedad de enfermedades crónicas (Howe y col., 2012). Por lo que una droga efectiva para ambas patologías representaría una importante ventaja terapéutica, aumentando la eficacia, y, además incrementando la adherencia al tratamiento al disminuir el número de fármacos que el paciente debe consumir. Teniendo esto en cuenta, se decidió estudiar si la flavanona **25** presenta efectos símil-antidepresivos. El ensayo de suspensión por la cola, reveló que el compuesto **25** a 3 y 10 mg/kg disminuye el tiempo de inmovilidad de los ratones. Al no presentar cambios en la actividad locomotora espontánea en un amplio rango de dosis, se comprobó que posee actividad símil-antidepresiva. Por los datos obtenidos en los ensayos *in vitro*, esta flavanona no presenta afinidad por el receptor 5-HT_{1A} y tampoco inhibe a la hMAO A y B. Además, el ensayo de bloqueo *in vivo* del receptor 5-HT_{2C} demostró que no actúa a través del mismo. Por lo que otros mecanismos estarían involucrados en la generación del efecto símil-antidepresivo, o metabolitos activos, que no se evalúan en los ensayos *in vitro*, podrían mediar este efecto. El resultado obtenido para este compuesto es relevante, ya que la combinación de trastornos depresivos con el dolor se asocia con un peor resultado clínico y a la falta de adherencia al tratamiento. Por lo tanto, la 3,3-dibromoflavanona (**25**) es un compuesto promisorio no solo para tratar el dolor, sino que también para el tratamiento de esta comorbilidad. El mecanismo de acción es diferente al de los fármacos antidepresivos utilizados como analgésicos, ya que estos potenciarían el sistema opioide central endógeno, mientras que el compuesto **25** lo activaría directamente. Se contempla en el futuro, estudiar el efecto símil-antidepresivo luego de la administración crónica y en otros modelos animales de depresión, como el ensayo de nado forzado.

También, los pacientes con dolor crónico, con frecuencia, presentan trastornos de ansiedad. Si bien este compuesto no presentó afinidad por el su-BDZ, algunos derivados de flavanona, tales como 6-bromoflavanona y la 5-metoxi-6,8-dibromoflavanona han mostrado actividad ansiolítica el ensayo de laberinto en cruz elevado, pero se desconoce su mecanismo de acción (Ognibene y col., 2008). Por lo que, se decidió evaluar la posible actividad ansiolítica de 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el mismo ensayo. El compuesto **25**

no mostró efecto ansiolítico en ratones a las dosis ensayadas. Según lo sugerido por Ognibene y col. (2008), la sustitución con un átomo de bromo en la posición 6 del núcleo flavanona es esencial para incrementar las propiedades ansiolíticas en estos compuestos.

4.8.3.5 Estudio de los efectos adversos más comunes que presentan los opiáceos

A pesar de los intentos para desarrollar otras terapias efectivas para paliar el dolor, los analgésicos opioides continúan siendo el pilar para el tratamiento del dolor moderado a severo. Sin embargo, el uso de analgésicos opioides está asociado con un número de efectos adversos que limitan su uso clínico, como dependencia física, sedación, constipación y tolerancia a sus efectos analgésicos. En roedores, la morfina también genera una respuesta bifásica sobre la locomoción (Holzer, 2015; Neubert y col., 2007). En este trabajo se evaluó si el compuesto **25** presenta los efectos adversos característicos de la droga de referencia, morfina.

4.8.3.5.1 Sedación

El efecto del tratamiento agudo de 3,3-dibromoflavanona (**25**) en el comportamiento general de ratones fue estudiado mediante el ensayo de campo abierto con agujeros. También, se evaluó el efecto de este compuesto en el ensayo de la actividad locomotora, ya que ambos ensayos se utilizan comúnmente asociados para evaluar efectos sedantes de los compuestos (Vogel, 2008). La administración i.p. del compuesto **25** no disminuyó la exploración ni la actividad locomotora de los animales, descartando que esta flavanona ejerza efectos sedativos a las dosis ensayadas.

4.8.3.5.2 Constipación

La constipación es el efecto secundario no deseado más frecuente de la morfina que puede aparecer incluso después de una única administración (Kromer, 1988). El sistema nervioso entérico de roedores y seres humanos expresa todos los subtipos principales de receptores opioides. El subtipo μ_2 desempeña un papel destacado en los efectos inhibitorios sobre la motilidad intestinal de la administración sistémica de morfina, mediado tanto por receptores localizados a nivel central como a nivel periférico (Matsumoto y col., 2006). Los agonistas opiáceos suprimen el impulso neuronal excitatorio inhibiendo la liberación de neurotransmisores excitatorios como la ACh y bloqueando las contracciones peristálticas. También, inhiben el vaciado gástrico, aumentan el tono muscular pilórico, alteran los complejos mioeléctricos migratorios,

retrasan el tránsito a través del intestino delgado y grueso y elevan la presión del esfínter anal de reposo. La suspensión de la motilidad propulsora se combina con la inhibición del transporte de iones y fluidos gastrointestinales. Como resultado se genera constipación y malestar abdominal, dos aspectos importantes de la disfunción intestinal inducida por opioides.

El retraso en el tránsito gastrointestinal y el estreñimiento son los efectos secundarios más comunes, y a menudo discapacitantes, de los analgésicos opioides. Sin embargo, son sólo un síntoma de disfunción intestinal inducida por opioides, cuyas manifestaciones comprenden evacuación incompleta, distensión abdominal, malestar abdominal y aumento de reflujo gastro-esofágico. Además, puede dar lugar a complicaciones secundarias, como la pseudo-obstrucción del intestino, anorexia, náuseas y vómitos (Holzer, 2015). En el caso de la morfina, la dosis utilizada para ejercer efecto analgésico es mayor a la requerida para reducir la motilidad gastrointestinal. Por lo tanto, la constipación no es una cuestión menor cuando se utiliza la morfina como analgésico (Matsumoto y col., 2006). En este trabajo se demostró que, a diferencia de la morfina, la administración de la dosis máxima utilizada del compuesto **25** (30 mg/kg) no inhibió el tránsito gastrointestinal en el ensayo del carbón activado, por lo que presenta la ventaja de no producir constipación. Una probable explicación para dicho efecto podría ser que 3,3-dibromoflavanona (**25**) actuó a través del subtipo μ_1 , ya que se ha sugerido que la analgesia de los opiáceos estaría mediada por el subtipo μ_1 , mientras que los receptores μ_2 estarían involucrados en la inhibición del tránsito gastrointestinal (Matsumoto y col., 2006). Futuros estudios con los antagonistas específicos para el receptor μ , β -funaltrexamina, y para el subtipo μ_1 , naloxonazina, serían necesarios para corroborar esta hipótesis.

4.8.3.5.3 Dependencia

Existen datos que apoyan la existencia de una doble vía en la expresión de los síntomas físicos y motivacionales en el síndrome de abstinencia a los opiáceos. El locus coeruleus y la sustancia gris periacueductal juegan un papel importante en la aparición y desarrollo de los síntomas físicos de abstinencia (Rodríguez-Arias y col., 1999).

Algunos de los mecanismos moleculares por los cuales se desarrolla la dependencia son: cambios en enzimas citoplasmáticas y mitocondriales que pertenecen a las familias de GTPasas y ATPasas, la sobrerregulación del sistema adenilato ciclasa (AC)/cAMP-proteínquinasa A, cambios funcionales en los receptores β adrenérgicos y la

proteínquinasa C, inducción de la expresión dinámica de los receptores AMPA y alteración en la síntesis del ON en varias regiones de SNC (Bodnar, 2014, 2007; Javadi y col., 2013; Nestler, 2001; Suzuki y Misawa, 1997).

En los roedores, el síndrome de abstinencia a la morfina se define como un conjunto de signos y síntomas generales que se producen en animales dependientes de morfina por la privación de la misma (Rodríguez-Arias y col., 1999). Este síndrome fue precipitado por la administración del antagonista opiáceo naltrexona, y se evaluó la presencia de algunos signos: pérdida de peso, número de saltos, número de sacudidas del cuerpo, diarrea, ptosis, postura anormal y erección o eyaculación (acicalamiento genital), que componen la escala de Gellert y Holtzman modificada por Broseta y col (2002) utilizada en esta Tesis. Los ratones dependientes de morfina, luego de la administración de naltrexona, aumentaron de manera significativa el valor en la escala de Gellert y Holtzman con respecto a los que recibieron solución salina, lo que denota la dependencia a la misma. En cambio, los ratones administrados con el compuesto **(25)** que recibieron naltrexona o salina, no evidenciaron cambios en los signos evaluados respecto al grupo control. Por lo que, a diferencia de la morfina, la flavanona **25** no desarrolló dependencia. Además, el salto es la herramienta más utilizada para cuantificar la intensidad de la abstinencia de morfina en roedores. Es interpretado como un intento de escape a la incomodidad que experimentan los animales durante el síndrome de retirada y se ha determinado que el sistema noradrenérgico central puede facilitar este comportamiento (Azizi y col., 2012). Al igual que en la escala de Gellert y Holtzman, sólo los ratones tratados con morfina y naltrexona aumentaron significativamente el número de saltos, indicando la fuerte dependencia que genera la administración de este fármaco.

Se ha establecido que los agonistas de los receptores opioides de los subtipos μ y δ , pero no de los subtipos κ , generan dependencia física. Se sugiere que el desarrollo de la dependencia a la morfina se debe predominantemente a la activación de los subtipos μ_1 y μ_2 . El primero, juega un papel importante en la mediación de los saltos y sacudidas del cuerpo generados por la precipitación del síndrome de retirada por medio de antagonistas como la naltrexona, mientras que el subtipo 2 está implicado en la pérdida de peso, diarrea y ptosis en ratones tratados crónicamente con morfina. Otros estudios han revelado que los agonistas de los subtipos μ y δ_1 activan el sistema dopaminérgico mesolímbico para inducir un efecto de recompensa, mientras que este efecto puede ser producido a través de un sistema no dopaminérgico para los agonistas de los receptores δ_2 . A su vez, existen interacciones complejas entre los tipos de receptores opioides. La

activación de los receptores κ suprime la dependencia física y psíquica sobre los agonistas de los receptores μ y δ opioide, mientras que la activación del receptor δ -opioide potencia la dependencia de los agonistas de receptores μ -opioide. A su vez, el bloqueo selectivo de los receptores δ -opioide por naltrindol inhibe el desarrollo de dependencia física de la morfina (Narita y col., 2001; Suzuki y Misawa, 1997). Esto podría explicar los resultados obtenidos para el compuesto **25**. Por un lado, según lo analizado en el ensayo de carbón activado, esta flavanona no actuaría por el subtipo μ_2 , por lo que se explica la falta en los signos de pérdida de peso y diarrea en los ratones evaluados. Asimismo, por los ensayos de bloqueo, hemos determinado que los receptores δ no están implicados en su mecanismo de acción, por lo que no se generan los signos de dependencia a partir de este receptor, ni se potenciarían los signos a través del subtipo μ_1 .

La falta de generación de dependencia a las dosis ensayadas de la 3,3-dibromoflavanona (**25**) representa una gran ventaja terapéutica, ya que el abuso y la adicción de opioides en la población con dolor crónico ha incrementado notoriamente y es un tema de suma importancia. Informes de pacientes que padecen dolor crónico con abuso de opioides y muertes asociadas continúan aumentando a un ritmo alarmante en todo el mundo (Manchikanti y col., 2013).

4.8.3.5.4 Estudio comparativo del tratamiento agudo y crónico

4.8.3.5.4.1 Tolerancia

La tolerancia se presenta con diferente intensidad y curso temporal sobre sus diversos blancos de acción. Así, en un tratamiento crónico con morfina, inicialmente se desarrolla tolerancia a la sedación, náuseas y vómitos; tiempo después, a la depresión respiratoria y a la analgesia, y casi no se desarrolla para la miosis y la constipación (Hernández-Delgadillo y Cruz, 2005).

Este efecto involucra la participación de diversos sistemas de neurotransmisión y adaptaciones a diferentes niveles subcelulares. No parece tratarse de un fenómeno farmacocinético, ya que no se observan diferencias significativas en los metabolitos de pacientes que han recibido tratamientos crónicos y agudos con opiáceos. La administración crónica de opioides produce cambios en el nivel de receptores (desensibilización por fosforilación; internalización o endocitosis; y degradación), de segundos mensajeros (hipertrofia del sistema de la adenilato ciclasa, incremento de la activación de los canales de Ca^{2+} , pérdida de la activación de los GIRKs y un aumento en la hidrólisis de los lípidos de inositol) y de otros sistemas de neurotransmisión (se produce

un incremento de péptidos antiopioides, como la colecistocinina (CCK), el neuropéptido FF y la orfanina) (Hernández-Delgadillo y Cruz, 2005).

En este trabajo se evaluó si la administración crónica del compuesto **25** desarrolla tolerancia a su efecto antinociceptivo y se la comparó con la droga de referencia morfina. Los resultados indicaron que una administración diaria de 3,3-dibromoflavanona (**25**) i.p durante doce días no disminuye su efecto antinociceptivo, ya que no se redujo el tiempo de latencia en los ratones tratados crónicamente en comparación con el tratamiento agudo. En cambio, la morfina presentó una disminución significativa de su efecto antinociceptivo tras su administración crónica.

4.8.3.5.4.2 Efectos motores

La morfina genera un efecto bifásico sobre la actividad locomotora que depende de la dosis y del tiempo transcurrido después del tratamiento. Al comienzo se observa un período de reducción de la actividad locomotora (sedación), seguido por un período de hiperactividad. Se ha observado que la administración crónica de morfina en diversas especies de animales de experimentación genera tolerancia marcada al efecto sedativo y se cree que los cambios observados en la actividad locomotora se deben a modificaciones, generados por los agonistas opioides, en el sistema mesolímbico dopaminérgico y/u otros sistemas de neurotransmisores como el glutamatérgico (Timár y col., 2005). En esta Tesis no se observó una respuesta bifásica para los ratones tratados con morfina porque el efecto sedativo de la morfina se observa a dosis mayores a la utilizada aquí. En cambio, se observa claramente un aumento de la actividad locomotora tras la administración crónica de la misma. Por el contrario, la 3,3-dibromoflavanona (**25**) no presentó cambios en la actividad locomotora luego de ambos tratamientos.

Además de su capacidad para estimular la locomoción, la morfina puede interferir en la coordinación motora. Se ha reportado que la morfina afecta la coordinación de los roedores en la prueba de la malla invertida y del alambre horizontal (Ginski y Witkin, 1994; Koek y col., 2012). En cambio, el compuesto **25** no generó incoordinación motora a la dosis evaluada en el ensayo de la malla invertida.

4.8.3.5.4.3 Constipación

A diferencia de otros efectos adversos de la terapia crónica con opiáceos como sedación, náuseas y vómitos que a menudo se resuelven con el uso, la disfunción intestinal inducida por opioides generalmente persiste durante todo el tratamiento (Holzer, 2015).

La constipación que esta genera puede convertirse en un problema importante durante la administración crónica de opiáceos. Los síntomas asociados a esta disfunción pueden afectar profundamente a la calidad de vida y, en algunos pacientes pueden ser tan grave que prefieren interrumpir la terapia analgésica en lugar de experimentar las molestias que surgen a partir de esta (Holzer, 2015). Por lo que el alivio de los efectos adversos gastrointestinales mejora notablemente la calidad de vida de los pacientes. En los ensayos realizados en este trabajo, se ratificó que la morfina disminuye el tránsito gastrointestinal tras su administración aguda y crónica, y que no se desarrolla tolerancia a este efecto. Por su parte, la flavanona **25** no modificó la motilidad gastrointestinal en ningún tipo de tratamiento.

4.8.3.5.4.4 Ventajas del tratamiento crónico con 3,3-dibromoflavanona (25)

En los últimos años ha habido un importante aumento en el uso de la terapia crónica con opiáceos para pacientes con dolor crónico no oncológico. Sin embargo, los estudios observacionales sugieren que una gran parte de los pacientes (mayor de un tercio de los que utilizan opioides por vía oral) discontinúan su uso en el plazo de 6 meses debido a los efectos adversos o alivio del dolor insuficiente (Howe y col., 2012). Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antinociceptiva y menores efectos secundarios. En este contexto, la 3,3-dibromoflavanona (**25**) resulta un compuesto promisorio, ya que el tratamiento crónico en roedores demostró que posee potenciales ventajas terapéuticas en comparación con el opiáceo estándar morfina, porque a la dosis que genera efectos antinociceptivos, no presenta los efectos adversos característicos como tolerancia, alteración de la actividad locomotora y constipación.

4.8.3.6 Administración conjunta de morfina con 3,3-dibromoflavanona (25)

Otra alternativa para mejorar los efectos terapéuticos y reducir la incidencia de efectos secundarios no deseados es utilizar una combinación de drogas. El uso de combinaciones de medicamentos que ofrecen sinergismo analgésico permite una reducción de la dosis requerida y una disminución de la incidencia de efectos adversos (Déciga-Campos y col., 2003). Los estudios realizados revelaron que la administración de morfina y el compuesto **25**, no genera un efecto sinérgico ya que dicha combinación no ejerció un efecto mayor que la suma de los efectos de cada droga por separado. En cambio, se observó un efecto aditivo a las dosis evaluadas. Para confirmar que se trata de una interacción de tipo aditiva es necesario realizar un estudio isoblográfico.

En conclusión, la 3,3-dibromoflavanona (**25**) surge como un nuevo compuesto promisorio con actividad antinociceptiva mediada por el receptor μ -opioide, sin presentar los efectos adversos característicos de la morfina como: tolerancia, dependencia, alteración de la actividad locomotora, incoordinación motora, sedación y constipación a las dosis evaluadas en roedores. Además, presenta la ventaja de ejercer un efecto similar-antidepresivo, por lo que podría utilizarse para el tratamiento conjunto del dolor y su comorbilidad frecuente, la depresión.

Discusión

5 Discusión general

La presente Tesis comprende desde el diseño de compuestos hasta el estudio de sus efectos en modelos animales de EA, ansiedad, depresión y dolor. El objetivo fue desarrollar compuestos para el tratamiento no solo de estas patologías, sino también para sus comorbilidades. De esta manera este trabajo aporta una visión integral de la terapéutica de las enfermedades, con el fin primordial de desarrollar nuevos compuestos que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

En esta Tesis se expuso que los derivados de flavonoides del tipo **chalcona** son compuestos con capacidad de actuar en diferentes blancos biológicos implicados en la EA, la ansiedad, la depresión y el dolor como: muAChE, hMAO B, agregación del péptido A β ₁₋₄₂, su-BDZ, receptor 5HT_{1A} y μ -opioide. La mayoría de los derivados de chalconas sintetizados presentaron actividad en uno o más blancos, como se detalla en forma de resumen en la Tabla 24. En particular se puede mencionar que la 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**) presentó la mayor actividad inhibitoria sobre la muAChE, la 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona (**4**) sobre la hMAO B y la 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) sobre la agregación del péptido A β ₁₋₄₂. La 3-nitrochalcona (**17**) fue el compuesto que presentó mayor afinidad para el su-BDZ, la 6'-metoxi -2'-hidroxichalcona (**5**) para el receptor serotoninérgico 5HT_{1A} y la 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) para el receptor μ -opioide. El núcleo chalcona (**1**) presentó actividad sobre los tres receptores estudiados y sobre la enzima hMAO B.

Tabla 24. Actividad de los compuestos sintetizados sobre diversos blancos biológicos

| Nº | Compuesto | muAChE CI ₅₀ (µM) | hMAO B CI ₅₀ (µM) | % inhibición agregación Aβ ₁₋₄₂ (10 µM) | su-BDZ Ki (µM) | 5HT _{1A} Ki (µM) | µ-opioide Ki (µM) |
|----|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------|-------------------------|
| 1 | chalcona | - | 1.8 ± 0.1 | 0.0 ± 5.9 | 2.8 ± 1.0 | 20.8 ± 1.5 | 28.2 ± 9.9* |
| 2 | 2'-hidroxichalcona | - | 3.1 ± 0.6 | 0.0 ± 5.6 | 17.1 ± 1.3 | 71.4 ± 1.4 | - |
| 3 | 4'-metoxi-2'-hidroxichalcona | - | 0.05 ± 0.002 | 42.7 ± 4.3 | 9.0 ± 1.2 | - | - |
| 4 | 5'-metoxi-2'-hidroxichalcona | - | 2.1 ± 0.2 | 3.2 ± 1.9 | 45.7 ± 1.3 | 303 ± 1.2 | 54.6 ± 2.9 |
| 5 | 6'-metoxi-2'-hidroxichalcona | - | 7.5 ± 1.2 | 15.6 ± 1.1 | - | 13.3 ± 0.3 | 26.7 ± 1.6 |
| 6 | 5'-cloro-2'-hidroxichalcona | - | 0.5 ± 0.1 | ND | - | - | 19.4 ± 3.5 |
| 7 | 5'-fluor-2'-hidroxichalcona | - | 0.4 ± 0.02 | 0.0 ± 2.6 | - | 129 ± 2.7 | 29.5 ± 6.6 |
| 8 | 5'-bromo-2'-hidroxichalcona | - | 1.1 ± 0.1 | 6.8 ± 7.9 | - | - | - |
| 9 | 5'-metil-2'-hidroxichalcona | 10.2 ± 1.7 | 2.4 ± 0.5 | 1.2 ± 2.7 | 6.1 ± 1.5 | - | 46.3 ± 1.6 |
| 10 | 3', 5'-dibromo-2'-hidroxichalcona | - | 3.6 ± 0.8 | 36.5 ± 5.6 | - | 1221 ± 469 | 32.5 ± 9.3 |
| 11 | 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona | 6.9 ± 1.3 | 0.2 ± 0.02 | 41.4 ± 1.7 | - | 164 ± 1.47 | 29.1 ± 8.5 |
| 12 | 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona | ND | ND | 47.2 ± 3.1 | - | - | 13.5 ± 6.9 |
| 13 | 3'-metoxi-4'-hidroxichalcona | ND | ND | ND | - | 287.8 ± 1.9 | 101 ± 21 |
| 14 | 4'-aminochalcona | - | 2.5 ± 0.1 | 11.7 ± 5.4 | 6.1 ± 0.2 | - | 59.4 ± 1.5 |
| 15 | 4'-metilchalcona | ND | ND | ND | 6.3 ± 0.8 | - | - |
| 16 | 2'-bromochalcona | ND | ND | ND | - | - | - |
| 17 | 3-nitrochalcona | ND | ND | ND | 0.2 ± 0.05 | - | - |
| 18 | 4-nitrochalcona | ND | ND | ND | - | - | - |
| 19 | 3-clorochalcona | ND | ND | ND | - | - | - |
| 20 | 4-clorochalcona | ND | ND | ND | - | - | - |
| 21 | 4-dimetilaminochalcona | - | 0.7 ± 0.05 | ND | - | 59.6 ± 1.5 | 23.8 ± 3.1 |
| 22 | 4'-amino-3-nitrochalcona | ND | ND | ND | - | 473 ± 7.3 | 107 ± 17.6 |
| 23 | flavanona | ND | ND | ND | 40 ⁺ | - | - |
| 24 | 6-metil-8-nitroflavanona | ND | ND | ND | - | 967 ± 11.7 | 22.1 ± 2.1 |
| 25 | 3,3-dibromoflavanona | ND | ND | 0.0 ± 26.3 | >100 ⁺ | - | 0.8 ± 0.3* |

Compuestos sintetizados con sus respectivas actividades. *(Loscalzo, 2011); +(Medina y col., 1998); ND: no determinado; -: no supero el % de inhibición establecido para calcular la Ki o CI₅₀. Nota: Los compuestos no presentaron actividad para la hBChE y la MAO A.

El mayor número de compuestos y los valores más altos de actividad se obtuvieron para la inhibición de la hMAO B. Esta enzima está involucrada en la desaminación de la dopamina, un neurotransmisor implicado en la EP y la depresión.

La EP es un trastorno que se caracteriza por la neurodegeneración progresiva de las células dopaminérgicas de la vía nigroestriatal. Los IMAO B se utilizan como monoterapia en la EP temprana o como terapia adyuvante en pacientes tratados con levodopa que experimentan dificultades motoras. Los IMAO B aumentan los niveles de dopamina por un mecanismo diferente, pudiendo reducir el riesgo de efectos adversos asociados a la levodopa y la progresión de la enfermedad (Stafford y col., 2007). Los resultados obtenidos en esta Tesis abren la posibilidad de estudiar a los compuestos sintetizados en modelos animales de la EP, que serán establecidos en nuestro laboratorio.

También, se ha asociado a la dopamina con síntomas característicos de la depresión (Grace, 2016). La pargilina (un inhibidor selectivo de la MAO B), a altas dosis, ha demostrado efectos símil-antidepresivos en el ensayo de suspensión por la cola (Cryan y col., 2005). Por lo que también, se planea continuar el estudio de estos compuestos en modelos animales de depresión.

Además, se evaluará la capacidad de los compuestos **13**, **15-20**, **22** y **24** de inhibir a la muAChE, hBChE, hMAO A y B y la agregación del péptido A β ₁₋₄₂.

Este es el primer trabajo que estudia la afinidad del núcleo chalcona y sus derivados por los receptores 5-HT_{1A} y μ -opioide. Además, se demostró que las chalconas con sustituciones simples pueden actuar como inhibidores de la agregación del péptido A β ₁₋₄₂, además de poder actuar como agentes de detección de placas beta amiloide (Ono y col., 2009, 2007a). Nuestros hallazgos revelan nuevos blancos de acción para las chalconas.

Las chalconas han sido descritas como estructuras prometedoras en química medicinal (Matos y col., 2015). En estos trabajos se plantea la necesidad de profundizar el estudio de estos compuestos para comprender mejor sus actividades, mecanismos de acción, identificar nuevos blancos farmacológicos y realizar un análisis estructural para identificar un nuevo compuesto líder. Esta Tesis contribuye al conocimiento de las chalconas en todos estos aspectos.

Dado el nuevo paradigma en el descubrimiento de fármacos para el tratamiento de enfermedades multifactoriales, la actividad de las chalconas sobre múltiples blancos biológicos motiva continuar con el diseño de chalconas como compuestos prometedores

para el tratamiento de estas patologías complejas, por lo que representan estructuras valiosas en la química medicinal.

Con respecto a los derivados de **flavanona**, su actividad estuvo limitada al receptor μ -opioide (Tabla 23). Si bien aún no se han sintetizado un número elevado de este tipo de compuestos, los resultados obtenidos en este trabajo motivan a ampliar su estudio.

Los resultados obtenidos en diversos modelos animales relacionados con la EA, la ansiedad, la depresión y el dolor, y realizados con los compuestos más activos de la serie, mostraron que:

-La 4', 5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (**11**) y la 4'-metoxi -2'-hidroxichalcona (**4**) no afectaron la memoria de trabajo evaluada en la prueba del laberinto en Y de alternancia espontánea, pero no revertieron el deterioro cognitivo inducido por escopolamina. Futuros estudios contemplan estudiar estos compuestos en otros modelos animales de EA.

-El núcleo chalcona (**1**) presentó actividad símil-antidepresiva.

-La 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) presentó efectos ansiolíticos, sin presentar los efectos adversos comunes de las BDZ como sedación, miorelajación y ataxia.

-La 5'-metil -2'- hidroxil-3'-nitrochalcona (**12**) ejerció efectos antinociceptivos en ratones a nivel periférico/visceral y central, sin presentar alteraciones de la coordinación motora ni efectos sedativos a las dosis evaluadas. Por los estudios *in vitro* y de bloqueo, esta acción estaría mediada por el receptor μ -opioide.

Tradicionalmente, el núcleo chalcona ha sido utilizado para el desarrollo de compuestos antiinflamatorios. En concordancia, en este trabajo se ha determinado que los derivados 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (**6**) y la 3-nitrochalcona (**17**) presentan efectos antinociceptivos a nivel periférico. A diferencia de otros trabajos bibliográficos, en la presente Tesis se propuso estudiar a las chalconas como compuestos con actividad a nivel central mediada por el receptor μ -opioide. Los derivados de chalconas presentaron moderada afinidad por este receptor *in vitro*, y la chalcona **12** presentó actividad central *in vivo*, que fue revertida por el antagonista de los receptores opioides. Por lo que se demostró, que también son potenciales estructuras para el desarrollo de drogas con efecto antinociceptivo a nivel central, además de sus conocidas propiedades como agentes antiinflamatorios.

-La 3,3-dibromoflavanona (**25**) surgió como un compuesto prometedor, con actividad antinociceptiva central mediada por el receptor μ -opioide, sin presentar los efectos adversos característicos de la morfina como: tolerancia, dependencia, alteración

de la actividad locomotora, incoordinación motora, sedación y constipación a las dosis evaluadas en roedores. Además, presenta la ventaja de ejercer efecto símil-antidepresivo, por lo que, con su única administración, podría indicarse para tratar una comorbilidad frecuente del dolor crónico, la depresión. Estos factores contribuirían a aumentar la adherencia al tratamiento de los pacientes, presentando grandes ventajas terapéuticas con respecto a la droga de referencia morfina.

En conclusión, se ha demostrado que una serie de derivados de flavonoides del tipo chalcona y flavanona presentan efectos en modelos animales de dolor, ansiedad y depresión. Los compuestos obtenidos pueden contribuir al desarrollo de fármacos efectivos, con menos efectos adversos y más ventajas terapéuticas que los que se utilizan en la actualidad.

Conclusiones

6 Conclusiones

- Veintiún chalconas fueron sintetizadas mediante condensación aldólica, y dos flavanonas, por bromación del núcleo flavanona o ciclación de la chalcona correspondiente, con altos rendimientos y teniendo en cuenta requerimientos estructurales compartidos según datos bibliográficos.

-Las chalconas obtenidas presentaron actividad sobre múltiples blancos biológicos *in vitro* (el su-BDZ en el GABA_A, el receptor 5-HT_{1A}, el receptor μ -opioide, la agregación del péptido A β y las enzimas: monoaminoxidasa A y B, acetil y butiril colinesterasa).

-Algunos derivados de chalconas presentaron actividad en modelos animales de depresión, ansiedad y dolor.

El núcleo chalcona (**1**) presentó actividad símil-antidepresiva.

La 5'-metil-2'-hidroxichalcona (**9**) presentó efectos ansiolíticos.

La 5'-cloro-2'-hidroxichalcona (**6**) y la 3-nitrochalcona (**17**) presentaron efectos antinociceptivos a nivel periférico.

La 5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (**12**) ejerció efectos antinociceptivos a nivel periférico/visceral y central.

-Las chalconas representan compuestos prometedores para la química medicinal.

-La 3,3-dibromoflavanona presentó actividad antinociceptiva central mediada por el receptor μ -opioide, sin ejercer los efectos adversos característicos de la morfina y con actividad símil-antidepresiva.

Referencias

7. Referencias

- Abbott, F. V., Melzack, R., y Samuel, C. 1982. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems. *Experimental neurology*, 75(3): 644-51.
- Abell, C. W. y Kwan, S.W. 2000. Molecular Characterization of Monoamine Oxidases A and B. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 65: 129-156.
- Academic. Flavonoide. Recuperado a partir de <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/489428>
- Agudelo, D., Buéla-Casal, G., & Spielberger, C. D. 2007. Ansiedad Y Depresión: El Problema De La Diferenciación a Través De Los Síntomas. *Salud Mental*, 30(2): 33-41.
- Akimova, E., Lanzenberger, R., y Kasper, S. 2009. The Serotonin-1A Receptor in Anxiety Disorders. *Biological Psychiatry*, 66(7): 627-635.
- Al-Khrasani, M., Lackó, E., Riba, P., Király, K., Sobor, M., Timár, J., Mousa, S., Schäfer, M., y Fürst, S. 2012. The central versus peripheral antinociceptive effects of μ -opioid receptor agonists in the new model of rat visceral pain. *Brain Research Bulletin*, 87(2-3): 238-243.
- American Psychiatric Association. 2000. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV* (4th ed.). Washington DC: American Psychiatric Association.
- Anand, P., y Singh, B. 2013. Synthesis and evaluation of novel carbamate-substituted flavanone derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors and anti-amnesic agents. *Medicinal Chemistry Research*, 22(4): 1648-1659.
- Andersen, Ø. M., y Markham, K. R. 2006. *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor y Francis Group.
- Arikian, S. R., y Gorman, J. M. 2001. A Review of the Diagnosis, Pharmacologic Treatment, and Economic Aspects of Anxiety Disorders. *Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry*, 3(3): 110-117.
- Armstrong, A. H., Chen, J., McKoy, A. F., y Hecht, M. H. 2011. Mutations That Replace Aromatic Side Chains Promote Aggregation of the Alzheimer's A β Peptide. *Biochemistry*, 50(19): 4058-4067.
- Arrant, A. E., Schramm-Sapota, N. L., y Kuhn, C. M. 2013. Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. *Behavioural Brain Research*, 256: 119-127.
- Arro, A., Uustare, A., Harro, J., y Rincken, A. 2001. Modulation of [3 H] 8-OHDPAT binding to rat brain membranes by metal ions. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences.*, 50(1): 28-38.
- Assié, M.-B., y Koek, W. 2000. [3 H]-8-OH-DPAT binding in the rat brain raphe area: involvement of 5-HT 1A and non-5-HT 1A receptors. *British Journal of Pharmacology*, 130(6): 1348-1352.
- Azizi, H., Ranjbar-Slamloo, Y., y Semnani, S. 2012. Height-dependent difference in the expression of naloxone-induced withdrawal jumping behavior in morphine dependent rats. *Neuroscience Letters*, 515(2): 174-176.
- Bag, S., Ghosh, S., Tulsan, R., Sood, A., Zhou, W., Schifone, C., Foster, M., LeVine, H., Török, B., y Török, M. 2013. Design, synthesis and biological activity of multifunctional α,β -unsaturated carbonyl scaffolds for Alzheimer's disease. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*, 23(9): 2614-2618.
- Bannon, A. W., y Malmberg, A. B. 2007. Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-Flick, and Formalin Tests in Rodents. *Current Protocols in Neuroscience*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley y Sons, Inc.
- Baptista, F. I., Henriques, A. G., Silva, A. M. S., Wiltfang, J., y da Cruz e Silva, O. A. B. 2014. Flavonoids as therapeutic compounds targeting key proteins involved in Alzheimer's disease. *ACS chemical neuroscience*, 5(2): 83-92.
- Barker, A., Kettle, J. G., Nowak, T., y Pease, J. E. 2013. Expanding medicinal chemistry space. *Drug discovery today*, 18(5-6): 298-304.
- Barrot, M. 2012. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211: 39-50.
- Batovska, D., y Todorova, I. 2010. Trends in Utilization of the Pharmacological Potential of Chalcones. *Current Clinical Pharmacology*, 5(1): 1-29.
- Bautista-Aguilera, O. M., Samadi, A., Chioua, M., Nikolic, K., Filipic, S., Agbaba, D., Soriano, E., de

- Andrés, L., Rodríguez-Franco, M. I., Alcaro, S., Ramsay, R. R., Ortuso, F., Yañez, M., y Marco-Contelles, J. 2014. N -Methyl- N -((1-methyl-5-(3-(1-(2-methylbenzyl)piperidin-4-yl)propoxy)-1 H -indol-2-yl)methyl)prop-2-yn-1-amine, a New Cholinesterase and Monoamine Oxidase Dual Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(24): 10455-10463.
- Beesdo, K., Hoyer, J., Jacobi, F., Low, N. C. P., Höfler, M., y Wittchen, H.-U. 2009. Association between generalized anxiety levels and pain in a community sample: Evidence for diagnostic specificity. *Journal of Anxiety Disorders*, 23(5): 684-693.
- Berenbaum, M. C. 1989. What is synergy? *Pharmacological reviews*, 41(2): 93-141.
- Blier, P., y Ward, N. M. 2003. Is there a role for 5-HT1A agonists in the treatment of depression? *Biological Psychiatry*, 53(3): 193-203.
- Bodnar, R. J. 2007. Endogenous opiates and behavior: 2006. *Peptides*, 28(12): 2435-2513.
- Bodnar, R. J. 2014. Endogenous opiates and behavior: 2013. *Peptides*, 62(12): 67-136.
- Bodnar, R. J., y Klein, G. E. 2006. Endogenous opiates and behavior: 2005. *Peptides*, 27(12): 3391-3478.
- Bonetti, E. P., Pieri, L., Cumin, R., Schaffner, R., Pieri, M., Gamzu, E. R., Muller, R. K. M., y Haefely, W. 1982. Benzodiazepine antagonist Ro 15-1788: Neurological and behavioral effects. *Psychopharmacology*, 78(1): 8-18.
- Bourin, M., Masse, F., Dailly, E., y Hascoet, M. 2005. Anxiolytic-like effect of milnacipran in the four-plate test in mice: Mechanism of action. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(3): 645-656.
- Bowery, N. G., Hudson, A. L., y Price, G. W. 1987. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 20(2): 365-383.
- Brahmachari, G., y Gorai, D. 2006. Progress in the Research on Naturally Occurring Flavones and Flavonols: An Overview. *Current Organic Chemistry*, 10(8): 873-898.
- Brambilla, P., Perez, J., Barale, F., Schettini, G., y Soares, J. C. 2003. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Molecular psychiatry*, 8(8): 721-37, 715.
- Broseta, I., Rodríguez-Arias, M., Stinus, L., y Miñarro, J. 2002. Ethological analysis of morphine withdrawal with different dependence programs in male mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 26(2): 335-347.
- Brown, A. S., y Gershon, S. 1993. Dopamine and depression. *Journal of Neural Transmission*, 91(2-3): 75-109.
- Butterweck, V., Nahrstedt, A., Evans, J., Hufeisen, S., Rauser, L., Savage, J., Popadak, B., Ernsberger, P., y Roth, B. L. 2002. In vitro receptor screening of pure constituents of St. John's wort reveals novel interactions with a number of GPCRs. *Psychopharmacology*, 162(2): 193-202.
- Cabrera, M., Simoens, M., Falchi, G., Lavaggi, M. L., Piro, O. E., Castellano, E. E., Vidal, A., Azqueta, A., Monge, A., de Cerán, A. L., Sagraera, G., Seoane, G., Cerecetto, H., y González, M. 2007. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(10): 3356-3367.
- Caliendo, G., Fiorino, F., Perissutti, E., Severino, B., Scolaro, D., Gessi, S., Cattabriga, E., Borea, P. A., y Santagada, V. 2002. A convenient synthesis by microwave heating and pharmacological evaluation of novel benzoyltriazole and saccharine derivatives as 5-HT 1A receptor ligands. *Synthesis*, 16: 15-28.
- Calixto, J. B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A. R., Filho, V. C., y Yunes, R. A. 2000. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy research : PTR*, 14(6): 401-18.
- Calpe, M. A. A., y López, J. M. 1997. Efectos de la morfina sobre la actividad motora en ratones macho. *Psicothema*, 9(1): 27-32.
- Cárdenas, J., y Navarro, J. F. 2002. Modelos animales de ansiedad incondicionada. *Psiquiatría Biológica*, Vol. 09. Núm. 01. Enero 2002, 9(1): 18-31.
- Organización mundial de la Salud. 2001. *Carga de los Trastornos Mentales y Conductuales. Informe sobre la salud en el mundo 2001 - Salud mental: nuevos conocimientos, nuevas esperanzas* (p. 16). Ginebra: Organización Mundial de la Salud.

- Carli, M., Afkhami-dastjerdian, S., y Reader, T. A. 1996. [3HJ8-OH-DPAT Binding and Serotonin Content in Rat Cerebral Cortex after Acute Fluoxetine. *Journal of Psychiatry y Neuroscience*, 21(2): 114-122.
- Carradori, S., D'Ascenzio, M., Chimenti, P., Secci, D., y Bolasco, A. 2014. Selective MAO-B inhibitors: a lesson from natural products. *Molecular Diversity*, 18(1): 219-243.
- Carter, R. B. 1991. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. *Pain*, 47(2): 211-20.
- Cazarolli, L., Zanatta, L., Alberton, E., Bonorino Figueiredo, M. S., Folador, P., Damazio, R., Pizzolatti, M., y Barreto Silva, F. R. 2008. Flavonoids: Prospective Drug Candidates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(13): 1429-1440.
- Cechinel-Filhol, V., Vaz, Z.R., Zunino L., Calixto, J. B. y Yunes, R. A. 1996. Synthesis of xanthoxylone derivatives with antinociceptive and antioedematogenic activities. *European journal of medicinal chemistry*, 31: 833-839.
- Celada, P., Bortolozzi, A., y Artigas, F. 2013. Serotonin 5-HT_{1A} Receptors as Targets for Agents to Treat Psychiatric Disorders: Rationale and Current Status of Research. *CNS Drugs*, 27(9): 703-716.
- Chai, C. L., y Mátyus, P. 2016. One size does not fit all: Challenging some dogmas and taboos in drug discovery. *Future Medicinal Chemistry*, 8(1): 29-38.
- Change Pain. Banco de Imágenes: Change Pain. Recuperado a partir de <http://www.changepain.org/grt-change-pain-portal/231100038.jsp>
- Chauhan, U. In vivo model of depression. Recuperado a partir de www.slideshare.net/urchauhan/in-vivo-model-of-depression
- Chimenti, F., Fioravanti, R., Bolasco, A., Chimenti, P., Secci, D., Rossi, F., Yáñez, M., Orallo, F., Ortuso, F., y Alcaro, S. 2009. Chalcones: a valid scaffold for monoamine oxidases inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 52(9): 2818-24.
- Chimenti, F., Fioravanti, R., Bolasco, A., Chimenti, P., Secci, D., Rossi, F., Yáñez, M., Orallo, F., Ortuso, F., Alcaro, S., Cirilli, R., Ferretti, R., y Sanna, M. L. 2010. A new series of flavones, thioflavones, and flavanones as selective monoamine oxidase-B inhibitors. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 18(3): 1273-1279.
- Cho, S., Kim, S., Jin, Z., Yang, H., Han, D., Baek, N. I., Jo, J., Cho, C. W., Park, J. H., Shimizu, M., y Jin, Y. H. 2011. Isoliquiritigenin, a chalcone compound, is a positive allosteric modulator of GABA A receptors and shows hypnotic effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(4): 637-642.
- Choi, S.-M., Kim, B. C., Cho, Y.-H., Choi, K.-H., Chang, J., Park, M.-S., Kim, M.-K., Cho, K.-H., y Kim, J.-K. 2014. Effects of Flavonoid Compounds on β -amyloid-peptide-induced Neuronal Death in Cultured Mouse Cortical Neurons. *Chonnam Medical Journal*, 50(2): 45.
- Chung, L. Y., Soo, W. K., Mustafa, M. R., Goh, S. H., y Imiyabir, Z. 2009. 5-Hydroxytryptamine 1A receptor binding activity of bisbenzyltetrahydroisoquinoline alkaloids from *Popowia odoardi*. *Pharmaceutical Biology*, 47(12): 1130-1136.
- Cicero, T. J., Nock, B., y Meyer, E. R. 2002. Gender-linked differences in the expression of physical dependence in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 72(3): 691-697.
- Clodomiro, A., Gareri, P., Puccio, G., Frangipane, F., Lacava, R., Castagna, A., Manfredi, V. G. L., Colao, R., y Bruni, A. C. 2013. Somatic comorbidities and Alzheimer's disease treatment. *Neurological Sciences*, 34(9): 1581-1589.
- Conthe, P., Márquez Contreras, E., Aliaga Pérez, A., Barragán García, B., Fernández de Cano Martín, M. N., González Jurado, M., Ollero Baturone, M., y Pinto, J. L. 2014. Adherencia terapéutica en la enfermedad crónica: estado de la situación y perspectiva de futuro. *Revista Clínica Española*, 214(6): 336-344.
- Corrêa, R., Fenner, B. P., Buzzi, F. D. C., Cechinel Filho, V., y Nunes, R. J. 2008. Antinociceptive activity and preliminary structure-activity relationship of chalcone-like compounds. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 63(11-12): 830-6.
- Corrêa, R., Pereira, M. A., Buffon, D., dos Santos, L., Cechinell Filho, V., Santos, A. R., y Nunes, R. J. 2001. Antinociceptive properties of chalcones. Structure-activity relationships. *Archiv der Pharmazie*,

334(10): 332-4.

- Coughenour, L. L., Mclean, J. R., y Parker, R. B. 1977. A new device for the rapid measurement of impaired motor function in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 6(3): 351-3.
- Courade, J.-P., Chassaing, C., Bardin, L., Alloui, A., y Eschaliér, A. 2001. 5-HT receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of acetaminophen in rats. *European Journal of Pharmacology*, 432(1): 1-7.
- Cragg, G. M., y Newman, D. J. 2005. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1): 3670-3695.
- Cragg, G. M., y Newman, D. J. 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(6): 3670-3695.
- Craig, L. A., Hong, N. S., y McDonald, R. J. 2011. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 35(6): 1397-1409.
- Cryan, J. F., Mombereau, C., y Vassout, A. 2005. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4-5): 571-625.
- Dailly, E., Chenu, F., Petit-Demoulière, B., y Bourin, M. 2006. Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins. *Journal of Neuroscience Methods*, 150(1): 111-115.
- Darvesh, S., Hopkins, D. a, y Geula, C. 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(2): 131-138.
- Dawson, G. R., Crawford, S. P., Collinson, N., Iversen, S. D., y Tricklebank, M. D. 1995. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. *Psychopharmacology*, 118(3): 316-323.
- Dawson, G. R., y Tricklebank, M. D. 1995. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16(2): 33-36.
- de Campos-Buzzi, F., Padaratz, P., Meira, A. V., Corrêa, R., Nunes, R. J., y Cechinel-Filho, V. 2007. 4'-Acetamidochalcone derivatives as potential antinociceptive agents. *Molecules*, 12(4): 896-906.
- de Campos-Buzzi, F., Pereira de Campos, J., Pozza Tonini, P., Corrêa, R., Augusto Yunes, R., Boeck, P., y Cechinel-Filho, V. 2006. Antinociceptive effects of synthetic chalcones obtained from xanthoxyline. *Archiv der Pharmazie*, 339(7): 361-5.
- De Cos, M. A. 2010. Interacciones de los fármacos y sus implicancias clínicas. En J. Florez (Ed.), *Farmacología Humana* (3.ª ed., pp. 165-176). Barcelona: Masson.
- De Diesbach H. y Kramer, H. 1945. Sur quelques dérivés de la tétrahydro-quinoléine. *Helv Chim Acta*, 28(1): 1399-1405.
- de Souza, É. T., Pereira de Lira, D., Cavalcanti de Queiroz, A., Costa da Silva, D. J., Bezerra de Aquino, A., Campessato Mella, E. A., Prates Lorenzo, V., de Miranda, G. E. C., de Araújo-Júnior, J. X., de Oliveira Chaves, M. C., Barbosa-Filho, J. M., Filgueiras de Athayde-Filho, P., de Oliveira Santos, B. V., y Alexandre-Moreira, M. S. 2009. The Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Caulerpin, a Bisindole Alkaloid Isolated from Seaweeds of the Genus *Caulerpa*. *Marine Drugs*, 7(4): 689-704.
- Déciga-Campos, M., López, U. G., Reval, M. I. D., y López-Muñoz, F. J. 2003. Enhancement of antinociception by co-administration of an opioid drug (morphine) and a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor (rofecoxib) in rats. *European Journal of Pharmacology*, 460(2-3): 99-107.
- Delacourte, A. 2002. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. *EMC - Tratado de Medicina*, 6(4): 1-11.
- Delfino, R. T., Ribeiro, T. S., y Figueroa-Villar, J. D. 2009. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(3): 407-428.
- Drozak, J., y Kozłowski, M. 2006. Monoamine oxidase as a target for drug action. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*, 60: 498-515.
- Duarte, F. S., Marder, M., Hoeller, A. A., Duzzioni, M., Mendes, B. G., Pizzolatti, M. G., y De Lima, T. C.

2008. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. *Psychopharmacology (Berl)*, 197(3): 351-360.
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L., y Sussman, J. L. 2010. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1-3): 10-22.
- Earnheart, J. C., Schweizer, C., Crestani, F., Iwasato, T., Itohara, S., Mohler, H., y Lüscher, B. 2007. GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(14): 3845-54.
- Eddy, N. B., y Leimbach, D. 1953. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 107(3): 385-93.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., y Feather-Stone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7: 88-95.
- Erickson, B. 2005. Depression, anxiety, and substance use disorder in chronic pain. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management*, 9(4): 200-203.
- Evangelista, S. 2013. Charcoal Meal, an Old Test but Still Valid to Measure Intestinal Transit in vivo: Effect of Activation of Tachykinin NK-2 Receptors. En E. Tyrone (Ed.), *Charcoal: Chemical Properties, Production Methods and Applications* (pp. 85-92). New York: Nova Science Publishers.
- Fabricant, D. S., y Farnsworth, N. R. 2001. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(s1): 69-75.
- File, S. E., y Pellow, S. 1985. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *British journal of pharmacology*, 86(3): 729-35.
- File, S. E., y Pellow, S. 1986. Behavioral pharmacology of the pyrazoloquinoline CGS 9896, a novel putative anxiolytic. *Drug Development Research*, 7(3): 245-253.
- Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., y Wilcock, G. K. 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery y Psychiatry*, 66(2): 137-147.
- Fuchigami, T., Yamashita, Y., Haratake, M., Ono, M., Yoshida, S., y Nakayama, M. 2014. Synthesis and evaluation of ethyleneoxylated and allyloxylated chalcone derivatives for imaging of amyloid β plaques by SPECT. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 22(9): 2622-2628.
- García-Ayllón, M.-S., Small, D. H., Avila, J., y Sáez-Valero, J. 2011. Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease: Cross-Talk with P-tau and β -Amyloid. *Frontiers in molecular neuroscience*, 22: 1-9.
- Gasteiger, J., y Marsili, M. 1980. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, 36(22): 3219-3228.
- Gazit, E. 2002. A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *The FASEB Journal*, 16(1): 77-83.
- Geldmacher, D. S. 2007. Treatment Guidelines for Alzheimer's Disease. *The Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry*, 9(2): 113-121.
- Gerrits, M. M. J. G., Vogelzangs, N., van Oppen, P., van Marwijk, H. W. J., van der Horst, H., y Penninx, B. W. J. H. 2012. Impact of pain on the course of depressive and anxiety disorders. *Pain*, 153(2): 429-436.
- Ginski, M. J., y Witkin, J. M. 1994. Sensitive and rapid behavioral differentiation of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Psychopharmacology*, 114(4): 573-582.
- Gong, J., Huang, J., Ge, Q., Chen, F., y Zhang, Y. 2014. Advanced Research on the Antidepressant Effect of Flavonoids. *Current Opinion in Complementary and Alternative Medicine*, 1(2): 1-6.
- Grace, A. A. 2016. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(8): 524-532.
- Gray, A. C., Coupar, I. M., y White, P. J. 2006. Comparison of opioid receptor distributions in the rat central nervous system. *Life Sciences*, 79(7): 674-685.

- Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., y Hen, R. 2002. Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature*, 416(6879): 396-400.
- Guadarrama, L., Escobar, A., y Zhang, L. 2006. Bases neuroquímicas y neuroanatómicas de la depresión. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 49(2): 7.
- Guan, L. P., Tang, L. M., Pan, C. Y., Zhao, S. L., y Wang, S. H. 2014. Evaluation of potential antidepressant-like activity of chalcone-1203 in various murine experimental depressant models. *Neurochemical Research*, 39(2): 313-320.
- Guan, L.-P., Zhao, D.-H., Chang, Y., Wen, Z.-S., Tang, L.-M., y Huang, F.-F. 2013. Synthesis of 2,4-dihydroxychalcone Derivatives as Potential Antidepressant Effect. *Drug Research*, 63(1): 46-51.
- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1): 1-93.
- Gustavsson, A., Svensson, M., Jacobi, F., Allgulander, C., Alonso, J., Beghi, E., Dodel, R., Ekman, M., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Gannon, B., Jones, D. H., Jenum, P., Jordanova, A., Jönsson, L., Karampampa, K., Knapp, M., Kobelt, G., Kurth, T., Lieb, R., y col. 2011. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*, 21(10): 718-779.
- Gustorff, B., Simoens, S., Tourné, J., Michelet, D., Mikkonen, L., Krohn, M., Santalahti, A., Crespo, M., Serrie, A., Laroche, F., Carton, L., Kletzko, H., Kohlmann, T., Sittl, R., Kouvelas, D., Vadalouka, A., Athanasakis, K., Bahill, M., Canroy, L., Church, J., y col. 2010. *Pain proposal: Improving the Current and Future Management of Chronic Pain. A European Consensus Report*.
- Guzior, N., Wieckowska, A., Panek, D., y Malawska, B. 2015. Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Current medicinal chemistry*, 22(3): 373-404.
- Häberlein, H., Tschiersch, K. P., y Schäfer, H. L. 1994. Flavonoids from *Leptospermum scoparium* with affinity to the benzodiazepine receptor characterized by structure activity relationships and in vivo studies of a plant extract. *Die Pharmazie*, 49(12): 912-22.
- Hanrahan, J. R., Chebib, M., y Johnston, G. A. R. 2011. Flavonoid modulation of GABA A receptors. *British Journal of Pharmacology*, 163(2): 234-245.
- Harborne, J. B., y Williams, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6): 481-504.
- Hasan, A., Khan, K. M., Sher, M., Maharvi, G. M., Nawaz, S. a, Choudhary, M. I., Atta-Ur-Rahman, y Supuran, C. T. 2005. Synthesis and inhibitory potential towards acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and lipoxygenase of some variably substituted chalcones. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(1): 41-47.
- Havsteen, B. H. 2002. *The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 96).
- Heidari, M. R., Foroumadi, A., Amirabadi, A., Samzadeh-Kermani, A., Azimzadeh, B. S., y Eskandarizadeh, A. 2009a. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of a novel rigid 3, 4-dihydroxy chalcone in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171: 399-406.
- Heidari, M. R., Foroumadi, A., Noroozi, H., Samzadeh-Kermani, A., y Azimzadeh, B. S. 2009b. Study of the anti-inflammatory and analgesic effects of novel rigid benzofuran-3, 4-dihydroxy chalcone by formalin, hot-plate and carrageenan tests in mice. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 22(4): 395-401.
- Helguera, A. M., Perez-Machado, G., Cordeiro, M. N. D. S., y Borges, F. 2012. Discovery of MAO-B inhibitors - present status and future directions part I: oxygen heterocycles and analogs. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12(10): 907-19.
- Heo, H. J., Kim, M.-J., Lee, J.-M., Choi, S. J., Cho, H.-Y., Hong, B., Kim, H.-K., Kim, E., y Shin, D.-H. 2004. Naringenin from *Citrus junos* Has an Inhibitory Effect on Acetylcholinesterase and a Mitigating Effect on Amnesia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 17(3): 151-157.
- Hernández-Delgado, G. P., y Cruz, S. L. 2005. Mecanismos de tolerancia analgésica a los opioides. *Salud Mental*, 28(3): 22-31.

- Heusler, P., Rauly-Lestienne, I., Tourette, A., Tardif, S., Ailhaud, M.-C., Croville, G., y Cussac, D. 2010. Actions of the prototypical 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT at human α ₂-adrenoceptors: (+)8-OH-DPAT, but not (–)8-OH-DPAT is an α _{2B} subtype preferential agonist. *European Journal of Pharmacology*, 640(1-3): 8-14.
- Holzer, P. 2015. New approaches to the treatment of opioid-induced constipation. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 12(1): 119-127.
- Howe, C. Q., Sullivan, M. D., Saunders, K. W., Merrill, J. O., Banta-Green, C. J., Weisner, C., Campbell, C. I., y Von Korff, M. 2012. Depression and Ambivalence Toward Chronic Opioid Therapy for Chronic Noncancer Pain. *The Clinical Journal of Pain*, 28(7): 561-566.
- Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Saxena, P. R., y Humphrey, P. P. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological reviews*, 46(2): 157-203.
- Hung, A. S. M., Liang, Y., Chow, T. C. H., Tang, H. C., Wu, S. L. Y., Wai, M. S. M., y Yew, D. T. 2016. Mutated tau, amyloid and neuroinflammation in Alzheimer disease—A brief review. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*.
- IASP. 2015. The International Association for the Study of Pain. Recuperado a partir de <http://www.iasp-pain.org/>
- Ikeda, K., Kobayashi, T., Kumanishi, T., Yano, R., Sora, I., y Niki, H. 2002. Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys? *Neuroscience research*, 44(2): 121-131.
- Ioja, E., Tourwé, D., Kertész, I., Tóth, G., Borsodi, A., y Benyhe, S. 2007. Novel diastereomeric opioid tetrapeptides exhibit differing pharmacological activity profiles. *Brain Research Bulletin*, 74(1-3): 119-129.
- Jäger, A. K., Almqvist, J. P., Vangsoe, S. A. K., Stafford, G. I., Adersen, A., y Van Staden, J. 2007. Compounds from *Mentha aquatica* with affinity to the GABA-benzodiazepine receptor. *South African Journal of Botany*, 73(4): 518-521.
- Jamal, H., Ansari, W. H., y Rizvi, S. J. 2008. Evaluation of chalcones--a flavonoid subclass, for their anxiolytic effects in rats using elevated plus maze and open field behaviour tests. *Fundamental y clinical pharmacology*, 22(6): 673-81.
- Javadi, S., Ejtemaimehr, S., Keyvanfar, H. R., Moghaddas, P., Aminian, A., Rajabzadeh, A., Mani, A. R., y Dehpour, A. R. 2013. Pioglitazone potentiates development of morphine-dependence in mice: Possible role of NO/cGMP pathway. *Brain Research*, 1510: 22-37.
- Jia, J., Zhu, F., Ma, X., Cao, Z. W., Li, Y. X., y Chen, Y. Z. 2009. Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(2): 111-28.
- Johnston, G. 2005. GABA_A Receptor Channel Pharmacology. *Current Pharmaceutical Design*, 11(15): 1867-1885.
- Julius, D., y Basbaum, A. I. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852): 203-210.
- Jürgensen, S., DalBó, S., Angers, P., Soares Santos, A. R., y Ribeiro-do-Valle, R. M. 2005. Involvement of 5-HT₂ receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(3): 466-477.
- Kachadourian, R., Day, B. J., Pugazhenti, S., Franklin, C. C., Genoux-Bastide, E., Mahaffey, G., Gauthier, C., Di Pietro, A., y Boumendjel, A. 2012. A synthetic chalcone as a potent inducer of glutathione biosynthesis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(3): 1382-1388.
- Kamaldin, M. N., Akhtar, M. N., Mohamad, A. S., Lajis, N., Perimal, E. K., Akira, A., Ming-Tatt, L., Israf, D. A., y Sulaiman, M. R. 2013. Peripheral antinociception of a chalcone, flavokawin B and possible involvement of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate/potassium channels pathway. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(4): 4209-20.
- Karl, T., Pabst, R., y von Hörsten, S. 2003. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie*, 55(1): 69-83.
- Kása, P., Rakonczay, Z., y Gulya, K. 1997. The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Progress in*

neurobiology, 52(6): 511-35.

- Katavic, P. L., Lamb, K., Navarro, H., y Prisinzano, T. E. 2007. Flavonoids as Opioid Receptor Ligands: Identification and Preliminary Structure–Activity Relationships. *Journal of Natural Products*, 70(8): 1278-1282.
- Katsori, A.-M., y Hadjipavlou-Litina, D. 2011. Recent progress in therapeutic applications of chalcones. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21(10): 1575-1596.
- Kaur, R., Singh, D., y Chopra, K. 2005. Participation of alpha2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin. *Journal of medicinal food*, 8(4): 529-32.
- Kennedy, D. O., y Wightman, E. L. 2011. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 2(1): 32-50.
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., y Kang, S. S. 2004. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96(3): 229-245.
- Kim, W., Kim, M., Go, D., Min, B.-I., Na, H., y Kim, S. 2016. Combined Effects of Bee Venom Acupuncture and Morphine on Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain in Mice. *Toxins*, 8(2): 33.
- Kinghorn, A. D., Pan, L., Fletcher, J. N., y Chai, H. 2011. The Relevance of Higher Plants in Lead Compound Discovery Programs. *Journal of Natural Products*, 74(6): 1539-1555.
- Kliethermes, C. L., y Crabbe, J. C. 2006. Pharmacological and genetic influences on hole-board behaviors in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 85(1): 57-65.
- Klimek, V., Schenck, J. E., Han, H., Stockmeier, C. A., y Ordway, G. A. 2002. Dopaminergic abnormalities in amygdaloid nuclei in major depression: a postmortem study. *Biological Psychiatry*, 52(7): 740-748.
- Koek, W., France, C. P., y Javors, M. A. 2012. Morphine-induced motor stimulation, motor incoordination, and hypothermia in adolescent and adult mice. *Psychopharmacology*, 219(4): 1027-1037.
- Köhler, S., Cierpinsky, K., Kronenberg, G., y Adli, M. 2015. The serotonergic system in the neurobiology of depression: Relevance for novel antidepressants. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 30(1): 13-22.
- Komada, M., Takao, K., y Miyakawa, T. 2008. Elevated Plus Maze for Mice. *Journal of Visualized Experiments*, (22): 2007-2009.
- Koster, R., Anderson, M., y De Beer, E. J. 1959. Acetic acid analgesic screening. *Federation Proceedings*, 18: 412-416.
- Kozurkova, M., Hamulakova, S., Gazova, Z., Paulikova, H., y Kristian, P. 2011. Neuroactive Multifunctional Tacrine Congeners with Cholinesterase, Anti-Amyloid Aggregation and Neuroprotective Properties. *Pharmaceuticals*, 4(12): 382-418.
- Kračmarová, A., Drtinová, L., y Pohanka, M. 2015. Possibility of Acetylcholinesterase Overexpression in Alzheimer Disease Patients after Therapy with Acetylcholinesterase Inhibitors. *Acta Medica (Hradec Kralove, Czech Republic)*, 58(2): 37-42.
- Krall, J., Balle, T., Krogsgaard-Larsen, N., Sørensen, T. E., Krogsgaard-Larsen, P., Kristiansen, U., y Frølund, B. 2015. GABAA Receptor Partial Agonists and Antagonists: Structure, Binding Mode, and Pharmacology. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* (Vol. 72, pp. 201-227).
- Kromer, W. 1988. Endogenous and exogenous opioids in the control of gastrointestinal motility and secretion. *Pharmacological reviews*, 40(2): 121-62.
- Lakey-Beitia, J., Berrocal, R., Rao, K. S., y Durant, A. A. 2015. Polyphenols as Therapeutic Molecules in Alzheimer's Disease Through Modulating Amyloid Pathways. *Molecular Neurobiology*, 51(2): 466-479.
- Lakhlani, P. P., MacMillan, L. B., Guo, T. Z., McCool, B. A., Lovinger, D. M., Maze, M., y Limbird, L. E. 1997. Substitution of a mutant alpha2a-adrenergic receptor via «hit and run» gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18): 9950-5.
- Laurijssens, B., Aujard, F., y Rahman, A. 2013. Animal models of Alzheimer's disease and drug development. *Drug discovery today. Technologies*, 10(3): e319-27.

- Lautenbacher, S., y Fillingim, R. B. 2004. *Pathophysiology of Pain Perception*. (S. Lautenbacher y R. B. Fillingim, Eds.). Boston, MA: Springer US.
- Le Bars, D., Gozariu, M., y Cadden, S. W. 2001. Animal models of nociception. *Pharmacological reviews*, 53(4): 597-652.
- Le Merrer, J., Becker, J. A. J., Befort, K., y Kieffer, B. L. 2009. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiological Reviews*, 89(4): 1379-1412.
- Lee, S. H., Park, Y. B., Bae, K. H., Bok, S. H., Kwon, Y. K., Lee, E. S., y Choi, M. S. 1999. Cholesterol-Lowering Activity of Naringenin via Inhibition of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase and Acyl Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase in Rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 43(3): 173-180.
- Lee, S., Chung, H., y Lee, I. 2000. Phenolics with inhibitory activity on mouse brain monoamine oxidase (MAO) from whole parts of *Artemisia vulgaris* L (Mugwort). *Food Science and Biotechnology*, 9(3): 179-182.
- Lee, Y. S., Kulkarni, V., Cowell, S. M., Ma, S., Davis, P., Hanlon, K. E., Vanderah, T. W., Lai, J., Porreca, F., Vardanyan, R., y Hruby, V. J. 2011. Development of Potent μ and δ Opioid Agonists with High Lipophilicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(1): 382-386.
- León, R., Garcia, A. G., y Marco-Contelles, J. 2013. Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Medicinal research reviews*, 33(1): 139-89.
- LeVine, H. 1993. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 2(3): 404-10.
- Lira-Navarrete, E., Valero-González, J., Villanueva, R., Martínez-Júlvez, M., Tejero, T., Merino, P., Panjikar, S., y Hurtado-Guerrero, R. 2011. Structural Insights into the Mechanism of Protein O-Fucosylation. (H. Song, Ed.) *PLoS ONE*, 6(9): e25365.
- Lister, R. G. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 92(2): 180-185.
- Liu, H., Fan, H., Gao, X., Huang, X., Liu, X., Liu, L., Zhou, C., Tang, J., Wang, Q., y Liu, W. 2015. Design, synthesis and preliminary structure-activity relationship investigation of nitrogen-containing chalcone derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors: a further study based on Flavokawain B Mannich base derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 0(0): 1-10.
- Loscalzo, L. M. 2011. *Flavonoides Glicosilados Neuroactivos. Caracterización Farmacológica y Mecanismo de Acción de la Hesperidina*. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Loscalzo, L. M., Wasowski, C., Paladini, A. C., y Marder, M. 2008. Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. *European journal of pharmacology*, 580(3): 306-13.
- Loscalzo, L. M., Yow, T. T., Wasowski, C., Chebib, M., y Marder, M. 2011. Hesperidin induces antinociceptive effect in mice and its aglicone, hesperetin, binds to μ -opioid receptor and inhibits GIRK1/2 currents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(3): 333-341.
- Lovell, K. M., Simpson, D. S., Cunningham, C. W., y Prinszano, T. E. 2009. Utilizing nature as a source of new probes for opioid pharmacology. *Future Medicinal Chemistry*, 1(2): 285-301.
- Lu, J.-J., Pan, W., Hu, Y.-J., y Wang, Y.-T. 2012. Multi-target drugs: the trend of drug research and development. *PloS one*, 7(6): e40262.
- Machado, D. G., Bettio, L. E. B., Cunha, M. P., Capra, J. C., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., y Rodrigues, A. L. S. 2009. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(4): 642-650.
- Madan, B., Batra, S., y Ghosh, B. 2000. 2'-hydroxychalcone inhibits nuclear factor-kappaB and blocks tumor necrosis factor-alpha- and lipopolysaccharide-induced adhesion of neutrophils to human umbilical vein endothelial cells. *Molecular pharmacology*, 58(3): 526-34.

- Manara, L., Bianchi, G., Ferretti, P., y Tavani, A. 1986. Inhibition of gastrointestinal transit by morphine in rats results primarily from direct drug action on gut opioid sites. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 237(3): 945-9.
- Manchikanti, L., Cash, K. a, Malla, Y., Pampati, V., y Fellows, B. 2013. A prospective evaluation of psychotherapeutic and illicit drug use in patients presenting with chronic pain at the time of initial evaluation. *Pain physician*, 16(1): E1-E13.
- Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Mathiesen, J. M., Sunahara, R. K., Pardo, L., Weis, W. I., Kobilka, B. K., y Granier, S. 2012. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 485(7398): 321-6.
- Manzano, S., González, J. L., Marcos, A., Payno, M., Villanueva, ., y Matías-Guiu, . 2009. Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer. *Neurologia*, 24(4): 255-262.
- Marder, M., Estiú, G., Blanch, L. B., Viola, H., Wasowski, C., Medina, J. H., y Paladini, a C. 2001. Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABA(A) receptor complex. *Bioorganic y medicinal chemistry*, 9(2): 323-35.
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Wolfman, C., Waterman, P. G., Medina, J. H., y Paladini, A. C. 1995. 6,3'-Dinitroflavone: a high affinity ligand for the BZD-R with potent anxiolytic properties. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*, 5(22): 2717-2720.
- Martínez-Vázquez, M., Ramírez Apan, T. O., Aguilar, H., y Bye, R. 1996. Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract and of the flavone linarin of *Buddleia cordata*. *Planta medica*, 62(2): 137-40.
- Mathew, B., Mathew, G. E., Uçar, G., Baysal, I., Suresh, J., Vilapurathu, J. K., Prakasan, A., Suresh, J. K., y Thomas, A. 2015. Development of fluorinated methoxylated chalcones as selective monoamine oxidase-B inhibitors: Synthesis, biochemistry and molecular docking studies. *Bioorganic Chemistry*, 62: 22-29.
- Mathew, B., Suresh, J., Mathew, G. E., Parasuraman, R., y Abdulla, N. 2014. Plant secondary metabolites-potent inhibitors of monoamine oxidase isoforms. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*, 14(1): 28-33.
- Matos, M. J., Vazquez-Rodriguez, S., Uriarte, E., y Santana, L. 2015. Potential pharmacological uses of chalcones: a patent review (from June 2011 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25(3): 351-366.
- Matsumoto, K., Hatori, Y., Murayama, T., Tashima, K., Wongseripatana, S., Misawa, K., Kitajima, M., Takayama, H., y Horie, S. 2006. Involvement of μ -opioid receptors in antinociception and inhibition of gastrointestinal transit induced by 7-hydroxymitragynine, isolated from Thai herbal medicine *Mitragyna speciosa*. *European Journal of Pharmacology*, 549(1-3): 63-70.
- Mc Donald, M. P., y Bruce, O. J. 1997. Present Imperfect: A Critical Review of Animal Models of the Mnemonic Impairments in Alzheimer's Disease. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 22(1): 99-120.
- McDonald, M. P., y Overmier, J. B. 1998. Present imperfect: a critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev*, 22(1): 99-120.
- McDonald, R. J. 2002. Multiple combinations of co-factors produce variants of age-related cognitive decline: a theory. *Canadian journal of experimental psychology = Revue canadienne de psychologie expérimentale*, 56(3): 221-39.
- McDonald, R. J., Craig, L. A., y Hong, N. S. 2010. The etiology of age-related dementia is more complicated than we think. *Behavioural Brain Research*, 214(1): 3-11.
- Medina, J. H., Viola, H., Wolfman, C., Marder, M., Wasowski, C., Calvo, D., y Paladini, A. C. 1997. Overview—Flavonoids: A New Family of Benzodiazepine Receptor Ligands. *Neurochemical Research*, 22(4): 419-425.
- Medina, J. H., Viola, H., Wolfman, C., Marder, M., Wasowski, C., Calvo, D., y Paladini, A. C. 1998. Neuroactive flavonoids: new ligands for the Benzodiazepine receptors. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 5(3): 235-43.
- Millan, M. J. 1994. Serotonin and pain: evidence that activation of 5-HT1A receptors does not elicit

- antinociception against noxious thermal, mechanical and chemical stimuli in mice. *Pain*, 58(1): 45-61.
- Millan, M. J. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1): 1-164.
- Millan, M. J. 2002. Descending control of pain. *Progress in neurobiology*, 66(6): 355-474.
- Millan, M. J. 2005. Serotonin 5-HT_{2C} receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. *Thérapie*, 60(5): 441-60.
- Minami, M., y Satoh, M. 1995. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neuroscience research*, 23(2): 121-45.
- Minders, C., Petzer, J. P., Petzer, A., y Lourens, A. C. U. 2015. Monoamine oxidase inhibitory activities of heterocyclic chalcones. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*, 25(22): 5270-5276.
- Miranda, H. F., Lemus, I., y Pinardi, G. 2003. Effect of the inhibition of serotonin biosynthesis on the antinociception induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Brain Research Bulletin*, 61(4): 417-425.
- Mizoguchi, H., Watanabe, C., Sakurada, T., y Sakurada, S. 2012. New vistas in opioid control of pain. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(1): 87-91.
- Mohamad, A. S., Akhtar, M. N., Zakaria, Z. A., Perimal, E. K., Khalid, S., Mohd, P. A., Khalid, M. H., Israf, D. A., Lajis, N. H., y Sulaiman, M. R. 2010. Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, flavokawin B on chemical and thermal models of nociception in mice. *European journal of pharmacology*, 647(1-3): 103-9.
- Möhler, H. 2012. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*, 62(1): 42-53.
- Morales-Camilo, N., Salas, C. O., Sanhueza, C., Espinosa-Bustos, C., Sepúlveda-Boza, S., Reyes-Parada, M., Gonzalez-Nilo, F., Caroli-Rezende, M., y Fierro, A. 2015. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Simulation of Chalcones and Aurones as Selective MAO-B Inhibitors. *Chemical Biology y Drug Design*, 85(6): 685-695.
- Moskowitz, A. S. y Goodman, R. R. 1985. Autoradiographic distribution of mu1 and mu2 opioid binding in the mouse central nervous system. *Brain research*, 360(1-2): 117-29.
- Mugwagwa, A. T., Gadaga, L. L., Pote, W., y Tagwireyi, D. 2015. Antiamnesic Effects of a Hydroethanolic Extract of *Crinum macowanii* on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice. *Journal of Neurodegenerative Diseases*, 2015: 1-9.
- Murray, C. W., Porreca, F., y Cowan, A. 1988. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. *Journal of pharmacological methods*, 20(2): 175-86.
- Nahmias, Y., Goldwasser, J., Casali, M., van Poll, D., Wakita, T., Chung, R. T., y Yarmush, M. L. 2008. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*, 47(5): 1437-1445.
- Narita, M., Funada, M., y Suzuki, T. 2001. Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacology y therapeutics*, 89(1): 1-15.
- National Institute for Health & Clinical Excellence (UK). 2010. *The Nice guideline on the Treatment and Management of Depression in Adults (Updated edition)* (First.). Londres: British Psychological Society.
- Nénonéné, E. K., Radja, F., Carli, M., Grondin, L., Reader, T. A., Nennonene, E. K., Radja, F., Carli, M., Grondin, L., y Reader, T. A. 1994. Heterogeneity of cortical and hippocampal 5-HT_{1A} receptors: a reappraisal of homogenate binding with 8-[³H]hydroxydipropylaminotetralin. *Journal of Neurochemistry*, 62(5): 1822-1834.
- Nestler, E. J. 2001. Molecular neurobiology of drug addiction. *The American Journal on Addictions*, 10: 201-217.
- Nestler, E. J., y Hyman, S. E. 2010. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 13(10): 1161-1169.
- Neubert, J. K., Rossi, H. L., Pogar, J., Jenkins, A. C., y Caudle, R. M. 2007. Effects of mu- and kappa-2 opioid receptor agonists on pain and rearing behaviors. *Behavioral and Brain Functions*, 3(1): 49.

- Newman, D. J., y Cragg, G. M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, 70(3): 461-77.
- Nie, Q., Du, X., y Geng, M. 2011. Small molecule inhibitors of amyloid β peptide aggregation as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Acta pharmacologica Sinica*, 32(5): 545-51.
- Nowakowska, Z. 2007. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European journal of medicinal chemistry*, 42(2): 125-37.
- Ocaña, M., Cendán, C. M., Cobos, E. J., Entrena, J. M., y Baeyens, J. M. 2004. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3): 203-219.
- Ognibene, E., Bovicelli, P., Adriani, W., Saso, L., y Laviola, G. 2008. Behavioral effects of 6-bromoflavanone and 5-methoxy-6,8-dibromoflavanone as anxiolytic compounds. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(1): 128-134.
- Olivier, B., Soudijn, W., y van Wijngaarden, I. 1999. The 5-HT_{1A} receptor and its ligands: structure and function. En E. Jucker (Ed.), *Progress in Drug Research* (Vol. 52, pp. 103-165). Basel: Birkhäuser Basel.
- Olsen, R. W., y Sieghart, W. 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. *Pharmacological Reviews*, 60(3): 243-260.
- Olsen, R. W., y Sieghart, W. 2009. GABA_A receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56(1): 141-148.
- Olsen, W., y Tobin, J. 1990. Molecular biology of GABA_A receptors. *The FASEB Journal*, 4(5): 1469-1480.
- Ono, M., Haratake, M., Mori, H., y Nakayama, M. 2007a. Novel chalcones as probes for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 15(21): 6802-6809.
- Ono, M., Hori, M., Haratake, M., Tomiyama, T., Mori, H., y Nakayama, M. 2007b. Structure-activity relationship of chalcones and related derivatives as ligands for detecting of beta-amyloid plaques in the brain. *Bioorganic y medicinal chemistry*, 15(19): 6388-96.
- Ono, M., Watanabe, R., Kawashima, H., Cheng, Y., Kimura, H., Watanabe, H., Haratake, M., Saji, H., y Nakayama, M. 2009. Fluoro-pegylated Chalcones as Positron Emission Tomography Probes for in Vivo Imaging of β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(20): 6394-6401.
- Ormazábal, M. J., Goicoechea, C., Alfaro, M. J., Sánchez, E., y Martín, M. I. 1999. Study of mechanisms of calcitonin analgesia in mice. Involvement of 5-HT₃ receptors. *Brain research*, 845(2): 130-8.
- Pajouhesh, H., y Lenz, G. R. 2005. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRX*, 2(4): 541-553.
- Paladini, A. C., Marder, M., Viola, H., Wolfan, C., Wasowski, C., y Medina, J. H. 1999. Flavonoids and the Central Nervous System: from Forgotten Factors to Potent Anxiolytic Compounds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(5): 519-526.
- Pan, X., Kong, L. D., Zhang, Y., Cheng, C. H., y Tan, R. X. 2000. In vitro inhibition of rat monoamine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. *Acta pharmacologica Sinica*, 21(10): 949-53.
- Pan, Z. Z. 1998. μ -Opposing actions of the κ -opioid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 19(3): 94-98.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., y Briley, M. 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 14(3): 149-67.
- Peng, X., Knapp, B. I., Bidlack, J. M., y Neumeyer, J. L. 2007. Pharmacological Properties of Bivalent Ligands Containing Butorphan Linked to Nalbuphine, Naltrexone, and Naloxone at μ , δ , and κ Opioid Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(9): 2254-2258.
- Perl, E. R. 1999. Causalgia, pathological pain, and adrenergic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14): 7664-7667.

- Philipp, M., Brede, M., y Hein, L. 2002. Physiological significance of $\alpha 2$ -adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283(2): R287-R295.
- Phillips, C. J. 2006. Economic burden of chronic pain. *Expert Review of Pharmacoeconomics y Outcomes Research*, 6(5): 591-601.
- Physiological Research. Maze Test. Recuperado a partir de <http://physiologicalresearch.weebly.com/t-maze-test.html>
- Pillay, N. S., y Stein, D. J. 2007. Emerging anxiolytics. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 12(4): 541-554.
- Pinho, B. R., Ferreres, F., Valentão, P., y Andrade, P. B. 2013. Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: an approach to Alzheimer's disease treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(12): 1681-1700.
- Pomilio, A. B., Oscar, J., Ollivier, C., y Vitale, A. A. 2013. Flavoproteínas que actúan como amino-oxidasas: Estructura, función e importancia clínica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(2): 279-305.
- Popik, P., Kozela, E., Wróbel, M., Wozniak, K. M., y Slusher, B. S. 2003. Morphine Tolerance and Reward but not Expression of Morphine Dependence are Inhibited by the Selective Glutamate Carboxypeptidase II (GCP II, NAALADase) Inhibitor, 2-PMPA. *Neuropsychopharmacology*, 28(3): 457-467.
- Porreca, F., Mosberg, H. I., Omnaas, J. R., Burks, T. F., y Cowan, A. 1987. Supraspinal and spinal potency of selective opioid agonists in the mouse writhing test. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 240(3): 890-4.
- Porsolt, R. D., Lenègre, A., y McArthur, R. A. 1991. Pharmacological Models of Depression. *Animal Models in Psychopharmacology* (pp. 137-159). Basel: Birkhäuser Basel.
- Qu, Y. 2014. Studies on antidepressant activity of a chalcone compound of Qu-1302. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(8): 495-498.
- Raehal, K. M. 2005. In Vivo Characterization of μ -Naltrexol, an Opioid Ligand with Less Inverse Agonist Activity Compared with Naltrexone and Naloxone in Opioid-Dependent Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313(3): 1150-1162.
- Ralvenius, W. T., Benke, D., Acuña, M. a, Rudolph, U., y Zeilhofer, H. U. 2015. Analgesia and unwanted benzodiazepine effects in point-mutated mice expressing only one benzodiazepine-sensitive GABA_A receptor subtype. *Nature Communications*, 6: 6803.
- Regan, J. W., Yamamura, H. I., Yamada, S., y Roeske, W. R. 1981. High affinity renal [3H]flunitrazepam binding: Characterization, localization, and alteration in hypertension. *Life Sciences*, 28(9): 991-998.
- Robinson, S. J., Petzer, J. P., Petzer, A., Bergh, J. J., y Lourens, A. C. U. 2013. Selected furanochalcones as inhibitors of monoamine oxidase. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*, 23(17): 4985-4989.
- Rodriguez-Arias, M., Aguilar Calpe, M. A., y Lopez Miñarro, J. 1999. Agresión y efectos condicionados en el síndrome de abstinencia a los opiáceos. *Trastornos Adictivos*, 1(3).
- Ruiu, S., Anzani, N., Orrù, A., Floris, C., Caboni, P., Alcaro, S., Maccioni, E., Distinto, S., y Cottiglia, F. 2015. Methoxyflavones from *Stachys glutinosa* with binding affinity to opioid receptors: in silico, in vitro, and in vivo studies. *Journal of natural products*, 78(1): 69-76.
- Salgueiro, J. B., Ardenghi, P., Dias, M., Ferreira, M. B., Izquierdo, I., y Medina, J. H. 1997. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 58(4): 887-91.
- Sánchez, A. P. 2014. Comorbilidades en dolor. *Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición «Salvador Zubirán»*. Departamento de Medicina del Dolor y Paliativa. Recuperado a partir de <http://www.dolorypaliativos.org/jc57.asp>
- Schechter, L. E., Dawson, L. A., y Harder, J. A. 2002. The potential utility of 5-HT_{1A} receptor antagonists in the treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 8(2): 139-145.

- Schildkraut, J. J. 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *The American journal of psychiatry*, 122(5): 509-522.
- Schloss, P., y Williams, D. C. 1998. The serotonin transporter: a primary target for antidepressant drugs. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 12(2): 115-121.
- Schreiber, S., Rigai, T., Katz, Y., y Pick, C. G. 2002. The antinociceptive effect of mirtazapine in mice is mediated through serotonergic, noradrenergic and opioid mechanisms. *Brain Research Bulletin*, 58(6): 601-605.
- Schulz, R., Wüster, M., y Herz, A. 1979. Centrally and peripherally mediated inhibition of intestinal motility by opioids. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 308(3): 255-60.
- Sepúlveda, J., Astorga, J. G., y Contreras, E. 1999. Riluzole decreases the abstinence syndrome and physical dependence in morphine-dependent mice. *European Journal of Pharmacology*, 379(1): 59-62.
- Serpell, M. G., Makin, A., y Harvey, A. 1998. Acute pain physiology and pharmacological targets: The present and future. *Acute Pain*, 1(3): 31-47.
- Shah, R. S., Lee, H.-G., Xiongwei, Z., Perry, G., Smith, M. A., y Castellani, R. J. 2008. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 62(4): 199-207.
- Shen, X. L., Nielsen, M., Witt, M. R., Sterner, O., Bergendorff, O., y Khayyal, M. 1994. Inhibition of [methyl-3H]diazepam binding to rat brain membranes in vitro by dinatin and skrofulein. *Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica*, 15(5): 385-8.
- Sheng, R., Lin, X., Zhang, J., Chol, K. S., Huang, W., Yang, B., He, Q., y Hu, Y. 2009. Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potent AChE inhibitors. *Bioorganic y medicinal chemistry*, 17(18): 6692-8.
- Sinclair, M. D. 2003. A review of the physiological effects of alpha2-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne*, 44(11): 885-97.
- Skolnick, P. 2005. Dopamine and Depression. *Dopamine and Glutamate in Psychiatric Disorders* (pp. 199-214). Totowa, NJ: Humana Press.
- Smith, A. P., y Lee, N. M. 2003. Opioid receptor interactions: Local and nonlocal, symmetric and asymmetric, physical and functional. *Life Sciences*, 73(15): 1873-1893.
- Smith, K. S., y Rudolph, U. 2012. Anxiety and depression: Mouse genetics and pharmacological approaches to the role of GABAA receptor subtypes. *Neuropharmacology*, 62(1): 54-62.
- Sociedad Española del Dolor. 2001. Conceptos, tipos de dolor y fisiopatología. *Plan nacional para la Enseñanza y formación en técnicas y tratamiento del dolor* (pp. 1-9). Sociedad Española del Dolor.
- Soreq, H., y Seidman, S. 2001. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(4): 294-302.
- Spencer, J. P. E., y Crozier, A. 2012. *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*. Boca Raton: CRC Press Taylor y Francis Group.
- Stafford, G. I., Pedersen, P. D., Jäger, A. K., y Van Staden, J. 2007. Monoamine oxidase inhibition by southern African traditional medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 73(3): 384-390.
- Stanford Neurosciences Institute. 2016. Stanford Behavioral and Functional Neuroscience Laboratory. Recuperado a partir de <http://sbnl.stanford.edu/cs/bm/lm/>
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., y Simon, P. 1985. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3): 367-370.
- Sugimoto, H., Ogura, H., Arai, Y., Iimura, Y., y Yamanishi, Y. 2002. Research and Development of Donepezil Hydrochloride, a New Type of Acetylcholinesterase Inhibitor. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 89(1): 7-20.
- Sui, X., Quan, Y.-C., Chang, Y., Zhang, R.-P., Xu, Y.-F., y Guan, L.-P. 2012. Synthesis and studies on antidepressant activity of 2',4',6'-trihydroxychalcone derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 21(7): 1290-1296.

- Suzuki, T., y Misawa, M. 1997. Opioid receptor types and dependence. *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica*, 109(4): 165-74.
- Tabarelli, Z., Rubin, M. A., Berlese, D. B., Sauzem, P. D., Missio, T. P., Teixeira, M. V., Sinhorin, A. P., Martins, M. A. P., Zanatta, N., Bonacorso, H. G., y Mello, C. F. 2004. Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(10): 1531-1540.
- Taiwan Mouse Clinic. Hot Plate test. Recuperado a partir de <http://tmc.sinica.edu.tw/hotcold.html>
- Takeda, H., Tsuji, M., y Matsumiya, T. 1998. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology*, 350(1): 21-29.
- Takemori, A. E., y Portoghese, P. S. 1984. Comparative antagonism by naltrexone and naloxone of μ , κ , and δ agonists. *European Journal of Pharmacology*, 104(1-2): 101-104.
- Tanaka, S., Kuwai, Y., y Tabata, M. 1987. Isolation of Monoamine Oxidase Inhibitors from Glycyrrhiza uralensis Roots and the Structure-Activity Relationship. *Planta Medica*, 53(1): 5-8.
- Tanoue, A., Koshimizu, T., y Tsujimoto, G. 2002. Transgenic studies of $\alpha 1$ -adrenergic receptor subtype function. *Life Sciences*, 71(19): 2207-2215.
- Tayeb, H. O., Yang, H. D., Price, B. H., y Tarazi, F. I. 2012. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology y Therapeutics*, 134(1): 8-25.
- Thapa, A., y Chi, E. Y. 2015. Biflavonoids as Potential Small Molecule Therapeutics for Alzheimer's Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 863, pp. 55-77).
- Thomasy, S. M., Moeller, B. C., y Stanley, S. D. 2007. Comparison of opioid receptor binding in horse, guinea pig, and rat cerebral cortex and cerebellum. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 34(5): 351-358.
- Timár, J., Gyarmati, Z., y Fürst, Z. 2005. The development of tolerance to locomotor effects of morphine and the effect of various opioid receptor antagonists in rats chronically treated with morphine. *Brain Research Bulletin*, 64(5): 417-424.
- Tjølsen, A., Berge, O.-G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., y Hole, K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51(1): 5-17.
- Trott, O., y Olson, A. J. 2009. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA.
- Uriarte-Pueyo, I., y Calvo, M. I. 2011. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors. *Current medicinal chemistry*, 18(34): 5289-302.
- Viana, G. S. B., Bandeira, M. a M., y Matos, F. J. a. 2003. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from Myracrodruon urundeuva allemão. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 10(2-3): 189-95.
- Vidyalakshmi, K., Kamalakannan, P., Viswanathan, S., y Ramaswamy, S. 2010. Antinociceptive effect of certain dihydroxy flavones in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 96(1): 1-6.
- Viet, M. H., Chen, C.-Y., Hu, C.-K., Chen, Y.-R., y Li, M. S. 2013. Discovery of dihydrochalcone as potential lead for Alzheimer's disease: in silico and in vitro study. *PloS one*, 8(11): e79151.
- Viola, H., Marder, M., Nuñez, J., Izquierdo, L., Wasowski, C., Wolfman, C., Ardenghi, P., Barros, D., Medina, J. H., y Paladini, A. C. 1999. 6-Methyl-3'-bromoflavone, a High-Affinity Ligand for the Benzodiazepine Binding Site of the GABAA Receptor with Some Antagonistic Properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262(3): 643-646.
- Viola, H., Marder, M., Wolfman, C., Wasowski, C., Medina, J. H., y Paladini, A. C. 1997. 6-Bromo-3'-nitroflavone, a New High Affinity Benzodiazepine Receptor Agonist Recognizes Two Populations of Cerebral Cortical Binding Sites. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*, 7: 373-378.
- Viola, H., Wasowski, C., Levi de Stein, M., Wolfman, C., Silveira, R., Dajas, F., Medina, J. H., y Paladini, A. C. 1995. Apigenin, a component of Matricaria recutita flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta medica*, 61(3): 213-6.
- Viola, H., Wolfman, C., Marder, M., Goutman, J. ., Bianchin, M., Wasowski, C., Calvo, D. ., Izquierdo, I.,

- Paladini, A. ., y Medina, J. . 2000. 6-Chloro-3'-nitroflavone is a Potent Ligand for the Benzodiazepine Binding Site of the GABAA Receptor Devoid of Intrinsic Activity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65(2): 313-320.
- Vogel, H. 2008. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. (Hans Vogel, Ed.) (3.^a ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., y Whistler, J. L. 2004. OPIOID RECEPTORS. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1): 953-990.
- Wang, H., Hui, K.-M., Chen, Y., Xu, S., Wong, J. T.-F., y Xue, H. 2002. Structure-Activity Relationships of Flavonoids , Isolated from *Scutellaria baicalensis*, Binding to Benzodiazepine Site of GABA A Receptor Complex. *Planta Medica*, 68(12): 1059-1062.
- Wang, L. X., y Wang, Z. J. 2003. Animal and cellular models of chronic pain. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(8): 949-965.
- Wang, W., Hu, X., Zhao, Z., Liu, P., Hu, Y., Zhou, J., Zhou, D., Wang, Z., Guo, D., y Guo, H. 2008. Antidepressant-like effects of liquiritin and isoliquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in the forced swimming test and tail suspension test in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(5): 1179-1184.
- Wasowski, C., y Marder, M. 2012. Flavonoids as GABA A receptor ligands : the whole story? *Journal of Experimental Pharmacology*, 4: 9-24.
- Webster, D. E., He, Y., Chen, S.-N., Pauli, G. F., Farnsworth, N. R., y Wang, Z. J. 2011. Opioidergic mechanisms underlying the actions of *Vitex agnus-castus* L. *Biochemical Pharmacology*, 81(1): 170-177.
- WHO. 2016. OMS. Recuperado a partir de <http://www.who.int/>
- Wilson, M. A., y Junor, L. 2008. The Role of Amygdalar Mu-Opioid Receptors in Anxiety-Related Responses in Two Rat Models. *Neuropsychopharmacology*, 33(12): 2957-2968.
- Wolfman, C., Viola, H., Marder, M., Ardenghi, P., Wasowski, C., Schröder, N., Izquierdo, I., Rúveda, E., Paladini, A., y Medina, J. H. 1998. Pharmacological characterization of 6-bromo-3'-nitroflavone, a synthetic flavonoid with high affinity for the benzodiazepine receptors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 61(3): 239-46.
- Wolfman, C., Viola, H., Marder, M., Wasowski, C., Ardenghi, P., Izquierdo, I., Paladini, A. C., y Medina, J. H. 1996. Anxiolytic properties of 6,3'-dinitroflavone, a high-affinity benzodiazepine receptor ligand. *European journal of pharmacology*, 318(1): 23-30.
- Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A., Dajas, F., y Medina, J. H. 1994. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora Coerulea*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 47(1): 1-4.
- Wu, H. 2002. Roles of Endogenous Opioid Peptides in Modulation of Nocifensive Response to Formalin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(2): 647-654.
- Wu, H., Hung, K., Ohsawa, M., Mizoguchi, H., y Tseng, L. F. 2001. Antisera against endogenous opioids increase the nocifensive response to formalin: demonstration of inhibitory beta-endorphinergic control. *European journal of pharmacology*, 421(1): 39-43.
- Yamaguchi, T., Hagiwara, Y., Tanaka, H., Sugiura, T., Waku, K., Shoyama, Y., Watanabe, S., y Yamamoto, T. 2001. Endogenous cannabinoid, 2-arachidonoylglycerol, attenuates naloxone-precipitated withdrawal signs in morphine-dependent mice. *Brain Research*, 909(1-2): 121-126.
- Yoburn, B. C., Lutfy, K. y Candido, J. 1991. Species differences in mu- and delta-opioid receptors. *European journal of pharmacology*, 193(1): 105-8.
- Yue, C.-Q., Ye, J., Li, C.-L., Li, R.-T., y Sun, Q. 2007. Antinociceptive effects of the novel spirocyclopiperazinium salt compound LXM-10 in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 86(4): 643-650.
- Zalta, A. K. 2011. A meta-analysis of anxiety symptom prevention with cognitive-behavioral interventions. *Journal of Anxiety Disorders*, 25(5): 749-760.
- Zernig, G., Burke, T., Lewis, J. W., y Woods, J. H. 1996. Mechanism of clocinnamox blockade of opioid

receptors: evidence from in vitro and ex vivo binding and behavioral assays. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 279(1): 23-31.

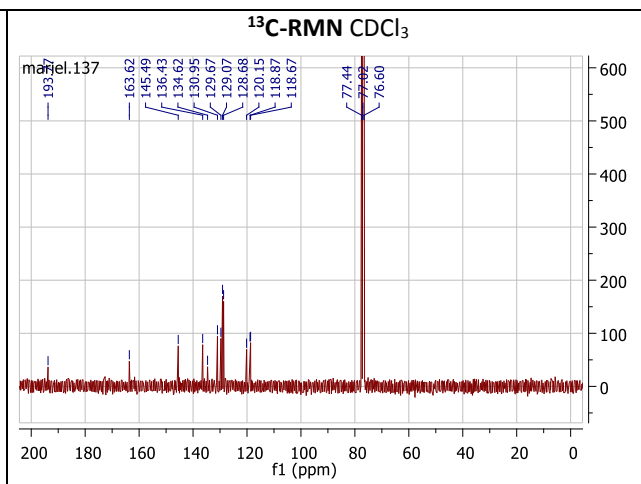
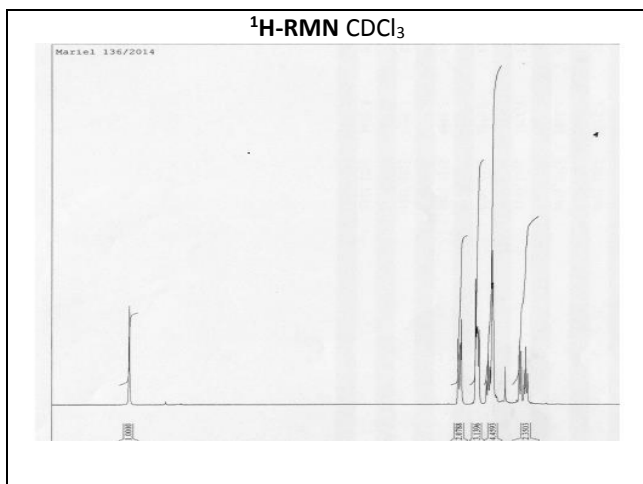
Zhao, C.-S., Tao, Y.-X., Tall, J. M., Donovan, D. M., Meyer, R. A., y Raja, S. N. 2003. Role of μ -opioid receptors in formalin-induced pain behavior in mice. *Experimental Neurology*, 184(2): 839-845.

Zhao, D. H., Zhang, Y. Z., y Zheng, Z. H. 2010. Synthesis and studies on antidepressant effect of 2', 4'-dihydroxychalcone. *Lishizhen Medicine and Materia Medical Research*, 21: 1115-1116.

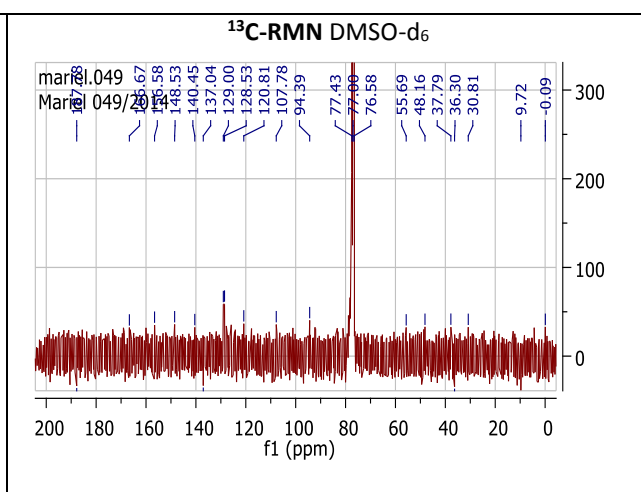
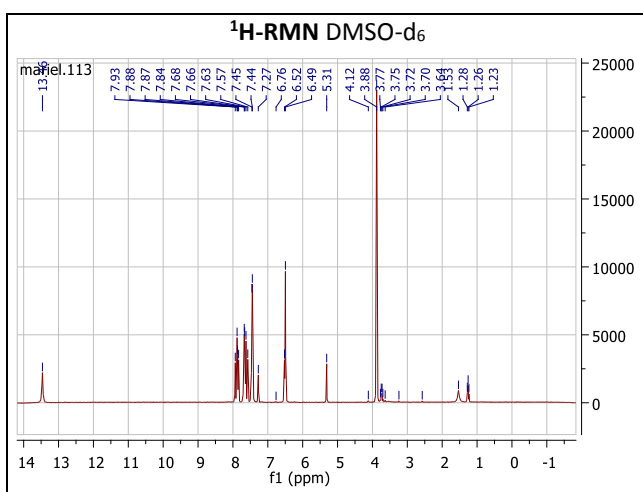
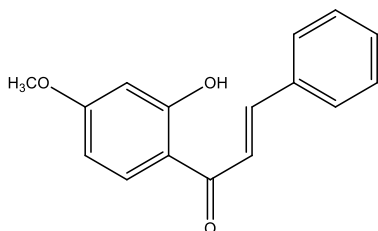
Zhu, M., Phillipson, J. D., Greengrass, P. M., Bowery, N. E., y Cai, Y. 1997. Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein? *Phytochemistry*, 44(3): 441-7.

Anexo

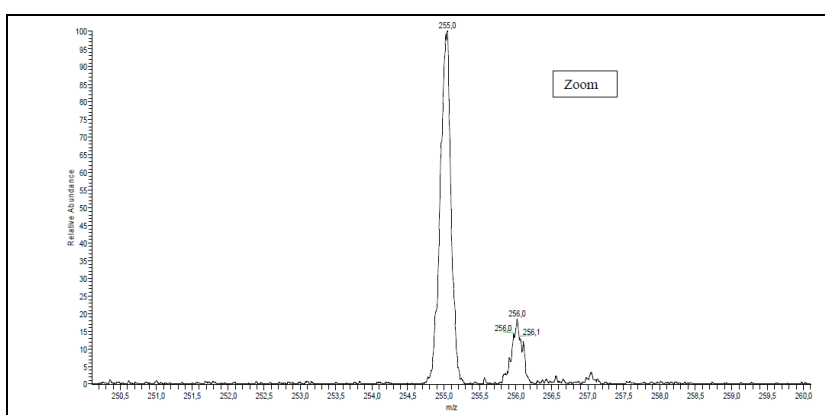
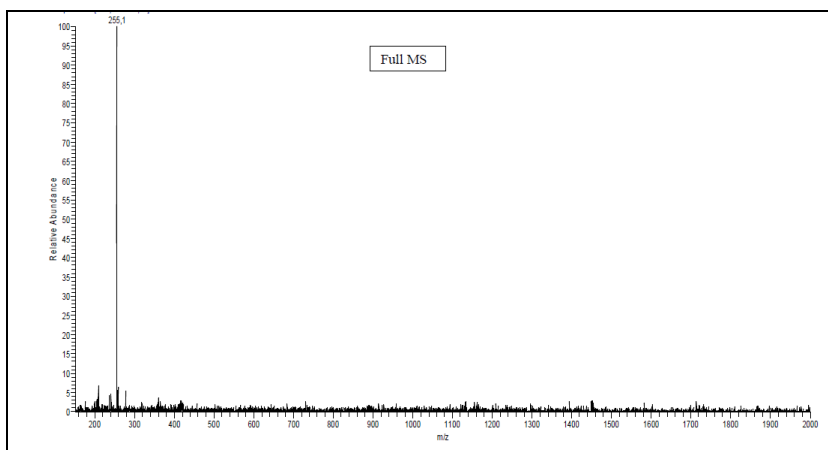
2'-hidroxichalcona (2)



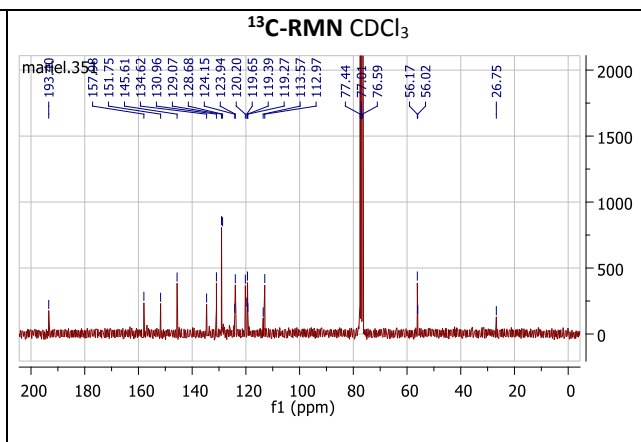
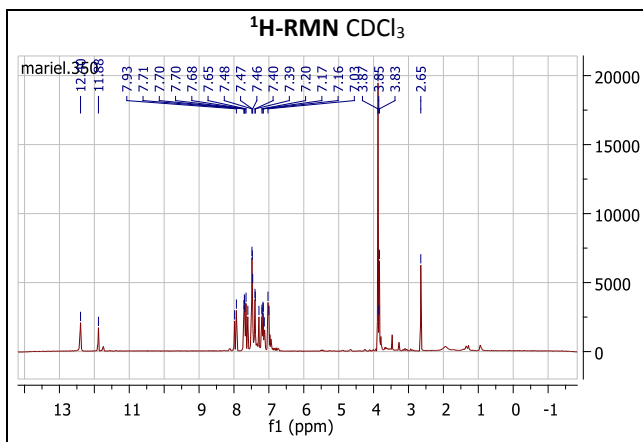
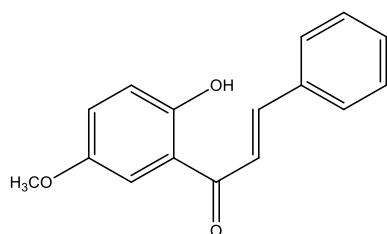
4'-metoxi -2'-hidroxichalcona (3)



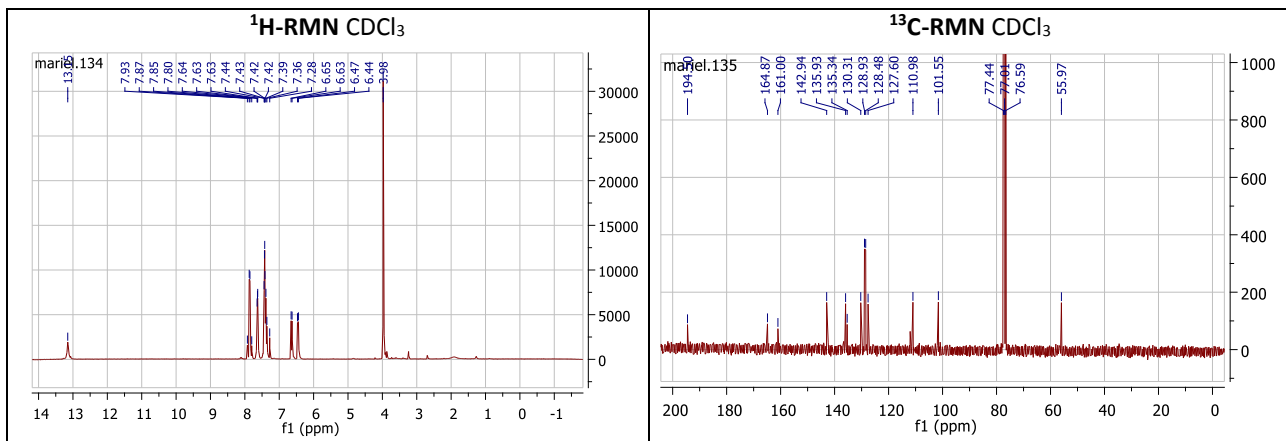
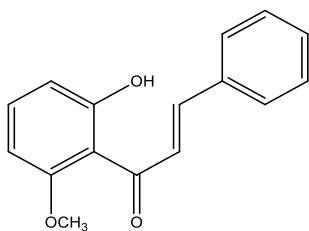
EM



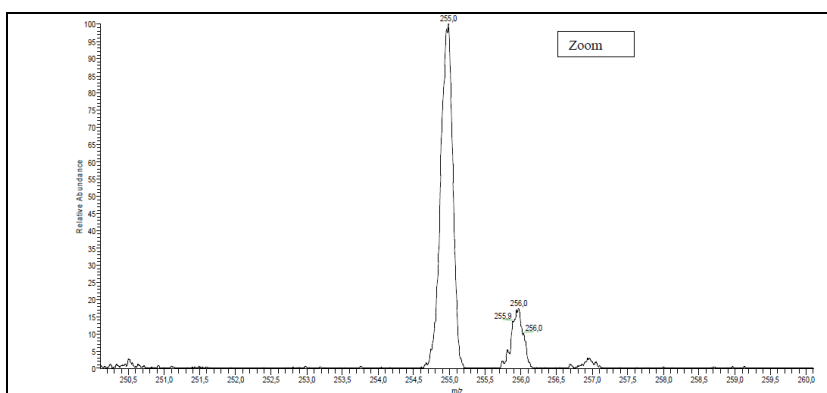
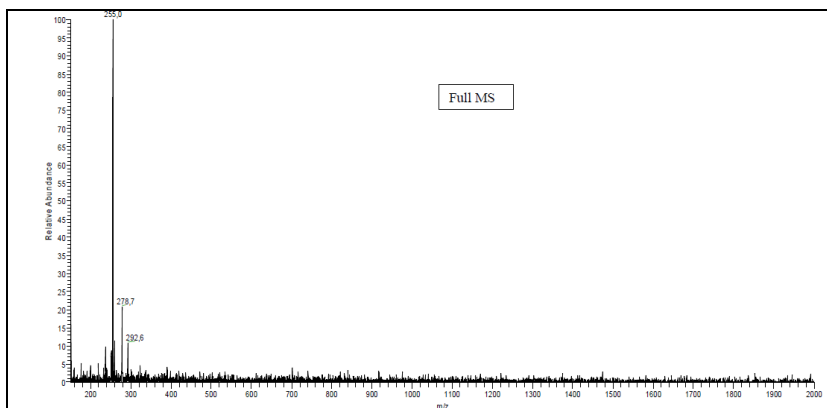
5'-metoxi -2'-hidroxichalcona (4)



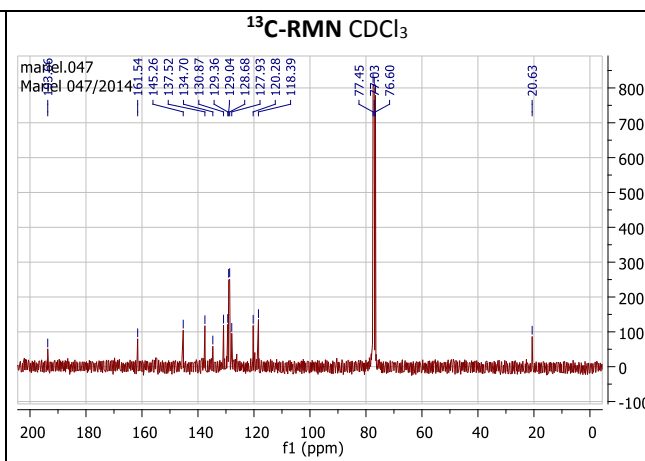
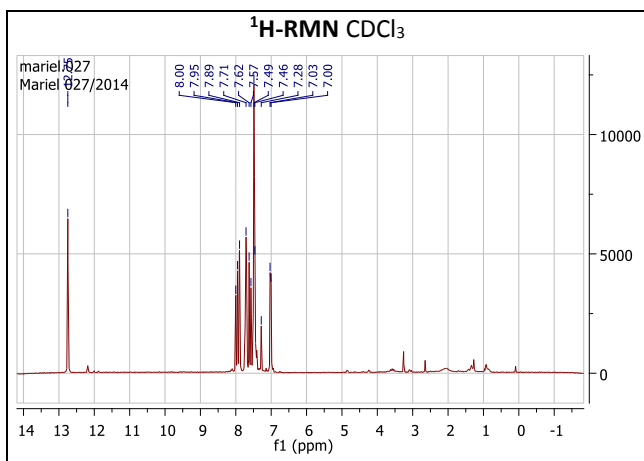
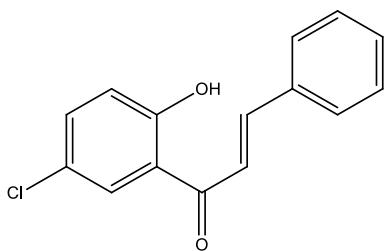
6'-metoxi -2'-hidroxichalcona (5)



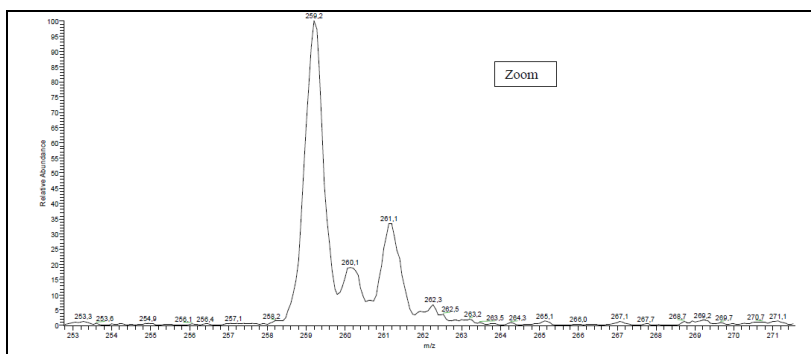
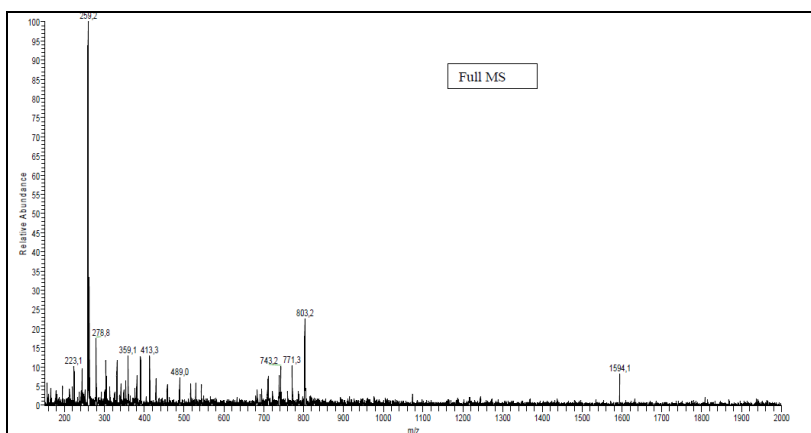
EM



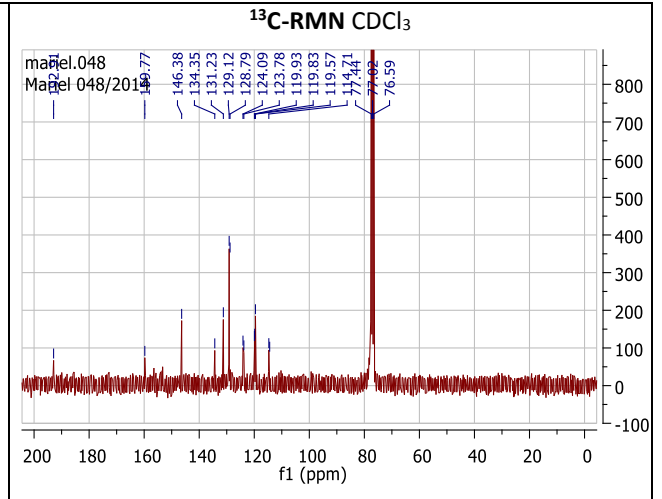
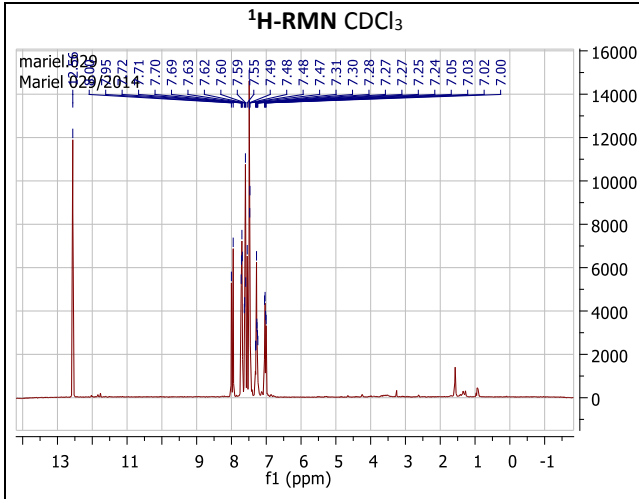
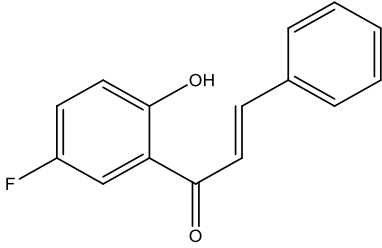
5'-cloro-2'-hidroxichalcona (6)



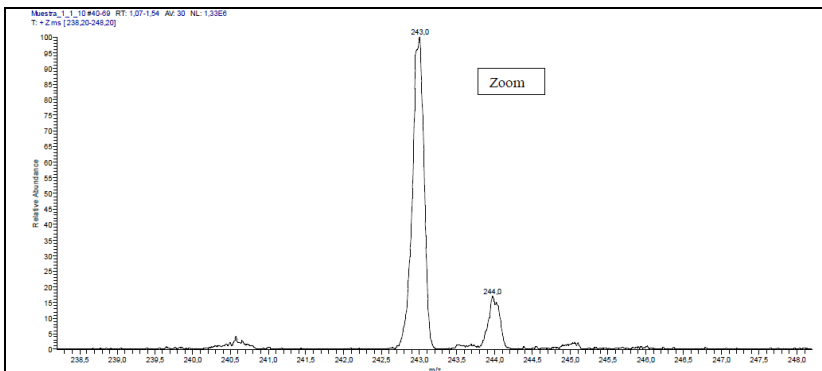
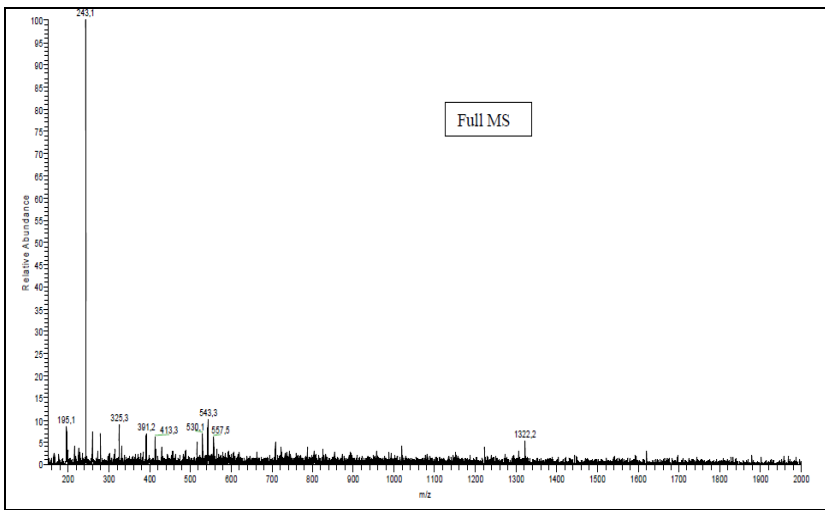
EM



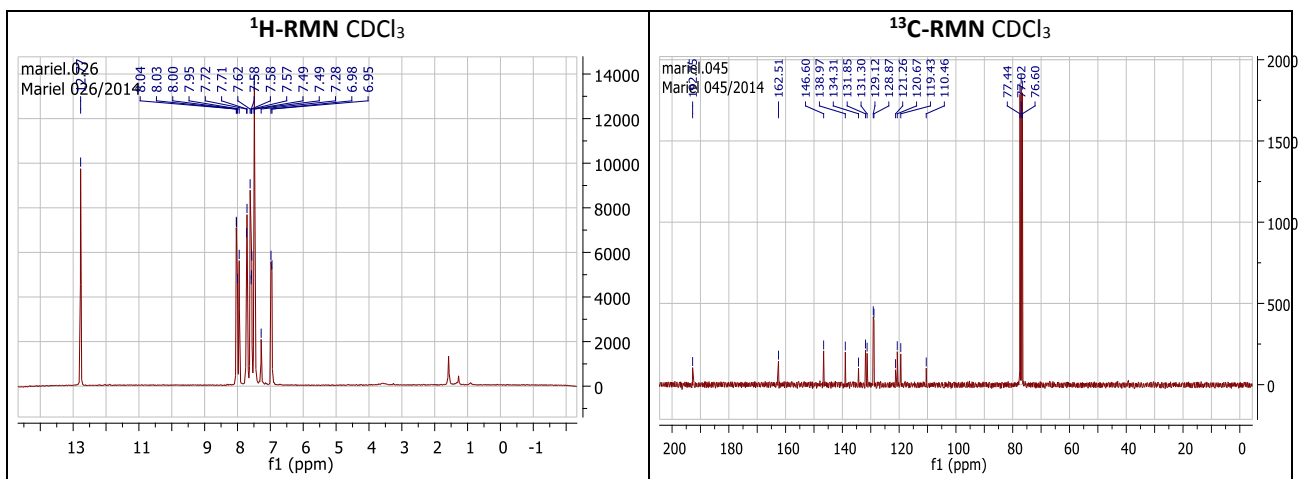
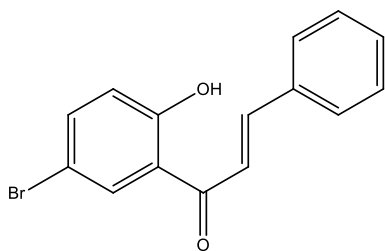
5'-fluor-2'-hidroxichalcona (7)



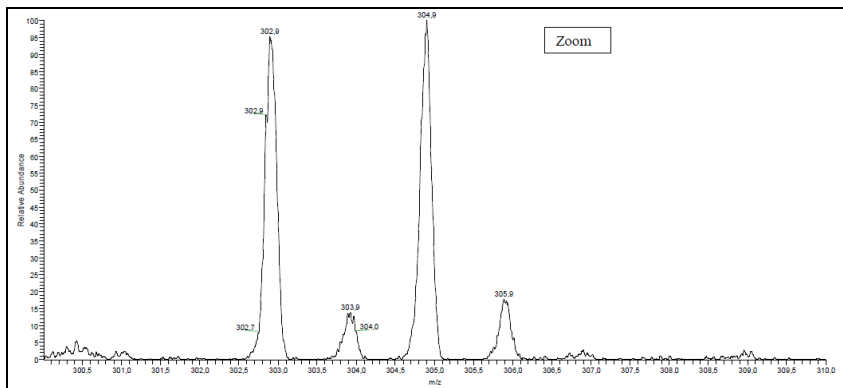
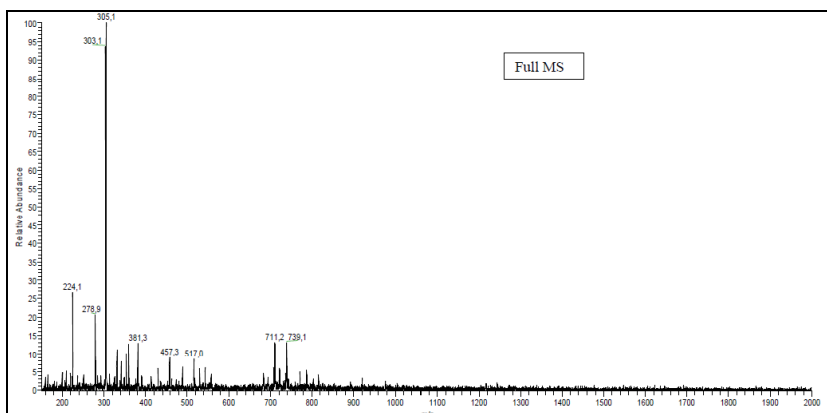
EM



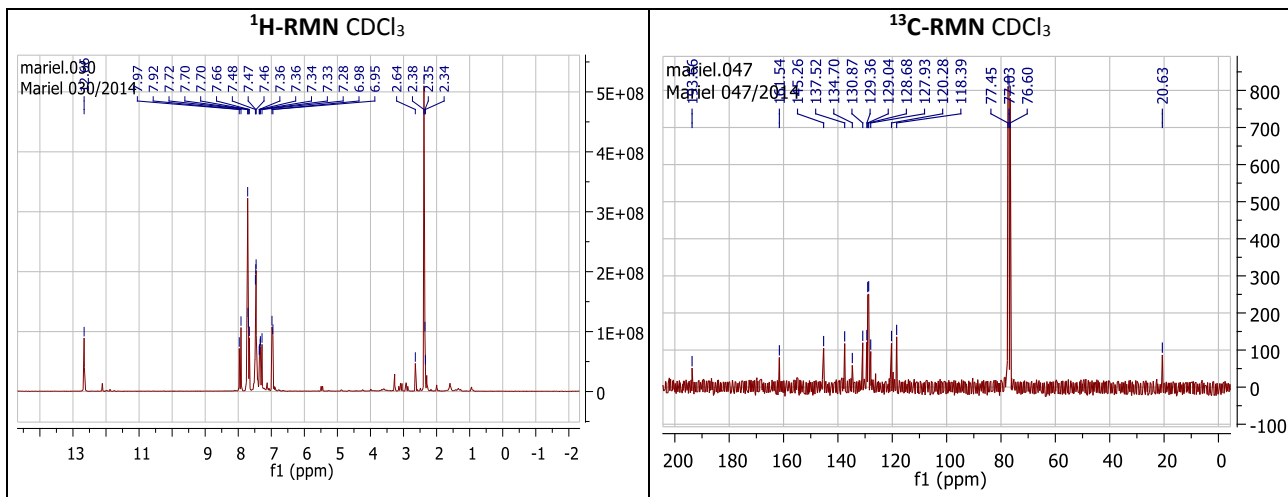
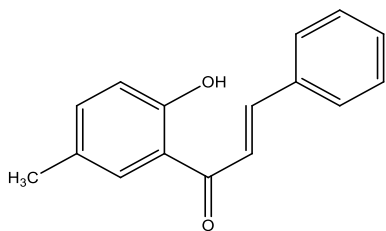
5'-bromo-2'-hidroxichalcona (8)



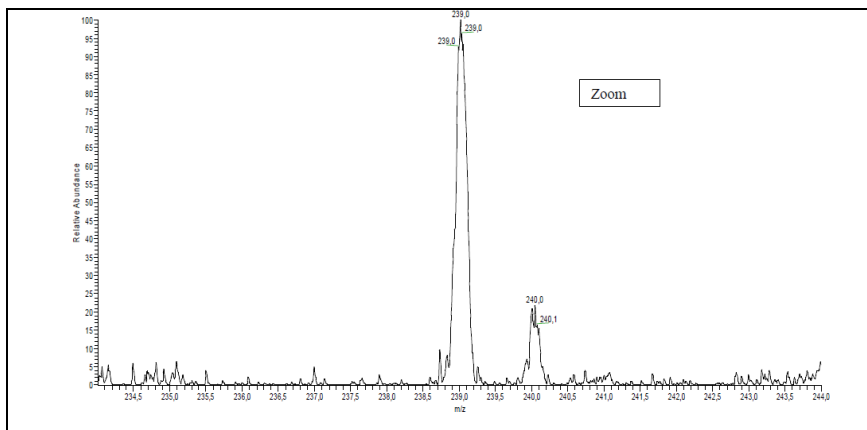
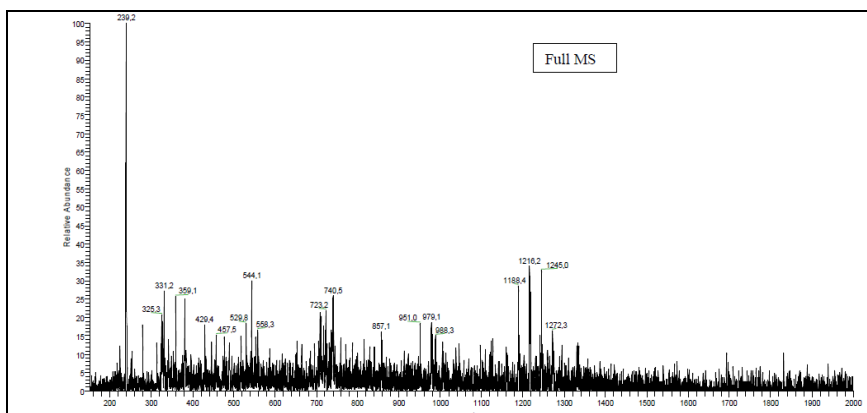
EM



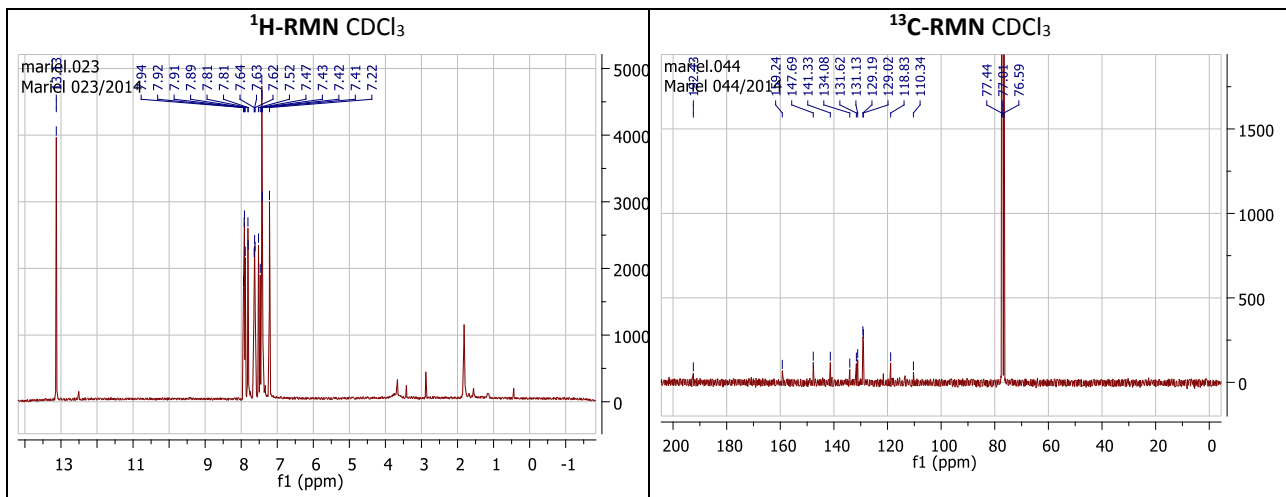
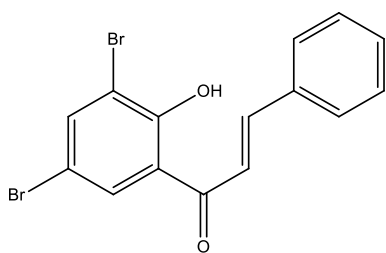
5'-metil-2'-hidroxichalcona (9)



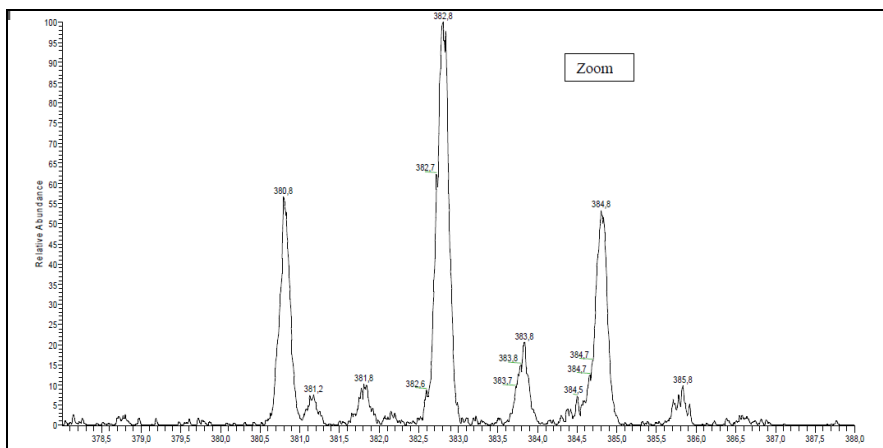
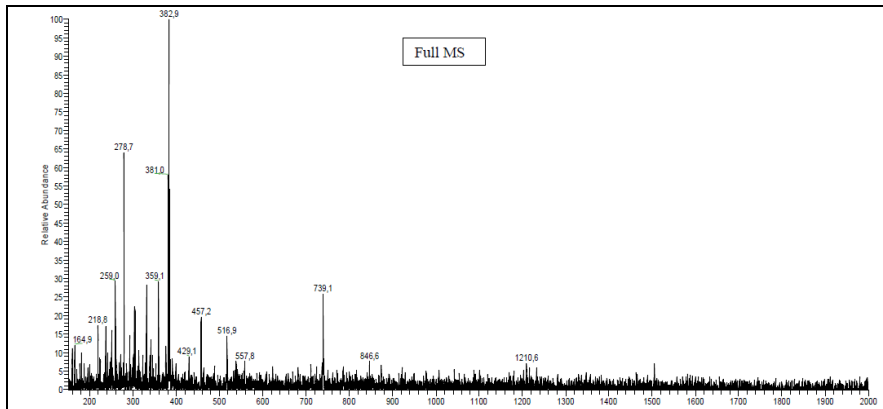
EM



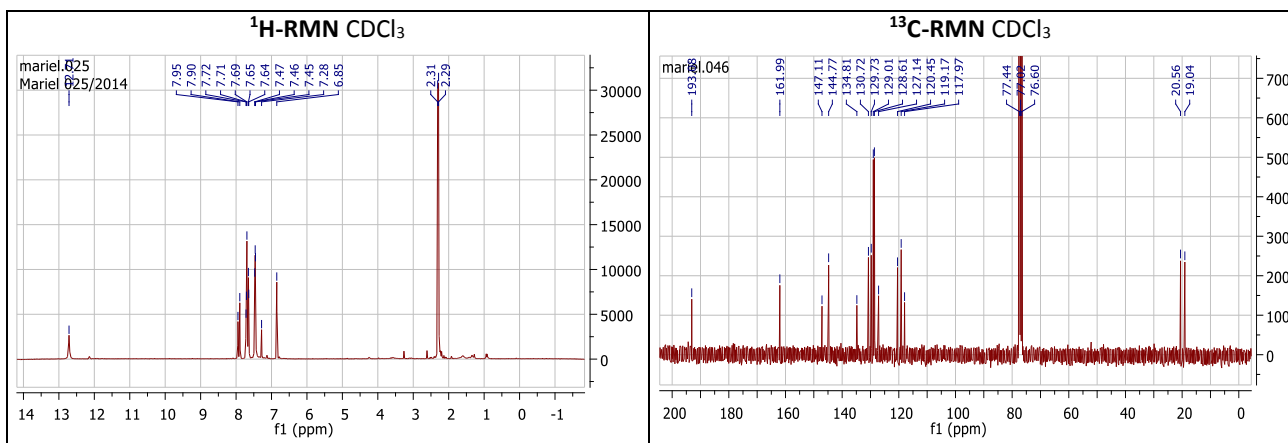
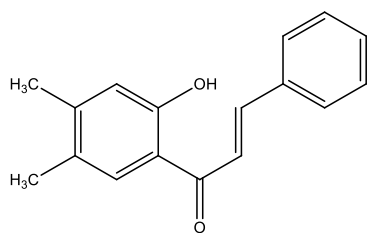
3',5'-dibromo-2'-hidroxichalcona (10)



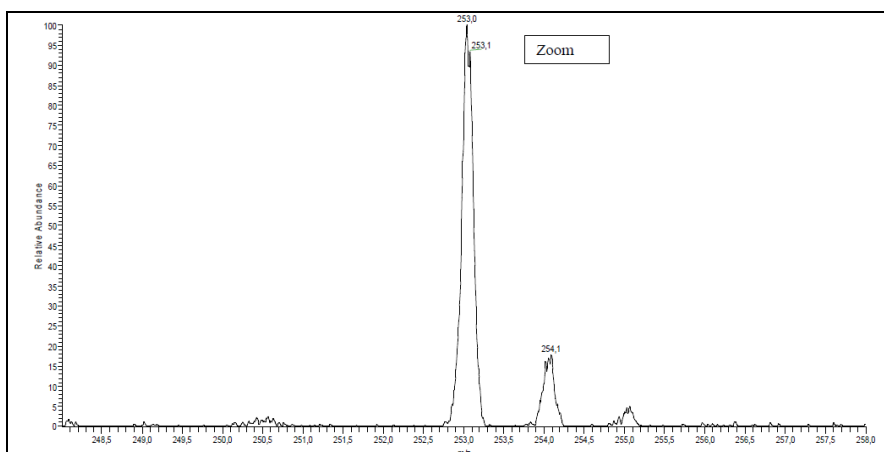
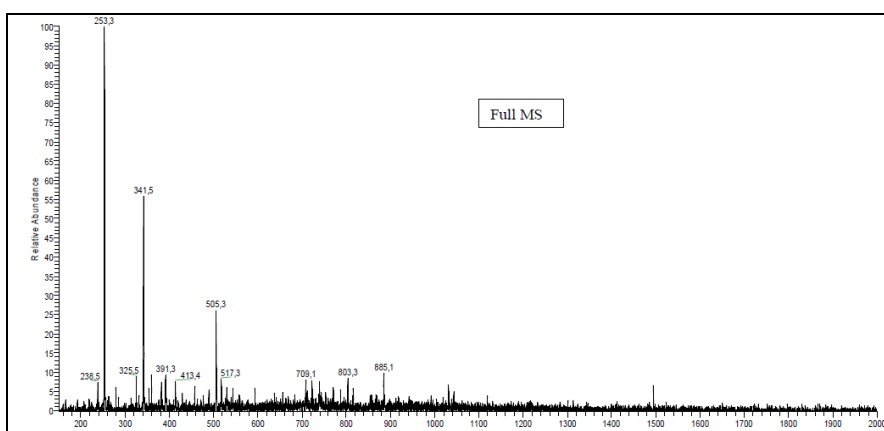
EM



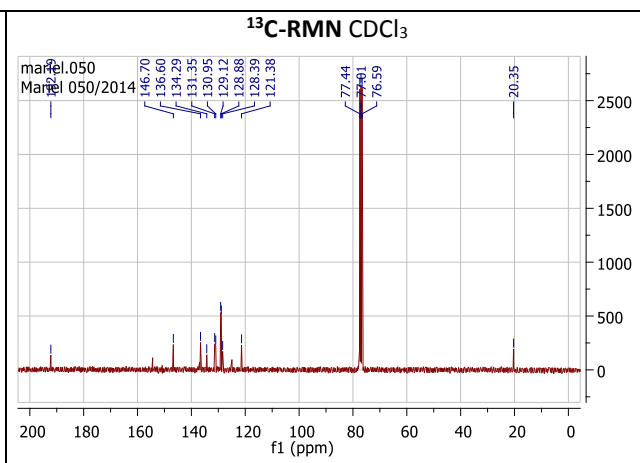
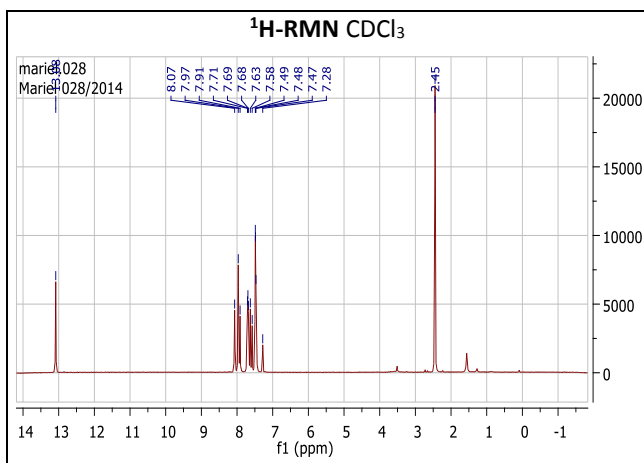
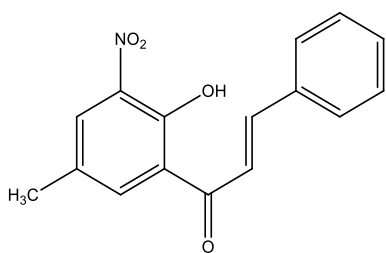
4',5'-dimetil-2'-hidroxichalcona (11)



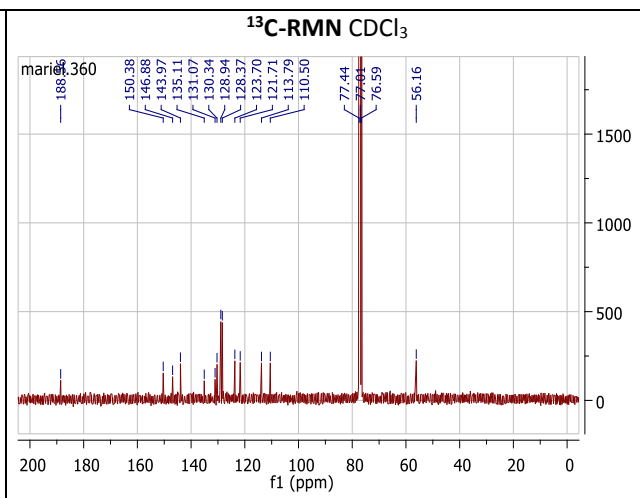
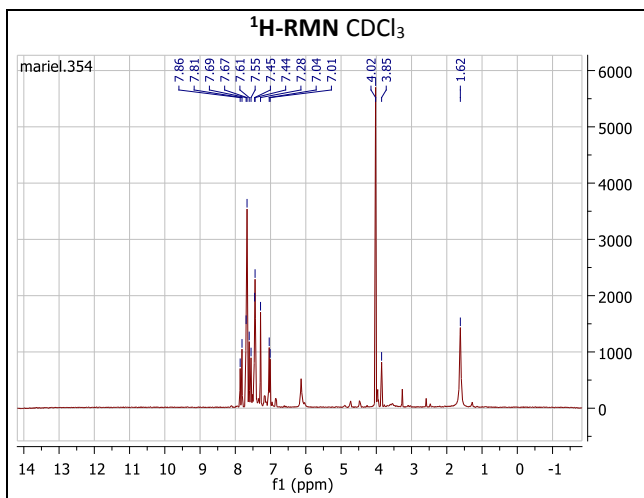
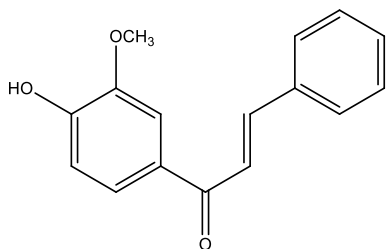
EM



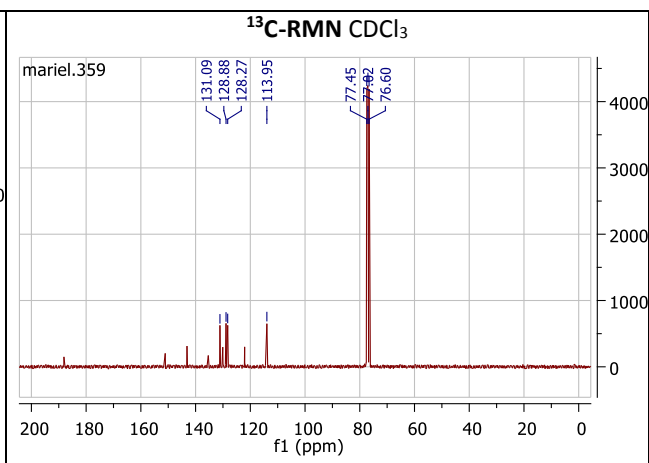
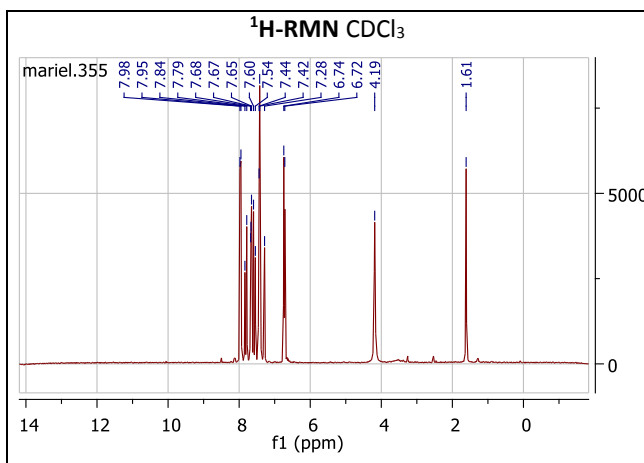
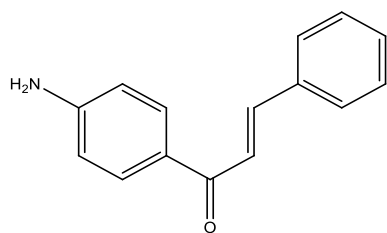
5'-metil-2'-hidroxi-3'-nitrochalcona (12)



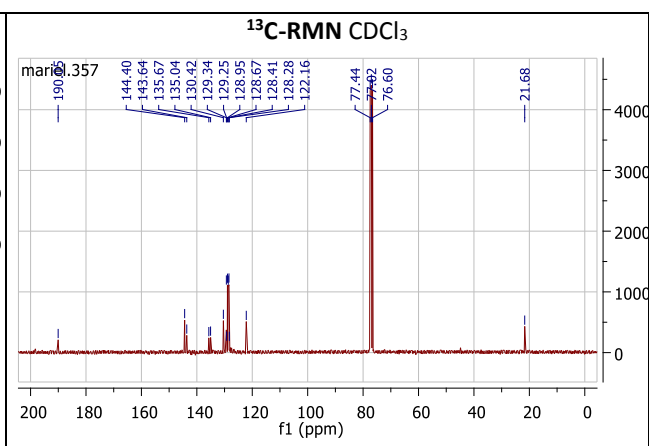
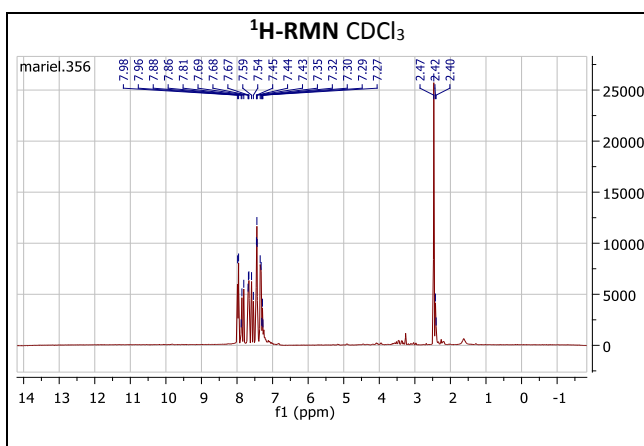
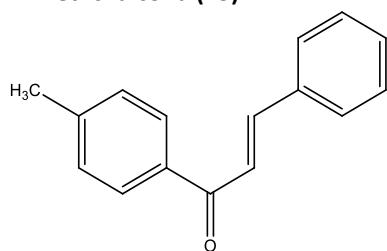
3'-metoxi-4'-hidroxi-chalcona (13)



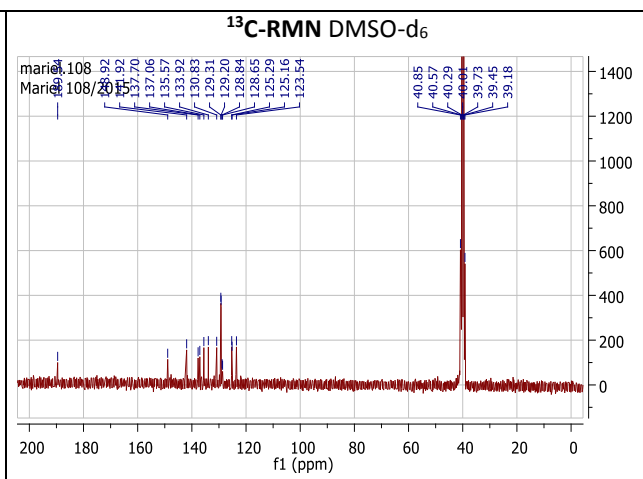
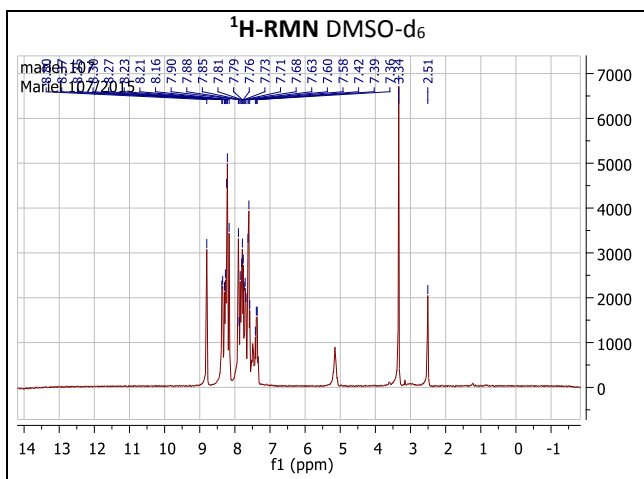
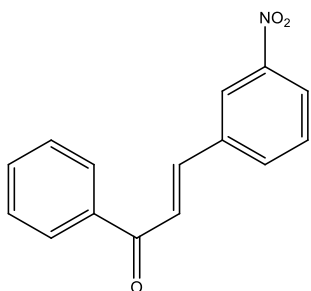
4'-aminochalcona (14)



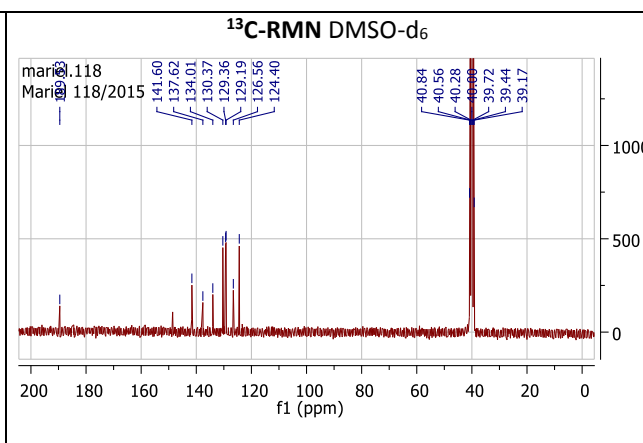
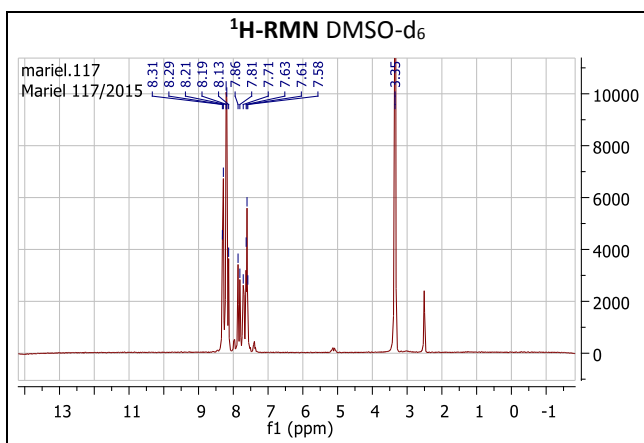
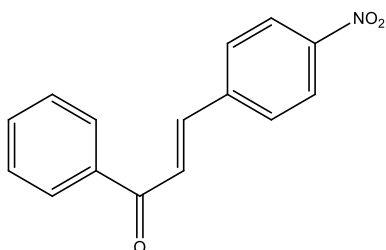
4'-metilchalcona (15)



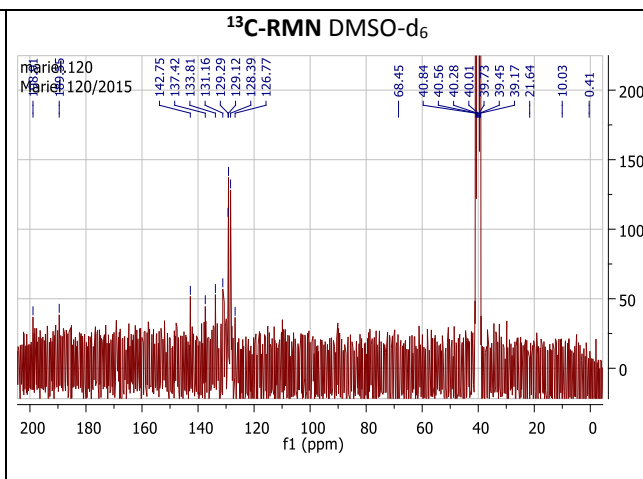
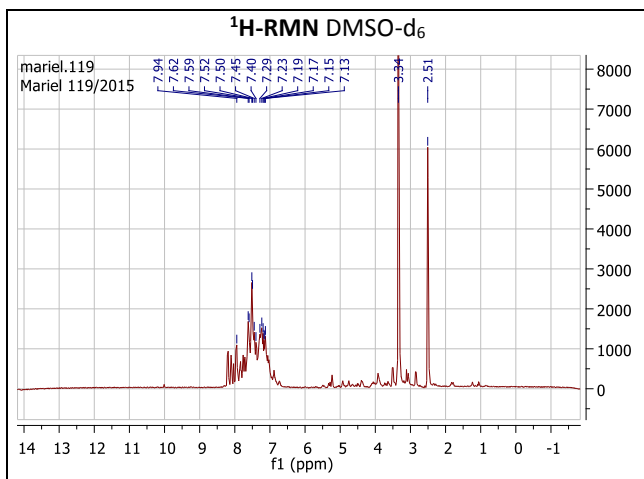
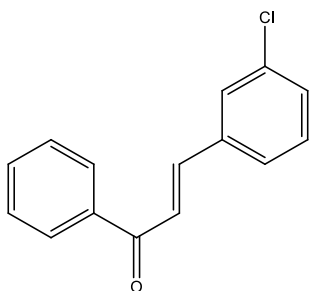
3-nitrochalcona (17)



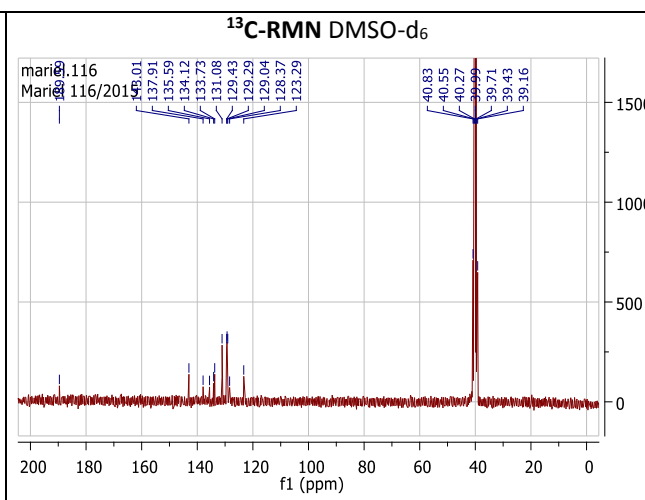
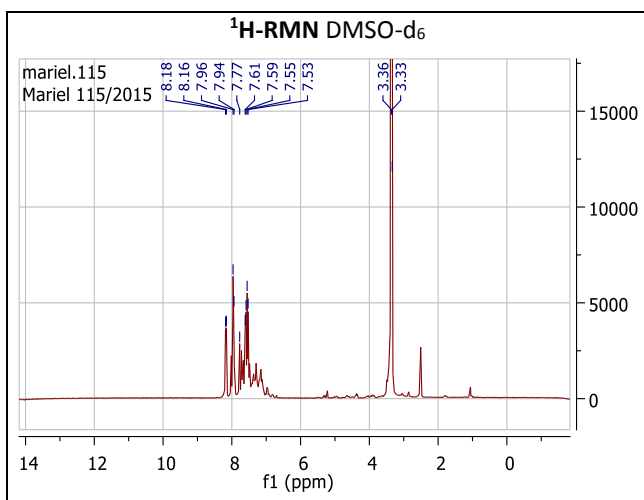
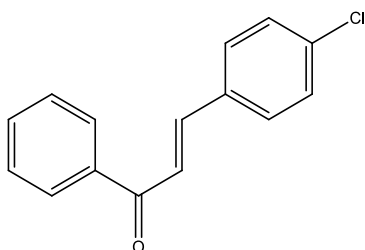
4-nitrochalcona (18)



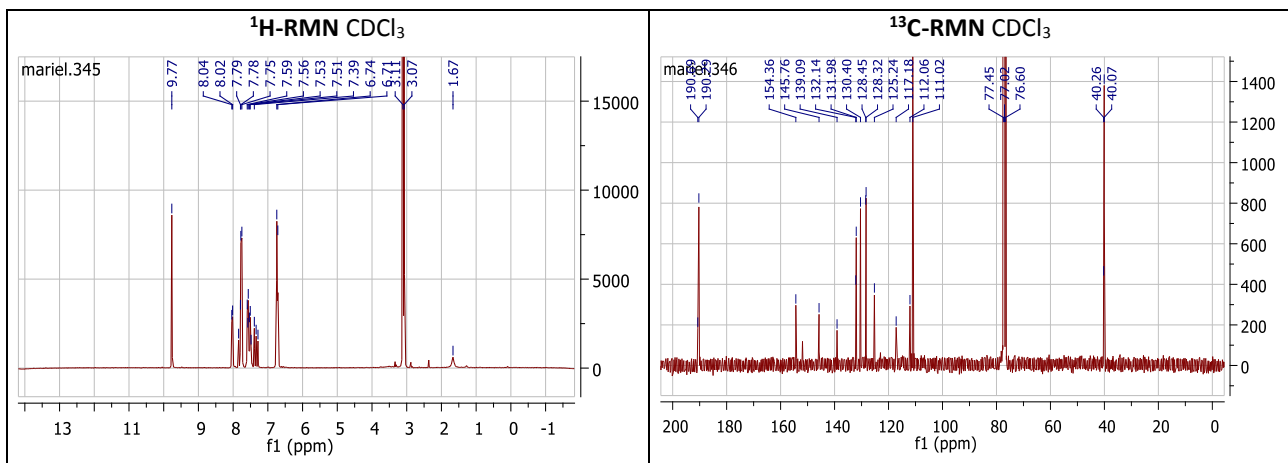
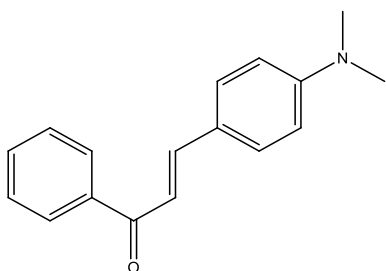
3-chlorochalcona (19)



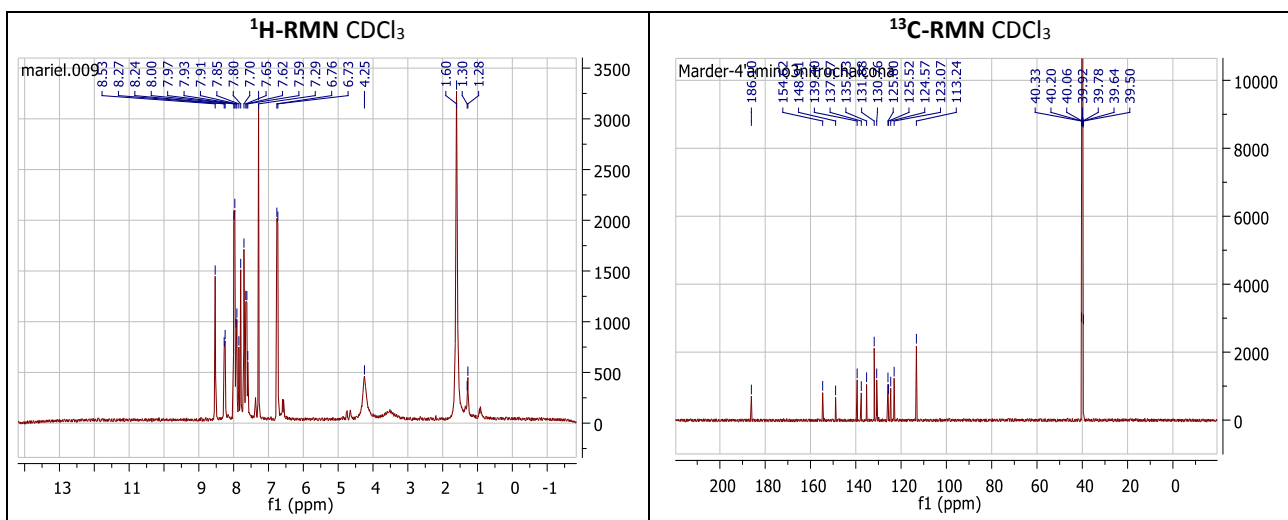
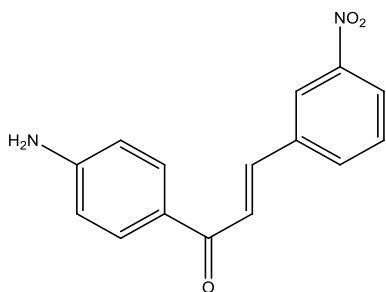
4-chlorochalcona (20)



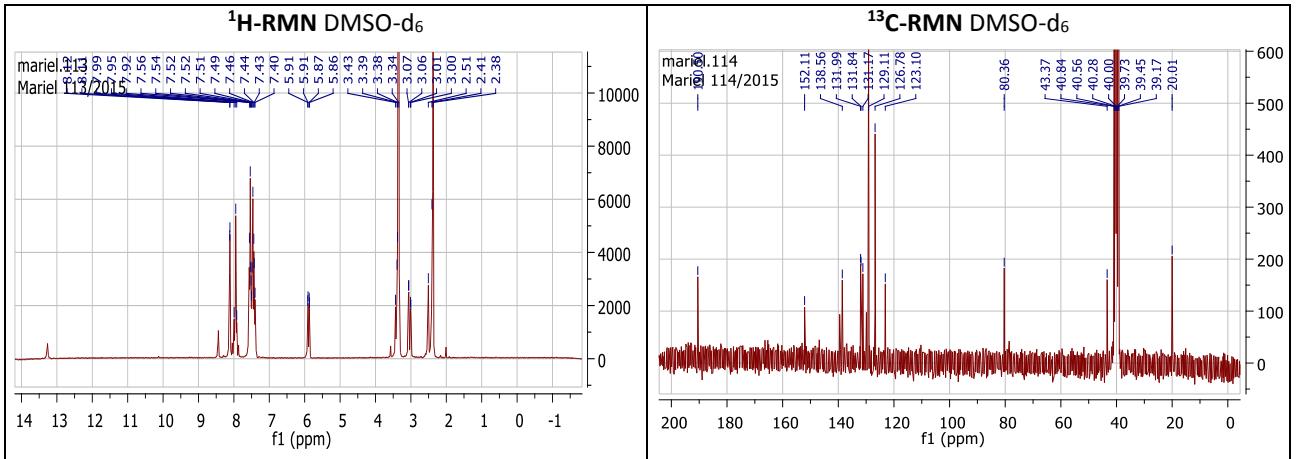
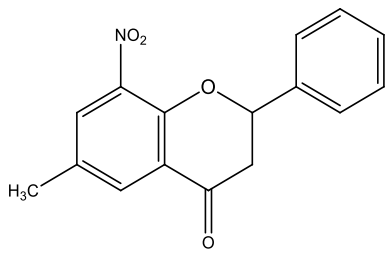
4-dimetilaminochalcona (21)



4'-amino-3-nitrochalcona (22)



6-metil-8-nitroflavanona (24)



EM

