



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Química

DERIVADOS DE BENZODIHIIDROFURANOS Y SU EVALUACIÓN
COMO POTENCIALES SISTEMAS NEUROPROTECTORES

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Concepción para optar al
grado académico de Doctor en Ciencias con mención en Química

Por: YAÍMA SÁNCHEZ MUSTELIER
Profesor Guía: Claudio Andrés Jiménez Águila

Diciembre - 2023

CONCEPCIÓN, CHILE

© Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

“Out of all the things I have lost, I miss my mind the most.”

—Mark Twain

A mi madre.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia, a todos los llevo en mi corazón, pero sobre todo a mi hermana Judith y a mi cuñi, Hubert, sin ustedes no habría sido posible que estuviera hoy aquí. Quiero dedicarle un agradecimiento especial a mi profesor guía, el doctor Claudio Jiménez, que además de ser un investigador y un científico de primera, es un maravilloso ser humano. Por su calidez, por su empatía y por una excelente asesoría científica, gracias. No puedo dejar de agradecer al profesor Jorge Fuentealba, de la Facultad de Ciencias Biológicas, por permitirme recibir mi entrenamiento en el laboratorio y por sus inapreciables conocimientos y consejos.

Muchas gracias igualmente a mis compañeros de laboratorio, un colectivo de trabajo increíble, alegre y dinámico, entre los cuales encontré amigos maravillosos. Gracias, Gerardo Ripoll, por guiarme en esos primeros tiempos tan locos de pandemia y regreso al laboratorio. A los compañeros de la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a mi *partner* Carolina Castillo que me enseñó tanto en un campo que era completamente nuevo para mí. Quiero agradecer también a mis profesores del doctorado. Un claustro de primera, de una excelencia académica y un rigor científico impresionante, y en especial al profesor Cristian Campos. Gracias, por tanto, profe.

Agradecer al personal técnico, por hacer posible la realización de los múltiples análisis para la obtención de datos. Un agradecimiento especial a Karin Garcés, por todo lo que hace a diario, y porque es siempre ayuda invaluable para mí y para tantos otros.

Mi agradecimiento también a la Universidad de Concepción, por proporcionarme la beca de Postgrado EDPG, a la ANID, al proyecto UCO 886, y al proyecto VRID multidisciplinario 220.023.056-M por el financiamiento otorgado, sin el cual este trabajo no habría sido posible.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Antecedentes sobre la demencia y la enfermedad de Alzheimer.....	1
1.1.1.	Demencia.....	1
1.1.2.	Enfermedad de Alzheimer.....	1
1.1.2.1.	Bases moleculares de la EA.....	3
1.1.2.2.	Enfermedad de Alzheimer y enfoque terapéutico actual.....	7
1.2.	Línea celular PC-12. Modelo para estudio de EA.....	8
1.3.	Benzofuranos: espacio químico neuroprotector.....	8
1.4.	Chalconas: estructuras privilegiadas en la química medicinal.....	9
1.5.	Biosíntesis y rutas sintéticas para la obtención de chalconas.....	11
1.6.	Mecanismos de neuroprotección: enfoque farmacoterapéutico actual.....	12
1.7.	Compuestos híbridos benzodihidrofuranos y chalconas.....	13
2.	HIPÓTESIS	15
3.	OBJETIVOS	15
4.	PARTE EXPERIMENTAL	16
4.1.	Técnicas de caracterización.....	16
4.2.	Síntesis y caracterización química de los compuestos híbridos benzodihidrofurano-chalconas.....	17
4.2.1.	Metodología sintética.....	17
4.2.2.	Protocolo de síntesis y caracterización de los productos.....	17
4.3.	Determinación de la actividad biológica de los compuestos híbridos benzodihidrofurano-chalconas.....	21
4.3.1.	Evaluación de citotoxicidad de los compuestos sintetizados	22
4.3.2.	Evaluación de actividad citoprotectora de los compuestos sintetizados.....	23
4.3.3.	Evaluación de los cambios en la agregación de A β en presencia de los compuestos sintetizados.....	24
4.3.4.	Evaluación del efecto de modulación alostérica positiva de los compuestos sintetizados en receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$	24
4.3.4.1.	Ovocitos de Xenopus: expresión del receptor nicotínico para acetilcolina (nAChR) y registro por agarradera de voltaje de dos electrodos.....	25

4.3.5.	Evaluación de la actividad neuroprotectora de los compuestos sintetizados.....	26
4.3.5.1.	Cultivos de neuronas de hipocampo.....	27
4.3.5.2.	Inmunofluorescencia.....	27
4.4.	Análisis estadístico.....	28
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1.	Síntesis y caracterización química de los compuestos híbridos de benzodihidrofuranochalconas.....	29
5.2.	Evaluación de citotoxicidad de los compuestos sintetizados.....	37
5.3.	Evaluación de actividad citoprotectora de los compuestos sintetizados.....	41
5.4.	Evaluación de los cambios en la agregación de A β en presencia de los compuestos sintetizados.....	45
5.5.	Estudios de acoplamiento molecular para estudiar las interacciones ligando-monómeros de A β	50
5.6.	Evaluación del efecto de modulación alostérica positiva de los compuestos sintetizados en receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$	54
5.7.	Evaluación de la actividad neuroprotectora de los compuestos sintetizados.....	59
5.7.1.	Discusión de los resultados obtenidos en neuroprotección.....	65
6.	CONCLUSIONES	69
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5.1. Caracterización física de las chalconas obtenidas.....	30
Tabla 5.2. Evaluación de la citotoxicidad intrínseca de las chalconas en el rango de concentraciones de 1 – 1000 nM.....	39
Tabla 5.3. Evaluación del efecto citoprotector de las chalconas en el rango de concentraciones evaluado de 1 – 1000 nM.....	42
Tabla 5.4. Energías de enlace y puntajes de acoplamiento de los compuestos con los monómeros de A β ensayados.....	53

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1.1. Estructura base de las chalconas.....	10
Figura 1.2. Chalconas aprobadas en la práctica clínica.....	10
Figura 1.3. Ruta biosintética de chalconas.....	11
Figura 1.4. Esquema general de la reacción de Claisen-Schmidt.....	12
Figura 1.5. Estructura de la fomannoxina.....	14
Figura 1.6. Propuesta de síntesis.....	14
Figura 4.1. Esquema de síntesis de las chalconas.....	17
Figura 5.1. Chalconas obtenidas mediante la condensación de Claisen-Schmidt.....	29
Figura 5.2. Mecanismo de acción en condensación de Claisen-Schmidt.....	30
Figura 5.3. Excepciones al rendimiento característico de la reacción.....	31
Figura 5.4. Espectro FTIR del compuesto 3d	32
Figura 5.5. Espectro RMN ¹ H de chalcona 3d	34
Figura 5.6. Espectro RMN ¹³ C de chalcona 3d	35
Figura 5.7. Espectro de masa del compuesto 3d	36
Figura 5.8. Ensayo de viabilidad de chalconas en células PC-12. Efecto de las chalconas 3c , 3d , 3i , y 3j en la viabilidad de células PC-12 expuestas a un amplio rango de concentraciones: 1 – 1000 nM por 24 h.....	38
Figura 5.9. Efecto citoprotector de las chalconas 3c , 3d , y 3g sobre la viabilidad de células PC-12 expuestas al rango de concentraciones de 1 – 1000 nM de estos compuestos durante 24 h y a OS-Aβ a una concentración de 0,5 μM.....	42
Figura 5.10. Representación esquemática de la cascada de autoagregación del péptido beta amiloide.....	46
Figura 5.11. Área bajo la curva de la fluorescencia emitida por el complejo ThT-Aβ en ausencia y en presencia de los compuestos evaluados.....	47
Figura 5.12. Comparación puntual de fluorescencia emitida en ciclos específicos del experimento de fluorescencia.....	48
Figura 5.13. Curva de fluorescencia y Áreas bajo la curva del péptido Aβ con y sin los compuestos a) 3c , b) 3d , y c) 3g	49
Figura 5.14. Modelo de interacción de las dos conformaciones de los monómeros de Aβ evaluados con 3c , 3d , y 3g	51

Figura 5.15. Caracterización estructural y energética de los complejos formados por 3c , 3d , y 3g con los monómeros de A β	52
Figura 5.16. Derivados de chalconas evaluados como PAM en receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$	54
Figura 5.17. Efecto funcional de los compuestos en receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$ expresados heterológamente en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	55
Figura 5.18. Modelo de acoplamiento molecular entre 3c , 3n , y el receptor humano nicotínico $\alpha 7$	58
Figura 5.19. Cambios en los niveles de expresión de la proteína presináptica SV2 producidos por 3c y OS-A β en cultivo primario de neuronas de hipocampo.....	61
Figura 5.20 A. Efecto de la incubación con el compuesto 3c en los niveles de proteína presináptica SV2.....	63
Figura 5.20 B. Efecto de la coincubación con el compuesto 3c y los OS-A β en los niveles de proteína presináptica SV2.....	63
Figura 5.21 A. Efecto de la incubación con el compuesto 3c en los niveles de mitofusina1.....	63
Figura 5.21 B. Efecto de la coincubación con el compuesto 3c y el péptido A β en los niveles de mitofusina 1.....	63
Figura 5.22. Cambio en los niveles de expresión de mitofusina 1 producidos por 3c y OS-A β en cultivo primario de neuronas de hipocampo de ratón.....	64

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es una patología neurodegenerativa y multifactorial que representa en la actualidad una problemática crucial de salud. Es la causa fundamental de demencia en la edad avanzada y las muertes asociadas a ésta se han visto incrementadas en un 68 % tan sólo en la última década. Mientras la esperanza de vida global aumenta en casi todos los países, mayor relevancia adquiere esta problemática de salud. La naturaleza multifactorial de la enfermedad dificulta el desarrollo de una cura efectiva. La ausencia de una cura real representa un desafío en el escenario clínico contemporáneo. El péptido beta amiloide ha sido identificado como un factor neurotóxico clave en esta patología, así como el fallo colinérgico. Actualmente, los medicamentos para el tratamiento sintomático del Alzheimer son principalmente inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa. La etiopatogenia compleja del Alzheimer impone el desarrollo de ligandos multiobjetivos, capaces de atacar simultáneamente a varias de las vías neuropatológicas de la enfermedad. La obtención de al menos un ligando multiobjetivo contra al menos dos de los mecanismos patológicos del Alzheimer fue el objetivo principal de esta tesis. Se planteó como hipótesis de trabajo, que la obtención de compuestos híbridos entre benzodihidrofuranos y chalconas dará lugar a moléculas con actividad neuroprotectora que podrán convertirse en candidatos terapéuticos para el tratamiento del Alzheimer. En esta tesis doctoral, enmarcada en el campo de la Química Biológica, se sintetizaron y caracterizaron 15 compuestos híbridos derivados, por un lado, de un benzodihidrofurano análogo a la fomannoxina y, por el otro extremo, de diversas arilcetonas con distintos patrones de sustitución. Los compuestos fueron sintetizados mediante la condensación de Claisen-Schmidt en condiciones alcalinas. Fueron numerados de **3a** – **3o**, y caracterizados estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas convencionales, determinación de punto de fusión y espectrometría de masas. Por un lado, la caracterización biológica abarcó, en primera instancia, la determinación de su potencial citotoxicidad, luego de esta evaluación preliminar, se procedió a la evaluación de su actividad citoprotectora frente a la toxicidad del péptido beta amiloide. Posteriormente, se determinó para los mejores candidatos la habilidad para inhibir *in vitro* la velocidad de agregación de dicho péptido, así como su potencial como moduladores alostéricos positivos de receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$. La evaluación de la actividad biológica se concluyó con la confirmación de la actividad neuroprotectora para el compuesto más activo biológicamente. El desarrollo de estos experimentos nos permitió obtener y caracterizar un compuesto con estructura tipo chalcona (**3c**) que posee la capacidad de preservar la

viabilidad celular en la línea celular ensayada (PC-12), la habilidad de inhibir la agregación del péptido beta amiloide contrarrestando su citotoxicidad, la capacidad de potenciar la actividad de receptores nicotínicos del tipo $\alpha 7$, además de preservar la función sináptica en cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Todo esto lo convierte en un candidato adecuado para el desarrollo de estudios posteriores dado que muestra tener efecto de neuroprotección *in vitro* mediado por más de un mecanismo de acción.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Antecedentes sobre la demencia y la Enfermedad de Alzheimer*

1.1.1 Demencia

La demencia constituye en la actualidad un problema de salud fundamental que además, representa una significativa carga física, financiera y psicosocial tanto para los pacientes como para sus familiares e instituciones encargadas de su manejo y cuidado.¹ Actualmente, a nivel mundial, alrededor de 55 millones de personas sufren demencia, con más del 60 % viviendo en países de bajos a medianos ingresos. En la medida en que la proporción de personas envejecidas en la población se incrementa en prácticamente todos los países, se espera que este número aumente a 78 millones en el 2030 y a 139 millones en el 2050.² El término demencia no se utiliza para referirse a una enfermedad propiamente dicha, sino que más bien se trata de un síndrome clínico caracterizado por un deterioro cognitivo progresivo que interfiere con la capacidad de funcionar de manera independiente.³⁻⁴ Los síntomas de demencia son graduales, persistentes y progresivos, y los pacientes que sufren demencia experimentan cambios cognitivos, funcionales y de comportamiento. Su presentación clínica posee una significativa variación interindividual, y el deterioro cognitivo causado puede presentarse como pérdida de memoria, trastornos de la comunicación y del lenguaje, agnosia (incapacidad para reconocer objetos), apraxia (incapacidad para ejecutar tareas previamente aprendidas) y discapacidad o capacidad disminuida en funciones ejecutivas (razonamiento, juicio y planificación). Este deterioro cognitivo proviene del daño a la corteza cerebral causado por el fallo sináptico, la inflamación y los cambios en el metabolismo cerebral.⁵

Los síntomas conductuales y psicológicos de la demencia son las principales complicaciones de esta condición. Los síntomas más comunes (agitación, apatía, agresión, psicosis, alucinaciones y delirios) constituyen impedimentos importantes para el desempeño y funcionamiento normal y representan también un riesgo de seguridad tanto para los pacientes como para sus cuidadores. Desafortunadamente, muchos de los síntomas conductuales y psicológicos, tales como el vagabundeo, acaparamiento, comportamientos inapropiados (desinhibición sexual, la ingestión de objetos), comportamiento repetitivo e inquietud no responden bien a la farmacoterapia. En la versión más reciente (con relación al año 2017) del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V)*, fue introducido el término *desorden cognitivo* para reemplazar el término

demencia. Los seis dominios cognitivos afectados por la demencia son aprendizaje y memoria, lenguaje, atención compleja, función ejecutiva, motora perceptiva y cognición social. El desorden cognitivo se clasifica como moderado o mayor dependiendo de la severidad de los síntomas. Más exactamente, los pacientes con MCI (desorden cognitivo moderado: *mild cognitive disorder*) presentan un declive discreto respecto a sus niveles previos de desempeño en uno o más dominios cognitivos. Por el contrario, el desorden cognitivo mayor es diagnosticado cuando los déficits en uno o más dominios interfieren con la independencia y funcionalidad en las actividades cotidianas.⁶

1.1.2 Enfermedad de Alzheimer (EA)

La enfermedad de Alzheimer, la causa más común de demencia, da cuenta del 60 a 75 % de la totalidad de los casos.⁷ Más aún, mientras que las muertes causadas por otros problemas de salud, tales como enfermedades cardíacas, ha disminuido en los últimos años, las muertes atribuidas al Alzheimer se han incrementado en un 68 %, tan sólo en la última década.⁸ El riesgo principal en su etiopatogenia es la edad, como consecuencia, en la medida que la esperanza de vida global se incrementa, aumenta paralelamente el número de personas afectadas. Estudios han demostrado que la prevalencia anual en personas de entre 45 y 64 años es de aproximadamente 24,2 en 100 000, y la incidencia es de 6,3 en 100 000.⁹ No obstante, la enfermedad es más común en personas mayores de 65 años, y la probabilidad de contraerla aumenta con la edad, doblándose cada cinco años a partir de dicho umbral.¹⁰ Fue descubierta en 1906 por el neurosiquiatra alemán Alois Alzheimer con el caso clínico de Auguste Deter; esta paciente de 51 años experimentaba pérdida de memoria, complejo de persecución y alteraciones psicológicas. *Post mortem*, la necropsia mostró, entre otros hallazgos, lo que hoy conocemos como marcadores distintivos de la enfermedad de Alzheimer (acumulación neuronal de proteína tau hiperfosforilada y placas amiloideas en forma de depósitos insolubles extracelulares constituidos por el péptido beta amiloide).¹¹⁻¹²

El origen multifactorial de esta enfermedad hace que la comprensión del proceso etiopatogénico global resulte sumamente compleja, ya que es el resultado de la interacción de numerosas variables como son la susceptibilidad genética, el envejecimiento y factores medioambientales.¹³⁻¹⁴ Histológicamente se caracteriza por la presencia de depósitos extracelulares insolubles constituidos por el péptido beta amiloide (A β) y enredos u ovillos neurofibrilares derivados de la hiperfosforilación de la proteína tau.¹⁵ Existe sin embargo, evidencia reciente y creciente indicando

que la mayor neurotoxicidad se debe a los oligómeros solubles de A β y que las placas amiloideas podrían constituir un mecanismo de defensa secuestrador de estos oligómeros.¹⁶⁻¹⁷

1.1.2.1 Bases moleculares de la EA

Uno de los riesgos para el desarrollo de esta patología es la historia familiar y la predisposición genética.¹⁸ Existen varias mutaciones que han sido asociadas al Alzheimer heredado de manera autosómica (FAD: Familiar Alzheimer's Disease), que tiene un inicio temprano (menos de 40 años)¹⁹ y puede ser visto en pacientes tan jóvenes como de 25 años (EOAD: Early Onset Alzheimer's Disease).²⁰ El péptido beta amiloide, que es el componente principal de las placas densas insolubles amiloideas y de los oligómeros solubles, es un producto del clivaje de la proteína precursora de amiloide (APP: Amyloid Precursor Protein). Ésta es una proteína transmembrana que desempeña un papel fundamental en la regulación de importantes funciones celulares, especialmente en el sistema nervioso, donde participa en la sinaptogénesis y la plasticidad sináptica. El dominio extracelular actúa como factor de crecimiento para muchos tipos de células y promueve la neuritogénesis en neuronas post-mitóticas. Sin embargo, la proteólisis alternativa de esta proteína da lugar a la formación de especies neurotóxicas, incluyendo al péptido beta amiloide que, como ya es conocido, está implicado de manera esencial en la patogénesis de la EA.²¹⁻²² Mutaciones en los genes que codifican para la APP y para las presenilinas (PSEN1 y PSEN2), que son proteasas parte del complejo de γ -secretasas responsables por el clivaje de la APP, han sido correlacionadas al FAD. Más aún, una duplicación del locus de la APP puede llevar también a la expresión de FAD. Estos datos sugieren que la disrupción del metabolismo de la APP es uno de los factores causantes de la enfermedad.²³⁻²⁴ Por otra parte, experimentos con neuronas de hipocampo en cultivo primario han evidenciado una relación entre las fibrillas de amiloide y la cascada de señalización molecular que desencadena la hiperfosforilación de la proteína tau.

Se ha estudiado a dos proteínas kinasas involucradas en la fosforilación anómala de la proteína tau: la kinasa dependiente de ciclina Cdk5 y la kinasa glicógeno sintasa GSK3. La kinasa Cdk5 juega un rol crucial en el desarrollo cerebral y está asociada con la neurogénesis según estudios en células cerebrales y de neuroblastomas. La desregulación de esta proteína kinasa como ocurre cuando es inducida por la acumulación de amiloide extracelular, resulta en la hiperfosforilación de la proteína tau, desencadenando subsiguientemente una secuencia de eventos moleculares que llevan a la degeneración neuronal. De hecho, se ha reportado que los inhibidores de Cdk5 y GSK3 brindan

protección contra los procesos de muerte neuronal.²⁵⁻²⁸ Evidencia derivada de estudios en cultivos de células cerebrales y en cerebros indica que el estrés oxidativo constituye también un factor determinante en la modificación de las vías normales de señalización en células neuronales, todo lo cual conduce a anomalías estructurales y a la neurodegeneración asociada a la patología del Alzheimer.²⁹⁻³¹ El péptido beta amiloide (A β) induce la formación de concentraciones anormalmente elevadas de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y RNS) así como una depleción de los niveles de antioxidantes endógenos, y esto juega un rol crucial en el daño y posterior muerte neuronal. El tejido cerebral de pacientes con EA presenta niveles incrementados de marcadores de daño oxidativo como proteínas, nucleótidos y lípidos peroxidados.³² La peroxidación lipídica, interrupción del ADN, el entrecruzamiento de proteínas y el daño celular oxidativo ha demostrado ser capaz de acelerar el proceso de envejecimiento y múltiples enfermedades crónicas incluyendo la diabetes, algunos cánceres, la artritis, problemas cardíacos (como la aterosclerosis), y enfermedades degenerativas como el Parkinson, el Alzheimer y la distrofia muscular.³³⁻³⁵ Los productos de la peroxidación de los dobles enlaces en los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos neuronales son moléculas extremadamente reactivas (malonildialdehído, 4-hidroxi-2,3-nonanal y F2-isoprostanos)³⁶⁻³⁷ que pueden estimular la hiperfosforilación y la subsecuente disfunción de la proteína tau, la disrupción de las vías de señalización del calcio intracelular y la inducción de la cascada apoptótica.³⁸⁻⁴⁰

Otro hallazgo patológico común en el cerebro con Alzheimer es la presencia de astroglia reactiva alrededor de las placas neuríticas. La existencia de células microgliales activadas constituye el rasgo principal y más característico de neuroinflamación en el cerebro con Alzheimer. Aunque las células microgliales constituyen solamente del 10 al 20 % de la población glial, pueden incrementar rápidamente el número de placas neuríticas.⁴¹ Además, la microglía activada es capaz de producir factores quimiotácticos que contribuyen a mantener la activación microglial, así como varias proteínas del complemento que ejercen citotoxicidad directa. Asimismo, A β puede unirse y activar al factor del complemento C1q y a través de este mecanismo, activar la vía de señalización molecular de la cascada del complemento.⁴²⁻⁴⁴ Este proceso neuropatológico tributa también a la neurotoxicidad mediante la inducción de mediadores de inflamación como la interleukina 1 (IL-1) y el factor alfa de necrosis tumoral (TNF α).⁴⁵ Numerosos estudios aportan evidencia que indica que la disfunción mitocondrial es también un evento neuropatológico relevante en el Alzheimer.⁴⁶⁻⁴⁸ La alteración en el transporte mitocondrial es considerada un factor de impacto en la patogénesis de

muchas enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA.⁴⁹ Las mitocondrias son organelos dinámicos que continuamente se combinan y disocian, formando y rompiendo redes dinámicas mediante procesos opuestos de fusión y fisión, respectivamente. En las neuronas sanas la actividad mitocondrial se correlaciona con la actividad sináptica y las mitocondrias juegan un papel fundamental en la regulación de la apoptosis neuronal.⁵⁰ Estos organelos tienden a agruparse en los sitios donde hay incremento en la demanda energética de la neurona. Diversos procesos pueden inducir a las mitocondrias a formar redes en diferentes partes de la célula, incluyendo la sinapsis, los sitios axonales de síntesis proteica, o el crecimiento activo de conos.⁵¹ En la EA, las mitocondrias están redistribuidas lejos de los axones en las neuronas piramidales, y más aún, las mitocondrias que quedan lejos del soma neuronal incrementan su longitud, dejando largos segmentos de neuronas privadas de mitocondrias, en abierto contraste con la distribución más homogénea característica de las neuronas sanas.⁵² Estudios *post mortem* en cerebros con EA han evidenciado niveles predominantemente superiores de proteínas asociadas a la fisión que a la fusión mitocondrial, sugiriendo que en el cerebro con Alzheimer prima la fisión mitocondrial sobre la fusión.⁵³ La propensión a la fragmentación mitocondrial característica de EA puede causar la liberación del citocromo c y otras proteínas conocidas inductoras de apoptosis.⁵⁴

La hipótesis colinérgica, por otra parte, da cuenta también de uno de los eventos neuropatológicos claves asociados al Alzheimer. De acuerdo con esta hipótesis, el declive cognitivo y de la memoria característicos de EA es mayoritariamente causado por una disminución en los niveles neuronales de acetilcolina (ACh), lo cual conduce a la pérdida de la transmisión colinérgica a nivel sináptico. Esto se conoce como fallo colinérgico o en la neurotransmisión colinérgica (mediada por ACh).⁵⁵ Producto de esto, múltiples estrategias farmacológicas han sido desarrolladas con el objetivo de paliar o ralentizar los síntomas clínicos característicos de EA y restaurar los niveles neuronales de ACh en la hendidura sináptica; se han empleado, por ejemplo, precursores de ACh o agonistas colinérgicos para incrementar la síntesis y los efectos de la acetilcolina, respectivamente.⁵⁶⁻⁵⁷ La hipótesis colinérgica revolucionó el campo de la investigación del Alzheimer, transportándolo del campo de lo meramente descriptivo al concepto moderno de neurotransmisión sináptica manejado actualmente.⁵⁸ Resultó aún más convincentemente validada cuando se observó que los inhibidores de acetilcolinesterasa inducen mejoras significativas en la sintomatología clínica de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.⁵⁹⁻⁶¹ Aunque se han investigado otros mecanismos fisiopatológicos relevantes, los tratamientos que mejoran la función colinérgica aún constituyen una herramienta

crítica en el manejo de la sintomatología clínica de los pacientes con EA.^{10, 62} En este contexto, la potenciación de los receptores para la ACh constituye una adecuada estrategia para incrementar su función. Un enfoque muy prometedor y relativamente novedoso lo constituye la potenciación de la actividad de los receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$ (nAChRs). Este receptor es uno de los principales para la acetilcolina en el sistema nervioso central, se caracteriza por su ubicuidad en el SNC y se encuentra fundamentalmente en el hipocampo, la corteza cerebral y las regiones subcorticales límbicas. Está estrechamente involucrado en la modulación de circuitos neurales asociados a la cognición, la memoria, el aprendizaje, la atención y la entrada de información sensorial.⁶³⁻⁶⁴ El declive de su actividad se ha visto asociado a varios trastornos neurológicos y neurodegenerativos como el Alzheimer, el Parkinson, y la esquizofrenia.⁶⁵ Para su potenciación, se han aprovechado las ventajas de la modulación alostérica como una estrategia emergente y muy prometedora, sin algunas de las desventajas de la modulación mediante agonistas ortostéricos. La modulación alostérica es aquella que ocurre a través de un sitio del receptor que es diferente al sitio donde naturalmente se une el ligando endógeno (agonista).⁶⁶ Los Moduladores Alostéricos Positivos (PAM), por ejemplo, pueden aumentar la respuesta inducida por el ligando endógeno mediante su unión al receptor a través de un sitio distinto al sitio de acción del agonista. Requieren la presencia del agonista para ejercer su efecto.⁶⁷

Como ya se ha mencionado, presentan varias ventajas sobre el empleo de agonistas ortostéricos; estas ventajas incluyen la conservación del patrón espacial y temporal de activación del propio ligando endógeno (ACh), mayor selectividad, menores efectos adversos y una enorme diversidad estructural.⁶⁸⁻⁷⁰ La más atractiva de sus ventajas la constituye, sin duda, la ausencia de desensibilización, característica de los ligandos ortostéricos. Pueden ser clasificados en tipo I y tipo II. Ambos tipos incrementan el máximo de corriente generada por el ligando endógeno, sin embargo, mientras que los de tipo I ejercen poco o ningún efecto en la desensibilización, los PAMs tipo II disminuyen la velocidad de desensibilización y pueden reactivar receptores de su estado desensibilizado.^{68-69, 71} El empleo de PAMs constituye, por tanto, un curso de tratamiento atractivo para enfermedades caracterizadas por un deterioro cognitivo como el Alzheimer.^{64, 72}

1.1.2.2. Enfermedad de Alzheimer y enfoque terapéutico actual

La agencia reguladora de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos, FDA, ha aprobado dos categorías de tratamientos para la EA: la primera incluye un anticuerpo monoclonal A β dirigido (DMT: Disease Modifying Treatment),⁷³⁻⁷⁴ y el segundo grupo, que se emplea principalmente para tratar los síntomas asociados con el Alzheimer, incluye donepezil (o donepezilo), rivastigmina, galantamina (inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa: AChEI), memantina (regulador de la transmisión glutamérgica) y una combinación de donepezil y memantina (tratamiento sintomático).⁷⁵⁻⁷⁷

Los AChEI (donepezil, galantamina y rivastigmina) se conoce que son efectivos en mejorar las funciones cognitivas en pacientes con EA. Presentan una eficacia similar en Alzheimer de grado leve a moderado.⁷⁸ Evidencia encontrada en estudio de metaanálisis en red indica que ni la monoterapia con AChEI ni en combinación de éstos con memantina se traduce en una mejora de la función cognitiva para pacientes con Alzheimer severo.⁷⁹

Basado en la Subescala Cognitiva de Evaluación del AD (ADAS-Cog), AChEI, la cerebrolisina, la huperzina A y *Ginkgo biloba* resultaron también efectivos en la mejora de la condición cognitiva de pacientes con EA. Asimismo, basado en el Examen de Estado Mini-mental (MMSE) los autores encontraron también que los AChEI, la huperzina A y las estatinas resultaron efectivas.⁸⁰ Este último estudio reportó la evaluación clínica global cognitiva y conductual, así como actividades de la vida diaria como indicadores de eficacia.

En otro renglón, la IVIG (inmunoglobulina intravenosa) constituye un método pasivo de inmunoterapia. IVIG y las inmunoterapias pasivas anti A β como el bapineuzumab intravenoso fueron evaluadas como candidatos terapéuticos para el AD en ocho estudios. En la evaluación de la eficacia cognitiva de estas inmunoterapias en el AD leve a moderado, Foroutan et al⁸¹ encontró una mejora estadística, aunque no clínicamente significativa de la función cognitiva.

Estudios de metaanálisis realizados con memantina evidencian que su prescripción resultó eficaz para pacientes con Alzheimer de moderado a severo, induciendo una ralentización del deterioro cognitivo, aunque aparentemente, resulta más eficaz en pacientes con Alzheimer avanzado.⁸²⁻⁸⁴ Ninguna de estas estrategias, sin embargo, representa una cura real para la enfermedad. Queda aún

un largo camino para encontrar un abordaje farmacológico idóneo para la mejora definitiva de las funciones cognitivas de pacientes con EA, enfocado directamente en los mecanismos biológicos celulares y moleculares del Alzheimer. La naturaleza multifactorial de esta patología apunta a la necesidad de una estrategia basada en ligandos multitarget dirigidos capaces de atacar eficazmente a más de uno de los mecanismos de la patogénesis del Alzheimer.

1.2 *Línea celular PC-12. Modelo para estudio de EA*

PC-12 es una línea celular derivada de feocromocitoma de médula adrenal de rata, con un origen embriogénico en la cresta neural con una mezcla de células neuroblásticas y eosinofílicas, que observa un linaje ectodérmico. Dado que comparte este origen embrionario con las neuronas, las células cromafínicas y su versión de línea celular, PC-12, comparten con las neuronas varias propiedades celulares y moleculares. Adicionalmente, las células PC-12 pueden, bajo la influencia de factor de crecimiento nervioso (NGF) diferenciarse en fenotipos neuronales mediante la expresión de proyecciones tipo dendritas.⁸⁵⁻⁸⁶ Esta línea celular posee, por lo tanto, gran versatilidad para su manipulación farmacológica y presenta, además, como innegables ventajas para su uso, su facilidad de cultivo, y una gran cantidad de información de respaldo respecto a su proliferación y diferenciación.⁸⁷⁻⁸⁸ Todos estos factores hacen de esta línea un excelente modelo para trabajar en el tamizaje y caracterización molecular preliminar, antes del empleo de cultivos primarios que implica el uso de embriones de ratón para la obtención de las neuronas. Aunque el uso más predominantemente extendido de estas células es el estudio de la actividad neurotóxica de diversas sustancias, esta línea celular es también ampliamente utilizada como modelo para enfermedades neurodegenerativas. La enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, puede ser modelada mediante la administración exógena del péptido β -amiloide.⁸⁹

1.3 *Benzofuranos: espacio químico neuroprotector*

La exploración de la naturaleza y su vasto arsenal de compuestos bioactivos se remonta prácticamente a los albores de la humanidad. Aún hoy, la naturaleza constituye el mayor laboratorio y es fuente inagotable de sustancias bioactivas.⁹⁰⁻⁹¹ Los organismos vivos, como las plantas, producen una gran variedad de compuestos orgánicos, de los que la gran mayoría no participa directamente en el crecimiento y desarrollo del organismo. Estos compuestos se conocen como metabolitos secundarios, y muchos de ellos han demostrado tener un rol importante en

mecanismos de defensa y supervivencia de los organismos. Son el resultado de millones de años de adaptaciones evolutivas especialmente diseñadas para garantizar la supervivencia en el medio, y esta singularidad los hace especialmente aptos para su estudio como potenciales precursores de nuevos y más potentes fármacos.⁹²⁻⁹³

El reino Fungi, por ejemplo, resulta particularmente prolífico en cuanto a compuestos bioactivos de bajo peso molecular, y el creciente número de secuencias genómicas fúngicas estudiadas, ha demostrado indiscutiblemente que el potencial biosintético de estos organismos está lejos de haber sido totalmente explotado.⁹⁴ Entre estos compuestos se encuentran los benzofuranos y benzodihidrofuranos. Éstos constituyen compuestos heterocíclicos altamente bioactivos, que pueden encontrarse en múltiples productos naturales.⁹⁵ Exhiben muchas actividades farmacológicamente relevantes que incluyen, pero no se limitan a, antibacteriana, antifúngica, analgésica, antiinflamatoria y anticonvulsivante.^{96-97,98-99} Sin embargo, durante los últimos años, su propiedad más atractiva, ha sido indiscutiblemente, su actividad neuroprotectora y, por consiguiente, su uso potencial en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.^{6, 100-101} Con relación a esto, se ha encontrado que específicamente en el Alzheimer, se han reportado benzodihidrofuranos como inhibidores del proceso de agregación del péptido beta amiloide mediante su unión a dicho péptido.¹⁰²⁻¹⁰³ Más aun, se ha propuesto el uso de esta propiedad para la detección *in vivo* de placas amiloideas. Hace unos años (2018), se logró aislar y caracterizar el benzodihidrofurano fomannoxina, metabolito secundario principal del hongo comestible y con propiedades antioxidantes *Aleurodiscus vitellinus*, endémico de la Patagonia andina. Este compuesto demostró ser capaz de prevenir la toxicidad de A β en la línea celular PC12 y de incrementar la actividad sináptica de la red neuronal en células nerviosas de hipocampo embrionario.^{104 105,106,107,102,108-109}

1.4 *Chalconas: estructuras privilegiadas en la química medicinal*

La diversidad de compuestos bioactivos presentes en la naturaleza no se limita a los benzodihidrofuranos solamente. Esto hace que muchas veces se emulen los núcleos químicos con actividad terapéutica presentes en muchos de los organismos vivos. Las chalconas, por ejemplo, constituyen una familia de compuestos con un extraordinario perfil de actividades biológicas. Desde el punto de vista químico, son 1,3 difenil-2-propen -1- onas y constituyen un subgrupo dentro de la familia de los flavonoides (Figura 1.1). Biosintéticamente, constituyen precursores de cadena

abierta para la obtención de flavonoides e isoflavonoides.¹¹⁰⁻¹¹¹ Devienen estructuras sumamente atractivas para el investigador de química farmacéutica debido al gran número de hidrógenos reemplazables que poseen, lo cual permite la obtención de múltiples derivados con un vasto espectro de actividades biológicas.

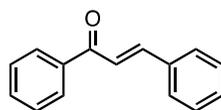
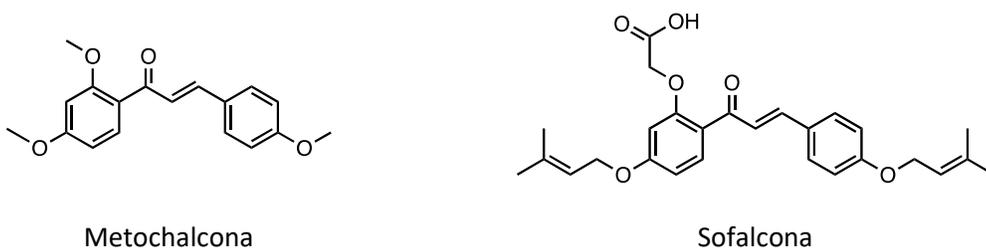


Figura 1.1. Estructura base de las chalconas (creación propia)

Entre las actividades reportadas para estos compuestos se encuentran la antiinflamatoria,¹¹² anti-gota,¹¹³ antihistamínica,¹¹⁴ antioxidante,¹¹⁵ e incluso han evidenciado actividad neuroprotectora mediante la inhibición de complejos enzimáticos que inciden en la hiperfosforilación de la proteína tau.¹¹⁶ Dos chalconas han sido introducidas con éxito en la práctica clínica: la metochalcona, una droga colerética, y la sofalcona, un agente antiulceroso (Figura 1.2). El amplio espectro de actividad de estos compuestos sugiere un perfil de acciones terapéuticas potencialmente muy amplio que representa un interesante desafío para el desarrollo clínico. Este comportamiento es mayormente atribuido a la naturaleza electrofílica del sistema carbonílico α - β insaturado característico de estos compuestos.¹¹⁷⁻¹¹⁸



Metochalcona

Sofalcona

Figura 1.2. Chalconas aprobadas en la práctica clínica (creación propia)

Debido a su carácter electrofílico (son uno de los aceptores de Michael más conocidos) pueden formar enlaces irreversibles con diversas macromoléculas biológicas. Resulta fácil comprender que esta reactividad puede verse modificada variando el patrón de sustitución tanto de los anillos aromáticos como del sistema vinílico. La intuición química nos dice que la modificación de la electrofilia del sistema se reflejará en su comportamiento químico-farmacológico en los sistemas biológicos. Los aceptores de Michael son generalmente biológicamente activos y se encuentran involucrados en múltiples vías de señalización celulares. Constituyen, por tanto, importantes herramientas en la investigación químico-biológica.¹¹⁹⁻¹²⁰ Pueden formar enlaces covalentes con los

grupos sulfhidrilos de las cisteínas u otros tioles para obtener el correspondiente aducto de Michael, modulando consecuentemente la actividad biológica. Se ha visto que las chalconas, por ejemplo, pueden modular la vía del Keap1 y liberar el factor Nfr2 el cual, una vez translocado al núcleo de la célula induce la activación del sistema antioxidante endógeno.¹²¹

1.5 Biosíntesis y rutas sintéticas para la obtención de chalconas

Las chalconas son uno de los principales precursores en la biosíntesis de flavonoides, isoflavonoides, antocianidinas, proantocianidinas, y otros compuestos polifenólicos.¹²² La chalcona sintasa (CHS) es la enzima principal para la biosíntesis de chalconas.¹²³⁻¹²⁴ La fenilalanina es el precursor principal, que sufre desaminación de la cadena alifática para formar el ácido cinámico. Este proceso es catalizado por la fenilalanina amonio-liasa (PAL) y seguido por la hidroxilación en posición *para* del anillo aromático, mediada por la cinamato -4- hidrolasa (C₄H) para formar el ácido *p* – coumárico. La sustitución del grupo hidroxilo catalizada por la Succinil-CoA tiene lugar en el grupo carboxilo alifático del ácido *p*-coumárico para dar lugar al *p*-coumaroil CoA mediante la enzima 4-coumaroil-CoA ligasa (4CL). CHS cataliza la condensación de tres moléculas de malonil CoA y *p*-coumaroil CoA sucesivamente. El proceso biosintético incluye también descarboxilación, ciclización, y aromatización del malonil CoA (Figura 1.3).

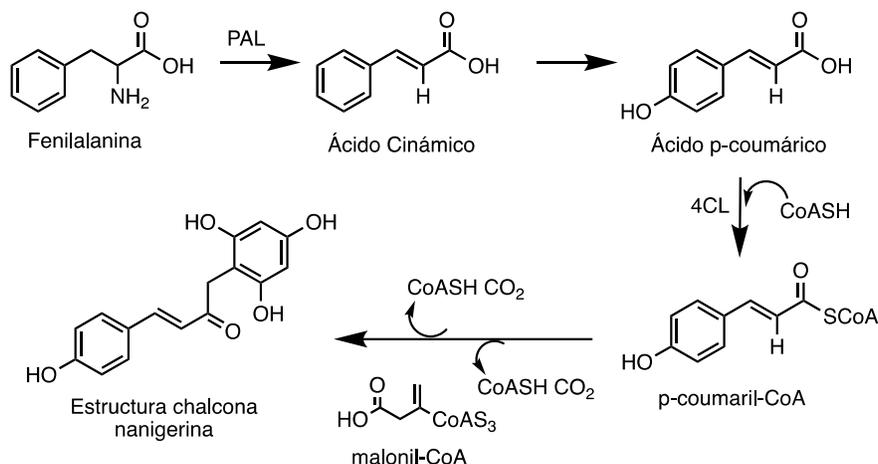


Figura 1.3. Ruta biosintética de las chalconas (elaboración propia)

Las chalconas pueden ser fácilmente sintetizadas mediante la condensación de Claisen-Schmidt, que implica la condensación aldólica mixta de aldehídos y cetonas catalizada mediante un ácido o una base, seguido de deshidratación (Figura 1.4). Para favorecer el producto de la condensación cruzada,

suelen emplearse aldehídos aromáticos con metil cetonas también aromáticas. Las chalconas obtenidas son estructuras completamente conjugadas, con una deslocalización de sus electrones π . La estabilidad que le brinda a la estructura final el doble enlace conjugado con ambos anillos aromáticos es la fuerza motriz tras la deshidratación que ocurre tras la condensación.

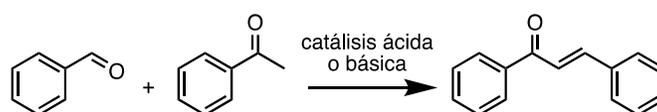


Figura 1.4. Esquema general de la reacción de Claisen-Schmidt (elaboración propia)

1.6 Mecanismos de neuroprotección: enfoque farmacoterapéutico actual

La neuroprotección se refiere a los mecanismos y estrategias empleadas para defender al sistema nervioso central, ya sea contra una lesión aguda como trauma, evento isquémico, hemorragias, etc; o contra desórdenes neurodegenerativos crónicos como el Alzheimer, Parkinson, epilepsia, entre otros.¹²⁵ Los mecanismos celulares subyacentes tras la neurodegeneración han sido objeto de interés durante las últimas décadas. Aunque las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, Huntington, y la esclerosis lateral amiotrófica poseen patologías específicas, comparten entre sí mecanismos neuropatológicos como la agregación proteínica, el daño oxidativo, neuroinflamación, apoptosis y disfunción mitocondrial, fenómenos todos que contribuyen a la pérdida neuronal. La investigación actual en estas áreas se ha enfocado fundamentalmente en el desarrollo de terapias de neuroprotección orientadas a contrarrestar cada uno de estos mecanismos. Las múltiples vías neuropatológicas asociadas a la pérdida de sinapsis y a la neurodegeneración imponen como conclusión acertada que difícilmente una mono terapia será enteramente satisfactoria y que, por el contrario, múltiples agentes trabajando mediante diversos mecanismos o, ligandos novedosos capaces de atacar más de un mecanismo neuropatológico ofrecen la mejor alternativa para el desarrollo de una terapia neuroprotectora eficaz.¹²⁶ Las estrategias terapéuticas empleadas para incrementar los procesos neuroprotectores incluyen el empleo de compuestos con actividad antioxidante como la rasagilina, y la CoQ10 oral que demostró ser capaz de ralentizar el deterioro motriz en un estudio aleatorizado realizado por 16 meses en pacientes con Parkinson moderado.¹²⁷ Han sido empleados también antioxidantes como los lazaroides, y los 2-metilaminocromanos para inhibir el incremento de la peroxidación lipídica y de ácidos nucleicos y proteínas, asociado al daño oxidativo en el Alzheimer.¹²⁸⁻¹²⁹ Por otra parte, la

activación excesiva del receptor para N-metil-D-aspartato (NMDA) ha sido implicada en la fisiopatología de diversas enfermedades neurodegenerativas y eventos isquémicos.¹³⁰

Varios antagonistas de este receptor han sido estudiados para el tratamiento de Parkinson y tanto la amantadina como el dextrometorfano han mostrado efectos anti-diskinéticos.¹³¹⁻¹³² En el caso del Alzheimer, uno de los pocos medicamentos anti-Alzheimer aprobados por la FDA es un antagonista de receptores de NMDA (memantina).¹³³ Se han empleado también medicamentos antiinflamatorios como estrategia de neuroprotección, ya que hay evidencia de que la inflamación sistémica puede promover la activación de la microglía, conocido desencadenante de neuroinflamación.¹³⁴ La minociclina, un derivado de las tetraciclinas ha mostrado la habilidad de reducir la activación de la microglía,¹³⁵ y el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) ha sido asociado a una reducción del 45 % en el riesgo de desarrollar Parkinson.¹³⁶ Asimismo, estudios clínicos demuestran que los AINE podrían inducir un retraso en la aparición del Alzheimer o, retrasar su progresión.¹³⁷ Los compuestos con actividad antiinflamatoria como los glucocorticoides, los antimaláricos, y las colchicinas constituyen, por esta razón, potenciales áreas de interés. El tratamiento con prednisona ha demostrado ser capaz de suprimir los niveles séricos en las proteínas de fase aguda en pacientes con Alzheimer. La neurohormona melatonina ejerce efecto inhibitorio en la agregación del péptido beta amiloide, la oxidación, y la inflamación *in vitro*, así como mejoras en el comportamiento en modelos animales.¹³⁸ En otro renglón, y en aras también de optimizar los procesos de neuroprotección, las propargilaminas han demostrado ser potentes agentes anti-apoptóticos tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* ya que estos péptidos pueden prevenir la permeabilización mitocondrial, la liberación del citocromo C, la activación de las caspasas y la translocación nuclear de la gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa.¹³⁹

1.7 Compuestos híbridos benzodihidrofuranos y chalconas

Por todas las razones expuestas anteriormente, en este trabajo se trazó como objetivo la obtención de una serie de compuestos híbridos a partir de un núcleo derivado del benzodihidrofurano natural fomannoxina (Figura 1.5), neuroprotector,¹⁰⁸ y núcleos de chalconas. La conjugación extendida de este sistema nos permitiría modificar, idealmente ampliar, el espacio químico neuroprotector del benzodihidrofurano (Figura 1.6).

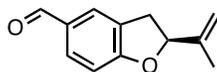


Figura 1.5. Estructura de la fomannoxina (elaboración propia)

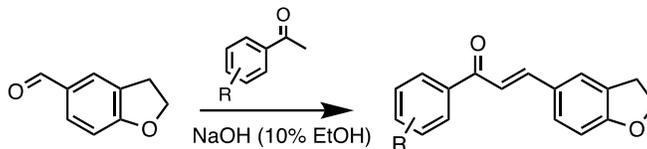


Figura 1.6. Propuesta de síntesis (elaboración propia)

Por las razones de tiempo impuestas por la contingencia sanitaria, solamente se estudiaron los efectos del patrón de sustitución halogenada. Ante la necesidad de limitarnos a la exploración de un solo patrón de sustitución, seleccionamos la halogenada ya que la inserción de halógenos ha sido una estrategia ampliamente utilizada en el desarrollo de medicamentos.¹⁴⁰⁻¹⁴² Un número significativo de candidatos terapéuticos y medicamentos ya aprobados en la práctica clínica son compuestos halogenados. Durante mucho tiempo, la inserción de halógenos se realizaba mayormente con el objetivo de explotar sus efectos estéricos; sin embargo, el impacto de los halógenos en el diseño y desarrollo de medicamentos va mucho más allá que la simple generación de un impedimento estérico. Por ejemplo, la formación de los enlaces de halógenos en los complejos ligando-objetivo es un tipo de interacción intermolecular que contribuye favorablemente a su estabilidad. Asimismo, la inserción de halógenos ha sido ampliamente utilizada para incrementar la permeabilidad a través de la membrana de los candidatos terapéuticos y sus niveles de absorción por vía oral.¹⁴³ Adicionalmente, su inclusión aumenta la permeabilidad a la barrera hematoencefálica, un prerrequisito esencial para medicamentos que actúen a nivel central.¹⁴⁴ La naturaleza voluminosa de estos sustituyentes puede inducir cambios conformacionales en la manera en que el ligando se une a la diana molecular. Esta estrategia es válida tanto para agonistas como para antagonistas.¹⁴⁰ La propuesta de nuestra investigación se centra en que los compuestos sintetizados en este estudio, con una estructura híbrida tanto de benzodihidrofurano como de chalconas, tendrán la capacidad de atacar al menos dos de los eventos neuropatológicos asociados al Alzheimer.

2. HIPÓTESIS

La síntesis de compuestos tipo chalcona a partir de benzodihidrofuranos y metil cetonas aromáticas dará lugar a moléculas con actividad neuroprotectora capaces de convertirse en candidatos terapéuticos eficaces contra la enfermedad de Alzheimer u otras patologías neurodegenerativas.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los potenciales efectos neuroprotectores frente a la toxicidad del péptido β -amiloide de una serie de derivados híbridos de chalcona-benzodihidrofurano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Sintetizar y caracterizar una serie de arilcetonas α , β -insaturadas (chalconas) unidas a un derivado del anillo benzodihidrofurano análogo a fomannoxina.
- ❖ Evaluar la actividad citotóxica de los derivados híbridos de chalcona y benzodihidrofurano.
- ❖ Evaluar los efectos citoprotectores de los derivados híbridos frente a la toxicidad del péptido β -amiloide en línea celular PC-12.
- ❖ Evaluar cambios en la agregación del péptido β -amiloide en presencia de los compuestos híbridos sintetizados.
- ❖ Evaluar el efecto de modulación alostérica positiva (PAM) potencial de los compuestos híbridos sintetizados en receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$.
- ❖ Evaluar los efectos neuroprotectores de los derivados híbridos con los mejores resultados de citoprotección frente a la toxicidad del péptido β -amiloide, en la viabilidad celular y en la expresión de biomarcadores indicadores de función mitocondrial (mitofusina 1) e incremento de los niveles de glicoproteína presináptica SV-2.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Técnicas de caracterización

Los compuestos sintetizados **3a-3o** fueron caracterizados por Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C , Espectrometría de Masa, y punto de fusión (no corregido). Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro marca NICOLET FTIT, modelo MAGNA 550. Se preparan disoluciones sólidas de la muestra a analizar al 1 % m/m en KBr, luego se comprime hasta formar una pastilla y se analiza en la zona del infrarrojo medio ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) informándose los valores de frecuencia también en cm^{-1} . Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y de ^{13}C fueron medidos en un equipo Bruker Ascend-400 MHz (400 MHz para ^1H y 100,6 MHz para ^{13}C); los desplazamientos químicos son informados en ppm (δ), relativos a las señales del solvente residual y están dados con relación al tetrametilsilano (TMS). Las constantes de acoplamiento (J) están reportadas en Hertzios (Hz). Las integrales corresponden al número de hidrógenos y todos los experimentos se desarrollan a temperatura ambiente. Para los experimentos de ^1H se disuelven 10 mg de muestra en 0,60 mL de un solvente deuterado y para los experimentos de ^{13}C se disuelven 20 mg en 0,60 mL de solvente deuterado. Los espectros fueron analizados con el programa MestreNova 14.2.0.¹⁴⁵ La abreviación de multiplicidad utilizada es: singlete (s), doblete (d), dobletes de dobletes (dd), doblete de tripletes (dt), triplete de tripletes (tt), quinteto (q), sexteto (sxt), y señal ancha (bs: por sus siglas en inglés). Los espectros de masa fueron obtenidos mediante un espectrómetro de masa QqToF Impact H.D, marca Bruker Daltonics GmbH, de Alemania, equipado con una fuente de ionización por *electrospray* (ESI) acoplado a cromatografía líquida. Se empleó un sistema cromatográfico de UPLC Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies) con un detector U.V. de longitud de onda variable (G7114B – modelo 1260 Infinity II – VWD, acoplado al espectrómetro de masa de alta resolución QqTOF (Bruker Daltonics - Impact, Rheinstetten, Alemania). La adquisición y el procesamiento de los datos se llevó a cabo con el software Data Analysis® (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania). Se utilizó una columna Betasil-C8 (10 x 0,2 mm). Las fases móviles empleadas fueron Solvente A- Agua y Solvente B-Acetonitrilo, ambas acidificadas con ácido fórmico al 0,1 %. El perfil de gradiente fue de 90 – 100 % de B durante cinco minutos, y se mantuvo en 100 % de solvente B durante un minuto, con una velocidad de flujo de 0,2 mL/min; después de eso, el sistema es llevado a las condiciones iniciales, y la columna se reacondiciona por un minuto. Se inyectan 1 - 2 μL de muestra disuelta inicialmente en metanol/agua (9:1 v/v). El experimento de iones totales se desarrolló en el modo positivo de

ionización en un rango de masas de m/z 100 a 1500. Las condiciones de la fuente de ionización fueron: nebulizador 4 bar, velocidad de flujo 8 L/min, temperatura 180 °C, voltaje de *End Plate* y de capilar 450 V y 4500 V, respectivamente. La calibración fue realizada con una solución de formiato de sodio 1 mM con masas de referencia de 100 – 1500; después de la corrida, los datos de masa son recalibrados con el mismo agente de calibración en el mismo rango de masas. La medición del punto de fusión fue realizada en un microscopio óptico de luz polarizada Olympus BX51 con platina calentable INSTEC-HCS 302, conectado a un controlador de temperatura LINKAN TMS94, informando la temperatura en grados Celsius (°C).

4.2 Síntesis y caracterización química de los compuestos híbridos benzodihidrofurano-chalconas:

4.2.1 Metodología sintética

Los compuestos híbridos de benzodihidrofuranos y chalconas fueron obtenidos mediante la condensación de Claisen-Schmidt desarrollada en condiciones básicas. La reacción se llevó a cabo entre el 2,3 dihidrobenzofurancarboxaldehído y distintas acetofenonas con diferentes patrones de sustitución (Figura 4.1).

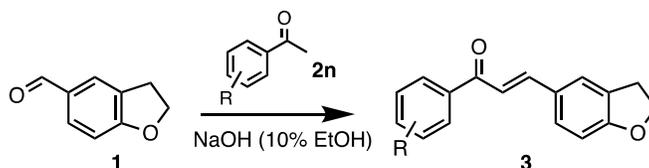


Figura 4.1. Esquema de síntesis de las chalconas. (elaboración propia)

4.2.2 Protocolo de síntesis y caracterización de los productos

A una disolución de **2n** [**2a**: 120 mg; **2b**, **2c**, **2d**: 138 mg; **2e**, **2f**: 156 mg; **2g**: 174 mg; **2h**, **2i**, **2j**: 155 mg; **2k**: 189 mg; **2l**, **2m**: 199 mg; **2n**, **2o**: 246 mg]] en 1,0 mL de etanol se adiciona, de una vez, **1** [0,90 mmol (133 mg)]. Posteriormente, se adiciona el hidróxido de sodio [0,25 mmol (10 mg)] y la mezcla se deja reaccionar durante dos horas a temperatura ambiente con agitación constante. El sólido obtenido es filtrado mediante filtración simple y lavado con etanol. El sólido se deja secar al aire durante 24 horas y luego se recristaliza a partir de etanol en la mayoría de los casos, y metanol y mezcla de diclorometano y metanol para las dos chalconas iodadas.

(E)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)-1-fenilprop-2-en-1-ona (3a): Rendimiento: 72%, pf: 124-126 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 8.13 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.65 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.62 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.56 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.61 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.23 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H). ¹³C NMR: δ 194.35, 167.64, 149.94, 143.32, 138.26, 136.16, 134.12, 133.99, 133.76, 132.82, 130.80, 124.16, 114.71, 77.16, 33.95. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: Calcd. para C₁₇H₁₄O₂H [M + H]⁺ 250.0094 encontrado 251.1062.

(E)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)-1-(2-fluorofenil)prop-2-en-1-ona (3b): Rendimiento: 53%, pf: 77-79 °C. ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.13 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.65 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.62 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.56 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.61 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.23 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H). ¹³C NMR: δ 189.25 (d, *J* = 3.7 Hz), 162.91, 161.16 (d, *J* = 252.6 Hz), 145.50, 133.65 (d, *J* = 9.5 Hz), 131.02 (d, *J* = 4.1 Hz), 130.58, 125.15, 123.70 (d, *J* = 167.0 Hz), 122.94 (d, *J* = 6.9 Hz), 116.57 (d, *J* = 23.4 Hz), 109.95, 72.09, 29.35. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: Calcd. para C₁₇H₁₃FO₂H [M + H]⁺ 268.0900 encontrado 269.0970.

(E)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)-1-(3-fluorofenil)prop-2-en-1-ona (3c): Rendimiento: 80%, pf: 149-151 °C. ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.12 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.92 (dt, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.69 (ddd, *J* = 7.9, 2.0, 1.0 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.37 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.65 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.26 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H). ¹³C NMR: δ 189.31, 163.00 (d, *J* = 244.5 Hz), 163.00, 146.12, 140.94, 140.88, 130.49, 130.31 (d, *J* = 7.4 Hz), 128.42, 127.69, 125.19, 124.16 (d, *J* = 2.4 Hz), 119.59 (d, *J* = 21.9 Hz), 118.67, 115.33 (d, *J* = 22.1 Hz), 110.04, 72.12, 29.37. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: Calcd. para C₁₇H₁₃FO₂H [M + H]⁺ 268.0900 encontrado 269.0970.

(E)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)-1-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-ona (3d): Rendimiento: 68%, pf: 155-157 °C. ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.04 (dd, *J* = 8.6, 5.6 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.16 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.64 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.25 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H). ¹³C NMR: δ 188.96, 165.57 (d, *J* = 253.9 Hz), 162.86, 145.52, 135.07, 131.05 (d, *J* = 9.1 Hz), 130.30, 128.35, 127.78, 125.13, 118.71, 115.75 (d, *J* = 21.6 Hz), 109.99, 72.08, 29.38. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: Calcd. para C₁₇H₁₃FO₂H [M + H]⁺ 268.0900 encontrado 269.0967.

(E)-1-(3,4-difluorofenil)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)prop-2-en-1-ona (3e): Rendimiento: 91%, pf: 159-161 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.77 (ddd, *J* = 10.5, 8.0, 2.0 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.75 - 7.74 (bs, 1H), 7.45 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.20 (td, *J* = 9.8, 6.8 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.58 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.18 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H). ¹³C NMR: δ 187.41, 162.76, 153.04 (dd, *J* = 256.0, 13.0 Hz), 150.14 (dd, *J* = 250.6, 13.0 Hz), 145.92, 135.44 (t, *J* = 3.9 Hz), 130.20, 128.12, 127.23, 124.95 (dd, *J* = 7.3, 3.7 Hz), 124.89, 117.59, 117.51 (d, *J* = 18.9 Hz), 117.20 (d, *J* = 17.7 Hz), 109.72, 71.81, 29.01. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: Calcd. para C₁₇H₁₂F₂O₂H [M + H]⁺ 286.0805 encontrado 287.0872.

(E)-1-(2,5-difluorofenil)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)prop-2-en-1-ona (3f): Rendimiento: 58%, pf: 109-111 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.72 (dd, *J* = 15.7, 1.9 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.49 (dt, *J* = 8.1, 5.0, 3.1 Hz, 2H), 7.40 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 15.7, 2.6 Hz, 1H), 7.18 (td, *J* = 8.1, 7.6, 4.3 Hz, 1H), 7.13 (td, *J* = 9.3, 4.3 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.64 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.24 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H). ¹³C NMR: δ 187.62 (d, *J* = 5.1 Hz), 163.14, 158.76 (d, *J* = 244.9 Hz), 157.11 (d, *J* = 248.3 Hz), 146.24, 130.77, 128.44, 127.51, 125.27, 122.13 (d, *J* = 7.8 Hz), 120.26 (dd, *J* = 25.1, 9.8 Hz), 118.01 (dd, *J* = 27.1, 8.8 Hz), 117.10 (dd, *J* = 25.1, 4.5 Hz), 110.02, 72.14, 29.32. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: Calcd. para C₁₇H₁₂F₂O₂H [M + H]⁺ 286.0805 encontrado 287.0876.

(E)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)-1-(2,4,5-trifluorofenil) prop-2-en-1-ona (3g): Rendimiento: 26%, pf: 117-119 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.76 (dd, *J* = 15.6, 1.9 Hz, 1H), 7.71 (dt, *J* = 9.8, 8.0 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 15.6, 2.9 Hz, 1H), 7.02 (td, *J* = 9.8, 6.0 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.65 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.25 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H). ¹³C NMR: δ 185.98 (d, *J* = 3.8 Hz), 163.21, 156.93 (ddd, *J* = 253.0, 10.0, 2.4 Hz), 152.69 (dt, *J* = 259.0, 15.1, 12.4 Hz), 147.25 (ddd, *J* = 247.5, 13.0, 3.8 Hz), 146.34, 130.81, 128.47, 127.45, 125.31, 123.85 (dt, *J* = 16.0, 4.1, 3.5 Hz), 121.70 (d, *J* = 8.1 Hz), 119.09 (dd, *J* = 20.2, 4.8 Hz), 110.04, 106.64 (dd, *J* = 30.0, 20.9 Hz), 72.15, 29.31. HRMS (ESI-FT-ICR) *m/z*: Calcd. para C₁₇H₁₁F₃O₂H [M + H]⁺ 304.0711 encontrado 305.0796.

(E)-1-(2-clorofenil)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)prop-2-en-1-ona (3h): Rendimiento: 87%, pf: 95-97 °C. ¹H NMR (CDCl₃): δ 7.48 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.47 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.66 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.26 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H). ¹³C NMR: δ 194.11, 163.09, 147.09, 147.06, 139.61, 131.32, 131.22, 130.69, 130.65, 130.37, 130.34,

129.36, 128.46, 127.38, 126.90, 125.13, 123.66, 109.99, 77.44, 77.41, 77.12, 76.80, 72.13, 29.31.

HRMS (ESI–FT–ICR) m/z: Calcd. para $C_{17}H_{13}ClO_2H$ $[M + H]^+$ 284.0604 encontrado 285.0686.

(E)-1-(3-clorofenil)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)prop-2-en-1-ona (3i): Rendimiento: 54%, pf: 118-120 °C. 1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.96 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.87 (dt, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.52 (dt, $J = 7.7, 2.2, 1.2$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J = 7.9, 2.6$ Hz, 1H), 7.43 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.64 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.25 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR: δ 189.18, 163.01, 146.15, 140.34, 134.92, 132.49, 130.53, 129.99, 128.57, 128.40, 127.62, 126.54, 125.18, 118.51, 110.00, 72.11, 29.33. HRMS (ESI–FT–ICR) m/z: Calcd. para $C_{17}H_{13}ClO_2H$ $[M + H]^+$ 284.0604 encontrado 285.0684.

(E)-1-(4-clorofenil)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)prop-2-en-1-ona (3j): Rendimiento: 35%, pf: 157-159 °C. 1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.95 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.78 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.43 (dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.64 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.25 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR: δ 189.27, 162.94, 145.82, 138.98, 137.03, 130.40, 129.92, 128.96, 128.38, 127.71, 125.16, 118.58, 110.01, 72.10, 29.36. HRMS (ESI–FT–ICR) m/z: Calcd. para $C_{17}H_{13}ClO_2H$ $[M + H]^+$ 284.0604 encontrado 285.0685.

(E)-1-(3,4-diclorofenil)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)prop-2-en-1-ona (3k): Rendimiento: 77%, pf: 153-155 °C. 1H NMR ($CDCl_3$): δ 8.08 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.83 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.65 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.26 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR: δ 188.07, 163.19, 146.57, 138.36, 137.08, 133.30, 130.81, 130.66, 130.49, 128.48, 127.55, 125.28, 117.99, 110.09, 72.16, 29.34. HRMS (ESI–FT–ICR) m/z: Calcd. para $C_{17}H_{12}Cl_2O_2H$ $[M + H]^+$ 318.0214 encontrado 319.0294.

(E)-1-(3-bromofenil)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)prop-2-en-1-ona (3l): Rendimiento: 98%, pf: 129-131 °C. 1H NMR ($CDCl_3$): δ 8.12 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.92 (dt, $J = 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.69 (ddd, $J = 7.9, 2.0, 1.0$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, 1H), 7.37 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.65 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.26 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR: δ 189.20, 163.06, 146.26, 140.61, 135.45, 131.54, 130.57, 130.29, 128.44,

127.67, 127.02, 125.23, 123.02, 118.55, 110.05, 72.14, 29.37. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z: Calcd. para $C_{17}H_{13}BrO_2H [M + H]^+$ 328.0099 encontrado 329.0177.

(E)-1-(4-bromofenil)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il)prop-2-en-1-ona (3m): Rendimiento: 55%, pf: 165-167 °C. 1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.82 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.73 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.47 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.37 (dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.59 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.20 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR: δ 189.44, 162.94, 145.88, 137.44, 131.94, 130.41, 130.04, 128.38, 127.68, 127.64, 125.16, 118.53, 110.00, 72.10, 29.35. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z: Calcd. para $C_{17}H_{13}BrO_2H [M + H]^+$ 328.0099 encontrado 329.0180.

(E)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il) -1-(3-iodofenil)prop-2-en-1-ona (3n): Rendimiento: 62%, mp: 133-135 °C. 1H NMR ($CDCl_3$): δ 8.31 (t, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.95 (dt, $J = 7.8, 1.4$ Hz, 1H), 7.89 (dt, $J = 7.8, 1.7, 0.9$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.23 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.65 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.26 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR: δ 188.72, 162.71, 145.82, 141.00, 140.29, 137.08, 130.23, 130.05, 128.09, 127.34, 127.28, 124.88, 118.18, 109.70, 94.21, 71.80, 29.04. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z: Calcd. para $C_{17}H_{13}IO_2H [M + H]^+$ 375.9960 encontrado 377.0044.

(E)-3-(2,3-dihidrobenzofurano-5-il) -1-(4-iodofenil)prop-2-en-1-ona (3o): Rendimiento: 48%, pf: 155-157 °C. 1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.85 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.78 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.64 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.25 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR: δ 189.61, 162.83, 145.78, 137.88, 137.82, 130.30, 129.84, 128.26, 127.57, 125.05, 118.39, 109.89, 100.19, 71.97, 29.24. HRMS (ESI-FT-ICR) m/z: Calcd. para $C_{17}H_{13}IO_2H [M + H]^+$ 375.9960 encontrado 377.0042.

4.3 Determinación de la actividad biológica de los compuestos híbridos benzodihidrofurano-chalconas

Para la caracterización biológica de los compuestos sintetizados primero se evaluó su citotoxicidad en la línea celular PC-12 mediante el ensayo colorimétrico de determinación de viabilidad de MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 bromuro de difeniltetrazolio)).¹⁴⁶ Las células PC-12 son mantenidas en medio de cultivo DMEM suplementado con suero bovino fetal (5 %), suero de caballo (5 %),

penicilina y estreptomina (1 %) a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las células se utilizaron después de alcanzar una confluencia de ~ 80 %, a una concentración de 2 x 10⁴ células por pocillo. Una vez comprobada la no citotoxicidad de los compuestos se realizaron los restantes ensayos de caracterización biológica. En primera instancia se realiza la **determinación de actividad citoprotectora** frente a la toxicidad del péptido beta amiloide (Aβ).

4.3.1 Evaluación de citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad se realizó determinando la viabilidad celular después de un período de incubación de 24 horas con cada uno de los compuestos sintetizados. La determinación de la viabilidad se realiza mediante el ensayo colorimétrico de viabilidad celular de MTT. El método se fundamenta en la capacidad reductora mitocondrial de las células vivas, específicamente del complejo II de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, conocido también como succinato deshidrogenasa,¹⁴⁷ para transformar a las sales solubles de MTT (de color amarillo) en cristales insolubles de formazán (de color púrpura). Los cristales obtenidos se disuelven en alcohol isopropílico y la absorbancia es medida a dos longitudes de onda en un lector de microplacas. Esta absorbancia se relaciona directamente con la viabilidad celular. Las diferentes concentraciones de los compuestos (rango amplio de 1 – 1000 nM: 1, 3, 10, 30, 100, 300, y 1000 nM) se incubaron por 24 horas a 37 °C en microplacas Costar de 96 pocillos con 2x10⁴ células PC-12 células por pocillo. Posteriormente, se extrajo el medio y se reemplazó con 100 µL de disolución MTT (1 mg/mL) y se incubó por un período de 2 horas a 37 °C. A continuación, los cristales de formazán obtenidos se solubilizaron en alcohol isopropílico durante 15 minutos a 37 °C y, finalmente, se midió la absorbancia en un lector de microplacas NOVOstar (BGM, Alemania) a dos longitudes de onda: 560 y 620 nm. Los datos se procesaron usando el Software NovoStar para las diferentes condiciones experimentales.

La evaluación se realiza comparando la viabilidad obtenida para cada concentración de los compuestos con la viabilidad obtenida para el grupo control negativo (células no tratadas), cuyo valor se considera como el 100 %. El criterio de no citotoxicidad es la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad de los grupos expuestos y el grupo control, con un 95 % de confianza. Se consideraron valores estadísticamente significativos: *p<0.05, **p<0.01 y ***p <0.001 versus control. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism

(GraphPad Prism, CA, USA). Se incluye también un grupo control positivo de muerte celular tratado con dimetilsulfóxido (DMSO) al 50 % v/v.

Para el ensayo de viabilidad celular, se preparó una solución stock 100 μM en DMSO. Para los ensayos siguientes, las disoluciones *stocks* se someten a tres diluciones seriadas en Solución de Buffer Fosfato Dulbecco® (DPBS) para obtener las concentraciones 10 000, 1000 y 100 nM y alcanzar las concentraciones finales por pocillo establecidas para los experimentos.

4.3.2 Evaluación de actividad citoprotectora de los compuestos sintetizados

La evaluación de la actividad citoprotectora se realizó empleando el mismo protocolo experimental descrito anteriormente para determinar la citotoxicidad de los compuestos sintetizados. Se monitoreó el impacto de la coincubación de los compuestos con oligómeros solubles de A β (OS- A β), a las mismas concentraciones evaluadas en el experimento de citotoxicidad, en la viabilidad de células PC-12 frente al estímulo citotóxico de A β . Siguiendo el mismo protocolo experimental ya descrito, las células se coincubaban por un período de 24 h a 37 °C con los compuestos sintetizados y con el péptido beta amiloide a una concentración de 0,5 μM .

Para agregar el péptido beta amiloide y obtener los oligómeros solubles (OS), A β_{1-40} (Peptide, Bogart, GA, USA) se reconstituye en DMSO a una concentración de 2,3 mM. Se toma una alícuota de 2 μL de este stock y se disuelve en buffer fosfato salino (PBS) hasta alcanzar una concentración de 80 μM . Esta solución es sometida a agitación vertical a 500 rpm con un agitador magnético por dos horas a 37 °C y dos horas a temperatura ambiente. El péptido es utilizado a una concentración de 0,5 μM .

Se considera un grupo control negativo (células no tratadas), y un grupo control positivo (células incubadas solamente con OS-A β). En todos los casos la incubación con el péptido solamente (control positivo) reduce de manera significativa los valores de viabilidad con respecto al grupo control negativo, y se evalúa si la coincubación con A β y las distintas concentraciones de los compuestos resulta en valores de viabilidad superiores a los obtenidos para el control positivo. Se considera criterio de citoprotección un aumento estadísticamente significativo de la viabilidad celular con respecto al grupo control tratado solamente con A β . (*p < 0,5). Se incluye también un grupo control positivo de muerte celular tratado con dimetilsulfóxido (DMSO) al 50 % v/v.

4.3.3 Evaluación de los cambios en la agregación de A β en presencia de los compuestos sintetizados

La evaluación de los cambios en la agregación del A β en presencia de los compuestos sintetizados se realizó evaluando el efecto de éstos en la cinética y perfil de agregación del A β mediante el monitoreo de la capacidad del péptido de agregarse y acomplejarse con el compuesto fluorescente Tioflavina T (ThT). El péptido beta amiloide, al agregarse, se acompleja con ThT y hay un aumento de la fluorescencia. La fluorescencia emitida permite conocer la progresión del proceso de agregación de los monómeros del péptido. A mayor agregación, mayor formación del complejo y, por consiguiente, se observará un incremento en la fluorescencia emitida por el sistema. El ensayo de agregación de A β se realizó en una placa de 96 pocillos en presencia y ausencia de los compuestos disueltos en buffer DPBS con 20 μ M de ThT (ThT, Sigma Aldrich). El proceso de agregación se siguió midiendo la fluorescencia del complejo ThT-A β (longitud de onda de excitación: 440 nm, de emisión: 485 nm), cada tres minutos durante cuatro horas. La placa se mantiene a una temperatura de 37 °C con una agitación orbital de 500 rpm.

4.3.4 Evaluación del efecto de modulación alostérica positiva de los compuestos sintetizados en receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$

La evaluación del potencial efecto de modulación alostérica positiva (PAM: *Positive Allosteric Modulation*) en receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$ se realizó utilizando la técnica electrofisiológica de *whole cell* con una configuración estándar de agarradera de voltaje de dos electrodos. El método consiste en registrar el máximo de corriente obtenida cuando la acetilcolina se une al receptor nicotínico y evaluar si esta respuesta es potenciada o no por la presencia de los compuestos unidos al sitio alostérico del receptor. El ensayo se realizó en ovocitos de sapos *Xenopus laevis*, en los que se expresa de manera heteróloga el receptor humano nicotínico $\alpha 7$ mediante la coinyección de ADN complementario de $\alpha 7$ y una chaperona molecular adecuada (NACHO, en este experimento). Los animales fueron almacenados y cuidados siguiendo el código de lineamientos prácticos del Reino Unido. Los ovocitos se colectaron en una habitación regulada en la instalación de Servicios Biomédicos en la Universidad de Oxford.

Los sapos adultos hembra *Xenopus laevis* fueron adquiridos de *Xenopus 1* (MI, Estados Unidos). Los animales fueron almacenados en instalaciones con clima e iluminación regulados y se emplearon un

total de 50 sapos. Los sapos se anestesiaron mediante inmersión en triclaína al 0,5 % hasta que no se observó respuesta al estímulo de pinchazo en el dedo. Posteriormente se decapitan y los lóbulos ováricos son cosechados e incubados en colagenasa tipo IA a 2 mg/mL a temperatura ambiente por dos horas para aislar y defolicular los ovocitos. El procedimiento de incubación en colagenasa se llevó a cabo en una solución (OR2) conteniendo 82 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 5 mM HEPES; pH 7,6. Los ovocitos fueron mantenidos a 18 °C hasta el momento de su uso en la misma solución (menos la colagenasa), suplementada con 20 mg/mL de neomicina, 100 UI/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina.

4.3.4.1 Ovocitos de *Xenopus*: expresión del receptor nicotínico para acetilcolina (nAChR) y registros por agarradera de voltaje de dos electrodos

Los experimentos electrofisiológicos se llevaron a cabo en receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$ expresados heterológamente en ovocitos de *Xenopus*. Para ello, los ovocitos se inyectaron con $\alpha 7$ cADN, y los registros se realizaron utilizando procedimientos estándares, de acuerdo a técnicas previamente descritas.¹⁴⁸ El $\alpha 7$ cADN se coinyectó con la chaperona NACHO en una proporción de 1 $\alpha 7$: 0,01 NACHO. La coinyección del ADN complementario con proteínas chaperonas moleculares incrementa notablemente la expresión superficial del receptor.⁶⁸ La expresión del receptor se examinó no antes de dos días después, de acuerdo a metodologías previamente descritas.¹⁴⁸ Los ovocitos se empalmaron con dos electrodos llenos con KCl a 3 M, y su potencial de membrana se mantuvo a -60 mV durante el experimento. Todos los registros se realizaron a 18 °C, y las células fueron perfundidas con solución OR2 a pH 7,4. Las corrientes se registraron mediante una plataforma automatizada equipada con una configuración estándar de agarradera de voltaje de dos electrodos (HiClamp; Multi Channel Systems, Reutlingen, Alemania). Este sistema difiere de la electrofisiología estándar y de otras plataformas automatizadas en el hecho de que, en lugar de aplicar el compuesto a evaluar en perfusión, el ovocito es movido a un pocillo de una microplaca de 96 pocillos conteniendo 230 μ L de la solución deseada. Los experimentos solamente se llevan a cabo si el potencial en reposo de los ovocitos empalados era superior a -10 mV y si la corriente total sostenida era menor que 0,2 μ A. Los datos son filtrados a 10 Hz, capturados a 100 Hz usando un sistema de adquisición de datos propio y un software de análisis Matlab (Mathworks Inc, Natick, Massachusetts, Estados Unidos). Los ligandos se prepararon como soluciones *stocks* concentradas en DMSO y luego se diluyeron en el medio de registro hasta obtener las concentraciones de prueba deseadas. Para determinar la eficacia potenciadora de los ligandos evaluados, se coaplicó una sola

concentración de prueba (10 μ M) con una EC_{20} de ACh (concentración efectiva para producir el 20 % del máximo de corriente: 30 μ M para $\alpha 7$).

La estructura cristalina del nAChR $\alpha 7$ en conformación abierta (PDBID:7EKT)¹⁴⁹ se obtuvo del Banco de Datos de Proteínas RCSB,¹⁵⁰ mientras que los átomos no proteínicos fueron eliminados utilizando el software Pymol.¹⁵¹ Los modelos de los compuestos se dibujaron utilizando el software Spartan 18. La optimización de energías y el análisis conformacional también fueron realizadas utilizando este software y almacenados en formato mol2. Además, todos los compuestos fueron almacenados digitalmente en formato pdbqt usando la aplicación AutoDockTools.¹⁵² Para la realización de los experimentos de docking molecular se empleó el AutoDock Vina (versión 1.1.1)¹⁵³ que es empleado para calcular la energía de enlace de los compuestos con mejor ajuste. Para realizar el acoplamiento del sitio activo, los mapas reticulares se calcularon usando la opción de *autogrid* y centrado en los sitios activos. Los volúmenes escogidos para los mapas reticulares se conformaron con 30 X 30 X 30 puntos, con un espacio interreticular de 0,375 Å. El análisis de las interacciones moleculares de los compuestos en el sitio activo en las proteínas se desarrolló utilizando el software BIOVIA Discovery Studio Visualizer v.21.1.0.20298.¹⁵⁴

4.3.5 Evaluación de la actividad neuroprotectora de los compuestos sintetizados

La evaluación de los efectos neuroprotectores de los compuestos se realizó mediante técnicas de inmunofluorescencia en neuronas de hipocampo embrionario de ratón C57BL/6 (E18). Las neuronas fueron expuestas a distintas condiciones experimentales y se realizó el marcaje de indicadores de morfofuncionalidad neuronal y de preservación de la red sináptica. Este ensayo se realizó con los compuestos con mejores efectos de citoprotección, con el objetivo de evaluar si podían prevenir el daño asociado a A β en la organización sináptica neural de cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Las neuronas fueron marcadas con anticuerpos para la proteína SV2 presináptica, glicoproteína de vesícula sináptica esencial para la neurotransmisión,¹⁵⁵ y anticuerpos para mitofusina 1 (MFN1),¹⁵⁶ proteína mitocondrial indicadora de uno de los procesos de la dinámica mitocondrial (fusión) y, por lo tanto, de la salud de estos organelos y, además, con MAP-2, proteína estructural citoesquelética. Se evaluaron los cambios en los marcadores de SV2 y MFN1 mediante técnicas de microscopía de fluorescencia confocal.

4.3.5.1 Cultivos de neuronas de hipocampo

Cultivos primarios de neuronas de hipocampo embrionario de ratón C57BL/6 (E18) fueron sembrados en placas pretratadas con polilisina a una densidad de 320 000 células/mL. Los cultivos se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM), suplementado con suero de caballo (10%), DNasa (4 µg/mL) y L-Glutamina (2mM) durante las primeras 24 h. Transcurrido este tiempo, se cambió por un medio de alimentación conteniendo MEM suplementado con suero de caballo (2%), suero fetal bovino (2%) y N3 (0,5%). N3 es un suplemento que contiene BSA (1 mg/mL), putrescina (4mg/mL), insulina (1,25 mg/mL), selenito de sodio (1 µg/mL), TH3 (2 µg/mL), progesterona (1,25 µg/mL) y corticosterona (4 µg/mL). Las neuronas fueron mantenidas en una incubadora termorregulada a 37 °C con 5 % de CO₂, y se utilizaron a los 10 días de incubación in vitro (DIV).

4.3.5.2 Inmunofluorescencia

Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de 10 DIV se sometieron a tratamientos crónicos de 24 h con OS-Aβ (0,5 µM), el compuesto **3c** a las concentraciones de 3 y 300 nM y OS-Aβ más el compuesto **3c** a las concentraciones de 3 y 300 nM. Se incluyó un control negativo de neuronas no tratadas. Luego de los tratamientos, las neuronas fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 15 minutos. La permeabilización y bloqueo se realizó de manera simultánea con una solución de suero de caballo al 10% en PBS y Tritón X-100 al 0,1%, durante 20 minutos. Para detectar la glicoproteína Synaptic Vesicle 2 (SV2), se empleó un anticuerpo específico para SV2, anti-SV2, (1:200, mouse, Hybridoma Bank); anti-mitofusina 1, (1:200, rabbit, Novus Biologicals) para detectar a la mitofusina 1, y para identificar la estructura neuronal se empleó la Proteína Asociada a Microtúbulo 2 marcada mediante MAP-2 anticuerpo, (1:200, guinea pig, Santa Cruz) incubados por 90 minutos a temperatura ambiente. Para la detección y marcaje de estos anticuerpos primarios, se utilizaron los anticuerpos secundarios asociados a fluoróforos Cy3 Donkey (1:200, anti-rabbit, Jackson Immuno Research Laboratories), Alexa Fluor 488 (1:200, mouse) y Alexa Fluor 647 (1:200, anti-guinea pig, Abcam) para detectar a MFN1, SV2 y a MAP-2, respectivamente. Esta incubación se realizó por 60 minutos a temperatura ambiente. El montaje de las células se realizó con el medio fluorescente Dako (Dako, USA) mientras que la localización espacial de Aβ se determinó mediante el uso de una forma fluorescente del péptido (Aβ₁₋₄₀ TAMRA-labeled, Anaspec) y correlacionada con MAP-2. Las imágenes fueron obtenidas en el Centro de Microscopía Avanzada Bío-Bío, de la Universidad de Concepción, empleando para ello un microscopio confocal espectral LEICA SP-8 y el software Nis Elements 4.20.01 (Nikon). Las microfotografías se analizaron usando el software MacBiophotonics ImageJ. Para medir los niveles de la proteína de dinámica mitocondrial MFN1, se tomaron 3

Regiones de Interés (ROIs: Region Of Interest) al azar (de un área determinada) en el soma neuronal, para cuantificar la intensidad de fluorescencia entre los distintos tratamientos. Con el fin de medir la inmunorreactividad de la proteína sináptica SV2, se analizaron ROIs de un área estándar en los procesos primarios de las neuronas.

4.4 Análisis estadístico

Los resultados fueron graficados como promedio \pm error estándar de la media y expresados como porcentaje con respecto al control sin tratamiento. El análisis estadístico se efectuó mediante ANOVA de una vía y se consideraron valores estadísticamente significativos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ versus control; y # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ versus SO-A β . Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Prism, CA, USA).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Síntesis y caracterización química de los derivados híbridos de benzodihidrofurano-chalconas

Se sintetizaron 15 cetonas α,β -insaturadas (chalconas), numeradas como **3a** - **3o** (Figura 5.1) empleando el método de condensación aldólica de Claisen-Schmidt entre un aldehído aromático, derivado del benzodihidrofurano de origen natural fomannoxina¹⁰⁸ y distintas acetofenonas. La acetona fue adicionada en un ligero exceso para incrementar la proporción del enolato con respecto al aldehído que sufrirá la adición nucleofílica, asegurando un mayor rendimiento en la obtención del producto de la condensación cruzada. Las chalconas sintetizadas fueron obtenidas con un rendimiento de bueno a excelente, entre 50 a 98 % (Tabla 5.1).

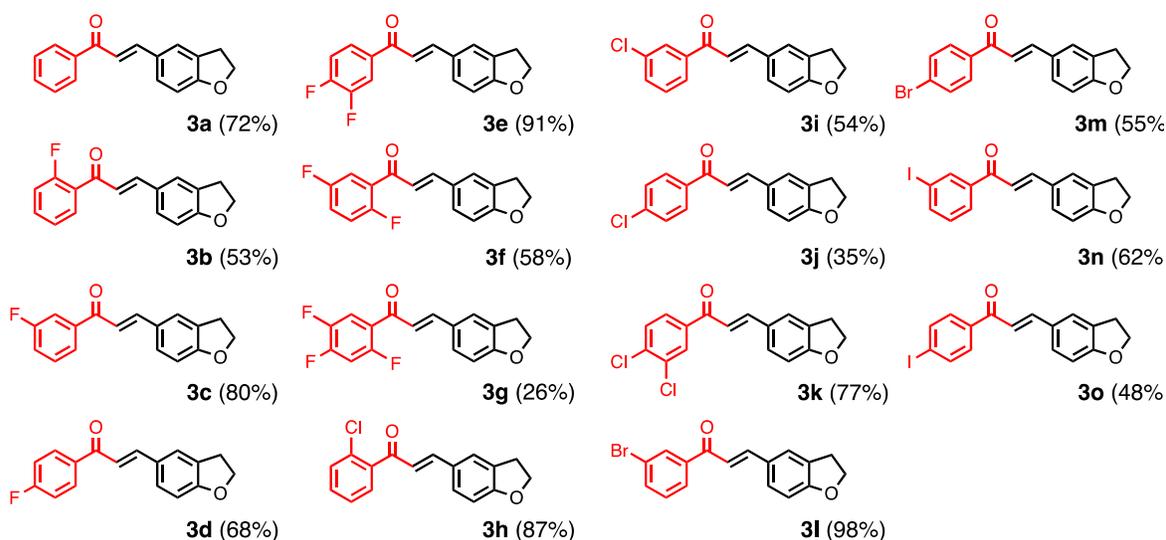


Figura 5.1. Chalconas obtenidas mediante la condensación de Claisen-Schmidt (elaboración propia)

Todos los productos obtenidos fueron sólidos cristalinos de color amarillo intenso o naranja, coloración característica de estas estructuras con extensa conjugación. Se determinó el punto de fusión para todos los compuestos sintetizados (Figura 5.1). En el esquema metodológico de reacción utilizado, se encuentra altamente favorecida la formación del producto de la condensación cruzada entre el aldehído y la cetona, dado que sólo la cetona puede formar el enolato, que es el agente nucleofílico que se adiciona al grupo carbonilo del aldehído aromático.

Tabla 5.1. Resumen 15 compuestos sintetizados.

CHALCONA	FÓRMULA MOLECULAR	RENDIMIENTO	COLOR	PUNTO DE FUSIÓN
3a	C ₁₇ H ₁₄ O ₂	72 %	Amarillo claro	124 – 126 °C
3b	C ₁₇ H ₁₃ FO ₂	53 %	Amarillo intenso	77 – 79 °C
3c	C ₁₇ H ₁₃ FO ₂	80 %	Amarillo intenso	149 – 151 °C
3d	C ₁₇ H ₁₃ FO ₂	68 %	Amarillo intenso	155 – 157 °C
3e	C ₁₇ H ₁₂ F ₂ O ₂	91 %	Amarillo intenso	159 – 161 °C
3f	C ₁₇ H ₁₂ F ₂ O ₂	58 %	Amarillo intenso	109 – 111 °C
3g	C ₁₇ H ₁₁ F ₃ O ₂	26 %	Amarillo intenso	117 – 119 °C
3h	C ₁₇ H ₁₃ ClO ₂	87 %	Amarillo intenso	95 – 97 °C
3i	C ₁₇ H ₁₃ ClO ₂	54 %	Amarillo intenso	118 – 120 °C
3j	C ₁₇ H ₁₃ ClO ₂	35 %	Amarillo intenso	157 – 159 °C
3k	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ O ₂	77 %	Amarillo intenso	153 – 155 °C
3l	C ₁₇ H ₁₃ BrO ₂	98 %	Amarillo intenso	129 – 131 °C
3m	C ₁₇ H ₁₃ BrO ₂	55 %	Amarillo intenso	165 – 167 °C
3n	C ₁₇ H ₁₃ IO ₂	62 %	Amarillo	133 – 135 °C
3o	C ₁₇ H ₁₃ IO ₂	48 %	Color ladrillo	155 – 157 °C

Adicionalmente, como la cetona es aromática, la formación del enolato es permitida sólo en una dirección. Por otro lado, el aldehído aromático, al no tener protones α no puede dar lugar a la formación del enolato y, al mismo tiempo, es más reactivo hacia la adición nucleofílica que la cetona, por lo que el producto de la condensación cruzada se encuentra mucho más favorecido que el producto de la autocondensación (Figura 5.2). El método, Claisen-Schmidt, es una técnica simple, versátil, y muy económica para la obtención de estos productos. Constituye una metodología de síntesis muy empleada en química orgánica ya que permite la formación de nuevos enlaces carbono-carbono de manera sencilla, en condiciones generalmente nobles (temperatura ambiente, presión normal, etc.) y con buenos rendimientos.¹⁵⁷⁻¹⁵⁸

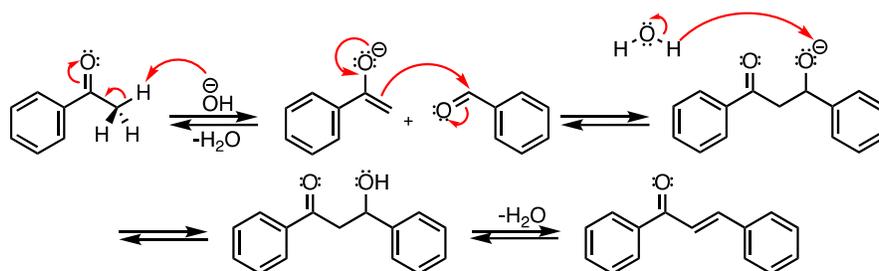


Figura 5.2. Mecanismo de acción en condensación de Claisen-Schmidt. (elaboración propia)

En nuestro caso, sin embargo, tuvimos tres excepciones con relación al rendimiento característico de la reacción que fueron los compuestos **3g**, **3j**, y **3o** (Figura 5.3).

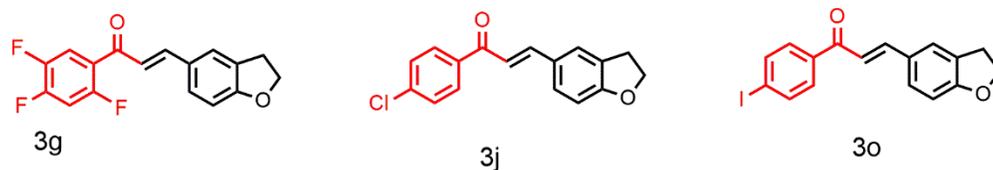


Figura 5.3. Excepciones al rendimiento característico de la reacción. (elaboración propia)

Compuesto **3g**, en este caso, la acetofenona de partida está tri sustituida con flúor, y el anillo aromático está fuertemente desactivado por el efecto inductivo de los tres halógenos. Este efecto desactivante, aunque aumenta la acidez de los tres protones alfa, provoca que el enolato obtenido sea un atacante nucleofílico más débil ya que la carga negativa sobre el carbanión se encuentra comprometida con un grupo carbonilo electrónicamente deficiente. Esta menor reactividad como atacante nucleofílico podría ser la causa del rendimiento excepcionalmente bajo obtenido para esta reacción en particular. Se ha visto, en chalconas fuertemente desactivadas como las nitrochalconas, que la reacción de condensación no conduce al producto esperado en las condiciones alcalinas convencionales, en casos como este, el empleo de catalizadores ácidos, seguido de la neutralización por la correspondiente base, ha permitido la obtención del precipitado con el producto de la condensación cruzada.¹⁵⁹

Compuestos **3j** y **3o**; durante la síntesis de estas dos chalconas hubo diferencias importantes en los procesos de purificación en comparación con los otros compuestos. El crudo de la reacción para **3j**, resultó ser desde el principio más difícil de trabajar, de ahí este bajo rendimiento. Para el tratamiento posterior a la obtención del crudo, fue necesario realizar un paso adicional de filtración en caliente; dado que no se observó la solubilización total del residuo en el disolvente a ebullición.¹⁶⁰

Por otro lado, para la obtención del compuesto *para* iodado, **3o**, fue necesario aumentar la temperatura a 40 °C para obtener el producto final. Esta menor reactividad podría ser la causa tras el menor rendimiento obtenido para esta condensación.

El proceso de purificación de todos los compuestos contempló filtración simple, seguida por recristalización. El solvente de recristalización utilizado en todos los casos fue el etanol, excepto para las dos chalconas iodadas: **3n**, y **3o**, donde la recristalización se realizó a partir de metanol, y

de una mezcla adecuada de diclorometano y metanol, respectivamente. La condensación de Claisen-Schmidt es el método principal para la síntesis de chalconas mediante el uso de bases o ácidos fuertes como el hidróxido de sodio, de potasio, ácido clorhídrico, y cloruro de aluminio.¹⁶¹ Es una variación específica de la condensación aldólica donde la reacción tiene lugar entre una cetona enolizable, y un aldehído aromático que, desde luego, no presenta hidrógenos α . Las condensaciones aldólicas mixtas que usan aldehídos aromáticos siempre implican la deshidratación del producto de la adición mixta, y forman un producto en el que está conjugado el doble enlace, tanto con el anillo aromático como con el grupo carbonilo.¹⁶² La reacción lleva su nombre en honor a dos de sus investigadores pioneros: Rainer Ludwig Claisen, y J. Gustav Schmidt, que publicaron independientemente sobre esta reacción en 1880.¹⁶³⁻¹⁶⁴ Algunos catalizadores organometálicos como el Zn(bpy)OAc han sido reportados también para esta reacción.¹⁶⁵ La condensación de Claisen-Schmidt puede llevarse a cabo con y sin solvente. Se han reportado reacciones de Claisen-Schmidt realizadas en ausencia de solvente utilizando materiales de sílica mesoporosa como una estrategia para reducir la contaminación ambiental.¹⁶⁶⁻¹⁶⁷ La evolución de la reacción fue monitoreada por Cromatografía en Capa Delgada, y revelada por UV visible y *p*-anisaldehído. Posteriormente, los productos fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas como FTIR, y resonancia magnética nuclear. Se completó la caracterización física de los compuestos con la determinando su punto de fusión (Tabla 1). La caracterización química fue complementada mediante espectrometría de masa (Figura 5.7).

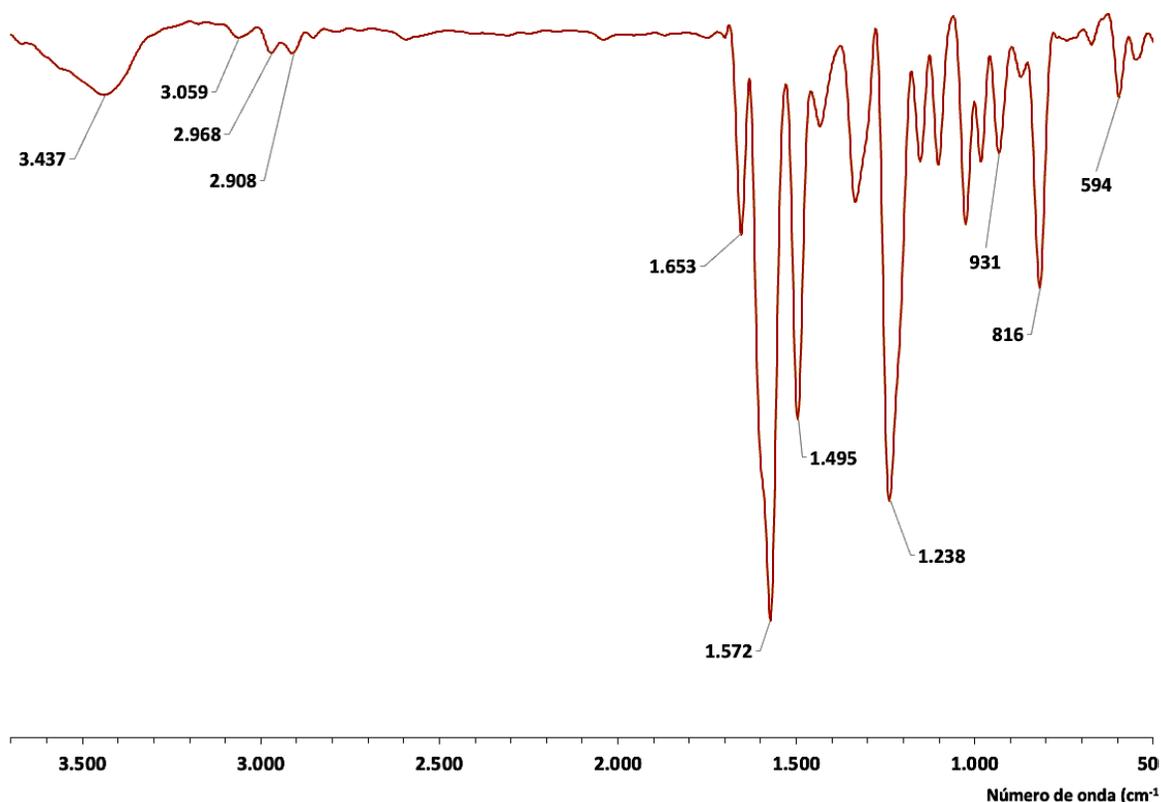


Figura 5.4. Espectro FTIR del compuesto 3d. (elaboración propia)

A modo de ejemplo, la caracterización por espectroscopía infrarroja del compuesto **3d** (Figura 5.4) muestra, aunque con baja intensidad, las bandas ubicadas ligeramente por encima de los 3000 cm^{-1} características de los estiramientos $\text{Csp}_2\text{-H}$. Justo por debajo de 3000 , en 2968 y en 2908 cm^{-1} se pueden apreciar las bandas características de estiramientos $\text{Csp}_3\text{-H}$. Asimismo, el espectro evidenció la presencia de señales típicas como la banda de absorción a 1653 cm^{-1} , asociadas al estiramiento C-O de grupos carbonilos α,β insaturados. Se observa, además, una banda intensa en la zona de la huella, características del estiramiento asimétrico en éteres alquílicos, asociada al fragmento de benzodihidrofurano de la estructura. También se distingue, a 1572 , una banda correspondiente a los estiramientos entre carbonos sp_2 de anillos aromáticos. En la zona de la huella pueden verse también, a 931 y 816 cm^{-1} bandas características de flexiones fuera del plano de C-H en anillos aromáticos.

La determinación espectroscópica por RMN ^1H y de ^{13}C confirmó que se obtuvo la estructura deseada. Los espectros de los diferentes compuestos mostraron aspectos comunes a todos los espectros obtenidos que adquieren especial relevancia para la confirmación de la estructura. Los espectros por RMN ^1H exhibieron señales consistentes con la caracterización química reportada en

la literatura para este tipo de compuestos.¹⁶⁸⁻¹⁶⁹ Para todas las chalconas, las señales correspondientes a los protones vinílicos se observan fuertemente desapantalladas, en la región correspondiente a los protones aromáticos, esto es debido a la extensa conjugación característica de estas estructuras donde todos los dobles enlaces están conjugados. El compromiso de los electrones π del doble enlace vinílico con la conjugación extendida del sistema, da como resultado una disminución en la densidad electrónica de los carbonos vinílicos que se traduce en el desapantallamiento de los protones enlazados a ellos. Se observan fundamentalmente como dos dobletes con constantes de acoplamiento ($^3J_{HH}$) entre 15 y 17 Hz, consistente con la configuración *trans* preferente para estos compuestos, y centrados aproximadamente entre 7,4 y 7,7 ppm donde el corrimiento a campo más bajo se corresponde con el protón vinílico más alejado del grupo carbonilo (Figura 5.5.). De manera general, en todos los espectros las señales correspondientes al fragmento del aldehído aromático son muy similares dado que esta porción de la molécula se mantiene inalterada en todas las chalconas. Para profundizar en los detalles referentes a estas señales, características a todos los espectros obtenidos, tomaremos como ejemplo la caracterización de la arilcetona **3d**, monosustituida en posición *para* con un átomo de flúor (Figura 5.5).

En primera instancia, y haciendo el análisis de campo alto a bajo, para todos los espectros se observan dos señales características. Dos tripletes, correspondientes a los únicos cuatro protones alifáticos de la estructura (protones unidos a los carbonos 18 y 19). De estos dos tripletes, el más desapantallado, a 4,64 ppm, es la señal correspondiente a los protones del carbono enlazado directamente al oxígeno, mientras que la señal más apantallada del espectro a 3,25 ppm corresponde a los otros dos protones alifáticos de la estructura (unidos al carbono 19).

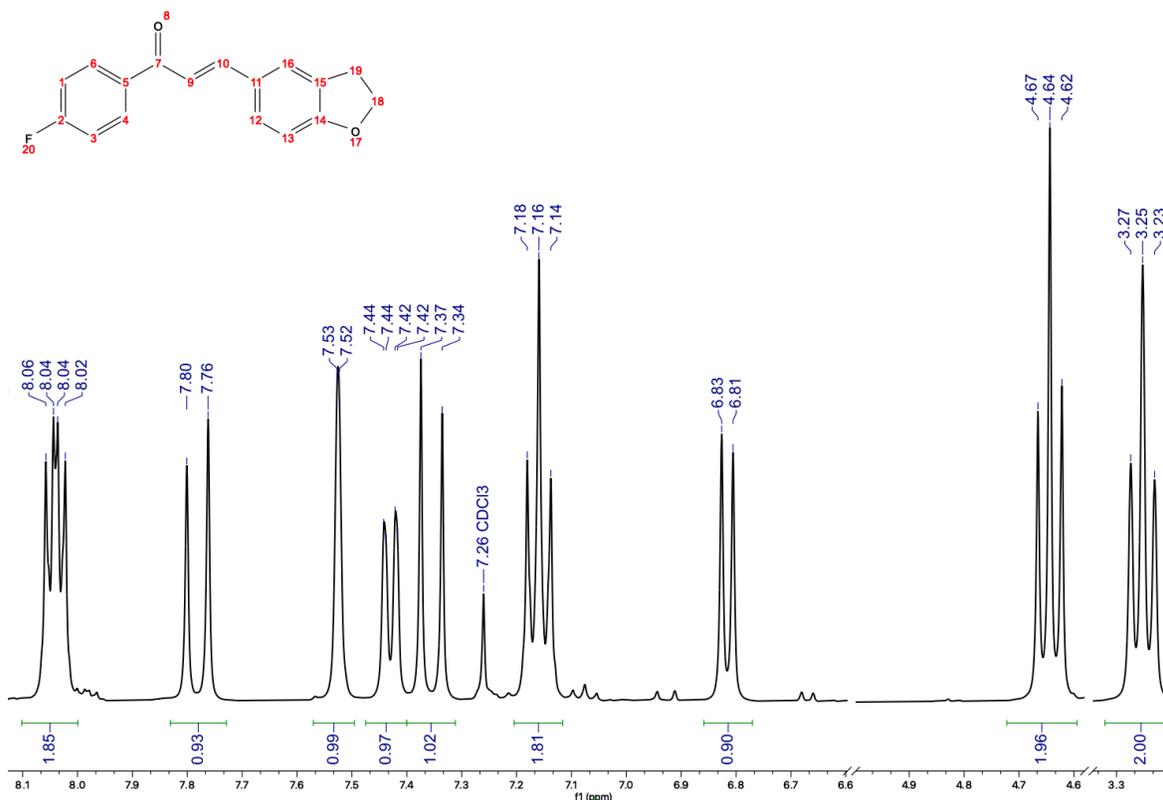


Figura 5.5. Espectro RMN ^1H de chalcona **3d**. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.04 (dd, $J = 8.6, 5.6$ Hz, 2H), 7.78 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.16 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.82 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.64 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.25 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H). (elaboración propia)

A continuación, en 6,81 ppm se observa un doblete, señal correspondiente a un único núcleo con acoplamiento $^3J_{\text{H-H}}$ (8,3 Hz), generada por el protón en 13. Esta señal acopla con un doblete de dobletes centrado en 7,43 ppm correspondiente al protón en 12. El desdoblamiento más pequeño para esta señal tiene un valor de J igual a 1,9 Hz, característico de un acoplamiento en $^4J_{\text{H-H}}$ en un anillo aromático, el que se espera ocurra con el protón en 16 a 7,52 ppm. Tal como ya habíamos mencionado, y en concordancia con lo reportado en bibliografía para este tipo de compuestos, todos los espectros muestran las señales de los dos protones vinílicos de la estructura, fuertemente desapantalladas en la región del espectro característica de las señales aromáticas. Éstas se presentan en casi todos los casos como dos dobletes, con constantes de acoplamiento entre 15 y 16 Hz, en virtud de la configuración *trans* del producto de la reacción. Las señales descritas anteriormente son comunes a casi todos los compuestos sintetizados, con diferencias sutiles en los desplazamientos químicos. Los cambios más importantes observados entre los espectros responden a los protones que se ubican sobre el anillo sustituido con halógenos ya que este patrón de

sustitución varía de un caso a otro. Para el compuesto **3d** (Figura 5.5), se observa un triplete centrado en 7,16 ppm generado por dos protones, correspondiente a la señal de los hidrógenos en 3 y 1, la multiplicidad de esta señal está en concordancia con el acoplamiento $^3J_{H-H}$ y el $^3J_{F-H}$, cuyos valores son similares. Finalmente, en 8,06 se observa la señal más desapantallada del espectro correspondiente a los protones 4 y 6, esta corresponde a un *dd*, que se genera por un acoplamiento $^3J_{H-H}$ y un $^4J_{F-H}$. Las variaciones observadas entre los espectros son diferencias tanto en los desplazamientos como en la multiplicidad de las señales. Se desarrollaron experimentos bidimensionales cuando la caracterización por RMN 1H y ^{13}C no fue suficiente para elucidar totalmente la estructura. Esto fue necesario en los compuestos fluorados dada la complejidad de las señales obtenidas por el acoplamiento del ^{19}F con los protones vecinos. La caracterización por RMN de ^{13}C también nos permitió verificar la presencia de señales importantes para la confirmación estructural (Figura 5.6).

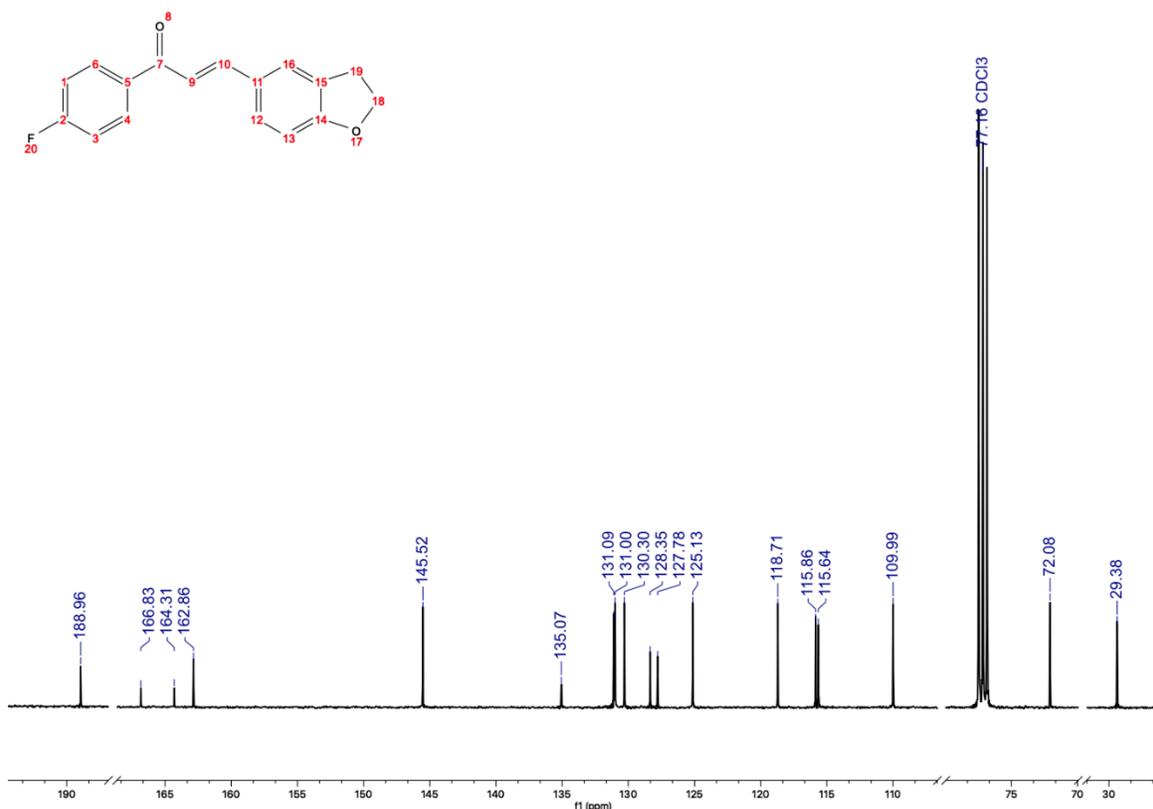


Figura 5.6. Espectro RMN de ^{13}C de chalcona **3d** ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 188.96, 165.57 (d, $J = 253.9$ Hz), 162.86, 145.52, 135.07, 131.05 (d, $J = 9.1$ Hz), 130.30, 128.35, 127.78, 125.13, 118.71, 115.75 (d, $J = 21.6$ Hz), 109.99, 72.08, 29.38. (elaboración propia).

Las señales en 29,38 y 72,08 ppm se corresponden a los carbonos 19 y 18 respectivamente, dado que el carbono 18 se encuentra directamente enlazado al átomo de oxígeno es el más

desapantallado de estos dos. A continuación, se realizó la asignación de los carbonos del anillo aromático fluorado ya que, para esto, las constantes de acoplamiento (bien tipificadas para el acoplamiento $^{13}\text{C}-^{19}\text{F}$) resultan una herramienta muy útil.¹⁷⁰ Centrada en 115,75 ppm se observa el doblete generado por los carbonos 1 y 3, con un valor de $^2J_{\text{C-F}} = 21,6$ Hz. A los 131,05 ppm se ve un doblete asociado a los carbonos 4 y 6, fácilmente identificable por la constante de acoplamiento de $^3J_{\text{C-F}} = 9,1$ Hz. En 164,31 y 166, 83 aparecen dos señales que constituyen un doblete centrado en 165,57 ppm, con un valor de $^1J_{\text{C-F}}$ de 253,9 Hz asociado al carbono 2, directamente enlazado al flúor. Puede observarse también, la señal característica del grupo carbonilo, correspondiente a la señal a campo más bajo del espectro y centrada en 188,96 ppm. Para la caracterización por espectrometría de masa, se empleó como procedimiento de ionización la técnica de electrospray y las muestras fueron previamente disueltas en una mezcla de metanol: agua (9:1 v/v). Dado que esta es una técnica de fragmentación blanda,¹⁷¹ sólo se espera ver el fragmento correspondiente al ion molecular para la confirmación de la estructura, y esto se observa en todos los compuestos lo que confirma que en todos los casos se obtuvo la estructura final deseada. No se espera ver fragmentaciones menores y, para los espectros obtenidos para los compuestos sintetizados se pueden ver algunas fragmentaciones, pero los fragmentos obtenidos son de una abundancia relativa muy baja como para ser considerados relevantes (Figura 5.7).

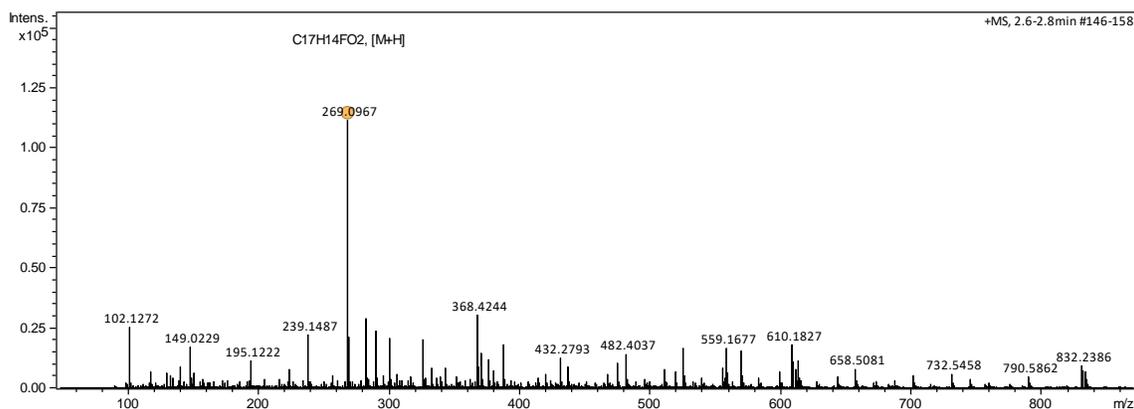


Figura 5.7. Espectro de masa del compuesto **3d**. (elaboración propia).

Todos los compuestos sintetizados se caracterizaron por espectroscopía FTIR y de resonancia magnética nuclear y también por espectrometría de masa.

5.2. Evaluación de citotoxicidad de los compuestos sintetizados

Los compuestos híbridos obtenidos fueron evaluados como potenciales agentes citoprotectores contra la toxicidad asociada al péptido beta amiloide, conocido factor neurotóxico, clave en la neurodegeneración asociada a la enfermedad de Alzheimer. Como elemento indispensable, preliminar a la evaluación biológica de estos compuestos, en el contexto de su potencial inserción en la práctica clínica a largo plazo, es necesario determinar su citotoxicidad en un determinado rango de concentraciones. Para evaluar la citotoxicidad potencial de cada compuesto, células de la línea PC-12 fueron incubadas por un período de 24 h a 37 °C con concentraciones de 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 nM, y luego se determinó la viabilidad celular. Como control de toxicidad celular se empleó el solvente anfipático DMSO al 50 % v/v. Este solvente es ampliamente utilizado en la solubilización de compuestos con aplicaciones terapéuticas y se sabe que a concentraciones de 0,1 – 0,5 % v/v puede ser empleado para cultivos celulares sin observarse efectos citotóxicos.¹⁷² Concentraciones superiores al 5 % sin embargo, son altamente citotóxicas y resultan en la muerte celular.¹⁷³ El mecanismo sugerido para la citotoxicidad del DMSO es la alteración de las propiedades físicas de los fosfolípidos de las membranas. Es un solvente aprótico y a la vez, altamente polar. Como molécula anfipática, DMSO puede interactuar con la membrana citoplasmática induciendo la formación de poros, lo que contribuye a una disminución en la selectividad de la membrana y al incremento de la permeabilidad celular.¹⁷²⁻¹⁷³ Las alteraciones en la estructura y funcionalidad de la membrana celular pueden derivar fácilmente en muerte celular debido esencialmente a la alteración de la homeostasis celular.¹⁷⁴⁻¹⁷⁵

Los resultados de citotoxicidad se muestran en la tabla 5.2 y se expresan como porcentaje respecto al grupo control (células no tratadas con ninguno de los compuestos), cuya viabilidad es considerada como el 100 %. Se consideró como efecto citotóxico la disminución estadísticamente significativa del porcentaje de viabilidad con $p < 0,0001$. Los resultados obtenidos muestran, de manera general, que las chalconas sintetizadas son no citotóxicas para la mayoría de las concentraciones evaluadas. Los compuestos híbridos **3c**, **3d**, **3i**, y **3j** mostraron ser no citotóxicos a ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 5.8).

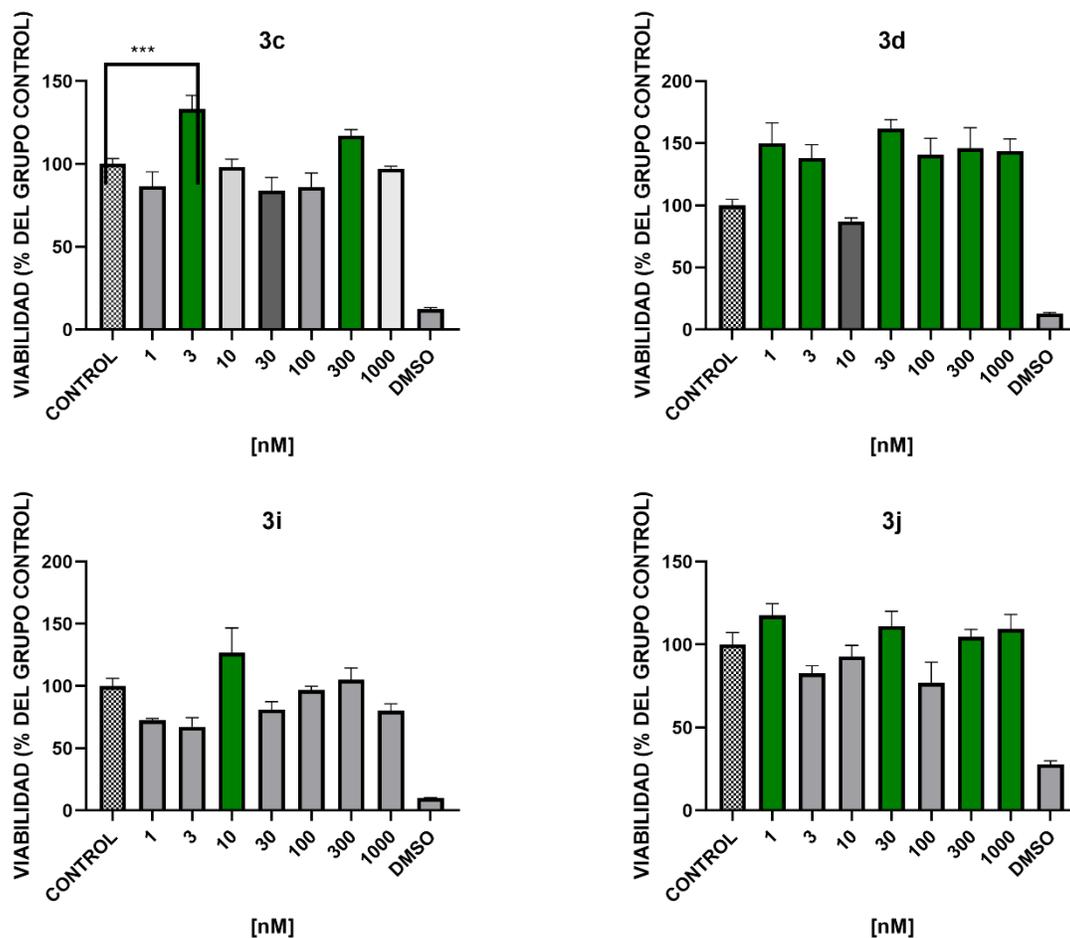


Figura 5.8. Ensayo de viabilidad de chalconas en células PC-12. Efecto de las chalconas **3c**, **3d**, **3i**, y **3j** en la viabilidad de células PC-12 expuestas a un amplio rango de concentraciones: 1 – 1000 nM por 24 h. DMSO al 50% fue empleado como control positivo de muerte celular. (elaboración propia).

Como elemento a destacar, llama la atención, no sólo que el compuesto **3i** no sea citotóxico a la mayor de las concentraciones evaluadas (y sí a todas las restantes), sino también el hecho de que el compuesto **3g** sólo resulte citotóxico a la concentración menor probada. Como consecuencia de la citotoxicidad mostrada en casi todas las concentraciones, no se evaluó el efecto citoprotector de la chalcona **3i**. Resulta llamativo también el comportamiento de la chalcona **3m** donde dos de las concentraciones resultaron citotóxicas para las células PC-12. Se advierte que, en ambos casos, el patrón de sustitución es con bromo, halógeno de mayor tamaño que el cloro y el flúor. Se ha visto que, para el caso de las chalconas halogenadas, el estudio de la relación estructura – actividad revela un incremento en la inhibición del crecimiento celular en la medida que el sustituyente en el anillo B pasa de F a Cl y de Cl a Br. Este efecto se ha visto correlacionado con un incremento en la actividad antiproliferativa debido a que inducen el arresto del ciclo celular.¹⁷⁶ En este mismo contexto destaca

el reporte de una chalcona bromada con actividad antiproliferativa que suprime el crecimiento de células tumorales gástricas *in vitro*.¹⁷⁷ El efecto citotóxico de los compuestos antiproliferativos, o ya con probada actividad antitumoral, ha sido ampliamente estudiado tanto en células nerviosas, como en células PC-12 no diferenciadas. Estudios realizados han demostrado que compuestos con actividad antitumoral exhiben una potente citotoxicidad contra células PC-12 no diferenciadas. La sensibilidad de estas células a las drogas anticancerígenas, de hecho, se incrementa notablemente cuando se diferencian a células de tejido nervioso.¹⁷⁸ Los resultados del ensayo de determinación de citotoxicidad han sido tabulados para su mejor lectura y comprensión (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Evaluación de la citotoxicidad intrínseca de las chalconas en el rango de concentraciones 1 – 1000 nM.

Chalconas	1	3	10	30	100	300	1000
3a	-	-	-	-	X	-	X
3b	-	-	-	X	-	-	-
3c	-	-	-	-	-	-	-
3d	-	-	-	-	-	-	-
3e	X	X	-	X	X	X	-
3f	-	-	-	X	-	-	-
3g	X	-	-	-	-	-	-
3h	-	X	X	-	-	-	-
3i	-	-	-	-	-	-	-
3j	-	-	-	-	-	-	-
3k	-	X	-	-	-	-	-
3l	X	X	X	X	X	X	-
3m	X	-	-	X	-	-	-
3n	-	X	-	-	-	-	-
3o	-	X	-	-	-	-	-

X = Concentraciones que disminuyeron la viabilidad celular de manera estadísticamente significativa en comparación con el grupo control.

Pese a los casos de las chalconas **3l**, **3m** y **3e** donde se observó una disminución importante en la viabilidad celular, se observó no citotoxicidad para la mayoría de los compuestos sintetizados. La citotoxicidad constituye una propiedad crítica en la determinación del destino de las moléculas pequeñas en el campo del desarrollo de medicamentos. Es esencial que la citotoxicidad químicamente inducida por los compuestos en evaluación pueda predecirse con una elevada confiabilidad **antes** de que los candidatos pasen a etapas más avanzadas de su evaluación, incluso, idealmente, antes de su misma síntesis. Dado que la muerte celular no regulada está asociada a múltiples enfermedades humanas, incluyendo el cáncer, la neurodegeneración, los accidentes cerebrovasculares, etc., pequeñas moléculas capaces de modular la viabilidad celular (en uno u otro

sentido), constituyen candidatos prometedores para el desarrollo de potenciales agentes terapéuticos contra el cáncer, (en el caso de muerte celular), y para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos (en el caso de recuperación o rescate celular).¹⁷⁹

Este estudio se ha enfocado en la neuroprotección, por lo que los candidatos deseables son aquellos que no generen citotoxicidad o cuyos resultados de viabilidad sean incluso superiores a los del control, pero se han observado compuestos que modulan la viabilidad celular en las dos maneras posibles. En los casos en los que pueden apreciarse incrementos en la viabilidad celular para algunas concentraciones de compuestos, esto puede atribuirse igualmente al aumento esperado en la población celular durante su crecimiento, hecho que ocurre a pesar de emplearse densidades celulares estandarizadas al comienzo de los experimentos. En casos como estos, naturalmente la concentración o condición a la cual se percibe este incremento es no citotóxica para la línea celular. Es necesario también explicar la aparente aleatoriedad para algunas de las concentraciones más bajas, que exhiben un efecto citotóxico donde otras concentraciones más elevadas no lo hacen. Este comportamiento no resulta inusual en la evaluación biológica de compuestos bioactivos, no siempre se encuentra la deseada correlación ascendente en la curva dosis-respuesta dado que, a diferentes concentraciones, estos compuestos podrían activar mecanismos celulares y moleculares completamente diferentes que darían pie a los resultados “anómalos” observados por el investigador. Este fenómeno se pudo ver no sólo en este experimento de evaluación de citotoxicidad, sino que también se observó en la búsqueda del efecto biológico de citoprotección contra la toxicidad de A β . Este comportamiento de curva dosis -respuesta no monotónica, ha sido reportado con anterioridad, especialmente para disruptores endocrinos, donde se puede observar a menudo una falta de linealidad en la relación dosis-respuesta, exhibiendo en ocasiones curvas en forma de U.¹⁸⁰ Las curvas no monotónicas de dosis-respuesta pueden resultar de múltiples mecanismos. En algunos casos, dosis muy bajas pueden estimular la producción de más receptores, resultando en un incremento de la respuesta, mientras que dosis más elevadas pueden inhibir a dichos receptores.¹⁸¹⁻¹⁸² En este trabajo se precisaría de una caracterización farmacológica más profunda en aras de arrojar luz sobre el mecanismo específico en cada caso, pero es una manera de explicar esta aleatoriedad que resulta tan llamativa. Las curvas no monotónicas de dosis – respuesta no son exclusivas de reguladores endocrinos, también pueden observarse en células, tejidos y poblaciones humanas y animales en respuesta a nutrientes, vitaminas, compuestos farmacológicos, entre otros.¹⁸³

5.3. Evaluación de actividad citoprotectora de los compuestos sintetizados

Para evaluar la actividad citoprotectora de los compuestos sintetizados contra la toxicidad asociada al péptido beta amiloide, se utilizó el mismo diseño experimental descrito anteriormente. Con este diseño, fue evaluado el efecto citoprotector de estas chalconas en células PC-12 tratadas por 24 h con oligómeros solubles del péptido beta amiloide OS-A β (0,5 μ M) en el mismo rango de concentraciones evaluadas en el experimento de citotoxicidad. Se encontró que 8 de los 14 compuestos ensayados exhibieron un efecto protector contra la toxicidad del péptido A β , en al menos una de las concentraciones testeadas mediante la recuperación de la viabilidad celular en células expuestas simultáneamente a A β y a los compuestos, en comparación con los valores de viabilidad reducida observados en las células expuestas solamente al péptido (Tabla 5.3).

Los resultados de actividad citoprotectora se muestran en la **Tabla 5.3**. Como elemento a destacar, el compuesto **3j** mostró tener actividad citoprotectora a cinco de las siete concentraciones evaluadas. Las células PC-12 expuestas solamente a OS-A β mostraron una viabilidad reducida de 62 \pm 5 % con respecto al grupo control. La coincubación con **3j** indujo una recuperación de la viabilidad celular del 62,5 % obtenido para el grupo control positivo a 77,7; 79,0; 85,6; 83,1; y 88,6 % para las concentraciones de 1, 10, 30, 300, y 1000 nM respectivamente. Para las concentraciones de 3 y 100 nM también se observó un incremento de la viabilidad hasta 76,6 y 74, 3 % respectivamente. Estos valores, pese a ser significativamente menores que el 100 % de viabilidad del grupo control son también estadísticamente superiores a los valores de viabilidad reducida obtenidos cuando se incubaba con A β solamente. El efecto de citoprotección se observó de manera concentración – dependiente para 100, 300 y 1000 nM. Concentraciones inferiores a 30 nM exhibieron un comportamiento similar. Los resultados más prometedores, sin embargo, fueron encontrados para los compuestos **3c**, **3g**, y en menor medida, **3d**, convirtiéndose éstos en los mejores candidatos para una caracterización farmacológica más profunda (Figura 5.9).

Tabla 5.3. Evaluación del efecto citoprotector de las chalconas en el rango de concentraciones evaluado de 1 – 1000 nM

Chalconas	Concentraciones que mostraron efecto citoprotector.						
	1	3	10	30	100	300	1000
3a	-	-	-	-	-	-	X
3b	-	-	-	-	-	X	X
3c	-	X	-	-	X	X	-

3d	-	-	-	-	-	-	X
3e	-	-	-	-	-	-	-
3f	-	-	-	-	-	-	-
3g	-	X	X	-	-	-	X
3h	-	-	-	-	-	-	-
3i	-	-	-	X	-	-	-
3j	-	X	X	X	-	X	X
3k	X	-	-	-	-	-	X
3m	-	-	-	-	-	-	-
3n	-	-	-	-	-	-	-
3o	-	-	-	-	-	-	-

X = concentraciones que mostraron efecto citoprotector contra la citotoxicidad de Aβ (se observó un incremento estadísticamente significativo en los valores de viabilidad en comparación con los valores de viabilidad reducidos observados para el grupo tratado solamente con Aβ)

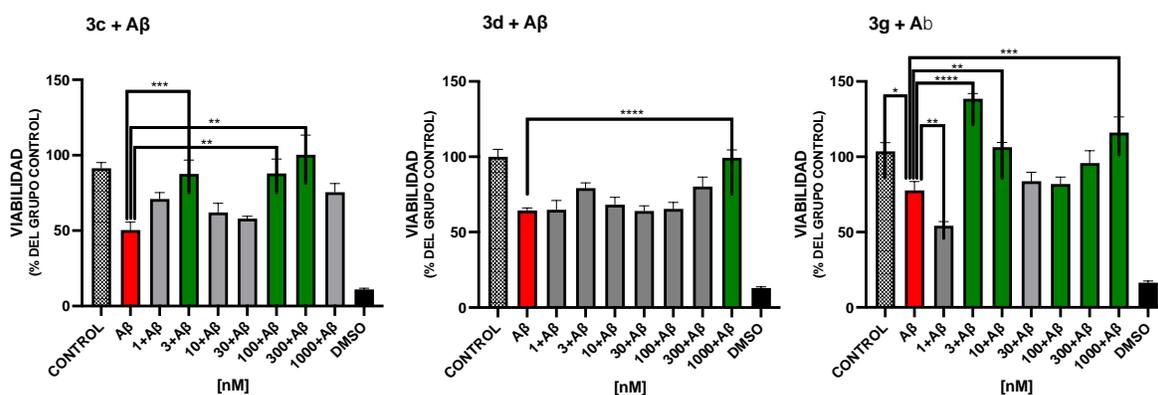


Figura 5.9. Efecto citoprotector de las chalconas **3c**, **3d**, y **3g** sobre la viabilidad de células PC-12 expuestas al rango de concentraciones de 1 – 1000 nM de estos compuestos durante 24 horas y a OS-Aβ a una concentración de 0,5 μM. Se empleó DMSO al 50 % como control positivo de muerte celular (n=3). (elaboración propia).

Para el compuesto **3c**, la viabilidad celular se recuperó en más de un 50 % en comparación con los valores de viabilidad observados para el grupo tratado solamente con OS-Aβ a la concentración de 300 nM; también se obtuvieron buenos valores de recuperación de viabilidad a concentraciones menores (3 y 100 nM): 38 % en ambos casos. De los tres compuestos con mejores resultados, la menor actividad se observó para la chalcona **3d** para la cual se observó una recuperación de la viabilidad de un 35 %, y solamente para la mayor de las concentraciones probadas: 1000 nM. La chalcona **3g** indujo una recuperación de la viabilidad celular del 61 % a una concentración tan baja como 3 nM, y de 38 % a 1000 nM.

De manera general, las chalconas, al igual que las moléculas que contienen núcleos de benzofuranos, han probado ser compuestos químicos altamente bioactivos.^{108, 116, 184} Estos heterociclos oxigenados se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, y existen múltiples actividades biológicas reportadas para ellos. En el desarrollo de este trabajo, se pudo observar que la sustitución en posición meta con el halógeno flúor en los compuestos sintetizados (**3c**), rindió excelentes resultados con relación a la actividad biológica evaluada.

Cuando se sustituyen con flúor ambas posiciones, meta y para (**3g**), los efectos citoprotectores, como se pudo constatar, se incrementan visiblemente, obteniéndose valores de recuperación de viabilidad celular de hasta un 61 % para una concentración tan baja como 3 nM, sugiriendo un compuesto bioactivo de alta sensibilidad, y del 38 % a la concentración superior de 1000 nM. Dado que A β es un conocido factor neurotóxico estrechamente relacionado con la patogénesis del Alzheimer, estos hallazgos preliminares constituyeron elementos prometedores y que permitieron avanzar en la evaluación de estos compuestos mediante varios ensayos que permitieron abordar varios de los eventos neuropatológicos asociados a la EA. En estos primeros experimentos de citoprotección fue posible constatar que, efectivamente, el péptido beta amiloide exhibió efectos citotóxicos en la línea celular PC-12, hallazgo consistente con lo reportado por la literatura.¹⁸⁵⁻¹⁸⁶ Está reportado que el péptido beta amiloide puede inducir apoptosis en células PC-12 no diferenciadas, así como desintegración del citoesqueleto de forma dosis dependiente. Los microfilamentos y microtúbulos son esenciales para el adecuado funcionamiento celular y la desintegración del citoesqueleto se ha observado a menudo en células apoptóticas.¹⁸⁷ Se pudo constatar que, efectivamente la viabilidad fue reducida en todos los experimentos realizados en las células que fueron tratadas solamente con el péptido, en un rango de 39 – 81 % en comparación con el 100 % de viabilidad del grupo control. Es bien conocido que la deposición anormal de A β en placas extracelulares insolubles, conlleva a una diversa variedad de mecanismos tóxicos para las neuronas que incluyen estrés oxidativo,¹⁸⁸⁻¹⁸⁹ difusión mitocondrial¹⁹⁰⁻¹⁹¹ y excitotoxicidad¹⁹²⁻¹⁹³ a través de interacciones con los receptores de neurotransmisores. Asimismo, hay evidencia de que el péptido beta amiloide induce muerte celular por necrosis en células PC-12, aunque los mecanismos por los cuales induce la necrosis no están del todo esclarecidos.¹⁹⁴⁻¹⁹⁵

Dado que diferentes vías fisiopatológicas median la toxicidad del péptido beta amiloide, el objetivo ideal de esta investigación fue la búsqueda y obtención de uno o más candidatos capaces de atacar

de manera efectiva al menos dos de estas vías. Con este objetivo, de este primer tamizaje farmacológico realizado en citoprotección se pudo comprobar que de las 15 chalconas sintetizadas y evaluadas, las fluoradas, y cloradas, resultaron ser las más efectivas para proteger a las células de la toxicidad asociada al péptido A β , especialmente las fluoro-sustituidas: **3c**, **3d**, y **3g**. Ya fueron explicados los satisfactorios resultados obtenidos con la sustitución en posición meta (**3c**), que se vieron notoriamente incrementados con la di sustitución en posiciones meta, y orto (**3g**), por otra parte, la mera sustitución en posición para (**3d**), arroja resultados más modestos, con una recuperación de la viabilidad celular de un 35 % para la concentración superior probada (1000 nM), aunque sigue siendo un resultado estadísticamente relevante. En el caso de la sustitución con el halógeno flúor se pudo observar que la sustitución en posición meta resultó más efectiva que en las posiciones orto y para solamente. Por el contrario, pudo constatarse el efecto contrario con la sustitución con cloro ya que la sustitución en posición para resultó ser más efectiva que cuando se realizó en orto y en meta. La chalcona **3j** mostró efectos citoprotectores a cinco de las siete concentraciones evaluadas, y aunque los resultados fueron más bien modestos, aun así, resultaron significativamente diferentes de los resultados obtenidos para el grupo control positivo, lo cual es más de lo que se pudo observar para las chalconas cloradas en otras posiciones. Durante el desarrollo de estos experimentos pudo apreciarse que el efecto citoprotector decrece cuando el patrón de sustitución halogenada pasa de átomos más pequeños como el flúor y el cloro, a halógenos más voluminosos como el bromo y el yodo. Como es sabido, en este orden aumenta no solamente el tamaño atómico sino también la polarizabilidad, que constituye una medida de la respuesta dinámica de la nube electrónica al efecto de un ion o de un dipolo cercano. Igualmente, como parte de esta investigación, se intentó explorar las conocidas ventajas de la hibridación molecular de compuestos ya biológicamente activos.¹⁹⁶⁻¹⁹⁷ Este enfoque se basa en la combinación de grupos farmacóforos complementarios de al menos dos compuestos conocidos como bioactivos que, mediante una fusión apropiada llevada a cabo en virtud de un diseño químico - farmacéutico racional, posibilite la obtención de compuestos más activos que los precursores originales. Con relación a esto, se contiene que los compuestos híbridos obtenidos en este trabajo, entre chalconas y benzodihidrofuranos derivados del núcleo de la fomannoxina (compuesto neuroprotector en el rango de los μ M), pueden convertirse en ligandos multiobjetivos capaces de inhibir al menos dos de los principales eventos neuropatológicos del Alzheimer. Resulta destacable que los compuestos sintetizados en este trabajo exhiben las actividades biológicas aquí descritas en el rango de los nM, siendo, por lo tanto, compuestos de mayor sensibilidad que la fomannoxina. A

partir de estos resultados de citoprotección, se seleccionaron las moléculas **3c**, **3d**, y **3g** como candidatos para pasar a las etapas siguientes como parte de una caracterización farmacológica más profunda que permitiera arrojar luz sobre sus posibles mecanismos de acción.

5.4. Evaluación de los cambios en la agregación del péptido β -amiloide en presencia de los compuestos sintetizados.

Dando cumplimiento a este objetivo, y en aras de comenzar la elucidación de los mecanismos de acción de los mejores compuestos citoprotectores, se evaluó el efecto sobre la agregación de los monómeros del péptido beta amiloide para los compuestos **3c**, **3d**, y **3g**. Resulta pertinente señalar que pese a que las chalconas **3c**, y **3g** no resultaron efectivas para la mayor parte de las concentraciones evaluadas, la actividad citoprotectora en aquellas concentraciones que sí lo fueron, hicieron necesario seleccionar a estas moléculas por encima de otros candidatos con efecto citoprotector a un mayor número de concentraciones, pero con una actividad más bien modesta. Con estas consideraciones, se evaluaron las tres moléculas seleccionadas para determinar si ejercían algún efecto sobre las fases del proceso de agregación del péptido beta amiloide (Figura 5.10). En este proceso, los monómeros de A β se combinan inicialmente para formar núcleos de agregación a través de una etapa conocida como nucleación primaria. Los núcleos son definidos como agregados para los que la adición de monómeros ocurre más rápido que la disociación.¹⁹⁸ La adición de monómeros a estos núcleos, mediante la etapa de elongación, da lugar a la formación de oligómeros solubles, que son intermediarios transitorios que elongan posteriormente dando lugar a la formación de fibrillas. Estas fibrillas pueden disociarse nuevamente mediante procesos independientes de los monómeros y la velocidad de dicho proceso dependerá solamente de la concentración existente de fibrillas. La elongación de las fibrillas mediante la adición de monómeros, así como la nucleación secundaria, dependerá tanto de la concentración de monómeros como de la concentración de fibrillas ya formadas.¹⁹⁹ Una vez alcanzada la concentración óptima de fibrillas, la superficie de éstas cataliza a su vez la nucleación de nuevos agregados a partir del estado monomérico. Este proceso se conoce como nucleación secundaria y una vez que inicia, toma preferencia sobre la nucleación primaria como fuente principal de nuevos oligómeros a difundir al medio y que, a través de la elongación, dan lugar a más fibrillas (retroalimentación positiva).

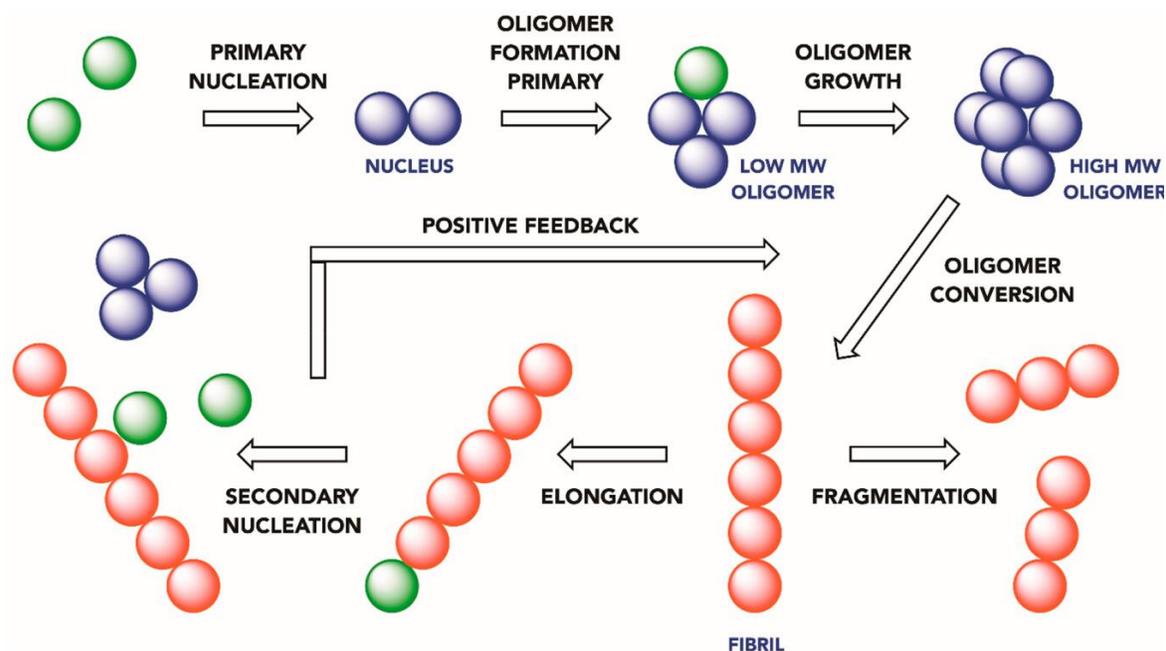


Figura 5.10. Representación esquemática de la cascada de auto-agregación del péptido beta amiloide. Código de colores: los monómeros están coloreados en verde, los núcleos y oligómeros solubles transitorios, en azul y las fibrillas se encuentran coloreadas en rosado. El número de círculos es solamente con propósitos ilustrativos y no representan el número real de subunidades en las diferentes especies. (elaboración propia)

El péptido beta amiloide fue incubado en presencia y ausencia de los compuestos a evaluar y siempre con el fluoróforo tioflavina T (ThT). Durante todo el experimento se midió la fluorescencia emitida por el complejo formado por la ThT y el péptido beta amiloide al agregarse. Durante la exposición del péptido al compuesto **3g** no se observó inhibición de la fluorescencia, al contrario, se observó un incremento significativo en los valores de fluorescencia total emitida a lo largo del experimento que podría deberse a un efecto estabilizador que favorece la agregación del péptido para obtener estructuras más estables, y con un grado más alto de agregación. En el caso del compuesto **3c**, sin embargo, se puede ver claramente como en las dos concentraciones probadas disminuye de manera significativa la fluorescencia emitida por el complejo ThT-A β , evidenciando que hay una alteración importante en el proceso de agregación del péptido. El compuesto **3c** mostró ser capaz de inhibir la cinética de agregación de los monómeros del péptido, lo cual se refleja en la disminución de los valores totales de fluorescencia obtenidos, que dan lugar a menores áreas bajo la curva (Figura 5.11).

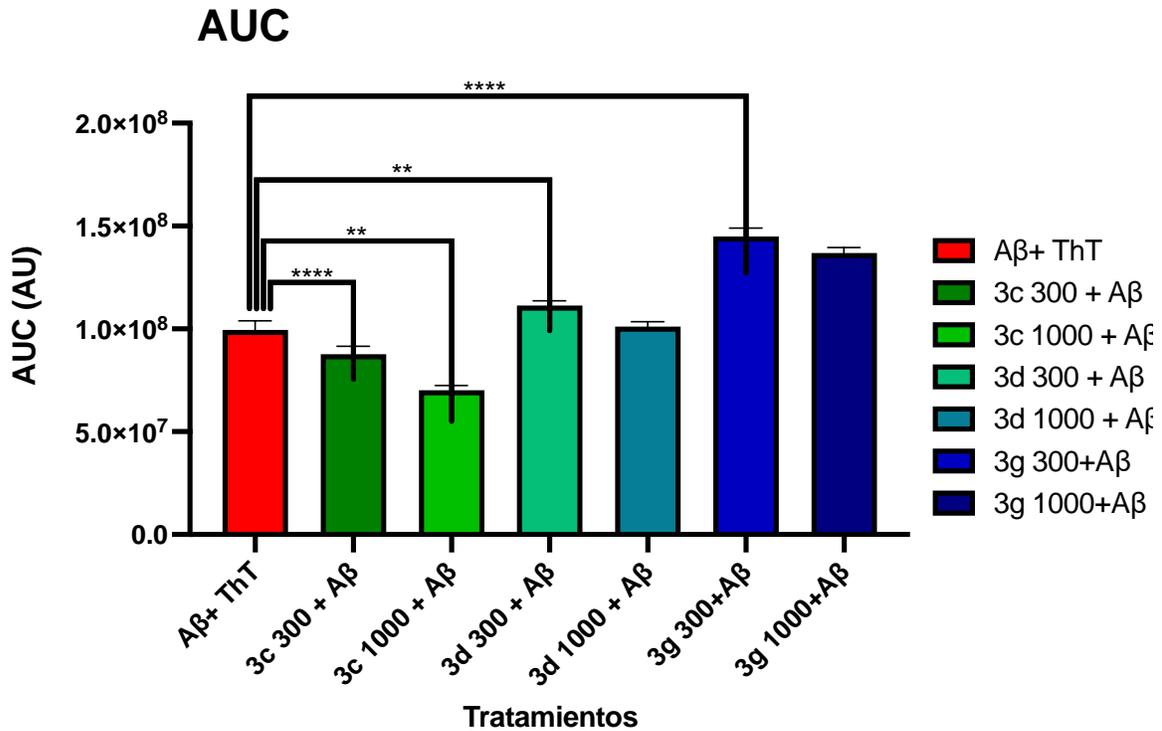


Figura 5.11. Área bajo la curva de la fluorescencia emitida por el complejo ThT-Aβ en ausencia y en presencia de los compuestos evaluados. (elaboración propia)

Puede verse también como la concentración superior del compuesto **3d** causa un comportamiento similar; se observa una disminución estadísticamente significativa en los valores de fluorescencia obtenidos. Un análisis más detallado permite ver como durante el transcurso del experimento, la fluorescencia emitida por el complejo en presencia de los compuestos se va modificando. La fluorescencia emitida es monitoreada durante un período de cuatro horas, en un lapso de 50 ciclos a través de los cuales puede observarse de manera más puntual (por ciclo), el comportamiento de la fluorescencia. De los tres compuestos evaluados, solamente el compuesto **3c**, y el **3d** para la concentración superior exhibieron actividad inhibitoria sobre la agregación del péptido beta amiloide. Para el caso del compuesto **3c**, puede verse que, a inicios del experimento, específicamente en el ciclo 8, la concentración superior de 1000 nM inhibe de manera significativa la agregación de los monómeros de Aβ. El mismo fenómeno puede verse, aunque en menor medida para la concentración superior de **3d** (Figura 5.12).

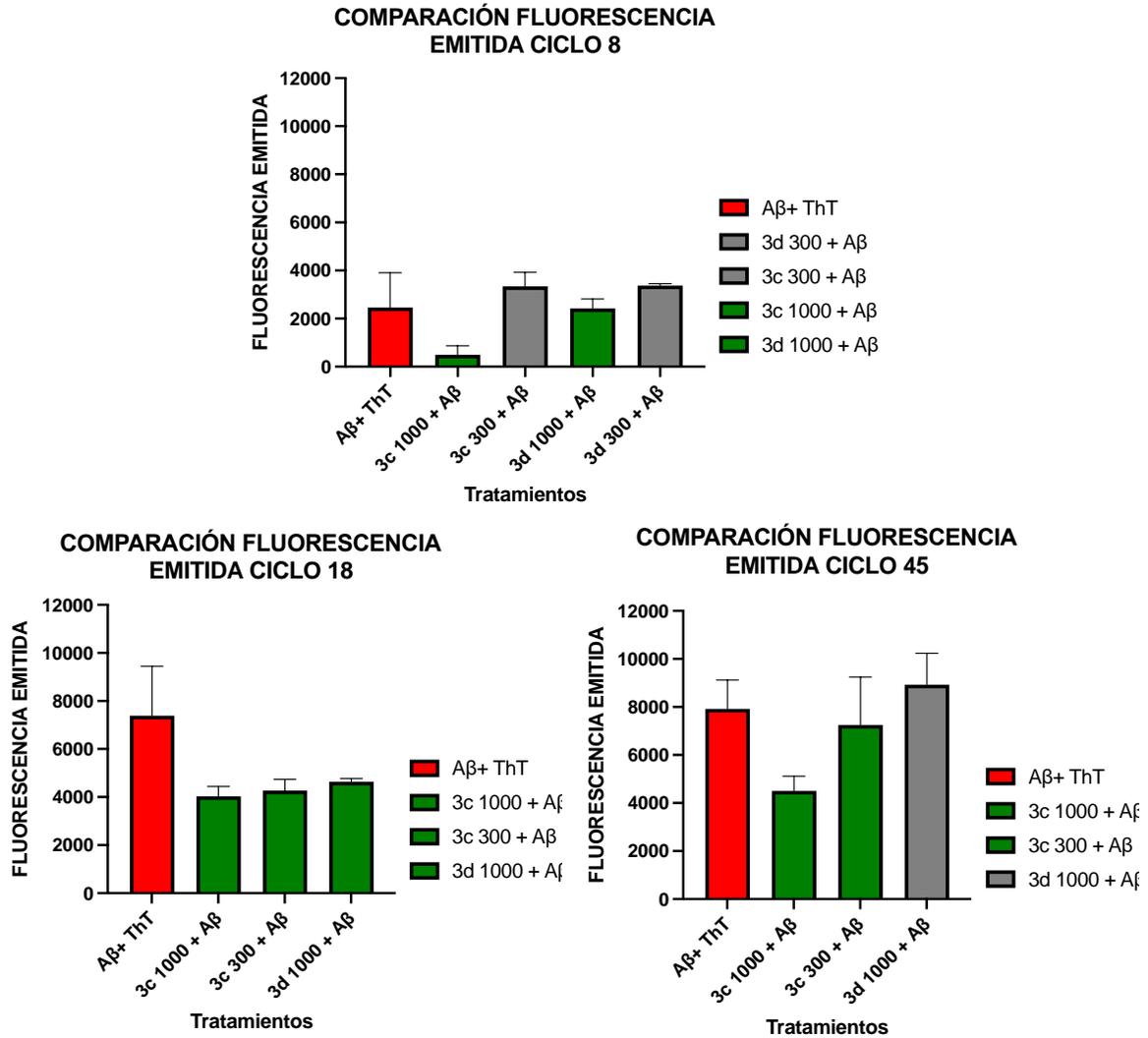


Figura 5.12. Comparación puntual de fluorescencia emitida en ciclos específicos del experimento. Ploteo del área bajo la curva en cada condición experimental para evaluar el cambio en la fluorescencia en presencia y ausencia de los compuestos **3c** a ambas concentraciones, y del compuesto **3d** a la concentración superior evaluada. (elaboración propia)

En el ciclo 18, más avanzado el experimento puede verse una disminución consistente de los valores de fluorescencia emitida, tanto para las dos concentraciones probadas para **3c**, como para la concentración superior evaluada para el compuesto **3d**. Cercano al final del experimento se observa que el efecto inhibitorio se mantiene para las dos concentraciones probadas del compuesto **3c** pero no para el compuesto **3d**.

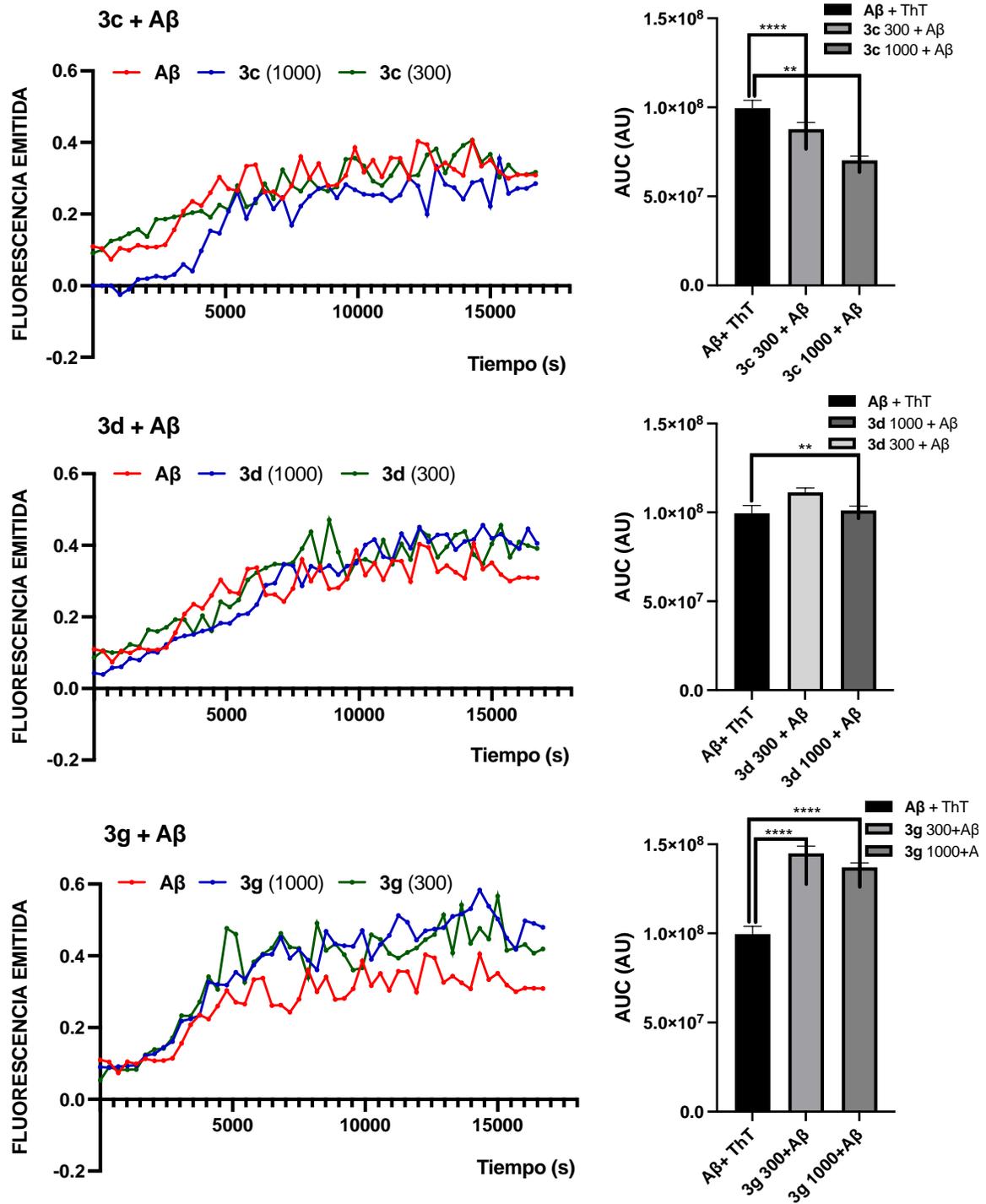


Figura 5.13. Curvas de fluorescencia y Áreas bajo la Curva del péptido Aβ con y sin los compuestos a) 3c, b) 3d, y c) 3g. Aβ fue incubado con y sin las chalconas durante 4 horas y la fluorescencia del complejo ThT - Aβ se midió durante 50 ciclos a las concentraciones de 300 nM (línea verde) y 1000 nM (línea azul). (elaboración propia).

El compuesto **3c** altera el perfil de la cinética de agregación (figura 5.13) y como ya se había visto, disminuye significativamente el área bajo la curva en el ploteo de la fluorescencia emitida contra el tiempo. El compuesto **3d** altera también el perfil de agregación, especialmente al inicio del experimento para ambas concentraciones, donde la emisión de fluorescencia se ve disminuida, lo cual podría indicar una inhibición del proceso de nucleación primaria, y a mediados del experimento, alrededor de los 1000 segundos (Figura 5.13) se observa un incremento abrupto de la fluorescencia especialmente para la concentración de 300 nM. Este comportamiento podría estar dado por un aumento en la estabilización de las fibrillas helicoidales características de la agregación del péptido, aunque es un comportamiento muy puntual. A diferencia de lo observado para **3c** no hay una disminución significativa en el área total bajo la curva de fluorescencia emitida contra el tiempo.

5.5. Estudios de acoplamiento molecular para estudiar las interacciones ligandos–monómeros de A β

Para complementar la evaluación se realizaron estudios de acoplamiento molecular para elucidar las interacciones entre los ligandos y el péptido, así como también si éstas están termodinámicamente favorecidas. Se realizaron las predicciones sobre los acoplamientos moleculares entre los monómeros de A β y los diferentes ligandos empleando el software Autodock Vina. Se observó que todos los compuestos en teoría pueden formar enlaces estables con los dos monómeros de A β evaluados 1AML y 1IYT (Figura 5.14), que difieren en sus conformaciones. Para ambos conformeros se observaron tres sitios de unión en su superficie. Un análisis más detallado de las interfases permitió identificar a los aminoácidos involucrados específicamente en cada interacción según el sitio de unión. En el monómero 1AML se pueden describir los sitios **1** (¹⁶KL¹⁷, ¹⁹FF²⁰, ²³D, ²⁹GA³⁰), **2** (⁴FRHDS⁸, ¹⁰YE¹¹, ¹⁴HQ¹⁵, ¹⁸V, ²²E) y **3** (¹⁶K, ¹⁹FF²⁰, ²²EDV²⁴). De manera similar, en 1IYT, los aminoácidos N-terminal localizados en los sitios **1** (³EF⁴, ⁶HD⁷, ¹⁰Y), **2** (⁸S, ¹¹EV¹², ¹⁵QK¹⁶, ¹⁹F) y **3** (¹³H, ¹⁶KL¹⁷, ²⁰FA²¹, ²⁴V) se encuentran esencialmente conservados (Figura 5.14).

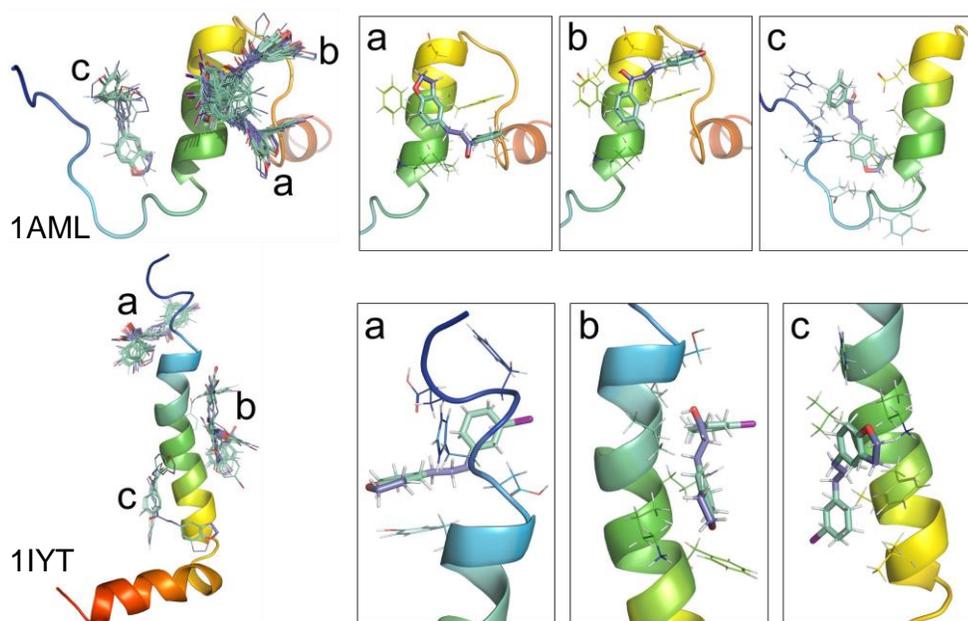


Figura 5.14. Modelo de interacción de las dos conformaciones de los monómeros de A β evaluados con **3c**, **3d**, y **3g**. Los compuestos fueron evaluados en tres regiones en la superficie de los monómeros de A β (1AML y 1IYT) (señalados en la figura con letras minúsculas y mostrados en sus respectivas cajas). Se utilizó un esquema de color de arcoíris en ambas estructuras²⁰⁰. (elaboración propia).

El estudio fue complementado con el análisis energético y estructural de los complejos formados basado en el puntaje obtenido mediante el acoplamiento molecular y, además, los valores de ΔG_{enlace} calculados para los complejos mostraron ser favorables para todos los compuestos evaluados, con puntajes de acoplamiento en el rango de -7 a -5,7, acompañado de valores de ΔG_{enlace} entre -52 a -40 kcal/mol (Figura 5.15, Tabla 5.4) avalando así la espontaneidad de la unión ligando – monómero (favorecida termodinámicamente). Es necesario resaltar que, independientemente de los resultados obtenidos en la predicción, lo que realmente pesa en la confirmación de la actividad biológica es el resultado observado en el ensayo experimental. Las predicciones *in silico* sirven como una herramienta adecuada para optimizar la selección de los candidatos a evaluar o, en este caso, en que se realizó *a posteriori*, para explicar la causa subyacente tras los resultados observados.

Asimismo, se estimaron las constantes de inhibición (K_i) para los compuestos **3c**, **3d**, y **3g** (los compuestos evaluados experimentalmente), y se obtuvieron los valores de 7,34 μM , 20,2 μM , y 14,4 μM respectivamente, para las interacciones de cada uno de los compuestos con 1AML; y 55,7 μM , 66,0 μM , y 55,7 μM para el monómero 1IYT. Tomados en conjunto, estos resultados predicen

interacciones con las dos diferentes conformaciones del monómero de A β de manera estructuralmente estable y, además, termodinámicamente favorecida. Nótese como en ambos casos, el valor de K_i obtenido para **3c** es el menor, avalando la mayor potencia de este ligando específico para la inhibición del proceso de agregación de A β .

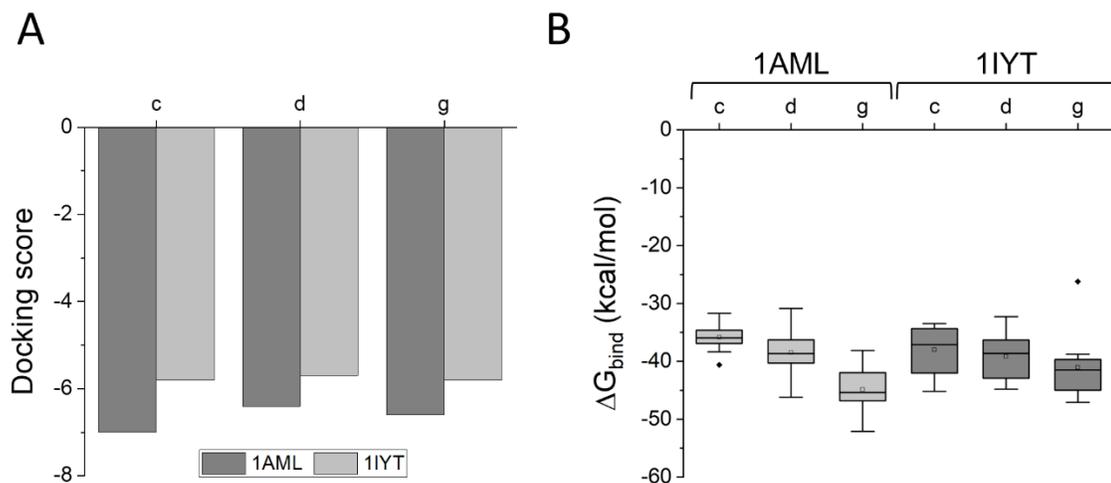


Figura 5.15. Caracterización estructural y energética de los complejos formados por **3c**, **3d**, y **3g** con los monómeros de A β . Los gráficos resumen el puntaje de acoplamiento y los valores ΔG_{enlace} calculados para la interacción de los compuestos **3c**, **3d**, y **3g** con los monómeros de A β 1AML y 1IYT²⁰⁰. (elaboración propia)

Es ampliamente conocido que los agregados solubles del péptido beta amiloide están relacionados con la pérdida neuronal y sináptica característica de la EA. Estos pequeños agregados, productos intermedios en la agregación de los monómeros de A β , dificultan la plasticidad sináptica del hipocampo, induciendo déficits en el aprendizaje relacionados con un deterioro cognitivo observable tanto en modelos murinos como humanos.²⁰¹ Estos agregados ejercen su efecto de toxicidad celular a través de diversos mecanismos (estrés oxidativo, disrupción del Ca²⁺, alteraciones en la señalización celular y daño mitocondrial, entre otros) que involucran principalmente la permeabilización de las membranas celulares mediante su unión no específica y las interacción específica con receptores de membrana.²⁰²

Tabla 5.4. Energías de enlace y puntajes de acoplamiento de los compuestos **3c**, **3d** y **3g** con los monómeros de A β ensayados.

Compuesto	1AML		1IYT	
	Puntaje de acoplamiento	ΔG_{enlace} (kcal/mol)	Puntaje de acoplamiento	ΔG_{enlace} (kcal/mol)
3c	-7.0	-40.61	-5.8	-35.58
	-6.9	-34.63	-5.8	-45.19
	-6.8	-35.75	-5.8	-33.58
	-6.7	-36.37	-5.7	-34.35
	-6.6	-36.89	-5.7	-42.03
	-6.5	-34.89	-5.7	-42.46
	-6.4	-38.36	-5.6	-33.47
	-6.4	-33.11	-5.6	-39.05
	-6.3	-36.14	-5.6	-37.74
	-6.3	-31.70	-5.6	-36.46
3d	-6.4	-46.20	-5.7	-36.15
	-6.3	-40.31	-5.6	-44.04
	-6.3	-39.00	-5.6	-38.23
	-6.3	-38.34	-5.6	-39.82
	-6.3	-40.19	-5.6	-44.83
	-6.3	-37.80	-5.6	-36.32
	-6.3	-36.29	-5.5	-39.01
	-6.2	-42.35	-5.5	-42.90
	-6.2	-33.57	-5.5	-32.29
	-6.1	-30.84	-5.4	-38.25
3g	-6.6	-38.13	-5.8	-26.21
	-6.5	-50.81	-5.8	-47.09
	-6.4	-38.25	-5.8	-41.81
	-6.4	-52.11	-5.7	-44.97
	-6.4	-41.95	-5.7	-47.07
	-6.3	-46.57	-5.7	-38.78
	-6.3	-46.53	-5.6	-41.16
	-6.3	-43.47	-5.6	-41.09
	-6.3	-44.26	-5.6	-39.70
	-6.2	-46.82	-5.5	-42.66

La obtención de tres compuestos capaces de inhibir el proceso de agregación de A β , y en el caso de **3c**, incluso desde las fases tempranas de agregación (durante la propia nucleación primaria) impidiendo, o al menos ralentizando la formación de oligómeros solubles, resulta un hallazgo sumamente prometedor, muy atractivo para el desarrollo de estudios posteriores que permitan profundizar en la caracterización biológica de estas moléculas.

5.6. Evaluación del efecto de modulación alostérica positiva de los compuestos sintetizados en receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$

La etapa siguiente de la caracterización biológica de los compuestos híbridos sintetizados consistió en la evaluación de su efecto de modulación alostérica positiva en receptores humanos nicotínicos del tipo $\alpha 7$. Once de los compuestos híbridos obtenidos en este trabajo fueron evaluados como moduladores alostéricos positivos (PAM) en receptores $\alpha 7$. Esta evaluación fue realizada en la Universidad Oxford Brookes en Inglaterra, donde cuatro de los compuestos no pudieron ser disueltos en ninguno de los disolventes probados para el ensayo (Figura 5.16).

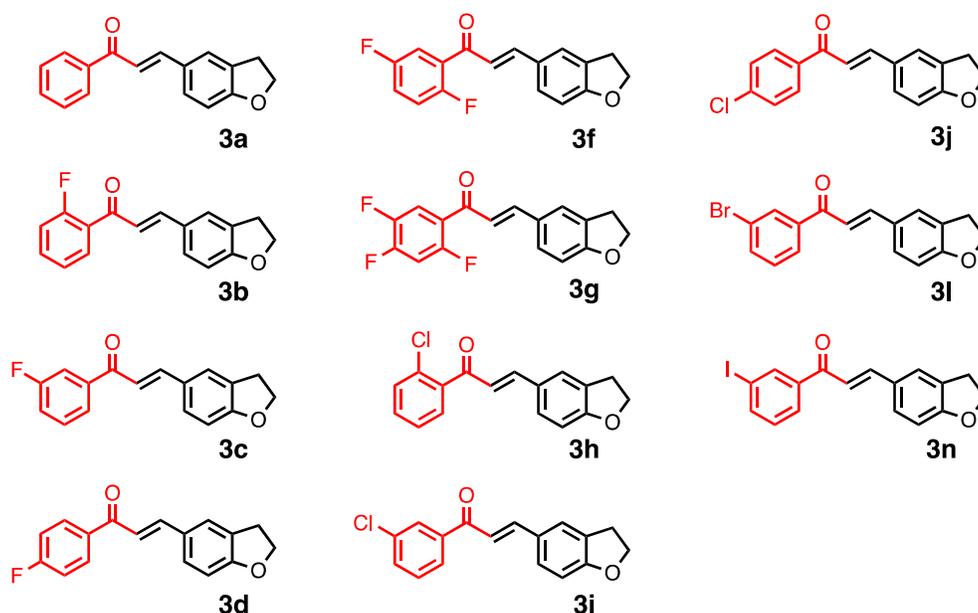


Figura 5.16. Derivados de chalconas evaluados como PAM en receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$. Todos los compuestos fueron coaplicados a una concentración de $10 \mu\text{M}$ con una EC_{20} de ACh (elaboración propia)

En todos los casos la concentración evaluada fue de $10 \mu\text{M}$. La acetilcolina fue co-aplicada en una concentración equivalente a su EC_{20} (concentración necesaria para generar el 20 % del máximo de corriente: $30 \mu\text{M}$ para estos receptores), y se midió el efecto de los compuestos en la respuesta evocada por el neurotransmisor al unirse a su sitio de acción. Todas las respuestas fueron normalizadas en base a la corriente evocada solamente por el neurotransmisor (control), que fue considerada como el 100 %. Se pudo comprobar que los compuestos **3c**, **3f**, y **3n** provocaron un incremento estadísticamente significativo en el máximo de corriente generado por ACh (Figura 5.17).

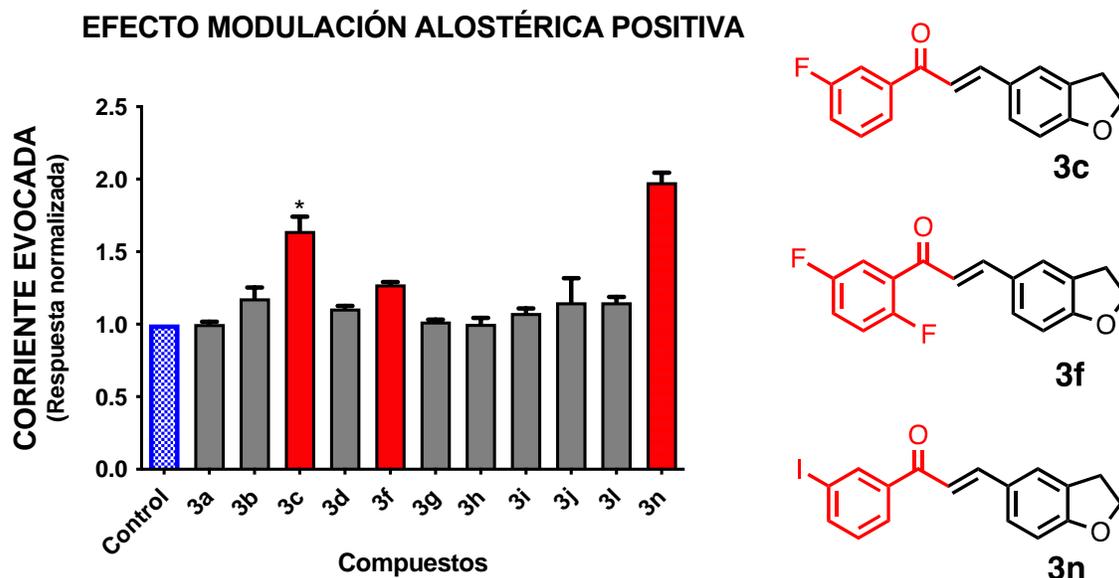


Figura 5.17. Efecto funcional de los once compuestos en receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$ expresados heterológicamente en ovocitos de *Xenopus*. (elaboración propia).

La chalcona **3c**, *meta* sustituida con flúor, indujo un incremento del 60 % en la corriente generada por el neurotransmisor, mientras que la chalcona sustituida en posición *meta* con yodo provocó un incremento de un 100 % ya que la corriente generada es el doble de la inducida por la acetilcolina por sí sola en el grupo control. El máximo de corriente también fue potenciado por **3f**. Pese a que el incremento fue más bien modesto, fue estadísticamente significativo. Resulta evidente que, para los dos casos más relevantes en cuanto a la modulación alostérica positiva, los resultados fueron obtenidos para la sustitución en posición *meta* en la que, entre otros factores que discutiremos con posterioridad, hay un menor impedimento estérico entre el grupo carbonilo y el halógeno que, aparentemente, podría dificultar el arreglo conformacional apropiado entre los ligandos ensayados y el sitio de modulación alostérica. Se plantea esta suposición basada en el hecho de que ninguno de los ligandos sustituidos solamente en posición *orto* mostró el efecto potenciador, excepción hecha del compuesto **3f** e incluso en este caso, el efecto es muy discreto, y existe también una sustitución en posición *meta*.

En el caso del ligando **3c**, la sustitución fue hecha con el flúor, que como es bien conocido, no sólo incrementa el tiempo de vida media de los compuestos, sino que, además, aumenta su lipofilia, una característica sumamente deseable para lograr la penetración de la barrera hematoencefálica. Los beneficios asociados a la sustitución con flúor en términos de potencia, lipofilia y mejora de las

propiedades farmacocinéticas en general son bien conocidos y han sido previamente reportados en la literatura.²⁰³ Sin embargo, y por mucho, los mejores resultados obtenidos en cuanto a la potenciación de los receptores $\alpha 7$ se lograron mediante la sustitución en posición *meta* con el halógeno más pesado iodo. Los halógenos, especialmente los más ligeros como el flúor y el cloro, son ampliamente utilizados en la química medicinal. Durante muchos años, fueron empleados fundamentalmente para introducir un impedimento estérico y, hasta no hace aún tanto tiempo, solamente eran percibidos como entidades moleculares hidrofóbicas y bases de Lewis debido a su electronegatividad. Sin embargo, contrario a esta percepción, los compuestos que contienen cloro, bromo, e incluso iodo pueden formar enlaces directos del tipo R-X--Y-R, donde el halógeno **X** actúa como un ácido de Lewis, e **Y** puede ser cualquier entidad electrodonadora. Esta interacción es conocida como enlace de halógeno y ha demostrado ser esencial para estabilizar la unión ligando-receptor. La formación de este enlace descansa en el concepto *sigma hole* (agujero o gap sigma), que describe la presencia de un espacio cuya densidad electrónica es mucho más baja debido a la anisotropía de la densidad electrónica alrededor del halógeno. Por tanto, el enlace de halógeno está dirigido fundamentalmente por la fuerza atractiva entre esta área deficiente en electrones que constituye el σ hole en el halógeno y la interacción con la correspondiente base de Lewis, donde, además, los efectos de dispersión y polarización juegan un rol decisivo para esta interacción.

Dado que el σ y la polarizabilidad son mayores para el átomo de iodo, se podría inferir que el efecto significativamente superior observado en el compuesto **3n** bien podría estar asociado a uno o a ambos efectos.¹⁴⁰⁻¹⁴¹ Además, el estudio de los moduladores alostéricos de $\alpha 7$ sugiere que estas moléculas afectan las transiciones energéticas al afectar los máximos de corriente obtenidas (en el caso de los PAM tipo I) o tanto el máximo de corriente como la duración de esta respuesta generada por el agonista (tipo II: afectan también el tiempo de desensibilización y recuperación del receptor).²⁰⁴ Estas diferencias entre los diversos moduladores positivos alostéricos sugieren que estas moléculas probablemente actúen por distintos mecanismos y, por consiguiente, se estén uniendo al receptor por distintos sitios de acción. En los receptores humanos $\alpha 7$, los PAM que han demostrado ser más efectivos son los que se unen al sitio alostérico del dominio transmembrana del receptor,²⁰⁵ por esta razón sería razonable asumir que un halógeno más voluminoso, y más lipofílico pudiera concretar una interacción más efectiva con este sitio de acción.²⁰⁶ Paradójicamente, la sustitución en posición *meta* con cloro y bromo (halógenos intermedios entre el flúor y el iodo por su volumen y polarizabilidad) no generó resultados visibles con relación al

efecto PAM de estas moléculas por lo que, con el objetivo de profundizar en los resultados prácticos obtenidos a través de los registros electrofisiológicos, se incorporaron estudios de predicción *in silico* a través de modelos de docking molecular. El docking molecular es una de las herramientas de modelado molecular, y es una técnica de gran utilidad para predecir la estructura de los complejos intermoleculares que se establecen entre dos o más moléculas. Es particularmente útil para estudiar las interacciones proteína-ligando, y su objetivo principal es predecir energías y modos de enlace.²⁰⁷

Los estudios realizados confirman los resultados obtenidos en la práctica ya que las predicciones *in silico* resaltaron las interacciones claves presentes entre los compuestos **3c**, **3f**, y **3n** y el sitio alostérico localizado en el dominio transmembrana del receptor que podrían explicar las diferencias en el perfil electrofisiológico de los compuestos sintetizados. La interacción más importante en la potenciación de la actividad del receptor resultó ser la que ocurre con el aminoácido MET276. En el camino a esclarecer la naturaleza de las interacciones formadas entre los ligandos y el receptor $\alpha 7$, los estudios de acoplamiento molecular fueron desarrollados en el sitio alostérico localizado en el dominio transmembrana de dicho receptor, que es consistente con el sitio de unión reportado para el modulador alostérico positivo PNU-120596.¹⁴⁹ Los hallazgos indican que el anillo de benzodihidrofurano, en los ligandos **3n**, y **3f** genera interacciones fuertes con los aminoácidos THR273, MET276, ALA298, MET301, ILE239, y LEU269 presentes en las hélices alfa del lado (-) M1 (Figura 5.18), y de éstas, la interacción $\alpha - \pi$ con MET276 resulta crucial para obtener el efecto de modulación alostérica positiva de diversos PAM ya reportados como el PNU-120596, la ivermectina,²⁰⁸⁻²¹² y el recientemente desarrollado por nuestro grupo de trabajo, 3-((6-(feniletinil)piridin-3-il)oxi)quinoclidina.²¹³

Por otra parte, la importancia de las interacciones del receptor con los sustituyentes del anillo fenilo de los compuestos están en consonancia con los resultados prácticos obtenidos que muestran que la inserción de un halógeno más pequeño como el flúor induce una potenciación relativamente más débil sobre la respuesta de la ACh, probablemente porque su inserción no origina las interacciones hidrofóbicas con LEU246 y MET301 que resultan también importantes para incrementar el efecto de potenciación (Figura 5.18)²¹³

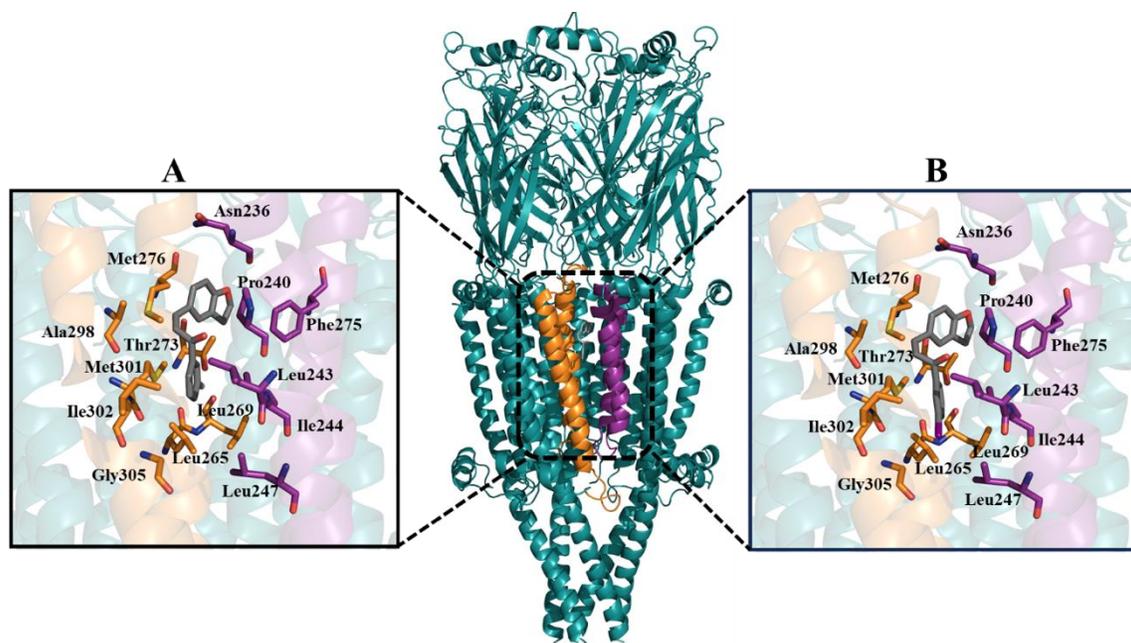


Figura 5.18. Modelo de acoplamiento molecular entre **3c**, **3n**, y el receptor. Centro: estructura cristalina del receptor humano nicotínico nAChR $\alpha 7$.¹⁴⁹ **A** y **B** representan el acoplamiento de los compuestos **3c** y **3n** con el nAChR $\alpha 7$. (elaboración propia).

La introducción de un segundo átomo de flúor disminuye aún más la actividad ya que se originan enlaces de halógeno e hidrógeno con los aminoácidos ILE244, ALA298 y PRO240 impidiendo la interacción del anillo de benzodihidrofurano con el aminoácido MET276, que es esencial para la potenciación alostérica de la actividad del receptor. En contraste, la inserción de un átomo voluminoso como el yodo (compuesto **3n**) favorece las interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos LEU247, LEU244 y MET301, lo cual contribuye al incremento de la actividad potenciadora mediada fundamentalmente por la interacción σ - π del benzodihidrofurano con MET276. Los resultados de este ensayo sugieren que las interacciones claves para la potenciación de este receptor son, efectivamente, las del tipo σ - π del núcleo de benzodihidrofurano con MET276, así como las interacciones hidrofóbicas con LEU244, LEU247 y MET301 que generan un efecto sinérgico con esta actividad. Estos hallazgos son consistentes con los registros electrofisiológicos obtenidos. El compuesto **3f**, por otra parte, no es capaz de generar las interacciones del tipo σ - π con MET276, lo cual conduce a la disminución observada en la actividad del receptor.

La propiedad de potenciar la actividad de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ constituye un hallazgo sumamente relevante en el objetivo de hallar compuestos capaces de ejercer un efecto neuroprotector mediado por más de un mecanismo de acción. Estos receptores, además de

encontrarse ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, resultan esenciales en procesos como el aprendizaje, la cognición, la memoria de trabajo, etc.²¹⁴⁻²¹⁸ La estimulación directa de estos receptores se ha convertido en un objetivo terapéutico muy prometedor para aliviar el deterioro cognitivo característico de las demencias debido a su ubicuidad en áreas del cerebro esenciales para la atención, cognición,²¹⁹ y la memoria como el hipocampo, la corteza cerebral y estructuras límbicas.²²⁰⁻²²³ Además, se conoce que están involucrados en mediar la transmisión sináptica rápida, la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica.²²⁴⁻²²⁵ Se expresan ampliamente tanto presináptica como postsinápticamente²²⁶⁻²²⁷ y su activación mediante agonistas o PAMs ha demostrado ser efectiva para mejorar el aprendizaje y la memoria en varios ensayos conductuales realizados en modelos animales preclínicos de varios trastornos cognitivos.²²⁸⁻²³¹

El hallazgo de tres compuestos capaces de modular positivamente la actividad de estos receptores y que, además, entre éstos se encuentre la chalcona **3c**, con efectos ya observados de **preservación de la viabilidad celular, citoprotección contra la toxicidad de A β , e inhibición del proceso de agregación de este péptido** brindó un escenario sumamente prometedor para el desarrollo de estudios de confirmación de la actividad neuroprotectora *per se*, a ser realizados en cultivos primarios de neuronas de hipocampo embrionario de ratón. Nótese que toda esta caracterización biológica preliminar fue realizada en línea celular (PC-12), o sea, células no diferenciadas que aún no han alcanzado la senescencia. Los estudios para confirmar la actividad neuroprotectora del compuesto **3c** fueron realizados en cultivos primarios de neuronas, lo que permitió ratificar la capacidad neuroprotectora de este compuesto.

5.7. Evaluación de la actividad neuroprotectora de los compuestos sintetizados

Para evaluar la actividad neuroprotectora del compuesto **3c** se trataron neuronas de hipocampo embrionario de ratón con OS-A β a una concentración de 0,5 μ M, y con **3c** a las concentraciones de 3 y 300 nM, las que resultaron ser más efectivas en los ensayos de citoprotección. Para la evaluación se utilizó un control negativo (de neuronas no tratadas), un control positivo de neurotoxicidad con neuronas expuestas solamente al OS-A β , dos grupos tratados solamente con **3c** a las concentraciones seleccionadas para observar el efecto que ejercen los compuestos sobre las neuronas en ausencia de A β , y finalmente, para la determinación de la potencial actividad neuroprotectora como tal, dos grupos de neuronas expuestas simultáneamente a los oligómeros solubles del péptido a la concentración de 0,5 μ M, y al compuesto en las dos concentraciones a

evaluar: 3 y 300 nM. Para determinar los efectos en la función sináptica se realizó el marcaje de la proteína presináptica SV2,²³²⁻²³⁴ cuyos cambios de inmunorreactividad fueron evaluados mediante microscopía de fluorescencia confocal y también se realizó el marcaje de la proteína mitocondrial mitofusina 1 (MFN1), que es una de las proteínas esenciales en la dinámica mitocondrial, específicamente para la fusión de las mitocondrias y es un indicativo de la salud mitocondrial. Las mitocondrias saludables constituyen una red de organelos compleja, interconectada y altamente dinámica, mantenida por eventos permanentes, opuestos y balanceados de fusión y fisión mitocondrial, y este equilibrio resulta esencial para la salud mitocondrial. MFN1 es una de las proteínas necesarias para este proceso (fusión) y es parte de la familia de las mitofusinas.²³⁵⁻²³⁶

Ambas proteínas fueron marcadas con anticuerpos primarios que a su vez, fueron marcados con los correspondientes anticuerpos secundarios: para el caso de la SV2 (proteína presináptica), el anticuerpo secundario emite en color verde, mientras que para el caso de la MFN1 (dinámica mitocondrial), emite en rojo. Las medidas se corresponden con la intensidad de la fluorescencia. Se analizaron los cambios en los niveles de expresión de los marcadores seleccionados. Para evaluar si el compuesto **3c** podía preservar la estructura y funcionalidad sináptica se midieron los niveles de expresión de la proteína presináptica **SV2** mediante técnicas inmunocitoquímicas en las neuronas de hipocampo embrionario de ratón. Con este fin se seleccionaron al azar ROIs (region of interest) en los procesos primarios de las neuronas y se cuantificó la intensidad de la fluorescencia en un área determinada.²³⁷ Todos los valores fueron normalizados con respecto a los obtenidos para el grupo control que fue considerado como el 100 %. Las imágenes fueron analizadas, procesadas y medidas mediante el software ImageJ®, mientras que el procesamiento estadístico fue realizado con el software GraphPad Prism®. El uso de estos programas permitió cuantificar y comparar estadísticamente los resultados obtenidos para las distintas condiciones experimentales y detectar diferencias significativas para un valor de *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001 versus control; y #p < 0.05, ##p < 0.01 y ###p < 0.001 versus SO-Aβ. Fueron considerados como resultados positivos para neuroprotección un incremento significativo en los niveles de expresión de uno o dos de los marcadores seleccionados.

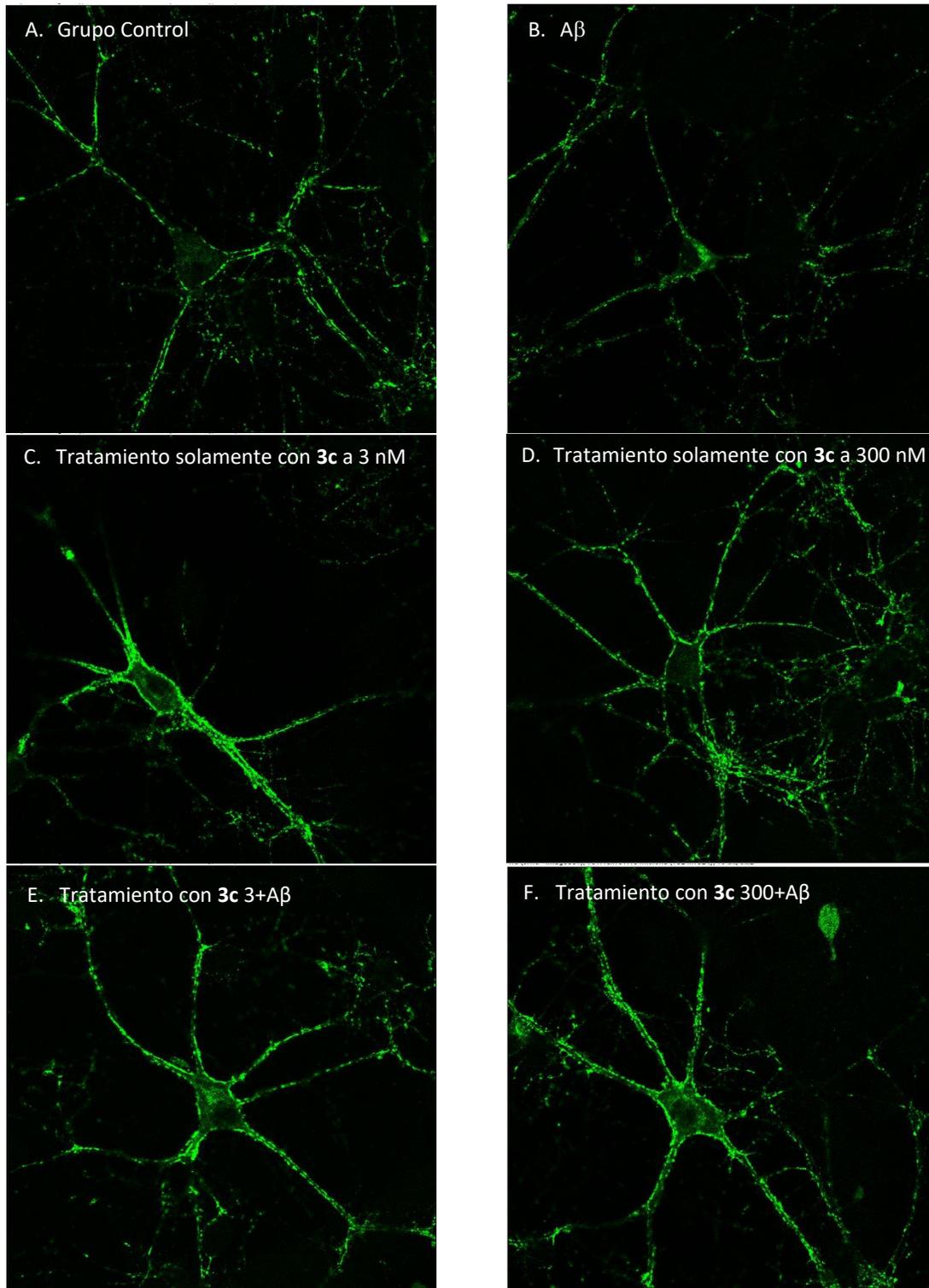


Figura 5.19. Cambios en los niveles de expresión de SV-2 (fluorescencia en verde) producidos por **3c** y OS-A β en cultivo primario de neuronas de hipocampo de ratón. Imágenes representativas de microscopía confocal de neuronas de hipocampo (10 DIV. Figura **A**: neuronas no tratadas. Figura **B**: neuronas tratadas con OS-A β , Figura **C**: neuronas tratadas con **3c** 3 nM, Figura **D**: neuronas tratadas con **3c** 300 nM, Figura **E**: neuronas tratadas con **3c** 3 nM + OS-A β , Figura **F**: neuronas tratadas con **3c** 300 nM + OS-A β . (elaboración propia).

Se pudo constatar que la exposición a A β provocó una disminución significativa en los niveles de SV2, del 100 % tomado como valor control, al 57 %, avalando los conocidos efectos neurotóxicos asociados a este péptido. Estudios realizados en autopsias han demostrado que la proteína presináptica SV2 se ve considerablemente disminuida en el cerebro con Alzheimer.²³⁸

Los resultados arrojaron que la coincubación con el compuesto **3c** no sólo impidió la disminución en los niveles de SV2 inducida por el A β , sino que, además, indujo incrementos en sus niveles, estadísticamente superiores incluso a los niveles de expresión en el grupo control, evidenciando el efecto de la chalcona **3c** en la protección de neuronas y de la red neuronal contra el fallo sináptico inducido por estímulos tóxicos y neurodegenerativos como la exposición al péptido beta amiloide. La coincubación con **3c** a 3 nM indujo una recuperación en los niveles de esta proteína de 137 %, superiores a los observados para el grupo control, y la concentración de 300 nM exhibió un comportamiento análogo con valores de 129 %. Además de preservar los niveles de proteína sináptica frente al A β , los resultados mostraron que la incubación de las neuronas solamente con **3c** a las dos concentraciones seleccionadas no sólo no indujo un descenso significativo en los niveles de la glicoproteína presináptica SV2, sino que además, por sí misma, provocó un incremento significativo en los niveles de este marcador para la concentración de 3 nM del 100 % del grupo control a un 184 %.

Puede observarse en las imágenes como la fluorescencia emitida aumenta cuando las neuronas son tratadas con el compuesto **3c** (Figura 5.19) y podemos constatar que, estadísticamente, también hay diferencias significativas y cuantificables. (para un valor de *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001 versus control; y #p < 0.05, ##p < 0.01 y ###p < 0.001 versus SO-A β) (Figuras 5.20).

Se analizaron también los cambios en los niveles de expresión del mediador de dinámica mitocondrial MFN1, mediante la técnica de inmunocitoquímica en cultivo primario de neuronas de hipocampo embrionario de ratón. Para analizar los cambios en sus niveles de expresión, se seleccionaron tres ROIs al azar en el soma neuronal y se cuantificó la intensidad de la fluorescencia. Se observó que la exposición al compuesto **3c**, indujo una disminución del 100 % considerado para el grupo control, a 71 %, en el caso de la concentración de 300 nM.

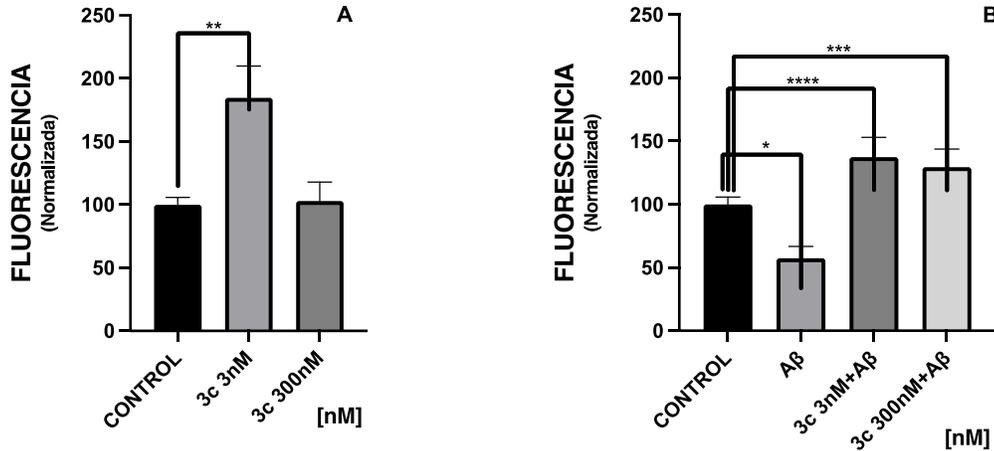


Figura 5.20. A) Efecto de la incubación con el compuesto **3c** en los niveles de proteína presináptica SV-2. **B)** Efecto de la coincubación con el compuesto **3c** y OS-Aβ en los niveles de proteína presináptica SV-2 para proteger a las neuronas del daño sináptico asociado al péptido Aβ. (elaboración propia).

No se observó una disminución estadísticamente significativa para la concentración de 3 nM (Figura 5.21). La exposición de las neuronas al péptido Aβ provocó una disminución de los niveles de MFN1 a 56,8 %, resultado esperado dado el conocido efecto que tiene este péptido en la inducción de daño mitocondrial.²³⁹ La coincubación con el compuesto **3c** indujo una recuperación de este valor a 81% para la concentración 3 nM y de 76 % para 300 nM, ambos valores superiores a los niveles reportados para el grupo control positivo pero inferiores a los del grupo control (Figura 5.21.B). Estos resultados, sin embargo, constituyen algo positivo ya que la coincubación con el compuesto fue capaz de prevenir a ambas concentraciones, la disminución abrupta en los niveles de MFN1 asociada a la exposición al péptido beta amiloide (Figura 5.23).

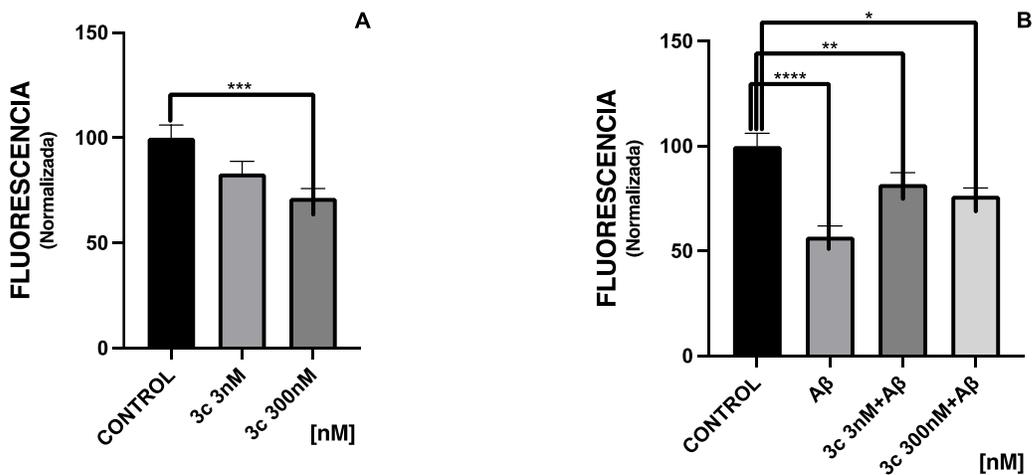


Figura 5.21. A) Efecto de la incubación con el compuesto **3c** en los niveles de mitofusina 1. **B)** Efecto de la coincubación con el compuesto **3c** y el péptido Aβ en los niveles de mitofusina 1 para proteger a las neuronas del daño sináptico asociado al péptido Aβ. (elaboración propia).

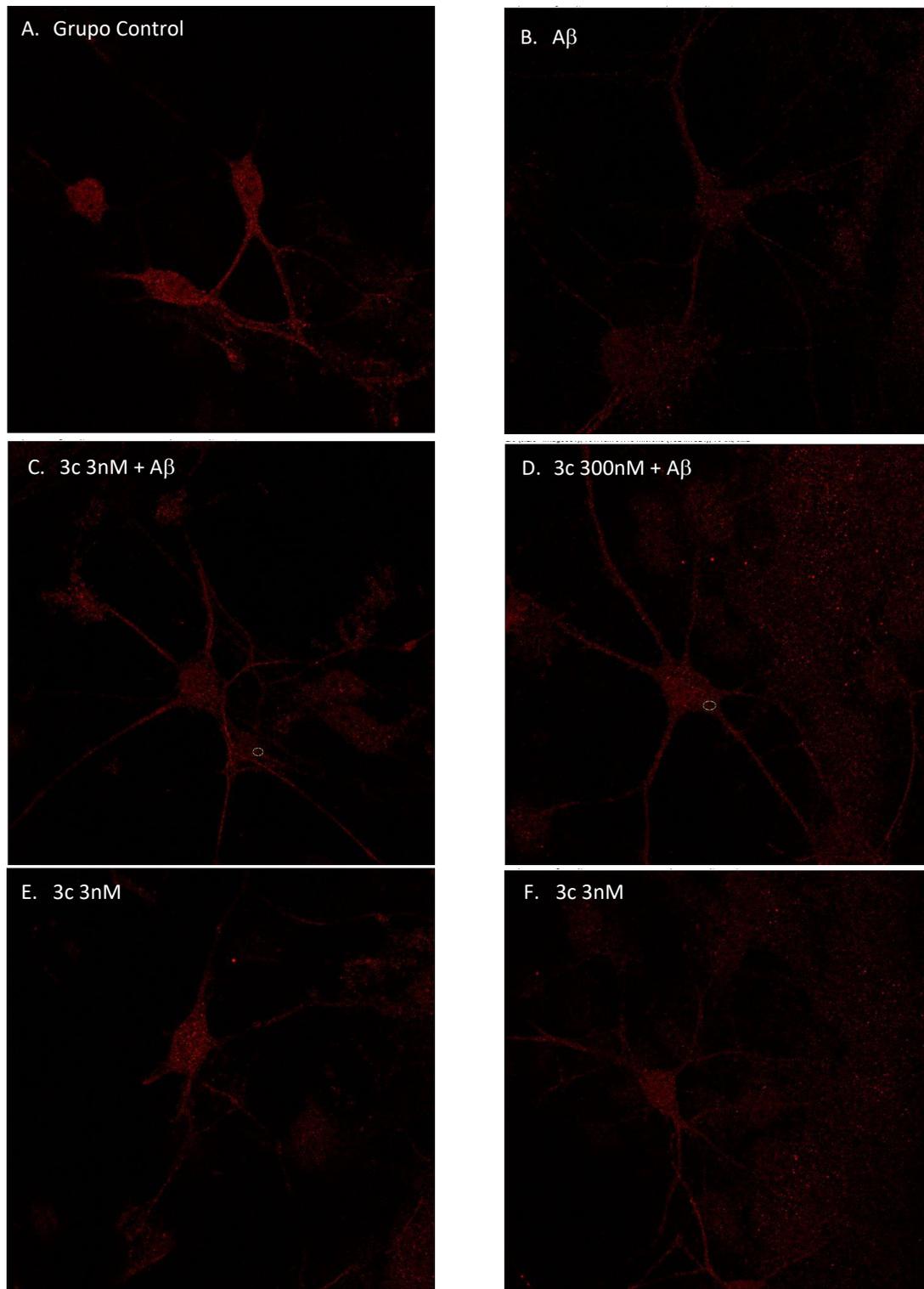


Figura 5.22. Cambios en los niveles de expresión de MFN1 (fluorescencia en rojo) producidos por **3c** y SO-Aβ en cultivo primario de neuronas de hipocampo de ratón. Imágenes representativas de microscopía confocal de neuronas de hipocampo (10 DIV) tratadas durante 24 h con OS-Aβ (0,5 μM), **3c** (3 y 300 nM) y SO-Aβ+**3c** 3 y 300 nM. También se muestra el grupo Control. (elaboración propia).

5.7.1. Discusión de los resultados obtenidos en neuroprotección

Los efectos neurotóxicos y eventualmente neurodegenerativos del péptido beta amiloide han sido ampliamente discutidos y reportados. Entre los múltiples mecanismos que median su toxicidad, se encuentra el estrés oxidativo, la difusión mitocondrial, alteraciones en la permeabilidad de la membrana, inflamación, disfunción sináptica, y excitotoxicidad mediada por su interacción con receptores para neurotransmisores.²⁴⁰⁻²⁴⁴ Pese a que en las últimas décadas se han realizado considerables esfuerzos para desarrollar estrategias terapéuticas efectivas contra la EA, el desarrollo de medicamentos anti-Alzheimer no ha gozado de un éxito clínico significativo. La farmacoterapia aprobada hasta ahora incluye mayoritariamente inhibidores de acetilcolinesterasa y el antagonista de N-metil-D-Aspartato, memantina.²⁴⁵ Igualmente, se ha investigado el potencial terapéutico de agentes antioxidantes, antiinflamatorios, y de diversos productos naturales y de origen nutracéutico.²⁴⁶⁻²⁴⁹

Pese a todos estos esfuerzos, el desarrollo de medicamentos anti-Alzheimer ha demostrado ser excepcionalmente difícil y muchos ensayos clínicos terminan simplemente con resultados decepcionantes. Una de las razones subyacentes tras esta dificultad, es la extraordinaria complejidad del proceso etiopatogénico global. Este proceso, que abarca muchísimas causas, desde susceptibilidad genética, hasta envejecimiento y factores medioambientales¹³ ha sido también asociado a siete hipótesis fundamentales; la cascada amiloidea mediante la toxicidad asociada al péptido beta amiloide, la hiperfosforilación de la proteína tau y la formación de ovillos o enredos neurofibrilares, el estrés oxidativo, la neuroinflamación mediada por la activación de la microglía y de los astrocitos, el impacto de metales pesados, trastornos metabólicos como la obesidad y la diabetes mellitus II, y alteraciones en la transmisión colinérgica (neurotransmisión mediada por ACh).²⁵⁰ La multitud y complejidad de factores asociados a la etiopatogenia de esta enfermedad, ha impuesto la necesidad de un enfoque moderno, más dinámico, abocado a la búsqueda de ligandos multi-target dirigidos (MTDLs). La naturaleza multifactorial de la enfermedad requiere de este diseño dinámico de ligandos con un amplio espectro de actividades, capaces de antagonizar a más de uno de los mecanismos neuropatológicos del Alzheimer.

Hasta ahora el enfoque mayoritariamente más atractivo ha sido la búsqueda de ligandos inhibidores de la acetilcolinesterasa (enzima responsable de la degradación de la ACh) que, además, exhiban otras actividades.²⁴⁵ Nada impide, sin embargo, el abordaje de otros enfoques o diseños en la

búsqueda de moléculas que puedan, de manera efectiva, inhibir varias de las vías de la patogénesis del Alzheimer. La naturaleza constituye un fabuloso laboratorio, una fuente virtualmente inagotable de productos con las más diversas actividades biológicas. Muy especialmente los metabolitos secundarios, desarrollados durante millones de años y conservados evolutivamente para la defensa y supervivencia de los organismos vivos, exhiben un amplio rasgo de funciones biológicas que representan un campo de investigación sumamente atractivo para la química biológica moderna.⁹⁴
²⁵¹ En este contexto, la cuantiosa evidencia existente respecto a las actividades terapéuticas de las chalconas, incluyendo, pero no limitada a, la actividad neuroprotectora¹¹⁶ llevó a los autores de este trabajo a investigar los efectos neuroprotectores que se podrían obtener a partir de un compuesto tipo chalcona con un núcleo de una molécula con actividad neuroprotectora ya demostrada. En la búsqueda de este objetivo se diseñó la síntesis de los 15 ligandos obtenidos a partir de un derivado de la fomannoxina, benzodihidrofurano con actividad neuroprotectora,¹⁰⁸ y diversas metil cetonas que permitiera la obtención de una batería de compuestos híbridos tipo chalcona. El objetivo principal de la investigación fue la obtención de al menos un ligando multiobjetivo capaz de inhibir al menos dos de las vías de la patogénesis del Alzheimer. Inicialmente se trazaron como objetivos primarios atacar la cascada amiloidea, ya fuera mediante la inhibición de la agregación de A β o, mediante el bloqueo de su unión específica, o inespecífica a las membranas celulares; atacar el fallo colinérgico (mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa o mediante la potenciación de algunos de los receptores para la acetilcolina), y el estrés oxidativo.

En este estudio, los resultados permitieron comprobar que de las 15 chalconas sintetizadas, 13 fueron capaces de preservar la viabilidad de las células para la mayor parte de las concentraciones probadas y, además, ocho exhibieron actividad citoprotectora en alguna medida contra la toxicidad del péptido beta amiloide. También se pudo demostrar que, de esas ocho moléculas, tres presentaron un interesante perfil de actividades ya que exhibieron, *in vitro* la capacidad de inhibir la cinética de agregación del péptido beta amiloide, proceso esencial para el desarrollo de su neurotoxicidad, así como la propiedad de potenciar la actividad de uno de los receptores nicotínicos más ubicuamente distribuidos en el cerebro y esencialmente asociados a la cognición, el aprendizaje y la memoria. Los resultados de esta investigación permitieron alcanzar el objetivo de incidir sobre dos de las vías de la patogénesis del Alzheimer: el fallo colinérgico y la neurotoxicidad asociada con la cascada amiloidea. Todos estos estudios permitieron destacar el perfil biológico del compuesto **3c**, que resultó ser una molécula particularmente bioactiva capaz de contrarrestar la neurotoxicidad del

péptido beta amiloide en neuronas de hipocampo embrionario de ratón. No sólo eso, sino que también incrementó los niveles de proteína presináptica en las neuronas expuestas al compuesto, e igualmente, la viabilidad en células PC-12 al ser expuestas solamente a la molécula. A la concentración de 3 nM hay un incremento significativo de la viabilidad celular, del valor 100 % considerado como control a un 133 %. Es notable que esta misma concentración (3 nM), exhibió también importantes efectos de citoprotección y, muy especialmente, de neuroprotección ya que fue capaz de incrementar por sí misma los niveles de expresión de la proteína sináptica SV2 en neuronas de hipocampo embrionario. En este mismo contexto, fue capaz de preservar a las neuronas del daño mitocondrial inducido por A β , conocido evento neuropatológico típico de la toxicidad asociada a este compuesto. El amplio perfil de actividad de este tipo de moléculas (chalconas), es mayormente atribuido a la naturaleza electrofílica del sistema carbonílico α , β -insaturado. Su estructura les permite formar enlaces irreversibles con moléculas biológicas con el consecuente impacto en la funcionalidad celular.²⁵² Su condición de aceptor de Michael las hace generalmente muy bioactivas ya que pueden involucrarse en la regulación de múltiples vías de señalización celular. Pueden, por ejemplo, formar enlaces covalentes con los grupos sulfidrilos del aminoácido cisteína u otros tioles para obtener el aducto de Michael y constituyen, como ya hemos visto, atractivos puntos de partida para la investigación biológica.¹²¹

Es evidente que sustituyentes que afecten la electrofilia del sistema influirán en la reactividad biológica de este tipo de compuestos. En este caso, debido a inevitables limitaciones de tiempo, solamente se pudo explorar el patrón de sustitución halogenada, debido fundamentalmente al vasto potencial que poseen los halógenos en el campo de la química medicinal.¹⁴⁰ Se pudo comprobar que una estructura tipo chalcona halogenada (mono fluorada) protegió no sólo a células PC-12, de la toxicidad asociada al péptido beta amiloide sino que además, mostró una actividad neuroprotectora significativa en la red neuronal de hipocampo embrionario contra la toxicidad de los oligómeros de A β mediada por la preservación de la función mitocondrial y, muy especialmente, por el incremento significativo en los niveles de expresión de la proteína sináptica SV-2. Ambos fenómenos representan un hito significativo desde el punto de vista de la etiopatología del Alzheimer ya que sabemos que tanto el daño mitocondrial como la pérdida de las sinapsis constituyen rasgos distintivos de la EA.^{47, 253} La relevancia de estos hallazgos se sustenta en que por una parte, han permitido la obtención de compuestos con un interesante perfil de actividades biológicas mediante una metodología sintética sencilla, versátil y económica, susceptible de sufrir

modificaciones químicas con relativa facilidad que permitan optimizar su espacio químico de neuroprotección y, como resultado, se cuenta ya con una molécula cuyo potencial como ligando “multitarget” dirigido con efectos neuroprotectores puede ser más ampliamente estudiado con vistas a su potencial inserción en la práctica clínica. Como proyección se impone la realización de estudios más detallados respecto a la relación estructura-actividad de la chalcona **3c**. La identificación del grupo (o grupos farmacóforos exactos) arrojaría luz sobre esta relación y, a su vez, podría permitir la optimización de la estructura de los restantes compuestos obtenidos, enfocada a ampliar su espacio químico neuroprotector.

6. CONCLUSIONES

- ❖ La utilización de una técnica simple, económica y versátil permitió la **síntesis exitosa de una batería de 15 compuestos con la estructura base de una chalcona**, a partir de un derivado del benzodihidrofurano fomannoxina con propiedades neuroprotectoras. Las limitaciones de tiempo solamente permitieron enfocar el estudio en la inserción de halógenos; sustitución que fue priorizada debido al uso extendido de la sustitución halogenada en el desarrollo de medicamentos y las ventajas asociadas a su uso. Los compuestos fueron obtenidos con un **rendimiento de bueno a excelente**, pudiéndose explorar las potenciales propiedades de los diversos patrones de sustitución halogenada para ampliar el espacio químico neuroprotector de las chalconas obtenidas a partir del derivado de fomannoxina. La caracterización química y espectroscópica realizada permitió la confirmación estructural para todos los compuestos obtenidos.
- ❖ Se encontró que, de los 15 compuestos sintetizados, **ocho exhibieron la capacidad de citoprotección**; fueron capaces de proteger a células de la línea PC-12 del estímulo tóxico que constituye la exposición al péptido beta amiloide. De estos compuestos destacaron tres, ya que mostraron diversos mecanismos para ejercer esta citoprotección. Los compuestos **3c** y **3d** exhibieron la capacidad de inhibir el proceso de agregación del péptido beta amiloide, que es el mecanismo fundamental mediante el que este péptido adquiere su toxicidad. La inhibición de la agregación del péptido por el compuesto **3c** durante todo el experimento, incluida la fase de nucleación primaria, resulta primordial para el efecto de citoprotección ya que impide la formación de los oligómeros solubles, cuya toxicidad para las células nerviosas ha sido establecida. De la evaluación biológica se pudo obtener también que tres compuestos ejercieron un efecto de modulación alostérica positiva (PAM) sobre los receptores humanos nicotínicos $\alpha 7$. Entre estos compuestos se encontró una vez más **3c**, con un **efecto dual de citoprotección** mediado por **la inhibición de agregación del péptido beta amiloide** y por **el efecto PAM sobre receptores $\alpha 7$** . Los estudios de acoplamiento molecular realizados permitieron arrojar luz sobre las interacciones establecidas entre los ligandos y las dianas moleculares, lo cual nos permitió una mejor comprensión sobre la relación estructura actividad de los compuestos obtenidos. Los estudios de acoplamiento molecular realizados entre los ligandos obtenidos y las diferentes

conformaciones de los monómeros del péptido beta amiloide permitieron entender que la interacción fundamental fue el enlace de hidrógeno, establecido fundamentalmente entre los grupos carbonilo y los hidrógenos de los aminoácidos específicos de los sitios activos. Igualmente, el cálculo de los puntajes de acoplamiento y de la variación de energía libre de Gibbs asociada a las interacciones, permitió establecer que la unión del compuesto **3c** a ambos conformeros de los monómeros de A β se encontraba más termodinámicamente favorecida con el consecuente impacto en el proceso de autoagregación del péptido. Por otra parte, los estudios de acoplamiento realizados para los resultados obtenidos en el ensayo de determinación del efecto PAM permitieron destacar como más relevante la interacción σ - π establecida entre los ligandos y el sitio de modulación alostérica del receptor α 7. La naturaleza más hidrofóbica de uno de los ligandos iodados favoreció notablemente esta interacción y, además, permitió las interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos LEU247, LEU244 y MET301, del sitio alostérico, contribuyendo al incremento de la actividad potenciadora.

- ❖ Los ensayos preliminares evidenciaron al compuesto **3c** como el ligando más biológicamente activo, por lo que la conclusión de la caracterización biológica fue la determinación de su actividad neuroprotectora. Ésta se determinó en neuronas de hipocampo embrionario de ratón, encontrándose que el compuesto preservó la viabilidad de las neuronas expuestas a oligómeros solubles de A β , y, más importante aún, **incrementó los niveles de proteína presináptica SV2** de manera que no sólo preservó la integridad de la red neuronal ante el estímulo neurotóxico de la exposición a A β , sino que, además, **potenció su conectividad sináptica**. El compuesto **previno también el daño mitocondrial asociado a la exposición a A β** impidiendo la disminución abrupta en los niveles de expresión de la proteína clave para la fusión mitocondrial mitofusina 1. Estos resultados armonizan con los hallazgos obtenidos en la caracterización biológica preliminar ya que el ligando **3c** además de inhibir la agregación de A β , también es capaz de potenciar alostéricamente la actividad de los receptores nicotínicos α 7, y ambos mecanismos tributan al efecto de neuroprotección.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Duong, S.; Patel, T.; Chang, F., Dementia: What pharmacists need to know. *Can Pharm J (Ott)* **2017**, *150* (2), 118-129.
2. Organization, W. H. Dementia. Overview and prevalence.
3. Chertkow, H.; Feldman, H. H.; Jacova, C.; Massoud, F., Definitions of dementia and predementia states in Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment: consensus from the Canadian conference on diagnosis of dementia. *Alzheimers Res Ther* **2013**, *5* (Suppl 1), S2.
4. Sheehan, B., Assessment scales in dementia. *Ther Adv Neurol Disord* **2012**, *5* (6), 349-58.
5. Hildreth, K. L.; Church, S., Evaluation and management of the elderly patient presenting with cognitive complaints. *Med Clin North Am* **2015**, *99* (2), 311-35.
6. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5™, 5th ed.* American Psychiatric Publishing, Inc.: Arlington, VA, US, 2013; p xlv, 947-xliv, 947.
7. Ayodele, T.; Rogaeva, E.; Kurup, J. T.; Beecham, G.; Reitz, C., Early-Onset Alzheimer's Disease: What Is Missing in Research? *Curr Neurol Neurosci Rep* **2021**, *21* (2), 4.
8. Alberdi, A.; Aztiria, A.; Basarab, A., On the early diagnosis of Alzheimer's Disease from multimodal signals: A survey. *Artif Intell Med* **2016**, *71*, 1-29.
9. Lambert, M. A.; Bickel, H.; Prince, M.; Fratiglioni, L.; Von Strauss, E.; Frydecka, D.; Kiejna, A.; Georges, J.; Reynish, E. L., Estimating the burden of early onset dementia; systematic review of disease prevalence. *Eur J Neurol* **2014**, *21* (4), 563-9.
10. Pardo-Moreno, T.; González-Acedo, A.; Rivas-Domínguez, A.; García-Morales, V.; García-Cozar, F. J.; Ramos-Rodríguez, J. J.; Melguizo-Rodríguez, L., Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease: Current Treatments and New Perspectives. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (6).
11. Alzheimer, A.; Stelzmann, R. A.; Schnitzlein, H. N.; Murtagh, F. R., An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* **1995**, *8* (6), 429-31.
12. Wang, W.; Zhao, F.; Ma, X.; Perry, G.; Zhu, X., Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances. *Molecular Neurodegeneration* **2020**, *15* (1), 30.
13. Hardy, J., Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **1997**, *20* (4), 154-9.
14. Adani, G.; Filippini, T.; Garuti, C.; Malavolti, M.; Vinceti, G.; Zamboni, G.; Tondelli, M.; Galli, C.; Costa, M.; Vinceti, M.; Chiari, A., Environmental Risk Factors for Early-Onset Alzheimer's Dementia and Frontotemporal Dementia: A Case-Control Study in Northern Italy. *Int J Environ Res Public Health* **2020**, *17* (21).
15. Arnold, S. E.; Hyman, B. T.; Flory, J.; Damasio, A. R.; Van Hoesen, G. W., The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* **1991**, *1* (1), 103-16.
16. Tanokashira, D.; Mamada, N.; Yamamoto, F.; Taniguchi, K.; Tamaoka, A.; Lakshmana, M. K.; Araki, W., The neurotoxicity of amyloid β -protein oligomers is reversible in a primary neuron model. *Molecular Brain* **2017**, *10* (1), 4.
17. Tolar, M.; Hey, J.; Power, A.; Abushakra, S., Neurotoxic Soluble Amyloid Oligomers Drive Alzheimer's Pathogenesis and Represent a Clinically Validated Target for Slowing Disease Progression. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (12).
18. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **2023**, *19* (4), 1598-1695.
19. Champion, D.; Dumanchin, C.; Hannequin, D.; Dubois, B.; Belliard, S.; Puel, M.; Thomas-Anterion, C.; Michon, A.; Martin, C.; Charbonnier, F.; Raux, G.; Camuzat, A.; Penet, C.; Mesnage, V.; Martinez, M.; Clerget-Darpoux, F.; Brice, A.; Frebourg, T., Early-onset autosomal dominant

Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* **1999**, *65* (3), 664-70.

20. Miklossy, J.; Taddei, K.; Suva, D.; Verdile, G.; Fonte, J.; Fisher, C.; Gnjec, A.; Ghika, J.; Suard, F.; Mehta, P. D.; McLean, C. A.; Masters, C. L.; Brooks, W. S.; Martins, R. N., Two novel presenilin-1 mutations (Y256S and Q222H) are associated with early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **2003**, *24* (5), 655-62.

21. Gralle, M.; Ferreira, S. T., Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol* **2007**, *82* (1), 11-32.

22. Chen, G.-f.; Xu, T.-h.; Yan, Y.; Zhou, Y.-r.; Jiang, Y.; Melcher, K.; Xu, H. E., Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica* **2017**, *38* (9), 1205-1235.

23. Mendez, M. F., Early-Onset Alzheimer Disease. *Neurol Clin* **2017**, *35* (2), 263-281.

24. Dai, M. H.; Zheng, H.; Zeng, L. D.; Zhang, Y., The genes associated with early-onset Alzheimer's disease. *Oncotarget* **2018**, *9* (19), 15132-15143.

25. Shukla, V.; Skuntz, S.; Pant, H. C., Deregulated Cdk5 activity is involved in inducing Alzheimer's disease. *Arch Med Res* **2012**, *43* (8), 655-62.

26. Nagy, Z., The dysregulation of the cell cycle and the diagnosis of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2007**, *1772* (4), 402-408.

27. Reinhardt, L.; Kordes, S.; Reinhardt, P.; Glatza, M.; Baumann, M.; Drexler, H. C. A.; Menninger, S.; Zischinsky, G.; Eickhoff, J.; Fröb, C.; Bhattarai, P.; Arulmozhivarman, G.; Marrone, L.; Janosch, A.; Adachi, K.; Stehling, M.; Anderson, E. N.; Abo-Rady, M.; Bickle, M.; Pandey, U. B.; Reimer, M. M.; Kizil, C.; Schöler, H. R.; Nussbaumer, P.; Klebl, B.; Sternecker, J. L., Dual Inhibition of GSK3 β and CDK5 Protects the Cytoskeleton of Neurons from Neuroinflammatory-Mediated Degeneration In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Reports* **2019**, *12* (3), 502-517.

28. Kanungo, J.; Zheng, Y. L.; Amin, N. D.; Pant, H. C., Targeting Cdk5 activity in neuronal degeneration and regeneration. *Cell Mol Neurobiol* **2009**, *29* (8), 1073-80.

29. Ionescu-Tucker, A.; Cotman, C. W., Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **2021**, *107*, 86-95.

30. Butterfield, D. A.; Halliwell, B., Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience* **2019**, *20* (3), 148-160.

31. Tamagno, E.; Guglielmotto, M.; Vasciaveo, V.; Tabaton, M. Oxidative Stress and Beta Amyloid in Alzheimer's Disease. Which Comes First: The Chicken or the Egg? *Antioxidants* [Online], **2021**.

32. Buccellato, F. R.; D'Anca, M.; Fenoglio, C.; Scarpini, E.; Galimberti, D., Role of Oxidative Damage in Alzheimer's Disease and Neurodegeneration: From Pathogenic Mechanisms to Biomarker Discovery. *Antioxidants (Basel)* **2021**, *10* (9).

33. Cassidy, L.; Fernandez, F.; Johnson, J. B.; Naiker, M.; Owoola, A. G.; Broszczak, D. A., Oxidative stress in alzheimer's disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics. *Complementary Therapies in Medicine* **2020**, *49*, 102294.

34. Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N., Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* **2010**, *4* (8), 118-26.

35. Al-Abd, N. M.; Mohamed Nor, Z.; Mansor, M.; Azhar, F.; Hasan, M. S.; Kassim, M., Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of Melaleuca cajuputi extract. *BMC Complement Altern Med* **2015**, *15*, 385.

36. Mark, R. J.; Lovell, M. A.; Markesbery, W. R.; Uchida, K.; Mattson, M. P., A Role for 4-Hydroxynonenal, an Aldehydic Product of Lipid Peroxidation, in Disruption of Ion Homeostasis and Neuronal Death Induced by Amyloid β -Peptide. *Journal of Neurochemistry* **1997**, *68* (1), 255-264.

37. Bradley-Whitman, M. A.; Lovell, M. A., Biomarkers of lipid peroxidation in Alzheimer disease (AD): an update. *Archives of Toxicology* **2015**, *89* (7), 1035-1044.
38. Keller, J. N.; Pang, Z.; Geddes, J. W.; Begley, J. G.; Germeyer, A.; Waeg, G.; Mattson, M. P., Impairment of Glucose and Glutamate Transport and Induction of Mitochondrial Oxidative Stress and Dysfunction in Synaptosomes by Amyloid β -Peptide: Role of the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal. *Journal of Neurochemistry* **1997**, *69* (1), 273-284.
39. Mattson, M. P.; Chan, S. L., Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium* **2003**, *34* (4), 385-397.
40. Tamagno, E.; Robino, G.; Obbili, A.; Bardini, P.; Aragno, M.; Parola, M.; Danni, O., H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid β -induced neuronal apoptosis by activating jnks and p38mapk. *Experimental Neurology* **2003**, *180* (2), 144-155.
41. Navarro, V.; Sanchez-Mejias, E.; Jimenez, S.; Muñoz-Castro, C.; Sanchez-Varo, R.; Davila, J. C.; Vizuete, M.; Gutierrez, A.; Vitorica, J., Microglia in Alzheimer's Disease: Activated, Dysfunctional or Degenerative. *Frontiers in Aging Neuroscience* **2018**, *10*.
42. Jiang, H.; Burdick, D.; Glabe, C. G.; Cotman, C. W.; Tenner, A. J., beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain. *J Immunol* **1994**, *152* (10), 5050-9.
43. Rodríguez, J. J.; Witton, J.; Olabarria, M.; Noristani, H. N.; Verkhatsky, A., Increase in the density of resting microglia precedes neuritic plaque formation and microglial activation in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis* **2010**, *1* (1), e1.
44. Zhang, G.; Wang, Z.; Hu, H.; Zhao, M.; Sun, L., Microglia in Alzheimer's Disease: A Target for Therapeutic Intervention. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2021**, *15*.
45. Leng, F.; Edison, P., Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology* **2021**, *17* (3), 157-172.
46. Reiss, A. B.; Ahmed, S.; Dayaramani, C.; Glass, A. D.; Gomolin, I. H.; Pinkhasov, A.; Stecker, M. M.; Wisniewski, T.; De Leon, J., The role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: A potential pathway to treatment. *Exp Gerontol* **2022**, *164*, 111828.
47. Bell, S. M.; Barnes, K.; De Marco, M.; Shaw, P. J.; Ferraiuolo, L.; Blackburn, D. J.; Venneri, A.; Mortiboys, H., Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease: A Biomarker of the Future? *Biomedicines* **2021**, *9* (1).
48. Wang, W.; Zhao, F.; Ma, X.; Perry, G.; Zhu, X., Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances. *Mol Neurodegener* **2020**, *15* (1), 30.
49. Zhang, L.; Trushin, S.; Christensen, T. A.; Bachmeier, B. V.; Gateno, B.; Schroeder, A.; Yao, J.; Itoh, K.; Sesaki, H.; Poon, W. W.; Gylys, K. H.; Patterson, E. R.; Parisi, J. E.; Diaz Brinton, R.; Salisbury, J. L.; Trushina, E., Altered brain energetics induces mitochondrial fission arrest in Alzheimer's Disease. *Scientific Reports* **2016**, *6* (1), 18725.
50. Berman, S. B.; Chen, Y.-b.; Qi, B.; McCaffery, J. M.; Rucker, E. B., III; Goebbels, S.; Nave, K.-A.; Arnold, B. A.; Jonas, E. A.; Pineda, F. J.; Hardwick, J. M., Bcl-xL increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons. *Journal of Cell Biology* **2009**, *184* (5), 707-719.
51. Boldogh, I. R.; Pon, L. A., Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol* **2007**, *17* (10), 502-10.
52. Wang, X.; Su, B.; Lee, H. G.; Li, X.; Perry, G.; Smith, M. A.; Zhu, X., Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **2009**, *29* (28), 9090-103.
53. Manczak, M.; Calkins, M. J.; Reddy, P. H., Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Human Molecular Genetics* **2011**, *20* (13), 2495-2509.
54. Eleftheriadis, T.; Pissas, G.; Liakopoulos, V.; Stefanidis, I., Cytochrome c as a Potentially Clinical Useful Marker of Mitochondrial and Cellular Damage. *Frontiers in Immunology* **2016**, *7*.

55. Hampel, H.; Mesulam, M. M.; Cuello, A. C.; Farlow, M. R.; Giacobini, E.; Grossberg, G. T.; Khachaturian, A. S.; Vergallo, A.; Cavedo, E.; Snyder, P. J.; Khachaturian, Z. S., The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* **2018**, *141* (7), 1917-1933.
56. Stanciu, G. D.; Luca, A.; Rusu, R. N.; Bild, V.; Beschea Chiriac, S. I.; Solcan, C.; Bild, W.; Ababei, D. C. Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement *Biomolecules* [Online], 2020.
57. Bekdash, R. A. The Cholinergic System, the Adrenergic System and the Neuropathology of Alzheimer's Disease *International Journal of Molecular Sciences* [Online], 2021.
58. Drachman, D. A.; Leavitt, J., Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol* **1974**, *30* (2), 113-21.
59. Summers, W. K.; Majovski, L. V.; Marsh, G. M.; Tachiki, K.; Kling, A., Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *N Engl J Med* **1986**, *315* (20), 1241-5.
60. Marucci, G.; Buccioni, M.; Ben, D. D.; Lambertucci, C.; Volpini, R.; Amenta, F., Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **2021**, *190*, 108352.
61. Santos, T. C. d.; Gomes, T. M.; Pinto, B. A. S.; Camara, A. L.; Paes, A. M. d. A., Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, *9*.
62. Revi, M., Alzheimer's Disease Therapeutic Approaches. *Adv Exp Med Biol* **2020**, *1195*, 105-116.
63. Lendvai, B.; Kassai, F.; Szájli, A.; Némethy, Z., $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition. *Brain Res Bull* **2013**, *93*, 86-96.
64. Uteshev, V. V., The therapeutic promise of positive allosteric modulation of nicotinic receptors. *Eur J Pharmacol* **2014**, *727*, 181-5.
65. Lee, C. H.; Hung, S. Y., Physiologic Functions and Therapeutic Applications of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor in Brain Disorders. *Pharmaceutics* **2022**, *15* (1).
66. Changeux, J. P., The concept of allosteric modulation: an overview. *Drug Discov Today Technol* **2013**, *10* (2), e223-8.
67. Abdel-Magid, A. F., Allosteric modulators: an emerging concept in drug discovery. *ACS Med Chem Lett* **2015**, *6* (2), 104-7.
68. Bouzat, C.; Lasala, M.; Nielsen, B. E.; Corradi, J.; Esandi, M. D. C., Molecular function of $\alpha 7$ nicotinic receptors as drug targets. *J Physiol* **2018**, *596* (10), 1847-1861.
69. Chatzidaki, A.; Millar, N. S., Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* **2015**, *97* (4), 408-417.
70. Yang, T.; Xiao, T.; Sun, Q.; Wang, K., The current agonists and positive allosteric modulators of $\alpha 7$ nAChR for CNS indications in clinical trials. *Acta Pharm Sin B* **2017**, *7* (6), 611-622.
71. Grønlien, J. H.; Håkerud, M.; Ween, H.; Thorin-Hagene, K.; Briggs, C. A.; Gopalakrishnan, M.; Malysz, J., Distinct profiles of alpha7 nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Mol Pharmacol* **2007**, *72* (3), 715-24.
72. Dineley, K. T.; Pandya, A. A.; Yakel, J. L., Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* **2015**, *36* (2), 96-108.
73. Knopman, D. S.; Jones, D. T.; Greicius, M. D., Failure to demonstrate efficacy of aducanumab: An analysis of the EMERGE and ENGAGE trials as reported by Biogen, December 2019. *Alzheimers Dement* **2021**, *17* (4), 696-701.
74. Selkoe, D. J., Alzheimer disease and aducanumab: adjusting our approach. *Nat Rev Neurol* **2019**, *15* (7), 365-366.
75. Koola, M. M., Galantamine-Memantine combination in the treatment of Alzheimer's disease and beyond. *Psychiatry Res* **2020**, *293*, 113409.

76. Hassan, M.; Raza, H.; Abbasi, M. A.; Moustafa, A. A.; Seo, S. Y., The exploration of novel Alzheimer's therapeutic agents from the pool of FDA approved medicines using drug repositioning, enzyme inhibition and kinetic mechanism approaches. *Biomed Pharmacother* **2019**, *109*, 2513-2526.
77. Khoury, R.; Patel, K.; Gold, J.; Hinds, S.; Grossberg, G. T., Recent Progress in the Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease. *Drugs Aging* **2017**, *34* (11), 811-820.
78. Kobayashi, H.; Ohnishi, T.; Nakagawa, R.; Yoshizawa, K., The comparative efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a Bayesian network meta-analysis. *Int J Geriatr Psychiatry* **2016**, *31* (8), 892-904.
79. Tsoi, K. K.; Chan, J. Y.; Chan, F. C.; Hirai, H. W.; Kwok, T. C.; Wong, S. Y., Monotherapy Is Good Enough for Patients with Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease: A Network Meta-analysis of 76 Randomized Controlled Trials. *Clin Pharmacol Ther* **2019**, *105* (1), 121-130.
80. Fan, F.; Liu, H.; Shi, X.; Ai, Y.; Liu, Q.; Cheng, Y., The Efficacy and Safety of Alzheimer's Disease Therapies: An Updated Umbrella Review. *J Alzheimers Dis* **2022**, *85* (3), 1195-1204.
81. Foroutan, N.; Hopkins, R. B.; Tarride, J. E.; Florez, I. D.; Levine, M., Safety and efficacy of active and passive immunotherapy in mild-to-moderate Alzheimer's disease: A systematic review and network meta-analysis. *Clin Invest Med* **2019**, *42* (1), E53-e65.
82. Jiang, J.; Jiang, H., Efficacy and adverse effects of memantine treatment for Alzheimer's disease from randomized controlled trials. *Neurol Sci* **2015**, *36* (9), 1633-41.
83. Kishi, T.; Matsunaga, S.; Oya, K.; Nomura, I.; Ikuta, T.; Iwata, N., Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J Alzheimers Dis* **2017**, *60* (2), 401-425.
84. McShane, R.; Westby, M. J.; Roberts, E.; Minakaran, N.; Schneider, L.; Farrimond, L. E.; Maayan, N.; Ware, J.; Debarros, J., Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev* **2019**, *3* (3), Cd003154.
85. Wiatrak, B.; Kubis-Kubiak, A.; Piwowar, A.; Barg, E., PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells* **2020**, *9* (4).
86. Xie, D.; Deng, T.; Zhai, Z.; Sun, T.; Xu, Y., The cellular model for Alzheimer's disease research: PC12 cells. *Front Mol Neurosci* **2022**, *15*, 1016559.
87. de Los Rios, C.; Cano-Abad, M. F.; Villarroya, M.; López, M. G., Chromaffin cells as a model to evaluate mechanisms of cell death and neuroprotective compounds. *Pflugers Arch* **2018**, *470* (1), 187-198.
88. Matsuzaki, Y.; Maruta, R.; Takaki, K.; Kotani, E.; Kato, Y.; Yoshimura, R.; Endo, Y.; Whitty, C.; Pernstich, C.; Gandhi, R.; Jones, M.; Mori, H., Sustained Neurotrophin Release from Protein Nanoparticles Mediated by Matrix Metalloproteinases Induces the Alignment and Differentiation of Nerve Cells. *Biomolecules* **2019**, *9* (10).
89. Zeng, Z.; Xu, J.; Zheng, W., Artemisinin protects PC12 cells against β -amyloid-induced apoptosis through activation of the ERK1/2 signaling pathway. *Redox Biol* **2017**, *12*, 625-633.
90. Yuan, H.; Ma, Q.; Ye, L.; Piao, G., The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules* **2016**, *21* (5).
91. Petrovska, B. B., Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev* **2012**, *6* (11), 1-5.
92. Buchanan, B. B., Gruissem, W. and Jones, R.L. Biochemistry and molecular biology of plants. , *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiology: Rockville, Maryland., 2000.
93. Demain, A. L.; Fang, A., The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2000**, *69*, 1-39.
94. Brakhage, A. A.; Schroeckh, V., Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet Biol* **2011**, *48* (1), 15-22.

95. Qin, L.; Vo, D.-D.; Nakhai, A.; Andersson, C. D.; Elofsson, M., Diversity-Oriented Synthesis of Libraries Based on Benzofuran and 2,3-Dihydrobenzofuran Scaffolds. *ACS Combinatorial Science* **2017**, *19* (6), 370-376.
96. Yeung, K.-S., Furans and benzofurans. *Metalation of azoles and related five-membered ring heterocycles* **2012**, 47-76.
97. Kamal, M.; Shakya, A.; Jawaid, T., Benzofurans: A new profile of biological activities. *International Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences* **2011**, *1*, 1-15.
98. Verma, A.; Pandeya, S. N.; Sinha, S., Synthesis and biological activities of furan derivatives. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* **2011**, *2*, 1110-1116.
99. Deshpande, R.; M, B.; S, P.; S.M, S.; S, A.; Yalagatti, M., Microwave-Assisted Synthesis and Pharmacological Activity of Pyrazolyl Benzofuran Deravatives. *American Journal of Chemistry* **2012**, *2*, 115-120.
100. Montanari, S.; Mahmoud, A. M.; Pruccoli, L.; Rabbito, A.; Naldi, M.; Petralla, S.; Moraleda, I.; Bartolini, M.; Monti, B.; Iriepa, I.; Belluti, F.; Gobbi, S.; Di Marzo, V.; Bisi, A.; Tarozzi, A.; Ligresti, A.; Rampa, A., Discovery of novel benzofuran-based compounds with neuroprotective and immunomodulatory properties for Alzheimer's disease treatment. *Eur J Med Chem* **2019**, *178*, 243-258.
101. Wang, Y.-N.; Liu, M.-F.; Hou, W.-Z.; Xu, R.-M.; Gao, J.; Lu, A.-Q.; Xie, M.-P.; Li, L.; Zhang, J.-J.; Peng, Y.; Ma, L.-L.; Wang, X.-L.; Shi, J.-G.; Wang, S.-J., Bioactive Benzofuran Derivatives from Cortex Mori Radicis, and Their Neuroprotective and Analgesic Activities Mediated by mGluR1. *Molecules* **2017**, *22* (2), 236.
102. Howlett, D. R.; Perry, A. E.; Godfrey, F.; Swatton, J. E.; Jennings, K. H.; Spitzfaden, C.; Wadsworth, H.; Wood, S. J.; Markwell, R. E., Inhibition of fibril formation in beta-amyloid peptide by a novel series of benzofurans. *Biochem J* **1999**, *340* (Pt 1) (Pt 1), 283-9.
103. Rizzo, S.; Tarozzi, A.; Bartolini, M.; Da Costa, G.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Belluti, F.; Ligresti, A.; Allarà, M.; Monti, J. P.; Andrisano, V.; Di Marzo, V.; Hrelia, P.; Rampa, A., 2-Arylbzofuran-based molecules as multipotent Alzheimer's disease modifying agents. *Eur J Med Chem* **2012**, *58*, 519-32.
104. Sashidhara, K. V.; Modukuri, R. K.; Jadiya, P.; Dodda, R. P.; Kumar, M.; Sridhar, B.; Kumar, V.; Haque, R.; Siddiqi, M. I.; Nazir, A., Benzofuran-chalcone hybrids as potential multifunctional agents against Alzheimer's disease: synthesis and in vivo studies with transgenic Caenorhabditis elegans. *ChemMedChem* **2014**, *9* (12), 2671-84.
105. Rizzo, S.; Rivière, C.; Piazzì, L.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Morroni, F.; Tarozzi, A.; Monti, J. P.; Rampa, A., Benzofuran-based hybrid compounds for the inhibition of cholinesterase activity, beta amyloid aggregation, and abeta neurotoxicity. *J Med Chem* **2008**, *51* (10), 2883-6.
106. Masahiro, O.; Mei-Ping, K.; Catherine, H.; Hank, F. K., Benzofuran derivatives as A β -aggregate-specific imaging agents for Alzheimer's disease. *Nuclear Medicine and Biology* **2002**, *29* (6), 633-642.
107. Ono, M.; Kawashima, H.; Nonaka, A.; Kawai, T.; Haratake, M.; Mori, H.; Kung, M.-P.; Kung, H. F.; Saji, H.; Nakayama, M., Novel Benzofuran Derivatives for PET Imaging of β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Brains. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49* (9), 2725-2730.
108. González-Ramírez, M.; Gavilán, J.; Silva-Grecchi, T.; Cajas-Madriaga, D.; Triviño, S.; Becerra, J.; Saez-Orellana, F.; Pérez, C.; Fuentealba, J., A Natural Benzofuran from the Patagonic Aleurodiscus vitellinus Fungus has Potent Neuroprotective Properties on a Cellular Model of Amyloid- β Peptide Toxicity. *J Alzheimers Dis* **2018**, *61* (4), 1463-1475.
109. David, A.; Gillian, G.; Ian, K. M.; Susan, M.; Stuart, T.; Lance, J. T., 3-p-toluoyl-2- 4' -(3-diethylaminopropoxy)-phenyl -benzofuran and 2- 4' -(3-diethylaminopropoxy)-phenyl -benzofuran

- do not act as surfactants or micelles when inhibiting the aggregation of β -amyloid peptide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11* (2), 255-257.
110. Elkanzi, N. A. A.; Hrichi, H.; Alolayan, R. A.; Derafa, W.; Zahou, F. M.; Bakr, R. B., Synthesis of Chalcones Derivatives and Their Biological Activities: A Review. *ACS Omega* **2022**, *7* (32), 27769-27786.
111. Marotta, L.; Rossi, S.; Ibba, R.; Brogi, S.; Calderone, V.; Butini, S.; Campiani, G.; Gemma, S., The green chemistry of chalcones: Valuable sources of privileged core structures for drug discovery. *Frontiers in Chemistry* **2022**, *10*.
112. Peng, Y. J.; Lu, J. W.; Lee, C. H.; Lee, H. S.; Chu, Y. H.; Ho, Y. J.; Liu, F. C.; Huang, C. J.; Wu, C. C.; Wang, C. C., Cardamonin Attenuates Inflammation and Oxidative Stress in Interleukin-1 β -Stimulated Osteoarthritis Chondrocyte through the Nrf2 Pathway. *Antioxidants (Basel)* **2021**, *10* (6).
113. Kim, D. W.; Curtis-Long, M. J.; Yuk, H. J.; Wang, Y.; Song, Y. H.; Jeong, S. H.; Park, K. H., Quantitative analysis of phenolic metabolites from different parts of *Angelica keiskei* by HPLC–ESI MS/MS and their xanthine oxidase inhibition. *Food Chemistry* **2014**, *153*, 20-27.
114. Yamamoto, T.; Yoshimura, M.; Yamaguchi, F.; Kouchi, T.; Tsuji, R.; Saito, M.; Obata, A.; Kikuchi, M., Anti-allergic activity of naringenin chalcone from a tomato skin extract. *Biosci Biotechnol Biochem* **2004**, *68* (8), 1706-11.
115. Aoki, N.; Muko, M.; Ohta, E.; Ohta, S., C-geranylated chalcones from the stems of *Angelica keiskei* with superoxide-scavenging activity. *J Nat Prod* **2008**, *71* (7), 1308-10.
116. Jeon, K. H.; Lee, E.; Jun, K. Y.; Eom, J. E.; Kwak, S. Y.; Na, Y.; Kwon, Y., Neuroprotective effect of synthetic chalcone derivatives as competitive dual inhibitors against μ -calpain and cathepsin B through the downregulation of tau phosphorylation and insoluble A β peptide formation. *Eur J Med Chem* **2016**, *121*, 433-444.
117. Valipour, M., Recruitment of chalcone's potential in drug discovery of anti-SARS-CoV-2 agents. *Phytother Res* **2022**, *36* (12), 4477-4490.
118. Aboukhatwa, S.; Sidhom, P.; Angeli, A.; Supuran, C.; Tawfik, H., Terminators or Guardians? Design, Synthesis, and Cytotoxicity Profiling of Chalcone-Sulfonamide Hybrids. *ACS Omega* **2023**, *8*.
119. Liang, S. T.; Chen, C.; Chen, R. X.; Li, R.; Chen, W. L.; Jiang, G. H.; Du, L. L., Michael acceptor molecules in natural products and their mechanism of action. *Front Pharmacol* **2022**, *13*, 1033003.
120. Chu, H. W.; Sethy, B.; Hsieh, P. W.; Horng, J. T., Identification of Potential Drug Targets of Broad-Spectrum Inhibitors with a Michael Acceptor Moiety Using Shotgun Proteomics. *Viruses* **2021**, *13* (9).
121. Zhuang, C.; Zhang, W.; Sheng, C.; Zhang, W.; Xing, C.; Miao, Z., Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chem Rev* **2017**, *117* (12), 7762-7810.
122. García-Calderón, M.; Pérez-Delgado, C. M.; Palove-Balang, P.; Betti, M.; Márquez, A. J., Flavonoids and Isoflavonoids Biosynthesis in the Model Legume *Lotus japonicus*; Connections to Nitrogen Metabolism and Photorespiration. *Plants (Basel)* **2020**, *9* (6).
123. Abe, I.; Morita, H., Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep* **2010**, *27* (6), 809-38.
124. Cheng, A. X.; Han, X. J.; Wu, Y. F.; Lou, H. X., The function and catalysis of 2-oxoglutarate-dependent oxygenases involved in plant flavonoid biosynthesis. *Int J Mol Sci* **2014**, *15* (1), 1080-95.
125. Bhat, S. A.; Kamal, M. A.; Yarla, N. S.; Ashraf, G. M., Synopsis on Management Strategies for Neurodegenerative Disorders: Challenges from Bench to Bedside in Successful Drug Discovery and Development. *Curr Top Med Chem* **2017**, *17* (12), 1371-1378.
126. Tarawneh, R.; Galvin, J. E., Potential future neuroprotective therapies for neurodegenerative disorders and stroke. *Clin Geriatr Med* **2010**, *26* (1), 125-47.
127. Shults, C. W.; Oakes, D.; Kieburtz, K.; Beal, M. F.; Haas, R.; Plumb, S.; Juncos, J. L.; Nutt, J.; Shoulson, I.; Carter, J.; Kompoliti, K.; Perlmutter, J. S.; Reich, S.; Stern, M.; Watts, R. L.; Kurlan, R.;

- Molho, E.; Harrison, M.; Lew, M., Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Arch Neurol* **2002**, *59* (10), 1541-50.
128. Youdim, M. B.; Bar Am, O.; Yogev-Falach, M.; Weinreb, O.; Maruyama, W.; Naoi, M.; Amit, T., Rasagiline: neurodegeneration, neuroprotection, and mitochondrial permeability transition. *J Neurosci Res* **2005**, *79* (1-2), 172-9.
129. Behl, C., Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog Neurobiol* **1999**, *57* (3), 301-23.
130. Liu, J.; Chang, L.; Song, Y.; Li, H.; Wu, Y., The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience* **2019**, *13*.
131. Uitti, R. J.; Rajput, A. H.; Ahlskog, J. E.; Offord, K. P.; Schroeder, D. R.; Ho, M. M.; Prasad, M.; Rajput, A.; Basran, P., Amantadine treatment is an independent predictor of improved survival in Parkinson's disease. *Neurology* **1996**, *46* (6), 1551-6.
132. Verhagen Metman, L.; Blanchet, P. J.; van den Munckhof, P.; Del Dotto, P.; Natté, R.; Chase, T. N., A trial of dextromethorphan in parkinsonian patients with motor response complications. *Mov Disord* **1998**, *13* (3), 414-7.
133. Lo, D.; Grossberg, G. T., Use of memantine for the treatment of dementia. *Expert Rev Neurother* **2011**, *11* (10), 1359-70.
134. Lee, J. K.; Tran, T.; Tansey, M. G., Neuroinflammation in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* **2009**, *4* (4), 419-29.
135. Du, Y.; Ma, Z.; Lin, S.; Dodel, R. C.; Gao, F.; Bales, K. R.; Triarhou, L. C.; Chernet, E.; Perry, K. W.; Nelson, D. L.; Luecke, S.; Phebus, L. A.; Bymaster, F. P.; Paul, S. M., Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98* (25), 14669-74.
136. Chen, H.; Zhang, S. M.; Hernán, M. A.; Schwarzschild, M. A.; Willett, W. C.; Colditz, G. A.; Speizer, F. E.; Ascherio, A., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* **2003**, *60* (8), 1059-64.
137. Klegeris, A.; McGeer, P. L., Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and other anti-inflammatory agents in the treatment of neurodegenerative disease. *Curr Alzheimer Res* **2005**, *2* (3), 355-65.
138. Olcese, J. M.; Cao, C.; Mori, T.; Mamcarz, M. B.; Maxwell, A.; Runfeldt, M. J.; Wang, L.; Zhang, C.; Lin, X.; Zhang, G.; Arendash, G. W., Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Pineal Res* **2009**, *47* (1), 82-96.
139. Olanow, C. W., Rationale for considering that propargylamines might be neuroprotective in Parkinson's disease. *Neurology* **2006**, *66* (10 Suppl 4), S69-79.
140. Hernandez, M. Z.; Cavalcanti, S. M.; Moreira, D. R.; de Azevedo Junior, W. F.; Leite, A. C., Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design. *Curr Drug Targets* **2010**, *11* (3), 303-14.
141. Wilcken, R.; Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Joerger, A. C.; Boeckler, F. M., Principles and Applications of Halogen Bonding in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56* (4), 1363-1388.
142. Lu, Y.; Liu, Y.; Xu, Z.; Li, H.; Liu, H.; Zhu, W., Halogen bonding for rational drug design and new drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2012**, *7* (5), 375-383.
143. Gerebtzoff, G.; Li-Blatter, X.; Fischer, H.; Frentzel, A.; Seelig, A., Halogenation of drugs enhances membrane binding and permeation. *ChemBiochem* **2004**, *5* (5), 676-84.
144. Gentry, C. L.; Egleton, R. D.; Gillespie, T.; Abbruscato, T. J.; Bechowski, H. B.; Hruby, V. J.; Davis, T. P., The effect of halogenation on blood-brain barrier permeability of a novel peptide drug. *Peptides* **1999**, *20* (10), 1229-38.

145. 14.0., M., Mestrelab Research Chemistry Software Solutions. **2019**.
146. Mani, S.; Swargiary, G., In Vitro Cytotoxicity Analysis: MTT/XTT, Trypan Blue Exclusion. In *Animal Cell Culture: Principles and Practice*, Mani, S.; Singh, M.; Kumar, A., Eds. Springer International Publishing: Cham, 2023; pp 267-284.
147. van Tonder, A.; Joubert, A. M.; Cromarty, A. D., Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes* **2015**, *8*, 47.
148. Rego Campello, H.; Garcia del Villar, S.; Honraedt, A.; Minguez-Viñas, T.; Oliveira, A. S.; Ranaghan, K.; Shoemark, D.; Bermudez, I.; Gotti, C.; Sessions, R.; Mulholland, A.; Wonnacott, S.; Gallagher, T., Unlocking Nicotinic Selectivity via Direct C–H Functionalisation of (–)-Cytisine. *Chem* **2018**, *4*.
149. Zhao, Y.; Liu, S.; Zhou, Y.; Zhang, M.; Chen, H.; Eric Xu, H.; Sun, D.; Liu, L.; Tian, C., Structural basis of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation. *Cell Res* **2021**, *31* (6), 713-716.
150. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E., The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **2000**, *28* (1), 235-42.
151. DeLano, W. L., The PyMOL Molecular Graphics System. 2002.
152. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* **1998**, *19* (14), 1639-1662.
153. Trott, O.; Olson, A. J., AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* **2010**, *31* (2), 455-61.
154. systems, D. <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>.
155. Stout, K. A.; Dunn, A. R.; Hoffman, C.; Miller, G. W., The Synaptic Vesicle Glycoprotein 2: Structure, Function, and Disease Relevance. *ACS Chem Neurosci* **2019**, *10* (9), 3927-3938.
156. Sidarala, V.; Zhu, J.; Levi-D'Ancona, E.; Pearson, G. L.; Reck, E. C.; Walker, E. M.; Kaufman, B. A.; Soleimanpour, S. A., Mitofusin 1 and 2 regulation of mitochondrial DNA content is a critical determinant of glucose homeostasis. *Nat Commun* **2022**, *13* (1), 2340.
157. Waldvogel, S., Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents. *Synthesis-stuttgart* **2010**, *2010*, 892-892.
158. Bukhari, S. N.; Jasamai, M.; Jantan, I., Synthesis and biological evaluation of chalcone derivatives (mini review). *Mini Rev Med Chem* **2012**, *12* (13), 1394-403.
159. Salum, K.; Alidmat, M.; Khairuldean, M.; Nur, N.; Nik, S.; Muhammad, M., Design, synthesis, characterization, and cytotoxicity activity evaluation of mono-chalcones and new pyrazolines derivatives ARTICLE INFO. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2020**, 20-036.
160. Database, J. S. E., Purifying Compounds by Recrystallization. Cambridge, MA: JoVE Science Education Database, 2023.
161. Calloway, N. O.; Green, L. D., Reactions in the Presence of Metallic Halides. I. β -Unsaturated Ketone Formation as a Side Reaction in Friedel–Crafts Acylations. *Journal of the American Chemical Society* **1937**, *59* (5), 809-811.
162. Carey, F. A., *Química orgánica*. McGraw-Hill Interamericana de España S.L.: 2007.
163. Claisen, L. C., A, Condensationen von Ketonen mit Aldehyden. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1881**, *14* (1), 8.
164. Schmidt, J. G., Ueber die Einwirkung von Aceton auf Furfurol und auf Bittermandelöl in Gegenwart von Alkalilauge [On the effect of acetone on furfural and on bitter almond oil (benzaldehyde) in the presence of alkali hydroxides]. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1881**, *14* (1), 2.

165. Watanabe, K. I. a. K.-I., Aldol condensations with Metal (II) complex catalysts. *Bull. Chem. Soc. Jpm* **1980**, 53 (5), 5.
166. Eddarir, S.; Cotelle, N.; Bakkour, Y.; Rolando, C., An Efficient Synthesis of Chalcones Based on the Suzuki Reaction. *Tetrahedron Letters - TETRAHEDRON LETT* **2003**, 44, 5359-5363.
167. Nagendrappa, G., Organic synthesis under solvent-free condition: An environmentally benign procedure — I. *Resonance* **2002**, 7, 59-68.
168. Evranos, B.; Ertan, R., Spectral properties of chalcones II. **2012**, 37, 205-216.
169. Padarthi, P.; Namasivayam, E., SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF CHALCONES FROM 2-ACETYL-5-METHYLFURAN. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2013**, 4, 2629-2638.
170. Roberts, J. D.; Weigert, F. J., Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Determination of carbon-fluorine couplings. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, 93 (10), 2361-2369.
171. Hoffmann, E. d.; Stroobant, V., *Mass spectrometry : principles and applications*. 3rd ed ed.; J. Wiley: Chichester, West Sussex, England, 2007.
172. Chen, X.; Thibeault, S., Effect of DMSO concentration, cell density and needle gauge on the viability of cryopreserved cells in three dimensional hyaluronan hydrogel. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* **2013**, 2013, 6228-31.
173. de Abreu Costa, L.; Henrique Fernandes Ottoni, M.; Dos Santos, M. G.; Meireles, A. B.; Gomes de Almeida, V.; de Fátima Pereira, W.; Alves de Avelar-Freitas, B.; Eustáquio Alvim Brito-Melo, G., Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes. *Molecules* **2017**, 22 (11).
174. Fadeel, B., Plasma Membrane Alterations During Apoptosis: Role in Corpse Clearance. *Antioxidants & Redox Signaling* **2004**, 6 (2), 269-275.
175. Olson, M.; Julian, L., Apoptotic membrane dynamics in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton* **2015**, 7, 133.
176. Dias, T. A.; Duarte, C. L.; Lima, C. F.; Proença, M. F.; Pereira-Wilson, C., Superior anticancer activity of halogenated chalcones and flavonols over the natural flavonol quercetin. *Eur J Med Chem* **2013**, 65, 500-10.
177. Zhang, S.; Li, T.; Zhang, Y.; Xu, H.; Li, Y.; Zi, X.; Yu, H.; Li, J.; Jin, C. Y.; Liu, H. M., A new brominated chalcone derivative suppresses the growth of gastric cancer cells in vitro and in vivo involving ROS mediated up-regulation of DR5 and 4 expression and apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* **2016**, 309, 77-86.
178. Sakagami, H.; Hara, Y.; Shi, H.; Iwama, S.; Nakagawa, M.; Suzuki, H.; Tanaka, K.; Abe, T.; Tamura, N.; Takeshima, H.; Horie, N.; Kaneko, T.; Shiratsuchi, H.; Kaneko, T., Change in Anticancer Drug Sensitivity During Neuronal Differentiation of PC12 Cells. *In Vivo* **2018**, 32 (4), 765-770.
179. Sun, H.; Wang, Y.; Cheff, D. M.; Hall, M. D.; Shen, M., Predictive models for estimating cytotoxicity on the basis of chemical structures. *Bioorg Med Chem* **2020**, 28 (10), 115422.
180. Xu, Z.; Liu, J.; Wu, X.; Huang, B.; Pan, X., Nonmonotonic responses to low doses of xenoestrogens: A review. *Environmental Research* **2017**, 155, 199-207.
181. Vandenberg, L. N., Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose Response* **2014**, 12 (2), 259-76.
182. Committee, E. S.; More, S.; Benford, D.; Hougaard Bennekou, S.; Bampidis, V.; Bragard, C.; Halldorsson, T.; Hernandez-Jerez, A.; Koutsoumanis, K.; Lambré, C.; Machera, K.; Mullins, E.; Nielsen, S. S.; Schlatter, J.; Schrenk, D.; Turck, D.; Tarazona, J.; Younes, M., Opinion on the impact of non-monotonic dose responses on EFSA' s human health risk assessments. *EFSA Journal* **2021**, 19 (10), e06877.

183. Hill, C.; Myers, J.; Vandenberg, L., Nonmonotonic Dose–Response Curves Occur in Dose Ranges That Are Relevant to Regulatory Decision-Making. *Dose-Response* **2018**, *16*, 155932581879828.
184. Gomes, M. N.; Muratov, E. N.; Pereira, M.; Peixoto, J. C.; Rosseto, L. P.; Cravo, P. V.; Andrade, C. H.; Neves, B. J., Chalcone derivatives: promising starting points for drug design. *Molecules* **2017**, *22* (8), 1210.
185. Sasaki, H.; Kitoh, Y.; Tsukada, M.; Miki, K.; Koyama, K.; Juliawaty, L.; Hakim, E.; Takahashi, K.; Kinoshita, K., Inhibitory activities of biflavonoids against amyloid- β peptide 42 cytotoxicity in PC-12 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25*.
186. Tan, J. W.; Kim, M. K., Neuroprotective Effects of Biochanin A against β -Amyloid-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells via a Mitochondrial-Dependent Apoptosis Pathway. *Molecules* **2016**, *21* (5), 548.
187. Wang, L.; Cao, J.; Shi, Z.; Fan, W.; Liu, H.; Deng, J.; Deng, J., Experimental study on the neurotoxic effect of β -amyloid on the cytoskeleton of PC12 cells. *Int J Mol Med* **2018**, *41* (5), 2764-2770.
188. Karapetyan, G.; Fereshetyan, K.; Harutyunyan, H.; Yenkovyan, K., The synergy of β amyloid 1-42 and oxidative stress in the development of Alzheimer's disease-like neurodegeneration of hippocampal cells. *Scientific Reports* **2022**, *12* (1), 17883.
189. Kadowaki, H.; Nishitoh, H.; Urano, F.; Sadamitsu, C.; Matsuzawa, A.; Takeda, K.; Masutani, H.; Yodoi, J.; Urano, Y.; Nagano, T.; Ichijo, H., Amyloid β induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death & Differentiation* **2005**, *12* (1), 19-24.
190. de la Cueva, M.; Antequera, D.; Ordoñez-Gutierrez, L.; Wandosell, F.; Camins, A.; Carro, E.; Bartolome, F., Amyloid- β impairs mitochondrial dynamics and autophagy in Alzheimer's disease experimental models. *Sci Rep* **2022**, *12* (1), 10092.
191. Abramov, A. Y.; Canevari, L.; Duchen, M. R., Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J Neurosci* **2004**, *24* (2), 565-75.
192. Pallo, S. P.; DiMaio, J.; Cook, A.; Nilsson, B.; Johnson, G. V. W., Mechanisms of tau and A β -induced excitotoxicity. *Brain Res* **2016**, *1634*, 119-131.
193. Esposito, Z.; Belli, L.; Toniolo, S.; Sancesario, G.; Bianconi, C.; Martorana, A., Amyloid β , glutamate, excitotoxicity in Alzheimer's disease: are we on the right track? *CNS Neurosci Ther* **2013**, *19* (8), 549-55.
194. Sung, Y. J.; Cheng, C. L.; Chen, C. S.; Huang, H. B.; Huang, F. L.; Wu, P. C.; Shiao, M. S.; Tsay, H. J., Distinct mechanisms account for beta-amyloid toxicity in PC12 and differentiated PC12 neuronal cells. *J Biomed Sci* **2003**, *10* (4), 379-88.
195. Tong, Y.; Bai, L.; Gong, R.; Chuan, J.; Duan, X.; Zhu, Y., Shikonin Protects PC12 Cells Against β -amyloid Peptide-Induced Cell Injury Through Antioxidant and Antiapoptotic Activities. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 26.
196. Fershtat, L. L.; Makhova, N. N., Molecular Hybridization Tools in the Development of Furoxan-Based NO-Donor Prodrugs. *ChemMedChem* **2017**, *12* (9), 622-638.
197. Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; da Silva Bolzani, V.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A., Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Curr Med Chem* **2007**, *14* (17), 1829-52.
198. Arosio, P.; Knowles, T. P. J.; Linse, S., On the lag phase in amyloid fibril formation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17* (12), 7606-7618.
199. Scheidt, T.; Łapińska, U.; Kumita, J. R.; Whiten, D. R.; Klenerman, D.; Wilson, M. R.; Cohen, S. I. A.; Linse, S.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J.; Arosio, P., Secondary nucleation

- and elongation occur at different sites on Alzheimer's amyloid- β aggregates. *Sci Adv* **2019**, *5* (4), eaau3112.
200. Sánchez, Y.; Castillo, C.; Fuentealba, J.; Sáez-Orellana, F.; Burgos, C. F.; López, J. J.; F. de la Torre, A.; Jiménez, C. A., New Benzodihydrofuran Derivatives Alter the Amyloid β Peptide Aggregation: Strategies To Develop New Anti-Alzheimer Drugs. *ACS Chemical Neuroscience* **2023**, *14* (15), 2590-2602.
201. Sciaccaluga, M.; Megaro, A.; Bellomo, G.; Ruffolo, G.; Romoli, M.; Palma, E.; Costa, C., An Unbalanced Synaptic Transmission: Cause or Consequence of the Amyloid Oligomers Neurotoxicity? *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (11), 5991.
202. De, S.; Whiten, D. R.; Ruggeri, F. S.; Hughes, C.; Rodrigues, M.; Sideris, D. I.; Taylor, C. G.; Aprile, F. A.; Muyltermans, S.; Knowles, T. P. J.; Vendruscolo, M.; Bryant, C.; Blennow, K.; Skoog, I.; Kern, S.; Zetterberg, H.; Klenerman, D., Soluble aggregates present in cerebrospinal fluid change in size and mechanism of toxicity during Alzheimer's disease progression. *Acta Neuropathologica Communications* **2019**, *7* (1), 120.
203. Gillis, E. P.; Eastman, K. J.; Hill, M. D.; Donnelly, D. J.; Meanwell, N. A., Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J Med Chem* **2015**, *58* (21), 8315-59.
204. Bertrand, D.; Gopalakrishnan, M., Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* **2007**, *74* (8), 1155-63.
205. Gulsevin, A.; Papke, R. L.; Stokes, C.; Garai, S.; Thakur, G. A.; Quadri, M.; Horenstein, N. A., Allosteric Agonism of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors: Receptor Modulation Outside the Orthosteric Site. *Mol Pharmacol* **2019**, *95* (6), 606-614.
206. Nielsen, B. E.; Stabile, S.; Vitale, C.; Bouzat, C., Design, Synthesis, and Functional Evaluation of a Novel Series of Phosphonate-Functionalized 1,2,3-Triazoles as Positive Allosteric Modulators of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *ACS Chem Neurosci* **2020**, *11* (17), 2688-2704.
207. Shoichet, B. K.; McGovern, S. L.; Wei, B.; Irwin, J. J., Lead discovery using molecular docking. *Curr Opin Chem Biol* **2002**, *6* (4), 439-46.
208. Hibbs, R. E.; Gouaux, E., Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature* **2011**, *474* (7349), 54-60.
209. Bondarenko, V.; Chen, Q.; Singewald, K.; Haloi, N.; Tillman, T. S.; Howard, R. J.; Lindahl, E.; Xu, Y.; Tang, P., Structural Elucidation of Ivermectin Binding to $\alpha 7$ nAChR and the Induced Channel Desensitization. *ACS Chem Neurosci* **2023**, *14* (6), 1156-1165.
210. Collins, T.; Millar, N. S., Nicotinic acetylcholine receptor transmembrane mutations convert ivermectin from a positive to a negative allosteric modulator. *Mol Pharmacol* **2010**, *78* (2), 198-204.
211. daCosta, C. J.; Free, C. R.; Corradi, J.; Bouzat, C.; Sine, S. M., Single-channel and structural foundations of neuronal $\alpha 7$ acetylcholine receptor potentiation. *J Neurosci* **2011**, *31* (39), 13870-9.
212. Young, G. T.; Zwart, R.; Walker, A. S.; Sher, E.; Millar, N. S., Potentiation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (38), 14686-91.
213. Viscarra, F., Chrestia, J.F., Sanchez, Y., Pérez, E.G., Biggin, P.C., Bouzat, C., Bermudez, I. and López, J.J., Side Groups Convert The $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Agonist Ether Quinuclidine into a Type I Positive Allosteric Modulator. *ACS Chem Neurosci* **2023**.
214. Ma, K. G.; Qian, Y. H., Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer's disease. *Neuropeptides* **2019**, *73*, 96-106.
215. Puzzo, D.; Arancio, O., Amyloid- β peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *J Alzheimers Dis* **2013**, *33* Suppl 1 (0 1), S111-20.
216. Xu, Z. Q.; Zhang, W. J.; Su, D. F.; Zhang, G. Q.; Miao, C. Y., Cellular responses and functions of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation in the brain: a narrative review. *Ann Transl Med* **2021**, *9* (6), 509.

217. Zhao, X.; Kuryatov, A.; Lindstrom, J. M.; Yeh, J. Z.; Narahashi, T., Nootropic drug modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in rat cortical neurons. *Mol Pharmacol* **2001**, *59* (4), 674-83.
218. Triakash, I.; Kasatkina, L.; Lykhmus, O.; Skok, M., Nicotinic acetylcholine receptors regulate clustering, fusion and acidification of the rat brain synaptic vesicles. *Neurochem Int* **2020**, *138*, 104779.
219. Levin, E. D., α 7-Nicotinic receptors and cognition. *Curr Drug Targets* **2012**, *13* (5), 602-6.
220. Gotti, C.; Zoli, M.; Clementi, F., Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* **2006**, *27* (9), 482-91.
221. Wallace, T. L.; Porter, R. H., Targeting the nicotinic α 7 acetylcholine receptor to enhance cognition in disease. *Biochem Pharmacol* **2011**, *82* (8), 891-903.
222. Kawamata, J.; Suzuki, S.; Shimohama, S., α 7 nicotinic acetylcholine receptor mediated neuroprotection in Parkinson's disease. *Curr Drug Targets* **2012**, *13* (5), 623-30.
223. Phenis, D.; Vunck, S. A.; Valentini, V.; Arias, H.; Schwarcz, R.; Bruno, J. P., Activation of α 7 nicotinic and NMDA receptors is necessary for performance in a working memory task. *Psychopharmacology (Berl)* **2020**, *237* (6), 1723-1735.
224. Südhof, T. C., Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* **2013**, *80* (3), 675-90.
225. Basu, J.; Siegelbaum, S. A., The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2015**, *7* (11).
226. Maccioni, R. B.; Muñoz, J. P.; Barbeito, L., The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* **2001**, *32* (5), 367-81.
227. Dani, J. A.; Bertrand, D., Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2007**, *47*, 699-729.
228. Ng, H. J.; Whittemore, E. R.; Tran, M. B.; Hogenkamp, D. J.; Broide, R. S.; Johnstone, T. B.; Zheng, L.; Stevens, K. E.; Gee, K. W., Nootropic α 7 nicotinic receptor allosteric modulator derived from GABAA receptor modulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (19), 8059-64.
229. Timmermann, D. B.; Grønlien, J. H.; Kohlhaas, K. L.; Nielsen, E.; Dam, E.; Jørgensen, T. D.; Ahring, P. K.; Peters, D.; Holst, D.; Christensen, J. K.; Malysz, J.; Briggs, C. A.; Gopalakrishnan, M.; Olsen, G. M., An allosteric modulator of the α 7 nicotinic acetylcholine receptor possessing cognition-enhancing properties in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **2007**, *323* (1), 294-307.
230. Bali, Z. K.; Inkeller, J.; Csurgó, R.; Bruszt, N.; Horváth, H.; Hernádi, I., Differential effects of α 7 nicotinic receptor agonist PHA-543613 on spatial memory performance of rats in two distinct pharmacological dementia models. *Behav Brain Res* **2015**, *278*, 404-10.
231. Nikiforuk, A.; Kos, T.; Potasiewicz, A.; Popik, P., Positive allosteric modulation of α 7 nicotinic acetylcholine receptors enhances recognition memory and cognitive flexibility in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* **2015**, *25* (8), 1300-13.
232. Janz, R., Key Molecules: SV2 ☆. **2015**.
233. Wan, Q. F.; Zhou, Z. Y.; Thakur, P.; Vila, A.; Sherry, D. M.; Janz, R.; Heidelberger, R., SV2 acts via presynaptic calcium to regulate neurotransmitter release. *Neuron* **2010**, *66* (6), 884-95.
234. Ciruelas, K.; Marcotulli, D.; Bajjalieh, S. M., Synaptic vesicle protein 2: A multi-faceted regulator of secretion. *Semin Cell Dev Biol* **2019**, *95*, 130-141.
235. Kuzmicic, J.; del Campo, A.; López-Crisosto, C.; Morales, P. E.; Pennanen, C.; Bravo-Sagua, R.; Hechenleitner, J.; Zepeda, R.; Castro, P. F.; Verdejo, H. E.; Parra, V.; Chiong, M.; Lavandero, S., Dinámica mitocondrial: un potencial nuevo blanco terapéutico para la insuficiencia cardiaca. *Revista Española de Cardiología* **2011**, *64* (10), 916-923.

236. Martorell Riera, A. Regulación de la dinámica mitocondrial en neuronas sometidas a excitotoxicidad. Doctoral, Universidad de Barcelona, 2014.
237. Feany, M. B.; Lee, S.; Edwards, R. H.; Buckley, K. M., The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell* **1992**, *70* (5), 861-7.
238. Mecca, A. P.; Chen, M. K.; O'Dell, R. S.; Naganawa, M.; Toyonaga, T.; Godek, T. A.; Harris, J. E.; Bartlett, H. H.; Zhao, W.; Nabulsi, N. B.; Wyk, B. C. V.; Varma, P.; Arnsten, A. F. T.; Huang, Y.; Carson, R. E.; van Dyck, C. H., In vivo measurement of widespread synaptic loss in Alzheimer's disease with SV2A PET. *Alzheimers Dement* **2020**, *16* (7), 974-982.
239. Chen, J. X.; Yan, S. D., Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. *J Alzheimers Dis* **2007**, *12* (2), 177-84.
240. Canevari, L.; Clark, J. B.; Bates, T. E., beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett* **1999**, *457* (1), 131-4.
241. Lin, H.; Bhatia, R.; Lal, R., Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *Faseb j* **2001**, *15* (13), 2433-44.
242. Rosales-Corral, S.; Tan, D. X.; Reiter, R. J.; Valdivia-Velázquez, M.; Acosta-Martínez, J. P.; Ortiz, G. G., Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain following the injection of fibrillar amyloid-beta onto the hippocampus in vivo. *J Neuroimmunol* **2004**, *150* (1-2), 20-8.
243. Butterfield, D. A.; Reed, T.; Newman, S. F.; Sultana, R., Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* **2007**, *43* (5), 658-77.
244. Parameshwaran, K.; Dhanasekaran, M.; Suppiramaniam, V., Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. *Exp Neurol* **2008**, *210* (1), 7-13.
245. Geldenhuys, W. J.; Darvesh, A. S., Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: current and future trends. *Expert Rev Neurother* **2015**, *15* (1), 3-5.
246. Persson, T.; Popescu, B. O.; Cedazo-Minguez, A., Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxid Med Cell Longev* **2014**, *2014*, 427318.
247. Morales, I.; Guzmán-Martínez, L.; Cerda-Troncoso, C.; Farías, G. A.; Maccioni, R. B., Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci* **2014**, *8*, 112.
248. Darvesh, A. S.; Carroll, R. T.; Bishayee, A.; Geldenhuys, W. J.; Van der Schyf, C. J., Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. *Expert Rev Neurother* **2010**, *10* (5), 729-45.
249. Soni, M.; Rahardjo, T. B.; Soekardi, R.; Sulistyowati, Y.; Lestariningsih; Yesufu-Udechuku, A.; Irsan, A.; Hogervorst, E., Phytoestrogens and cognitive function: a review. *Maturitas* **2014**, *77* (3), 209-20.
250. Vecchio, I.; Sorrentino, L.; Paoletti, A.; Marra, R.; Arbitrio, M., The State of The Art on Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Cent Nerv Syst Dis* **2021**, *13*, 11795735211029113.
251. Bob B. Buchanan (Editor), W. G. E., Russell L. Jones (Editor), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 2nd Edition*. American Society of Plant Physiologists: 2000.
252. Zhang, Y.; Liu, C.; Ju, H.; Jia, R.; Gao, S.; Liu, X.; Menéndez-Arias, L.; Zhan, P., Chapter 2 - Chalcones: Diverse biological activities and structure–activity relationships. In *Privileged Scaffolds in Drug Discovery*, Yu, B.; Li, N.; Fu, C., Eds. Academic Press: 2023; pp 21-39.
253. Subramanian, J.; Savage, J. C.; Tremblay, M., Synaptic Loss in Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights Provided by Two-Photon in vivo Imaging of Transgenic Mouse Models. *Front Cell Neurosci* **2020**, *14*, 592607.

