



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO  
DE ENFERMEDADES DEL SNC**

Autores:

Marta Estebaranz Santamaría

D.N.I.: 70256177D

Alejandra Melgarejo Ortuño

D.N.I.:47071963W

Tutor: María Pilar López-Alvarado Gutiérrez

Convocatoria: Junio

## RESUMEN

Los biomarcadores se usan como indicadores para el diagnóstico de diferentes enfermedades neurodegenerativas, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA), seguir su evolución y vigilar la respuesta al tratamiento. Para el diseño de estos biomarcadores es importante el estudio de las vías implicadas en los mecanismos patológicos que llevan a desarrollarlas. En la EA se forman depósitos de proteína beta amiloide ( $\beta$ A), debidos al mal plegamiento de ésta, al ser escindida erróneamente; pero el cómo se llega exactamente a esa situación está aún por dilucidar ya que hay varias teorías que confluyen y podrían ser válidas al tratarse de una patología multifactorial. Actualmente no existe un tratamiento para la EA que logre su curación, sino que el tratamiento está enfocado a reducir la progresión y síntomas de la misma. Ello le da una mayor importancia si cabe, al desarrollo de técnicas para el diagnóstico temprano de la EA para así frenar cuanto antes su progreso y mejorar la calidad y esperanza de vida de los pacientes. Este sería el caso de la investigación de métodos ópticos de diagnóstico unidos al uso de sondas en el infrarrojo cercano (NIR, near infrared) por las ventajas que supondrían respecto a los métodos de diagnóstico actuales; mayor sensibilidad y especificidad de la técnica, menos efectos adversos al no usar moléculas radiactivas, no emplean técnicas invasivas y además, las moléculas usadas como sondas en estas técnicas, podrían usarse como agentes teragnósticos, teniendo la dualidad de poder facilitar el diagnóstico y a su vez tratar la enfermedad al unirse específicamente al  $\beta$ A, frenando su depósito. En esta revisión se tratan diferentes moléculas candidatas a ser sondas NIR ideales para llegar a los fines expuestos como son los DANIRs y las estilquinolinas, con selectividad por el  $\beta$ A y baja toxicidad. Todavía no se han realizado ensayos clínicos, pero los estudios realizados podrían ser un punto de partida para el desarrollo de una técnica potente de diagnóstico de la EA en el futuro.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las enfermedades producidas por el mal plegamiento de las proteínas, son enfermedades neurodegenerativas que se han incrementado notablemente en los países desarrollados durante las últimas décadas y suponen serios problemas tanto sanitarios como económicos. Estas patologías, entre las que se encuentra la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad priónica de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), tienen en común que los trastornos que producen las proteínas mal plegadas son consecuencia de la desregulación dinámica de las vías de varios genes y

proteínas y de alteraciones metabólicas, que en conjunto desencadenan alteraciones en el organismo y que dan lugar a una degeneración del tejido cerebral.<sup>1,2</sup>

El primer caso de la enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrito por el doctor Alois Alzheimer en 1907. En los años 60 ya se observó que la EA afectaba principalmente a personas mayores y hacia los 70 se asoció a la falta de un neurotransmisor (NT), la acetilcolina (ACh). Sin embargo, fue en la década de los 80 cuando se descubrió la presencia de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) y hacia los años 90 se definió el papel de la proteína Tau.<sup>3</sup> Más adelante se relacionó esta enfermedad con el exceso de glutamato, principal NT excitatorio del cerebro ya que diversos ensayos indicaron que la sobreestimulación glutamatérgica podía causar daño neuronal.<sup>4</sup>

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta con deterioro cognitivo y trastornos de la conducta, consecuencia de la formación y la acumulación, fuera de la célula nerviosa, de grandes agregados proteicos conocidos como placas neuríticas o seniles, formadas por el depósito anormal de la proteína  $\beta$ A. Otra alteración histológica de la enfermedad la constituyen los nudos neurofibrilares (NNF) u “ovillos”, que consisten en lesiones intracelulares asociadas al enmarañamiento de la proteína Tau del citoesqueleto, por lo que encontramos un aumento de la proteína Tau fosforilada (p-Tau).

En la EA las proteínas mal plegadas forman agregados  $\beta$ -amiloides ( $\beta$ A) que constan de dos péptidos,  $\beta$ A40 y  $\beta$ A42, y que son el resultado de la escisión anormal de una glicoproteína transmembrana, la proteína precursora amiloide (APP). Debido a su mayor agregabilidad e insolubilidad, el  $\beta$ A42 es más abundante en las placas seniles que el  $\beta$ A40. Los péptidos  $\beta$ A, son ricos en la estructura secundaria de lámina  $\beta$ , que es insoluble y resistente a la digestión proteolítica y tiende a agregarse. Aunque las placas amiloides llevan tiempo asociándose con la enfermedad, las formas oligoméricas representan las especies tóxicas, provocando la muerte neuronal y la pérdida de memoria.<sup>1</sup> Es la unión de estas formas oligoméricas la que provoca una redistribución de las proteínas sinápticas e induce la hiperactividad en los receptores metabotrópicos e ionotrópicos de glutamato. El estudio de estas alteraciones ayuda a identificar las vías implicadas en los mecanismos patológicos, que a su vez pueden definirse como las huellas digitales o biomarcadores para diversos trastornos.

Un **biomarcador** es una sustancia o biomolécula que se puede medir y evaluar como un indicador de procesos normales o patológicos; suelen aceptarse como indicadores para diagnosticar una enfermedad (marcadores de diagnóstico), para establecer su gravedad, así

como para seguir su evolución (marcadores de progresión o pronóstico) o bien para vigilar la respuesta al tratamiento.<sup>2</sup>

Los biomarcadores del SNC se clasifican en genéticos, clínicos, bioquímicos y de neuroimagen, de acuerdo al tipo de información que proporcionan.

a) Los **biomarcadores genéticos** identifican variaciones genéticas en los pacientes asociadas con la enfermedad, pero no permiten predecir la edad de aparición de la misma.

b) Los **biomarcadores clínicos** permiten estudiar la pérdida de ciertas capacidades fisiológicas que comprometen la vida del paciente. Es importante tener en cuenta que habría que completar el examen clínico con el estudio del biomarcador que se realice.<sup>2</sup>

c) Los **biomarcadores bioquímicos** actuales más prometedores en la EA se han encontrado en el líquido cefalorraquídeo (LCR). El principal biomarcador de la EA es la formación y la acumulación de placas de  $\beta$ A.<sup>1</sup>

Como veremos más adelante, en la EA el incremento de proteína Tau total (t-Tau) y Tau fosforilada (p-Tau) en el LCR, junto con la disminución del péptido  $\beta$ A42, constituyen los principales biomarcadores diagnósticos capaces de distinguir la EA de otras demencias en etapas tempranas.<sup>5</sup>

d) Los **biomarcadores de neuroimagen** son el resultado de tecnologías de imagen molecular. Se denomina *imagen molecular* a toda aquella modalidad de imagen biomédica capaz de detectar procesos celulares a nivel molecular *in vivo*, y que permite el estudio de dichos procesos de forma externa y no invasiva. El concepto destacable en estas técnicas es el de *sonda para imagen molecular o trazador*. Se llama así a cualquier compuesto capaz de unirse con afinidad y especificidad a una diana biológica o biomarcador bioquímico y, capaz de ser detectado externamente mediante una técnica de imagen. Las diferentes técnicas de imagen que encontramos son: la imagen nuclear, que incluye la tomografía por emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada por emisión de fotón (SPECT); tomografía de rayos X, que incluye tomografía computerizada (CT) y tomografía axial computerizada (TAC); imagen de resonancia magnética (MRI) e imagen óptica (fluorescencia).<sup>6</sup>

Esta última está cobrando especial importancia en los últimos años y por ello está creciendo el interés en el desarrollo de sondas y contrastes con fluorescencia en el NIR. La imagen óptica utiliza una luz incidente cuya longitud de onda excita el llamado fluoróforo (compuesto fluorescente), que emite luz (fluorescencia) en otra longitud de onda mayor. La radiación excitadora debe ser capaz de atravesar los tejidos hasta llegar al lugar de interés, y la emisión fluorescente generada deberá ser capaz también de salir del tejido para poder ser detectada.

Cuando se diseñan sondas fluorescentes para uso *in vivo* se procura que las emisiones se localicen en el infrarrojo cercano (NIR). Esta región comprende el intervalo espectral 780-2500nm y se pretende que las emisiones se encuentren entre los 700-900nm, ya que a esas longitudes de onda la penetración en el tejido biológico es mayor.<sup>6</sup>

La absorción en el NIR se debe a los armónicos y bandas de combinación de las vibraciones fundamentales de las moléculas. Una molécula absorbe radiación infrarroja cuando experimenta un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o rotación.<sup>7</sup>

Por todo ello, los contrastes y las sondas con las que se está comenzando a investigar, son pequeñas moléculas con afinidad por los agregados  $\beta$ A con propiedades para emitir en el NIR (600-900nm) para poder ser detectadas mediante técnicas espectroscópicas de fluorescencia. Desde el descubrimiento de depósitos amiloides, se han preparado varios colorantes fluorescentes con alta afinidad por la especie  $\beta$ A para el diagnóstico post-mortem de la EA, como son el Rojo Congo y la Tioflavina T. Sin embargo, los contrastes más convencionales no pueden ser herramientas de diagnóstico clínico debido a varios motivos: su baja especificidad, pobre sensibilidad, incapacidad para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) o debido a su marcada toxicidad.

Para superar estos inconvenientes se han realizado investigaciones con el objetivo de obtener un marcador óptico óptimo que se pueda emplear *in vivo* en la formación de imágenes de placas  $\beta$ A. Con este fin, las sondas NIR han sido propuestas como candidatos ideales.<sup>1</sup>

## OBJETIVOS

- Aprender la etiopatogenia que conduce a la formación de depósitos amiloides y con ello determinar los biomarcadores para la detección de la enfermedad.
- Conocer el tratamiento farmacológico actual del Alzheimer y las nuevas tendencias terapéuticas.
- Conocer el diagnóstico actual de la EA y nuevas técnicas en desarrollo.
- Conocer las características estructurales y espectroscópicas de las sondas NIR.
- Aprender los principios físico-químicos que rigen el diseño de sondas NIR.
- Aprender el concepto de agentes teragnósticos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El método de búsqueda bibliográfica empleado para la adquisición de documentos válidos y relevantes ha sido a través de descriptores en la literatura científica como: “Alzheimer disease”, “Biomarkers alzheimer's”, “Beta amyloid plaques”, “NIR fluorescent”, “Enfermedades neurodegenerativas”, “Biomarcadores SNC”, “Fundamento NIR”, “Imagen molecular”, “Fisiopatología Alzheimer”, “PET” “Sondas fluorescentes”; en las bases de datos: Pubmed y Google Académico. De las publicaciones seleccionadas, se han incluido también varias referencias que se correspondían con fuentes primarias relevantes y artículos de revistas. Además, se ha realizado una búsqueda manual para la obtención de datos concretos de índole teórica.

Tras la búsqueda, se han seleccionado las publicaciones mediante la aplicación de determinados criterios de inclusión y exclusión:

- *Criterios de inclusión:* abstract disponible y/o texto completo disponible, lengua española e inglesa, fecha de publicación en los últimos 15 años, tipos de estudio: originales y revisiones.
- *Criterios de exclusión:* abstract no disponible, revisiones previas a los últimos 15 años.

En el marco teórico que se expone a continuación se mostrarán los principales hallazgos obtenidos tras la lectura crítica de la bibliografía consultada, donde se incluyen apartados específicos que hacen referencia a la fisiopatología, tratamiento, diagnóstico actual y nuevas vías de investigación en este ámbito.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Bioquímica y nuevos biomarcadores de la EA**

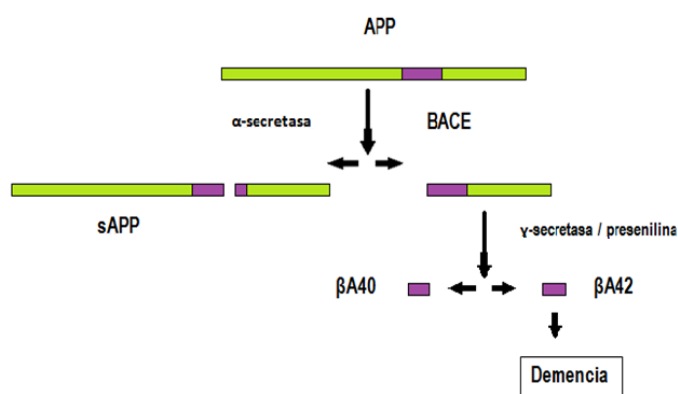


Figura 1. Esquema de la hipótesis de la cascada amiloide y de las presenilinas.<sup>3</sup>

Los principales biomarcadores de la EA son, como ya hemos dicho, la acumulación de  $\beta A$ ,<sup>1</sup> el incremento de proteína t-Tau y p-Tau en el LCR, junto con la disminución del péptido  $\beta A42$ . Las placas de  $\beta A$  se forman debido a la escisión de la proteína APP que puede llevarse a cabo por dos vías distintas ( $\alpha$  y  $\beta$ ), que

implican en ambos casos la actuación de exoproteasas denominadas secretasas. La vía  $\beta$ , implica la actuación secuencial de la  $\beta$ -secretasa (BACE) y la  $\alpha$ -secretasa. En este caso se originan, dependiendo de donde corte la  $\gamma$ -secretasa, dos posibles fragmentos de  $\beta$ -amiloide: un fragmento corto de 40 restos ( $\beta$ A40) o un fragmento largo de 42 restos ( $\beta$ A42), siendo este último el más abundante en las placas seniles. Se cree que el  $\beta$ A42 es el más abundante dado que la proteína APP o las presenilinas, que tienen actividad aspartil proteasa, predisponen el procesamiento erróneo de la molécula por mutaciones en sus centros catalíticos dando lugar a este péptido de 42 restos.

La acumulación de  $\beta$ A42 origina las placas seniles cuando se produce la precipitación de los polímeros  $\beta$ A. Estas placas disparan el proceso inflamatorio crónico que produce la destrucción de las neuronas. Durante este proceso se produce una depleción energética de la célula y la aparición de radicales de oxígeno reactivos (ROS).<sup>3</sup> Los cambios inflamatorios se deben probablemente a la acumulación de  $\beta$ A e incluyen microgliosis, astrocitosis, así como activación del complemento y producción incrementada de citocinas. Se cree que las células T entran en el cerebro como consecuencia de un incremento en el daño a la BHE.<sup>5</sup>

Se ha demostrado que en el caso de la EA el sistema del complemento puede ser activado a partir del vínculo de la proteína C1q de éste con determinadas proteínas de las placas  $\beta$ A, el amiloide P o la proteína C reactiva (un activador del sistema del complemento), en vez de la activación por la vía clásica del complemento.<sup>5,8</sup>

Sin embargo, que no exista correlación entre la cantidad de placas  $\beta$ A y el grado de demencia, hace pensar que esa hipótesis no sea completa, por lo que se requieren factores adicionales como serían la hipótesis de las presenilinas, el papel de los oligómeros de  $\beta$ A y la hipótesis de Tau y de los nudos neurofibrilares (NNF).

En cuanto al papel de los oligómeros de  $\beta$ A, se ha visto que controlando la formación de éstos en los primeros estadios de agregación, se podría evitar la pérdida de sinapsis y la muerte neuronal. Fyn es una tirosina quinasa que es activada por los oligómeros, con un papel importante en la señalización por priones y unida a los receptores ionotrópicos de glutamato, y además está acoplada a la fosforilación de Tau a través de la quinasa GSK-3 $\beta$ , como veremos más adelante.

Respecto a la hipótesis de la proteína Tau, hay que mencionar al citoesqueleto del cual esta proteína forma parte, en el que las fibras de tubulina que lo componen se ensamblan mediante la intervención de una proteína asociada llamada Tau. La apolipoproteína E3 se encarga de mantener el estado desfosforilado de Tau para su correcto funcionamiento. En la EA se ha visto que los pacientes presentan mayoritariamente la isoforma E4, la cual permite

la fosforilación de Tau, inactivándola. Al estar fosforilada, polimeriza y se glicosila, originando los NNF que provocan la degeneración neuronal por un proceso apoptótico.

Por último, existe una interacción entre las vías de  $\beta$ A y de Tau por la cual, la GSK-3 participa en la neurotoxicidad del  $\beta$ A, facilitando la formación de  $\beta$ A, mediante la fosforilación de APP. Se ha demostrado que la fosforilación de Tau por GSK-3 es inducida por  $\beta$ A, lo que lleva a la unión de Tau a los microtúbulos. El nexo de unión entre  $\beta$ A y GSK-3 parece ser la proteína Fyn.

En definitiva, la fosforilación de la proteína Tau por GSK3, activada por  $\beta$ A a través de Fyn, conduce a la formación de NNF, así como a la formación de placas seniles, por lo que en esta hipótesis confluyen tanto la vía de  $\beta$ A como la de Tau en la etiopatogenia de la EA.<sup>3</sup>

Para concluir, en los últimos estudios realizados por Grangeon *et al.*, se demostró que un nivel elevado de proteína Tau, además de indicar esta EA, también puede asociarse con la enfermedad priónica de Creutzfeldt-Jakob (ECJ).<sup>9</sup> Aunque las formas típicas de la EA y la ECJ se puedan distinguir clínicamente, los fenotipos atípicos de la EA pueden ser difíciles de distinguir de la ECJ. Dorey *et al.* realizaron un estudio en el que demostraron que la determinación de los niveles de proteína priónica (t-PrP) en el LCR, podría garantizar mayor precisión a la hora de realizar un diagnóstico diferencial de estas dos patologías.<sup>10</sup>

Además en los últimos estudios se vieron alteraciones en el factor H del complemento del LCR, que podrían complementar el diagnóstico clínico.<sup>11</sup>

### • Tratamiento de la EA

Los tratamientos existentes para la EA están enfocados hacia la reducción del grado de progresión de la enfermedad y de sus síntomas, constituyendo así un conjunto de tratamientos de índole paliativa.<sup>12</sup>

Dentro del tipo farmacológico hay dos tipos de medicamentos aprobados: los inhibidores de la acetilcolinesterasa (ACh) y la memantina. Los primeros, al inhibir la enzima encargada de la degradación de la ACh, mantienen niveles altos de ACh, que como vimos, se encontraban disminuidos. Los fármacos más utilizados de este grupo son donepezilo, rivastigmina y galantamina.

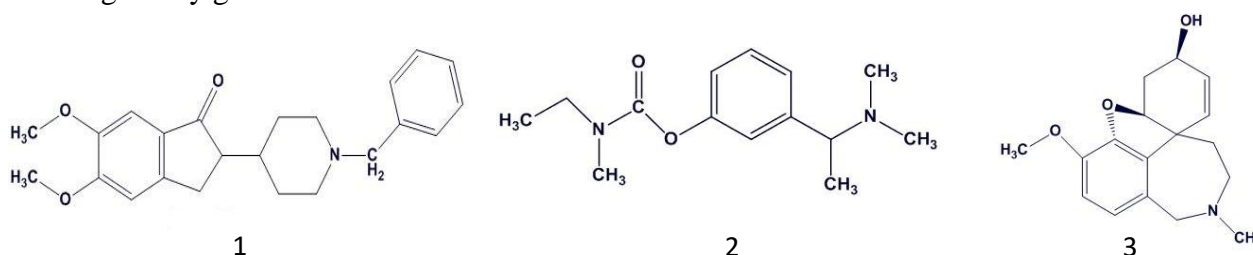


Figura 2. Estructura química de donepezilo (1), rivastigmina (2) y galantamina (3).<sup>13</sup>

Por otro lado, la memantina regula la actividad del glutamato al unirse a su receptor NMDA (de N-metil-D-aspartato) y antagonizarlo, previniendo la entrada excesiva de iones calcio en las células del cerebro.<sup>5</sup> Al parecer un exceso de estimulación glutamatérgica podría inducir una serie de reacciones de carácter tóxico (excitotoxicidad).<sup>12</sup>



Figura 3.  
Estructura  
memantina.<sup>13</sup>

También están en desarrollo nuevas técnicas no invasivas que emplean ultrasonidos para eliminar las placas  $\beta$ A.<sup>14</sup> Por último, en los últimos años se han diseñado numerosos compuestos nuevos que buscan modificar el proceso de la EA y disminuir su progresión, y que se encuentran actualmente en diferentes fases de desarrollo.<sup>15</sup> Este sería el caso de la cerebrolisina, que tiene efectos tanto neurotróficos como neuroprotectores.<sup>16</sup> La mayoría de estas nuevas moléculas están enfocadas en su capacidad potencial para interferir con los procesos patológicos propios de la enfermedad.<sup>15</sup>

- **Diagnóstico de la EA**

Las técnicas de imagen más usadas como diagnóstico clínico son la Tomografía de Emisión de Positrones (PET) y la Imagen por Resonancia Magnética (MRI).<sup>5</sup>

El **PET** es una técnica usada para el diagnóstico de imágenes obtenidas mediante la administración al individuo de una sustancia radiactiva, formada por materia orgánica, cuya emisión puede detectarse desde el exterior del sujeto mediante sensores de radiación. Los isótopos usados se desintegran dando lugar a la emisión de un positrón que produce dos rayos gamma emitidos en la misma dirección y en sentidos opuestos.

El mayor inconveniente de estos isótopos deriva de sus cortos períodos de semidesintegración y esta técnica presenta una resolución espacial baja por lo que dificulta la identificación de estructuras.<sup>6</sup>

Actualmente se dispondría de tres marcadores para uso clínico denominados florbetapir, florbetabén y flutemetamol.

La interpretación del PET de amiloide se ha basado en la distribución de la captación cerebral del trazador. En condiciones normales se observa una captación inespecífica en la sustancia blanca cerebral, mientras que en la EA se aprecia además una intensa captación en la sustancia gris, de modo que se pierde la diferenciación entre la sustancia gris y la sustancia blanca.

Por otra parte, la mera presencia de depósitos de  $\beta$ A no es sinónimo de enfermedad, sino que puede ser un fenómeno asociado al envejecimiento normal o a otras enfermedades.

Además, a la hora de aplicar estos estudios a nivel poblacional debemos tener en cuenta su coste y sus riesgos potenciales como puede ser la radiación, ya que existen varios estudios que muestran un aumento del riesgo de progresión de la EA en los pacientes con deterioro cognitivo leve y PET patológico.<sup>17</sup>

Las guías internacionales sobre el uso apropiado del PET de amiloide acuerdan que tiene utilidad en un grupo reducido de pacientes con deterioro cognitivo en los que se sospecha de EA.<sup>18</sup>

La otra técnica de diagnóstico usada es la **MRI** que se basa en la resonancia magnética nuclear, por la cual determinados núcleos atómicos pueden absorber y emitir energía electromagnética cuando se someten a un intenso campo magnético.<sup>19</sup> Las limitaciones de esta técnica derivan de su elevado tamaño y peso, del precio de la instrumentación, de su baja sensibilidad por el  $\beta$ A, así como de la duración del proceso.<sup>6</sup>

- **Sondas de fluorescencia en NIR**

Otras técnicas están cobrando cada vez mayor interés como es la espectroscopía de fluorescencia. Esta emplea contrastes y sondas de fluorescencia que se emplean *in vivo* para la formación de imágenes de placas  $\beta$ A. A parte de la capacidad de emitir fluorescencia en la región NIR, estas sondas deben poseer propiedades tales como: (1) especificidad por placas  $\beta$ A, (2) capacidad para cambiar sus propiedades de fluorescencia tras la unión a fibrillas, (3) alta afinidad de unión, (4) alto rendimiento cuántico fluorescente (relación entre los fotones de REM fluorescentes emitidos y de excitación absorbidos, señal que puede variar cambiando las condiciones experimentales), (5) gran desplazamiento de Stokes (diferencia entre los máximos de las bandas de absorción y emisión), (6) mínima unión a la albúmina de suero humano (HSA), (7) pequeño tamaño molecular y carácter lipófilo adecuado, lo que permite a la molécula cruzar la BHE, y (8) baja toxicidad.<sup>1</sup>

#### Diseño molecular para la emisión en la región NIR

Si se suministra una cantidad adecuada de energía a una molécula, los electrones pueden ser promovidos desde estados moleculares de baja energía a otros de mayor energía, ocupando orbitales vacíos y dando lugar a una transición que corresponde a una banda de absorción en el espectro.

En los compuestos fluorescentes, los electrones regresan del estado excitado al estado fundamental por emisión de fotones (fluorescencia), debido a que los electrones del estado excitado y fundamental están emparejados (estado singlete). La diferencia más pequeña

posible de energía entre un orbital completo y un orbital vacío radica en la existente entre el orbital molecular más alto ocupado (HOMO) y el orbital molecular más bajo desocupado (LUMO), el llamado intervalo HOMO-LUMO.

Teniendo esto en cuenta, las sondas NIR se han diseñado con el objetivo de reducir el intervalo HOMO-LUMO, basándose en los colorantes amiloides existentes. Cuanto menor sea este intervalo, más fácilmente visualizamos las bandas de absorción y de emisión fluorescentes puesto que se necesitará menos energía para que los electrones de la molécula pasen de estado fundamental a su estado excitado (proceso de absorción) y vuelvan del estado excitado al fundamental (proceso de emisión). Para lograr esto se puede emplear la conjugación extendida en las moléculas, y por tanto sistemas  $\pi$  conjugados serían los ideales para la construcción de sondas NIR.

Sin embargo por métodos de conjugación de sistemas  $\pi$ , las moléculas resultarían demasiado grandes, lo cual no interesa porque no cumpliría los requisitos ya mencionados. Una estrategia muy común para disminuir el intervalo HOMO-LUMO de un sistema  $\pi$  conjugado está en la presencia en la molécula de grupos aceptores y donadores de electrones generando así sistemas “push-pull”.

En el estado fundamental el sistema puede ser descrito con dos formas de resonancia, una neutra y otra en estado excitado, dando lugar a la forma zwitteriónica. Debido a los grupos aceptores y donadores el sistema conjugado completo es más polarizable y en términos de energía el estado fundamental está más cerca del excitado y por tanto el intervalo energético HOMO-LUMO es menor.

Por otro lado, el grupo donador debe poseer un par solitario de electrones en un orbital  $\pi$  capaz de interactuar con los orbitales  $\pi$  del sistema conjugado incrementando así la energía de los orbitales HOMO. A su vez los orbitales LUMO son más estables por la interacción de los orbitales antienlazantes del grupo aceptor, disminuyendo el intervalo HOMO-LUMO. El grupo donador más eficaz sería el grupo dimetilamino mientras que los grupos aceptores serían el formilo y el ciano.

Otro factor a tener en cuenta sería el carácter de los enlaces del sistema conjugado. Los enlaces simples en los sistemas conjugados poseen un carácter parcial de doble enlace, que se ve incrementado si en la molécula coexisten grupos aceptores y donadores. La deslocalización electrónica de este sistema  $\pi$  se vería aumentada disminuyendo también así el intervalo HOMO-LUMO.

La presencia de los dobles enlaces en los que los orbitales  $\pi$  se solapan y combinan hacen que la molécula sea plana y que se genere un orbital molecular muy grande que permite una

conjugación  $\pi$  más fuerte y una deslocalización electrónica mayor. Este efecto explica que los máximos de emisión de los compuestos fluorescentes en estado sólido son mayores que en disolución, ya que en disolución los compuestos pueden rotar libremente alrededor de los enlaces simples, mientras que en estado sólido carecen de esta libertad conformacional.

Otra estructura común de las moléculas fluorescentes, son los anillos aromáticos unidos por cadenas de etileno, que disminuirán la distancia entre niveles y por tanto se producirá una ampliación de la longitud de onda absorbida, desplazándose las bandas hacia el rojo en el espectro.

Tras la unión al  $\beta$ A, las sondas NIR suelen mostrar cambios en sus máximos de emisión incrementando también su rendimiento cuántico fluorescente y un desplazamiento en su máximo de absorción. Al unirse a dichos agregados, la molécula será más rígida y no tendrá libertad conformacional, convirtiéndose así en una molécula plana.

Hay más condiciones que influyen en los desplazamientos electrónicos que no son dependientes de la molécula en sí misma, como es el pH. A un pH alrededor de 7 la molécula se encuentra en estado neutro y tendría por ello un efecto push-pull débil y unas longitudes de onda de absorción y emisión bajas, mientras que a pH ácido estaría en estado ionizado, dándose el efecto contrario.

En resumen, existen diferentes factores que influyen en la reducción del intervalo HOMO-LUMO como son los sistemas conjugados extendidos, la introducción de grupos aceptores y donadores en la misma molécula, la longitud de enlace y el grado de planaridad.

Basándose en esto, se han diseñado numerosas sondas NIR con capacidad de unión a las placas amiloides.

#### Sondas para el diagnóstico por NIR de la EA

##### 1) NIAD-4 (2-[[5-[5-(4-hidroxipentil)tiofen-2-il]tiofen-2-il]metilideno]propanodinitrilo)

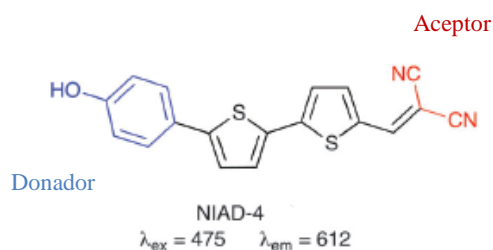


Figura 4. Arquitectura push-pull del NIAD-4.<sup>1</sup>

NIAD-4 es la primera sonda NIR que surgió para el diagnóstico de las placas  $\beta$ A *in vivo*. Presenta una estructura push-pull en la cual el grupo *p*-hidroxifenil (donador) y el grupo dicianometileno (aceptor) están conectados por un sistema aromático, teniendo un intervalo HOMO-LUMO menor. Además, el sistema aromático dota

a la molécula de un mayor carácter apolar necesario para formar interacciones hidrofóbicas con las fibras  $\beta$ A para que se una de forma específica a ellas.

La capacidad de unión del NIAD al  $\beta$ A se evaluó primero por ensayos *in vitro* mediante la constante de unión ( $K_i$ ), observándose que es muchísimo mayor la afinidad por el  $\beta$ A del NIAD ( $K_i=10\text{nM}$ ) que la que presentaba la Tioflavina T ( $K_i=580\text{nM}$ ), molécula en la cual se basó su diseño.

Además se realizaron ensayos *in vivo* en ratones transgénicos con EA, comprobando que atravesaban eficazmente la BHE y con elevada afinidad por las placas  $\beta$ A.

A pesar de ello, la emisión en el NIR está en el límite, por lo que el método para el diagnóstico tendría que ser invasivo al ser tan débil la señal.

Otros derivados con un grupo hidroxilo adicional en el fenilo o grupos dimetilamino y un anillo de benzotieno en lugar del tiofeno, presentan, aumentando el efecto donador del sistema push-pull, con una emisión máxima entre 690nm y 720nm.

## 2) Metoxi-X04 y politiofenos

Metoxi-X04 es un derivado del Rojo Congo con un menor peso molecular y sin efecto push-pull, con el fin de aumentar la lipofilia y tener una mayor capacidad de atravesar la BHE que los anteriores. Respecto

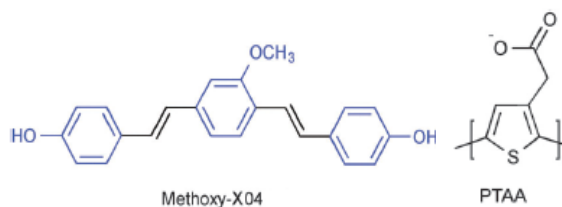


Figura 5. Estructura de Metoxi-X04 y PTAA.<sup>1</sup>

a la unión con el  $\beta$ A son eficaces *in vitro* y poseen una resolución mayor *ex vivo*. Además se ha comprobado que la emisión espectroscópica del PTAA (politiofeno), varía en función de la conformación de las proteínas, con un máximo de emisión de 590nm, siendo así posible la diferenciación de las placas amiloides respecto a otros tejidos cerebrales.

## 3) Sondas constituidas por derivados de dipirrolometanoboronatos (BODIPY)

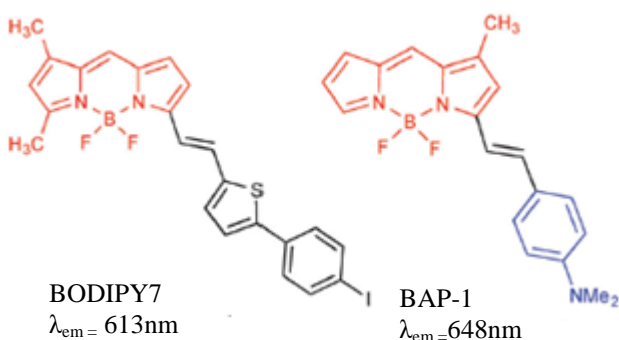


Figura 6. BODIPY7 fue modificado introduciendo un grupo donador para tener un sistema push-pull más eficaz dando lugar a BAP-1.<sup>1</sup>

Los BODIPY se combinaron con NIAD-4 para la obtención de diferentes derivados, (BODIPY7 y BAP 1-5) que poseen sistemas push-pull, donde el anillo de boronato representa el grupo aceptor y un grupo dimetilaminoestirilo constituye el grupo donador. Para obtener una mejor resolución de las placas  $\beta$ A *in vivo*, también se reemplazó el grupo fenilo por diferentes grupos como un tiofenilo o un

furanilo. Estos compuestos presentan una mayor afinidad por los agregados amiloides y *ex vivo* son capaces de atravesar la BHE.

El BAP-2 mostraba una buena absorción y se eliminaba rápidamente del cerebro, por lo que fue considerado un buen candidato para el diagnóstico *in vivo* pero se observó que no había diferencias de intensidad de fluorescencia entre ratones transgénicos y ratones control probablemente porque esta molécula quedaba retenida en el pericráneo y no lograba unirse a las placas  $\beta$ A.

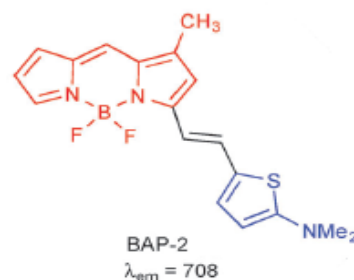


Figura 7. Estructura de BAP-2.<sup>1</sup>

#### 4) AOI-987

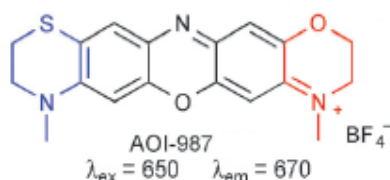


Figura 8. Estructura de AOI-987.<sup>1</sup>

AOI-987 es un derivado de oxacina de bajo peso molecular y elevada liposolubilidad que permitió la visualización de placas  $\beta$ A *in vivo* siguiendo una técnica no invasiva. Por su conjugación, presenta longitudes de absorción y emisión dentro de la región NIR. Sin embargo, su intensidad de fluorescencia no es muy elevada y su afinidad por las fibras de  $\beta$ A es menor que NIAD-4 y que BODIPY y sus derivados. Además, su selectividad por las fibrillas de  $\beta$ A del cerebro de ratones transgénicos con EA y la posibilidad de emplear la técnica de fluorescencia de reflectancia de imágenes (que permite obtener la imagen fluorescente rápidamente) hace que se considere la primera sonda capaz de emitir fluorescencia en el NIR mediante un método no invasivo *in vivo*, permitiendo además una monitorización.

#### 5) Curcumina y CRANAD (difluoroboronatos cíclicos).

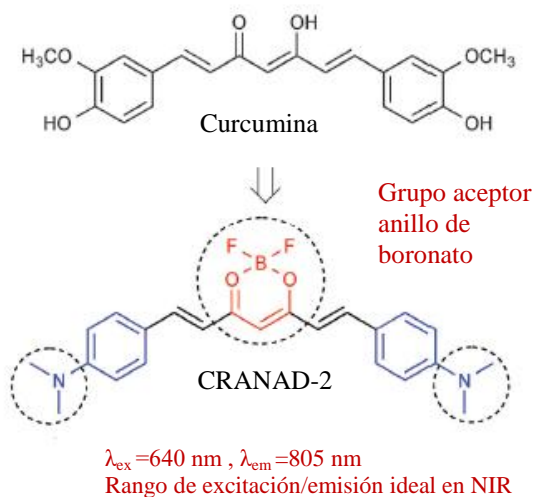


Figura 9. Estructura de la curcumina y CRANAD-2.<sup>1</sup>

CRANAD-2 es un compuesto derivado de la curcumina, sustancia obtenida de la cúrcuma. La curcumina es conocida por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antifibrinógenas, por lo que se empleó *in vitro* para reducir el daño oxidativo y la acumulación de placas  $\beta$ A, pero se vio que producía efectos adversos a las dosis requeridas, que era citotóxica en algunas células humanas e incluso teratógena. Aún así, y debido a sus propiedades fluorescentes, se probó *in vivo*,

pero atravesaba la BHE débilmente, por lo que se tuvo que observar las placas  $\beta$ A por microscopía de multifotón, siendo esta una técnica invasiva. Por ello, basándose en esta molécula trataron de buscar otra que permitiera unirse al  $\beta$ A *in vivo* mediante técnicas de NIR, con lo que se llegó a la molécula CRANAD-2. Este compuesto consiguió aumentar el máximo de emisión y está formado por dos moléculas de curcumina conectadas por un anillo de boronato. Con él se permite la transición del par de electrones desapareados del oxígeno central al orbital vacío del boro, lo que permite disminuir el intervalo HOMO-LUMO. Este efecto mejoró al incorporar a la molécula un grupo dimetilamino remplazando al grupo hidroxilo fenólico.

La afinidad por el  $\beta$ A fue evaluada *in vitro*, y se consiguió ver una unión muy específica a determinados depósitos amiloides.

En la evaluación *in vivo*, se vio que atravesaba la BHE y se pudo realizar una monitorización del progreso de la enfermedad.

El único inconveniente es que la técnica NIR empleada en este caso fue la fluorescencia de reflectancia de imágenes, la cual se caracteriza por tener bajo grado de penetración en el cerebro (< 1 cm) y posee baja resolución.

El diseño de CRANAD-58, se realizó teniendo en cuenta que la unión a las fibras de  $\beta$ A por un lado tenía que ser mediante interacciones hidrofóbicas y por el otro mediante interacciones hidrofílicas. Así, el segmento hidrofílico de la CRANAD-2 fue reemplazado por un anillo de piridina hidrofílico.

Este compuesto muestra elevadas longitudes de absorción

y de emisión, además de una mejora en el rendimiento cuántico fluorescente, al mezclar tanto especies solubles como fibrilares.

Sin embargo, los microscopios de fluorescencia necesarios para visualizar la morfología de las especies solubles no poseen la suficiente resolución y además no es posible validar la unión de este compuesto a las formas solubles *in vivo* y *ex vivo*.

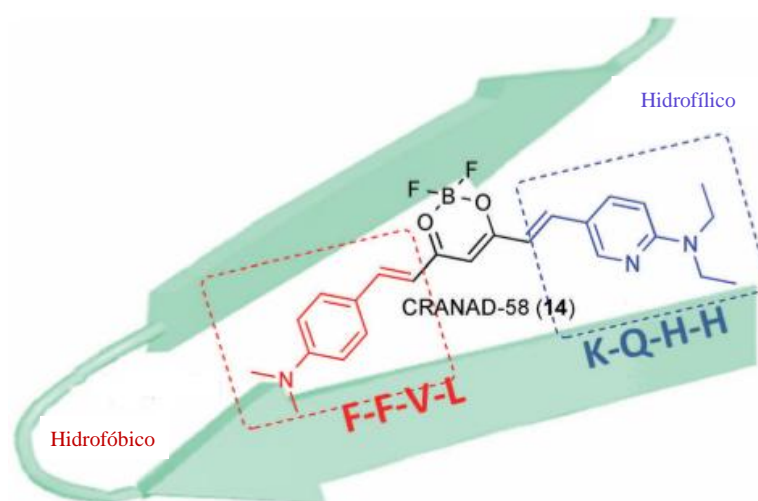


Figura 10. CRANAD-58 tiene una  $\lambda_{\text{ex}} = 630 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 750 \text{ nm}$  con afinidad por el  $\beta$ A interactuando específicamente con los segmentos hidrofóbicos (FFVL) e hidrofílicos (HHQK).<sup>1</sup>

## 6) THK-265

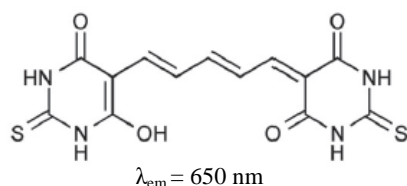


Figura 11. Estructura química de THK-265.<sup>1</sup>

THK-265 fue identificado por screening virtual y está formado por dos ácidos tiobarbitúricos unidos por una cadena de pentadieno, formando así el sistema conjugado. Posee un elevado rendimiento cuántico fluorescente y mayor afinidad por el  $\beta$ A que la Tioflavina T y que AOI-987. Además posee baja toxicidad y buena absorción por el tejido cerebral, lo que permite la visualización de las placas  $\beta$ A *in vivo*. Más adelante se validó *ex vivo*, confirmando la capacidad de atravesar la BHE y la selectividad por placas  $\beta$ A. Además, existe una correlación entre la intensidad de fluorescencia y el incremento de edad de los ratones. Los experimentos *ex vivo* demostraron que los cambios en la intensidad de fluorescencia dependían de la diferencia de cargas del  $\beta$ A. Sin embargo, se necesita una elevada sensibilidad para monitorizar los depósitos amiloides cerebrales a tiempo real.

## 7) DANIRs

Poseen estructura push-pull, en la cual un grupo dimetilamino constituye el donador y un grupo dicianometileno el grupo aceptor, ambos conectados mediante una cadena de polimetina de mayor número o menor de dobles enlaces conjugados.

Se llevaron a cabo experimentos *in vitro*, tanto con pacientes con EA como con ratones transgénicos para comprobar la afinidad por el  $\beta$ A y se vio que el compuesto más conjugado poseía la mayor afinidad por las fibras amiloides, ya que el aumento de la intensidad de fluorescencia correspondía con una mayor unión a las placas  $\beta$ A. Este compuesto presentó una mejora del rendimiento cuántico fluorescente, menor toxicidad, buena estabilidad en suero humano e interaccionaba débilmente con la albúmina de suero bovino.

*In vivo* se vio que era capaz de atravesar la BHE y que se eliminaba rápido del cerebro. Además se comprobó que la señal de fluorescencia en ratones transgénicos con EA era mayor que en ratones control.

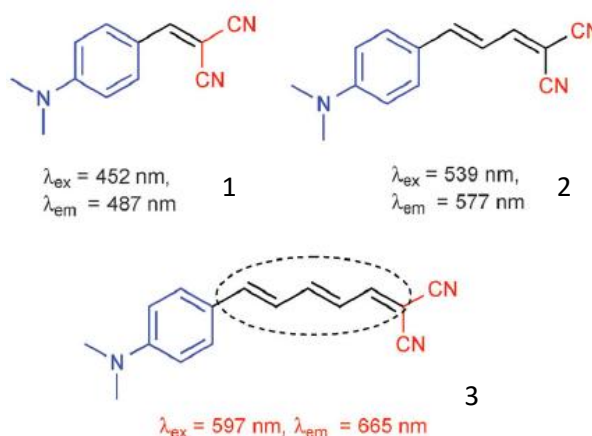


Figura 12. Estructuras DANIRs (1-3) en orden creciente de afinidad por el  $\beta$ A.<sup>1</sup>

Todo esto confirma que esta molécula tiene los requerimientos idóneos para ser considerada una sonda NIR ideal.<sup>1</sup>

- **Agente teragnóstico**

Los agregados amiloides han sido considerados históricamente como la forma neuropatológica postmortem identificativa de la EA y los biomarcadores adecuados para el diagnóstico clínico. Al mismo tiempo, los agregados amiloides han sido vistos como potenciales dianas terapéuticas para el descubrimiento de fármacos, y con mucho esfuerzo se han dedicado los últimos años al desarrollo de nuevas moléculas capaces de inhibir su agregación.

Estas consideraciones abren la posibilidad de desarrollar sondas fluorescentes capaces de detectar la deposición de  $\beta$ A y a su vez proporcionar estrategias terapéuticas. En otras palabras, estas moléculas podrían actuar como teragnósticas, es decir, agentes con propiedades para integrar diagnóstico y efecto terapéutico en una sola molécula.

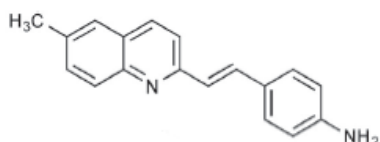


Figura 13. Estructura de un derivado de estilquinolina.<sup>1</sup>

Recientes estudios sobre derivados de estilquinolinas sugieren que podrían ser usados con este fin, y por ello se ha centrado su estudio en dos enfermedades, la EA y la enfermedad priónica. Se ha observado que las estilquinolinas presentan una prometedora actividad inhibitoria de  $\beta$ A y de PrPSc (forma patógena de la proteína priónica PrP)<sup>20</sup> *in vitro*.<sup>1</sup>

Para corroborar la posibilidad del empleo de estos compuestos como sonda amiloide NIR, se determinó su fluorescencia nativa en una variedad de entornos polares y no polares para modelar su interacción con proteínas. Se observó que el espectro fluorescente en su estado sólido mostró un máximo de emisión por encima de 600 nm y además se confirmó una unión a la proteína amiloide específica. Con todo ello representaría un punto de partida prometedor para una posible aplicación *in vivo*.<sup>1</sup>

## CONCLUSIÓN

La detección precoz de los primeros síntomas de la EA es la mejor arma de prevención de esta enfermedad, que junto con unos hábitos saludables ayudan a reducir los casos de EA, según La Sociedad Española de Neurología.<sup>21</sup> Por ello, es de gran importancia el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico, como es el caso de las sondas NIR.

Para llevar a cabo estas investigaciones es necesario el conocimiento en profundidad de la etiopatogenia de la enfermedad, con el objetivo de obtener nuevas y mejores dianas para el

diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad. Está demostrada la relación entre la EA con los oligómeros de  $\beta$ A, la proteína Tau, las presenilinas y los nudos neurofibrilares.

De acuerdo con la séptima conferencia anual sobre Ensayos Clínicos para la Enfermedad de Alzheimer (Filadelfia, 2014), la mayor parte de los esfuerzos en desarrollar tratamientos efectivos se ha centrado en las primeras etapas de la enfermedad.<sup>22</sup> Además están surgiendo nuevos fármacos como la cerebrolisina, proteína que promueve el crecimiento y el buen estado de las neuronas, además de nuevas técnicas terapéuticas no invasivas mediante el uso de ultrasonidos, todos ellos en vías de desarrollo.<sup>4,14</sup>

En la actualidad, las vías de investigación tienen como objetivo subsanar las limitaciones de las técnicas disponibles para el diagnóstico (PET y MRI), como son su baja sensibilidad y especificidad que no permiten el diagnóstico temprano en la mayoría de los casos y los efectos adversos que puedan causar debido al uso de moléculas radiactivas.

En este campo están surgiendo técnicas prometedoras que permitirían la detección de la enfermedad en etapas iniciales, como sería el caso de las sondas NIR. A lo largo de esta revisión hemos visto que han ido surgiendo nuevas moléculas, candidatas para convertirse en sondas NIR ideales, corrigiendo los inconvenientes de sus moléculas predecesoras. Así, poco a poco, se pasó de necesitar una técnica invasiva para la correcta absorción de la sonda, a ser capaces de monitorizar el progreso de la enfermedad, sin por ello tener que necesitar técnicas invasivas, incluso llegando a profundidades cerebrales de 3-5 cm.

Podríamos decir que las moléculas más eficaces a nivel diagnóstico serían DANIRs y las estililquinolinas. Las primeras presentan una mejora del rendimiento cuántico fluorescente, menor toxicidad, buena estabilidad en suero humano, son capaces de atravesar la BHE y se eliminan rápido del cerebro, por lo que reúnen todas las características para ser consideradas sondas NIR ideales. Por otro lado, las segundas tienen un tamaño adecuado para la manipulación en las técnicas de fluorescencia, lo que le permite una especificidad de unión con el  $\beta$ A y una baja toxicidad. Además poseen la potencialidad de ser una molécula teragnóstica, permitiendo realizar al mismo tiempo el diagnóstico y el tratamiento, característica que supone una gran ventaja respecto a las demás moléculas investigadas y otras técnicas de diagnóstico.

Hay que destacar que estas sondas aún no han sido probadas en humanos, sino que han sido ensayadas en otras especies, con el objetivo de analizar sus propiedades físicas, químicas, terapéuticas y de toxicidad para que en un futuro puedan convertirse en armas potentes de diagnóstico de esta enfermedad. Para ello serían necesarios muchos avances en la microscopía óptica que permitirían traducir todos estos esfuerzos en la práctica clínica.<sup>1</sup>

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Staderini M, Martín MA, Bolognesi ML, Menéndez JC. Imaging of  $\beta$ -amyloid plaques by near infrared fluorescent tracers: a new frontier for chemical neuroscience. *Chem Soc Rev* **2015**; 44(7): 1807-1819.
- 2) Sampieri AI, Gómez-Hernández FA, Carmona-Aparicio L. Clasificación de los biomarcadores en las enfermedades del sistema nervioso central. *Acta Pediatr Mex* **2013**; 34: 171-172.
- 3) Oset-Gasque MJ, Roncero C. Capítulo 4: Enfermedad de Alzheimer. En: Bases Moleculares de las Enfermedades Neurodegenerativas: Estrategias Neuroprotectoras y Neurorreparadoras. Madrid: Oset-Gasque MJ (UCM); **2011**. p. 49-62. ISBN 978-84-96704-49-7. DL M-14637-2011.
- 4) Asociación Lucha contra el Mal de Alzheimer y Alteraciones Semejantes de la República Argentina [sede Web]. Argentina: A.L.M.A; **2009** [acceso 6 de abril de 2016]. Tratamiento con medicamentos en la enfermedad de Alzheimer. Disponible en: <http://www.alma-alzheimer.org.ar/tratamientos.php>
- 5) Herrera-Rivero M, Hernández-Aguilar ME, Manzo J, Aranda-Abreu GE. Enfermedad de Alzheimer: Inmunidad y Diagnóstico. *Rev Neurol* **2010**; 51: 153-64.
- 6) Desco M, Vaquero JJ. Imagen molecular. *Nuevas Tecnologías* **2008**; 68-76.
- 7) Peguero A. La espectroscopía NIR en la determinación de propiedades físicas y composición química de intermedios de producción y productos acabados [tesis doctoral]. Universidad Autónoma de Barcelona; **2010**.
- 8) Padilla B, Dorta AJ, Noris E. Complemento y Sistema Nervioso Central. *Rev Mex Neuroci* **2005**; 6(4): 310-314.
- 9) Grangeon L, Paquet C, Bombois S, Quillard-Muraine M, Martinaud O, Bourre B et al. Differential Diagnosis of Dementia with High Levels of Cerebrospinal Fluid Tau Protein. *Journal of Alzheimer's Disease* [Revista on-line] **2016**; 1-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26890785>
- 10) Dorey A, Tholance Y, Vighetto A, Perret-Liaudet A, Lachman I, Krolak-Salmon P et al. Association of cerebrospinal fluid prion protein levels and the distinction between Alzheimer disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *JAMA Neurol* [Revista on-line] **2015**; 72(3):267-275. Disponible en: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=2088873>
- 11) Hu WT, Watts KD, Taylor P, Nguyen TP, Howell JC, Lee RC et al. CSF Complement 3 and factor H are staging biomarkers in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications* **2016**; 4(14): 1.

- 12) Moro E, Parras M. Enfermedades degenerativas y desmielinización del SNC [monografía en Internet]. Madrid: Eusalud; **2015** [acceso 3 de abril de 2016]. Disponible en: [http://eusalud.uninet.edu/misapuntes/index.php/Enfermedades\\_degenerativas\\_y\\_demielinizaci%C3%B3n\\_del\\_SNC](http://eusalud.uninet.edu/misapuntes/index.php/Enfermedades_degenerativas_y_demielinizaci%C3%B3n_del_SNC)
- 13) López JM. Enfermedad de Alzheimer: fisiopatología y tratamiento [monografía en Internet]. Zaragoza: Info-farmacia; **2011** [acceso 3 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.info-farmacia.com/medico-farmaceuticos/revisiones-farmaceuticas/enfermedad-de-alzheimer-fisiopatologia-y-tratamiento>
- 14) Actualidad RT [sede Web]. Rusia: RT; **2015** [acceso 6 de abril de 2016]. Un nuevo tratamiento revolucionario contra el alzhéimer restaura casi totalmente la memoria. Disponible en: <https://actualidad.rt.com/ciencias/169570-tratamiento-alzheimer-regenerar-memoria-ratones>
- 15) Acosta D, Brusco LI, Fuentes P, Guerra M, Mena R, Nitrini R, Trujillo Z, Ventura R. La enfermedad de Alzheimer: Diagnóstico y tratamiento. 1ª Ed. México: Panamericana; **2015**.
- 16) Asociación Peruana de enfermedad de Alzheimer y otras demencias [sede Web]. Perú: APEAD; **2013** [acceso 6 de abril de 2016]. Tratamientos de la enfermedad de Alzheimer. Disponible en: <http://www.alzheimerperu.org/tratamientos-enfermedad-alzheimer.html>
- 17) Jiménez A. Diagnóstico del Alzheimer: PET de amiloide [monografía en Internet]. Madrid: Neurología clínica: Servicio de Neurología, Hospital Ruber Internacional; **2015** [acceso 20 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.neurologiaclinica.es/diagnostico-del-alzheimer-pet-de-amiloide/>
- 18) Lleó A L, Lladó A, Camacho V, Lomeña F, Lorenzo, C. Guía clínica de utilización de PET de amiloide en la evaluación del deterioro cognitivo. *Societat Catalana de Neurologia* **2016**; 1-5.
- 19) IntraMed [sede Web]. Argentina: Intramed; **2006** [acceso 6 de abril de 2016]. Biomarcadores en las enfermedades neurodegenerativas. Disponible en: <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=39593>
- 20) MEDISAN [sede Web]. Cuba: Rubio T, Verdecia M; **2009** [acceso 11 de abril de 2016]. Enfermedades priónicas. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol13\\_1\\_09/san08109.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol13_1_09/san08109.htm)
- 21) Sánchez I, Romero R, Rodríguez E, García B. Alzheimer. 1ª Ed. Melilla: <sup>3</sup>*Ciencias*; **2016**.
- 22) Valdés S, Abad F. Estrategias de tratamiento precoz para la enfermedad de Alzheimer. *Actualidad en farmacología y terapéutica* **2015**; 13(2): 88-90.