



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
BIOMARCADORES PARA EL
DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DEL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL:
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Autor: KOZMA, DIANA

Tutor: LÓPEZ-ALVARADO, MARIA PILAR

Convocatoria: FEBRERO

TABLA DE CONTENIDO

TÍTULO	1
RESUMEN	3
PALABRAS CLAVE	3
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	4
CONCEPTO Y DESARROLLO DE BIOMARCADORES	4
CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES	4
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	4
AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO.....	6
OBJETIVO	8
MATERIALES Y METODOS	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
NEUROIMAGEN.....	9
ELECTROENCEFALOGRAMA.....	15
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	16
CONCLUSIÓN.....	20
BIBLIOGRAFÍA	20
ANEXOS	22



BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Autora: Kozma, Diana

Tutora: López-Alvarado, María Pilar

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más frecuente, representando hasta el 70%. Se caracteriza por la pérdida de memoria y el deterioro cognitivo progresivo. En España su prevalencia alcanza el 6% entre las personas mayores de 70 años. En los próximos 50 años se espera que la enfermedad de Alzheimer (EA) afecte a 100 millones de personas en el mundo. El diagnóstico precoz y preciso de la EA es difícil debido a que los primeros síntomas de la enfermedad son compartidos por una variedad de trastornos, lo que refleja características neuropatológicas comunes. El fracaso de muchos fármacos candidatos se ha atribuido a su administración en una etapa tardía, cuando la patología es demasiado avanzada. Sobre estas bases, el desarrollo de biomarcadores apropiados para el diagnóstico precoz y la monitorización de la enfermedad parece ser crítico para una terapia eficaz. Por el momento parece probable que sólo un análisis combinado de varios biomarcadores permitirá obtener un diagnóstico específico de la EA en el futuro. Hasta el momento ninguno de éstos biomarcadores están estandarizados para poder ser utilizados, pero la investigación avanza en dirección correcta.

Palabras clave: biomarcador, enfermedad de Alzheimer (EA), demencia, deterioro cognitivo leve (DCL), tau, beta-amiloide, beta-A42, beta-A42/A40, ¹¹C-PIB-PET, neuroimagen, imagen infrarroja cercana (NIR).

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

CONCEPTO Y DESARROLLO DE BIOMARCADORES

El término de “biomarcador” fue establecido formalmente en el año de 1987 por el Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos (National Research Council, NRC) a través del Comité de Marcadores Biológicos. Esta definición considera como biomarcador a un evento (de estado conocido) que puede usarse como guía para la evaluación de sistemas biológicos. Es decir, una característica de señalización, en muestras o sistemas biológicos que pueda ser medida y evaluada objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales o patogénicos (Schlenk, 1999) (2).

CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES

Un **biomarcador** es un evento (una molécula, imagen, etc.), 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); para vigilar la respuesta al tratamiento (terapéuticos) y marcadores de susceptibilidad. Por lo tanto, un biomarcador puede emplearse tanto en el área clínica, como en el desarrollo de medicamentos (1, 2).

En algunos casos no se miden biomarcadores directamente, sino unas moléculas que se unen a éstos y emiten señales que se pueden medir, interpretar, cuantificar etc. En otros casos, los biomarcadores que existen para el diagnóstico son escasos o difíciles de obtener (líquido cefalorraquídeo) y se recurre al empleo de compuestos que se administran para que actúe como sondas fluorescentes NIR (11).

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

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa de causa incierta. La manifestación clínica más esencial y, a menudo, más temprana de la EA es el deterioro de la memoria selectiva, aunque hay excepciones (3). Es el tipo de demencia más frecuente, representando hasta el 70% de los casos. En España su prevalencia alcanza el 6% en el grupo de mayores de 70 años (4). En los próximos 50 años se espera que la EA afecte a 100 millones de personas en el mundo (9).

La relevancia sociosanitaria de la EA, el desarrollo de nuevos fármacos, potencialmente modificadores del curso de la enfermedad y la existencia de estrategias terapéuticas para la fase precoz, ha motivado un interés creciente por conocer y diagnosticar mejor los estadios iniciales (4). El fracaso de muchos fármacos candidatos se ha atribuido a su administración en una etapa tardía, cuando la patología es demasiado avanzada. Sobre estas bases, el desarrollo de biomarcadores apropiados para el diagnóstico precoz y la monitorización de la enfermedad parece ser crítico para una terapia eficaz (4, 5). Hasta la fecha, la EA solo podía ser diagnosticada cuando el deterioro cognitivo alcanzaba la gravedad suficiente para interferir con la capacidad funcional del paciente (en el ámbito personal, social o profesional). Sin embargo, este umbral clínico puede ser muy variable entre las personas, dependiendo de factores como el rendimiento cognitivo premórbido, el nivel de inteligencia, la complejidad de las actividades diarias, o el nivel de percepción del informador.

Hoy en día el diagnóstico se realiza según unos criterios clínicos validados internacionalmente (DSM-IV-TR, CIE-10 o NINDS-ADRDA). Todos se basan en el reconocimiento del síndrome de demencia y en las características clásicas de la EA, estando más orientados a la exclusión de otras causas no degenerativas de demencia. Sin embargo, y a pesar de la amplia difusión de estos criterios clínicos, se ha demostrado que son poco específicos y sensibles en las fases iniciales de la enfermedad (4).

Las que las características fisiopatológicas más importantes de la enfermedad de Alzheimer son las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (Ver anexo 1: imagen 1). El componente mayoritario de dichas placas es el péptido β -amiloide (β A o bA). Éste péptido de 39 - 43 aminoácidos es muy hidrofóbico, se libera en la escisión proteolítica de la proteína precursora amiloidea (PPA o APP en inglés) y se agrega para formar oligómeros. Estos oligómeros a su vez se agregan para formar fibras, que se depositan en el parénquima cerebral y originan las placas seniles (9) (Ver anexo 1: imagen 2). La APP es normalmente procesada de forma secuencial por distintas proteasas llamadas alfa, beta y gamma secretasas. Los fragmentos liberados por la actividad alfa-secretasa no son patogénicos. Pero hay otra vía de procesamiento de la APP menos común, aunque también fisiológica, en la que es la beta-secretasa es la encargada de realizar el primer corte. Es una proteasa anclada a la membrana mediante un dominio transmembrana. Posee un dominio aspartil-proteasa (utiliza un aspartato para la reacción de catálisis) en su porción extracelular, que es el que realiza el corte (15). (Ver anexo 1: imagen 3)

El β A es un candidato perfecto para ser un biomarcador eficaz para el diagnóstico precoz de la EA, porque se sabe que se puede detectar varios años antes de la aparición de los síntomas clínicos (4, 6). Por consiguiente, *in vivo* la obtención de imágenes de β A es particularmente adecuada para identificar individuos en riesgo y en las primeras etapas de la EA (5).

La proteína Tau es un constituyente del citoesqueleto de la neurona. En procesos que cursan con neurodegeneración es un marcador de muerte celular que se libera al compartimento extracelular y puede medirse en LCR (líquido cefalorraquídeo) (4). (Ver anexo 1: imagen 4).

AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO

La mayoría de las nuevas técnicas y pruebas que se están estudiando para utilizarlas en el diagnóstico de la EA, y que ya se utilizan para otras enfermedades, se basan en cambios funcionales ocurridos en el proceso EA, excepto los biomarcadores genéticos.

Podemos considerar varios grupos de ellas: 1) técnicas de diagnóstico por la imagen; 2) electroencefalografía de nueva generación; 3) determinación de marcadores bioquímicos periféricos.

1. La neuroimagen en el diagnóstico de la EA. Las técnicas más empleadas son la resonancia magnética, la tomografía de emisión de positrones y la tomografía de emisión de fotones simples. (Ver Anexo 2)

➤ La Resonancia Nuclear Magnética (RNM) es una técnica no invasiva, que puede aplicarse de forma repetitiva en un individuo, capaz de detectar diversos núcleos atómicos como ^1H , ^{31}P , ^{13}C , cuando se sitúan bajo un potente campo magnético. Existen dos aplicaciones fundamentales, la espectroscopia por resonancia magnética (ERM), que proporciona un registro gráfico, cuyos picos informan de la concentración de determinadas sustancias que contienen grupos atómicos determinados, y la imagen por resonancia magnética (IRM), que se proporciona una representación pseudofotográfica. Es decir, la técnica sirve tanto para proporcionar informes metabólicos como morfológicos.

La Espectroscopia de Protones (^1H -ERM) es muy utilizada, ya que se pueden identificar y cuantificar moléculas, que disminuyen en la EA más que en la senilidad fisiológica. En su versión anatómica, la IRM no sólo proporciona el aspecto visual, sino

determinaciones del volumen de distintas regiones cerebrales, lo que nos proporciona un importante índice de la atrofia de esas zonas.

➤ Las técnicas de Tomografía de Emisión de Positrones (conocida por las siglas inglesas PET, positron emission tomography) (ej. ^{11}C -PIB-PET) y la de emisión de fotones (de igual manera denominada SPECT, single-photon emission computed tomography) se basan en la introducción de moléculas marcadas radiactivamente (biomarcadores indirectos), de vida media muy corta, que emiten positrones o fotones que son recogidos por un sistema de rastreo (un escáner) con detectores adecuados. Las señales detectadas son analizadas y los datos procesados, produciéndose registros de densidad y mapas de localización (imágenes cerebrales). Actualmente se trabaja en poner a punto técnicas que puedan marcar *in vivo* las placas βA (12).

2. El electroencefalograma (EEG) en el diagnóstico de EA

La actividad eléctrica cerebral que recoge el EEG es un reflejo de la actividad sináptica de ciertas neuronas. La pérdida o disfunción de la conectividad neuronal típica de la EA es una teórica fuente de alteraciones del EEG. Puede ser empleada como predictora de la evolución de trastornos cognoscitivos leves. (Ver Anexo 3)

3. Los marcadores bioquímicos útiles en el diagnóstico de EA (excepto "marcadores genéticos").

Se puede decir que los marcadores bioquímicos patognomónicos de EA son de gran interés en todos los aspectos: confirmación del diagnóstico, estudios epidemiológicos, identificación de subgrupos o subtipos de EA, valoración del progreso de la enfermedad y de su tratamiento, predicción de la evolución, etc. Los siguientes marcadores están actualmente siendo muy utilizados y sus ensayos permiten augurar una pronta utilización en la clínica:

- proteína tau (fosforilada y no fosforilada) y otras proteínas derivadas de neurofilamentos o sinapsis en LCR; (1, 12)
- proteína beta-amiloide (1-40, 1-42 y el coeficiente 1-40/1-42) en LCR o suero o en músculo (1, 4, 11);
- proteína precursora de amiloide (APP) y sus derivados inmediatos en diversas células periféricas;
- apolipoproteínas (A, E) en suero y LCR, solas o en correlación con HDL;

- otros

También se buscan nuevos marcadores en plaquetas, especialmente en base a la composición y fluidez de las membranas.

4. Los marcadores genéticos de EA.

Se ha demostrado que existe un componente genético en la EA de tipo familiar (o de inicio precoz) que tiene como etiología la alteración de determinados genes en los cromosomas nucleares 1 (gen de la presenilina II), 14 (gen de la presenilina I) y 21 (gen de la APP) o del cromosoma mitocondrial (genes para moléculas de la citocromo-oxidasa o de la NADH deshidrogenasa). Se han caracterizado gran número de familias con mutaciones puntuales en alguno de los genes. En estos casos, el análisis genético aporta el beneficio científico de la tipificación del subtipo de EA, pero no supone ninguna ventaja práctica (7).

OBJETIVO

Investigar sobre los avances del uso de biomarcadores para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer. Ver si se pueden aplicar en la clínica en un futuro cercano. Determinar si se puede predecir cuales de los pacientes con el deterioro cognitiva leve van a desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

MATERIALES Y METODOS

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica de la literatura científica publicada en las siguientes bases de datos: PubMed, Biblioteca UpToDate, Scielo, MEDLINE y PreMedline, EMBASE (Elsevier), Psycinfo, Cochrane Library, Google Scholar.

No se aplicaron restricciones de idioma a las búsquedas electrónicas y no se utilizaron filtros metodológicos para maximizar sensibilidad. Se aplicó el filtro de fecha en la búsqueda de artículos, se excluyeron artículos publicados antes del 2009.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La búsqueda dio lugar a 15 citaciones, de las cuales 11 son textos completos de artículos científicos, 2 abstractos y 2 páginas web. Los artículos proponen diferentes biomarcadores directos o indirectos para el diagnóstico de la EA. Sin embargo, hoy en día, aun no se ha conseguido encontrar un marcador óptimo y único para diagnosticar y seguir el progreso de la EA. Por el momento parece probable que sólo un análisis

combinado de varios biomarcadores permitiría obtener un diagnóstico específico de la EA en un futuro cercano. También hay que estandarizar su aplicación e interpretación para poder usarlos a nivel clínico y sin dificultad para el personal facultativo. (3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14).

Varios biomarcadores ampliamente investigados del proceso molecular y degenerativo de la EA pueden ser de apoyo en un diagnóstico, pero aún no se recomiendan para el diagnóstico de rutina. Sin embargo, este tipo de pruebas puede añadir más confianza al diagnóstico clínico de la EA (8).

NEUROIMAGEN

Hay varios biomarcadores topográficos o degenerativos utilizados para evaluar los cambios cerebrales posteriores que se correlacionan con la distribución regional de la disfunción neuronal y la muerte neuronal asociada con la EA eventual. Estos incluyen la atrofia del lóbulo temporal medial, que se puede ver en la IRMN y la reducción de metabolismo de la glucosa en las regiones temporoparietales en la FDG-PET [del inglés fluorodeoxyglucose (FDG)-positron emission tomography (PET)] (8, 15). (Ver anexo 2: imagen 5)

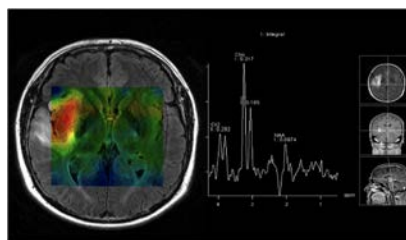
En general, los biomarcadores topográficos son menos específicos que los biomarcadores moleculares, pero se correlacionan mejor con la aparición de los síntomas clínicos. Ninguna de estas pruebas es válida como prueba única de diagnóstico, pero los criterios de investigación incorporan tanto los datos de biomarcadores moleculares como topográficos en las definiciones de investigación de ambas formas sintomáticas y pre-sintomáticas de la EA, anticipando que una vez que los biomarcadores se vuelvan más estandarizados, se incorporarán en algoritmos de diagnóstico clínico para la EA. En la actualidad, el uso de biomarcadores se limita principalmente a estudios de investigación y ensayos clínicos, y las pruebas no están universalmente disponibles ni reembolsadas por la mayoría de las aseguradoras (8).

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Diversos estudios muestran que en la EA la corteza cerebral, el lóbulo temporal medial, el hipocampo, la corteza entorrinal, etc., sufren una atrofia cuantificable y de valor diagnóstico.

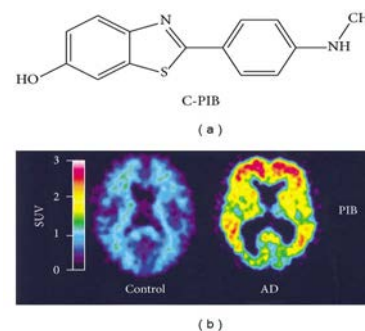
Se usa preferiblemente la imagen de resonancia magnética nuclear (IRMN), indicada en la evaluación de pacientes con sospecha de EA. La IRMN cerebral puede ayudar como diagnóstico adicional sobre atrofia cerebral regional que sugiere demencia frontotemporal u otros tipos de enfermedad neurodegenerativa (3). En contra de ella se tiene una baja sensibilidad y un costo elevado. Para mejorar la técnica y su rendimiento práctico, se están desarrollando diferentes protocolos de utilización de los equipos, mejoras técnicas y combinación de pruebas (7).

El hallazgo más característico focal en la EA es la reducción del volumen de hipocampo o atrofia del lóbulo medio temporal. Debido a que los volúmenes del hipocampo declinan en el curso normal de envejecimiento, se necesitan criterios específicos de la edad. El hallazgo de atrofia del hipocampo proporciona apoyo incremental para un diagnóstico de EA en un paciente con una presentación clínica típica, pero no es suficientemente específica para contribuir significativamente a la precisión del diagnóstico sobre la evaluación clínica por sí sola. Algunos estudios sugieren que las características de IRMN pueden predecir la tasa de disminución de la EA y en el futuro pueden guiar las decisiones de tratamiento. La volumetría del hipocampo utilizando normas corregidas para la edad proporcionadas por la *Iniciativa de Neuroimagen para la EA*, puede predecir las tasas de conversión de DCL a la demencia de EA. Sin embargo, estos resultados requieren confirmación independiente y las herramientas para generar estas mediciones no están ampliamente disponibles. (3)



TOMOGRAFÍA DE EMISIÓN DE POSITRONES

Para detectar a participantes con DCL inicial que presentarán la conversión clínica a la demencia de la enfermedad de Alzheimer u otras formas de demencia después de un tiempo, se realizó un meta-análisis que determinara la exactitud de diagnóstico de la ^{11}C -PIB-PET (Ver anexo 2: imagen 6 y 7). El compuesto de Pittsburgh B (PiB) es un análogo radioactivo de la tioflavina T que puede usarse en tomografías de emisión de positrones para visualizar placas de beta-amiloide en el tejido neuronal (12). (ver índice 2).



La conversión de DCL a demencia de la enfermedad de Alzheimer se evaluó en 9 estudios. La calidad de las pruebas era limitada. De los 274 participantes incluidos en el

metanálisis, 112 desarrollaron demencia de Alzheimer. Sobre la base de los 9 estudios incluidos, la proporción mediana que presentó la conversión fue de un 34%. Los estudios varían notablemente en la forma en que se realizaron e interpretaron las exploraciones con PIB. La sensibilidad esta entre el 83% y el 100%, mientras que la especificidad entre el 46% y el 88%. Debido a la variación en los umbrales y las medidas de retención del ^{11}C -PIB por bA, no se calculó la sensibilidad y la especificidad medias. Si se supone una tasa de conversión típica de DCL a la demencia del Alzheimer de un 34%, por cada 100 exploraciones con PIB, un paciente con una exploración negativa progresaría y 28 con una exploración positiva en realidad no progresaría a la demencia de Alzheimer.

Aunque la buena sensibilidad lograda en algunos estudios incluidos es alentadora para el valor de la ^{11}C -PIB-PET, debido a la heterogeneidad en la realización y la interpretación de la prueba y la ausencia de umbrales definidos para la determinación de la positividad de la prueba, no es posible recomendar el uso sistemático en la práctica clínica. El biomarcador de la ^{11}C -PIB-TEP es una investigación de costo elevado, por lo tanto, es importante demostrar claramente su exactitud y estandarizar el proceso de la modalidad de diagnóstico de la ^{11}C -PIB antes de utilizarla (12) (ver índice 2).

Otros compuestos (F18-florbetapir, F18-flutemetamol, F18-florbetaben), que miden βA en el cerebro, se han desarrollado como herramientas para ayudar en el diagnóstico diferencial y pronóstico de la EA *in vivo*, en el desarrollo de fármacos anti-amiloides. Estos marcadores han sido aprobados por las agencias reguladoras en los Estados Unidos para la evaluación cualitativa de densidad de la placa βA ; sin embargo, no están destinados para su uso como un agente de diagnóstico. (8).

TOMOGRAFÍA MOLECULAR FLUORESCENTE (FMT) Y TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA DE RAYOS X

Existe un interés creciente en la espectroscopía de fluorescencia como una alternativa no invasiva para el diagnóstico precoz que permite la visualización en tiempo real de biomoléculas en sistemas vivos. Es un método versátil y sensible que conduce a un sistema de formación de imágenes rápido, barato y no radiactivo. Para su aplicación *in vivo*, las sondas fluorescentes tienen que emitir fluorescencia en la región 600-900 nm del rojo lejano o infrarrojo cercano (NIR).

Las sondas fluorescentes NIR son extremadamente útiles para visualizar y monitorizar la formación de placas βA y para evaluar la efectividad del tratamiento

farmacológico en modelos animales, por lo que se consideran herramientas de diagnóstico atractivas y prometedoras para la EA.

El desarrollo de sistemas de imagen óptica modernos y eficientes, tales como la tomografía molecular fluorescente (TMF) y la técnica híbrida conocida como tomografía computarizada de rayos X han permitido la visualización *in vivo* de la distribución de placa β A en ratones con EA con un cráneo intacto.

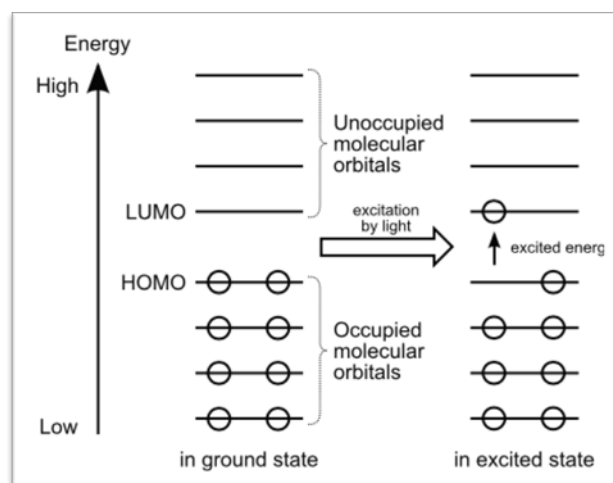
SONDAS FLUORESCENTES NIR

Existen dos enfoques potenciales para la formación de imágenes NIR que implican el uso de nanopartículas de emisión de fluorescencia (puntos cuánticos) o trazadores de imágenes *in vivo*.

Diseño molecular para la emisión en la región NIR

Si se administra una cantidad adecuada de energía a una molécula, los electrones pueden excitarse y saltar desde un orbital molecular ocupado de baja energía a uno vacío, de mayor energía, dando lugar a una transición que corresponde a una banda de absorción en el espectro. La fluorescencia se debe a que los electrones del estado excitado vuelven al estado fundamental emitiendo fotones, porque los electrones de los estados excitado y de basal están emparejados (estado singlete).

Teoría de orbitales de frontera. Se han definido los orbitales de frontera como HOMO y LUMO. El HOMO es el orbital molecular más alto ocupado y el LUMO es orbital molecular más bajo vacío (ver anexo 2: imagen 8). La brecha HOMO-LUMO está estrechamente correlacionada con las longitudes de onda de absorción y emisión. Las sondas NIR han sido diseñadas con el objetivo de reducir la brecha HOMO-LUMO de los colorantes amiloides existentes. Esto puede lograrse por conjugación, y por lo tanto los sistemas π conjugados son enlaces ideales para la construcción de sondas NIR y un cambio en la longitud de conjugación representa una manera efectiva de ajustar el nivel de intervalo de energía. Una estrategia muy común utilizada para reducir la brecha HOMO-LUMO de un sistema π conjugado se basa en la presencia de grupos



donadores de electrones (D) y aceptor de electrones (A) como restos terminales con el fin de generar una molécula "pull-push". En su estado fundamental, tal molécula D-A puede describirse por dos formas de resonancia, es neutra y zwitteriónica (figura 1).

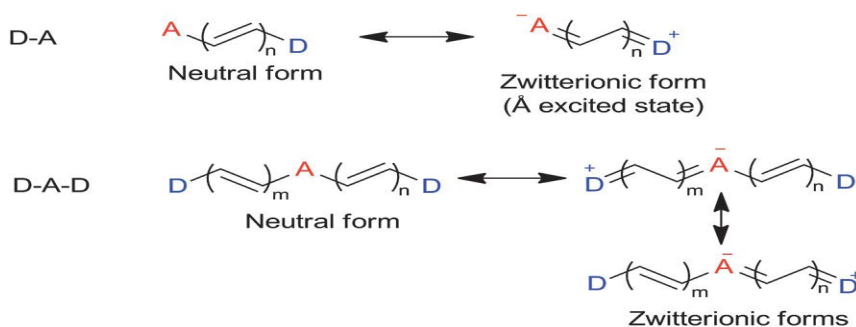
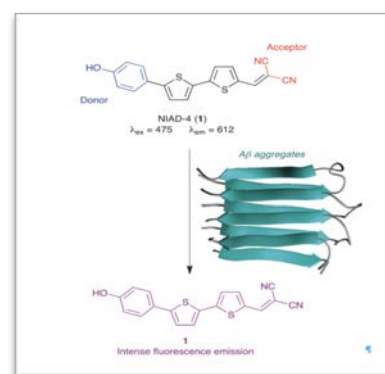


Figura 1. Una molécula push-pull y una molécula donante-aceptor-donante, mostrando sus formas neutras y zwitteriónicas.

NIAD-4 (compuesto 1) y compuestos relacionados. NIAD-4 fue una de las primeras sondas NIR utilizada para la visualizar placas β A *in vivo*. Presenta la estructura clásica push-pull. A pesar de la alta especificidad de compuesto 1 para las placas de Ab, el método de imagen utilizado fue invasivo. (Ver anexo 2: imagen 9 ampliada).



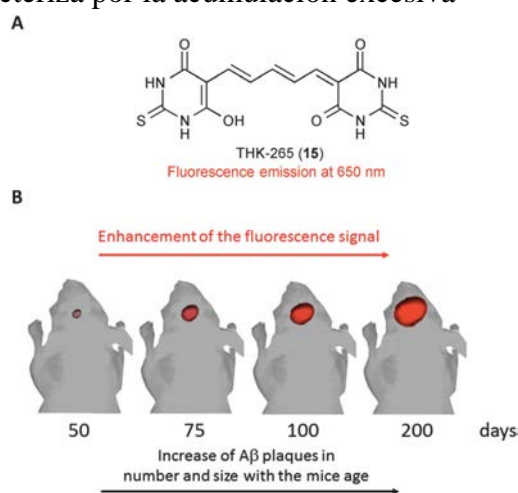
BODIPY incluye en su estructura un sistema de difluoroboronato cíclicos. Ono et al. combinaron el fragmento BODIPY con una porción de NIAD-4 (2-feniltiofeno) y el dimetilamino estirilo (D). A pesar de la alta afinidad de unión a las fibrillas amiloides, no cumple los requisitos ideales para ser utilizado *in vivo* debido a su acumulación inespecífica en el cuero cabelludo. (Ver anexo 2: imagen 10).

AOI - 987 permitió la visualización de placas de β A *in vivo* de una manera no invasiva. Es un colorante de oxazina. Debido a su estructura conjugada, mostró buenas propiedades espectrales con absorción y emisión máximas en la región NIR. La técnica ha demostrado ser particularmente adecuada para obtener imágenes rápidas, pero tiene una resolución de profundidad limitada a no más 3-5 mm de la superficie y no es cuantitativa. (Ver anexo 2: imagen 11).

CRANAD-2. Este compuesto contiene dos restos de curcumina conectados por un anillo de borato, lo que confiere a sus soluciones un color rojo brillante debido a la transición π - π^* de un par solitario de electrones sin compartir desde el oxígeno central

hasta el orbital vacío del boro, dando lugar a un cambio de absorbancia hacia el rojo. También se reemplazaron los grupos hidroxilo fenólicos de la curcumina con grupos N, N'-dimetilamino, que se considera como uno de los mejores grupos para el cambio de la absorción al rojo. Como resultado final CRANAD-2 cumplió la mayoría de los requisitos para una sonda NIR, y se demostró que entra en el cerebro y marca específicamente placas β A lo que permite su imagen *in vivo*. Sin embargo, también en este caso la técnica de imagen NIR empleada fue la reflectancia, que se caracteriza por una profundidad de penetración baja (<1 cm) y una baja resolución. (Ver anexo 2: figura 12).

CRANAD-58. Este compuesto es capaz de unirse tanto a las placas β A como a los monómeros A. Se cree que el inicio de la AD se caracteriza por la acumulación excesiva de monómeros β A solubles, que gradualmente tienden a agregarse en dímeros y oligómeros tóxicos, dando lugar a la formación de placas de β A. Esto ofrece la oportunidad única de monitorizar la progresión de la AD desde sus etapas muy tempranas. Sin embargo, los actuales microscopios de fluorescencia no tienen suficiente resolución para permitir visualizar la morfología de las especies solubles. (Ver anexo 2: imagen 13 más amplia)

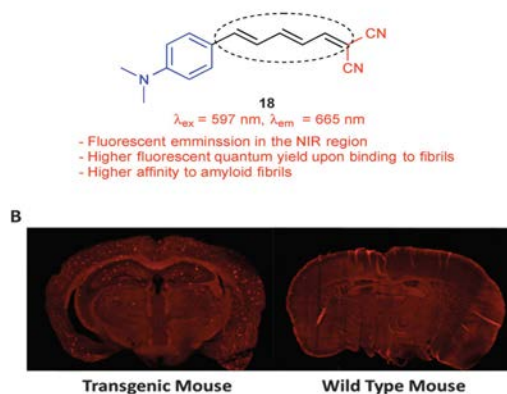


THK-265 está formado por dos unidades de ácido tiobarbitúrico conectadas por una cadena de pentadienilideno, formando un sistema conjugado. Mostró propiedades espectroscópicas adecuadas, con un máximo de emisión a 450 nm y un rendimiento cuántico fluorescente elevado (38,5% en metanol). THK-265 podría representar un posible candidato para el seguimiento de la progresión de la AD y evaluar la eficacia de los fármacos anti-AD. (Ver anexo 2: imagen 14).

DANIRs. Todas las sondas NIR para visualizar β A discutidas hasta ahora son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y marcar selectivamente las placas amiloides, sin embargo, muestran limitaciones. Por ejemplo, NIAD-4 no pudo ser detectado en ratones con un cráneo intacto, BODIPY7 y BAP mostraron baja permeabilidad a través de BHE, AOI-1987 mostró sólo afinidad moderada por los agregados β A y CRANAD-2 mostró una escasa eliminación del cerebro. Por esto Cui et al. desarrollaron una nueva serie de moléculas pequeñas fluorescentes para la detección *in vivo* de placas de β A. Los autores utilizaron la estructura D-A separadas por una cadena

de polimetino. El grupo N, N'-dimetilamino se seleccionó como donador de electrones debido a su capacidad conocida para la absorción de la radiación, y como aceptor se eligió un grupo dicianometileno obteniendo el **compuesto 18**. (Ver anexo 2: imagen 15).

El compuesto 18 *in vitro* posee la afinidad más alta por las fibrillas amiloides, mostrando una constante de inhibición (K_i) de 36,9 nm, y demostrando que la longitud del puente conjugado juega un papel crítico en la unión al Ab. Otra característica importante de esta sonda es su capacidad para aumentar la intensidad de fluorescencia tras la unión a los agregados de Ab. Esta molécula mostró baja toxicidad, buena estabilidad en el suero e interacciones débiles con la seroalbúmina, es capaz de cruzar la BHE y podría ser rápidamente eliminada del cerebro. Estos resultados confirmaron que el compuesto 18 cumple los requisitos para una sonda NIR ideal (5).



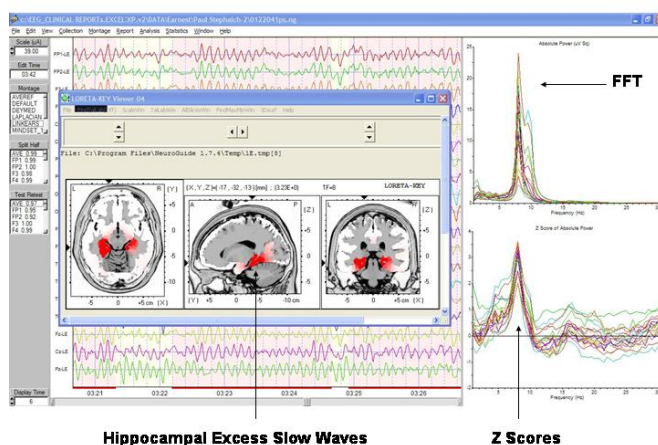
ELECTROENCEFALOGRAMA

Las fuentes corticales de los ritmos delta (2-4 Hz) y los ritmos alfa (8-10.5 Hz) electroencefalográficos de estado de reposo (EEG) muestran una actividad anormal (es decir, densidad de corriente) en pacientes con demencia debida a la EA. Se registraron datos EEG con ojos cerrados de reposo en 19 pacientes con demencia y 40 sujetos sanos. Las bandas de frecuencia de EEG de interés eran delta y alfa de baja frecuencia. Las fuentes de EEG se estimaron en estas bandas mediante tomografía electromagnética cerebral de baja resolución. Los resultados mostraron que, en comparación con el grupo de sujetos sanos, el grupo con AD indicó una mayor actividad de las fuentes delta y menor actividad de las fuentes alfa de baja frecuencia en una región cortical de interés. (10).

Electroencefalografía cuantitativa (qEEG) es un método de reconocimiento de patrones estadísticos, que proporciona resultados prometedores. Se ha comparado el valor de diagnóstico de qEEG-SPR con la imagen estructural y con biomarcadores del líquido ceforraquídeo (LCR). Un total de 511 individuos fueron reclutados a partir de un estudio multicéntrico NORD EEG (141 controles sanos, 64 con deterioro cognitivo subjetivo, 124 con DCL, 135 con EA, 47 con otras demencias). Los datos EEG se registraron de manera estandarizada. Los datos de imagen estructural se evaluaron visualmente mediante escalas de atrofia en la corteza medial temporal, frontal y posterior.

La adición de qEEG al estudio de diagnóstico aumenta sustancialmente la detección de la patología de EA incluso en etapas pre-demenciales y mejora el diagnóstico diferencial. El EEG podría servir como un buen complemento a los biomarcadores de demencia actualmente establecidos, ya que es barato, no invasivo y ampliamente aplicado fuera de los centros académicos (11).

Simultaneous NeuroGuide and LORETA in an Early Stage Alzheimer's Patient



BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Los marcadores basados en determinaciones bioquímicas pueden obtenerse en LCR, plasma y orina. Pero requieren un trabajo adicional importante en cuanto a la protocolización de los procedimientos de extracción y análisis (13).

La disminución de la apolipoproteína E (**APOE**) y los niveles plasmáticos $\epsilon 4$ APOE, así como una variedad de otras proteínas del suero y LCR han sido evaluados como un valor predictivo de la EA en sujetos sin demencia y en pacientes con DCL. Dichos marcadores también podrían distinguir la EA de otras formas de demencia, y pueden identificar subgrupos de pacientes con EA en riesgo que progrese rápidamente. Sin embargo, el papel para estas mediciones en la práctica clínica no se ha establecido todavía. Se estudia a continuación la validación de estos y otros biomarcadores de suero y LCR emergentes para la EA con más detalle y de manera independiente (8).

Hasta el momento los marcadores más estudiados son **proteína tau** y el **péptido beta-amiloide ($\beta A-42$)** en el LCR. La determinación de marcadores en LCR se ha utilizado como apoyo para el diagnóstico de la EA en la fase precoz, el diagnóstico diferencial con otros procesos causantes de demencia, o con otras situaciones clínicas como el envejecimiento normal y la valoración del riesgo de progresión en pacientes con Deterioro Cognitivo Ligero (DCL) (4).

Biomarcadores en líquido cefalorraquídeo.

El LCR está en contacto directo con el espacio extracelular cerebral, por lo que puede suponerse que los procesos fisiopatológicos básicos que ocurren en la EA deben dejar su huella en éste (13). La obtención de LCR es mediante una punción lumbar, que

es una desventaja por ser una técnica invasiva y no se puede repetir frecuentemente para un seguimiento de la evolución de la EA o del tratamiento.

Proteína β -amiloide. Diversos estudios han mostrado de forma consistente que los niveles de A β 42 están disminuidos en la EA un 50% con relación a los niveles de la población control (13).

Tau total y fosfo-tau. Si se tiene en cuenta el papel que tiene la proteína tau en los ovillos neurofibrilares, es lógico que se haya estudiado el potencial de la determinación de los niveles de tau en el LCR como biomarcador en la EA. En estudios transversales¹ se han demostrado incrementos de tau en pacientes con EA que duplican o triplican el valor encontrado en controles sanos. Los estudios revelan que los niveles de estas formas fosforiladas son más específicos para la EA, y en concreto la determinación de fosfo-tau treonina 231 distinguía entre pacientes con EA y otras enfermedades neurodegenerativas con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 97% (13).

Combinaciones de A β 42 y fosfo-tau. El hallazgo de la disminución de A β 42 sirve para reflejar el depósito acelerado de la proteína amiloide en los tejidos cerebrales, y una concentración elevada de tau y de tau fosforilada se considera que son una expresión de los ovillos neurofibrilares (3). En un estudio de cohortes prospectivo², se encontró una baja relación de A β 42 frente a los niveles de tau entre:

- ◆ más de 30 % de los voluntarios sanos,
- ◆ más de 50 % de las personas con informes subjetivos de problemas de memoria, pero cognitivamente normales,
- ◆ y casi un 70 y 80 % para sujetos con demencia cognitiva leve no amnésica (naDCL) y demencia cognitiva leve amnésica (aDCL).

Este perfil se asocia con el deterioro cognitivo en los dos grupos con DCL y es predictiva de la EA en pacientes con aDCL (3).

La aplicabilidad de estos resultados a la población general no está clara, y estas pruebas no tienen un papel establecido en la evaluación de pacientes con DCL en la

¹ Es un tipo de **estudio** observacional y descriptivo, que mide a la vez la prevalencia de la exposición y del efecto en una muestra poblacional en un solo momento temporal; es decir, permite estimar la magnitud y distribución de una enfermedad en un momento dado

² Un **estudio de cohortes** es un estudio epidemiológico, observacional, analítico, longitudinal prospectivo, en el que se hace una comparación de la frecuencia de enfermedad entre dos poblaciones, una de las cuales está expuesta a un determinado factor de riesgo al que no está expuesta la otra.

práctica clínica. La sensibilidad de la cuantificación combinada de la proteína tau y la β A-42 es muy alta, para el diagnóstico de EA. Existen problemas en cuanto a su especificidad, ya que la combinación de los niveles de éstas proteínas en LCR no es exclusiva de la EA y éstas pueden alterarse en otras enfermedades neurodegenerativas causantes de demencia, debida, entre otras causas, a la presencia de copatología (4).

En 2014 un meta-análisis de 14 estudios observacionales que evalúan A β 42 en LCR como una herramienta para predecir la conversión del DCL a la EA encontró una variación significativa en los umbrales de ensayo, lo que impidió estimar la sensibilidad y especificidad medias. La sensibilidad en los estudios individuales varió de 36% a 100% y la especificidad variaron entre 29% y 91%. Los autores concluyeron que la reducción de A β 42 en LCR es de utilidad clínica marginal. Además, los ensayos para marcadores de DCL pueden variar, lo que sugiere la necesidad de una mejor estandarización del ensayo. La ausencia de un tratamiento clínico imperativo para DCL hace esta prueba invasiva relativamente menos atractiva en este momento (3).

Otro meta-análisis se realizó para determinar la exactitud de los niveles de β A en plasma y LCR para detectar a los pacientes con DCL que se convertiría en EA u otras formas de demencia con el transcurso del tiempo. De los 1349 participantes, 436 desarrollaron EA. Las estimaciones de sensibilidad de los estudios individuales estuvieron entre el 36% y el 100%, mientras las especificidades estuvieron entre el 29% y el 91%. Debido a la variación en los umbrales de ensayo, no se estimaron la sensibilidad ni la especificidad medias. Sin embargo, se obtuvieron estimaciones de sensibilidad a valores fijos de especificidad del modelo, que se ajustó para producir la curva ROC. A la especificidad mediana del 64%, la sensibilidad fue del 81% (IC del 95%: 72 a 87). Lo anterior se equiparó a un valor predictivo positivo (VP+) de 2,22 (IC del 95%: 2,00 a 2,47) y un valor predictivo negativo (VP-) de 0,31 (IC del 95%: 0,21 a 0,48) (9).

Sólo un estudio examinó la exactitud del A β 42 plasmático y la relación plasmática A β 42 / A β 40 para la demencia de la enfermedad de Alzheimer. La sensibilidad del 86% (IC del 95%: 81 a 90) fue la misma para ambos ensayos, mientras que las especificidades fueron de 50% (95% CI 44 a 55) y 70% (95% CI 64 a 75) A β 42 / A β 40 respectivamente. De los 565 participantes examinados, 245 desarrollaron demencia de Alzheimer y 87 otros tipos de demencia (9).

Biomarcadores plasmáticos

En seres humanos, aproximadamente 500 mL de LCR se absorben en la sangre diariamente, lo que hace a la sangre una fuente adecuada de biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas. La facilidad de una punción venosa en comparación con una punción lumbar permite repetitividad, lo que hace adecuada su aplicación en ensayos clínicos para el diagnóstico de la EA y evaluar tratamientos modificadores de esta enfermedad (6).

Un análisis de 120 proteínas de señalización en el plasma sanguíneo encontró 18 que podrían ser utilizadas para diferenciar los controles sanos de pacientes con AD. En una serie de 47 pacientes con demencia cognitiva leve (DCL); estas proteínas identificaron 20 de 22 pacientes, que desarrollaron EA clínica y ninguno de los ocho pacientes que desarrollaron demencia no EA (3).

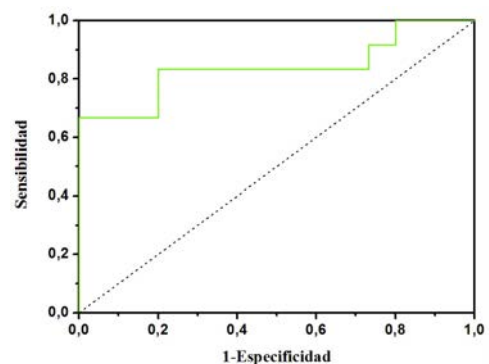
Espectroscopía vibracional infrarroja y Raman

Los espectros vibracionales se pueden considerar como huellas digitales utilizables en la identificación cualitativa o análisis cuantitativo de las especies moleculares en cuestión. En el caso del plasma sanguíneo utilizado como fuente de marcadores de la EA, los espectros vibracionales correspondientes serán el resultado de la superposición de espectros de las proteínas, péptidos, lípidos y metabolitos contenidos en el mismo.

Los lípidos son unos de los componentes del plasma más susceptibles al ataque por radicales libres inductores de peroxidación, generando productos muy reactivos. Compuestos hidroxilados (por ejemplo, isoprostanos, hidroperóxidos) son productos de la peroxidación lipídica y se han descrito como marcadores de daño oxidativo en la EA. La espectroscopía infrarroja es muy sensible a la presencia de grupos hidroxilo, que se hacen visibles no solamente a través de las bandas de tensión OH sino también a través de las de tensión C-O (Ver anexo 3: Imagen 16).

Los cambios de intensidad de algunas bandas infrarrojas puestos de manifiesto por espectroscopía de correlación bidimensional se han utilizado como marcadores de la EA en curvas ROC para evaluar pruebas diagnósticas. (Figura 3.

Curva ROC obtenida mediante la intensidad del perfil espectral entre 1639 y 1624 cm^{-1} medida en plasma sanguíneo de controles sanos y pacientes con EA en fase leve.)



Para diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer algunas regiones espectrales generan unas curvas ROC con un grado de exactitud en la clasificación de muestras superior al 80%. Por lo tanto, se satisface el criterio propuesto por el *National Institute on Aging (NIA)* en lo que respecta a la especificidad y sensibilidad que debe tener un biomarcador ideal para el diagnóstico de la EA. No obstante, se proseguirá potenciando este método con la inclusión de más controles sanos y pacientes afectados por la EA (6).

CONCLUSIÓN

Algunos de los biomarcadores son útiles en determinados casos, pero no en todos. Aún no se ha encontrado un marcador óptimo y único para diagnosticar y seguir el progreso de la EA. Por el momento parece probable que sólo un análisis combinado de varios biomarcadores permitiría obtener un diagnóstico específico de la EA en un futuro cercano. Pero hay que estandarizarlos para el uso clínico.

Bibliografía

1. **“Clasificación de los biomarcadores en las enfermedades del Sistema Nervioso Central”**; Biol. Fernando A. Gómez-Hernández, M en C. Aristides III Sampieri, Dra. Liliana Carmona-Aparicio; Acta Pediatría México; 2013; 34: p.171-172.
2. **“Biomarcadores moleculares: nueva herramienta en la biotecnología médica y ambiental”**; Gerardo Alfonso Anguiano Vega; Universidad Iberoamericana León. Entre textos. 2007; 5316: p.51-59.
3. <http://www.uptodate.com/contents/mild-cognitive-impairment-prognosis-and-treatment> **“Mild cognitive impairment: Prognosis and treatment”**; Eric M McDade, Ronald C Petersen, MD. 2016. Biblioteca UpToDate.
4. **“Efectividad y coste-efectividad de la determinación de las proteínas abeta-42, tau total y tau fosforilada en líquido cefalorraquídeo como biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer”**; L. Perestelo-Pérez. 2012. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Santa Cruz de Tenerife: Servicio Canario de la Salud.
5. **“Imaging of beta-amyloid plaques by near infrared fluorescent tracers: a new frontier for chemical neuroscience”**; Matteo Staderini, M^a Antonia Martín, M^a Laura Bolognesi, J. Carlos Menéndez. Neuron. 2014. 79 (6): p.1094–1108.
6. **“Sobre la espectroscopía vibracional en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer”**; P. Carmona, E. López-Tobar, M. Molina, A. Toledano. An Real Acad. Farm.; 2015. 81; (1): p.19-24.
7. <http://www.alzfae.org/alzheimer/98-alzheimer-faq/pautas-diagnostico> **“Pautas para su diagnóstico”**; Fundación Alzheimer España (FAE). 2015.
8. <http://www.uptodate.com/contents/clinical-features-and-diagnosis-of-alzheimer-disease?source=machineLearning&search=biomarcadores+snc&selectedTitle=26%7E150§ionRank=1&anchor=H406207357#H406207357> **“Clinical Features and Diagnosis of Alzheimer's Disease”**; David A Wolk, MD, Bradford C Dickerson, MD; 2016. Biblioteca UpToDate.
9. **“Plasma and cerebrospinal fluid amyloid beta for the diagnosis of Alzheimer’s disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI) (Review)”**; Ritchie C, Smailagic N, Noel-Storr AH, Takwoingi Y, Flicker L, Mason SE, McShane R; Cochrane Database of Systematic Reviews. 2014. 6. CD008782. DOI: 10.1002/14651858.CD008782.pub4

10. **“Cortical sources of resting state EEG rhythms are related to brain hypometabolism in subjects with Alzheimer’s disease: an EEG-PET study”**; Babiloni C; et.al; Neurobiol Aging. 2016. 48, p.122-134. DOI: [10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.021](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.021)
11. **“Electroencephalography is a good Complement to currently established dementia biomarkers”**; Ferreira D; et.al; Dement Geriatric Cognitive Disorders.; 2016. 42(1-2): p.80-92. doi: [10.1159/000448394](https://doi.org/10.1159/000448394)
12. **“¹¹C-PIB-PET for the early diagnosis of Alzheimer’s disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI) (Review)”**; Zhang S, N Smailagic, Hyde C, Noel-AH Storr, Takwoingi Y, R McShane, Feng J; Cochrane Database of Systematic Reviews. 2014. 7: CD010386. DOI: [10.1002/14651858.CD010386.pub2](https://doi.org/10.1002/14651858.CD010386.pub2).
13. **“Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer: definición, significación diagnóstica y utilidad clínica”**; M. Martín-Carrasco. Viguera. Psicogeriatría; 2009. 1 (2): p.101-114.
14. **“Pre-clinical detection of Alzheimer's disease using FDG-PET, with or without amyloid imaging”**; Mosconi L¹, Berti V, Glodzik L, Pupi A, De Santi S, de Leon MJ. J Alzheimers Dis. 2010. 20(3): p.843–854. doi: [10.3233/JAD-2010-091504](https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091504)
15. http://medmol.es/temas/procesamiento_app/ **“El procesamiento proteolítico de la proteína precursora de beta-amiloide (APP)”**; Medicina molecular de FIBAO. 2011.

ANEXOS

ANEXO 1. INTRODUCCIÓN

Lesiones Neuropatológicas Típicas de un Cerebro con Alzheimer

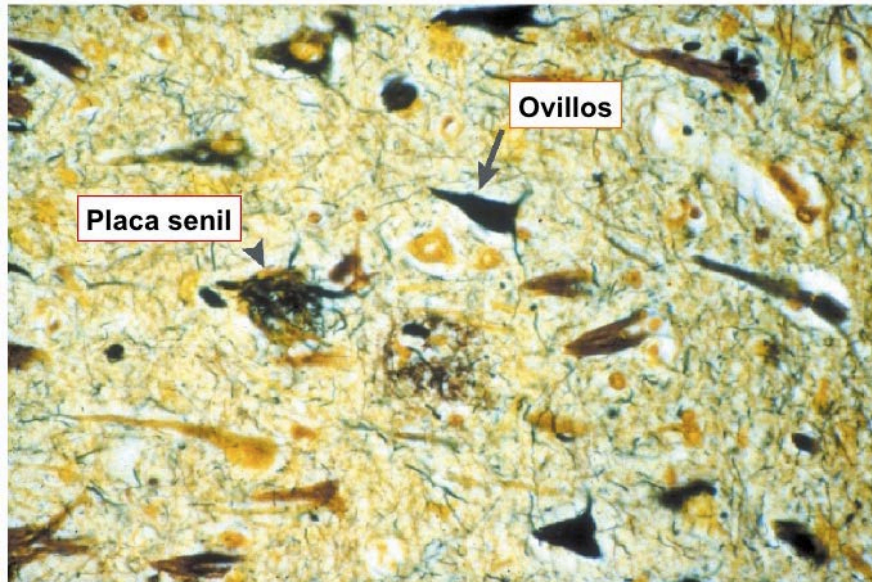


Imagen 1. Placas seniles y los ovillos neurofibrilares

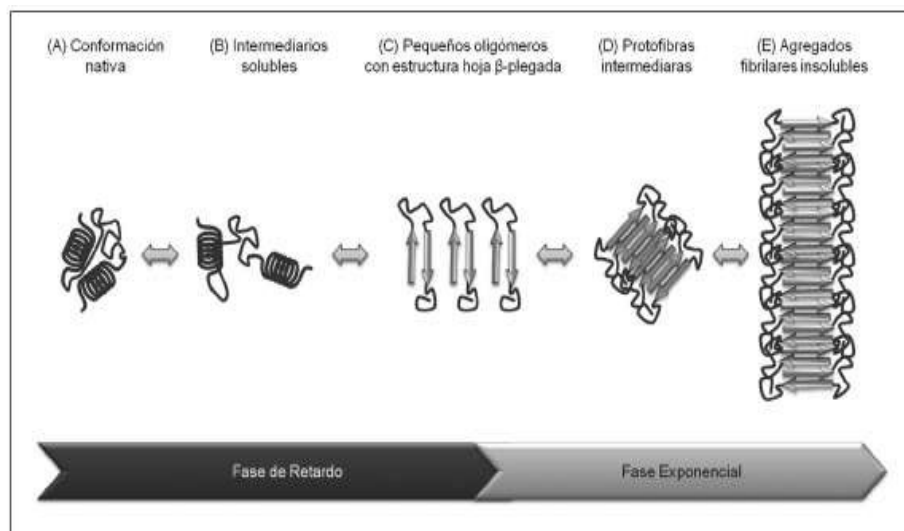


Imagen 2. Formación de las placas bA

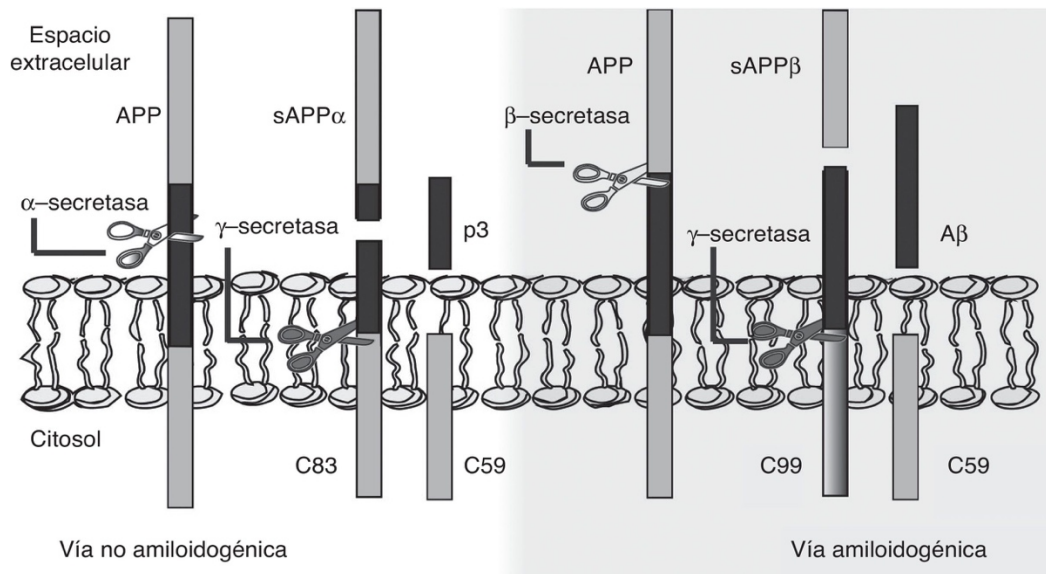


Imagen 3. El procesamiento proteolítico de la proteína precursora de beta-amiloide (APP): vía amiloidogénica.

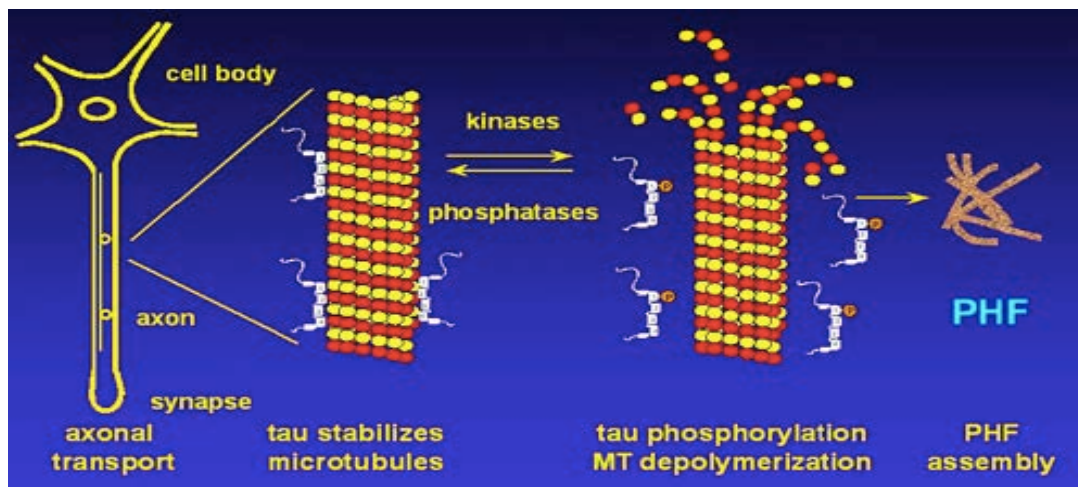


Imagen 4. El esquema señala que la proteína tau normal es importante para el transporte de moléculas a lo largo del axón (estabiliza los microtúbulos). La acción de ciertas quinasas le adosa moléculas de fosfato (las fosforila) y eso lleva a la “aglutinación” de la tau inactiva en los filamentos helicoidales pareados (PHF, del inglés), que caracterizan la degeneración neurofibrilar de las neuronas.

ANEXO 2. NEUROIMAGEN

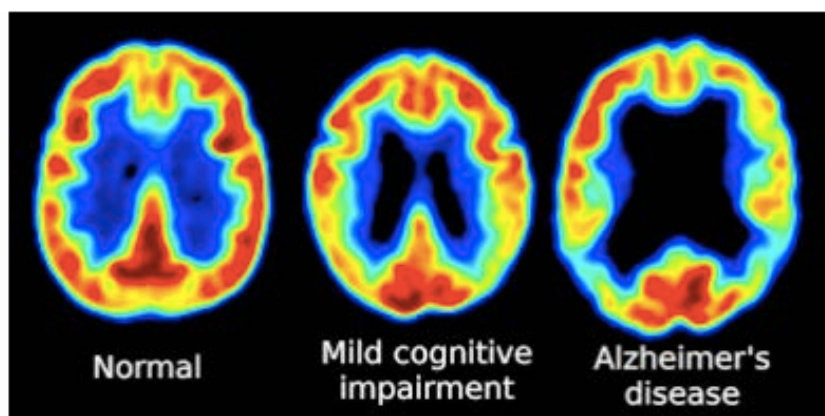


Imagen 5. Las imágenes de FDG-PET muestran un metabolismo de glucosa reducido en regiones temporales y parietales en pacientes con DCL y EA.

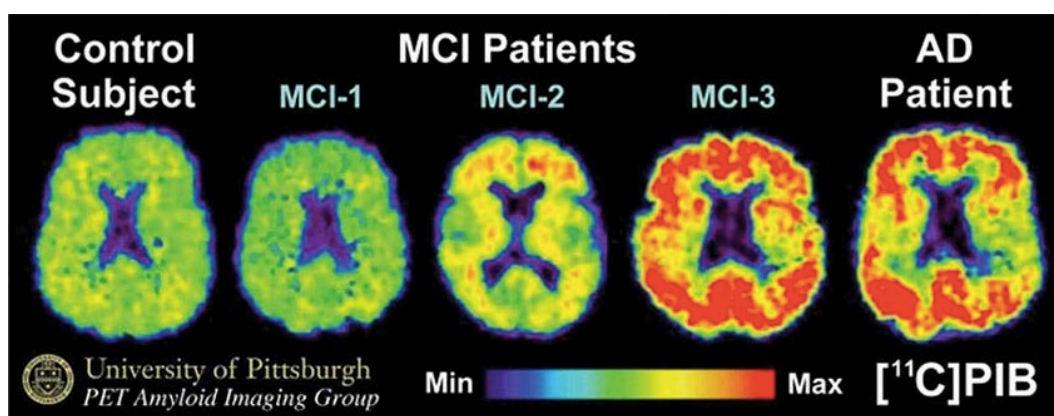


Imagen 6. Imágenes de tomografía de emisión de positrones (PET) obtenidas con ^{11}C -PIB unido a bA en un paciente control, 3 pacientes con DCL y un paciente con EA.

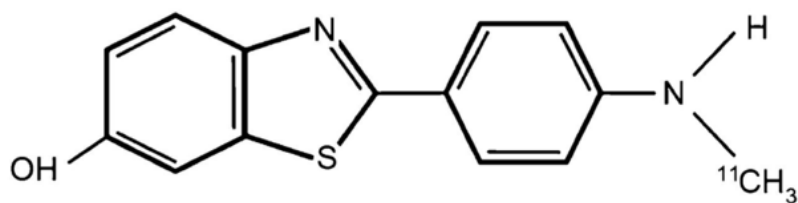


Imagen 7. ^{11}C -PIB

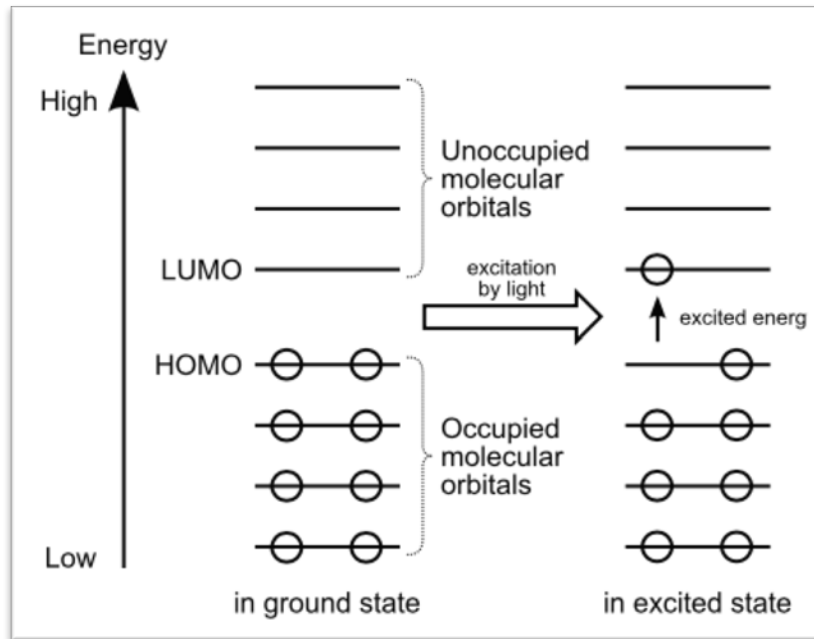


Imagen 8. Teoría de orbitales de frontera HOMO-LUMO

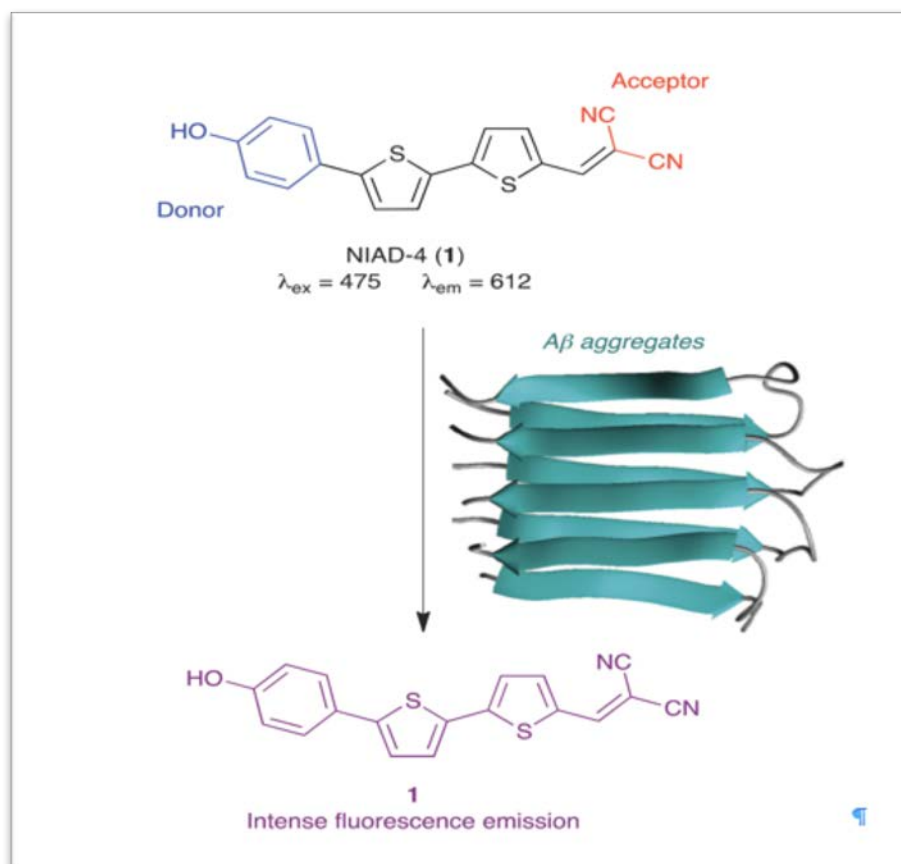


Imagen 9. La estructura push-pull de NIAD-4 (compuesto 1). Se observa una fuerte potenciación de la señal fluorescente cuando el compuesto 1 se une a los agregados beta-amiloides.

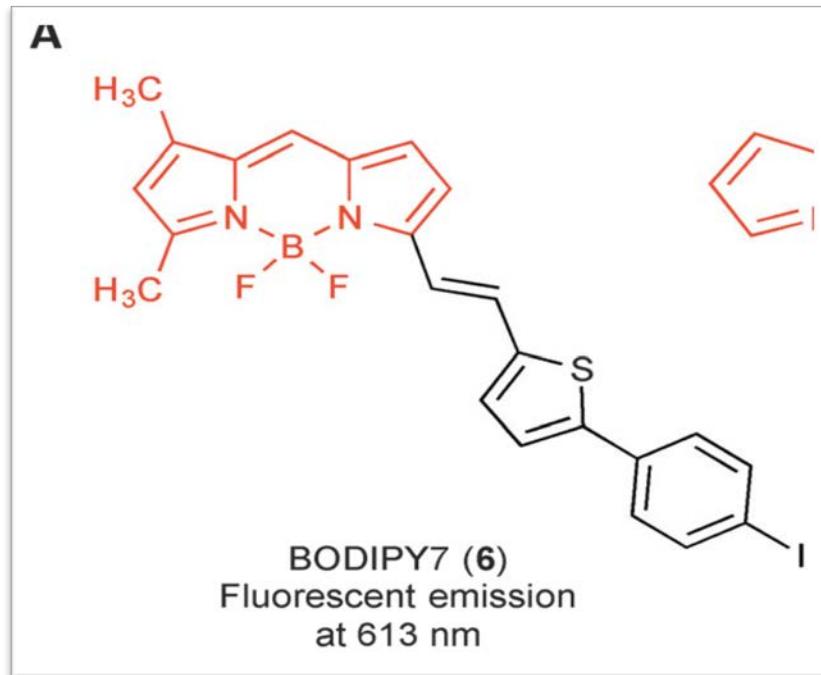


Imagen 10. BODIPY7.

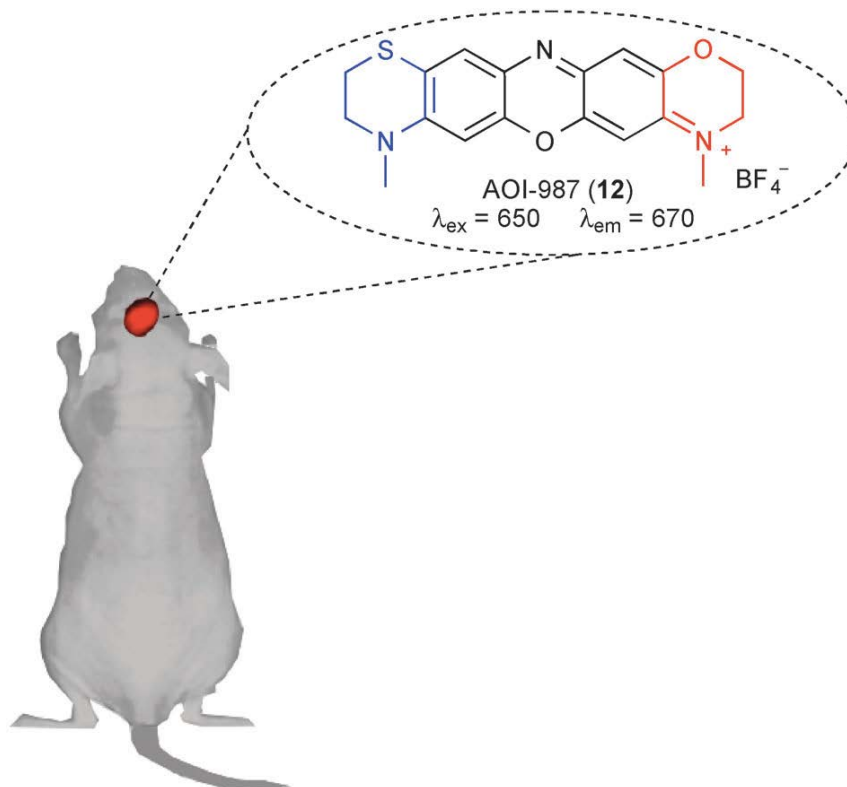


Imagen 11. AOI-987 permite la visualización *in vivo* de placas de βA en ratones transgénicos usando imágenes NIR.

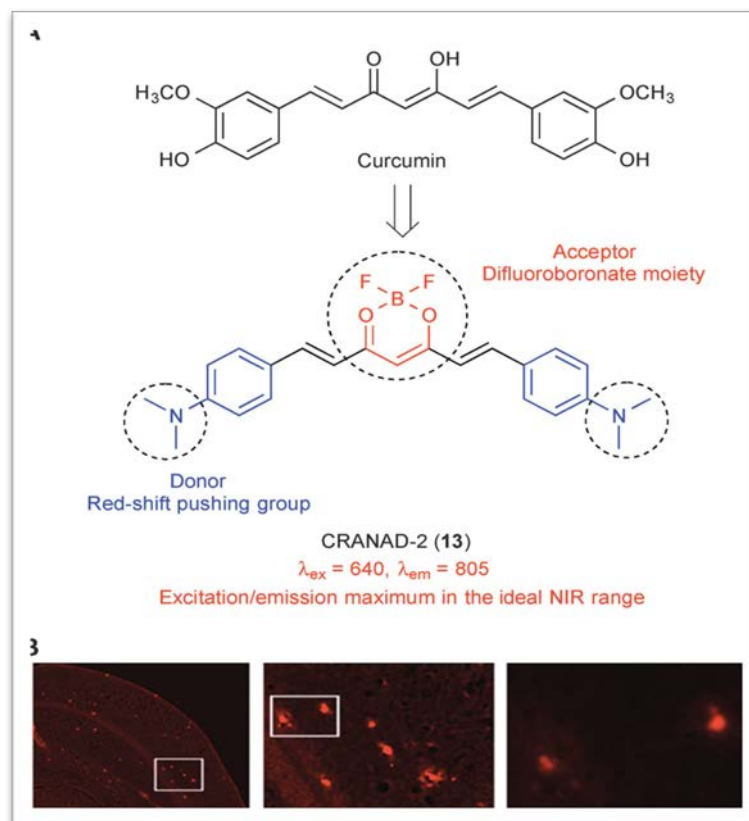


Imagen 12. Estructura química y propiedades fluorescentes de la curcumina y CRANAD-2. Tinción fluorescente con CRANAD-2 de secciones cerebrales de ratones transgénicos. Amplificación de izquierda a derecha

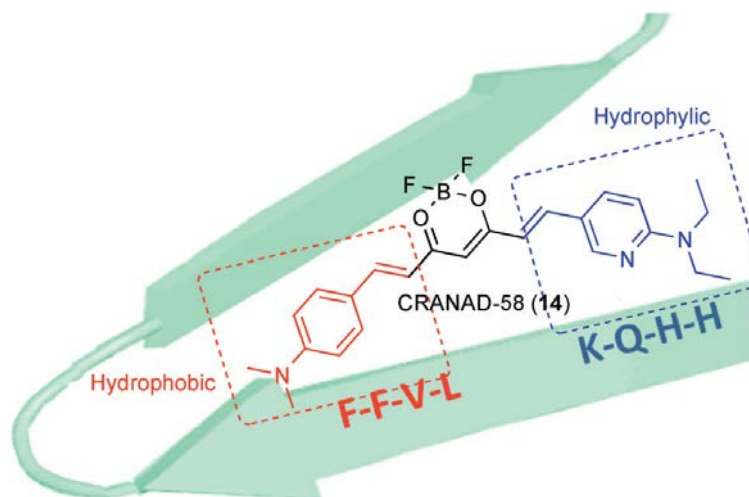


Imagen 13. CRANAD-58 muestra una fuerte afinidad por las fibrillas β A, que interactúan específicamente con sus segmentos hidrófobos (FFVL) e hidrófilos (HHQK) que dan como resultado un fuerte aumento del rendimiento cuántico de la fluorescencia.

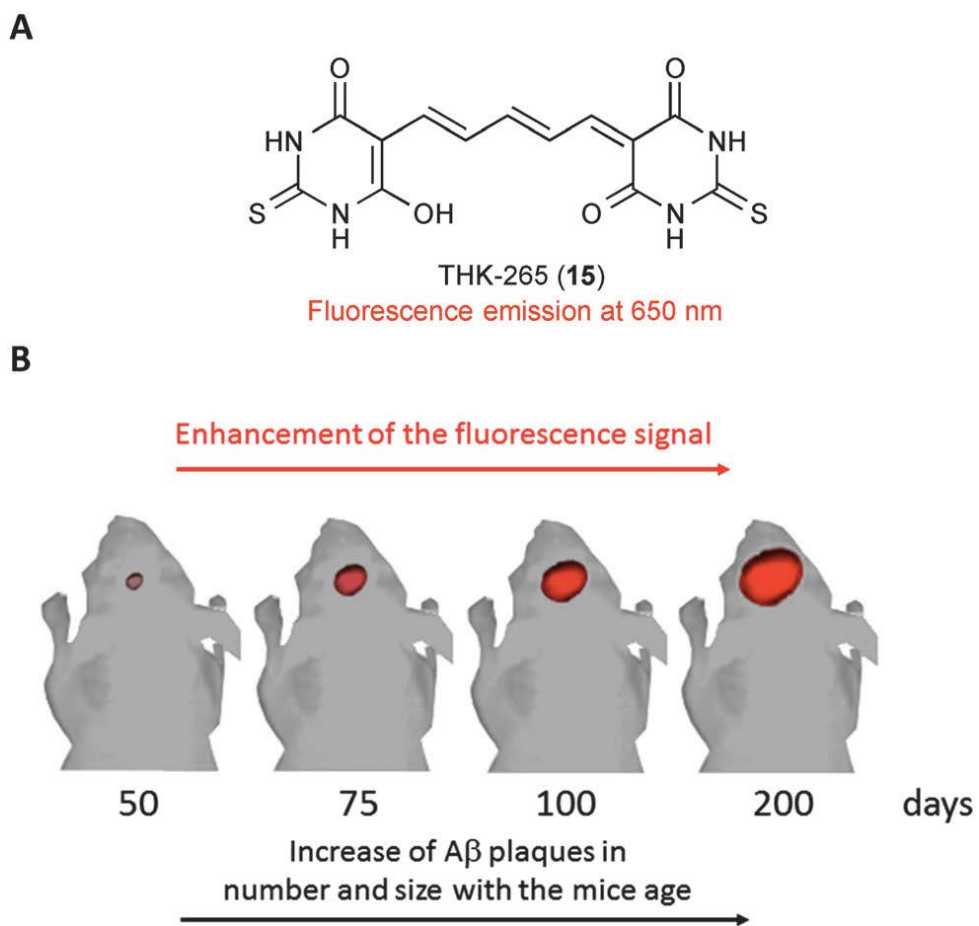


Imagen 14. A) Estructura química de THK Chemical structure. B) La intensidad de la señal de fluorescencia de THK aumenta con la edad creciente de los ratones.

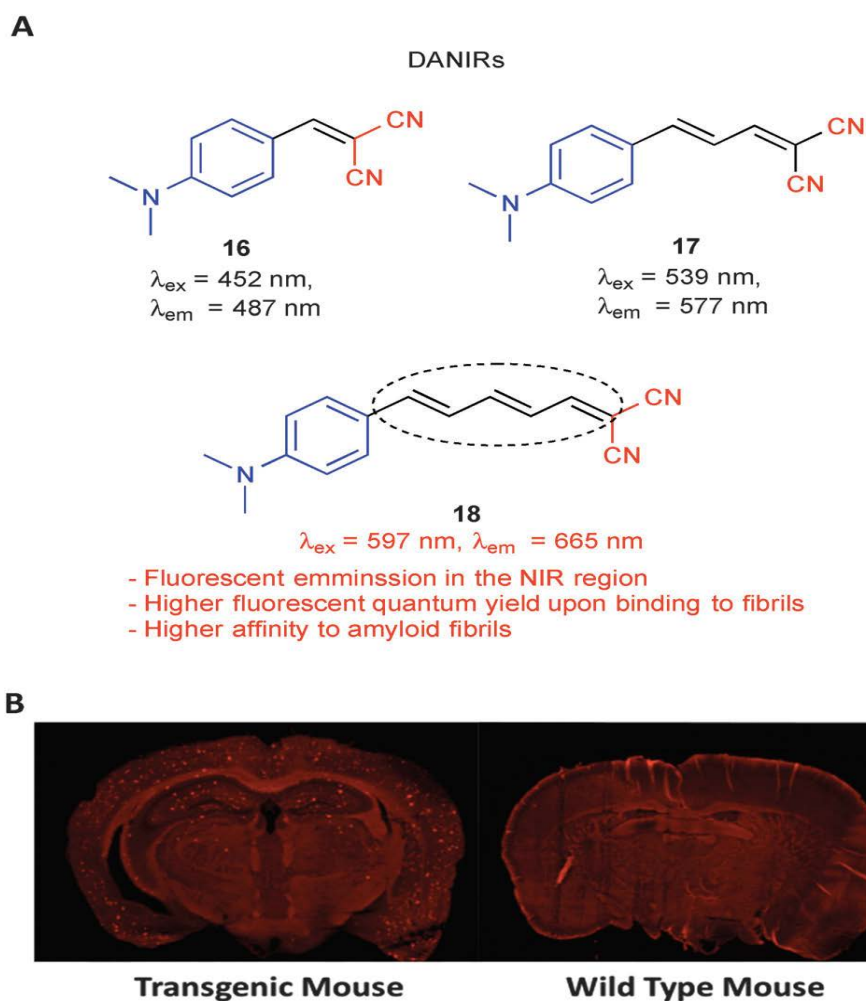


Imagen 15. A) Estructura química y propiedades ópticas de los compuestos 16-18. Debido a sus características fluorescentes favorables y alta afinidad por las fibrillas amiloides, se seleccionó el compuesto 18 para la obtención de imágenes NIR *in vivo*. B) Una tinción fluorescente con compuesto 18 de una sección cerebral de un ratón transgénico en comparación con la de un ratón salvaje.

ANEXO 3. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

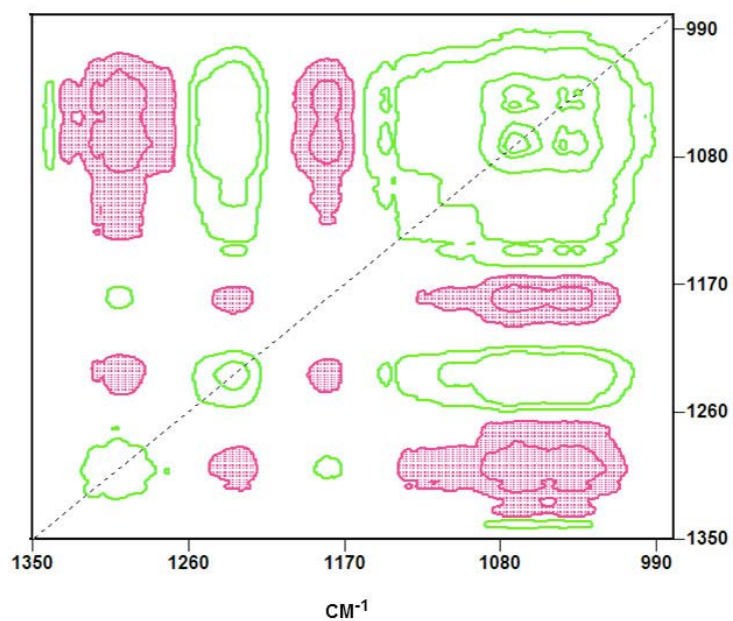


Imagen 16. Espectro síncrono obtenido a partir de espectros infrarrojos medios en la región $1350-980\text{ cm}^{-1}$ de plasma sanguíneo de controles sanos y pacientes con EA leve, moderada y grave.