



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**BIOMARCADORES Y BIOSENSORES PARA EL
DIAGNÓSTICO DEL ALZHEIMER**

Autor: Lucrecia Casado Lira

Tutor: María Pilar López-Alvarado Gutiérrez

Convocatoria: Junio 2017

RESUMEN

La enfermedad del Alzheimer (EA) afecta a un elevado número de personas a nivel mundial, se calcula que entre 18 y 22 millones de personas la padecen, con una prevalencia media entre el 3 y el 15 % y una incidencia anual entre 0,3 y 0,7 %, siendo la causa más frecuente de demencia en la actualidad.² Aun así, no se conoce ningún tratamiento que cure la enfermedad, ya que los fármacos utilizados actualmente únicamente aminoran la sintomatología. Tampoco se conoce una forma de diagnóstico precoz que permita actuar sobre ella a tiempo. La detección de la EA en etapas tempranas se ha convertido en uno de los principales focos de investigación en enfermedades neurodegenerativas. Su detección y diagnóstico temprano permitirían realizar ensayos clínicos e intervenciones eficaces cuando el daño neurológico es aún relativamente leve. Los nuevos criterios diagnósticos para la enfermedad de Alzheimer incluyen la posibilidad de practicar técnicas de neuroimagen o análisis del líquido cefalorraquídeo con el objeto de aumentar la certeza de que un paciente presenta un proceso neuropatológico relacionado con la EA. Ciertos biomarcadores del líquido cefalorraquídeo ($A\beta_{42}$ ó tau fosforilada) reflejan las características patológicas centrales de la EA. Estos procesos neuropatológicos se inician años antes de que sean notables los síntomas, por lo que se está determinando si estos biomarcadores pueden ser útiles en la detección precoz y prevención de la demencia. Por lo tanto, en este trabajo se van a describir los biomarcadores, tanto bioquímicos como de neuroimagen, más relevantes encontrados hasta la fecha.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la presencia de deterioro cognitivo y conductual, cuyo curso es progresivo. Su etiología es desconocida, aunque se considera una enfermedad de causa multifactorial y compleja, en la cual influyen la edad, la herencia genética, la dieta y el estado de salud. Es la causa más común de demencia, descrita inicialmente por el neurólogo alemán Alois Alzheimer en el año 1906. Entendemos por demencia la disminución de las funciones intelectuales del paciente, si lo comparamos con el nivel de funciones que tenía anteriormente.

Los síntomas de la enfermedad variarán de un individuo a otro, en función de cómo sea la condición física, personalidad y estilo de vida de la persona, pero generalmente se pueden agrupar en tres etapas de desarrollo: *etapa temprana*, *etapa intermedia* y *etapa tardía*, al tratarse de una enfermedad de curso progresivo. En la *etapa temprana*, se pueden experimentar lapsos de memoria y problemas para encontrar palabras adecuadas, es decir, una afectación de memoria episódica. Más adelante se pueden llegar a confundir u olvidar nombres de personas, lugares, citas y eventos recientes, se experimentan cambios de humor como consecuencia de todo lo anterior, ya que la

persona enferma llega a tener parte de conciencia de su enfermedad. Conforme la enfermedad avanza, se necesitará ayuda para efectuar todas las actividades diarias. El proceso degenerativo de la EA se inicia probablemente 20 ó 30 años antes del inicio de la sintomatología, pero al tratarse de una enfermedad gradual, es difícil precisar el momento exacto de su comienzo.

En los pacientes con EA, existe pérdida neuronal y la presencia de dos alteraciones típicas: la degeneración u **ovillo neurofibrilar**, y la **placa neurítica** o placa senil. El desarrollo de placas y ovillos en la estructura del cerebro es lo que lleva a la muerte de las neuronas.

El **ovillo neurofibrilar** es una lesión intracelular que afecta principalmente a las neuronas piramidales, están formados de filamentos helicoides apareados compuestos de neurofilamentos y proteína tau hiperfosforilada. Su principal constituyente es la proteína tau, asociada a microtúbulos que se fosforilan anormalmente, lo que altera su solubilidad y unión con los microtúbulos.

Las **placas neuríticas** son focos microscópicos de depósitos amieloides extracelulares, que se encuentran en grandes cantidades en la corteza límbica y de asociación. Su componente principal es el beta-amieloide ($A\beta$) en forma filamentosa generado a partir del procesamiento proteolítico de una proteína de mayor tamaño, la β APP. Por lo tanto, a día de hoy, las proteínas principales que desempeñan un papel importante en el desarrollo del Alzheimer serían:^{3,4}

- **Proteína tau:** en el SNC, esta proteína promueve el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos requeridos para la morfogénesis y el transporte axonal. Tiene dos formas de controlar la estabilidad de los microtúbulos, sus isoformas y la fosforilación. Cuando se fosforila altamente reduce su afinidad por los microtúbulos. La fosforilación de tau la regula un grupo de cinasas, como la cinasa de serina/treonina (PKN). Una anormal fosforilación de la proteína tau, ha resultado ser clave en la EA, ya que conlleva a una atrofia celular y demencia.
- **Proteína precursora de amieloide (APP):** se trata de uno de los tres genes que codifican proteínas membranales tipo I con un gran dominio extracelular y una pequeña región citoplasmática. La APP contiene una secuencia que codifica para el dominio $A\beta$.³
- **Péptido amieloide ($A\beta$):** es generado por la acción de β y γ -secretasas sobre la APP. La proteólisis de APP resulta en la generación de péptidos $A\beta$ de varias longitudes. Los péptidos $A\beta$ son monómeros normalmente solubles que circulan a bajos niveles en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre. En los cerebros de pacientes con EA, la formación de placas fibrilares insolubles se facilita por un aumento y acumulo de péptidos $A\beta$. La forma predominante de péptidos $A\beta$ encontrada dentro de medio de cultivo celular condicionado y LCR es el péptido más corto $A\beta_{40}$. Sin embargo, $A\beta_{42}$ es la forma de péptido $A\beta$ inicialmente depositado dentro de las placas extracelulares de los pacientes con EA. La explicación de este

hecho puede ser que todas las mutaciones identificadas dentro de APP conducen a la producción aumentada de $A\beta_{42}$. Adicionalmente, $A\beta_{42}$ tiende a agregarse a una velocidad más rápida y a unas concentraciones más bajas que la forma AB_{40} .

Los pacientes con EA también **tienen deficiencia de algunos neurotransmisores en el cerebro**. Los síntomas dementes se deben a que las neuronas que sintetizan y liberan *acetilcolina* sufren una degeneración grave. También se encuentran alterados los niveles del *aminoácido glutamato*, que se trata del principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (SNC), y su interacción con receptores específicos en las membranas neuronales es responsable de múltiples funciones como el movimiento, la cognición, la memoria y la sensación ya que las grandes células piramidales, que son las neuronas más afectadas en la EA, utilizan glutamato como neurotransmisor y reciben aferencias de este aminoácido. La alteración glutamatérgica más importante hallada en la EA es el aumento del nivel de mismo, lo que su vez aumenta la activación de los receptores de glutamato, la entrada de calcio en la célula, el arranque de mecanismos de excitotoxicidad indirecta, y la muerte neuronal. Como consecuencia de ello, el tratamiento farmacológico de la enfermedad del Alzheimer se centra en estos dos neurotransmisores, la *acetilcolina* y el *glutamato*, ambos relacionados con la función de la memoria y aprendizaje. Actualmente existen tres estrategias de tratamiento de la enfermedad: los anticolinesterásicos, los moduladores glutamatérgicos y los reguladores de factores neurotróficos. Ninguno de ellos cura la enfermedad sino que tienen efecto sobre sus síntomas.

Hasta la fecha, para el diagnóstico de la EA se necesitan descartar ciertas condiciones como infecciones, deficiencias vitamínicas o tumores cerebrales entre otras. Además de evaluar la memoria y habilidades cognitivas, puede realizarse una tomografía computerizada o una resonancia magnética. Sería necesario poder realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad para llevar a cabo ensayos clínicos de fármacos modificadores del curso evolutivo de la enfermedad y mostrar su eficacia en fases lo mas iniciales posibles. Actualmente, el diagnóstico de la EA se basa en la aplicación de criterios clínicos, ya que a día de hoy no se han establecido marcadores biológicos con la fiabilidad y especificidad necesaria. El diagnóstico clínico de la EA es inexacto en un 10-15% de los casos y los biomarcadores pueden ayudar a la precisión del diagnóstico.

Un **biomarcador** es una sustancia o molécula bioquímica que se puede medir y evaluar como un indicador de procesos normales o patológicos. Puede utilizarse para diagnosticar una enfermedad, para establecer su gravedad, para seguir su progresión o para monitorizar la respuesta a medidas terapéuticas. Hasta la fecha, se ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda de biomarcadores de la EA que pudiesen ser considerados como un criterio indirecto de valoración clínica. Se han propuesto *determinaciones bioquímicas en líquido cefalorraquídeo (LCR), plasma y orina*, además de

exploraciones realizadas con *técnicas de neuroimagen o marcadores genéticos*. Los requisitos que debería cumplir un biomarcador ideal para la enfermedad de Alzheimer son: ⁴

- Estar relacionado con un rasgo fundamental de la fisiopatología.
- Estar validado en casos confirmados por el estudio neuropatológico.
- Tener una sensibilidad superior al 85% para detectar EA y una especificidad de más del 75% para distinguir la EA de otras causas de demencia, establecidas preferentemente mediante dos estudios independientes con muestras adecuadas.
- Ser preciso, fiable y barato.
- De utilización cómoda y no lesiva para el paciente
- Ser capaz de apreciar la progresión de la enfermedad y la eficacia de las intervenciones terapéuticas.

Los biomarcadores que se están estudiando actualmente para la EA son los biomarcadores clasificados como **bioquímicos**, que serían aquellos que encontramos en el LCR (formación y acumulación de placas amieloides). Pero además, se está empezando a dar una considerable importancia a los **biomarcadores de neuroimagen**, cuyo fundamento se basa en la introducción de moléculas en el organismo con afinidad por un biomarcador bioquímico determinado de tal manera que pueda ser detectado mediante una técnica de imagen desde el exterior, es decir, actuarían como **biosensores**.

Actualmente, se está barajando la utilización de **agentes teragnósticos** para abordar tanto el diagnóstico como el tratamiento de la EA entre otras patologías. Los agentes teragnósticos son pequeñas moléculas que además de facilitar el diagnóstico de la lesión, poseen capacidad terapéutica, lo que permitiría por un lado, mejorar la detección precoz de la lesión y la clasificación del riesgo del paciente de una manera no invasiva y por otro, su tratamiento. En la EA se están estudiando moléculas teragnósticas cuya finalidad sería la unión selectiva a las placas β -amieloides, permitiendo así obtener una imagen mediante métodos no invasivos para realizar el diagnóstico, y además que retardasen la evolución de la enfermedad actuando sobre estos depósitos.

OBJETIVOS

- Conocimiento de la **etiopatogenia** de la enfermedad del Alzheimer y posibles abordajes terapéuticos.
- Evaluación del **tratamiento farmacológico** que utilizan actualmente los sujetos que padecen de la EA.

- Concepto de **biomarcador**, **biosensor** y **agente teragnóstico**, y explicar cuáles podrían ser útiles para el diagnóstico de la enfermedad.
- Establecer una relación entre la etiología de la enfermedad con el uso de fármacos (para el tratamiento), biomarcadores (para el diagnóstico) y agentes teragnóstico (para el tratamiento y diagnóstico).

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo consiste en una revisión bibliográfica. Se obtuvo la información mediante la lectura de una serie de artículos, publicaciones en revistas y libros de texto relacionados con la enfermedad del Alzheimer. Estos últimos fueron encontrados en *Google Académico*, *Pub Med* y *Scifinder*, tres bases de datos científicos a las que podemos acceder desde internet. Para realizar la búsqueda se introdujeron términos de búsqueda enfocados a los objetivos del trabajo como ‘*biomarcador*’, ‘*tratamiento Alzheimer*’, ‘*theranostics*’, ‘*tracers*’, ‘*glutamato y Alzheimer*’, ‘*NIR tracers*’, entre otros. Todos los materiales de lectura estaban redactados en español o inglés. Además, tanto las revistas como los artículos fueron publicados entre los años 1999 hasta el 2017 (actual), de tal manera que se pudo apreciar los avances realizados en este campo a lo largo de los años.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

❖ Principales moléculas implicadas en la etiopatogenia de la EA

La etiología de la EA no está todavía claramente definida (**Figura 1**). Se sabe que existen determinados riesgos genéticos, como la presencia del gen para la ApoE4 o la presencia de mutaciones en las presenilinas 1 y 2 (proteínas de membrana), aunque estos riesgos genéticos tan sólo se relacionan con el 1-2% de los casos de EA. Lo que está claramente definido es el papel del péptido β -amiloide en el desarrollo de la enfermedad, cuyo procesamiento anómalo a partir de una proteína precursora amiloide (APP) va a dar lugar a la formación de las placas extracelulares por acúmulo de este péptido, y va a favorecer la hiperfosforilación de la proteína tau, lo que derivará a la formación de los ovillos neurofibrilares intracelulares. Independientemente del mecanismo implicado, se producirá un desequilibrio celular y se favorecerá la activación de la llamada ‘cascada de la apoptosis’, o muerte celular programa, que será la principal responsable de la muerte neuronal característica de esta patología y que comienza siendo más manifiesta en las neuronas de tipo colinérgico.

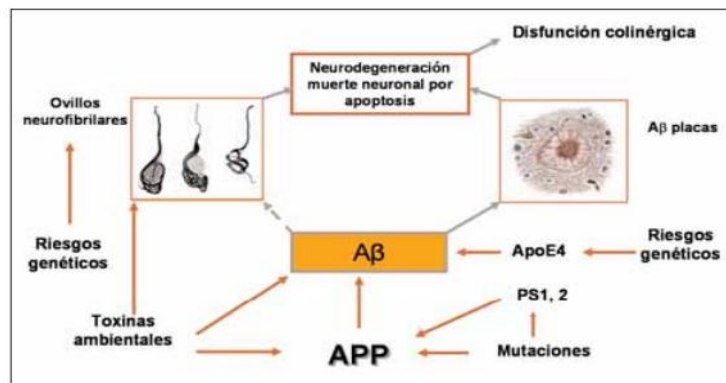


Figura 1. Patogénesis de la enfermedad del Alzheimer y posibles dianas terapéuticas.⁷

Si se tiene en cuenta este posible esquema etiopatogénico representado en la **Figura 1**, se podría deducir cuáles serían los posibles abordajes terapéuticos que pueden conducir a reducir la muerte neuronal y frenar el deterioro progresivo de los pacientes de EA. Así, evitar el procesamiento anómalo de la proteína precursora del péptido β -amiloide y favorecer su procesamiento hacia otros péptidos no amiloidogénicos podría evitar la formación de las placas de β -amiloide. Esta reducción de la producción de β -amiloide podría conseguirse mediante el uso de: bloqueadores de β -secretasa, bloqueadores de γ -secretasa (enzimas proteolíticas que escinden el péptido APP dando lugar a $A\beta$), activadores de α -secretas (enzima que escinde la APP por una posición distinta a las anteriores proteasas, produciendo productos diferentes a $A\beta$), estatinas, quelantes de β -amiloide, prevención de la formación de APP, incremento de la eliminación de β -amiloide por incremento de actividad proteasa.. También se sabe que determinados mediadores proinflamatorios, los radicales libres de oxígeno, los peróxidos lipídicos y determinados iones (Fe^{3+} , Al^{2+}) pueden favorecer la agregación del péptido, con lo que se formarían las placas de amiloide. En este sentido, algunos antiinflamatorios no esteroideos, los estrógenos, la vitamina C y la vitamina E (antioxidantes) se han propuesto como fármacos con potencialidad para reducir la agregación del péptido amiloide, de manera que pueden ejercer ciertos efectos neuroprotectores.⁷

❖ Tratamiento farmacológico de la EA

El tratamiento farmacológico de la enfermedad del Alzheimer está enfocado a aminorar la sintomatología, pero no cura la enfermedad. Podemos diferenciar entre ‘tratamiento de los síntomas de grado leve a moderado’ y ‘tratamiento de los síntomas de grado moderado a severo’.

- Tratamiento de los síntomas de grado leve a moderado

Los medicamentos utilizados para tratar estos síntomas iniciales son los llamados *inhibidores de acetilcolinesterasa*. Estos medicamentos pueden ayudar a retrasar los síntomas o impedir que

empeoren por un tiempo limitado. Dichos fármacos son: *galantamina*, *rivastigmina* y *donepezilo*. Éstos previenen la descomposición de la acetilcolina, neurotransmisor del cerebro, cuya pérdida en la EA se relaciona con la alteración cognitiva que se presenta. A medida que la enfermedad de Alzheimer progresa, el cerebro produce menos acetilcolina y por lo tanto, con el tiempo, los inhibidores de acetilcolinesterasa pueden perder su efecto, por ello se utilizan sobretodo en etapas tempranas de la enfermedad.⁶

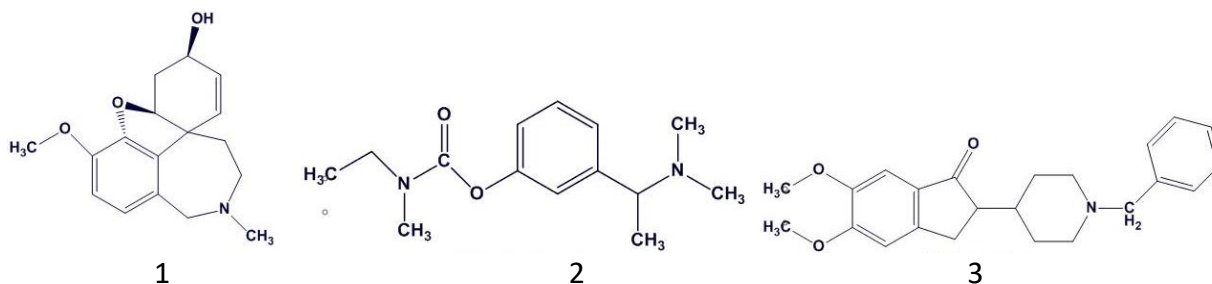


Figura 2. Molécula 1: *Galantamina*, Molécula 2: *Rivastigmina*, Molécula 3: *Donepezilo*

- Tratamiento de los síntomas de grado moderado a grave

El medicamento utilizado para el tratamiento de síntomas moderados o graves en etapas más avanzadas de la EA es la *Memantina*, un antagonista del N-metil D-aspartato (NMDA), receptor al cual se uniría el aminoácido glutamato. En personas con la EA que presentan niveles elevados de este aminoácido, al unirse el glutamato al receptor NMDA provoca un aumento de la entrada Ca^{2+} al interior de las neuronas, como consecuencia del aumento de calcio intracelular, las células se hinchan y estallan ocasionando la muerte neuronal. Por lo tanto, la *Memantina* actuaría regulando los niveles de glutamato y disminuyendo la muerte neuronal lo que ocasiona la disfunción cognitiva en estos pacientes. Debido a que los antagonistas del NMDA funcionan de manera muy distinta a la de los inhibidores de colinesterasa, los dos tipos de medicamentos pueden ser recetados en combinación.

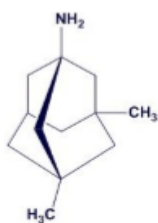


Figura 3. Estructura de *Memantina*

❖ Biomarcadores en LCR

Los biomarcadores basados en determinaciones bioquímicas para el diagnóstico de la EA que se van a analizar se sitúan principalmente en el líquido cefalorraquídeo (LCR). 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 dejan su huella en éste. Las lesiones patológicas características de la EA son los **ovillos neurofibrilares** y las **placas seniles** formadas por la acumulación neuronal de filamentos de tau anormal y depósitos de fibrillas extracelulares de β -amiloide respectivamente. Por lo tanto, los niveles de *proteína A β* y la *proteína tau* en el LCR se han convertido en marcadores biológicos principales de la patología relacionada con la EA.

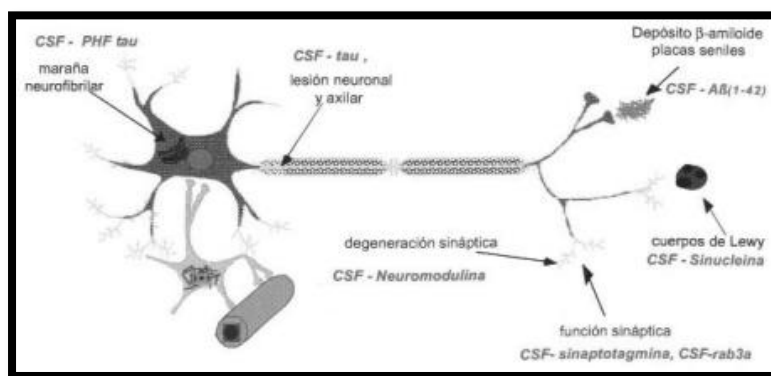


Figura 2. Marcadores biológicos en LCR utilizados en la EA y su localización.

Niveles de proteína β amiloide

El péptido beta-amiloide ($A\beta$), constituyente de las **placas neuríticas**, es un biomarcador interesante por la importancia que cobra en la EA debido a su aglomeración y como consecuencia, formación de depósitos extracelulares. Fue descubierto en el año 1984, cuando se pudieron solubilizar por primera vez fibras de β -amiloide obtenidas del cerebro de un paciente.

El **péptido $A\beta$** se genera a partir de dos cortes enzimáticos secuenciales de β -APP transmembrana, por las enzimas β -secretasa y γ -secretasa. Las especies predominantes de $A\beta$ son el péptido de 40 aminoácidos $A\beta$ 1–40 ($A\beta_{40}$) y el péptido de 42 aminoácidos $A\beta$ 1–42 ($A\beta_{42}$). Su forma amiloidogénica $A\beta_{42}$, es en la que se centran la mayoría de los estudios revisados. Diversos estudios han demostrado de forma consistente que los niveles de $A\beta_{42}$ están disminuidos en la EA en un 50% con relación a los niveles de la población control, mientras que los niveles de $A\beta_{40}$ y $A\beta$ total no difieren casi de los controles.¹⁹ De esta manera, a pesar de que $A\beta_{40}$ en el LCR representa una proporción mucho más alta que $A\beta_{42}$, los cambios en $A\beta_{40}$ no son tan marcados como los de $A\beta_{42}$. Este resultado muestra que $A\beta_{42}$ es un componente importante de las placas. En la EA hay una sobreproducción de $A\beta_{42}$, pero al depositarse en el parénquima cerebral hay una disminución en LCR. Aun así, este biomarcador no es específico de la EA.¹⁰

Tau total y fosfo-tau

Tau y tau fosforilada (p-tau) son biomarcadores potenciales de EA en LCR. Numerosos estudios han identificado tau total elevada en LCR, como característica de la EA. Sin embargo, tau total también puede encontrarse elevada en otras condiciones neurológicas.

Tau es una proteína involucrada en el ensamblaje de los microtúbulos mediante las subunidades de tubulina, y está ampliamente presente en el cerebro. Las acumulaciones intracelulares anormales de tau constituyen la segunda marca patológica característica de EA, en adición a las placas que contienen amiloide. Debido a que la EA es marcada por una fosforilación anormal de tau, p-tau puede ser más específica para la EA y permitir la discriminación de EA de otras condiciones con daño neuronal que cursen con p-tau elevada. Mediciones de p-tau en estudios recientes demuestran mejoría en la precisión del diagnóstico, y especialmente en la diferenciación de otras demencias.⁴

Dado que la proteína tau puede estar fosforilada a distintos niveles, se ha estudiado si existen diferencias entre el comportamiento como biomarcador de los niveles de tau total y de las formas de tau fosforilada. 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* distinguida entre pacientes con EA y otras enfermedades neurológicas.^{11,5}

Combinaciones de $A\beta_{42}$ y fosfo-tau

La probada utilidad de $A\beta_{42}$ y proteína tau como biomarcadores ha llevado a su uso combinado. Hoy en día existen varios estudios en los cuales la ejecución del diagnóstico de la combinación de p-tau en LCR y $A\beta_{42}$ ha sido evaluada, y se ha obtenido una mejoría del diagnóstico comparado con el uso de cualquier método aislado. Las concentraciones de tau total, p-tau y $A\beta_{42}$ parecen estar ya alteradas en los pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL), que posteriormente evolucionarán a EA, por lo que se trata de una excelente herramienta de diagnóstico para poder identificar a los sujetos con DCL con mayor riesgo de evolucionar hacia la EA, es decir, de diagnóstico precoz. En la mayoría de los estudios, la sensibilidad y la especificidad para la combinación de estos dos biomarcadores han sido ligeramente elevadas, con relación a tau total y $A\beta_{42}$ solas.¹²

❖ **Técnicas de neuroimagen para el diagnóstico de la EA**

En la actualidad se pueden utilizar diversas *técnicas de neuroimagen* en el estudio del paciente con deterioro cognitivo. Su utilidad e indicaciones varían en función de cada paciente, y a menudo son complementarias:

- **Tomografía computerizada (TAC).** En pacientes con EA esta técnica cobra interés a la hora de descartar otras lesiones, tumores, infartos etc. que pueden presentarse con la demencia. También tiene una buena resolución para detectar lesiones vasculares, aunque menor que la **resonancia magnética (RM)**. Su valor en el diagnóstico diferencial de las demencias degenerativas es escaso, pero al ser más económica, rápida y disponible que la RM se utiliza mucho.
- **Resonancia Magnética.** Se puede utilizar por las mismas razones que la TAC craneal, en general con imágenes de mayor definición anatómica y con la posibilidad de aumentar la especificidad en el diagnóstico de diferentes causas de demencia. La *resonancia magnética nuclear* es una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de la EA y se basa en la absorción y emisión de energía por determinados núcleos atómicos los cuales son sometidos a un campo magnético de elevada intensidad.¹³
- **SPECT (tomografía computerizada por emisión de fotón único).** Desde la década de 1980, numerosos estudios han demostrado una disminución de la perfusión cerebral en la corteza temporoparietal en la EA. Asimismo, esta técnica ha permitido diferenciar entre casos de DCL que evolucionaron a demencia de los que no lo hicieron.⁴

Esta técnica, al igual que PET, con el uso de radioligandos apropiados específicos para determinados elementos del espacio sináptico, permiten la obtención de imágenes y la cuantificación de sistemas de neurotransmisión. No obstante, la resolución del SPECT es notablemente inferior a la de la PET, lo que ha primado la realización de trabajos con esta última técnica.¹⁵

- **PET (tomografía por emisión de positrones)**

PET cerebral con fluorodesoxiglucosa (FDG-PET): Esta técnica se basa en la utilización de un radiofármaco (**2-flúor-2-desoxi-D-glucosa**). La FDG es un análogo de la glucosa. PET con FDG proporciona información sobre el consumo cerebral, tanto global como regional, de glucosa. El consumo de glucosa es un parámetro metabólico, relacionado con el funcionalismo cerebral. La PET está considerada como el método *in vivo* más exacto para la investigación del metabolismo del cerebro humano. La PET con FDG puede poner de manifiesto aumentos o disminuciones del metabolismo cerebral en numerosas enfermedades neurológicas. Los patrones de hipometabolismo son similares a las alteraciones de perfusión en el SPECT, pero la técnica es más sensible. Por ejemplo, la sensibilidad y especificidad para distinguir enfermedad de Alzheimer de controles es del 86%.¹⁴

Más recientemente, se han llevado a cabo estudios con PET empleando radioligandos que se acoplan directamente a las placas de β -amiloide, a la proteína tau o a ambos, que

permiten la visualización de estas proteínas anómalas *in vivo* o bien detectan la activación de la microglia. Una de estas sustancias es la denominada *Pittsburgh Compound-B* (PIB), un derivado de tioflavina que parece ser altamente selectiva para las placas β -amiloideas a las concentraciones empleadas en los estudios de neuroimagen. Además, los estudios también han demostrado la presencia de captación de PIB en un cierto número de controles sin demencia, lo que confirma los hallazgos previos de presencia de patología tipo Alzheimer en sujetos sin afectación cognitiva.

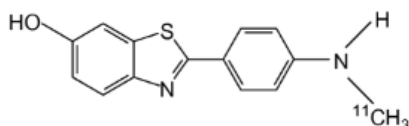


Figura 3. Estructura de *Pittsburgh Compound-B*

Se han desarrollado varios agentes estructuralmente similares al PIB. Uno de ellos es el denominado **18F-BAY94-9172**, un derivado estilbeno que parece poseer propiedades similares al PIB, pero con una vida media seis veces superior, lo que facilitaría su utilización clínica.

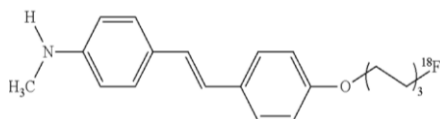


Figura 4. Estructura de *18F-BAY94-9172*

Por último, [**11C**] **BF-227** es un derivado bensoxazol que se une a $A\beta$ cerebral, pero con un patrón diferente al PIB. Según un estudio realizado en humanos, las imágenes de PET mostraron que la retención de [**11C**] BF-227 era significativamente mayor en las regiones cerebrales que se sabía que contenían placas $A\beta$ en pacientes con AE, que en los sujetos control.

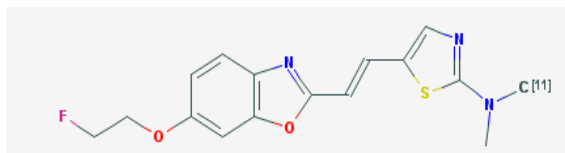


Figura 6. Estructura de [*11C*] *BF-227*

De manera generalizada, las técnicas de neuroimagen más utilizadas en este ámbito son la Imagen por **Resonancia Magnética** y la **Tomografía de Emisión de Positrones**.

Cada vez está cobrando mayor importancia la **Espectroscopia de Fluorescencia** por tratarse de una alternativa no invasiva para el diagnóstico precoz de la EA, ya que permite la visualización de biomoléculas *in vivo*, utilizando **biosensores** para ello. Es importante destacar que para su potencial aplicación *in vivo*, y crear imágenes de las placas β -amiloide, las sondas fluorescentes tienen que poseer características apropiadas incluyendo la capacidad de emitir fluorescencia en la región NIR (*near-infrared*). Trabajar en la región del NIR tiene las ventajas de la llamada “ventana biológica” (entre 650 y 900 nm): la absorción de la luz por parte del agua, la autofluorescencia o la absorción

por células y tejidos están minimizados. Esto incita al diseño de nuevos materiales fluorescentes que puedan ser excitados y que emitan en la región roja del visible o en el NIR. Un **biosensor** ideal de este tipo, además de absorber en el NIR, debe tener elevado coeficiente de absorción molar, así como ser fotoestable y ser funcional para su empleo como marcadores o indicadores fluorescentes.

Además, estas sondas deben cumplir los siguientes requisitos¹:

- Especificidad por las placas A β
- Poder cambiar sus propiedades de fluorescencia una vez que se han unido a las fibrillas
- Afinidad de unión elevada
- Rendimiento cuántico fluorescente elevado
- Desplazamiento de Stokes considerable
- Unión a la albumina del suero humano mínima
- Baja toxicidad

Tras ello, se realizó un **diseño de moléculas para la emisión en la región NIR**.¹

Si se aplica una cantidad adecuada de energía a una molécula, los electrones pueden ser desplazados desde un orbital molecular de baja energía a uno de mayor energía, ocupando orbitales vacíos, dando lugar a una transición que corresponde a una banda de absorción en el espectro. En el caso de los compuestos fluorescentes, los electrones del estado excitado regresan al estado fundamental por emisión de fotones, siendo este último fenómeno conocido como *fluorescencia*, ya que los electrones del estado excitado y fundamental están emparejados (*estado singlete*). La diferencia mínima de energía que puede existir entre un orbital lleno y un orbital vacío es la que encontramos entre el orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO) y orbital molecular vacío de menor energía (LUMO), llamado **intervalo HOMO-LUMO**, que está estrechamente correlacionado con la absorción y longitudes de onda de emisión.

Como consecuencia de ello, las sondas NIR han sido diseñadas con el objetivo de reducir el intervalo HOMO-LUMO de los colorantes amieloides existentes. Esto puede lograrse mediante una conjugación extendida de las moléculas, siendo así los sistemas π conjugados bases ideales para la construcción de sondas NIR y una manera eficaz de ajustar el nivel de intervalo de energía.

Una de las estrategias utilizadas para disminuir el intervalo HOMO-LUMO de un sistema π conjugado se basa en la presencia de grupos donadores de electrones (D) y grupos aceptores de electrones (A) como grupos terminales en ambos lados de la molécula, obteniendo de tal manera una *molécula "push-pull"*.

El grupo donador de electrones debe poseer un par solitario de electrones en un orbital π , siendo capaz de interactuar con los orbitales π -moleculares del sistema conjugado, aumentando la

energía de los orbitales HOMO. Por otro lado, la estabilidad de los orbitales de LUMO aumenta por la interacción con los orbitales antienlazantes del grupo π que retira electrones (grupo aceptor). Ambos efectos concomitantes conducen a la reducción del intervalo HOMO-LUMO. Entre los grupos donadores de electrones, el grupo *dimetilamino* es considerado como el mejor grupo donador, mientras que los grupos *formilo* y *ciano* se consideran aceptores óptimos.

Otro factor que se debe tener en cuenta para la disminución de dicho intervalo, es la diferencia de longitud entre enlaces dobles y simples (BLA '*bond length alternation*'), lo que afecta a la deslocalización de los electrones en la molécula. En un sistema conjugado, un enlace simple C-C tiene carácter parcial de doble enlace debido a la superposición de los orbitales π , y por lo tanto su longitud es ligeramente más corta que un enlace simple estándar. Además, debido a este solapamiento, aumenta la dificultad de la rotación de la molécula y como consecuencia, la estructura molecular tiende a adoptar una conformación planar (los orbitales π se superponen y se combinan mejor si la molécula es plana). Conociendo esto, si el BLA es cercano a cero significa que hay un gran solapamiento entre los orbitales π y consecuentemente el sistema está altamente conjugado y los electrones muy deslocalizados, llevando a una reducción del intervalo HOMO-LUMO.

Otro componente a destacar de estas moléculas, son los anillos aromáticos unidos por cadenas de etileno. Con esto se conseguía una disminución en la distancia entre niveles y ampliación de la longitud de onda absorbida, de tal manera que las bandas en el espectro se desplazaban hacia el rojo (región NIR).

Además, al unirse a los agregados βA , las sondas NIR suelen mostrar cambios en sus máximos de emisión y un desplazamiento en su máximo de absorción.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, diferentes factores influyen en la transición $\pi^* - \pi$, disminuyendo el intervalo energético entre HOMO y LUMO, incluyendo la extensión del sistema conjugado, la introducción de grupos dadores y aceptores de electrones como grupos terminales, la alternancia de la longitud del enlace y el grado de planaridad.

Considerando todos estos factores, se diseñaron una serie de **biosensores** con capacidad de emitir fluorescencia en la región NIR, algunos de ellos se presentan a continuación:

1. NIAD-4 y compuestos derivados

NIAD-4 fue la primera sonda NIR usada *in vivo* en ratones transgénicos para la obtención de imágenes de placas $A\beta$.

La molécula diseñada presenta la clásica estructura del modelo '*push-pull*', siendo el grupo donador *p-hidroxilfenil* y el grupo aceptor *dicianometileno*, ambos conectados por un sistema aromático π -conjugado, consiguiendo así una molécula altamente polarizada.

Una vez diseñada la molécula, se hicieron pruebas *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, obteniendo buenos resultados de unión a las placas A β , ya que se unía con elevada especificidad a éstas. El principal problema que presentó NIAD-4 fue que la emisión en la región NIR era débil, por lo que habría que utilizar un método invasivo para el diagnóstico de la EA.

Con el objetivo de mejorar las propiedades ópticas de la sonda NIAD-4, se diseñaron dos nuevas moléculas a partir de ella: NIAD-11 y NIAD-16.

NIAD-11 tiene un grupo hidroxilo adicional en el grupo fenilo, para reforzar el efecto donador, y en lugar de un grupo tiofeno, encontramos un grupo benzotienilo.

NIAD-16 se obtuvo reemplazando el grupo terminal hidroxilo de NIAD-4, por un grupo dimetilamino, aumentando los resultados de longitud de onda de máxima emisión.

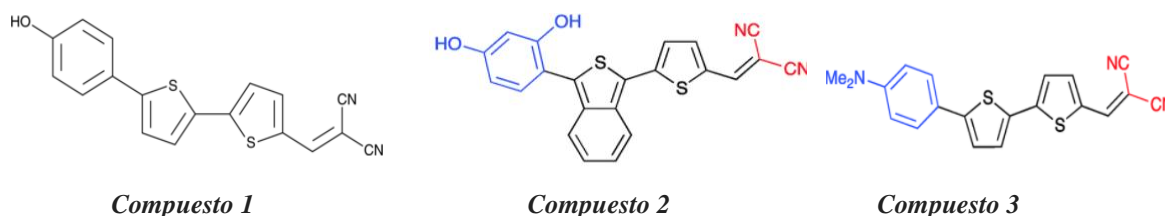


Figura 7. Compuesto 1: NIAD-4, Compuesto 2: NIAD-11, Compuesto 3: NIAD-16

2. Metoxi-X04 y politiofenos

Metoxi-X04 fue diseñado con el objetivo de mejorar algunos parámetros como fueron: un menor peso molecular, mayor carácter lipófilo y ausencia de carga para proporcionar una permeabilidad cerebral mucho mayor. Metoxi-04, presentó selectividad de unión por placas A β en estudios *in vitro*. En estudios *ex vivo* (*post mortem*), se comprobó que este biosensor poseía la capacidad de distinguir los agregados β -amiloideos con elevada resolución.

PTAA (politiofeno), fue otra molécula estudiada en este ámbito, con una estructura completamente diferente a las vistas hasta el momento. Se comprobó que la emisión en el espectro de este compuesto varía en función de la conformación que adopten las proteínas, pudiendo de tal manera, diferenciar las placas β -amiloideos del resto de tejido cerebral.

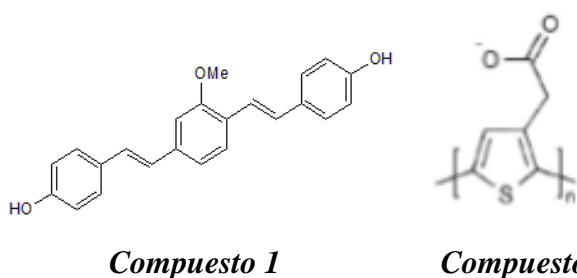
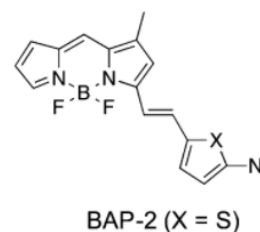
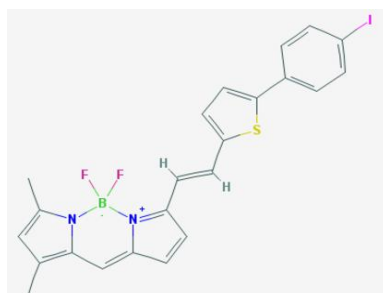


Figura 8. Estructuras moleculares
Compuesto 1: Metoxi-X04
Compuesto 2: PTAA

3. Dipirrolometanoborotanos (BODIPY)

La primera molécula que se obtuvo de este tipo fue *BODIPY7*, combinando el fragmento de dipirrolometanoboronato con otro de *NIAD-4*, pero ésta no dio buenos resultados en estudios *in vivo* en ratones transgénicos, por lo que se hicieron una serie de modificaciones basándose en la clásica estructura 'push-pull' (el grupo aceptor lo constituía *BODIPY* y el grupo donador un dimetilamino), que dieron lugar a una segunda molécula, *BAP-1*. Ésta tampoco cumplió los requisitos para su uso *in vivo*, lo que llevo a realizar nuevas modificaciones en esta última molécula, con la finalidad de aumentar la resolución de las imágenes de placas A β , obteniendo una tercera, *BAP-2*. Se reemplazo el grupo fenilo por un grupo tiofenilo. Esta molécula pareció resultar idónea para el diagnostico *in vivo*, ya que se absorbía y eliminaba adecuadamente del cerebro, pero tras la realización de pruebas *in vivo*, se pensó que este compuesto podría quedar retenido en el pericráneo y no lograr unirse a las placas β -amiloideas.

Figura 9. Estructura de *BODIPY 7*



4. AOI-987

Esta molécula permitió la visualización de placas A β *in vivo* mediante métodos no invasivos, lo cual fue demostrado tras la realización de estudios *in vivo* con ratones transgénicos. Se trata de un derivado de oxacina, de bajo peso molecular y elevada liposolubilidad. Gracias a su estructura conjugada, da lugar a longitudes de absorción y emisión dentro de la región NIR. A pesar de ello, tenía menos afinidad por las fibras A β que las moléculas *NIAD-4* y *derivados de BODIPY*, además de poseer baja intensidad de fluorescencia.

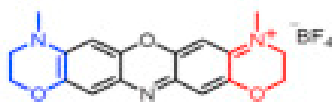


Figura 10. Estructura AOI-987

5. CRANAD-2 y CRANAD-58

La *curcumina*, colorante natural procedente de la Cúrcuma, demostró en estudios *in vitro* cualidades interesantes, como una disminución de los agregados β -amiloideos o de daños oxidativos, pero a su vez, mostró muchos inconvenientes a las dosis requeridas, por lo que se sintetizó una nueva molécula tomando como base su estructura química, ésta fue *CRANAD-2*. Este compuesto está formado por dos restos de curcumina (cambiando el grupo hidroxil fenilo por un grupo dimetilamino) conectados por un anillo de boronato, lo que permite la transición del par de electrones desapareados del oxígeno central al orbital vacío del boro, consiguiendo así una disminución del intervalo HOMO-LUMO.

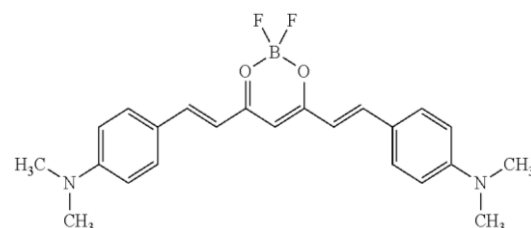


Figura 11. Estructura de CRANAD-2

Tras la realización de estudios *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* (examen histológico), CRANAD-2 cumplía la mayoría de los requisitos necesarios como sonda NIR, demostró una buena penetración en el cerebro, unión específica a las placas $A\beta$ pudiendo obtener imágenes *in vivo*. El inconveniente que presentó fue que para la obtención de imágenes, se utilizó la *fluorescencia de reflectancia de imágenes* como técnica NIR, teniendo ésta una baja resolución y bajo poder de penetración en el cerebro. La unión de CRANAD-2 a las fibras $A\beta$ resultó ser mediante la interacción de sus grupos fenólicos con sustituyente *N,N*-dimetilamino, a un segmento hidrofóbico y a otro hidrofílico que presentaban las fibras. Se observó que la unión de uno de los grupos con el segmento hidrofóbico era débil, por lo que se reemplazó dicho grupo por un anillo de piridina hidrofílico, reforzando dicha unión. Este nuevo compuesto fue CRANAD-58. Esta molécula se consideró adecuada para la obtención de imágenes NIR y la detección de especies solubles de $A\beta$, lo que podría ayudar a monitorizar la enfermedad desde sus inicios. Sin embargo, los microscopios de fluorescencia existentes hasta el momento, no tienen la resolución necesaria para visualizar *in vivo* y *ex vivo* la morfología de dichas especies solubles, lo que hace imposible validar la unión de CRANAD-58 a los péptidos $A\beta$ solubles.

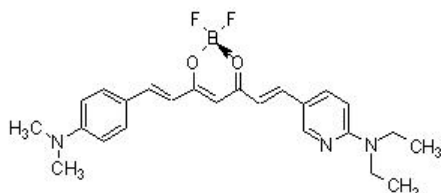


Figura 12. Estructura de CRANAD-58

6. THK-265

Este compuesto conjugado está formado por dos ácidos tiobarbitúricos, unidos por una cadena de pentadieno. Fue descubierto por screening virtual, y presentó buenas cualidades como sonda NIR debido a su correcta longitud de onda de emisión.

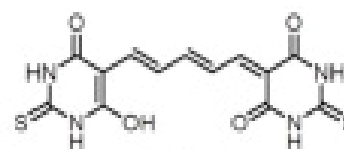


Figura 13. Estructura de THK-265

Su afinidad por las placas A β era mayor que la de AOI-987, además su absorción a través del tejido cerebral era buena. Estudios *in vivo* realizados en ratones transgénicos demostraron que THK-265 atravesaba la barrera hematoencefálica y que en el cerebro se unía selectivamente a las placas A β tras su administración intravenosa. Lo más importante fue que la intensidad de fluorescencia de THK-265 se correlacionó bien con la carga de la placa A β , lo que indica su potencial para monitorizar la progresión de la agregación de A β en la EA. El problema es la elevada sensibilidad necesaria para la monitorización de dichos depósitos a tiempo real.

7. DANIRs

Utilizando la clásica estructura 'push-pull', se sintetizaron unas nuevas sondas llamadas DANIRs. El donador de la molécula lo constituye un grupo dimetilamino, mientras que el aceptor es un grupo dicianometileno, unidos por una cadena de polimetina y se comprobó que al aumentar el número de enlaces dobles conjugados, aumentaba la afinidad por el β A.

Se realizaron estudios *in vitro* con muestras de pacientes con EA, dando lugar a una buena estabilidad en el suero humano, baja toxicidad, además de un aumento en la fluorescencia a mayor unión con las placas β A.

En estudios realizados *in vivo* con ratones transgénicos, éstas presentaron una buena absorción a través de la barrera hematoencefálica, y una excelente afinidad por los agregados A β , además de una velocidad de lavado rápida de la sonda no unida. También tiene propiedades ópticas favorables (longitud de onda de emisión a 665 nm), por lo que cumple con la mayoría de los requisitos como una sonda óptima para la formación de imágenes *in vivo* de placas A β .

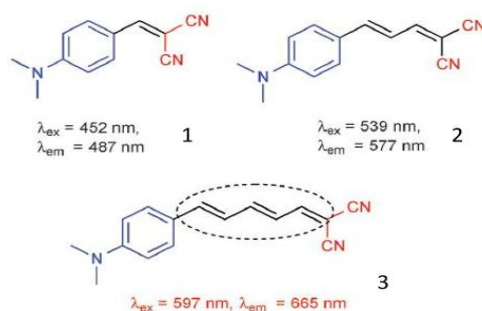


Figura 14. Estructura DANIRs

❖ Agentes teragnósticos

En los últimos años se ha estado investigando sobre un nuevo concepto de molécula que podría ser de gran utilidad en casos de EA. Se trata de moléculas que actúen como sondas fluorescentes, es decir, como biosensores con capacidad de detectar las placas β A, unirse a ellas con elevada especificidad, y que a su vez presenten propiedades terapéuticas, inhibiendo la agregación de este péptido evitando así un aumento en el depósito extracelular de β A. Este nuevo tipo de compuesto se conoce como **teragnóstico**, como su propio nombre indica, unificando ambas cualidades (diagnóstico y terapéutico).

Entre los últimos avances en este campo de la ciencia hay que resaltar el descubrimiento de que *derivados de estirilquinolinas* podrían ser usados en la EA, cumpliendo los fines anteriores ya que han demostrado en estudios *in vitro* la inhibición de la agregación β A.

Para validar el uso de estas moléculas como sondas NIR con afinidad por las placas β A, se estudio la fluorescencia que producían en medios polares y apolares, para estudiar la forma con la que interaccionaban con proteínas.

La molécula en estado sólido, dio lugar a un espectro fluorescente con un máximo de emisión dentro de la región NIR, además, demostró tener afinidad por las placas β A.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, esta molécula podría ser una buena opción para su aplicación *in vivo*.¹

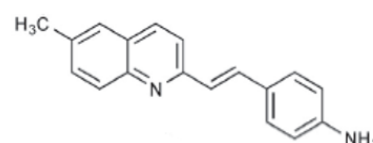


Figura 15. Estructura de un derivado de estirilquinolina.¹

CONCLUSIONES

La enfermedad del Alzheimer tiene una elevada prevalencia a nivel mundial, siendo una enfermedad fulminante debido a la progresiva disminución de la función cognitiva que va produciendo. Los fármacos existentes para tratar esta enfermedad no detienen la pérdida neuronal. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con capacidad de actuar sobre nuevas dianas clave en la EA, como por ejemplo, enzimas proteolíticas que aumentan la producción del péptido $A\beta$, podrían llegar a ser un avance importante para frenar el deterioro neuronal.

Los fármacos utilizados a día de hoy para tratar la EA, únicamente aminoran la sintomatología especialmente en etapas tempranas, pero los *inhibidores de acetilcolinesterasa* pierden su efecto a medida que progresa la enfermedad por disminución en la producción de acetilcolina del cerebro. Por otra parte, la *memantina*, utilizada para regular los niveles de glutamato, disminuyen la muerte neuronal, pero éste solo puede retrasar el progreso de la misma, no frenarla por completo.

Para los dos puntos anteriores, sería crucial el diagnóstico precoz de la EA. Por ello se ha hecho una revisión en este trabajo tanto de **biomarcadores** como de **biosensores**.

Respecto a los biomarcadores en el LCR, se ha demostrado que la combinación de los marcadores $A\beta_{42}$ y *p-tau* para el diagnóstico de la EA, han resultado tener una mayor sensibilidad y especificidad que ambos por separado. El problema que surge es que para la obtención de una muestra de LCR, hay que realizar una punción lumbar al paciente, siendo ésta una técnica invasiva de diagnóstico. Por ello, cada vez están cobrando mayor importancia las técnicas de neuroimagen, resaltando en este campo el uso del PET mediante la utilización de radioligandos. Estos últimos pueden mostrar en metabolismo cerebral, que se encuentra afectado en la EA, mediante el uso de **2-flúor-2-desoxi-D-glucosa**, o bien, se están estudiando otros radioligandos que presenten unión específica a las placas βA .

La técnica de neuroimagen que esta mas en auge, es la *Espectroscopia de Fluorescencia*, por ser una técnica no invasiva de diagnóstico precoz de la EA, ya que los biosensores utilizados son de administración intravenosa. Entre los revisados en este trabajo, los que parecen ser más prometedores para la obtención de imágenes de placas $A\beta$ *in vivo* son los DANIRs, por mostrar las cualidades requeridas para ello, además de dar buenos resultados en los estudios realizados hasta el momento. Ninguno de los biosensores ha sido probado en humanos, por lo que aún están en estudio.

Por último, los agentes teragnósticos podrían llegar a ser un método clave tanto de diagnóstico como de remisión de la enfermedad, pero al ser reciente su descubrimiento no hay muchos estudios que lo confirmen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Staserini M, Martin MA, Bolognesi ML, Menéndez JC. Imaging of β -amyloid plaques by near infrared fluorescent tracers: a new frontier for chemical neuroscience. *Chem Soc Rev* **2015**; 44(7): 1807-1819
2. Dr. Juan de J. Llibre Rodríguez y Dra. Milagros A. Guerra Hernández. Enfermedad del Alzheimer. Situación actual y estrategias terapéuticas. *Rev cubana de medicina*; **1999** [acceso 3 de abril de 2017]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75231999000200007
3. Herrera-Rivero M., Hernández Aguilar M.Elena, Manzo J., Aranda-Abreu E. Enfermedad de Alzheimer: inmunidad y diagnóstico. *Rev Neurol* **2010**; 51: 153-64
4. Martin-Carrasco M. Biomarcadores en la enfermedad del Alzheimer: definición, significación diagnóstica y utilidad clínica. *PSICOGERIATRIA* **2009**; 1: 101-14

5. Valls-Pediet Cinta, Molinuevo J.L, Rami Lorena. Diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer: fase prodrómica y preclínica. *Rev neurol* **2010**; 51: 471-80
6. Asociación Lucha contra el Mal de Alzheimer y alteraciones semejantes de la República Argentina [sede web]. Argentina: A.L.M.A; **2009** [acceso 10 de abril de 2017]. Tratamiento con medicamentos en la enfermedad de Alzheimer. Disponible en:
<http://www.alma-alzheimer.org.ar/tratamientos.php>
7. L. Gandía, R.M. Álvarez, J.M. Hernández-Guijo, J.M. González-Rubio, R. de Pascual, J. Rojo, L. Tapia. Anticolinesterásicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* **2006**; 42: 471-77
8. M. Martín-Carrasco. Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer: definición, significación diagnóstica y utilidad clínica. *PSICOGERIATRÍA* **2009**; 1: 101-14
9. Soto Claudio. Desentrañando los misterios del mal de Alzheimer: una enfermedad relacionada a alteraciones en la conformación de proteínas. *Ciencia al Día* **1999**, Vol. 2. Disponible en:
http://www.divulgacion.ccg.unam.mx/files/pdfs/docencia/proteinas/textos_apoyo/Alzheimer
10. Dr. Rafael Marcel Ranzola, Lic. Julio Junco Cuesta y Dra. CM. Olga L. González González. Artículo: Marcadores biológicos. Apuntes recientes en relación con la enfermedad de Alzheimer. *Medicentro* **2010**; 14: 59-67
11. Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Goernitz A, Andreasen N, et al. Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry* **2004**; 61: 243-53
12. Martínez Rivera M, Menéndez González M, Calatayud MT, Pérez Piñera P. Biomarcadores para la enfermedad de Alzheimer y otras demencias degenerativas. *Arch Méd* [Internet]. **2008** [acceso 8 abril de 2017]. Disponible en:
<http://archivosdemedicina.com/ojs/index.php/archmed/article/view/96/123>
13. Press GA, Amaral DG, Squire LR. Hippocampal abnormalities in amnesic patients revealed by high-resolution magnetic resonance imaging. *Nature* **1989**; 341:54-7
14. Tomografía de positrones (PET) cerebral con fluordesoxiglucosa-F18. *Rev. Esp. Med. Nuclear* **2002**; 21:38-40. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/1-s2.0-S0212698202720326/first-page-pdf>
15. Jagust W., Thisted R., Devous MD., SR Van HR, Mayberg H., Jobs K., et al. Spect perfusion imaging in the diagnosis of Alzheimer's disease: a clinical pathologic study. *Neurology* **2001**; 125: 1772-81