

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**Radiofármacos en uso y en exploración para el diagnóstico de
Alzheimer por tomografía de emisión de positrones (PET)**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN
DEL GRADO DE BACHILLER EN CIENCIAS CON
MENCION EN QUÍMICA**

AUTOR:

Diego Adrián Uehara Oshiro

ASESOR:

Dra. Paloma Friedda Salas Fernández

Lima, Octubre, 2020

RESUMEN

La enfermedad del Alzheimer (AD) es un desorden neurodegenerativo incurable que afecta a millones de personas en el mundo. Lamentablemente, hasta el momento no se ha desarrollado un método de diagnóstico adecuado que confirme con total seguridad que una persona padece de este tipo de demencia. La formación de las placas $A\beta$ es uno de los principales biomarcadores en esta patología que se manifiesta desde la fase preclínica de la enfermedad, antes de que ocurra la disfunción sináptica y el deterioro cognitivo en el paciente. La detección temprana de este biomarcador, a través de distintas técnicas de neuroimagen, ayudaría a encontrar un mejor tratamiento para frenar o disminuir el progreso del Alzheimer. Entre las diferentes técnicas de imagen no invasivas que se emplean se encuentran: la resonancia magnética de imagen y la tomografía de emisión de positrones.

La tomografía de emisión de positrones (PET) es una de las técnicas más comunes en medicina y, además, es de gran utilidad para detectar la formación de placas $A\beta$ en el paciente. Esta técnica emplea moléculas pequeñas marcadas con radioisótopos, denominados radiofármacos, que interactúan selectivamente con órganos o tejidos y liberan energía, la cual es detectada y transformada en una imagen tridimensional. Los radiofármacos que han sido más estudiados para el diagnóstico del Alzheimer poseen en su estructura radionúcleos de ^{11}C , ^{18}F o metales de transición. Estos últimos presentan ciertas ventajas frente a los otros radioisótopos; por ello, en los últimos años se han desarrollado y explorado distintos complejos de coordinación para la detección de las placas $A\beta$.

El presente trabajo comienza con una breve introducción al AD, en la cual se describen la incidencia, la prevalencia, las fases clínicas, los síntomas característicos, los factores de riesgo

y los prospectos de futuros tratamientos para esta enfermedad. Asimismo, en el siguiente capítulo se presentan algunas generalidades del sistema nervioso central, los biomarcadores más importantes de esta afección y la hipótesis de la cascada amiloide. En el último capítulo, se explican las diferentes técnicas de neuroimagen empleadas para detectar los biomarcadores presentes en el Alzheimer. Además, se describen los agentes de diagnóstico basados en los radioisótopos de ^{11}C , ^{18}F y metales de transición.



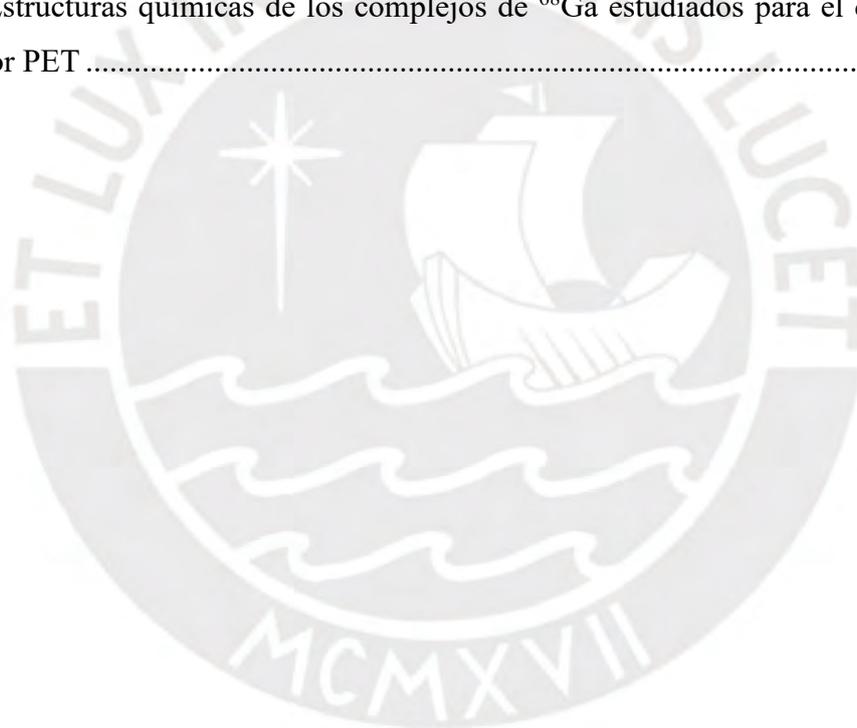
TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción a la enfermedad del Alzheimer.....	1
1.1 Incidencia y prevalencia.....	1
1.2 Sintomatología del Alzheimer:.....	3
1.2.1 Enfermedad del Alzheimer preclínico	3
1.2.2 Daño cognitivo leve (MCI) debido a la enfermedad del Alzheimer.....	4
1.2.3 Demencia debido a la enfermedad del Alzheimer	4
1.3 Factores de riesgo.....	6
1.4 Prospectos en el tratamiento y diagnóstico	9
2 Bioquímica del Alzheimer.....	12
2.1 Generalidades del sistema nervioso	12
2.1.1 Neuronas	12
2.1.2 Células gliales	15
2.2 Biomarcadores del Alzheimer.....	16
2.2.1 Placas amiloides.....	17
2.2.2 Ovillos neurofibrilares	21
2.3 Otros biomarcadores	23
2.4 Hipótesis de la cascada amiloide.....	24
3 Diagnóstico basado en técnicas de imagen	28
3.1 Imagen por resonancia magnética (MRI).....	29
3.2 Tomografía de emisión de positrones (PET).....	32
3.2.1 Agentes de diagnóstico basados en ^{11}C	36
3.2.2 Agentes de diagnóstico basados en ^{18}F	39
3.2.3 Agentes de diagnóstico basados en metales.....	42
3.2.3.1 Diseño de radiofármacos basados en metales.....	45
3.2.3.2 Compuestos metálicos en exploración	47
4 Conclusiones.....	57
5 Bibliografía.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Progresión de la enfermedad del Alzheimer	3
Figura 2: Estructura típica de una neurona del sistema nervioso central.....	13
Figura 3: Tipos de canales de iones en las membranas neuronales	14
Figura 4: Sinapsis química.....	14
Figura 5: Células gliales en el sistema nervioso central y sistema nervioso periférico	16
Figura 6: Representación esquemática del procesamiento proteolítico de APP.....	18
Figura 7: Representación esquemática de la agregación de los péptidos A β y su toxicidad en la hipótesis de la cascada amiloide	19
Figura 8: Mecanismos de eliminación y transporte del A β	20
Figura 9: Isoformas de tau producidas a partir de un solo gen por un empalme alternativo...22	
Figura 10: Cambios en los biomarcadores en relación con los estados clínicos del AD.....	23
Figura 11: Representación esquemática de la hipótesis de la cascada amiloide	27
Figura 12: Funcionamiento de la técnica de imagen de resonancia magnética (MRI).....	29
Figura 13: Vista axial del cerebro de un paciente con Alzheimer tomada por MRI estructural para cuantificar la velocidad de atrofia anual.	30
Figura 14: Vista lateral del hemisferio izquierdo del cerebro de un paciente con AD tomada por fMRI para evaluar la deficiencia en la actividad neuronal.....	32
Figura 15: Funcionamiento de la Tomografía de Emisión de Positrones (PET).....	33
Figura 16: Estructuras de distintas moléculas estudiadas por su afinidad a las placas A β en cerebros de pacientes con AD post-mortem	34
Figura 17: Representación de la superficie de las fibras A β simuladas unidas a la Tioflavina T y PIB.	36
Figura 18: Agentes de radioimagen de ^{11}C afines a las placas A β	37
Figura 19: Vista axial del cerebro de un paciente con Alzheimer tomada por [^{11}C]-PIB PET para cuantificar el contenido de placas A β	38
Figura 20: Estructura de la fluorodesoxiglucosa ([^{18}F]-FDG).....	40
Figura 21: Vista axial del cerebro de un individuo sano y de un paciente con Alzheimer tomada por [^{18}F]DGPET.....	40
Figura 22: Agentes de radioimagen de ^{18}F afines a las placas A β aprobados por la FDA.....	40
Figura 23: Vista axial del cerebro de un paciente con AD (izquierda) y de un control sano (derecha) tomada por [^{18}F]-AV-1 PET	42

Figura 24: Representación esquemática de los dos tipos de complejos metálicos empleados para el diagnóstico de Alzheimer.....	45
Figura 25: Estructuras químicas de los complejos de ^{64}Cu con ligandos tiosemicarbazona y tiosemicarbazona-piridilhidrazina estudiados para el diagnóstico de Alzheimer.....	49
Figura 26: Estructuras químicas de los complejos de ^{64}Cu con ligandos tacn y N4 unidos covalentemente al ligando 2-fenilbenzotiazol estudiados para el diagnóstico de Alzheimer por PET	52
Figura 27: Imagen por PET de secciones del cerebro de ratones WT y transgénicos (Tg2576) en presencia de complejos de $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ y del agente competidor B1.....	53
Figura 28: Imágenes por PET de la sección del cerebro de un ratón transgénico (Tg2576) estudiada en presencia del complejo L4- $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ y el Congo Rojo.....	53
Figura 29: Estructuras químicas de los complejos de ^{68}Ga estudiados para el diagnóstico de Alzheimer por PET	55



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación del riesgo de AD entre individuos que poseen diferentes genotipos APOE	7
Tabla 2: Constantes de inhibición (K_i) de varios compuestos que compiten con el ^{18}F -AV-45 por su unión con las placas $\text{A}\beta$ en cerebros de pacientes con AD post-mortem	35
Tabla 3: Propiedades nucleares de los radioisótopos metálicos más utilizados en el diagnóstico por imágenes y radioterapia	44
Tabla 4: Propiedades de los ligandos L_0 - L_5 y sus complejos marcados con ^{64}Cu	50
Tabla 5: Resultados de la biodistribución de los complejos de ^{64}Cu en el cerebro de ratones sanos.....	54



Abreviaturas

α CTF	Fragmento C-terminal
α 2M	α 2-macroglobulina
α -SN	α -sinucleína
A β	Amiloide β
ACT	α 1-antiquimotripsina
AD	Enfermedad del Alzheimer
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AICD	Dominio intracelular APP
APOE	Apolipoproteína
APP	Proteína amiloide precursora
astm	Ligando bis(tiosemicarbazona)
BBB	Barrera hematoencefálica
BFCA	Agentes quelatos bifuncionales
BOLD	Nivel dependiente de oxígeno en la sangre
CAA	Angiopatía amiloide cerebral
CBF	Flujo de sangre cerebral
CG	Cristamina G
CQ	Clioquinol
CSF	Fluido cerebroespinal
DBL	Enfermedad por cuerpos de Lewy
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
[¹⁸ F]-AV-1	Florbetaben
[¹⁸ F]-AV-45	Florbetapir
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FDG	Fluorodesoxiglucosa
FPIB	Flutemetamol
fMRI	Imagen por resonancia magnética funcional
FTD	Formas de demencia frontotemporales
GSK-3b	Quinasa Glicógeno Sintasa 3 beta
IDE	Enzima que degrada insulina
IL	Interluquina
K _i	Constante de inhibición
k _{off}	Constante de disociación
LRP	Lipoproteína receptora de baja densidad
MAPT	Proteína Tau Asociada a Microtúbulos
MBDs	Dominios de unión a microtúbulos
MCI	Daño cognitivo leve
MRI	Imagen por resonancia magnética
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
N4	2,11-diaza[3,3]-(2,6)piridinofano
NEP	Neprelisin

NFTs	Ovillos neurofibrilares
NMDA	Glutamato N-metil-D-aspartato
NOTA	Ácido triazaciclononano-1,4,7-triacético
OMS	Organización Mundial de la Salud
PET	Tomografía de emisión de positrones
PIB	Compuesto B de Pittsburgh
PP2A	Proteína fosfatasa 2
PS-1	Presenil-1
PS-2	Presenil-2
RAGE	Receptor para avanzada glicación en productos terminales
RF	Radiofrecuencia
ROS	Especies radicales de oxígeno
sAPP α	Proteína amiloide precursora soluble
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotón único
taen	1,4,7-triazaciclononano
ThS	Tioflavinas S
ThT	Tioflavinas T
TNF- α	Factor α de tumor de necrosis



1. INTRODUCCIÓN A LA ENFERMEDAD DEL ALZHEIMER

1.1 Incidencia y prevalencia

La enfermedad del Alzheimer (AD) es un desorden neurodegenerativo incurable que se caracteriza por un deterioro progresivo de la función cognitiva del paciente.¹⁻³ Esta patología es la causa más común de demencia que contribuye entre un 60-80% de los casos. Por ello, afecta a millones de personas en el mundo; de hecho, se estima que actualmente más de 46 millones de personas padecen de demencia. Desafortunadamente, esta cifra continúa en aumento a nivel mundial y se calcula que, para el año 2040, 81.1 millones de personas presentarían esta patología.⁴

Uno de los principales países afectados por esta patología es EEUU, pues según la OMS actualmente existen más de 5.8 millones de americanos, mayores a los 65 años, que padecen de AD.^{2,3} Para el 2050, se proyecta que esta cifra aumente a 13.8 millones de afectados. Este crecimiento dramático estaría asociado a la mayor esperanza de vida debido a los nuevos avances médicos y mejoras en las condiciones sociales y ambientales. De esta forma, se espera un incremento de 4.8 millones de ancianos en la población estadounidense entre los años 2020-2050, lo cual acrecentaría el número de personas que estarían en riesgo de padecer Alzheimer u otro tipo de demencia.⁵

En el 2018, se reportaron oficialmente en el país estadounidense 122 019 actas de defunción por Alzheimer.⁵ Por ello, esta enfermedad es considerada como la sexta causa de muerte en los EEUU, superando la cifra de mortalidad por cáncer de mama y próstata juntos.^{3,5} Esto se ve reflejado en la tasa de mortalidad entre los años 2000-2018, la cual aumentó dramáticamente en 146.2% en comparación con otras enfermedades como los accidentes cerebrovasculares, el VIH y los ataques al corazón.⁵

Si bien es cierto que, el AD es la causa más común de demencia, existen otras patologías como las enfermedades cerebrovasculares, la enfermedad por cuerpos de Lewy, el Parkinson y la esclerosis en el hipocampo que pueden desencadenar demencia en el individuo.^{3,5} Estudios recientes, basados en autopsias de pacientes con Alzheimer, revelaron que más del 75% presentaban cambios patológicos en el cerebro asociados a otras causas de demencia. A este tipo de patologías coexistentes se les denomina demencia mixta.⁶

Las diferencias entre estos distintos tipos de demencia son usualmente indistinguibles, ya que los síntomas que presenta el paciente son muy similares y, por ello, es difícil hasta la actualidad para los médicos hacer un diagnóstico 100% certero. De hecho, estudios realizados en autopsias de pacientes diagnosticados con Alzheimer basados en la sintomatología han revelado que entre el 15-30% de los casos el individuo padecía de demencia causada por otro tipo de enfermedad.^{5,7}

Sin embargo, existen algunos cambios bioquímicos cerebrales característicos de cada demencia a los cuales se les denominan biomarcadores. Por ejemplo, la enfermedad cerebrovascular, que se caracteriza por el daño y la obstrucción de los vasos sanguíneos en el cerebro, lo cual impide el flujo de sangre y el transporte de oxígeno y nutrientes, tiene como principal biomarcador la disminución del metabolismo de glucosa. Por otro lado, la enfermedad por cuerpos de Lewy (DBL), que es otro tipo de demencia, ocurre por la agregación anormal de la proteína alfa-sinucleína en las neuronas, y esta puede ser empleada como biomarcador para la detección de esta enfermedad.⁷ Por último, los biomarcadores presentes en el Alzheimer incluyen la deposición extracelular de la proteína beta-amiloide (placas A β), la formación de ovillos neurofibrilares (NFTs) al interior de las neuronas, la atrofia en la región del hipocampo, entre otros. Estos biomarcadores van a ser fundamentales para el diagnóstico temprano de esta enfermedad, ya que muchos de estos aparecen en el paciente años antes de que se presente algún síntoma.⁸

1.2 Sintomatología del Alzheimer

Se presume que el Alzheimer comienza 20 años antes de que el paciente desarrolle algún síntoma.⁹ Solo después de algunos años de cambios en el cerebro, este comienza a desarrollar algunos síntomas de la enfermedad como pérdida de la memoria, dificultad en el lenguaje, aprendizaje y, eventualmente, pérdida de la capacidad motora. La progresión de esta enfermedad se puede dividir en 3 fases: enfermedad del Alzheimer preclínico, daño cognitivo leve (MCI) y demencia debido a la enfermedad del Alzheimer.¹⁰ Asimismo, esta última fase se puede subdividir en leve, moderada y severa, de acuerdo con la gravedad de los síntomas que presente el paciente (Figura 1).^{3,5}



Figura 1: Progresión de la enfermedad del Alzheimer (Adaptado de 5)

1.2.1 Enfermedad del Alzheimer preclínico

En esta fase, el individuo no muestra ningún tipo de sintomatología; sin embargo, es posible detectar algunos biomarcadores que indican el inicio de esta enfermedad. En esta fase temprana, el cerebro realiza una compensación frente a estos cambios cerebrales, lo cual permite que la persona pueda realizar sus actividades normalmente. Es importante destacar que no todos los individuos que presentan estos biomarcadores van a desarrollar síntomas de MCI o demencia. Por ejemplo, se han realizado autopsias donde se han encontrado placas amiloides en el cerebro; sin embargo, el individuo nunca presentó problemas de demencia en vida.^{4,10}

1.2.2 Daño cognitivo leve (MCI) debido a la enfermedad del Alzheimer

Las personas con MCI presentan una cantidad anormal de placas beta-amiloides y además tienen problemas leves relacionados con la memoria. Estos problemas cognitivos leves son percibidos solo por el entorno más cercano del individuo como familiares o amigos. Asimismo, este tipo de sintomatología no interfiere con las actividades normales que realiza la persona.¹¹

En esta fase, el cerebro ya no puede contrarrestar el daño y la muerte en células neuronales; por ello, el individuo comienza a tener una deficiencia en las capacidades cognitivas. Algunos estudios han mostrado que después de 2 años con MCI, el 15% de personas mayores a los 65 años desarrolla demencia.¹² Otro estudio mostró que luego de 5 años con MCI, el 32% de personas desarrolla demencia. Sin embargo, en otros casos el estado del individuo permanece estable o el MCI se revierte.¹³

1.2.3 Demencia debido a la enfermedad del Alzheimer

La fase de demencia en el AD se caracteriza por la pérdida de memoria, la dificultad en el lenguaje y los cambios en la personalidad, los cuales impiden que la persona pueda desarrollar sus actividades diarias con normalidad. Estos síntomas reflejan el daño en las células y el tejido nervioso. Según la gravedad de los síntomas la demencia se clasifica en:^{3,5}

i. Demencia leve:

En esta primera fase de la demencia, la mayoría de pacientes pueden realizar sus actividades independientemente. Sin embargo, presentan algunas dificultades recordando eventos recientes, no se ubican temporalmente y pierden la motivación de realizar algunos hobbies. En algunos casos, esta etapa es confundida con el

envejecimiento normal; no obstante, la enfermedad se caracteriza por presentar síntomas leves, los cuales se van agravando a medida que el daño cerebral es mayor.^{3,5}

ii. Demencia moderada:

En esta segunda fase, la cual es usualmente la más larga en toda la enfermedad, el paciente tiene dificultad para comunicarse, recordar eventos o personas, realizar sus actividades diarias como bañarse o vestirse y comienza a tener comportamientos agresivos en su hogar y en la comunidad.^{3,5,14}

iii. Demencia severa:

En esta última fase de la enfermedad el paciente necesita del cuidado de otra persona las 24 horas del día. Debido al gran daño en las neuronas involucradas en la capacidad motora, el individuo está la mayor parte del tiempo en cama, lo cual lo hace propenso a que desarrolle coágulos sanguíneos, infecciones a la piel y sepsis que eventualmente puede provocar una insuficiencia orgánica. El daño en otras áreas del cerebro relacionadas con la deglución de alimentos ocasiona que el paciente presente dificultades para comer y beber. Esto puede causar que el individuo aspire la comida por la tráquea y no por el esófago, lo cual genera una afección denominada neumonía por aspiración que es una de las principales causas de muerte por Alzheimer.^{3,5}

Como ya se ha mencionado, la enfermedad del AD comienza con una fase preclínica y culmina con una demencia severa. El tiempo de duración de cada fase varía en cada paciente, ya que este depende de la edad, la genética y el género. El tiempo de vida estimado para las personas mayores a los 65 años diagnosticadas con AD es entre 4-8 años, aunque algunos pacientes pueden llegar a vivir más de 20 años con esta enfermedad. Esto refleja la progresión lenta, degenerativa e incierta que puede tener esta enfermedad.⁵

1.3 Factores de riesgo

La enfermedad del Alzheimer, como otras enfermedades crónicas, se desarrolla por diversos factores, entre los cuales se encuentran la edad, la genética y el estilo de vida, entre otros.

La edad es el factor de riesgo predominante en esta enfermedad, ya que se observa un incremento dramático de incidencia en adultos mayores que presentan demencia debido al Alzheimer. Un estudio realizado por Hebert *et al.* estima que actualmente hay 5.8 millones de americanos que padecen de Alzheimer. De este total, el 17% tiene entre 65-74 años, el 47% tiene entre 75-84 años y el 36% excede los 85 años.¹⁵ Personas menores a los 65 años también pueden desarrollar demencia; sin embargo, esto es menos probable y la prevalencia es incierta.⁵

Asimismo, existen diversos mecanismos que estarían asociados en la protección del cerebro de un individuo joven del AD como son los altos niveles de factores de crecimiento, un mejor metabolismo de energía, mayor eficiencia al eliminar proteínas mal plegadas y reparación de células. Asimismo, personas de mayor edad tienen una mayor prevalencia a desarrollar obesidad, diabetes, arterosclerosis y enfermedades cardiovasculares, las cuales promueven el AD a través de mecanismos metabólicos y vasculares que están relacionados principalmente con procesos inflamatorios.¹⁶

Otro factor que incrementa el riesgo de padecer Alzheimer es la presencia de una proteína de 299 aminoácidos denominada apolipoproteína-e4 (apoE-e4), la cual es expresada en diversos órganos como el hígado y el cerebro. En el cerebro, los astrocitos, la microglía y las células vasculares son las principales células encargadas de expresar apoE. Esta proteína es vital en el proceso de sinaptogénesis y en mantener las conexiones sinápticas.¹⁷ Además, cumple la función de redistribuir el colesterol y otros lípidos a las neuronas a través de su unión por los receptores de APOE.¹⁸ El gen APOE presenta 3 tipos de formas (alelos), los cuales solo se diferencian en 2 aminoácidos: APOE e2 (cys112, cys158), e3 (cys112, arg158) y e4 (arg112,

arg158). Sin embargo, estas ligeras variaciones en los aminoácidos alteran sustancialmente la estructura, sus propiedades de afinidad hacia lípidos y receptores y por tanto; cambian su función.^{17,18}

Todas las personas heredamos un par de genes APOE, uno del padre y el otro de la madre. De esta forma, existen 6 diferentes combinaciones de pares de genes APOE: e2/e2, e2/e3, e3/e3, e3/e4, e4/e4 y e4/e2.^{17,18} Estudios realizados a una población de 17000 individuos de raza blanca reveló que el ratio (OR) de aquellos que desarrollan AD era de 14.49, 2.64 y 3.64, en individuos con APOE e4/e4, e2/e4 y e3/e4, respectivamente, en relación con aquellos que presentan un genotipo APOE e3/e3 (Tabla 1). Asimismo, la presencia de un solo alelo APOE-e4 adelantaría la enfermedad entre 2-5 años, mientras que tener dos alelos APOE-e4 lo aceleraría en 5-10 años.¹⁸ Esto demuestra que heredar copias del gen APOE-e4 incrementa la probabilidad de desarrollar Alzheimer, en comparación con personas que tienen los isomorfos APOE-e3 o APOE-e2.^{16,18,19}

Tabla 1: Comparación de la incidencia de AD entre individuos que poseen diferentes genotipos APOE (Adaptado de 18)

Genotipo APOE	Frecuencia en individuos cognitivamente sanos (%)	Frecuencia en pacientes con AD (%)	Ratio para el desarrollo del AD
APOE e2/e2	0.7	0.3	0.56
APOE e2/e3	11	4.6	0.56
APOE e3/e3	62.3	34.3	1
APOE e2/e4	1.9	2.6	2.64
APOE e3/e4	22.2	43.4	3.63
APOE e4/e4	1.9	14.8	14.49

Se presume que la interacción entre la isoforma APOE-e4 y las placas A β juegan un rol importante en la patogénesis de la enfermedad del AD, pues esta interacción induciría un cambio conformacional en placas A β que desencadenaría la agregación de esta proteína. Además, APOE-e4 afectaría la capacidad de respuesta microglial, el transporte de lípidos, el

metabolismo de glucosa, la integridad sináptica y cerebrovascular, todos fenómenos observados en pacientes con Alzheimer.¹⁸

La etnicidad parece influir en la magnitud en la que la isoforma APOE-e4 incrementa la posibilidad de desarrollar AD. Esto se ha observado en el caso de individuos de poblaciones afroamericanas e hispanas, los cuales no se ven tan afectados por el gen APOE-e4, a diferencia de la población japonesa.¹⁸ Por ello, es necesario seguir investigando sobre los mecanismos genéticos involucrados en esta enfermedad en diferentes grupos étnicos.

Si bien es cierto, todos los factores mencionados hasta el momento no pueden ser controlados por los humanos, no obstante, existen algunos factores de riesgo que pueden variar para disminuir la posibilidad de desarrollar AD. En el 2019, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Academia Nacional de Medicina reportó que realizar actividad física, tener una dieta saludable, controlar enfermedades cardiovasculares (diabetes, obesidad, hipertensión), tener un entrenamiento cognitivo y no fumar, reduciría el riesgo de padecer de Alzheimer.¹⁶

El cerebro constituye tan solo el 2% de toda la masa corporal de una persona; sin embargo, este órgano consume alrededor del 20% de oxígeno y nutrientes que ingresan al cuerpo. El suministro de ambos compuestos está fuertemente ligado al bombeo de la sangre del corazón y su transporte por los vasos sanguíneos. Por ello, personas con enfermedades cardiovasculares como la diabetes, hipertensión, obesidad e hiperlipidemia presentan un mayor riesgo de desarrollar Alzheimer u otras demencias.⁷

En el caso de la actividad física se sabe que podría disminuir la probabilidad de padecer AD, aunque aún no se conoce con seguridad el tipo de ejercicio, el tiempo estimado o la frecuencia con la que se tendría que desarrollar esta actividad. Tener una dieta saludable basada en el consumo de frutas, vegetales, granos, pescado, pollo, nueces, legumbres y reducir las grasas saturadas, azúcares y carnes rojas parecería beneficiar la salud cerebral. Todos estos

cambios en el estilo de vida disminuyen el colesterol en la sangre, evitan la presión alta e incrementan los factores de crecimiento de la memoria en el cerebro.^{10,16}

Personas que desempeñan un trabajo mentalmente estimulante o aquellas que están en constante aprendizaje desarrollan reserva cognitiva. Esto hace referencia a la habilidad que tiene el cerebro de crear conexiones neuronales para realizar alguna actividad cognitiva; de esta forma, probablemente evitar la neurodegeneración en un futuro. Asimismo, se presume que incrementa los niveles de neurotrofinas, presentes en el cerebro, que están relacionadas con la protección y la reparación de las neuronas de algunos procesos de deterioro como la edad, el estrés y las enfermedades neurodegenerativas.²⁰

Si bien es cierto, seguir todas estas recomendaciones no asegura que el individuo no padezca de Alzheimer o algún tipo de demencia en un futuro, sí reduce el riesgo de desarrollar esta enfermedad o, al menos, favorece que se desarrolle algunos años después en el paciente. También, se han mencionado diversos factores como el estilo de vida, la genética, la edad y el ambiente sociocultural que contribuirían al desarrollo del AD; empero, existen muchos otros, los cuales aún se encuentran en estudio y se desconoce la relación exacta con esta enfermedad.⁵

1.4 Prospectos en el tratamiento y diagnóstico

A pesar de la complejidad y lo poco que se conoce acerca de esta enfermedad, numerosos esfuerzos se han hecho para desarrollar un tratamiento efectivo para el AD. Dentro de estos tratamientos se encuentra la administración de cinco fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) de EE. UU., de los cuales cuatro son inhibidores de la acetilcolinesterasa (tacrina, donepezilo, rivastigmina y galantamina) y uno es un antagonista del receptor glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) (memantina).^{1,3,16}

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa son medicamentos que bloquean esta enzima, la cual tiene la función de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina. Este neurotransmisor

permite la sinapsis entre las células neuronales motoras y las células musculares. La enfermedad del Alzheimer se caracteriza por presentar bajos niveles de acetilcolina, debido a la gran cantidad de muerte neuronal; por ello, inhibir la hidrólisis de acetilcolina ayuda a mejorar la actividad motora en el paciente. Los beneficios informados para estos tipos de medicamentos han sido reportados cuando se consumen en dosis más altas; sin embargo, esto implica una mayor probabilidad de efectos secundarios.^{3,4}

Por otro lado, la memantina es un antagonista que bloquea al receptor glutamato N-metil-D-aspartato (NMDAR), encontrado en células nerviosas en el hipocampo, región encargada de la memoria a corto plazo, y que tiene la función de despolarizar la membrana plasmática cuando es activado.²¹ El flujo de cationes, principalmente de iones Ca^{+2} , juega un rol importante en la plasticidad sináptica y en los mecanismos celulares relacionados al aprendizaje y la memoria. No obstante, una sobreestimulación de estos receptores podría conducir a una pérdida de funcionalidad sináptica, seguida de una sinaptotoxicidad que llevaría a una muerte celular en el individuo con AD. Este antagonista, que bloquea al NMDAR, ha sido empleado desde 1970 en Alemania para tratar el AD en estado moderado y severo.³⁻⁵

Todos estos fármacos tienen la función de aliviar los síntomas cognitivos; sin embargo, ninguno de ellos ralentiza o detiene la muerte neuronal ocasionada por la enfermedad del Alzheimer.⁵ Dada la eficiencia limitada de estas estrategias de tratamiento, se han buscado otras alternativas que proporcionen mejores resultados para combatir esta enfermedad.

El tratamiento basado en la hipótesis de la cascada amiloide plantea la posibilidad de prevenir la producción y agregación de las placas $\text{A}\beta$, así como también, eliminarlas de modo que la enfermedad no continúe desarrollándose. Por ello, numerosas investigaciones se han enfocado en el diseño de agentes dirigidos a los péptidos $\text{A}\beta$ y oligómeros para inhibir la oligomerización o fibrilación. Entre estos agentes se encuentran péptidos o dominios de

proteínas, compuestos naturales, ligandos quelatos y complejos metálicos que modulan la agregación de especies A β mediante su unión a través de diferentes interacciones específicas.¹

Por ejemplo, el desarrollo de agentes que reconozcan el núcleo hidrofóbico Leu17 a Ala21 (KLVFF), implicado en la elongación de fibrillas A β , impediría la formación de placas A β . También, se han diseñado agentes quelatos como el clioquinol (CQ, 5-cloro-7-yodo-8-hidroxiquinolina) y 5,7-dicloro-2-[(dimetilamino)metil]-8-hidroxiquinolina (PBT2) que tienen la función de acomplejar iones Cu(II), Zn(II) y Fe(II), los cuales facilitan la agregación de las placas A β mediante la coordinación con los residuos del extremo N-terminal de los péptidos A β .^{1,22}

Por otro lado, con el descubrimiento de que los oligómeros o protofibrillas podrían ser las especies tóxicas que generen la disfunción neuronal en el AD, se plantea la posibilidad de acelerar el plegado de estas especies hasta fibrillas maduras. De esta forma, diversas especies como derivados de la curcumina, orceína y azul de metileno han exhibido propiedades terapéuticas para esta enfermedad.¹

Sin embargo, todos estos tratamientos se encuentran todavía en investigación. Parte de la razón por la cual se ha tenido poco éxito en la identificación de un tratamiento exitoso de esta enfermedad se debe a que muchos de los fármacos desarrollados no atacan la causa principal o en algunas ocasiones bloquean una ruta patogénica, pero el efecto es, en el mejor de los casos, parcial, porque existen múltiples factores causales. Por ello, el futuro de la investigación en nuevos tratamientos que ralenticen o detengan la progresión del Alzheimer en una fase temprana de la enfermedad depende intrínsecamente de conocer los mecanismos bioquímicos y de desarrollar métodos de diagnóstico conclusivos y tempranos. Para ello, los biomarcadores del Alzheimer desempeñan un rol esencial en el diagnóstico certero y anticipado. De esta manera, se puede asegurar un tratamiento apropiado según sea la causa de demencia.⁵

2 BIOQUÍMICA DEL ALZHEIMER

2.1 Generalidades del sistema nervioso

El cerebro de una persona adulta sana contiene alrededor de 100 billones de neuronas, cada una con grandes extensiones ramificadas. Estas extensiones hacen posible la formación de conexiones con otras neuronas que permiten el flujo de señales por todo el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP).⁵ La habilidad de crear recuerdos, pensamientos, sensaciones, emociones y respuestas motoras se basa en este sistema nervioso, el cual cuenta con 2 tipos de células especializadas: las células nerviosas (neuronas) y las células gliales.²³

2.1.1 Neuronas

Las neuronas son las unidades básicas funcionales del sistema nervioso que se encargan de recibir, procesar y generar impulsos nerviosos a través de señales eléctricas y químicas, las cuales permiten que la información pueda ser transmitida a todo el cuerpo.

Como toda célula, las neuronas tienen un cuerpo (conocido como soma), en el cual se encuentran el núcleo, el retículo endoplasmático liso y rugoso, las mitocondrias y el aparato de Golgi, entre otras organelas celulares. Además, al ser un tipo de célula especializada en la comunicación neuronal a través de señales eléctricas y químicas, posee una estructura única que se muestra en la Figura 2.^{23,24}

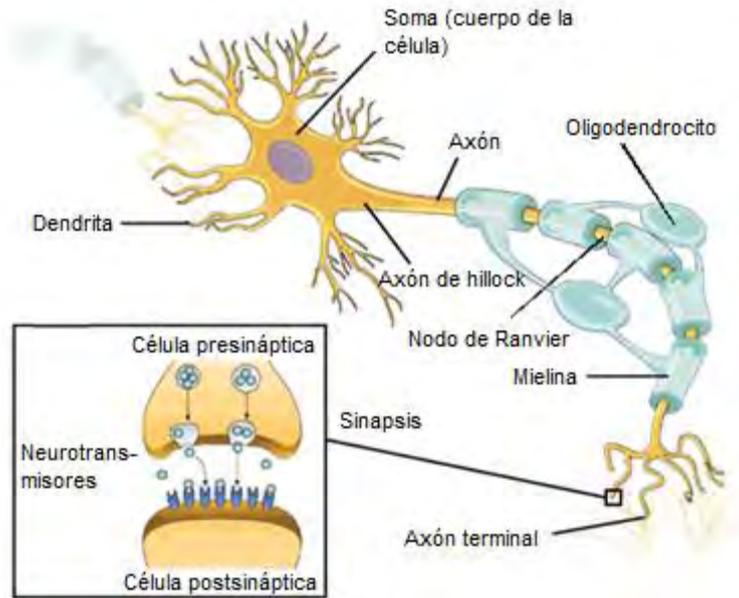


Figura 2: Estructura típica de una neurona del sistema nervioso central (Adaptado de 23).

La región especializada donde se transmiten estas señales se le denomina sinapsis. Su propagación ocurre en una sola dirección, del terminal del axón de una célula presináptica hacia una célula postsináptica, la cual puede ser una célula muscular, la dendrita, el soma o, en raras ocasiones el axón de otra neurona (Figura 2).²³ Existen dos tipos de sinapsis: la eléctrica cuando la transmisión de la señal se da directamente por el flujo de iones y la química cuando la señal se transmite por la liberación de compuestos químicos, denominados neurotransmisores.²⁴ Esta última es la más común en humanos; por ello, en este trabajo se dará un mayor énfasis en este tipo de sinapsis.

En primer lugar, los impulsos nerviosos (potencial de acción) son conducidos desde el soma hacia el terminal del axón.²⁴ Esto ocurre por los ciclos de cambios de voltaje en la membrana axonal que permiten la apertura de los canales de iones Na^+ y K^+ dependientes de voltaje, los cuales posibilitan la entrada o salida de cationes del citosol al fluido extracelular o viceversa (Figura 3b). De esta forma, ocurre la propagación del potencial de acción a lo largo de todo el axón hasta el terminal del axón.²⁵

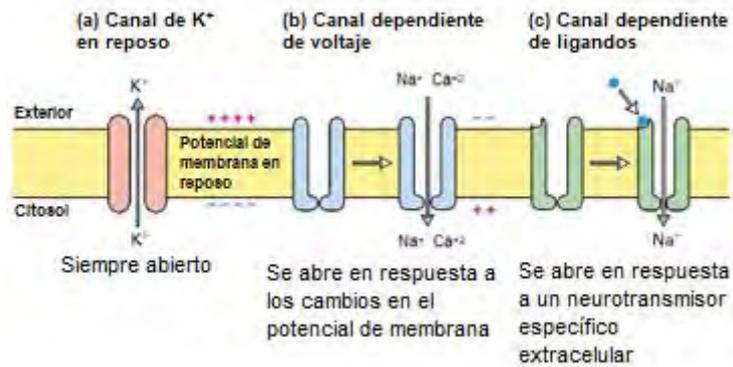


Figura 3: Tipos de canales de iones en las membranas neuronales (Adaptado de 25).

Cuando este impulso nervioso llega al terminal del axón, se produce la entrada de los iones Ca⁺², debido a los canales-dependientes de Ca⁺² de voltaje. Esto genera que, a través de una cascada de señales, las vesículas químicas se fusionen con la membrana presináptica y se liberen neurotransmisores a la hendidura sináptica, espacio estrecho entre ambas células. Los neurotransmisores tardan alrededor de 0.5 ms en cruzar la hendidura sináptica y ser reconocidos por los receptores de la célula postsináptica en las dendritas. (Figura 4).²⁴

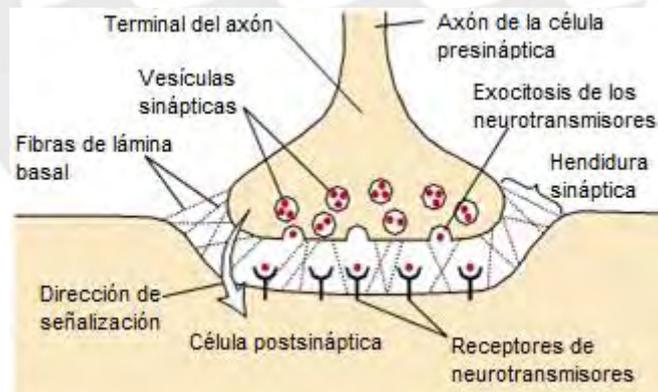


Figura 4: Sinapsis química (Adaptado de 24)

Las dendritas se encargan de convertir estas señales químicas en señales eléctricas, por medio de canales-dependientes de ligandos (Figura 3c), los cuales permiten la entrada de iones Na⁺ y K⁺ al reconocer a los neurotransmisores. Estos cambios en la concentración de iones en

el citosol generan la despolarización en la célula y la activación del potencial de acción que permite que se transmita la señal. Esta señal culmina cuando deja de haber neurotransmisores en la hendidura sináptica. Esto puede ocurrir por una degradación enzimática, difusión pasiva o reabsorción de los neurotransmisores por transportadores a la célula presináptica. Por otro lado, si los neurotransmisores se unen a un receptor que activa la entrada de Cl^- o salida de K^+ en la célula postsináptica; es decir, que causa una hiperpolarización en la célula, la señal queda inhibida.²⁴

2.1.2 Células gliales

Por otro lado, las células gliales son unidades que cumplen un rol importante de soporte al sistema nervioso. En efecto, se estima que el número de células gliales en el cerebro es 10 veces mayor que el número de neuronas. Sus funciones esenciales son guiar a las neuronas en desarrollo a sus destinos, proporcionar las vainas de mielina alrededor de los axones y proveer de nutrientes y protección a todo el sistema nervioso.²³ Entre los más importantes tipos de células gliales se encuentran las siguientes (Figura 5):

- **Astrocitos:** Son células que se encuentran en el SNC que proporcionan nutrientes a las neuronas, regulan las concentraciones de iones y compuestos químicos en el fluido extracelular, proveen de soporte estructural en el proceso sináptico y bloquean sustancias tóxicas que pudieran ingresar al cerebro.²³
- **Microglía:** Son células del sistema inmunológico encargadas de degradar las células muertas y proteger al cerebro de patógenos invasores en el SNC.²³
- **Oligodendrocitos y células de Schwann:** Forman la sustancia aislante mielina, la cual cubre los axones de las neuronas en el SNC y PNS, respectivamente. Esta sustancia juega un rol importante en el sistema nervioso, ya que incrementa la velocidad de

conducción de impulsos nerviosos y disminuye la pérdida del potencial eléctrico. Una diferencia entre ambas células es que varios oligodendrocitos pueden proveer de mielina a un mismo axón; en cambio, solo una célula de Schwann cubre de mielina a un axón.²³

- Satélites gliales: Cubren el cuerpo de las neuronas en el PNS. Además, proveen de nutrientes y soporte estructural a las mismas.²³
- Células endimarias: Son células que recubren los ventrículos del cerebro y el canal central de la médula espinal. Están involucrados en la producción y el flujo del fluido cerebroespinal del cerebro a la médula espinal. Este fluido cumple la función de protección del cerebro.²³

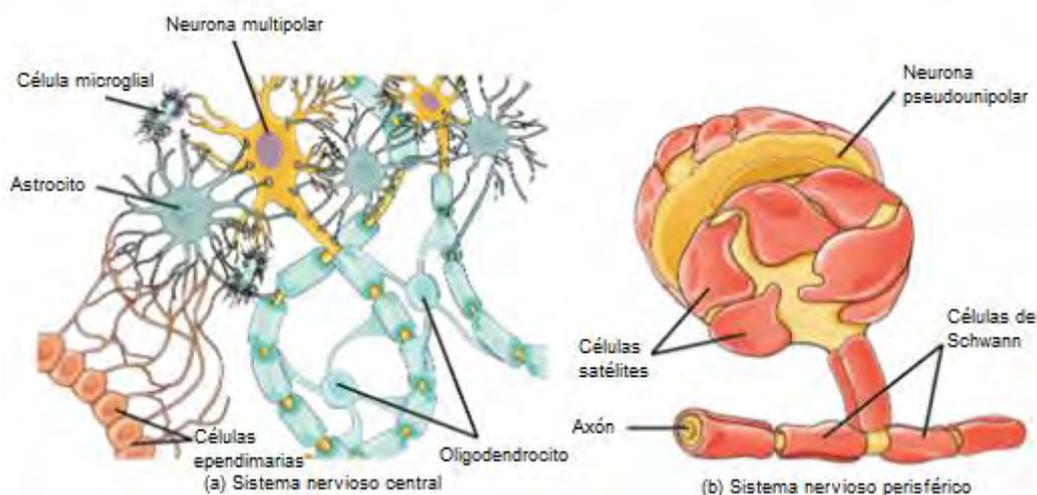


Figura 5: Células gliales en el sistema nervioso central y sistema nervioso periférico (Adaptado de 23).

2.2 Biomarcadores del Alzheimer

La fisiopatología de la enfermedad del Alzheimer comienza con el daño y la muerte neuronal en la región del hipocampo, zona del cerebro encargada de la memoria y el aprendizaje, que luego se extiende por todo el cerebro generando atrofia. Esto causa que el paciente presente una disfunción cognitiva irreversible y progresiva.^{1,3}

A pesar de que todavía no se conoce completamente la etiología de esta enfermedad, diversos estudios han mostrado que la principal causa del Alzheimer estaría relacionada a la

agregación de la proteína β amiloide ($A\beta$). La deposición de esta proteína $A\beta$, en forma de oligómeros, protofibrillas, fibrillas y placas, ocasionaría una cascada patogénica de respuestas dentro del organismo, como es la formación intracelular de ovillos neurofibrilares (NFTs), neuroinflamación, atrofia debido a la pérdida neuronal, disfunción sináptica, deterioro cognitivo y finalmente, la enfermedad del Alzheimer.¹ A esta hipótesis vigente, desde hace más de 30 años, se le conoce como la hipótesis de la cascada amiloide.

2.2.1 Placas amiloides

La proteína amiloide β es un péptido de 39-43 aminoácidos, generado a partir de una escisión proteolítica de la proteína amiloide precursora (APP), la cual es una glicoproteína transmembrana que posee un dominio C-terminal corto intracelular y otro dominio N-terminal largo extracelular.²⁶

El procesamiento proteolítico de APP puede ocurrir por dos rutas: amiloidogénica y no amiloidogénica (Figura 6). En la vía no amiloidogénica, la proteína α -secretasa realiza una escisión proteolítica en APP, lo cual libera el fragmento soluble N-terminal (sAPP α) y deja en la membrana al fragmento C-terminal (α CTF). Posteriormente, sobre α CTF actúa otra proteasa denominada γ -secretasa, la cual permite la formación del péptido extracelular P3 y el dominio intracelular APP (AICD).^{1,22}

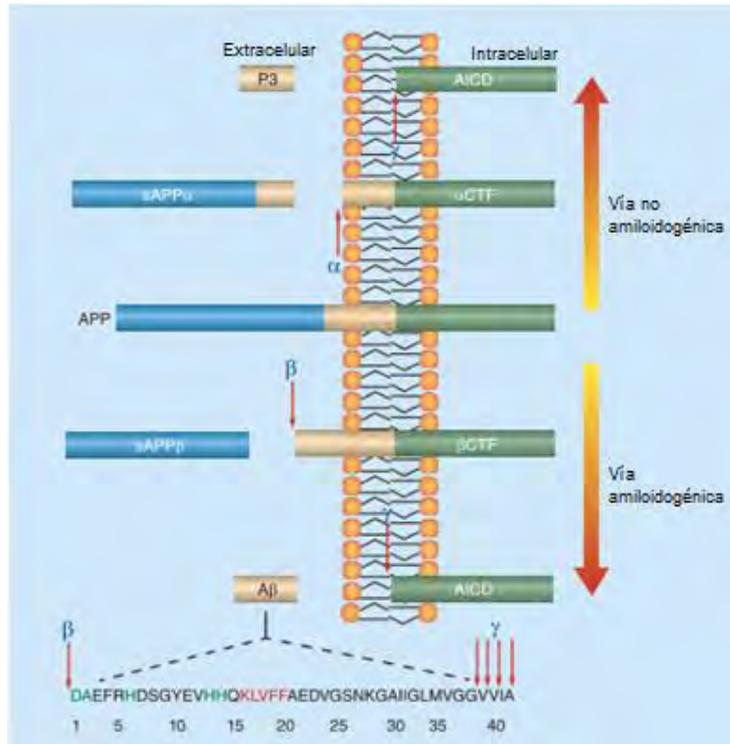


Figura 6: Representación esquemática del procesamiento proteolítico de APP (Adaptado de 1).

En la vía amiloidogénica, APP es degradada por la proteasa β-secretasa, la cual produce el fragmento N-terminal (sAPPβ) y el péptido residual βCTF. Sobre este péptido actúa la γ-secretasa que genera 2 péptidos amiloides extracelulares (Aβ40 y Aβ42) y el AICD. Este último fragmento intracelular sería el encargado de enlazarse al gen promotor de neprilisin, el cual expresaría una metaloenzima que degradaría el péptido Aβ.^{1,22}

Ambas rutas proteolíticas pueden ocurrir en organismos sanos. Incluso, existen hipótesis que plantean que los péptidos Aβ solubles podrían tener una función en el cerebro de una persona sana. De estas 2 isoformas, el péptido Aβ40 constituye el 90% del total de Aβ, mientras el péptido Aβ42, a pesar de encontrarse en menor proporción, es el más tóxico, debido a que posee 2 residuos hidrofóbicos adicionales que facilitan su cinética de agregación y estabilidad. Algunos de los factores patológicos que influyen en la formación de placas son la disminución del pH, la hipoxia, la hipercolesterolemia y la deficiencia de Zn.^{27,28}

Los péptidos A β presentan un dominio N-terminal hidrofílico (1-28) y una región C-terminal hidrofóbica (29-39/43). Asimismo, en su forma nativa este monómero muestra una estructura secundaria intrínsecamente desordenada con, principalmente, hélices α y algunas hojas β . Los procesos de agregación de placas A β ocurren por la formación de hojas β , las cuales se generan por la interacción entre los aminoácidos del núcleo hidrofóbico (KLVFF) del péptido (Figura 6).¹ De la misma forma, los residuos aromáticos fenilalanina (4, 19 y 20) y tirosina (10) forman interacciones apilamiento- π que favorecen este proceso de agregación.²⁷ Las proteínas mal plegadas son bastante comunes en los desórdenes neurodegenerativos como en la enfermedad del Parkinson, las enfermedades priones y la esclerosis lateral amiotrófica.²⁸

La agregación de estos péptidos se da por mecanismos de nucleación. En primer lugar, el monómero A β 42 pasa de un estado no plegado a su estado nativo. Posteriormente, estos monómeros comienzan a formar estructuras más largas y ordenadas como oligómeros, protofibrillas, fibrillas y, finalmente, placas amiloides insolubles, las cuales se depositan en el parénquima del cerebro (Figura 7). A pesar de la relativa estabilidad que tienen las fibrillas, estas se encuentran en un equilibrio dinámico con las otras estructuras. La velocidad de agregación depende de diversos factores como el pH, la fuerza iónica, la concentración del péptido e iones metálicos.^{1,29}

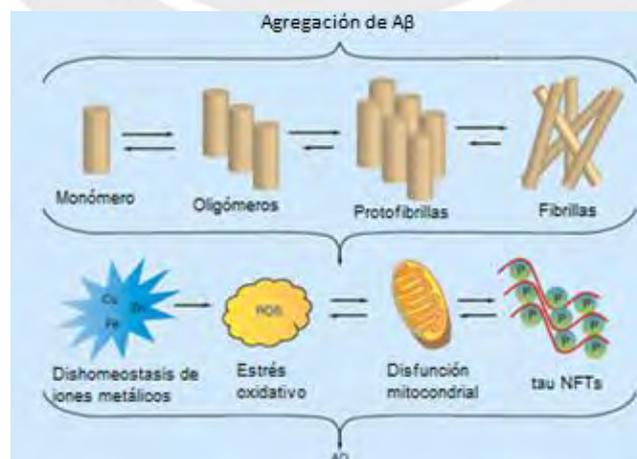


Figura 7: Representación esquemática de la agregación de los péptidos A β y su toxicidad en la hipótesis de la cascada amiloide (Adaptado de 1).

De todas estas estructuras, se propone que los oligómeros serían las especies más tóxicas. Esta hipótesis está basada en estudios bioquímicos que muestran que la presencia de oligómeros solubles correlaciona mejor con las deficiencias cognitivas en pacientes con AD. No obstante, esta hipótesis todavía sigue en debate, incluso no se conoce si la agregación de las placas A β serían la causa o una consecuencia de esta enfermedad.²⁸

Existen diversos mecanismos de eliminación de los péptidos y las placas A β (Figura 8). Entre ellas se encuentran la degradación por microglías o por peptidasas como la enzima que degrada insulina (IDE) y la neprilisin (NEP). Asimismo, esta remoción puede ocurrir por la unión de los péptidos con la lipoproteína receptora de baja densidad (LRP) o las chaperonas A β (apoE y α 2 M), las cuales se encargan de transportar a A β del cerebro hacia el plasma para su posterior degradación en el hígado o en los riñones. Sin embargo, este proceso puede darse en sentido contrario, es decir, es posible que A β pase a través de la barrera hematoencefálica (BBB) vía el receptor para avanzada glicación en productos terminales (RAGE).³⁰

Asimismo, se han encontrado maneras de evitar que ocurra la formación de las placas A β . Por ejemplo, el bloqueo de las interacciones de los péptidos A β con los iones Zn⁺² y Cu⁺² impide la agregación de estos péptidos en forma de placas.³⁰

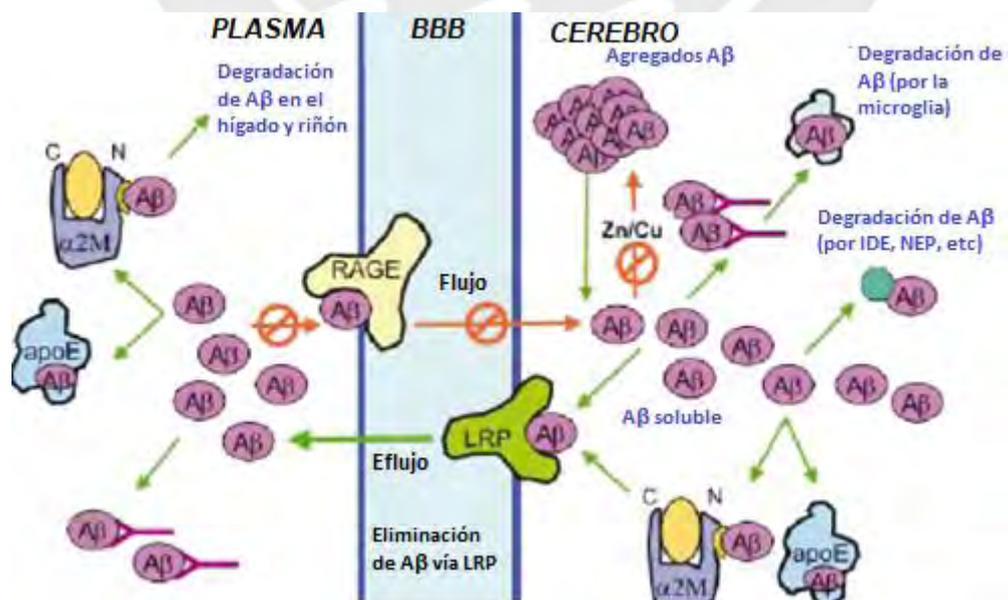


Figura 8: Mecanismos de eliminación y transporte del A β (Adaptado de 30).

Numerosos estudios *postmortem* en pacientes con AD han confirmado la presencia de placas A β como principal biomarcador para esta enfermedad. Asimismo, según la hipótesis de la cascada amiloide, la acumulación de placas A β desencadenaría una serie de eventos patológicos como la dishomeostasis de iones metálicos, la producción de especies radicales de oxígeno, estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la hiperfosforilación de la proteína tau, la formación de NFTs y; eventualmente, la muerte neuronal (Figura 7).^{1,27}

2.2.2 Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares (NFTs) están conformados por ubiquitinas, colinesterasas y principalmente, por la proteína microtubular tau fosforilada.²⁶ Esta proteína citosólica, expresada en las neuronas, está involucrada en los procesos de ensamblaje y estabilización del transporte axonal. Estas funciones son reguladas por modificaciones post-traducción, especialmente, por la fosforilación de los residuos de serina y treonina.⁸

La proteína tau presenta 6 isoformas, con diferente número de exones, expresadas a partir de un empalme alternativo del mRNA del gen MAPT en el cromosoma 17 (Figura 9). Las isoformas se diferencian en la presencia (tau 4R) o ausencia (tau 3R) de un cuarto dominio repetido codificado en el exón 10 y en la cantidad de inserciones en el N-terminal. La cadena polipeptídica posee 3 zonas basadas en su interacción con los microtúbulos: un extremo N-terminal ácido, una región rica en prolinas y un dominio C-terminal básico.^{31,32}

La interacción de tau con los microtúbulos se da de manera específica a través de los dominios de unión de microtúbulos (MBDs). Estos MBDs son 3 o 4 dominios repetidos con 31-32 residuos localizados en el extremo C-terminal. Por otro lado, la fosforilación de las regiones ricas en prolinas juega un rol importante en las interacciones entre tau y los MBDs, así como también favorece la agregación de la proteína.^{31,32}

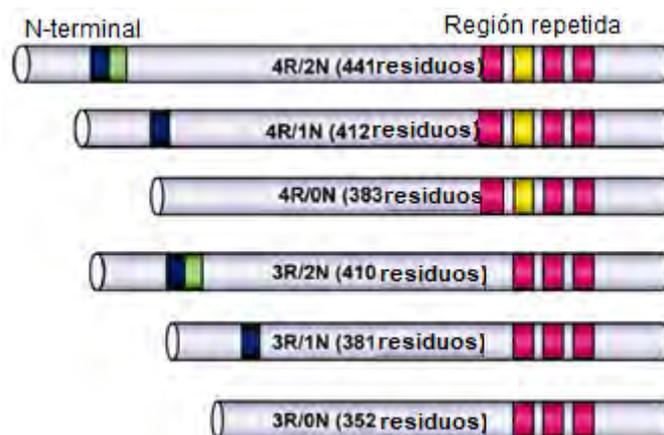


Figura 9: Isoformas de tau producidas a partir de un solo gen por un empalme alternativo. Las secciones de color azul, verde y amarillo representan los exones 2, 3 y 10, respectivamente (Adaptado de 33).

Un aumento excesivo en la fosforilación de tau ocasionaría su acumulación, agregación y formación de ovillos neurofibrilares en las dendritas. De esta forma, se afectaría el transporte dendrítico y axonal, la distribución de proteínas y organelas, y la señalización celular. El deterioro de todos estos procesos causa neurodegeneración, muerte neuronal y deterioro cognitivo.³¹ A este tipo de desórdenes se les conoce como taupatías, las cuales incluyen el AD y algunas formas de demencia frontotemporales (FTD).³³

La fosforilación de tau estaría modulada por los genes que codifican la proteína precursora amiloide (APP) y el complejo γ -secretasa, conformado por las proteínas presenil-1 (PS-1) y presenil-2 (PS-2). Todas estas enzimas están involucradas en el procesamiento proteolítico del péptido A β , el cual al agregarse induce la fosforilación de tau por la activación de la quinasa-1 GSK-3b y la regulación negativa de la fosfatasa PP2A. Asimismo, los factores de riesgo asociados al desarrollo del AD como la isoforma de APOEe4 y las condiciones de estrés oxidativo, también inducirían a la fosforilación de esta proteína.³²

Las placas A β , descritas en la sección anterior, así como los NFTs son los biomarcadores más importantes y estudiados en la enfermedad del AD. La gráfica de la Figura 10 muestra la relación entre los estadios clínicos del Alzheimer con la concentración de placas amiloides y

ovillos neurofibrilares. Al inicio de la gráfica, en la fase preclínica de esta enfermedad, se observa una acumulación de los dos biomarcadores por un periodo de 10-15 años. En esta fase el paciente no desarrolla ningún síntoma cognitivo que demuestre pérdida neuronal; sin embargo, hay una ligera disminución en la integridad neuronal. Eventualmente, en las fases de MCI y demencia, el individuo presenta un incremento drástico en el contenido de A β y NFTs, lo cual se relaciona con un gran daño neuronal y disfunción sináptica.⁸

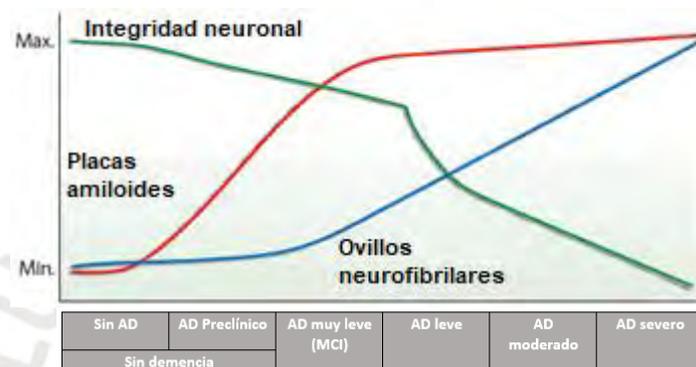


Figura 10: Cambios de los biomarcadores en relación con los estadios clínicos del AD (Adaptado 8).

2.3 Otros biomarcadores

Las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares no son los únicos biomarcadores que definen el proceso de la enfermedad del AD, ya que existen otros cambios en la estructura y el funcionamiento del cerebro que podrían contribuir al diagnóstico y la prognosis durante la fase preclínica de esta enfermedad. Por ejemplo, la disminución de A β 42 en el CSF, la presencia de A β 42 en el cerebro, la inflamación, el estrés oxidativo, la microgliolisis, el hipometabolismo regional, la atrofia cerebral, el aumento de tau y tau fosforilada en el CSF son algunos de los biomarcadores reportados en la literatura.⁸

La inflamación sistémica es causada por alguna infección, una enfermedad crónica o una sepsis, entre otros factores. Esta respuesta está marcada por un incremento de las proteínas citoquinas proinflamatorias (interleuquinas IL y el factor α de tumor de necrosis TNF- α) que

atraviesan la barrera hematoencefálica (BBB) y desencadenan una cascada de señalizaciones en el sistema nervioso central. De esta forma, se induce la liberación de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, las cuales activan a las microglías y a los astrocitos que protegen al cuerpo de distintos patógenos. Sin embargo, una activación prolongada de estas células gliales podría promover procesos neurodegenerativos (AD) a través de la fagocitosis sináptica, la regulación positiva de quinasas que favorecerían la hiperfosforilación de tau y la oligomerización de A β .³⁴

Estudios han demostrado que las personas que padecen de AD o MCI tienden a tener mayores niveles de citoquinas proinflamatorias, receptores de citoquinas y otros biomarcadores inflamatorios como la IL-6 y el receptor soluble TNF α en la sangre. Por ello, estos resultados indicarían que existiría una conexión entre los procesos inflamatorios con la patogénesis de esta enfermedad.³⁴

De la misma forma, el estrés oxidativo desempeña un rol importante en la enfermedad del Alzheimer, ya que produce especies radicales de oxígeno (ROS), hidroxilos especialmente, en presencia de iones metálicos que podrían influir en el metabolismo y promover la agregación de A β . Estos radicales libres causan un incremento en la peroxidación de ácidos grasos polinsaturados, los cuales producen isoprostanos que podrían ser empleados como biomarcadores en el CSF. Asimismo, como resultado de la oxidación del ADN se generan 8-hidroxi-guaninas que también son potenciales biomarcadores en el CSF. Por último, el estrés oxidativo causa un aumento en las células microgliales en el sistema nervioso central que generaría procesos de neuroinflamación que desencadenaría el AD.^{8,30}

2.4 Hipótesis de la cascada amiloide

La hipótesis de la cascada amiloide para la enfermedad del Alzheimer es una de las más conocidas, estudiadas y aceptadas por la academia y la industria farmacéutica. Esta hipótesis

propuesta por Hardy y Allsop hace más de 25 años sintetiza la información histopatológica y genética en una sola teoría.³⁵ Además, sugiere que la acumulación y la agregación de A β en forma de placas, especialmente A β 42, desencadenaría una serie de eventos como la formación de NFTs, la interrupción de las conexiones sinápticas, la activación de las células microgliales y los astrocitos que generarían una neuroinflamación y eventualmente, una pérdida neuronal que terminaría en el desarrollo del AD (Figura 11).³⁶

Los monómeros A β 42 se forman a partir del procesamiento proteolítico de la proteína amiloide precursora (APP). Estos péptidos extracelulares empiezan a agregarse en forma de oligómeros, fibrillas y placas que interactúan con las membranas neuronales, alterando la transducción de señales y la actividad neuronal. Esto genera la activación de las células microgliales, las cuales incrementan la producción de citoquinas (IL-1 β y TNF- α) que atraviesan la BBB para activar los astrocitos e inducir la producción de α 1-antiquimotripsina (ACT), α 2-macroglobulina (α 2 M) y la apolipoproteína (apoE). Además, las células microgliales y las neuronas producen otros factores complementarios que causan la pérdida sináptica y el daño neuronal.^{16,36}

Asimismo, la agregación de las placas A β en los vasos sanguíneos del cerebro origina angiopatía amiloide cerebral (CAA), la cual disminuye el suministro de oxígeno y nutrientes que llegan al cerebro e impide la eliminación de los productos metabólicos en el sistema nervioso central. Esto ocasiona microinfartos que promueven la activación de astrocitos y microglía.^{16,36}

También, la acumulación de las placas A β causa la activación de las quinasas y la inhibición de las fosfatasa, lo cual genera la hiperfosforilación de tau y la formación de NFTs y neuritas distróficas en las dendritas. De esta forma, se bloquean los procesos de transporte y señalización celular, lo cual origina que las neuronas se vuelvan disfuncionales y eventualmente, mueran.⁸

La proteína α -sinucleína (α -SN), encontrada en los cuerpos de Lewy de la enfermedad del Parkinson, es expresada abundantemente en el cerebro en situaciones de estrés oxidativo. Su principal función es interactuar con las vesículas sinápticas en las dendritas, sin embargo, los estudios sugieren que estaría involucrada en la patogénesis del AD, pues induciría a la fosforilación y agregación de tau mediante la formación de un complejo con la fosfatasa GSK-3 β .³¹

La lipoproteína apoE, expresada en el cerebro luego de que ocurre un daño en las neuronas, desempeña un rol de protección y reparación mediante el transporte de colesterol a las membranas. No obstante, la isoforma de apoE4 es menos efectiva en estos procesos de señalización, ya que es más susceptible a sufrir una proteólisis intraneuronal. Además de la función de transporte de colesterol a las membranas, apoE tiene el rol de unirse con las placas A β y formar complejos estables, para luego transportarlos del cerebro a la periferia. Algunos estudios han demostrado que este transporte de las placas A β es menos efectivo con la isoforma de apoE4, en comparación con apoE2 y apoE3. Esto genera que la proteína apoE4 incremente la producción de A β e impida su eliminación. Asimismo, cuando esta proteína se expresa en una neurona con estrés oxidativo, apoE4 se fragmenta en residuos neurotóxicos que desestabilizan el citoesqueleto e impiden las funciones mitocondriales.^{16,36}

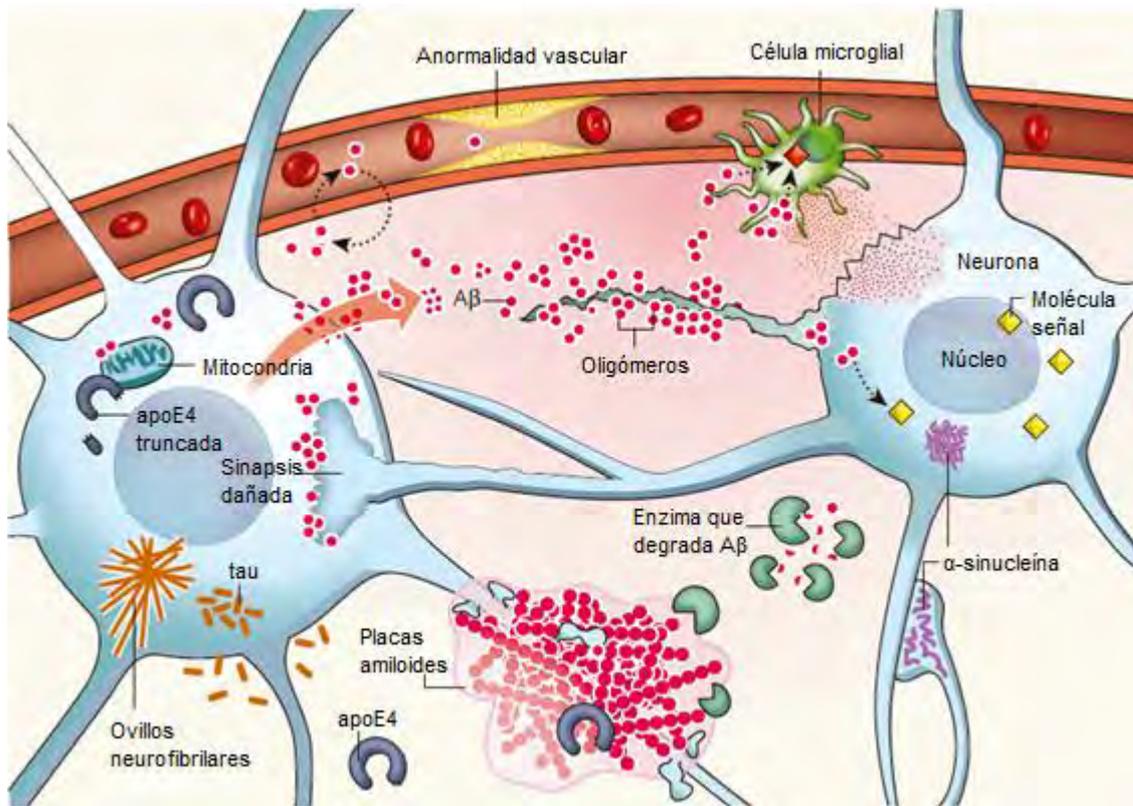


Figura 11: Representación esquemática de la hipótesis de la cascada amiloide (Adaptado de 16).

Toda esta cascada de eventos originada a partir de la agregación del péptido Aβ₄₂ en forma de placas constituye la hipótesis de la cascada amiloide. Esta teoría ha sido de mucha utilidad en los últimos años, pues ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos y métodos de diagnóstico a partir de algunos de los biomarcadores de esta hipótesis. En el siguiente capítulo, se estudiarán los diferentes métodos de diagnóstico de estos biomarcadores, con especial énfasis en los radiofármacos comerciales y en exploración basados en complejos con metales de transición.

3 DIAGNÓSTICO BASADO EN TÉCNICAS DE IMAGEN

Actualmente, el diagnóstico de Alzheimer está basado en la historia clínica del paciente, en exámenes neurológicos, psiquiátricos y de laboratorio.⁸ Los exámenes formales cognitivos resultan ser muy útiles para determinar la situación clínica y evitar confusiones con otro tipo de enfermedades como la depresión. Asimismo, los diferentes exámenes neuropsicológicos evalúan al paciente en diferentes áreas como son la orientación, intelecto, lenguaje, memoria, atención, concentración, habilidades visuales/perceptivas, funciones sensorial-motoras, personalidad y estado de ánimo. También se toman algunos exámenes de laboratorio, como los de sangre, los cuales ayudan a descartar otras posibles causas de este tipo de patologías como son la presencia de un tumor y la falta de vitaminas, entre otros. Con esta información es posible presumir que el paciente padezca de demencia por Alzheimer.^{5,8}

Sin embargo, hasta el momento el diagnóstico de demencia debido a la enfermedad del Alzheimer solo puede ser confirmado mediante una biopsia del cerebro del paciente.⁸ No obstante, debido a que el proceso de daño cerebral por el AD comienza en la fase preclínica con la agregación de placas A β y la formación de NFTs, es posible hacer un diagnóstico temprano de esta demencia si se detectan estos biomarcadores antes de que ocurra la neurodegeneración significativa en el paciente.^{1,8}

Por ello, nuevos avances en la tecnología y la ciencia han permitido desarrollar técnicas de neuroimagen y exámenes bioquímicos del fluido cerebroespinal (CSF) y del plasma sanguíneo para la detección de estos biomarcadores del Alzheimer en la fase preclínica.⁸

En este documento se describirán las técnicas y fármacos de neuroimagen de uso actual y aquellos que se encuentran en etapas de exploración, los cuales van a permitir detectar algunos de los biomarcadores presentes en el AD. Entre las técnicas de neuroimagen más

empleadas para el diagnóstico de esta patología se encuentran la imagen por resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones.

3.1 Imagen por resonancia magnética (MRI)

El MRI es una técnica de imagen no invasiva con alta resolución espacial que se basa en el fenómeno de resonancia magnética (Figura 12). Este fenómeno consiste en la alineación de los espines de los protones del agua por un fuerte campo magnético externo de 1.5-3T (B_0). Luego, se induce un pulso de radiofrecuencia (RF) en el paciente, el cual fuerza a los espines de los protones a salir de ese estado de equilibrio. Una vez que el RF se detiene, los espines nucleares se relajan y vuelven a alinearse con el campo magnético, generando una corriente inducida, la cual es detectada por una bobina de alambre y transformada en imágenes. La amplitud de esta señal detectada es proporcional a la concentración de protones y varía según los cambios en el ambiente y la naturaleza química de las moléculas que rodeen estos protones.³⁷

Para mejorar la calidad de las imágenes se suelen emplear agentes de contraste basados en metales con un alto momento paramagnético (Gd^{+3} y Fe^{+3}), los cuales aumentan el tiempo de relajación de los espines y, de esta forma, incrementan la sensibilidad, el contraste y el procesamiento de estas imágenes. De esta manera, es posible distinguir y visualizar la estructura de distintos órganos y tejidos del paciente.³⁷

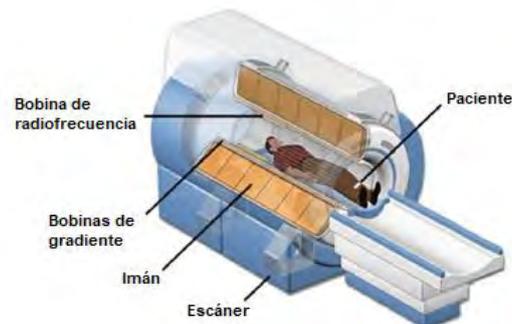


Figura 12: Componentes de un equipo de resonancia magnética (MRI) (Adaptado de 69).

Existen diferentes modalidades de esta técnica de imagen que permiten obtener distinta información acerca del diagnóstico del AD. Entre las más importantes se encuentran el MRI estructural y el MRI funcional (fMRI).³⁸

En pacientes con AD, el MRI estructural permite observar una reducción en la región frontotemporal y del hipocampo del cerebro, los cuales están involucrados en los procesos de memoria (Figura 13). Esta disminución anatómica, conocida como atrofia, supone la transición del paciente de una fase preclínica a una fase MCI, o de una fase MCI a la fase de demencia por AD.³ De hecho, un estudio de meta-análisis estimó que la atrofia media temporal podía predecir el cambio en el estado de un paciente con MCI a demencia por AD con un 73% de sensibilidad y 81% de especificidad.³⁹ Asimismo, la técnica MRI con alta resolución cuantitativa permite discriminar el AD del proceso común de envejecimiento, el cual presenta este mismo biomarcador.²⁶



Figura 13: Vista axial del cerebro de un paciente con Alzheimer tomada por MRI estructural para cuantificar la velocidad de atrofia anual. Esta región de atrofia es representada con una escala de colores, donde el azul oscuro representa que la velocidad anual de atrofia es de 0.4% y el amarillo/verde es de 1%.⁸

Sin embargo, la atrofia y el deterioro cognitivo ocurren en la mayoría de trastornos neurodegenerativos, es decir, aunque se observe una disminución en el volumen de ciertas regiones del cerebro, esta técnica no confirma que el paciente padezca una forma particular de demencia. Por tanto, empleando solo MRI no es posible realizar un diagnóstico certero y, en consecuencia, tampoco tratar adecuadamente al paciente.⁸

Por otro lado, la resonancia magnética funcional (fMRI) es una técnica de neuroimagen empleada para la obtención de imágenes de las zonas del cerebro con mayor actividad. El principio de esta técnica está basado en las diferencias de concentraciones de oxihemoglobina

y desoxihemoglobina en la sangre; es decir, esta técnica depende de los niveles de oxígeno en la sangre (BOLD). Una alta concentración de desoxihemoglobina (paramagnético) en los glóbulos rojos causa una alteración en el campo magnético de los protones del agua, lo cual termina disminuyendo la señal MRI, generando que esta región en la imagen se vuelva oscura. En cambio, la oxihemoglobina (diamagnético) no desencadena un efecto magnético relevante en la imagen obtenida.⁴⁰

El cerebro, al ser el órgano más activo metabólicamente, no presenta reservas energéticas ni de oxígeno, por lo que depende exclusivamente del suministro de nutrientes a través de la sangre. Así, cuando una neurona es activada, inmediatamente, la célula comienza a metabolizar una mayor cantidad de oxígeno de las oxihemoglobinas en los capilares, lo cual aumenta las moléculas de desoxihemoglobina. En base a esto, se esperaría una disminución en la señal en las regiones de activación en el cerebro, debido al mayor número de moléculas paramagnéticas. No obstante, la presencia de neurotransmisores induce la liberación de compuestos químicos por los astrocitos hacia las arterias para dilatarlas e incrementar el flujo de sangre cerebral (CBF) a la neurona en actividad. Por ello, aunque la célula esté consumiendo más oxígeno, el volumen de sangre con oxihemoglobina que llega a la neurona es mucho mayor. En consecuencia, se observa un aumento en la señal MRI en las células activas, en comparación, con las células inactivas.^{40,41} Las imágenes que se obtienen al final del análisis son el resultado de estímulos visuales que recibe el paciente cada 30 segundos. De esta forma, se espera que la señal aparezca y desaparezca con la presencia o ausencia de los estímulos, respectivamente.⁴⁰

La pérdida de neuronas en el lóbulo temporal medio y el hipocampo es muy común en la enfermedad del Alzheimer. Esta pérdida coincide con la deficiencia de la actividad cognitiva, la cual puede ser detectada por la técnica de imagen no invasiva fMRI. En pacientes con AD se observa una hipoactivación en el lóbulo medio temporal (Figura 14). En cambio, en individuos en la fase preclínica de esta enfermedad, donde todavía no hay mucho daño

neuronal, se puede visualizar una hiperactivación en la misma región del cerebro debido a que el cuerpo trata de compensar esta ineficiencia funcional.^{3,8}

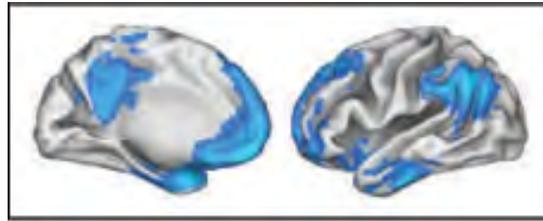


Figura 14: Vista lateral del hemisferio izquierdo del cerebro de un paciente con AD tomada por fMRI para evaluar la deficiencia en la actividad neuronal. El color celeste representa una mayor deficiencia, mientras que el color azul una menor deficiencia neuronal.⁸

3.2 Tomografía de emisión de positrones (PET)

La medicina nuclear es una rama de la medicina que se encarga del diagnóstico y tratamiento de enfermedades mediante técnicas que emplean radioisótopos en concentraciones muy bajas, con lo cual se logra obtener imágenes de órganos y tejidos del paciente.⁴²

Una de las técnicas más conocidas en esta área es PET (Tomografía de Emisión de Positrones, por sus siglas en inglés). Esta técnica emplea pequeñas moléculas marcadas con radioisótopos denominadas radiofármacos, los cuales deben ser introducidos en el paciente por vía intravenosa, oral o alguna cavidad corporal. Dichos compuestos, debido a sus propiedades químicas particulares interactúan con órganos o tejidos selectivamente. El radioisótopo se desintegra emitiendo positrones, de manera no invasiva en el paciente, los cuales eventualmente colisionan con un electrón del medio para producir dos fotones de radiación gamma que viajarán en direcciones opuestas. Los detectores ubicados alrededor del paciente detectan los pares de fotones que permiten recrear una imagen tridimensional del órgano o tejido.^{42,43} (Figura 15)

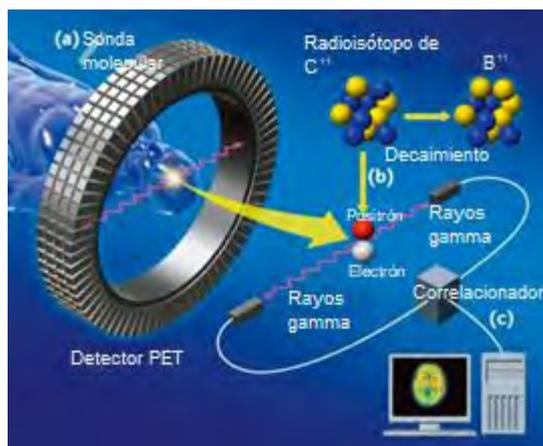


Figura 15: Funcionamiento de la Tomografía de Emisión de Positrones (PET) (Adaptado de 53).

El desarrollo de esta técnica y de radiofármacos que interactúen con biomarcadores específicos abre nuevas posibilidades para el diagnóstico de distintas enfermedades, entre ellas el AD.

En estas dos últimas décadas, se han sintetizado diferentes radiofármacos que cruzan la BBB y se asocian con las placas $A\beta$ para poder diagnosticar el AD a través de una imagen PET no invasiva. La mayoría de estos compuestos presentan una estructura química similar a la de los estilbenos y benzotiazoles. Ambas estructuras contienen sistemas de anillos aromáticos conjugados y rígidos con grupos donadores de electrones, lo cual hace posible que estas moléculas entren en los bolsillos hidrofóbicos de las placas $A\beta$ y se unan a los residuos de aminoácidos aromáticos mediante interacciones π - π .⁴⁴

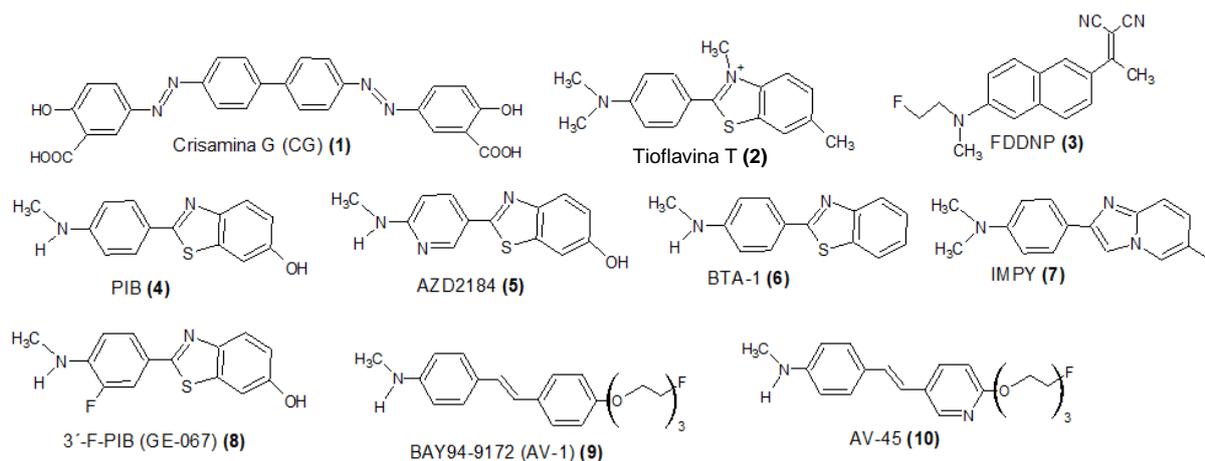


Figura 16: Estructuras de distintas moléculas estudiadas por su afinidad a las placas A β en cerebros de pacientes con AD *postmortem*.

Algunos de los pigmentos orgánicos conjugados que han sido estudiados por su afinidad a las placas A β en cerebros de pacientes con AD *postmortem* son el Congo rojo, la crisamina G (CG) y las tioflavinas S y T (ThS y ThT), entre otros (Figura 16).⁴⁴

En la Tabla 2, se observa que los compuestos **(4)-(10)** (Figura 16) presentan una baja constante de inhibición (K_i), lo cual indica que tienen una alta afinidad por las placas A β y requieren una baja concentración para unirse a ellas selectivamente. Esto demuestra que los radiofármacos derivados de los benzotiazoles y estilbenos con grupos donadores de electrones (aminas o hidroxilos) muestran una mayor afinidad por estos biomarcadores. En cambio, los compuestos con una estructura distinta como bifenilos **(1)** y naftalenos **(3)** muestran una menor interacción con las placas A β . Asimismo, las moléculas cargadas, como la tioflavina **(2)**, tienen una mayor dificultad para atravesar la BBB e ingresar al cerebro. Por esta razón, su constante de inhibición es significativamente alta en comparación con las K_i de otros compuestos.

Tabla 2: Constantes de inhibición (K_i) de varios compuestos que compiten con el [^{18}F]-AV-45 por su unión con las placas A β en cerebros de pacientes con AD *postmortem* (Adaptado de 44)

Compuesto	K_i (nM)	Compuesto	K_i (nM)
Crisamina G (CG) (1)	>1000	BTA-1 (6)	1.28 \pm 0.46
Tioflavina T (2)	>1000	IMPY (7)	1.29 \pm 0.46
FDDNP (3)	172 \pm 18	GE-067 (3'-F-PIB) (8)	0.74 \pm 0.38
PIB (4)	0.87 \pm 0.18	BAY 94-9172 (AV-1) (9)	2.22 \pm 0.54
AZD2184 (5)	1.70 \pm 0.54	AV-45 (10)	2.87 \pm 0.17

Estudios de dinámica molecular muestran las posibles interacciones entre la secuencia de aminoácidos del péptido amiloide (DFGAILS) y los agentes de imagen ThT (2) y [^{11}C]-PIB (4) (Figura 17). La simulación de esta fibrilla consiste en una capa doble de 10 hojas β antiparalelas, de esta manera, se forman los bolsillos entre ambas capas. Dentro de todos los posibles sitios de unión que puede tener la fibrilla, los bolsillos hidrofóbicos de las caras superiores e inferiores presentan una mayor afinidad por el ThT y el [^{11}C]-PIB, debido a las interacciones π - π . Sin embargo, si se compara el ThT con su análogo neutro [^{11}C]-PIB se observa que la unión de este último con las placas A β es energéticamente mucho más favorable, como se demuestra en la Tabla 2.⁴⁵

No obstante, una alta afinidad por las placas A β no basta para ser un agente de diagnóstico óptimo para el AD. Existen otros requisitos que debe cumplir un radiofármaco, entre los cuales se encuentran: una alta selectividad, eficiencia en el rendimiento de marcaje isotópico, un peso molecular inferior a los ~ 500 g/mol, una alta y rápida asimilación en el cerebro, una eliminación eficiente en un corto periodo de tiempo, y una lipofilidad de $\log P=0.1-3.5$.⁴⁴ Este último parámetro fisicoquímico hace referencia al coeficiente de partición de una molécula entre una fase hidrofílica (agua) y una fase lipofílica (octanol). Es decir, una molécula con un menor $\log P$ será más hidrofílica y podrá ser transportada rápidamente por la sangre hasta el cerebro, pero tendrá mayores dificultades para atravesar la BBB. En cambio, una molécula con un mayor $\log P$ será más lipofílica y permeable por la BBB; sin embargo, su alta hidrofobicidad dificultaría su transporte por la sangre. Por ello, un fármaco óptimo deberá

presentar un logP intermedio, de tal forma que sea soluble en la sangre y logre cruzar la BBB eficientemente.⁴⁶

Todas estas propiedades varían de los ensayos *in vitro* a los ensayos *in vivo*, pues muchas de las moléculas de la Figura 18 suelen ser inestables, poco selectivas e incluso no logran atravesar la BBB. Por ello, es de suma importancia contar con información de ensayos *in vivo*. En ese sentido, entre los radiofármacos que han resultado exitosos en la caracterización de placas A β en ensayos *in vivo* se encuentran aquellos que presentan radioisótopos de ¹¹C, ¹⁸F y metales de transición.^{2,47,48}

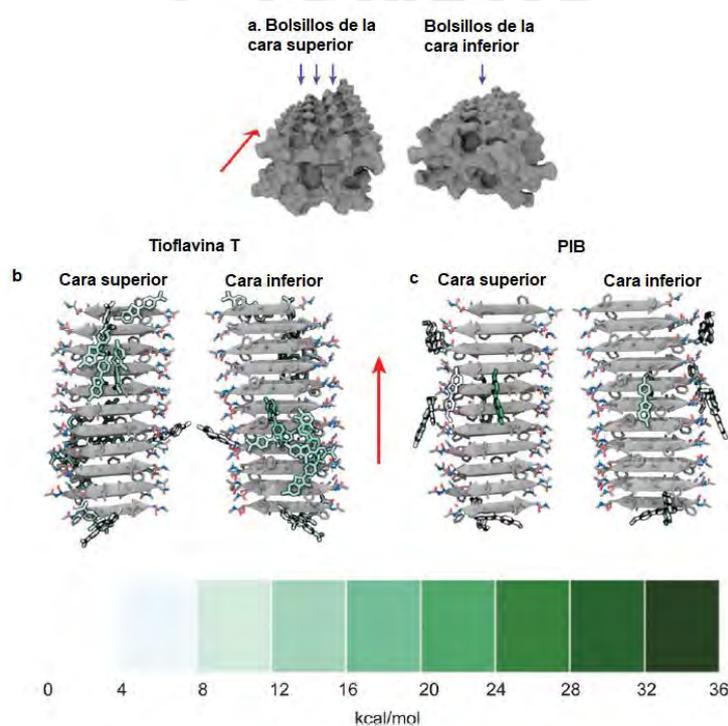


Figura 17: Representación de la superficie de las fibras A β simuladas unidas a la Tioflavina T y PIB. El incremento en la intensidad de color en estas moléculas indica una mayor afinidad con las fibrillas (Adaptado de 45).

3.2.1 Agentes de diagnóstico basados en ¹¹C

Los radiofármacos basados en el radioisótopo de ¹¹C han demostrado tener una gran capacidad para unirse selectivamente a las placas A β .⁴⁷ Lamentablemente, el principal desafío

de emplear este radioisótopo es su corto tiempo de vida media ($t_{1/2} = 20$ min). Esto genera que su aplicación se encuentre mayormente en centros médicos que cuenten con un ciclotrón y un equipo de profesionales especializados en radioquímica.⁴⁹ A continuación, se muestran algunos de los radiofármacos de ^{11}C que han presentado una gran afinidad a las placas $\text{A}\beta$ en humanos con AD (Figura 18).

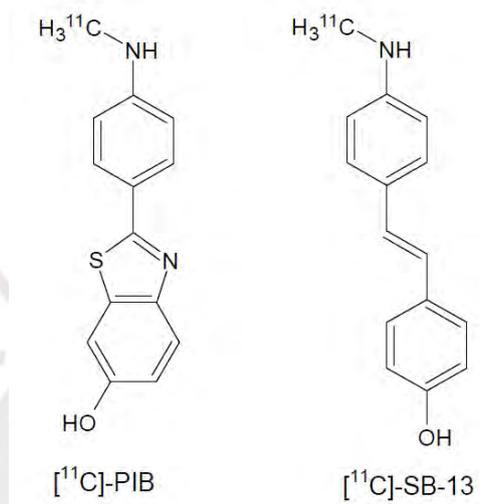


Figura 18: Agentes de radioimagen de ^{11}C afines a las placas $\text{A}\beta$

El compuesto B de Pittsburgh ($^{11}\text{C}\text{-PIB}$) (Figura 18), análogo a las tioflavinas, es uno de los radiofármacos que ha sido más estudiado para el diagnóstico de Alzheimer por PET, debido a su eficiente interacción con las placas $\text{A}\beta$. Esta unión no ocurre con los péptidos u oligómeros $\text{A}\beta$ solubles, ya que estas estructuras no poseen los bolsillos hidrofóbicos con los cuales interactúa este radiofármaco. En individuos con AD se observa la retención de este compuesto en regiones cerebrales específicas, típicamente asociadas a la corteza prefrontal y a las áreas del precúneo y cinguladas (Figura 19).⁵⁰

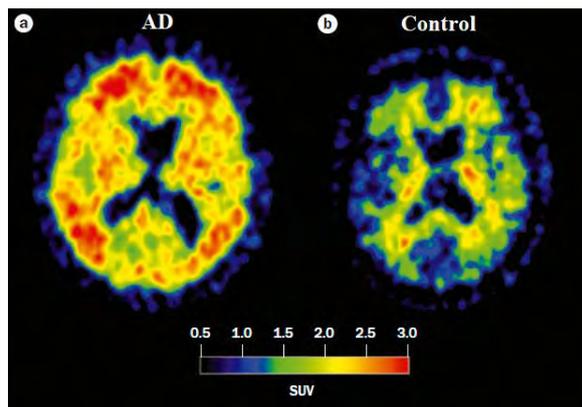


Figura 19: Vista axial del cerebro de un paciente con Alzheimer tomada por $[^{11}\text{C}]$ -PIB PET para cuantificar el contenido de placas $\text{A}\beta$. La escala de colores representa con rojo una mayor retención de $[^{11}\text{C}]$ -PIB y con negro o azul oscuro una menor retención de $[^{11}\text{C}]$ -PIB.⁵⁴

Para demostrar esta asociación, se realizó un estudio por 20 ± 3 meses con 206 individuos: 35 con demencia debido al AD, 65 con MCI y 106 controles sanos. Al aplicar el radiofármaco y analizar los resultados por PET, se obtuvo que el 97% de individuos con AD, el 69% con MCI y el 31% de controles sanos presentaron una alta retención de $[^{11}\text{C}]$ -PIB en el cerebro. Luego de 20 meses, se realizó nuevamente el análisis y se observó un incremento en la retención de $[^{11}\text{C}]$ -PIB del 5.7% en pacientes con AD, 2.1% en individuos con MCI y 1.5% en los controles sanos, en comparación con los análisis iniciales. Además, la progresión a demencia por AD ocurrió en el 67% de individuos con MCI que mostraron una alta señal de $[^{11}\text{C}]$ -PIB al inicio. Sin embargo, el 20% de personas con MCI que tuvieron una baja afinidad por $[^{11}\text{C}]$ -PIB presentaron otras demencias. Por otro lado, el 16% de los controles sanos con alta retención de $[^{11}\text{C}]$ -PIB desarrolló MCI o AD en esos 20 meses y el 25% en 3 años.⁵¹ Este estudio muestra la gran diferencia en la afinidad del compuesto $[^{11}\text{C}]$ -PIB entre pacientes con AD e individuos cognitivamente sanos, lo cual hace a este un agente de diagnóstico atractivo para poder predecir y monitorear el desarrollo de esta enfermedad.

Por otro lado, el 4-N-metilamino-4'-hidroxiestibeno ($[^{11}\text{C}]$ -SB-13) (Figura 18), presenta una gran afinidad por los agregados $\text{A}\beta$ *in vitro* ($K_i = 6$ nM). Asimismo, este radiofármaco muestra una lipofiliidad moderada ($\log P = 2.36$), gran penetración y eliminación efectiva en los bioensayos realizados en ratones. También, se hizo un estudio en pacientes con AD y en individuos cognitivamente sanos que tenían entre 54-77 años, donde se comparaban los agentes

de imagen [^{11}C]-PIB y [^{11}C]-SB-13. De esta forma, se demostró que ambos radiofármacos presentaban una alta retención en las cortezas de las regiones frontales y posteriores del lóbulo parietal y temporal en pacientes con AD. Esto indica que el [^{11}C]-SB-13 es una molécula que se compara en eficiencia con el [^{11}C]-PIB, ya que ambos permiten discriminar a los pacientes con AD de individuos cognitivamente sanos.⁵²

3.2.2 Agentes de diagnóstico basados en ^{18}F

Los radiofármacos basados en ^{11}C han demostrado una gran afinidad por las placas $\text{A}\beta$ en pacientes con AD, sin embargo, la principal desventaja de estos agentes de contraste es su corto tiempo de vida media ($t_{1/2} = 20$ min). Por ello, para mejorar estos radiofármacos se han sintetizado otras moléculas con el radioisótopo ^{18}F , el cual presenta un tiempo de vida media de 110 minutos. Esto facilita su manipulación y distribución desde el lugar de síntesis en el ciclotrón hacia el centro médico, donde es aplicado al paciente.⁴⁹

Uno de los radiofármacos de ^{18}F más empleados en PET debido a su diversidad de aplicaciones en varios tipos de cáncer, escaneo de huesos y enfermedades neuronales, es el análogo fluorado de la glucosa, conocido como fluorodesoxiglucosa (^{18}F]-FDG) (Figura 20).⁴³

Las neuronas en acción de una persona sana metabolizan grandes cantidades de glucosa para obtener energía; sin embargo, en pacientes con Alzheimer que presentan una supresión en la función sináptica metabolizan una menor cantidad de glucosa.⁵³ La toma de imágenes por PET [^{18}F]-FDG a un paciente con AD permite observar una reducción de la señal en la zona del precúneo, el lóbulo lateral parietal y el lóbulo temporal (Figura 21). Estas regiones del cerebro que presentan hipometabolismo correlacionan con la alta retención de [^{11}C]-PIB y, por tanto, con la deposición de las placas $\text{A}\beta$. En ese sentido, estos estudios demuestran que el [^{18}F]-FDG es un agente de imagen robusto capaz de predecir la velocidad del deterioro cognitivo progresivo en la enfermedad del Alzheimer.^{54,55}

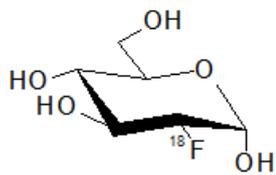


Figura 20: Estructura de la fluorodesoxiglucosa ($[^{18}\text{F}]$ -FDG)

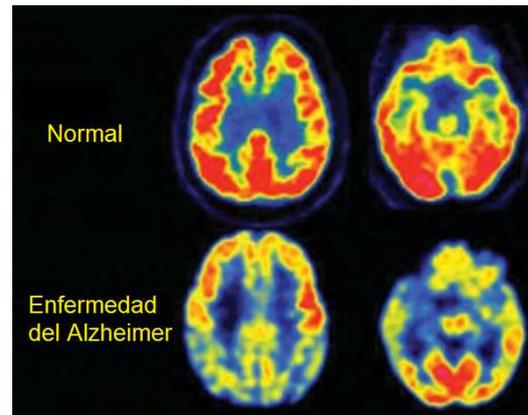


Figura 21: Vista axial del cerebro de un individuo sano y de un paciente con Alzheimer tomada por $[^{18}\text{F}]$ -FDGPET. La escala de colores representa con el color rojo un mayor metabolismo de glucosa, mientras que el color azul indica un menor metabolismo de glucosa.⁵⁵

Además del $[^{18}\text{F}]$ -FDG, se han estudiado diversos agentes de contraste con radioisótopos de ^{18}F que son afines a las placas $\text{A}\beta$ y han sido aprobados por la FDA. Entre ellos se encuentran: el flutemetamol ($[^{18}\text{F}]$ FPIB), el florbetaben ($[^{18}\text{F}]$ AV-1) y el florbetapir ($[^{18}\text{F}]$ -AV-45) (Figura 22).¹

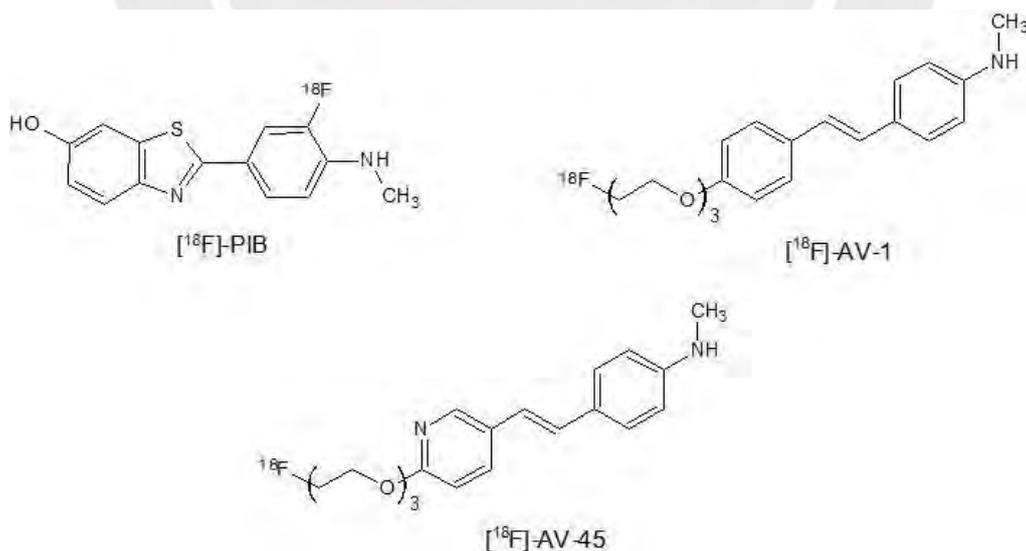


Figura 22: Agentes de radioimagen de ^{18}F afines a las placas $\text{A}\beta$ aprobados por la FDA

El radiofármaco [^{11}C]-PIB ha probado ser un buen agente de imagen afín a las placas $\text{A}\beta$ en cerebros de pacientes que presentan Alzheimer. Por ello, para que este sea más accesible a todos los centros médicos se reemplaza el radioisótopo de ^{11}C por el ^{18}F que presenta un mayor tiempo de vida media.⁵⁶ De esta forma, se sintetiza el flutemetamol (^{18}F]-FPIB), el cual ha probado tener afinidad a las placas $\text{A}\beta$ tal como su análogo [^{11}C]-PIB. Estudios *in vivo* en personas sanas y con AD han demostrado que existe una gran correlación con el radiofármaco [^{11}C]-PIB (0.89-0.92).⁵⁷

Por otro lado, el compuesto [^{18}F]-AV-1 es el análogo al radiofármaco [^{11}C]-SB-13, con la diferencia de que el grupo hidroxilo en la posición 4 ha sido reemplazado por el polietilenglicol (PEG), cuyo último metilo contiene al radioisótopo ^{18}F . La variación en la longitud de esta cadena hidrofóbica permite cambiar la lipofilidad de toda la molécula.⁴⁸ Una de las grandes ventajas de este compuesto es que presenta una alta afinidad por las placas $\text{A}\beta$ ($K_i = 6.7 \pm 0.3$ nM) en cerebros de pacientes con AD *postmortem* y atraviesa rápidamente la BBB en ensayos *in vivo* con ratones (8.14 ± 2.03 %dosis/g de cerebro en 2 minutos luego de la inyección intravenosa). Adicionalmente, este radiofármaco es eliminado del cerebro en un corto periodo de tiempo (1.2 - 2.6 %dosis/g de cerebro luego de 60 minutos).⁵⁸

Estudios realizados en pacientes con Alzheimer y en individuos sanos empleando el radiofármaco [^{18}F]-AV-1, demostraron una alta retención de este compuesto en la corteza frontal del cerebro con AD (Figura 23).⁴⁴ Actualmente, este agente se encuentra en la fase clínica III y se espera que próximamente sea empleado para el diagnóstico de esta enfermedad.⁵⁹

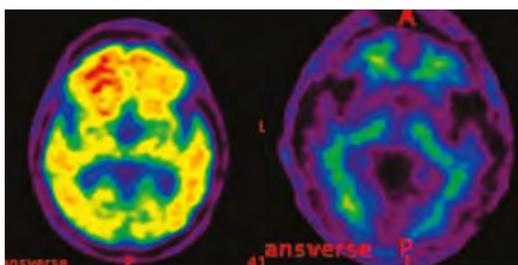


Figura 23: Vista axial del cerebro de un paciente con AD (izquierda) y de un control sano (derecha) tomada por [^{18}F]-AV-1 PET.⁴⁴

Con el propósito de explorar otros compuestos que se unan selectivamente a las placas $\text{A}\beta$, se probó reemplazar un átomo de C del anillo aromático del [^{18}F]-AV-1 por un átomo de N. De esta manera, se forma un análogo a la estilpiridina denominado florbetapir ([^{18}F]-AV-45). Este radiofármaco, también presenta una alta afinidad por las placas $\text{A}\beta$ ($K_i = 2.87 \pm 0.17$) en cerebros de pacientes con *AD postmortem*. Además, los estudios en humanos han mostrado que este agente de diagnóstico atraviesa la BBB rápidamente, lo cual permite la detección de las placas $\text{A}\beta$ luego de 30 minutos de su inyección.⁵⁸

3.2.3 Agentes de diagnóstico basados en metales

Los radiofármacos basados en radioisótopos de ^{11}C y ^{18}F presentan gran afinidad por las placas $\text{A}\beta$; sin embargo, todavía tienen ciertas desventajas que impiden que sean candidatos ideales para realizar un diagnóstico por PET.

Entre algunas de estas desventajas se encuentra el tiempo de vida media de ambos radioisótopos, pues a pesar de que el del ^{18}F es mayor (109.7 min) al del ^{11}C (20.4 min), sigue siendo corto si se toma en consideración que el radiofármaco debe sobrevivir todo el recorrido desde el lugar de fabricación a los hospitales locales, la administración a los pacientes y la duración del examen PET. Además, ambos radioisótopos, ^{11}C y ^{18}F , tienen que ser

incorporados covalentemente en la molécula, lo cual requiere que procedimientos de síntesis y de purificación más elaborados, sean realizados *in situ* en los hospitales.⁴⁷

Frente a esta problemática, surge la idea de sintetizar radiofármacos basados en radioisótopos de metales de transición. Estos elementos tienen la ventaja de presentar un mayor tiempo de vida media ($t_{1/2} = 60.55\text{min} - 10\text{d}$) y, además, pueden incorporarse de manera más rápida, sencilla y con mayores rendimientos en el radiofármaco. La forma más común de preparar este radiofármaco es a partir de kits, los cuales contienen el ligando orgánico, la sal del radioisótopo metálico y, en algunas ocasiones, agentes reductores. El rendimiento de estas reacciones de complejación suele ser bastante alto, superior al 90%.⁶⁰ Este método ha sido bastante exitoso y es empleado en la actualidad para la preparación de radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ utilizados en la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).^{47,61}

En la siguiente tabla, se muestran los radioisótopos metálicos más empleados en el diagnóstico de enfermedades por imágenes y en radioterapia (Tabla 3). Como se puede observar, el tiempo de vida media de la gran mayoría de estos radioisótopos es bastante superior en relación con el tiempo de vida media del ^{11}C y el ^{18}F . Sin embargo, este no es el único factor que debe ser tomado en consideración para elegir un radioisótopo, pues el tipo de emisión nuclear (α , β^- , β^+ , γ), sus energías, la disponibilidad, sus propiedades fisicoquímicas para reconocer los sitios activos de la enfermedad y el costo económico son aspectos a considerar antes de su elección.⁶⁰

Tabla 3: Propiedades nucleares de los radioisótopos metálicos más utilizados en el diagnóstico por imágenes y radioterapia (Adaptado de 60).

Radionúcleo	Tipo de partícula y energía de emisión (%)	Emisión gamma (%)	$t_{1/2}$
Cu-64	0.653 MeV β^+ (17.6%) Decaimiento EC (43.9%)	511 keV	12.7 h
Cu-67	0.562 MeV β^-	184.6 keV 93.3 keV 91.3 keV	2.58 d
Ga-67	Decaimiento EC	393.5 keV 300 keV 184.6 keV 93.3 keV	3.2617 d
Ga-68	0.836 MeV β^+ (90%) Decaimiento EC (10%)	1077 keV 511 keV	67.71 min
Zr-89	0.902 MeV β^+ (22.74%) Decaimiento EC (77.26%)	511 keV 909 keV	3.27 d
Y-90	2.28 MeV β^-		64.053 h
Rh-105	0.5672 MeV β^-	318.9 keV	35.36 h
In-111	Decaimiento EC	245 keV 171 keV	2.8047 d
Pm-149	1.072 MeV β^- (95.9%)	286 keV	53.08 h
Sm-153	0.8076 MeV β^-	103 keV	46.50 h
Tb-161	0.593 MeV β^-	74.6 keV	6.89 d
Dy-166	0.4868 MeV β^-	82.5 keV	81.6 h
Ho-166	1.8547 MeV β^-	80.57 keV	26.824 h
Lu-177	0.498 MeV β^-	208.4 keV 112.95 keV	6.647 d
Re-186	1.07 MeV β^-	137.2 keV	3.7186 d
Re-188	2.12 MeV β^-	155 keV	17.003 h
Au-198	1.372 MeV β^-	411.8 keV	2.695 d
Au-199	0.452 MeV β^-	208.2 keV 158.4 keV	3.139 d
Bi-212	2.252 MeV β^- (64.06%) 6.09 MeV α (35.94%) 8.78 MeV α (Po-212)	727.3 keV	60.55 min
Ac-225	5.83 MeV α 6.34 MeV α (Fr-221) 7.07 MeV α (At-217) 1.423 MeV β^- (Bi-213)	99 keV	10 d

3.2.3.1 Diseño de radiofármacos basados en metales

El éxito de los radiofármacos en la medicina nuclear está basado en poder dirigir selectivamente las moléculas marcadas con el radioisótopo al sitio activo de la enfermedad. En ese sentido, algunos de los radiofármacos empleados en el diagnóstico y en el tratamiento de ciertas patologías van a estar conformados por un radioisótopo metálico acomplejado por un ligando biológicamente activo.⁶⁰ En la Figura 24, se muestra de manera esquemática las dos estructuras más comunes con las que se diseñan los radiofármacos metálicos utilizados para el diagnóstico de Alzheimer. Los complejos tipo A tienen el ligando afín a las placas A β unidos al ligando quelato del metal a través de un conector. Este enlazador/conector no debe de interferir en la farmacocinética ni en la afinidad del radiofármaco; por ello, suelen ser de longitud y grupos funcionales variables (cadenas alifáticas, aminoácidos simples o pequeños heterociclos). En cambio, en los complejos tipo B los ligandos selectivos al biomarcador forman parte de la esfera de coordinación del metal. A estos ligandos, en ambos complejos, se les denomina agentes quelatos bifuncionales (BFCA), ya que desempeñan el rol de coordinar al metal y enlazarse selectivamente a las placas A β ; de esta forma, se minimiza la acumulación de radioactividad en un tejido u órgano sano.^{1,60}

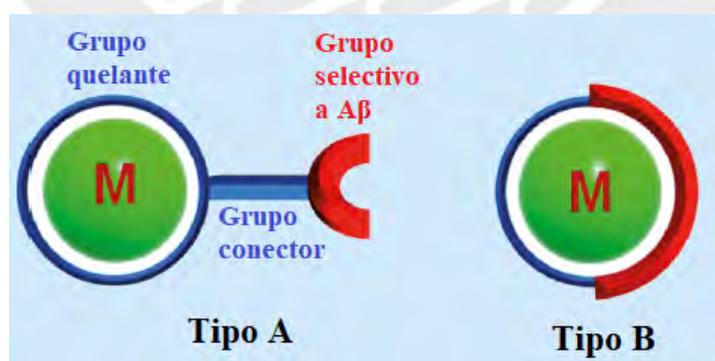


Figura 24: Representación esquemática de los dos tipos de complejos metálicos empleados para el diagnóstico de Alzheimer (Adaptado de 1).

Las características principales que se debe de tener en consideración para el diseño de un radiofármaco efectivo y seguro para el Alzheimer son las siguientes: estabilidad termodinámica, cinética, selectividad, permeabilidad por la BBB y toxicidad. En ese sentido, los ligandos quelatos juegan un rol fundamental en todas estas características; por ello, se han desarrollado y probado numerosos BFCAs en los últimos años.⁶⁰

Cuando los radiofármacos son introducidos en el cuerpo, generalmente de manera intravenosa y a bajas concentraciones, deben ser cinéticamente inertes y termodinámicamente estables bajo condiciones fisiológicas. El acomplejamiento efectivo del BFCA al radioisótopo metálico va a depender de la naturaleza y el estado de oxidación del metal, pues cada centro metálico requiere para su estabilidad e inercia de distintos átomos donadores de densidad electrónica. La constante de disociación (k_{off}) va a determinar la estabilidad *in vivo* del complejo ($K_s = k_{\text{on}} / k_{\text{off}}$), por ello, una menor k_{off} aumentaría la estabilidad del radiofármaco y, en consecuencia, evitaría la liberación del radioisótopo metálico en cualquier parte del cuerpo, minimizando la emisión de radiación innecesaria y la toxicidad en distintos órganos y tejidos. Adicionalmente, en algunos casos el BFCA provee estabilidad redox al metal, ya que evita que este pueda oxidarse o reducirse haciendo que se pierda la actividad del radiofármaco. Por ejemplo, se suelen emplear este tipo de ligandos en los complejos de Re y Tc que son susceptibles a oxidarse a sus especies perrenato (VII) o pertechnetato (VII). De la misma forma, se utilizan los BFCA en los complejos de Cu(II) y Au(III), los cuales tienden a reducirse a Cu(I) y Au(0).⁶⁰

La penetración del complejo a través de la BBB es otro de los factores que se deben de tomar en consideración cuando se diseña un fármaco. Usualmente, los complejos de menor tamaño y neutros difunden de manera pasiva, aunque en ocasiones es necesario incorporar algunas moléculas o grupos funcionales al complejo que aumenten la lipofilidad, de tal forma que se favorezca el transporte hacia el cerebro.⁶² Una manera de cuantificar el rango óptimo de

lipofilicidad que debe de presentar un fármaco para cruzar la BBB eficientemente es de un $\log P=0.1-3.5$.^{47,48}

Este rango óptimo de lipofilicidad es vital, ya que compuestos con características muy lipofílicas presentan mayores niveles de deposición en el hígado, el pulmón y el vaso, además de que son susceptibles al metabolismo por las enzimas P450.⁴⁷ A esto se le suma, su posible unión con algunas proteínas séricas como la albúmina, lo cual disminuye la concentración del radiofármaco que llega al sistema nervioso central.⁴⁷ Otra complicación asociada a la difusión de moléculas por la BBB es la glucoproteína-p, la cual es la encargada de remover sustancias extrañas que llegan al cerebro.⁴⁷

Por otro lado, la selectividad del radiofármaco va a estar determinada por el ligando biológicamente activo. Como ya se describió en la sección anterior, los compuestos derivados de estilbenos y benzotiazoles con grupos donadores de electrones afines a los bolsillos hidrofóbicos de las placas $A\beta$ por las interacciones $\pi-\pi$ van a ser los candidatos óptimos para estos radiofármacos metálicos.⁴⁴

En la siguiente sección describen algunos de los complejos metálicos en exploración que se han desarrollado para el diagnóstico de Alzheimer por tomografía de emisión de positrones en los últimos años.

3.2.3.2 Compuestos metálicos en exploración

El desarrollo de radiofármacos de cobre ha cobrado vital interés en la tomografía de emisión de positrones debido a los múltiples radioisótopos que este metal presenta. En particular, para la enfermedad del Alzheimer el radioisótopo más estudiado es el ^{64}Cu , debido a su alto tiempo de vida media ($t_{1/2} = 12.7$ h) y su buena calidad en las imágenes. Asimismo, su estado de oxidación más común debido a su estabilidad termodinámica y cinética es el +2, ya que al tener una configuración electrónica d^9 puede estabilizarse por el efecto Jahn-Teller. El

Cu(II) puede coordinarse a distintos ligandos donadores con átomos de oxígeno o nitrógeno, a pesar de tener una naturaleza ligeramente blanda. También, esta especie puede enlazarse a tiolatos o fosfinas; sin embargo, estos grupos tienden a reducirlo a su especie más lábil, el Cu(I).⁶³

El ligando bis(tiosemicarbazona) (at-sm) ha demostrado tener una alta estabilidad y permeabilidad por la BBB. Por ello, este ligando ha sido derivatizado con grupos afines a las placas A β y acomplejado por ⁶⁴Cu para ser probado como potencial agente de diagnóstico del Alzheimer. En la Figura 25 se observan las estructuras de los radiofármacos de cobre estudiados por Donnelly y colaboradores. Todas estas moléculas presentan el ligando quelante at-sm y un trans-estilbena selectivo a las placas A β . El complejo Cu^{II}(at-sm) ha mostrado una gran asimilación en el cerebro de ratones transgénicos con APP/PS1, en comparación con controles sanos. Sin embargo, el enlace tiocarbhidrazona es susceptible a hidrólisis y, además, el ⁶⁴Cu resulta difícil de acomplejar con el ligando at-sm.⁶⁴

Por este motivo, se probaron ligandos híbridos de tiosemicarbazona-piridilhidrazina (complejos Cu^{II}L² y Cu^{II}L³), los cuales formaron complejos redox inertes y estables. En particular, la estabilidad del radiofármaco Cu^{II}L³ fue bastante alta a pH fisiológico (K_D = 5.8 x 10⁻¹⁸). Asimismo, ambos complejos pudieron ser marcados con el radioisótopo de ⁶⁴Cu de manera eficiente y rápida. La lipofiliidad reportada a través de los valores del logD fueron para el Cu^{II}L² (1.90) y Cu^{II}L³ (1.87), lo cual sugiere que serían moléculas óptimas para atravesar la BBB.⁴⁷

Estudios biológicos preliminares por micro-PET con ratones sanos mostraron baja retención del complejo Cu^{II}L² en el cerebro, luego de 5 minutos postinyección; sin embargo, con el radiofármaco de Cu^{II}L³ se obtuvo una asimilación de 1.11 %ID/g y una eliminación rápida luego de 30 minutos postinyección, 0.38 %ID/g (Figura 25). Esto indica que el complejo Cu^{II}L³ es capaz de atravesar la BBB y además es selectivo a las placas A β , ya que su

eliminación es veloz debido a la ausencia de placas A β . Las diferencias de retención en estos dos complejos probablemente estén asociadas a una mayor permeabilidad por la BBB o a una reducción de las interacciones hidrofóbicas con las proteínas séricas debido al enlace de hidrógeno intramolecular del grupo N, N-dimetilaminoetil terminal del radiofármaco Cu^{II}L³.⁴⁷

Por otro lado, se realizaron pruebas *in vitro* en placas A β de tejido humano y controles sanos. De esta forma, se observó que estos dos complejos presentaban una gran afinidad por las placas A β y no mostraban retención por los tejidos sanos.⁴⁷

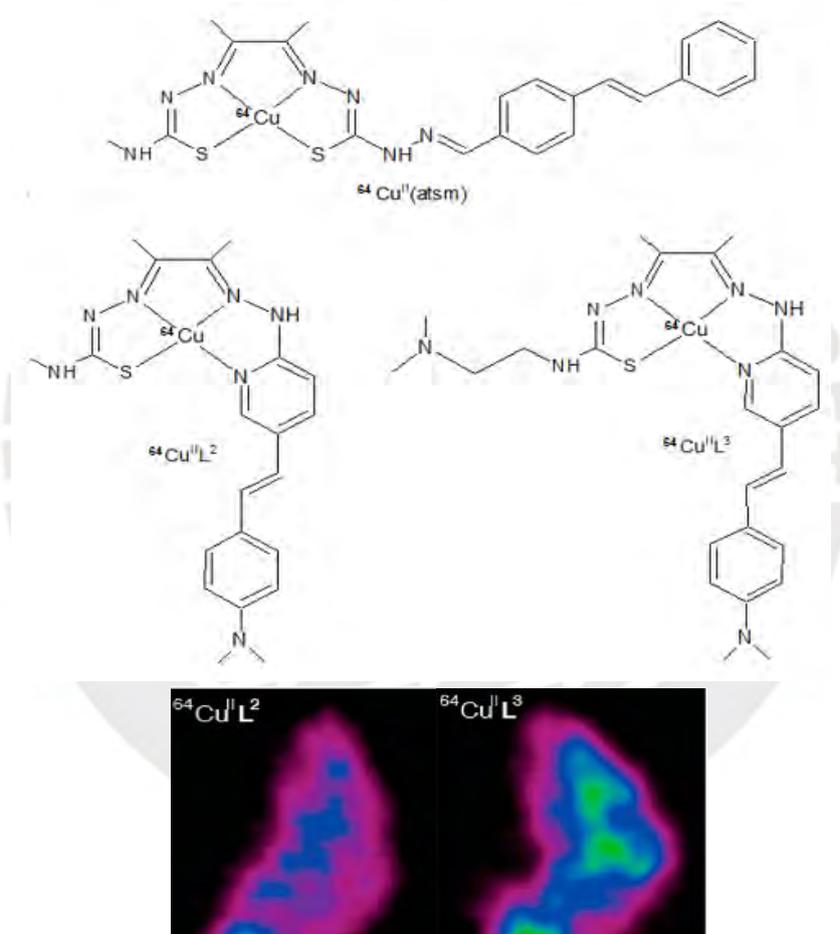


Figura 25: Estructuras químicas de los complejos de ⁶⁴Cu con ligandos tiosemicarbazona y tiosemicarbazona-piridilhidrazina estudiados para el diagnóstico de Alzheimer. Imágenes del cerebro de ratones en presencia de los radiofármacos Cu^{II}L₂ y Cu^{II}L₃ tomadas por micro-PET (Adaptado de 47).

Asimismo, en el 2017, Mirica y colaboradores reportaron la síntesis de otros complejos de Cu(II) con ligandos macrocíclicos 1,4,7-triazaciclononano (tacn) y 2,11-diaza[3,3]-

(2,6)piridinofano (N4) unidos covalentemente al ligando 2-fenilbenzotiazol, afin a las placas A β (L₀-L₅, Figura 26). Todos los complejos de Cu(II) mostraron una constante de estabilidad alta ($K_D=10^{-27}$ - 10^{-30}) y, además, presentaron características redox inertes.² También, se realizaron estudios de competición *in vitro* de afinidad de estos complejos con las fibrillas A β 40, en comparación con el ligando fluorescente ThT. De esta manera, mediante la disminución en la intensidad de la fluorescencia se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 4.⁶⁵

Tabla 4: Propiedades de los ligandos L₀-L₅ y sus complejos marcados con ⁶⁴Cu (Adaptado de 65).

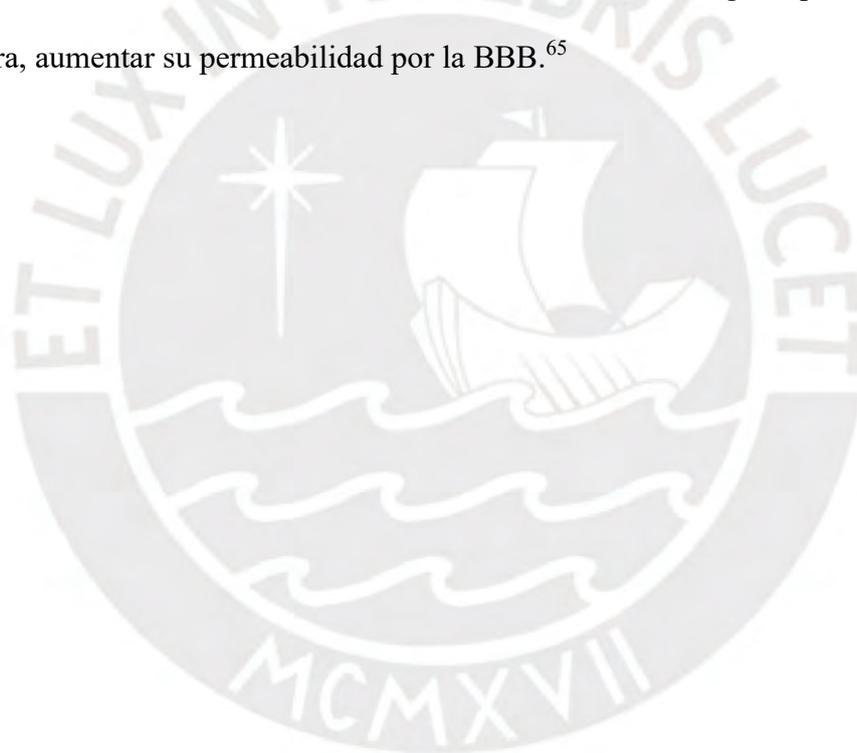
Ligando	MW (g/mol)	Log Poct	K _i L _n (nM)	K _i Cu-L _n (nM)
L ₀	384.4	-1.09 ± 0.16	NA	NA
L ₁	426.6	0.97 ± 0.12	170 ± 50	765 ± 30
L ₂	509.6	0.72 ± 0.08	30 ± 10	275 ± 20
L ₃	523.7	0.64 ± 0.11	40 ± 10	325 ± 25
L ₄	567.9	0.82 ± 0.05	320 ± 40	2350 ± 250
L ₅	779.0	0.92 ± 0.07	580 ± 150	142 ± 55

Los ligandos bifuncionales L₁-L₅ exhibieron constantes de inhibición en un rango entre 30-580 nM, lo cual indica que se requeriría de una baja concentración del ligando para que se una a las fibras A β de manera efectiva. Adicionalmente, estos resultados sugieren que, en el caso de los ligandos tipo N4, los grupos de mayor volumen en la amina (-CO₂H y benzotiazol, L₄ y L₅) disminuirían la interacción con las fibras A β por impedimento estérico, en contraste con los grupos de menor volumen (L₂ y L₃). Con respecto al ligando tacn L₁, se puede observar que este presentaría un valor de K_i ligeramente mayor que L₂ y L₃ debido a que estos últimos ligandos tendrían una mejor interacción π por sus anillos piridina.⁶⁵

Los complejos sintetizados L₂-Cu, L₃-Cu y L₅-Cu fueron los que mostraron una mayor afinidad por las fibras A β 40 (Tabla 4). En contraste, el complejo L₄-Cu disminuyó su interacción con las fibras, lo cual probablemente se deba a un cambio en la carga del metal por la desprotonación del carboxilato.⁶⁵ Por otro lado, L₅-Cu tuvo una constante de inhibición

menor que el ligando L₅, lo cual podría atribuirse a un rearrreglo espacial de los dos grupos benzotiazoles por el ion Cu(II) que permitiría una mejor entrada en los bolsillos hidrofóbicos.⁶⁵

Por otro lado, se determinó la hidrofobicidad de los complejos de Cu(II), a partir de los coeficientes de partición en octanol/agua ($\log P_{\text{oct}}$). De esta forma, se observó que el complejo L₀-Cu, que no tiene el ligando benzotiazol, presenta un valor de $\log P_{\text{oct}}$ negativo, lo cual indica que es poco probable que logre cruzar la BBB. En cambio, los otros complejos tuvieron valores de $\log P_{\text{oct}}$ entre 0.64-0.97, lo cual sugiere que sí pueden atravesar la BBB. No obstante, para una segunda generación de estos complejos se requeriría realizar algunas modificaciones químicas en las estructuras, con el fin de incrementar los valores de $\log P_{\text{oct}}$ por encima de 1 y; de esta manera, aumentar su permeabilidad por la BBB.⁶⁵



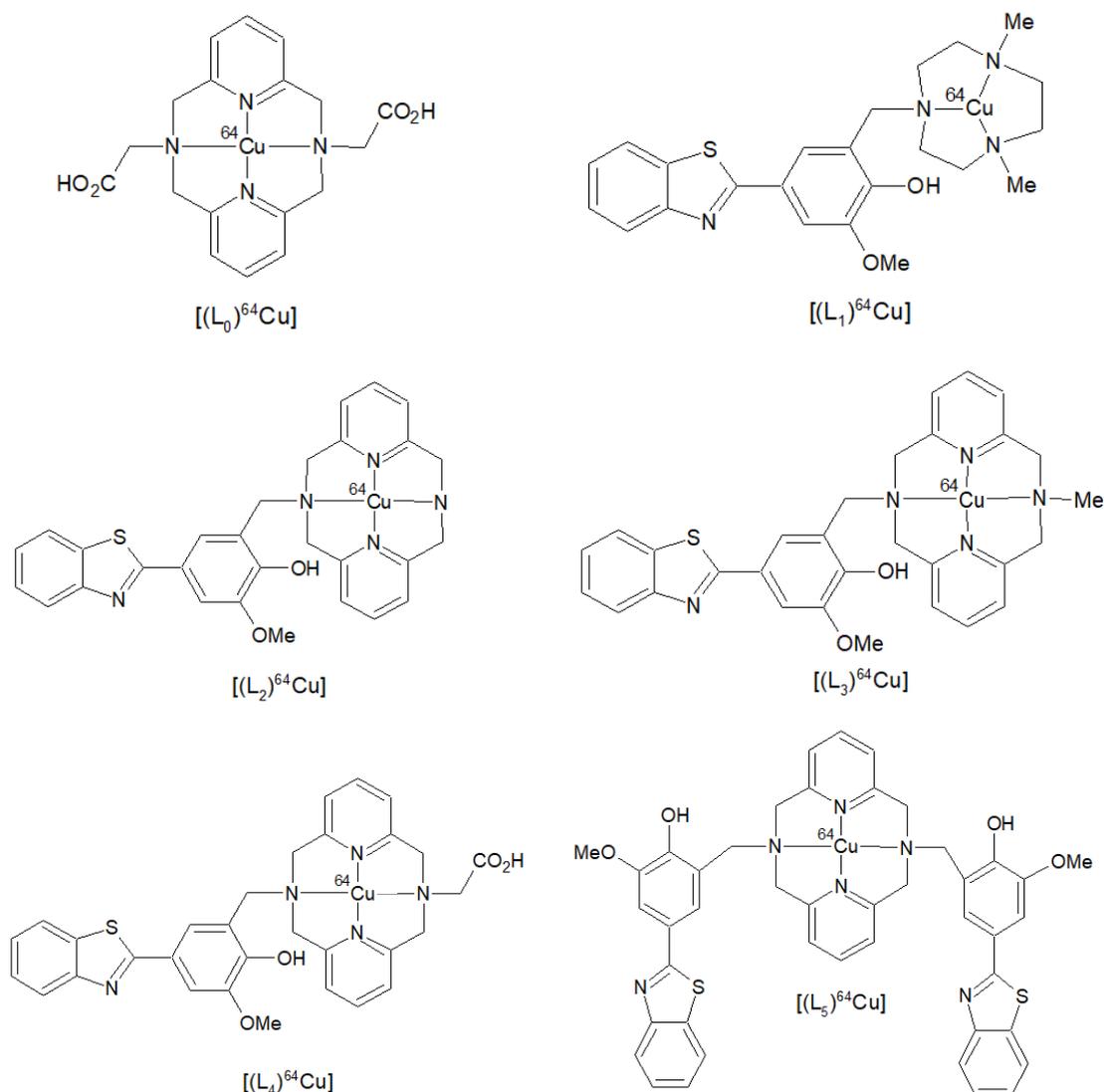


Figura 26: Estructuras químicas de los complejos de ^{64}Cu con ligandos tacn y N4 unidos covalentemente al ligando 2-fenilbenzotiazol estudiados para el diagnóstico de Alzheimer por PET.

Para determinar la selectividad de los complejos de $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ se realizaron ensayos *ex vivo* de afinidad a las placas $\text{A}\beta$ por PET usando secciones de cerebro de ratones transgénicos Tg2576, los cuales expresan la proteína APP encargada de la formación de estas placas. La Figura 27 muestra que ninguno de estos complejos de $\text{Cu}(\text{II})$ presentó gran afinidad por los cerebros de los ratones sanos (WT). Sin embargo, al realizar el ensayo en los cerebros

transgénicos se observó un aumento significativo en la intensidad con los complejos L₁, L₂, L₄ y L₅. Por otro lado, el radiofármaco L₀-Cu no tuvo afinidad por el cerebro WT ni por el cerebro transgénico. Esto se debería a la ausencia del ligando afín a las placas A β y a su baja permeabilidad por la BBB.⁶⁵

Asimismo, para confirmar la especificidad de los radiofármacos de ⁶⁴Cu^{II} se hizo el ensayo en presencia de un agente competidor B₁, que contiene un fragmento de 2-fenilbenzotiazol. De esta forma, se pudo notar una disminución en la intensidad de la señal de los 5 radiofármacos, pues muchos de los bolsillos hidrofóbicos de las placas A β estaban interactuando con B₁. Por último, se compararon las regiones de afinidad de los complejos L₁-L₅ en los cerebros de los ratones Tg2576 con las zonas de tinción en presencia de Congo rojo (Figura 28). De esta manera, se confirmó que las secciones de tinción coinciden, lo cual sugiere que los cinco complejos de Cu^{II} se unirían selectivamente a las placas A β .⁶⁵

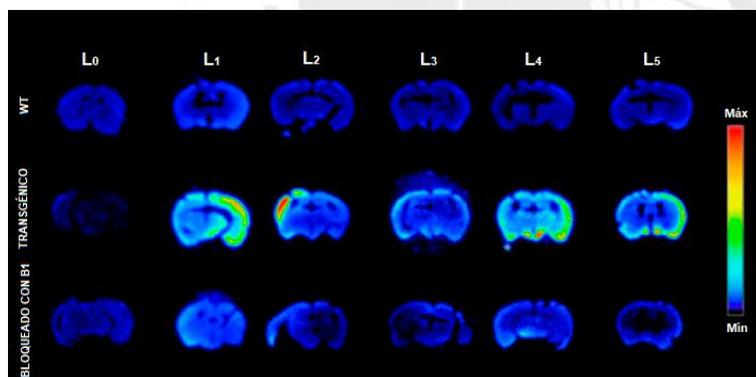


Figura 27: Imágenes por PET de secciones del cerebro de ratones WT y transgénicos (Tg2576) en presencia de complejos de ⁶⁴Cu(II) y del agente competidor B1 (Adaptado de 65).

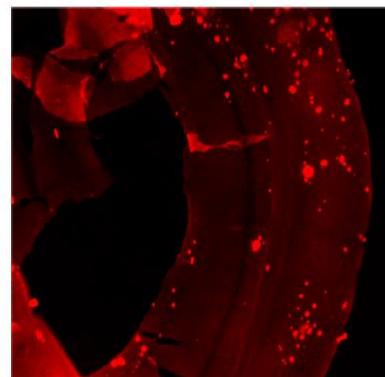


Figura 28: Imagen por PET de la sección del cerebro de un ratón transgénico (Tg2576) estudiada en presencia del complejo L₄-⁶⁴Cu(II) y el Congo Rojo (Adaptado de 65).

Estudios de biodistribución *in vivo* en ratones sanos mostraron que el complejo de L₂-⁶⁴Cu(II) presentaba la mayor asimilación en el cerebro ($1.33 \pm 0.27\%$ ID/g a los 2 min) y, además, tenía una rápida eliminación ($0.27 \pm 0.03\%$ ID/g a los 60 min) (Tabla 5). También, se

observó que los complejos L_4 - $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ y L_5 - $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ mostraban valores de asimilación y eliminación aceptables, los cuales serían comparables a los reportados por Donelly. Con esto se confirma que los complejos de ^{64}Cu sintetizados por Donelly (Figura 25) y Mirica (Figura 26) serían candidatos de radiofármacos de imagen óptimos para la detección de los agregados $\text{A}\beta$ por PET.⁶⁵

Tabla 5: Resultados de la biodistribución de los complejos de ^{64}Cu de la Figura 25 en el cerebro de ratones sanos (Adaptado de 65).

Ligando	Tiempo post inyección	
	%ID/g a 2 min	%ID/g 60 min
L₀	0.37 ± 0.06	0.14 ± 0.01
L₁	0.17 ± 0.02	0.13 ± 0.01
L₂	1.33 ± 0.27	0.27 ± 0.03
L₃	0.49 ± 0.01	0.22 ± 0.04
L₄	0.61 ± 0.14	0.13 ± 0.01
L₅	0.75 ± 0.16	0.26 ± 0.01

Por otro lado, los complejos de ^{68}Ga han cobrado interés en los últimos años como radionúcleos en PET debido a su sencilla preparación en un generador a partir del ^{68}Ge . A esto se le suma, su adecuada energía (1.92 meV), tiempo de vida media ($t_{1/2} = 67.7$ min) y sus conocidas geometrías de coordinación. El estado de oxidación más común para el galio es el +3 y usualmente presenta un número de coordinación 6, donde los ligandos, generalmente, aminocarboxilatos (DTPA, DOTA y NOTA) saturan de densidad electrónica al ion metálico para poder estabilizarlo. El pH en la reacción de formación del complejo es fundamental, ya que en caso el compuesto formado sea inestable y se libere $\text{Ga}(\text{III})$ en la sangre, este se coordinaría con la transferrina al igual que el $\text{Fe}(\text{III})$ y se depositaría en el hígado.^{63,66}

En el 2014, Mishra y colaboradores reportaron un complejo de ^{68}Ga con un ligando quelato DTPA unido a dos calconas selectivas a las placas $\text{A}\beta$ a través de un enlace amida (Figura 29a). Este radiofármaco fue marcado con el radioisótopo eficientemente (85.4 % de rendimiento) y, además, presentó una constante de estabilidad de $K_D = 18.2$, la cual es

suficiente para ser empleada en medicina nuclear.⁶⁷ Respecto a su permeabilidad por la BBB, su logP fue 1.58, lo cual indica que esta molécula se encuentra en el rango óptimo de penetración.⁶⁷

Asimismo, estudios *in vitro* demostraron que la constante de afinidad de este complejo por las placas A β 42 era de $K_i = 4.18$ nM, este valor es comparable con la constante de 2.8 nM reportada por el [¹⁸F]-AV-45. Posteriormente, estudios *in vivo* realizados en ratones mostraron una asimilación del radiofármaco y una rápida eliminación del cerebro, ya que a los 2 minutos la concentración era de $1.24 \pm 0.31\%$ ID/g, mientras a los 30 minutos era de $0.36 \pm 0.06\%$ ID/g.⁶⁷

Ese mismo año, el grupo de investigación de Ono reportó otro complejo de ⁶⁸Ga con el ligando quelato DOTA y el 2-fenilbenzofurano como molécula afin a las placas A β (Figura 29b). Este radiofármaco mostró una gran afinidad por las placas A β 42 ($K_i = 10.8$ nM) *in vitro*; sin embargo, presentó una baja asimilación en el cerebro de un ratón sano luego de los 2 minutos de la inyección intravenosa (0.45% ID/g). Estos resultados desfavorables podrían estar asociados con el alto peso molecular (MW = 706 g/mol) y la baja lipofilidad (logP = -0.38). Por esta razón, todavía se requiere de una mayor investigación en otros ligandos afines al ion Ga⁺³ que presenten una mayor permeabilidad por la BBB.⁶⁸

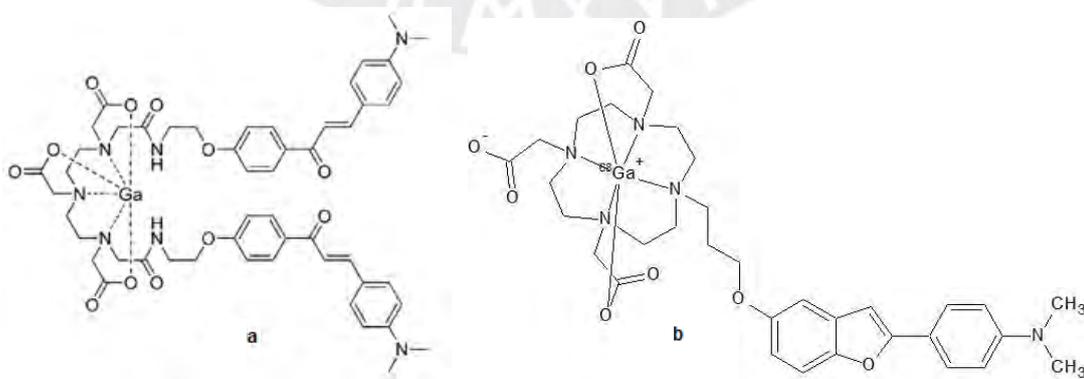


Figura 27: Estructuras químicas de los complejos de ⁶⁸Ga estudiados para el diagnóstico de Alzheimer por PET. (Adaptado de 66)

En suma, los radiofármacos basados en metales de transición han demostrado tener características ideales y prometedoras como agentes de diagnóstico para el Alzheimer. Sin embargo, todavía se deben mejorar algunas características asociadas a la permeabilidad por la BBB y a la afinidad por las placas A β . Es importante resaltar que todos estos complejos se encuentran aún en desarrollo y todavía faltarían algunos años más para que se terminen de realizar las pruebas clínicas que permitan su posible uso como radiofármacos comerciales.



4 CONCLUSIONES

La enfermedad del Alzheimer ha demostrado ser una fisiopatología que afecta a millones de personas en el mundo, debido al daño neuronal progresivo e irreversible que causa en la región del hipocampo en el cerebro.

Sin embargo, hasta la actualidad no se conoce completamente la etiología de esta enfermedad. Muchos estudios afirman que la causa principal del Alzheimer estaría asociada a la agregación del péptido A β , el cual se observa en una fase preclínica de esta patología. Esta hipótesis, conocida como la hipótesis de la cascada amiloide, sugiere que la acumulación de las placas A β desencadenaría una serie de eventos patológicos como la formación de NFTs, la interrupción de las conexiones sinápticas, la activación de procesos neuroinflamatorios y eventualmente, una pérdida neuronal que terminaría en el desarrollo del AD. Esta teoría ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento y métodos de diagnóstico conclusivos y tempranos centrados en estos biomarcadores.

El diagnóstico del Alzheimer solo puede ser confirmado mediante una biopsia del cerebro del paciente. Sin embargo, es posible realizar un diagnóstico temprano de manera no invasiva de esta patología si se detectan los biomarcadores (placas A β y NFTs) en la fase preclínica de la enfermedad, antes de que ocurra una neurodegeneración significativa en el paciente.

En ese sentido, los radiofármacos de ^{11}C y ^{18}F han demostrado tener una alta afinidad por las placas A β , incluso algunos de ellos han sido aprobados por la FDA como agentes de diagnóstico por PET para el Alzheimer. Sin embargo, estos radioisótopos presentan un tiempo de vida media muy corto y, además, su incorporación covalente al fármaco exige procedimientos de síntesis y de purificación más elaborados, que limita su aplicación a centros médicos especializados.

Por ello, en este trabajo se han descrito distintos complejos en exploración con radioisótopos de ^{64}Cu y ^{68}Ga que presentan tiempos de vida media moderados y se incorporan

de manera más rápida, sencilla y con mayores rendimientos, en comparación con los radiofármacos de ^{11}C y ^{18}F . Estos complejos están conformados por un ligando quelato unido covalentemente a un derivado de estilbenos o benzotiazoles, afines a las placas $\text{A}\beta$. Asimismo, han demostrado ser candidatos óptimos para el diagnóstico de AD, ya que tienen una alta estabilidad termodinámica, moderada afinidad a las placas $\text{A}\beta$ en ensayos *in vitro* e *in vivo* y regular permeabilidad por la BBB. No obstante, los resultados hasta ahora logrados en cuanto a la permeabilidad, afinidad y toxicidad de los complejos metálicos reportados como potenciales radiofármacos, sugieren que aún se requiere mejorar a los ligandos para poder realizar ensayos *in vivo* en humanos.



5 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Liu, H.; Qu, Y.; Wang, X. Amyloid β -targeted metal complexes for potential applications in Alzheimer's disease. *Future Med. Chem.* **2018**, *10* (6), 697–701. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0248>.
- (2) Sharma, A. K.; Schultz, J. W.; Prior, J. T.; Rath, N. P.; Mirica, L. M. Coordination Chemistry of Bifunctional Chemical Agents Designed for Applications in ^{64}Cu PET Imaging for Alzheimer's Disease. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (22), 13801–13814. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01883>.
- (3) Duthey, B. Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias, Update on 2004. *World Heal. Organ.* **2013**, N° February, 1–77.
- (4) Bhute, S.; Sarmah, D.; Datta, A.; Rane, P.; Shard, A.; Goswami, A.; Borah, A.; Kalia, K.; Dave, K. R.; Bhattacharya, P. Molecular Pathogenesis and Interventional Strategies for Alzheimer's Disease: Promises and Pitfalls. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, *3* (3), 472–488. <https://doi.org/10.1021/acspsci.9b00104>.
- (5) Physicians, P. C. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* **2020**, *16* (3), 391–460. <https://doi.org/10.1002/alz.12068>.
- (6) Brenowitz, W. D.; Hubbard, R. A.; Keene, C. D.; Hawes, S. E.; Longstreth, W. T.; Woltjer, R. L.; Kukull, W. A. Mixed neuropathologies and estimated rates of clinical progression in a large autopsy sample. *Alzheimer's Dement.* **2017**, *13* (6), 654–662. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.09.015>.
- (7) Kapasi, A.; DeCarli, C.; Schneider, J. A. Impact of multiple pathologies on the threshold for clinically overt dementia. *Acta Neuropathol.* **2017**, *134* (2), 171–186. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1717-7>.
- (8) Perrin, R. J.; Fagan, A. M.; Holtzman, D. M. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature* **2009**, *461* (7266), 916–922. <https://doi.org/10.1038/nature08538>.
- (9) Hanseeuw, B. J.; Betensky, R. A.; Jacobs, H. I. L.; Schultz, A. P.; Sepulcre, J.; Becker, J. A.; Cosio, D. M. O.; Farrell, M.; Quiroz, Y. T.; Mormino, E. C.; et al. Association of Amyloid and Tau with Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. *JAMA Neurol.* **2019**, *76* (8), 915–924. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.1424>.
- (10) Sperling, R. A.; Aisen, P. S.; Beckett, L. A.; Bennett, D. A.; Craft, S.; Fagan, A. M.; Iwatsubo, T.; Jack, C. R.; Kaye, J.; Montine, T. J.; et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **2011**, *7* (3), 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.003>.
- (11) Albert, M. S.; DeKosky, S. T.; Dickson, D.; Dubois, B.; Feldman, H. H.; Fox, N. C.; Gamst, A.; Holtzman, D. M.; Jagust, W. J.; Petersen, R. C.; et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **2011**, *7* (3), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.008>.
- (12) Petersen, R. C.; Lopez, O.; Armstrong, M. J.; Getchius, T. S. D.; Ganguli, M.; Gloss, D.; Gronseth, G. S.; Marson, D.; Pringsheim, T.; Day, G. S.; et al. Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment report of the guideline development, dissemination, and implementation. *Neurology* **2018**, *90* (3), 126–135. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004826>.
- (13) Ward, A.; Tardiff, S.; Dye, C.; Arrighi, H. M. Rate of Conversion from Prodromal

- Alzheimer's Disease to Alzheimer's Dementia: A Systematic Review of the Literature. *Dement. Geriatr. Cogn. Dis. Extra* **2013**, 3 (1), 320–332. <https://doi.org/10.1159/000354370>.
- (14) McKhann, G. M.; Knopman, D. S.; Chertkow, H.; Hyman, B. T.; Jack, C. R.; Kawas, C. H.; Klunk, W. E.; Koroshetz, W. J.; Manly, J. J.; Mayeux, R.; et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **2011**, 7 (3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>.
- (15) Hebert, L. E.; Weuve, J.; Scherr, P. A.; Evans, D. A. Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* **2013**, 80 (19), 1778–1783. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828726f5>.
- (16) Mucke, L. Alzheimer's disease. *Nature* **2009**, 461 (7266), 895–897. <https://doi.org/10.1038/461895a>.
- (17) Kim, J.; Basak, J. M.; Holtzman, D. M. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron* **2009**, 63 (3), 287–303. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.026>.
- (18) Yamazaki, Y.; Zhao, N.; Caulfield, T. R.; Liu, C. C.; Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, 15 (9), 501–518. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0228-7>.
- (19) Safieh, M.; Korczyn, A. D.; Michaelson, D. M. ApoE4: an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *BMC Med.* **2019**, 17 (1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1299-4>.
- (20) Pool, L. R.; Weuve, J.; Wilson, R. S.; Bültmann, U.; Evans, D. A.; Mendes de Leon, C. F. Occupational cognitive requirements and late-life cognitive aging. *Neurology* **2016**, 86 (15), 1386–1392. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002569>.
- (21) Neurotransmitter Receptors - Molecular Cell Biology - NCBI Bookshelf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21586/> (accessed abr 3, 2020).
- (22) Rauk, A. The chemistry of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (9), 2698. <https://doi.org/10.1039/b807980n>.
- (23) University, R. Biology https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@10.4:c9j4p0aj@3/Neurons-and-Glial-Cells (accessed mar 28, 2020).
- (24) Overview of Neuron Structure and Function - Molecular Cell Biology - NCBI Bookshelf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21535/> (accessed mar 28, 2020).
- (25) Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and J. D. Molecular Cell Biology. En *Molecular Medicine for Clinicians*; 2000; pp 37–49.
- (26) Perl, D. P. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt. Sinai J. Med. A J. Transl. Pers. Med.* **2010**, 77 (1), 32–42. <https://doi.org/10.1002/msj.20157>.
- (27) Bu, X.-L.; Rao, P. P. N.; Wang, Y.-J. Anti-amyloid Aggregation Activity of Natural Compounds: Implications for Alzheimer's Drug Discovery. *Mol. Neurobiol.* **2016**, 53 (6), 3565–3575. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9301-4>.
- (28) Faller, P.; Hureau, C. Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid- β peptide. *Dalt. Trans.* **2009**, N° 7, 1080–1094. <https://doi.org/10.1039/B813398K>.
- (29) Gilbert, B. J. The role of amyloid β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Clin. Pathol.* **2013**, 66 (5), 362–366. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2013-201515>.
- (30) Hamley, I. W. The Amyloid Beta Peptide: A Chemist's Perspective. Role in Alzheimer's and Fibrillization. *Chem. Rev.* **2012**, 112 (10), 5147–5192. <https://doi.org/10.1021/cr3000994>.

- (31) Mietelska-Porowska, A.; Wasik, U.; Goras, M.; Filipek, A.; Niewiadomska, G. Tau Protein Modifications and Interactions: Their Role in Function and Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (3), 4671–4713. <https://doi.org/10.3390/ijms15034671>.
- (32) Hernández, F.; Avila, J. Tauopathies. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64* (17), 2219–2233. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7220-x>.
- (33) Portelius, E.; Hansson, S. F.; Tran, A. J.; Zetterberg, H.; Grognon, P.; Vanmechelen, E.; Höglund, K.; Brinkmalm, G.; Westman-Brinkmalm, A.; Nordhoff, E.; et al. Characterization of Tau in Cerebrospinal Fluid Using Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (5), 2114–2120. <https://doi.org/10.1021/pr7008669>.
- (34) Walker, K. A.; Ficek, B. N.; Westbrook, R. Understanding the Role of Systemic Inflammation in Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10* (8), 3340–3342. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.9b00333>.
- (35) Karran, E.; Mercken, M.; Strooper, B. De. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: An appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group 2011, pp 698–712. <https://doi.org/10.1038/nrd3505>.
- (36) Amiri, H.; Saeidi, K.; Borhani, P.; Manafirad, A.; Ghavami, M.; Zerbi, V. Alzheimer's Disease: Pathophysiology and Applications of Magnetic Nanoparticles as MRI Theranostic Agents. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4* (11), 1417–1429. <https://doi.org/10.1021/cn4001582>.
- (37) Grover, V. P. B.; Tognarelli, J. M.; Crossey, M. M. E.; Cox, I. J.; Taylor-Robinson, S. D.; McPhail, M. J. W. Magnetic Resonance Imaging: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. INASL 2015, pp 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2015.08.001>.
- (38) Gu, L.; Zhang, Z. Exploring Structural and Functional Brain Changes in Mild Cognitive Impairment: A Whole Brain ALE Meta-Analysis for Multimodal MRI. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10* (6), 2823–2829. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.9b00045>.
- (39) Frisoni, G. B.; Fox, N. C.; Jack, C. R.; Scheltens, P.; Thompson, P. M. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2010**, *6* (2), 67–77. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2009.215>.
- (40) Rabai, F.; Ramani, R. Magnetic Resonance Imaging: Anesthetic Implications. Anesthetic Implications. En *Essentials of Neuroanesthesia*; Elsevier Inc., 2017; pp 519–532. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805299-0.00031-2>.
- (41) Glover, G. H. Overview of Functional Magnetic Resonance Imaging. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **2011**, *22* (2), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2010.11.001>.
- (42) Sogbein, O. O.; Pelletier-Galarneau, M.; Schindler, T. H.; Wei, L.; Wells, R. G.; Ruddy, T. D. New SPECT and PET Radiopharmaceuticals for Imaging Cardiovascular Disease. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–24. <https://doi.org/10.1155/2014/942960>.
- (43) Townsend, D. W. Physical principles and technology of clinical PET imaging. *Ann. Acad. Med. Singapore* **2004**, *33* (2), 133–145.
- (44) Kung, H. F.; Choi, S. R.; Qu, W.; Zhang, W.; Skovronsky, D. 18 F Stilbenes and Styrylpyridines for PET Imaging of A β Plaques in Alzheimer's Disease: A Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (3), 933–941. <https://doi.org/10.1021/jm901039z>.
- (45) Hayne, D. J.; Lim, S.; Donnelly, P. S. Metal complexes designed to bind to amyloid- β for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (19), 6701–6715. <https://doi.org/10.1039/c4cs00026a>.
- (46) Lu, D.; Chambers, P.; Wipf, P.; Xie, X.-Q.; Englert, D.; Weber, S. Lipophilicity screening of novel drug-like compounds and comparison to clogP. *J. Chromatogr. A*

- 2012, 1258, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.078>.
- (47) Hickey, J. L.; Lim, S.; Hayne, D. J.; Paterson, B. M.; White, J. M.; Villemagne, V. L.; Roselt, P.; Binns, D.; Cullinane, C.; Jeffery, C. M.; et al. Diagnostic imaging agents for alzheimer's disease: Copper radiopharmaceuticals that target a β plaques. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (43), 16120–16132. <https://doi.org/10.1021/ja4057807>.
- (48) Zhang, W.; Kung, M. P.; Oya, S.; Hou, C.; Kung, H. F. 18F-labeled styrylpyridines as PET agents for amyloid plaque imaging. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34* (1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2006.10.003>.
- (49) Kung, H. F.; Choi, S. R.; Qu, W.; Zhang, W.; Skovronsky, D. 18 F Stilbenes and Styrylpyridines for PET Imaging of A β Plaques in Alzheimer's Disease: A Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (3), 933–941. <https://doi.org/10.1021/jm901039z>.
- (50) Vlassenko, A. G.; Benzinger, T. L. S.; Morris, J. C. PET amyloid-beta imaging in preclinical Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V. 2012, pp 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.11.005>.
- (51) Villemagne, V. L.; Pike, K. E.; Chételat, G.; Ellis, K. A.; Mulligan, R. S.; Bourgeat, P.; Ackermann, U.; Jones, G.; Szoëke, C.; Salvado, O.; et al. Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* **2011**, *69* (1), 181–192. <https://doi.org/10.1002/ana.22248>.
- (52) Ono, M.; Wilson, A.; Nobrega, J.; Westaway, D.; Verhoeff, P.; Zhuang, Z. P.; Kung, M. P.; Kung, H. F. 11C-labeled stilbene derivatives as A β -aggregate-specific PET imaging agents for Alzheimer's disease. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30* (6), 565–571. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(03\)00049-0](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(03)00049-0).
- (53) Yosky, R. Molecular imaging opens up a vast new world for neuroscience. *Med. Press* **2010**, N^o September, 1–6.
- (54) Nordberg, A.; Rinne, J. O.; Kadir, A.; Lngström, B. The use of PET in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group 2010, pp 78–87. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.217>.
- (55) Johnson, K. A.; Fox, N. C.; Sperling, R. A.; Klunk, W. E. Brain Imaging in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2* (4), a006213–a006213. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006213>.
- (56) Koole, M.; Lewis, D. M.; Buckley, C.; Nelissen, N.; Vandenbulcke, M.; Brooks, D. J.; Vandenberghe, R.; Van Laere, K. Whole-body biodistribution and radiation dosimetry of 18F-GE067: A radioligand for in vivo brain amyloid imaging. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (5), 818–822. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.060756>.
- (57) Vandenberghe, R.; Van Laere, K.; Ivanoiu, A.; Salmon, E.; Bastin, C.; Triau, E.; Hasselbalch, S.; Law, I.; Andersen, A.; Korner, A.; et al. 18 F-flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: A phase 2 trial. *Ann. Neurol.* **2010**, *68* (3), 319–329. <https://doi.org/10.1002/ana.22068>.
- (58) Zhang, W.; Oya, S.; Kung, M. P.; Hou, C.; Maier, D. L.; Kung, H. F. F-18 Polyethyleneglycol stilbenes as PET imaging agents targeting A β aggregates in the brain. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32* (8), 799–809. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2005.06.001>.
- (59) Seibyl, J.; Catafau, A. M.; Barthel, H.; Ishii, K.; Rowe, C. C.; Leverenz, J. B.; Ghetti, B.; Ironside, J. W.; Takao, M.; Akatsu, H.; et al. Impact of training method on the robustness of the visual assessment of 18F-florbetaben PET scans: Results from a phase-3 study. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (6), 900–906. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.161927>.
- (60) Carroll, V.; Demoin, D. W.; Hoffman, T. J.; Jurisson, S. S. Inorganic chemistry in

- nuclear imaging and radiotherapy: Current and future directions. *Radiochim. Acta* **2012**, *100* (8–9), 653–667. <https://doi.org/10.1524/ract.2012.1964>.
- (61) McInnes, L. E.; Noor, A.; Kysenius, K.; Cullinane, C.; Roselt, P.; McLean, C. A.; Chiu, F. C. K.; Powell, A. K.; Crouch, P. J.; White, J. M.; et al. Potential Diagnostic Imaging of Alzheimer's Disease with Copper-64 Complexes That Bind to Amyloid- β Plaques. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (5), 3382–3395. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b03466>.
- (62) Hureau, C.; Faller, P. Platinoid complexes to target monomeric disordered peptides: A forthcoming solution against amyloid diseases? *Dalt. Trans.* **2014**, *43* (11), 4233–4237. <https://doi.org/10.1039/c3dt52954a>.
- (63) Shokeen, M.; Anderson, C. J. Molecular Imaging of Cancer with Copper-64 Radiopharmaceuticals and Positron Emission Tomography (PET). *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (7), 832–841. <https://doi.org/10.1021/ar800255q>.
- (64) Lim, S.; Paterson, B. M.; Fodero-Tavoletti, M. T.; O'Keefe, G. J.; Cappai, R.; Barnham, K. J.; Villemagne, V. L.; Donnelly, P. S. A copper radiopharmaceutical for diagnostic imaging of Alzheimer's disease: A bis(thiosemicarbazonato)copper(ii) complex that binds to amyloid- β plaques. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (30), 5437–5439. <https://doi.org/10.1039/c0cc01175d>.
- (65) Bandara, N.; Sharma, A. K.; Krieger, S.; Schultz, J. W.; Han, B. H.; Rogers, B. E.; Mirica, L. M. Evaluation of 64 Cu-Based Radiopharmaceuticals that Target A β Peptide Aggregates as Diagnostic Tools for Alzheimer's Disease. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (36), 12550–12558. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b05937>.
- (66) Chen, K.; Cui, M. Recent progress in the development of metal complexes as β -amyloid imaging probes in the brain. *Medchemcomm* **2017**, *8* (7), 1393–1407. <https://doi.org/10.1039/C7MD00064B>.
- (67) Chauhan, K.; Datta, A.; Adhikari, A.; Chuttani, K.; Kumar Singh, A.; Mishra, A. K. 68Ga based probe for Alzheimer's disease: Synthesis and preclinical evaluation of homodimeric chalcone in β -amyloid imaging. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (37), 7328–7337. <https://doi.org/10.1039/c4ob00941j>.
- (68) Watanabe, H.; Ono, M.; Iikuni, S.; Yoshimura, M.; Matsumura, K.; Kimura, H.; Saji, H. A 68Ga complex based on benzofuran scaffold for the detection of β -amyloid plaques. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (20), 4834–4837. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.08.058>.
- (69) Schweber, B. Magnetic resonance imaging (MRI), Part 1: How it works <https://www.analogictips.com/magnetic-resonance-imaging-part-1-how-it-works-faq/> (accessed jun 15, 2020).