

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**Agentes de contraste metálicos en investigación para el diagnóstico por imagen del
Alzheimer**

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

AUTOR:

David Estefano Grados Bueno

ASESOR:

Dra. Paloma Friedda Salas Fernández

Lima, Enero, 2023

Resumen

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a un gran número de personas alrededor del mundo, en su mayoría, adultos mayores de 65 años. Por lo general, los síntomas más característicos están relacionados al declive cognitivo del paciente y a la formación de agregados peptídicos β -amiloide ($A\beta$) distribuidos alrededor del cerebro. Hoy en día, existen distintas teorías que tratan de explicar el mecanismo de formación de los agregados y el inicio del proceso neurodegenerativo, sin embargo, no hay evidencia concreta que las valide en su totalidad. De igual manera, los tratamientos del Alzheimer están centrados en retrasar y aliviar los síntomas de la enfermedad mas no en curarla, por ello, es muy importante diagnosticar la enfermedad en una etapa temprana, para así detener el daño neurodegenerativo lo antes posible.

Los métodos de diagnóstico por imagen permiten la identificación de distintas patologías, y en el caso del Alzheimer, muchos métodos de diagnóstico se basan en generar imágenes cerebrales que permitan determinar la cantidad de agregados β -amiloides presentes en el cerebro. Las tres principales técnicas usadas son la tomografía por emisión de positrones (PET), la imagen por resonancia magnética (MRI) y la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT). Entre todas, la técnica PET es la más ampliamente utilizada en el diagnóstico del Alzheimer para la identificación de agregados $A\beta$. Esta técnica hace uso de agentes de contraste, los cuales permiten mejorar la calidad de la imagen adquirida. Los agentes de contraste PET, comúnmente utilizados en el diagnóstico del Alzheimer, son radiofármacos marcados con los radioisótopos ^{11}C y ^{18}F , que, si bien permiten el diagnóstico de la enfermedad, también presentan desventajas relacionadas a su corto tiempo de vida media. Por ello, existen distintos proyectos que intentan implementar el uso de radionúcleos metálicos como alternativa extra, ya que muchos de estos tienen tiempos de vida media mayores al ^{11}C y ^{18}F , así como también otras características útiles para la síntesis de radiofármacos de diagnóstico.

El presente trabajo, tiene como objetivo presentar a los distintos agentes de contraste metálicos en exploración para su uso en las técnicas de imagen de MRI, SPECT y PET, haciendo un énfasis especial en los complejos de ^{64}Cu diseñados para su empleo en PET.



Tabla de contenidos

1. La enfermedad del Alzheimer	1
1.1. Síntomas y características comunes del Alzheimer	1
1.2. Etapas de la neurodegeneración	1
1.3. Biomarcadores de la enfermedad	3
1.3.1. Ovillos neurofibrilares	3
1.3.2. Placas β -amiloides	3
2. Hipótesis acerca del desarrollo de las placas Aβ y del Alzheimer.....	4
2.1. Hipótesis de la cascada de amiloides	5
2.2. Hipótesis del estrés oxidativo y su relación con los iones metálicos	6
2.2.1. Rol del hierro y el cobre en el estrés oxidativo y en el desarrollo del Alzheimer	7
2.2.2. Rol del zinc en el estrés oxidativo y en el desarrollo del Alzheimer.....	9
3. Compuestos metálicos en investigación para el diagnóstico del Alzheimer por imagen	12
3.1. Imagen por resonancia magnética (MRI).....	15
3.1.1. Gadolinio (Gd^{+3}).....	17
3.1.2. Nanopartículas de óxidos de hierro.....	23
3.2. Tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).....	28
3.2.1. Tecnecio-99m	29
3.3. Tomografía por emisión de positrones (PET)	34
3.3.1. Cobre-64	35
3.3.2. Galio-68	50
3.3.3. Zirconio-89.....	56
4. Conclusiones.....	62
5. Bibliografía.....	64

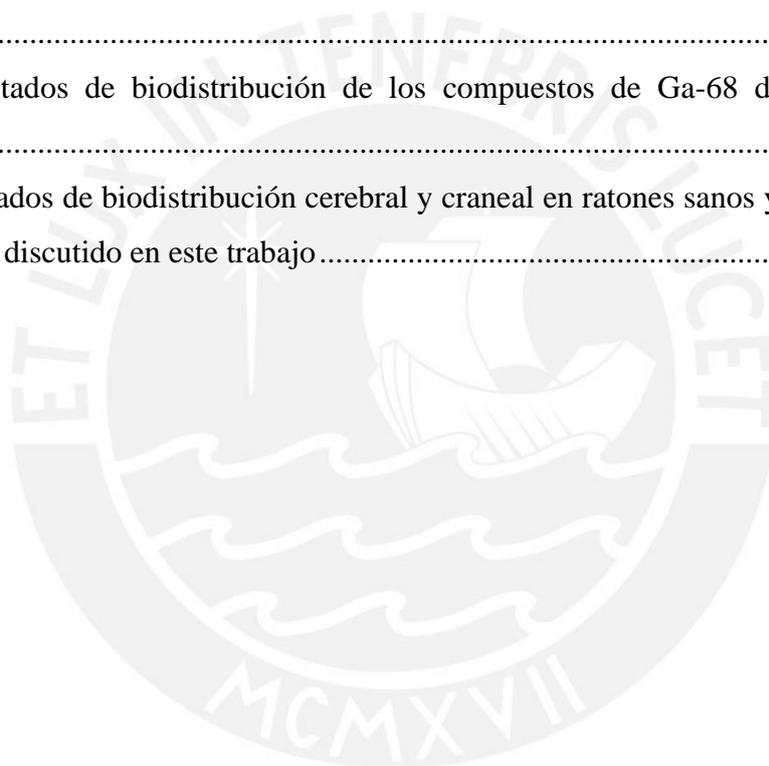
Índice de figuras

Figura 1: Esquema representativo de la formación de agregados A β	4
Figura 2: Esquema de un diagnóstico por imagen PET con el agente de contraste ^{11}C -PIB.....	13
Figura 3: Fármacos usados para el diagnóstico del Alzheimer	14
Figura 4: Imagen del cerebro de un ratón recopilada por MRI	16
Figura 5: Estructuras moleculares de GdR ₁ y GdR ₂ e imágenes MRI	19
Figura 6: Estructuras moleculares de ET3-T3 y Gd(III)-DSPE-DOTA.....	21
Figura 7: Estructuras moleculares de GdR ₄₋₁₁	22
Figura 8: Imágenes obtenidas por MRI a partir del uso de FeL ¹ y FeL ²	24
Figura 9: Imágenes cerebrales de FeL ³ obtenidas por MRI y fluorescencia.....	26
Figura 10: Gráficos de las pruebas realizadas para determinar la capacidad de FeL ³ como agente terapéutico	27
Figura 11: Imagen cerebral de un paciente con Alzheimer recopilada por SPECT.....	28
Figura 12: Esquema de la descomposición del ^{99}Mo en $^{99\text{m}}\text{Tc}$	30
Figura 13: Estructuras moleculares de los compuestos TcOL ¹ , TcOL ² , MOL ³ , MOL ⁴ , TcOL ⁵ , TcOL ⁶ y TcOL ⁷	31
Figura 14: Representación tridimensional de TcOL ¹ y sus interacciones intermoleculares con el agua.....	33
Figura 15: Imágenes recopiladas por autorradiografía del tejido cerebral de ratones transgénicos haciendo uso de TcOL ⁴ y TcOL ⁶	34
Figura 16: Estructura molecular del Cu(atm)	36
Figura 17: Estructuras moleculares del CuL ¹ , CuL ² y CuL ³	37
Figura 18: Imágenes adquiridas con LA-ICP-MS y microscopía haciendo uso de CuL ³ en tejido cerebral.....	40
Figura 19: Estructuras moleculares de CuL ⁴ y CuL ⁵	41
Figura 20: Imágenes de tejido cerebral tratado con CuL ⁴ , CuL ⁵ y 1E8	42
Figura 21: Estructuras moleculares de CuL ⁶ , CuL ⁷ y CuL ⁸	44
Figura 22: Imágenes del tejido cerebral de ratones transgénicos tratado con CuL ⁶ , CuL ⁷ , CuL ⁸ y HJ3.4	45
Figura 23: Estructuras moleculares de los compuestos divalentes sintetizados por Cho: CuL ⁹ , CuL ¹⁰ y CuL ¹¹	46

Figura 24: Estructuras moleculares de los compuestos monovalentes sintetizados por Cho: CuL ¹² y CuL ¹³	47
Figura 25: Imagen de los resultados correspondientes a las pruebas de autorradiografía de los compuestos divalentes con sus homólogos monovalentes.....	47
Figura 26: Imágenes de los tejidos cerebrales de ratones transgénicos tratados con las moléculas CuL ⁹ , CuL ¹⁰ , CuL ¹¹ y AF596-HJ3.4	48
Figura 27: Imágenes de los tejidos cerebrales de ratones transgénicos y sanos recopiladas por autorradiografía.....	49
Figura 28: Esquema de descomposición del ⁶⁸ Ge	51
Figura 29: Estructura del ligando de GaL ⁴ sintetizado por Chauhan	53
Figura 30: Estructuras moleculares de GaL ⁵⁻⁹ y sus imágenes cerebrales respectivas, recopiladas por autorradiografía	54
Figura 31: Espectro de emisión de GaL ⁴ puro y en presencia de Aβ	54
Figura 32: Estructura molecular y resultados de selectividad Aβ de GaL ⁰	55
Figura 33: Estructuras moleculares de GaL ¹⁻³	56
Figura 34: Estructura molecular del complejo ZrL ¹	57
Figura 35: Resultados de las pruebas de autorradiografía realizadas en ratones transgénicos	60

Índice de tablas

Tabla 1: Etapas y síntomas de la enfermedad del Alzheimer	2
Tabla 2: Biomoléculas asociadas al Fe, Cu y Zn.....	8
Tabla 3: Relaxividades longitudinales de GdR ₄₋₁₁ en agua y en suero sanguíneo	22
Tabla 4: Resultados de biodistribución de los compuestos de Tc-99m discutidos en este trabajo	32
Tabla 5: Coeficientes de reacción y de distribución de las moléculas sintetizadas por McInnes y colaboradores a un pH de 7.4.....	38
Tabla 6: Resultados de biodistribución de los compuestos de Cu-64 discutidos en este trabajo	39
Tabla 7: Resultados de biodistribución de los compuestos de Ga-68 discutidos en este trabajo	52
Tabla 8: Resultados de biodistribución cerebral y craneal en ratones sanos y transgénicos del compuesto ZrL ¹ discutido en este trabajo.....	59



Abreviaturas

%ID/cc	Porcentaje de dosis inyectada por centímetro cúbico de tejido
%ID/g	Porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido
AD	Enfermedad de Alzheimer
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APOE	Apolipoproteína E
APOE4	Apolipoproteína E4
APP	Proteína precursora de amiloides
A β	β -amiloides
ATP7A	Proteína transportadora de cobre ATP7A
ATP7B	Proteína transportadora de cobre ATP7B
atsm	Bis-tiosemicarbazona
AZD2184	2-[6-(Metilamino)-3-piridinil]-1,3-benzotiazol-6-ol
BAY94-9172	Florbetaben
BBB	Membrana hematoencefálica
BF-227	5-[2-[6-(2-fluoroetoxi)-2-benzoxazolil]etenil]- <i>N,N</i> -dimetil-2-tiazolamina
CTR1	Proteína transportadora de cobre CTR1
Df	Deferoxamina
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
dpi	Días postinyección
DSPE	1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ET3-T3	Derivado del DSPE-PEG-3500,1,2-diestearoil-snglicero-3-fosfoetanolamina- <i>N</i> -[maleimida (polietilenglicol) -3500]
FDDNP	2-(1-{6-[(2-[fluoro-18]-fluoroetil)-(metil)-amino]-2-naftil]-etilidieno)malononitrilo
GM	Materia gris
hpi	Horas postinyección
IMPY	6-iodo-2-(4-dimetilamino)-fenilimidazo[1,2- <i>a</i>]piridina
LA-ICP-MS	Espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo por ablación con láser

Log D	Coefficiente de distribución
mpi	Minutos postinyección
MRI	Imagen por resonancia magnética
NFT	Ovillos neurofibrilares
NOTA	Ácido 1,4,7-triazaciclonona-1,4,7-triacético
PEG	Polietilenglicol
PET	Tomografía por emisión de positrones
PIB	Compuesto B de Pittsburgh
PSEN1	Presenilina-1
PSEN2	Presenilina-2
R	Índice de relación
RF	Radiofrecuencias
r ₁	Relaxividad longitudinal
r ₂	Relaxividad transversal
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SB-13	4- <i>N</i> -Metilamino-4'-hidroxostilbeno
SOD	Superóxido dismutasa
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotón único
T ₁	Tiempo de relajación longitudinal
T ₂	Tiempo de relajación transversal
t _{1/2}	Tiempo de vida media
TACN	1,4,7-triazaciclononano
ThT	Tioflavina T
WM	Materia blanca

1. La enfermedad del Alzheimer

1.1. Síntomas y características comunes del Alzheimer

El Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por pérdida de memoria, declive cognitivo, discapacidad física, cambios de comportamiento y, como última instancia, la muerte.¹ Se estima que ~50-60% de todos los casos de demencia terminan siendo diagnosticados como AD, lo cual convierte a dicha enfermedad en la forma más común de demencia.¹ El proceso de neurodegeneración consiste en una muerte neuronal progresiva que se divide en múltiples facetas, las cuales llevan al paciente a experimentar diferentes síntomas, dependiendo del avance de la enfermedad.²

Actualmente, las causas que llevan a una persona a padecer de AD no son conocidas en su totalidad, pero, se han logrado identificar distintos factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la enfermedad como la edad, la genética, los factores ambientales, el consumo de cigarrillos, la obesidad, la diabetes y la dishomeostasis de metales esenciales.^{1,2} Sin embargo, el mecanismo patogénico de la enfermedad es desconocido, lo cual genera que los tratamientos existentes vayan dirigidos a aliviar y retrasar los síntomas, mas no a curar la enfermedad.^{1,2}

1.2. Etapas de la neurodegeneración

El proceso neurodegenerativo del Alzheimer se divide en tres etapas: etapa preclínica, etapa prodrómica y etapa de demencia.^{3,4} En la Tabla 1, se pueden observar los síntomas y características más comunes de cada etapa en el ámbito cognitivo, funcional y de comportamiento. En general se puede apreciar que síntomas como el declive cognitivo aparecen desde la etapa preclínica de la enfermedad y comienzan como episodios esporádicos de pérdida de memoria, que muchas veces se confunden con el proceso natural de envejecimiento.⁴ Sin embargo, a medida que la enfermedad se desarrolla se presentan otros

síntomas relacionados al deterioro cognitivo, que culminan en la pérdida total de independencia del paciente, así como en una incapacidad de éste para realizar actividades básicas como vestirse o bañarse.⁴

Tabla 1: Etapas y síntomas de la enfermedad del Alzheimer (Adaptado de la referencia 4).⁴

Ámbito	Preclínica	Prodrómica	Demencia
Cognitivo	Episodios esporádicos de pérdida de memoria	La pérdida de memoria se vuelve algo más común. También aparecen otros síntomas como la dificultad en la resolución de problemas y toma de decisiones, acompañado de una pérdida de la noción del tiempo.	La pérdida de memoria, la dificultad para hablar y la incapacidad para retener información específica como la fecha y hora se vuelven síntomas del día a día. De igual manera el paciente presenta problemas severos en la toma de decisiones, capacidad de planificación y en el pensamiento abstracto.
Funcional	Normal	Dificultades para realizar actividades del día a día de forma independiente (manejar, trabajar, hacer compras, cocinar, etc)	Pérdida total de independencia, incapacidad total para realizar actividades básicas de forma independiente (vestirse, bañarse, alimentarse, etc).
Comportamiento	Apático e irritable	Apático, irritable y ansioso	Apático, irritable, ansioso, resistente al cuidado, depresivo e incapacidad para dormir.

Es importante mencionar que el proceso de neurodegeneración en un paciente de AD demora muchos años, por ello, muchos de los síntomas mencionados anteriormente suelen aparecer en la etapa de la vejez del individuo, sin embargo, se estima que las lesiones provocadas por la neurodegeneración empiezan en la pubertad del paciente, décadas antes de que sea clínicamente detectable.⁵ Es de vital importancia diagnosticar dicha enfermedad en una etapa temprana con el objetivo de retrasar el proceso neurodegenerativo, ya que, diagnósticos y tratamientos prematuros suelen ser claves para mejorar la salud y la calidad de vida del paciente.⁴

1.3. Biomarcadores de la enfermedad

La enfermedad del Alzheimer se caracteriza por la presencia de dos tipos de solidificaciones peptídicas en el cerebro de los pacientes: los ovillos neurofibrilares (NFT) y las placas β -amiloides ($A\beta$).^{1,2} El mecanismo exacto de formación de ambas solidificaciones peptídicas es, por el momento, desconocido. Sin embargo, se cree que tanto los NFT como los $A\beta$, son los productos finales de una cascada de reacciones, en donde factores como la dishomeostasis de metales esenciales como el Fe, Cu y Zn pueden acelerar el proceso de formación.²

1.3.1. Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares (NFT) son solidificaciones proteicas compuestas, principalmente, por la proteína tau.¹ Dicha proteína, tiende a pasar por un proceso de auto-ensamblaje, dando lugar a la formación de distintas estructuras de agregados que suelen generarse en las células nerviosas ubicadas en la zona central y periférica del cerebro.⁶ De igual manera, las proteínas tau son capaces de sufrir modificaciones internas como, por ejemplo: fosforilación, acetilación, metilación e isomerización. Se atribuye a las proteínas fosforiladas la tendencia a producir los agregados proteicos y se cree que estos últimos están directamente relacionados con el proceso neurodegenerativo y el declive cognitivo del paciente.⁶

1.3.2. Placas β -amiloides

Los residuos β -amiloides ($A\beta$) son péptidos, que tienen tres formas isomórficas de 39 a 42 residuos y provienen de la degradación de la proteína precursora de amiloides (APP), el cual es un compuesto presente en la mitocondria y la membrana de la célula.^{1,7} Los compuestos $A\beta$ tienden a interactuar entre sí con el objetivo de formar cuerpos proteicos cada vez más grandes, hasta exceder un límite de solubilidad y generar las placas sólidas $A\beta$.² En la Figura 1, se puede observar una representación del mecanismo por el cual dichas placas se forman, sin embargo,

es importante mencionar que los detalles específicos y los pasos determinantes del mecanismo son por el momento desconocidos.²

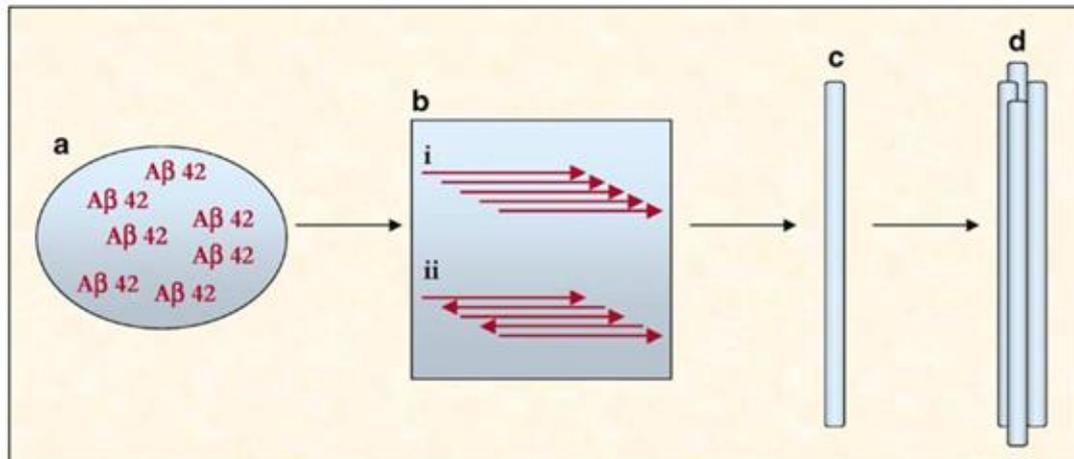


Figura 1: Esquema representativo de la formación de agregados Aβ. En a) se pueden observar péptidos Aβ de 42 residuos, en b) se aprecian los péptidos uniéndose entre sí de forma paralela (i) o antiparalela (ii), y en c) y d) se puede observar la formación de agregados Aβ cada vez más grandes producto de la acumulación excesiva de residuos Aβ (Adaptado de la referencia 2).²

Así, la formación de las placas Aβ sería el resultado de una cascada de reacciones que pueden ser aceleradas en presencia de los factores de riesgo previamente mencionados.¹ En donde, la dishomeostasis de los metales esenciales Fe, Cu y Zn es uno de los factores más importantes en la formación de agregados.²

2. Hipótesis acerca del desarrollo de las placas Aβ y del Alzheimer

Como se ha mencionado antes, la enfermedad del Alzheimer se caracteriza, principalmente, por la presencia de agregados Aβ en el cerebro del paciente. Sin embargo, el mecanismo de formación de dichos agregados y la forma en la cual estos contribuyen al declive cognitivo del paciente, no son del todo conocidos. Por ello, hoy en día existen distintas teorías, las cuales tratan de explicar dichos fenómenos; dos de las más importantes son la teoría de la cascada de amiloides y la teoría del estrés oxidativo.

2.1. Hipótesis de la cascada de amiloides

La hipótesis de la cascada de amiloides plantea que el proceso neurodegenerativo es ocasionado por la formación de agregados A β en las distintas secciones cerebrales.⁸⁻¹⁰ De acuerdo con esta teoría, la deposición de A β es el primer evento patogénico de la enfermedad,⁸ y a su vez, dicha deposición genera poco a poco cambios estructurales en los axones y dendritas, lo cual genera una muerte neuronal progresiva en el cerebro del paciente.⁹

En la enfermedad del Alzheimer existe una desregulación en el balance de producción y eliminación de los péptidos A β , lo cual provoca su acumulación en el cerebro.⁹ De igual manera, se cree que existen distintos factores genéticos que facilitan el proceso acumulativo.⁸ Como se mencionó anteriormente, los agregados A β son producto de la degradación natural de la proteína APP, por ello, se sugiere que las mutaciones en dicha biomolécula pueden contribuir a una producción excesiva de A β que puede terminar en un proceso acumulativo.⁹ Igualmente, se ha reportado que distintos tipos de lesiones cerebrales pueden contribuir a un exceso de producción de APP, que, en consecuencia, generaría una mayor cantidad de agregados A β por un proceso de degradación.¹⁰ A su vez, las mutaciones en los genes de PSEN1 y PSEN2 también podrían influir y promover el proceso acumulativo de A β .⁸

Asimismo, se conoce que la proteína Apolipoproteína E (APOE), cumple la función de eliminar el exceso de agregados A β presentes en el cerebro.¹⁰ Sin embargo, dicha proteína posee una forma isomórfica denominada APOE4, que es incapaz de cumplir con esta función, lo cual genera que la cantidad de solidificaciones A β aumente en gran medida cuando esta última está presente en gran proporción.^{9,10}

Si bien la hipótesis de la cascada de amiloides plantea observaciones y postulados coherentes respecto al desarrollo de la enfermedad del Alzheimer, no existe evidencia concreta, que sustente que los agregados A β generen todos los síntomas de la enfermedad.¹⁰ De igual

manera, si bien el desarrollo de la enfermedad está relacionado con la deposición de A β , no se sabe con seguridad si el AD es una causa o una consecuencia de dicha deposición. De acuerdo con la teoría de la cascada de amiloides, el AD es una consecuencia de la agregación de A β , aunque se estima que un 20-40% de adultos mayores sin antecedentes de demencia poseen cantidades de agregados peptídicos iguales o incluso mayores a pacientes diagnosticados con Alzheimer, por lo que se plantea que el desarrollo e inicio de la enfermedad podría estar relacionado a otros factores.¹

2.2.Hipótesis del estrés oxidativo y su relación con los iones metálicos

El estrés oxidativo se define como el desbalance existente entre la producción y la eliminación de radicales libres en un organismo,^{2,11} el cual genera que dichos radicales reaccionen y alteren la estructura de distintas proteínas, enzimas y lípidos, provocando un mal funcionamiento de las biomoléculas afectadas y daños al metabolismo celular.² Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son compuestos capaces de generar estrés oxidativo, y algunas de las más conocidas son los superóxidos, los peróxidos y los radicales hidroxilos, siendo estos últimos los más reactivos y peligrosos de entre todos los compuestos ROS.^{1,11}

La hipótesis del estrés oxidativo propone que la enfermedad del Alzheimer es desencadenada por un proceso oxidativo, el cual contribuye a la muerte neuronal y al declive cognitivo.¹² Se plantea que el cerebro es un órgano muy susceptible al daño oxidativo, ya que posee una gran cantidad de ácidos grasos peroxidables y consume una gran cantidad de oxígeno,¹² del cual se estima que un 1-2% se convierte en compuestos ROS.¹¹ A su vez, se plantea que la deposición de agregados A β mantiene una relación con el proceso oxidativo, aunque, dicha relación no es conocida en su totalidad.

Por otro lado, el cuerpo humano tiene distintos mecanismos antioxidantes por los cuales se evita que los compuestos ROS generen daño oxidativo en nuestros cuerpos. Dichos

mecanismos son posibles gracias a la existencia de biomoléculas antioxidantes, que inhiben a los ROS.¹² Sin embargo, existen distintos factores que pueden incrementar la cantidad de ROS producidos por el cuerpo humano, provocando que los compuestos antioxidantes no sean capaces de procesarlos en su totalidad. Se cree que la dishomeostasis de metales como el Fe, Cu y Zn, es un factor de riesgo que promueve la producción de compuestos ROS y, en consecuencia, el daño oxidativo.¹ De igual manera, se ha reportado que pacientes en etapas muy prematuras de AD, presentan concentraciones inusuales de Fe, Cu y Zn en sus cerebros,¹ y, adicionalmente, se han encontrado distintos ácidos nucleicos, proteínas y lípidos oxidados, que indican que el daño oxidativo ocasionado por los ROS podría contribuir al desarrollo de la enfermedad del Alzheimer en etapas prematuras.¹²

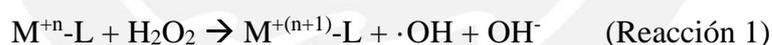
2.2.1. Rol del hierro y el cobre en el estrés oxidativo y en el desarrollo del Alzheimer

El hierro y el cobre son dos metales de transición muy importantes para muchas reacciones metabólicas del cuerpo humano. Dichos metales, por lo general, se encuentran complejados por un gran número de biomoléculas (Tabla 2) como la hemoglobina, ferritina y transferrina, en el caso del Fe,¹³ y la CTR1, ceruloplasmina, ATP7A y ATP7B en el caso del Cu.¹

Tabla 2: Biomoléculas asociadas al Fe, Cu y Zn (Adaptado de la referencia 1).¹

Metal	Biomolécula asociada al metal	Función
Fe	Transferrina	Transporta el Fe a través de todo el organismo.
	Ferritina	Almacena el Fe.
	Hemoglobina	Transporta el oxígeno a través del sistema sanguíneo
Cu	CTR1	Transportan el Cu a través de todo el organismo.
	ATP7A	
	ATP7B	
	Ceruloplasmina	
Zn	Metalotioneínas	Regulan el estrés oxidativo y cumplen un rol antioxidante en el organismo.
	SOD	

Ambos metales son activos en reacciones redox que catalizan la formación de compuestos ROS por medio de la reacción de Fenton (Reacción 1).^{14,15} De igual manera, dichos metales también pueden producir la formación de radicales de lípidos por medio de la reacción 2, por lo que es muy importante mantenerlos complejados con sus biomoléculas respectivas para así evitar la producción de daño oxidativo en el organismo.¹⁴



Distintos estudios han logrado determinar que los agregados A β poseen la capacidad de complejar los núcleos de Fe y Cu en el interior de sus estructuras, aunque, dicho complejamiento no detiene la actividad redox de los metales en su totalidad, provocando que el daño oxidativo continúe.^{16,17} Se sugiere que los núcleos metálicos de Fe y Cu podrían servir como núcleos de complejamiento, en los cuales las placas A β se adhieren y acumulan poco a poco. De igual manera, el daño oxidativo alrededor de estos puntos podría afectar y alterar a las biomoléculas cercanas y provocar su mal funcionamiento.^{13,17} A su vez, algunos autores plantean que la producción excesiva de compuestos ROS puede generar mutaciones en el ADN

del paciente, ya que dichos compuestos pueden reaccionar con las bases nitrogenadas, así como también pueden alterar el esqueleto desoxirribosa de la molécula, produciendo mutaciones genéticas.¹⁴ Por otro lado, la proteína APP también es capaz de complejar a los metales Fe y Cu en su estructura, lo cual aceleraría el proceso de degradación y la formación de placas A β en el cerebro del paciente.¹⁵

Es importante mencionar que la actividad redox de los metales en su forma libre es mucho más grande que cuando se encuentran complejados por alguna molécula, por ello, se sugiere que, posiblemente, el complejamiento del Fe y Cu por parte de A β y APP sea una respuesta defensiva del metabolismo en un intento de reducir el daño oxidativo que dichos metales pueden producir en su forma libre.^{15,16}

En general, se puede afirmar que tanto el Fe como el Cu cumplen un rol en la producción directa de compuestos ROS por medio de las reacciones 1 y 2, lo cual genera estrés oxidativo en las biomoléculas cercanas y, a su vez, desencadena en el mal funcionamiento de distintas reacciones metabólicas, relacionadas a dichas biomoléculas. De igual manera, si bien es cierto que hay evidencia de daño oxidativo en etapas muy prematuras de la enfermedad del Alzheimer, todavía hace falta recolectar más evidencias que establezcan un mecanismo exacto que relacione el daño oxidativo con el proceso de neurodegeneración y agregación de péptidos A β .

2.2.2. Rol del zinc en el estrés oxidativo y en el desarrollo del Alzheimer

El zinc es un metal de transición esencial utilizado por el cuerpo humano en diversos procesos biológicos como la neurogénesis, la coordinación motora y la protección contra el estrés oxidativo.¹ Para mantener regulados dichos procesos es importante que el zinc mantenga una concentración específica, por lo que, una dishomeostasis de este metal puede resultar ser

un factor de riesgo para muchas enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, el Alzheimer.¹

El Zn mantiene una relación con el estrés oxidativo y la producción de compuestos ROS en un organismo. Sin embargo, dicha relación no es la misma que la del Fe y Cu, ya que el Zn es un metal redox inerte incapaz de producir compuestos ROS mediante las reacciones 1 y 2. Las funciones del Zn en el cuerpo humano tienen un rol antioxidante que protege al organismo del estrés oxidativo, por ello, el déficit de dicho metal en proteínas antioxidantes como las metalotioneínas y las SOD (Tabla 2), puede provocar un mal funcionamiento de estas biomoléculas, generando un exceso de compuestos ROS y de estrés oxidativo.¹⁸ De igual manera, el Zn es un metal necesario para el desarrollo cerebral, ya que cumple un rol esencial en el aprendizaje, la memoria y la actividad sináptica entre neuronas. Por ello, una ausencia de este podría afectar dichos procesos, que coinciden con los síntomas vistos en el declive cognitivo presente en la enfermedad del Alzheimer.¹⁹

Por otro lado, respecto al desarrollo y acumulación de las placas A β , diversos estudios sugieren que altas concentraciones de Zn pueden promover la deposición de agregados A β en el cerebro.¹⁹ De igual manera, se sugiere que un exceso de zinc puede interferir con las funciones mitocondriales y desregular el proceso de respiración celular, lo cual produce un exceso de compuestos ROS dentro del organismo que ocasionan daño cerebral y mutaciones a las biomoléculas cercanas.¹⁹

Con el objetivo de demostrar el efecto del exceso de Zn en organismos biológicos, Yan y colaboradores, realizaron un experimento en ratones transgénicos, cuyos resultados demostraron que una dieta con un exceso de iones de Zn⁺² producía problemas de memoria espacial, cambios de comportamiento y una acumulación excesiva de agregados A β .²⁰ El experimento realizado sugiere que el exceso de Zn también cumple un rol en el proceso

neurodegenerativo y el declive cognitivo, aunque, el mecanismo exacto por el cual se producen dichos síntomas no es conocido en su totalidad.²⁰

Se puede afirmar que tanto el exceso como el defecto de Zn guardan relación con el proceso degenerativo visto en la enfermedad del Alzheimer. Sin embargo, es importante mencionar que, a diferencia del Fe y Cu, el Zn no produce los compuestos ROS de forma directa, sino que está relacionado a otros procesos de regulación de ROS, en los cuales la baja concentración de Zn desregula la capacidad antioxidante del organismo, generando que los compuestos ROS produzcan daño oxidativo. Si bien el Zn cumple un rol importante en la enfermedad, todavía hace falta evidencia que indique el mecanismo exacto por el cual dicho metal se relaciona con la neurodegeneración y la agregación A β observada en la enfermedad del Alzheimer.

Si bien la presencia de altas concentraciones del Fe, Cu y Zn ha sido relacionada a la aparición de signos de deterioro cognitivo atribuidos al Alzheimer, un uso en pequeñas concentraciones de estos y otros metales podría ser útil para la detección de este mal. Por ello, en el siguiente capítulo se discutirá el empleo de iones metálicos para la detección del Alzheimer por distintas técnicas de generación de imagen.

3. Compuestos metálicos en investigación para el diagnóstico del Alzheimer por imagen

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad del Alzheimer se caracteriza por la presencia de dos biomarcadores distintos: las placas A β y los agregados NFT.²¹ Los métodos de diagnóstico por imagen que serán discutidos a continuación se centran en crear una imagen del cerebro, en la cual se pueda identificar claramente las zonas afectadas por la neurodegeneración.^{22,23} Esta imagen es creada haciendo uso de distintos compuestos de contraste metálicos, los cuales están aún en investigación. Lo que se busca usando este tipo de compuestos es que superen las limitaciones de los fármacos de contraste actuales para, así, mejorar la resolución de las imágenes, reducir la concentración de la dosis, reducir los efectos secundarios y atravesar la membrana hematoencefálica (BBB) con mayor facilidad.²⁴ Este último aspecto es uno de los más importantes, debido a que esta barrera es muy selectiva y solo deja pasar moléculas con un tamaño y lipofilidad específicos.

Actualmente, los agentes de contraste de uso comercial para el diagnóstico del Alzheimer son marcados con ^{11}C y ^{18}F para permitir la toma de imagen cerebral por medio de la técnica de Tomografía por emisión de positrones (PET). Estos radionúcleos son preparados haciendo uso de un ciclotrón médico, que es un acelerador de partículas que genera las distintas especies isotópicas utilizadas para la síntesis de los radiocompuestos. Posteriormente, estos últimos deben ser purificados para eliminar cualquier otro producto producido por una reacción alterna.²² Luego, son inyectados por vía intravenosa al paciente hasta llegar al cerebro y adherirse a las zonas de alta concentración de formaciones A β por medio de interacciones intermoleculares. Llegado este punto los radionúcleos de ^{11}C y ^{18}F comienzan a desintegrarse, produciendo señales, las cuales son detectadas y permiten reconstruir una imagen del cerebro, en la cual la intensidad de señal es proporcional a la concentración de péptidos A β (Figura 2).²²

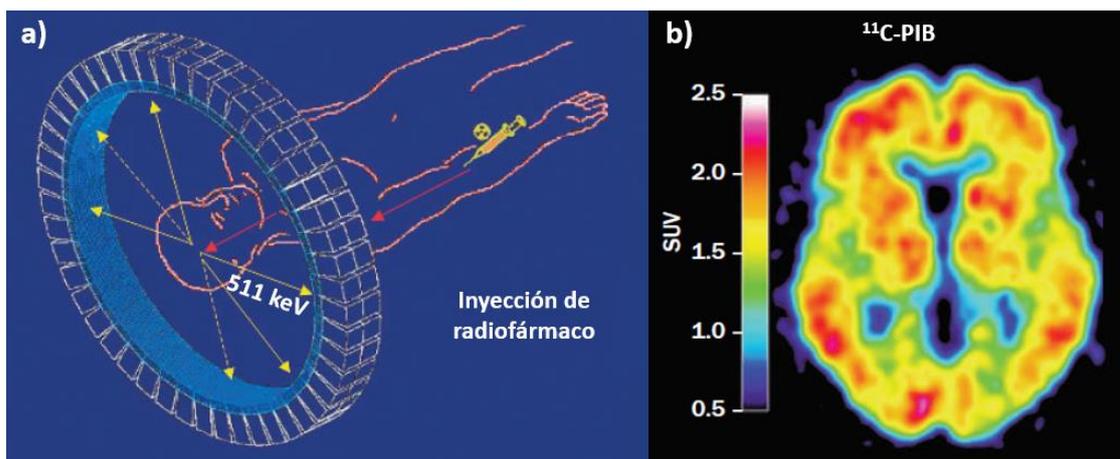


Figura 2: Esquema de un diagnóstico por imagen PET con el agente de contraste ^{11}C -PIB. En a) se puede observar la inyección de un paciente con un radiofármaco PET y en b) se puede ver la imagen del cerebro adquirida (Adaptado de las referencias 22 y 25).^{22,25}

Las interacciones que permiten la unión entre las radiomoléculas y los agregados $\text{A}\beta$ son del tipo π - π y suceden en la zona hidrofóbica de las solidificaciones peptídicas, por ello es recomendable que estos radiofármacos posean grupos funcionales como el benzotiazol o el estilbino, capaces de generar estas interacciones y unirse exitosamente a los agregados.²⁶ Algunas de las moléculas más comunes utilizadas para diagnosticar el Alzheimer son la ^{18}F -FDDNP, ^{11}C -PIB, ^{11}C -SB-13, ^{11}C -BF-227, ^{18}F -BAY94-9172 y ^{11}C -AZD2184 (Figura 3).²⁵ Si bien estas son capaces de adherirse efectivamente a las placas $\text{A}\beta$, presentan un problema relacionado con los tiempos de vida media del ^{11}C y ^{18}F , los cuales son de 20.4 y 109.7 minutos, respectivamente,²⁶ valores demasiado pequeños que obligan a los analistas a realizar los exámenes de una forma muy acelerada. Por ello, estos fármacos deben ser sintetizados en los mismos centros de salud, minutos antes de las pruebas, para evitar su descomposición, lo cual limita que los análisis sólo puedan realizarse en hospitales que cuenten con la tecnología necesaria para sintetizar estas moléculas.

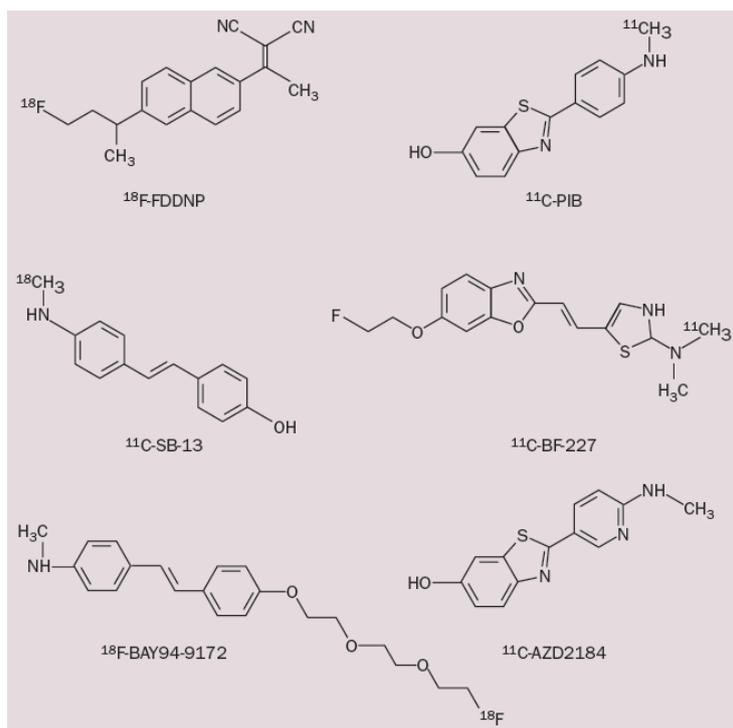


Figura 3: Fármacos usados para el diagnóstico del Alzheimer (Adaptado de la referencia 25).²⁵

El uso de distintos radioisótopos con tiempos de vida media mayores permitiría que las moléculas de diagnóstico sean sintetizadas en algún laboratorio especializado y luego enviadas al centro de salud donde se deba realizar la prueba, sin enfrentar una significativa desintegración durante su transporte que disminuya su efectividad como fármaco de diagnóstico. De igual manera, el uso de otros agentes de contraste y técnicas de imagen no radioactivas también es una solución al problema de desintegración rápida del ^{11}C y ^{18}F . Por ello, distintos autores plantean el uso de otras técnicas de diagnóstico por imagen alternativas a PET, las cuales, mediante el uso de diferentes agentes de contraste, presentan muy buenos resultados en la recopilación de imágenes cerebrales de pacientes con Alzheimer. Algunos de los métodos de diagnóstico alternativos son la Imagen por resonancia magnética (MRI) y la Tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT). El primero se basa en el comportamiento magnético de los hidrógenos en presencia de un fuerte campo magnético

externo, mientras que el segundo se justifica con el uso de diferentes agentes de contraste capaces de emitir radiación gamma en las zonas cerebrales de interés.

En este capítulo se discutirá, por lo tanto, el uso de distintos agentes de contraste metálicos en exploración para el diagnóstico por imagen del Alzheimer por medio de las tres técnicas de imagen mencionadas: MRI, SPECT y PET.

3.1. Imagen por resonancia magnética (MRI)

La técnica de MRI es un método de diagnóstico no radioactivo que permite obtener imágenes de mucha calidad de los distintos órganos y tejidos presentes en el cuerpo humano. El concepto por el cual MRI funciona radica en el diferente comportamiento magnético de los hidrógenos presentes en las moléculas de agua y tejido, en presencia de un fuerte campo magnético externo. En estas pruebas se somete al paciente a un fuerte campo magnético, el cual genera que los espines de los protones entren en un estado de equilibrio y se alineen en sincronía con dicho campo. Posteriormente, se utilizan pulsos de radiofrecuencia (RF), los cuales fuerzan a que los protones salgan de su estado de equilibrio y se exciten por unos microsegundos.^{27,28} Al término del pulso de RF, los protones comienzan a relajarse y regresan a su estado de equilibrio, lo cual produce una corriente inducida que es detectada por una bobina de detección, generando las imágenes de diagnóstico.²⁹

Esta técnica hace uso de variaciones en el campo magnético alrededor del espacio para generar gradientes. Los gradientes pueden ser aplicados en cualquier dirección ortogonal y permiten cambios en el movimiento rotatorio de los hidrógenos de acuerdo con su posición espacial. Dichos cambios en la frecuencia de rotación de los hidrógenos generan que la imagen MRI tenga diferentes contrastes en las diferentes secciones del órgano estudiado.²⁹

De igual manera, existen otros dos factores intrínsecos conocidos como tiempo de relajación longitudinal (T_1) y tiempo de relajación transversal (T_2). Ambos factores determinan

el tiempo que el protón demora en regresar a su estado de equilibrio y están relacionados con el contraste final de la imagen de diagnóstico.²⁷ En concreto, los protones que posean T_1 y T_2 diferentes también tendrán distintos contrastes que permitirán diferenciar los distintos tejidos del cuerpo humano. Por lo general, los valores pequeños de T_1 producen contrastes brillantes, mientras que los tiempos T_2 pequeños generan contrastes oscuros (Figura 4).^{30,31}

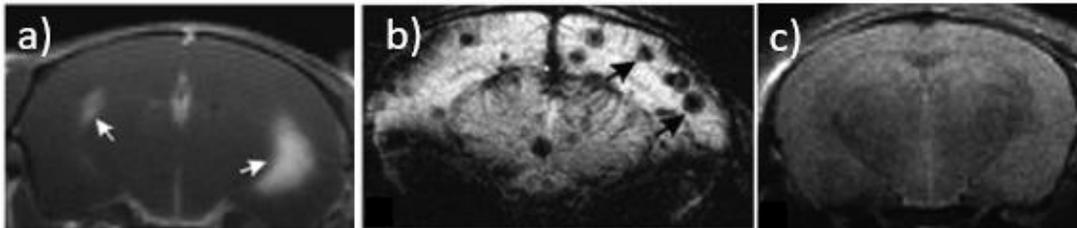


Figura 4: Imagen del cerebro de un ratón recopilada por MRI. En a) se pueden ver zonas brillantes correspondientes a una reducción de T_1 ; en b) se pueden observar secciones oscuras correspondientes a la disminución de T_2 y en c) se observa una imagen en donde no se redujo ningún tiempo de relajación (Adaptado de la referencia 31).³¹

Con el objetivo de mejorar la calidad de las imágenes se utilizan distintos agentes de contraste, los cuales son compuestos con momentos magnéticos muy grandes que inducen a que los tiempos de relajación de los hidrógenos se reduzcan, produciendo una imagen de mejor calidad.³⁰ Dichos agentes de contraste poseen núcleos metálicos con muchos electrones desapareados que, al momento que los RF son retirados, ayudan a que los protones excitados regresen a su estado inicial de equilibrio. Ello se logra, ya que el procedimiento de relajación de los núcleos excitados consiste en un intercambio energético con el medio y/o sus momentos de spin. Los iones paramagnéticos tienen la capacidad de generar fluctuaciones electromagnéticas, provocando que los electrones de las moléculas vecinas presenten diferentes momentos magnéticos que afectan su frecuencia de resonancia, dependiendo de su posición. Los electrones tienden a relajarse mucho más rápido que sus núcleos respectivos, generando que los protones cercanos a dichos electrones tengan una fuente adicional con la cual intercambiar energía y relajarse, provocando que los tiempos de relajación T_1 y T_2 se reduzcan significativamente.³²

Existen dos tipos de agentes de contraste utilizados en MRI, que se dividen en paramagnéticos y superparamagnéticos, los primeros son cationes metálicos, los cuales poseen muchos electrones desapareados que generan un momento magnético muy grande, mientras que los segundos son compuestos metálicos rodeados por una matriz polimérica, que tienen momentos magnéticos mucho más grandes que los agentes paramagnéticos.³⁰ La efectividad de un agente de contraste para reducir los tiempos de relajación se determina mediante la relaxividad longitudinal (r_1) y la relaxividad transversal (r_2). En concreto, un valor de relaxividad muy grande indica que el tiempo de relajación se reducirá en gran medida generando una imagen de mayor contraste y calidad.³⁰

En general, el uso de agentes de contraste en MRI, puede permitir el estudio de distintos órganos, así como también puede facilitar el diagnóstico de distintas enfermedades.³⁰ Por ello, distintos autores plantean el uso de agentes de contraste de MRI en el diagnóstico del Alzheimer con el objetivo de detectar las placas $A\beta$ presentes en el cerebro. En este apartado se presenta una investigación bibliográfica respecto a distintos compuestos de gadolinio y nanopartículas de óxidos de hierro, los cuales están en investigación para ser usados en el diagnóstico del Alzheimer.

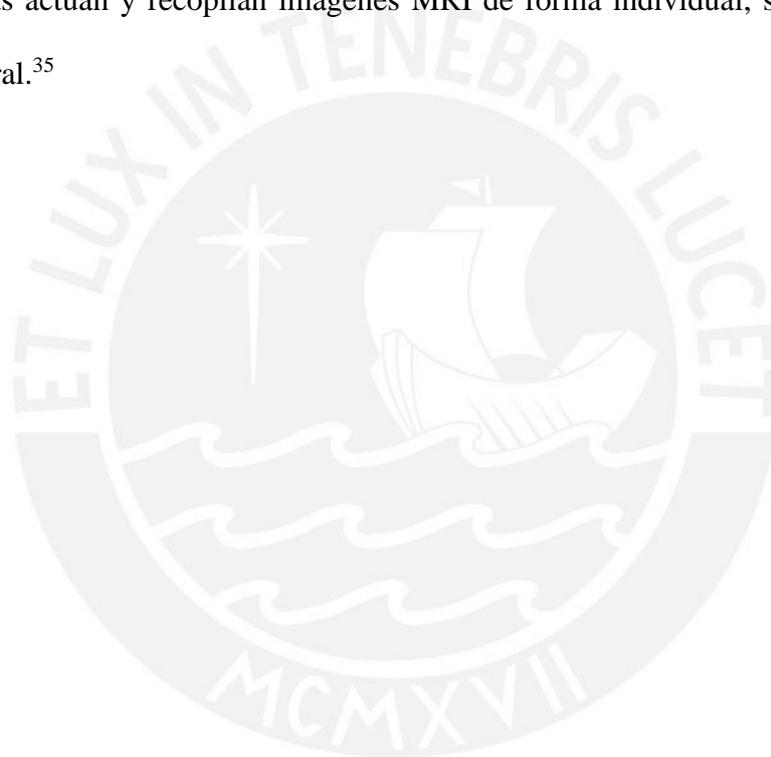
3.1.1. Gadolinio (Gd^{+3})

El gadolinio es un metal de número atómico 64 que pertenece al grupo de las tierras raras; su forma catiónica más común es Gd^{+3} y es utilizada como núcleo de distintos agentes de contraste del tipo paramagnético, ya que posee 7 electrones desapareados, los cuales generan un momento magnético de, aproximadamente, $7.9 \mu_B$.³⁰ Naturalmente, es necesario sintetizar moléculas capaces de mantener quelado al Gd^{+3} , ya que, si se quiere emplear como agente de diagnóstico para el Alzheimer, es indispensable que este elemento atraviese la BBB y llegue al cerebro sin ser complejoado por alguna proteína o compuesto presente en el cuerpo del paciente.

Los protones que entren en contacto en la esfera de coordinación del Gd^{+3} serán afectados por el fuerte efecto paramagnético de dicho metal, provocando que sus tiempos de relajación se reduzcan. Este efecto genera que las imágenes MRI tengan un mejor contraste en las secciones de interés, causando que algunos tejidos sean más fáciles de distinguir respecto a otros.³⁰ En el caso de los agentes de contraste en el diagnóstico del Alzheimer, el objetivo es que sean capaces de distinguir a los agregados $A\beta$ del resto de tejidos.

Existen distintos agentes de contraste en investigación sintetizados a base de Gd, los cuales resaltan tanto por su afinidad hacia los agregados $A\beta$, como por su capacidad de generar imágenes MRI de gran calidad. En la Figura 5, se pueden observar las estructuras moleculares de los compuestos GdR_1 y GdR_2 ,^{33,34} así como también las imágenes MRI que dichos compuestos generan. Por un lado, en GdR_1 (Figura 5B) se pueden observar distintos puntos negros correspondientes a las solidificaciones $A\beta$ en los tejidos cerebrales de ratones transgénicos,³³ mientras que en GdR_2 (Figura 5D) se observan zonas muy brillantes que también son producto de la identificación de los agregados.³⁴ Se sugiere que dichas diferencias se deben a que GdR_1 es un compuesto hidrofílico, el cual interactúa con los tejidos cerebrales, mas no directamente con los agregados $A\beta$, generando que todas las zonas del tejido adquieran un contraste más brillante con excepción de $A\beta$.³³ Por otro lado, GdR_2 posee una larga cadena de péptidos, los cuales, se sospecha, le permiten ser más hidrofóbico que GdR_1 , generando que GdR_2 interactúe directamente con las placas $A\beta$ y genere un contraste brillante en los agregados, mas no en los tejidos cercanos, ello se propone que es porque dentro de la cadena de péptidos de GdR_2 hay una sección encargada de adherirse a los residuos hidrofóbicos de $A\beta$ (Figura 5C).³⁴

es un tipo de nanopartícula; dicha característica, de acuerdo con los autores, permite que muchas moléculas de contraste entren en contacto con los hidrógenos presentes en los tejidos cerebrales, provocando un efecto de relajamiento muy superior al de las moléculas individuales.³⁵ Esto se puede ver reflejado en los valores de las relaxividades longitudinales, ya que las moléculas de contraste individuales presentan un r_1 de $\sim 31 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, mientras que la estructura liposomal obtiene un r_1 de $\sim 2\,295\,000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, lo cual es un valor de cinco órdenes de magnitud mayor. Dicho comportamiento se diferencia de lo visto en GdR_1 y GdR_2 , ya que dichas moléculas actúan y recopilan imágenes MRI de forma individual, sin formar ningún arreglo estructural.³⁵



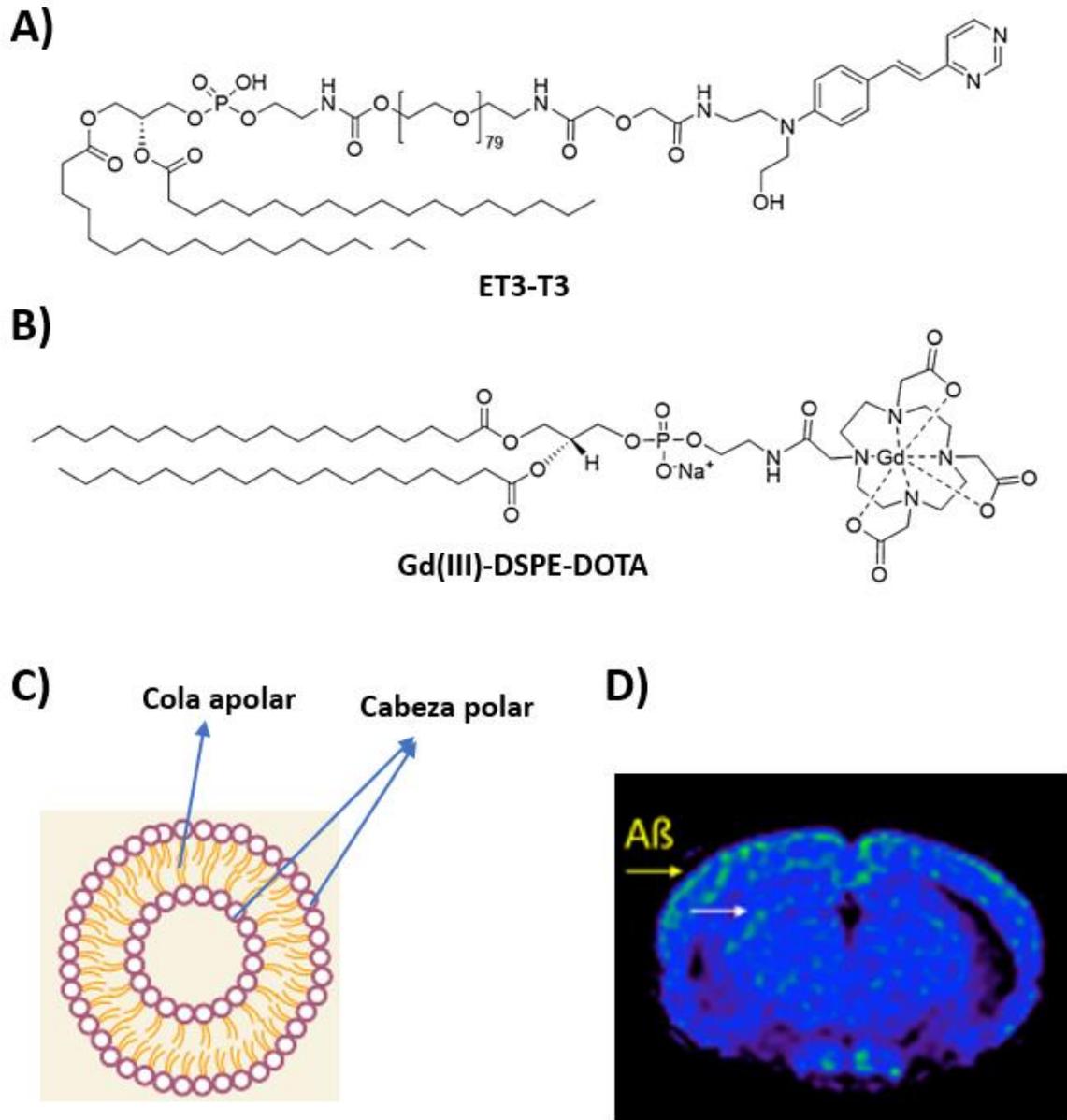


Figura 6: Estructuras moleculares de ET3-T3 y Gd(III)-DSPE-DOTA. En A) y B) se pueden observar los compuestos ET3-T3 y Gd(III)-DSPE-DOTA, respectivamente, en C) se observa la representación de una estructura liposomal (GdR_3) formada por ET3-T3 y Gd(III)-DSPE-DOTA y en D) se aprecia la imagen MRI adquirida por GdR_3 (Adaptado de las referencias 35 y 36).^{35,36}

Adicionalmente, en la Figura 7 se pueden observar las estructuras moleculares de los compuestos GdR_{4-11} , los cuales poseen cadenas de péptidos, que los llevan a formar arreglos micelares e incrementar su relaxividad longitudinal en comparación a sus estructuras individuales (Tabla 3). Se observó que dicha tendencia varía en algunos compuestos, dependiendo de si se encuentran en agua o suero sanguíneo, ya que, en este último, ciertas

proteínas presentes como la albúmina, pueden interactuar con el Gd e interferir con su capacidad de formar micelas.³⁷

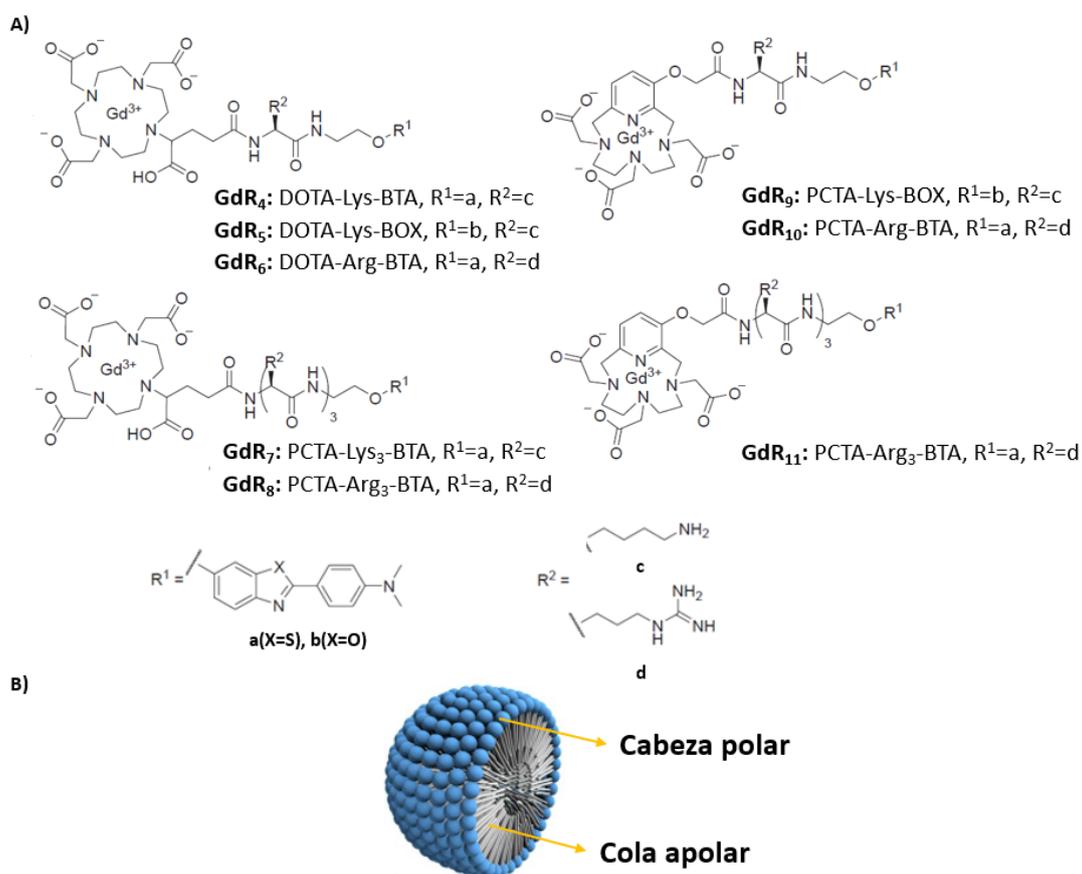


Figura 7: Estructuras moleculares de GdR₄₋₁₁. En A) se pueden observar las estructuras moleculares de GdR₄₋₁₁ y en B) se puede observar la representación de una estructura micelar (Adaptado de las referencias 37 y 38).^{37,38}

Tabla 3: Relaxividades longitudinales de GdR₄₋₁₁ en agua y en suero sanguíneo (Adaptado de la referencia 37).³⁷

	r₁ monomérica en agua (mM⁻¹s⁻¹)	r₁ micelar en agua (mM⁻¹s⁻¹)	r₁ monomérica en suero (mM⁻¹s⁻¹)	r₁ micelar en suero (mM⁻¹s⁻¹)
GdR₄	8.1	14.5	16.4	-
GdR₅	7.8	11.3	14.0	-
GdR₆	8.0	16.5	17.2	-
GdR₇	8.6	12.2	13.5	-
GdR₈	7.1	10.5	5.7	10.7
GdR₉	12.3	-	21.7	-
GdR₁₀	11.8	17.4	22.9	-
GdR₁₁	11.7	-	9.0	10.5

En resumen, los agentes de contraste de Gd poseen una amplia gama de variantes con diferentes características y propiedades. Se propone que el compuesto GdR₁ es capaz de identificar los agregados A β por medio de interacciones indirectas,³³ mientras que GdR₂ y GdR₃ lo hacen por contacto directo con las placas.^{34,35} Por otro lado, a diferencia de GdR₁ y GdR₂, las moléculas GdR₃₋₁₁ son capaces de interactuar entre sí para generar distintos arreglos estructurales (liposomales o micelares) que incrementan los valores de r₁ de cada uno de los compuestos en comparación a su forma individual.^{35,37} A partir de estos ejemplos se puede apreciar que todas las moléculas de Gd poseen distintas propiedades fisicoquímicas, las cuales les permiten interactuar con los agregados A β y producir imágenes MRI empleadas para la identificación de solidificaciones peptídicas.

3.1.2. Nanopartículas de óxidos de hierro

Las nanopartículas de óxidos de hierro son materiales superparamagnéticos con distintas aplicaciones biomédicas, debido a las características y propiedades que poseen. Dichas propiedades están definidas por el tamaño de partícula, superficie y morfología presente en la estructura de la nanopartícula.³⁹ Debido a sus propiedades magnéticas, estos materiales pueden ser utilizados como agentes de contraste en MRI, que generalmente son empleados para reducir T₂ y generar un contraste oscuro en la imagen adquirida.³¹ Factores como la superficie promueven que las nanopartículas interactúen específicamente con proteínas, macrófagos y células.³¹ El objetivo es obtener nanopartículas de óxidos de hierro que permitan recopilar imágenes MRI de calidad, en donde sea posible diferenciar los agregados A β del resto de tejidos cerebrales.

Las propiedades de las nanopartículas de hierro motivaron a distintos investigadores a sintetizar distintos ligandos y conjugarlos con dichas nanopartículas, dando lugar a FeL¹, FeL² y FeL³, los cuales poseían distintas propiedades y características que les permitían identificar

a los agregados A β en imágenes MRI.⁴⁰⁻⁴² Las nanopartículas de FeL¹ consisten en una mezcla de Fe₂O₃ y Fe₃O₄ cubiertas con el polisacárido Dextrano T-10,⁴⁰ mientras que, FeL² se compone de nanopartículas de óxidos de hierro cubiertas por la molécula 1,1-diciano-2-[6-(dimetilamino)-naftalen-2-il].⁴¹ En la Figura 8 se pueden observar las imágenes MRI recolectadas a través del uso de FeL¹ y FeL², en dichas imágenes se pueden apreciar distintos puntos negros correspondientes a las placas A β , que están distribuidos alrededor de todo el tejido cerebral de los ratones transgénicos. En este caso se sugiere que los compuestos FeL¹ y FeL² interactúan con los agregados A β , dotándolos de un contraste muy oscuro, producto de una reducción del tiempo de relajación T₂, produciendo los puntos negros vistos en la imagen.^{40,41}

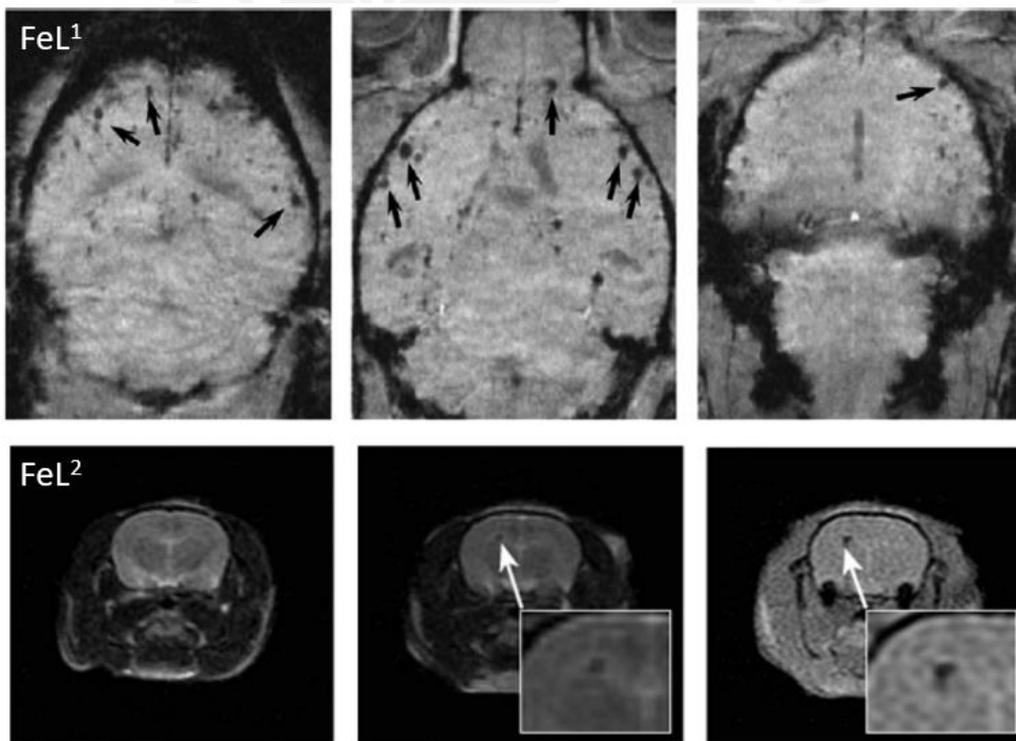


Figura 8: Imágenes obtenidas por MRI a partir del uso de FeL¹ y FeL² (Adaptado de las referencias 40 y 41).^{40,41}

Adicionalmente, es importante mencionar que a diferencia de FeL², FeL¹ no posee ningún grupo selector de los agregados A β . Sin embargo, los autores proponen que FeL¹ es capaz de ingresar en el interior de las células macrófagas por medio de un proceso de

endocitosis absorptiva; y después dichas células son capaces de distribuirse en las zonas cerebrales afectadas por la neurodegeneración, posibilitando que FeL¹ entre en contacto con A β y permita su identificación.⁴⁰

Por otro lado, las nanopartículas FeL³ (Figura 9A) se componen de un núcleo de Fe₃O₄ acoplado con un derivado de la molécula PEG.⁴² Estas son capaces de producir imágenes MRI, en las cuales se pueden apreciar los agregados A β (puntos negros) distribuidos alrededor del tejido cerebral de ratones transgénicos (Figuras 9B y 9C).⁴² Por otro lado, FeL³ también es capaz de emitir señales fluorescentes que permiten la identificación de las placas A β presentes en el tejido cerebral de ratones (Figuras 9D y 9E).⁴² Se puede apreciar que en la Figura 9D la intensidad de señal es mayor a la Figura 9E, ya que en esta última los sujetos de prueba son ratones sanos sin concentraciones altas de A β , mientras que en la primera se tienen ratones transgénicos con altas concentraciones de agregados, lo cual genera que FeL³ se les adhiera y permita identificarlos.⁴²

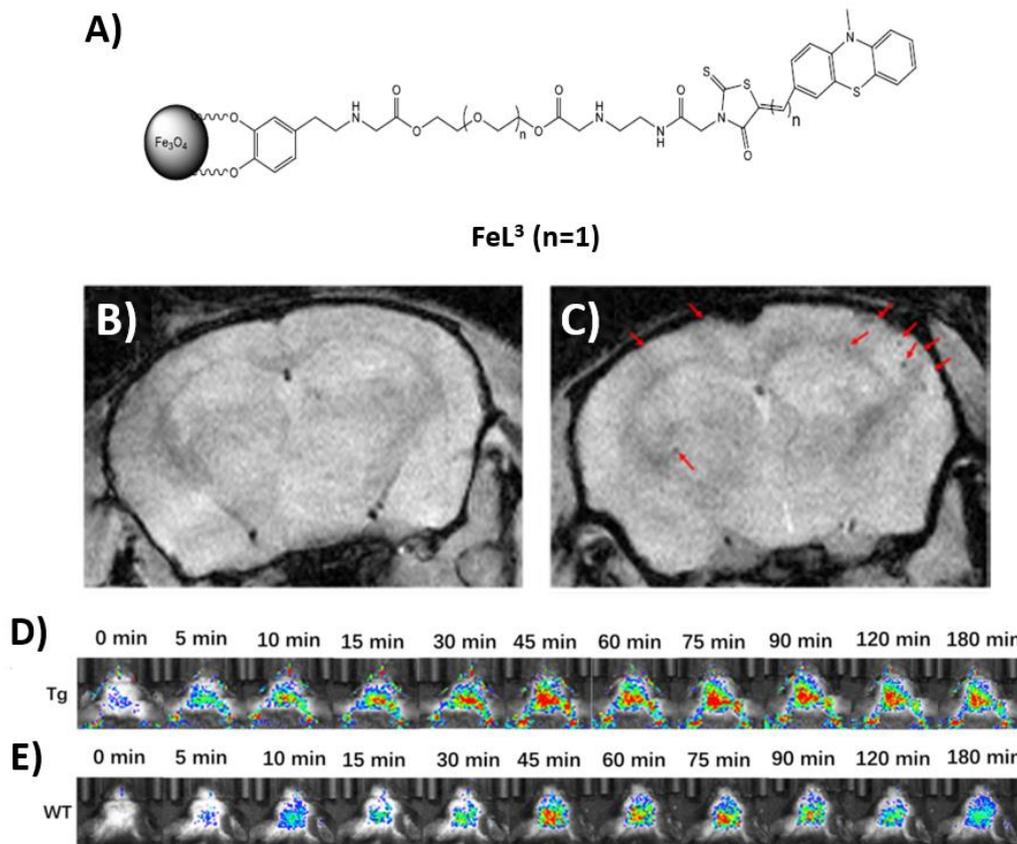


Figura 9: Imágenes cerebrales de FeL³ obtenidas por MRI y fluorescencia. En A) se puede observar la estructura molecular de FeL³, en B) y C) se pueden observar las imágenes cerebrales obtenidas con FeL³, en D) se pueden apreciar las imágenes cerebrales de ratones transgénicos obtenidas por fluorescencia con FeL³ y en E) se pueden apreciar las imágenes cerebrales de ratones sanos obtenidas por fluorescencia con FeL³ (Adaptado de la referencia 42).⁴²

Los agentes de diagnóstico y tratamiento son compuestos que permiten detectar y curar una enfermedad, respectivamente, mientras que, los agentes teranósticos son moléculas que pueden realizar estas dos funciones al mismo tiempo. Como ya fue discutido, FeL³ es capaz de identificar las placas Aβ presentes en el tejido cerebral de ratones transgénicos, pero, dicho compuesto también tiene cierta actividad terapéutica, lo cual lo convierte en un agente teranóstico. En la Figura 10A, se pueden observar los resultados de una prueba realizada con un cultivo celular en presencia de agregados Aβ. Se puede apreciar que la presencia de FeL³ reduce la toxicidad de Aβ y, además, permite que las células afectadas por la deposición de agregados retomen un comportamiento similar al de un cultivo celular sano tomado como punto de control.⁴² De igual manera, en la Figura 10B, se pueden ver una serie de proteínas

involucradas en el proceso de apoptosis celular, las cuales se desregulan frente a la presencia de agregados A β . Sin embargo, al tratar dichos cultivos con FeL³, todas las proteínas reducen su desregulación, acercándose al estado inicial de control. Ambas pruebas indican que FeL³ tiene cierta capacidad protectora frente a A β , lo cual evidencia que el compuesto tiene cierta capacidad terapéutica.⁴²

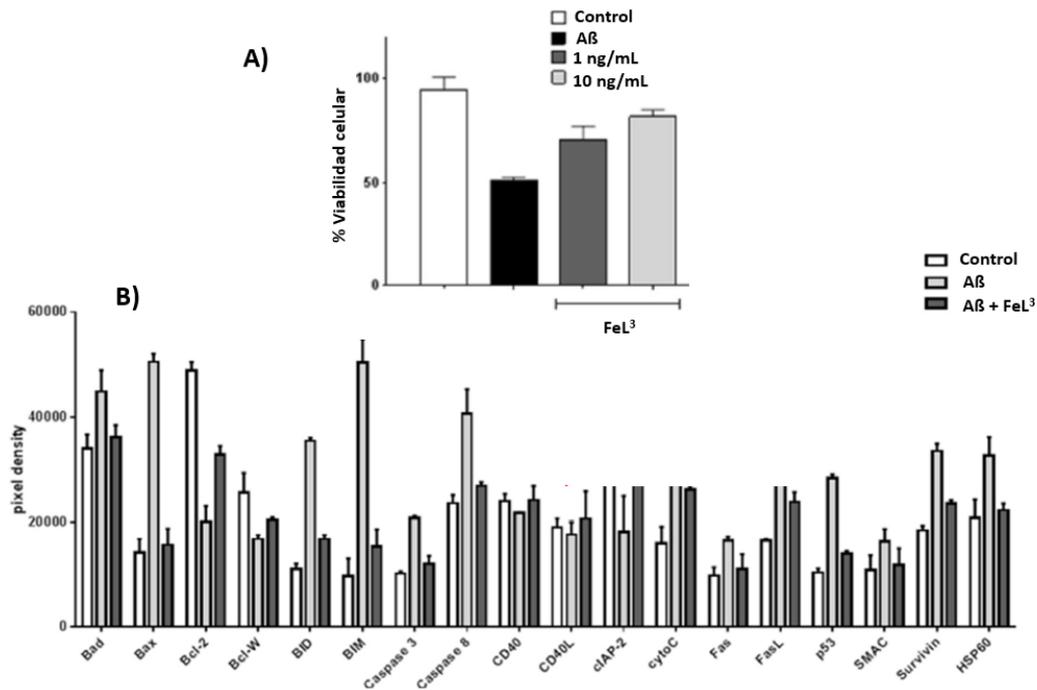


Figura 10: Gráficos de las pruebas realizadas para determinar la capacidad de FeL³ como agente terapéutico. En A) se puede observar un gráfico que indica la viabilidad de un cultivo celular en presencia de agregados A β y FeL³. Por otro lado, en B) se observa un gráfico el cual muestra el comportamiento de distintas proteínas en presencia de una alta concentración de agregados A β y de FeL³ (Adaptado de la referencia 42).⁴²

En resumen, las moléculas FeL¹⁻³ son capaces de generar imágenes MRI, en las cuales es posible distinguir los agregados A β presentes en el tejido cerebral de ratones transgénicos. Sin embargo, los compuestos FeL¹ y FeL² presentan únicamente propiedades de diagnóstico, mientras que FeL³ tiene además cierta actividad terapéutica que lo convierte en un agente teranóstico. De igual manera, las nanopartículas de FeL³ son capaces de identificar a los agregados A β por medio de MRI y fluorescencia, lo cual lo convierte en un agente de contraste

mucho más eficaz y prometedor en comparación a FeL^1 y FeL^2 que solo son capaces de producir imágenes por medio de MRI.

Se puede concluir que, los agentes de contraste hechos a base de Gd y Fe presentan propiedades magnéticas muy útiles que permiten la recopilación de imágenes cerebrales mediante la técnica de MRI. Asimismo, se recomienda seguir explorando el uso de otros metales paramagnéticos en la síntesis de nuevos compuestos aplicados al diagnóstico del Alzheimer, con el objetivo de producir imágenes con un contraste mucho más pronunciado.

3.2. Tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT)

El SPECT es una técnica de imagen no invasiva, la cual es utilizada para recolectar imágenes de distintos órganos y obtener información respecto a la actividad metabólica de los mismos. SPECT se basa en inyectar al paciente un radiofármaco afín a las formaciones $\text{A}\beta$ del cerebro. Posteriormente, la molécula se descompone por emisión de rayos gamma y genera fotones de 364 keV, que son detectados por detectores de cristales de centelleo⁴³ y permiten la reconstrucción de una imagen cerebral, en la cual se identifican las zonas de grandes concentraciones $\text{A}\beta$ (Figura 11).⁴⁴

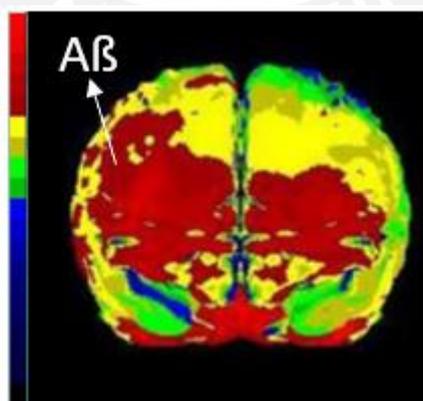


Figura 11: Imagen cerebral de un paciente con Alzheimer recopilada por SPECT (Adaptado de la referencia 45).⁴⁵

A partir del uso de SPECT es posible recopilar imágenes cerebrales, que proveen información de distintas patologías y también permiten realizar un seguimiento de sustancias como la dopamina o glucosa, muchas veces asociadas a enfermedades neurodegenerativas.⁴⁶ El objetivo de este apartado es evaluar la efectividad de distintos radiocompuestos de tecnecio investigados para el diagnóstico del Alzheimer por medio de la identificación de agregados A β .

3.2.1. Tecnecio-99m

El tecnecio es un metal de transición de número atómico 43 que posee un isótopo radioactivo (^{99m}Tc), el cual tiene un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 6 horas y se descompone por emisión de rayos gamma de 140 keV.⁴⁷ Dicho metal es ampliamente utilizado en la técnica de SPECT, ya que su tiempo de vida media es lo suficientemente largo como para generar los análisis de diagnóstico, sin el peligro a que el radionúcleo se desintegre antes de la recopilación de imagen.⁴⁷ De igual manera, este metal es utilizado para la producción de kits de diagnóstico, los cuales están diseñados para sintetizar al radiofármaco mediante una única reacción de complejación, que suele ser muy sencilla y puede ser realizada por el personal médico del centro de salud. En la Figura 12 se puede ver un esquema que describe la obtención de ^{99m}Tc a partir de ^{99}Mo ; este último es un isótopo inestable, que al descomponerse produce ^{99m}Tc en un dispositivo conocido como “generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ”.⁴⁸ Dicho proceso de obtención es diferente al del ^{11}C y ^{18}F , ya que estos dos son obtenidos por medio de la aceleración de partículas en un ciclotrón médico.

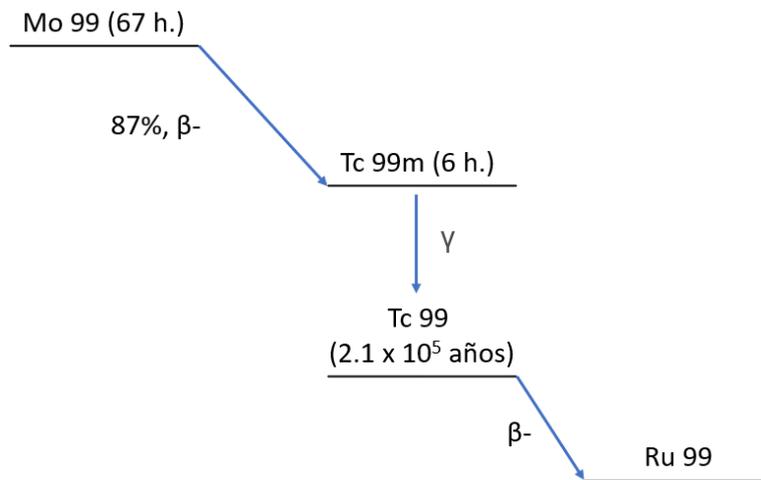


Figura 12: Esquema de la descomposición del ^{99}Mo en $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Adaptado de la referencia 48).⁴⁸

La gran capacidad del Tc para producir imágenes por medio de SPECT motivó a distintos investigadores a sintetizar diversas moléculas, TcOL¹⁻⁷ (Figura 13),^{47,49,50} las cuales resaltan por sus distintas características relacionadas a la biodistribución cerebral y afinidad por las formaciones A β .

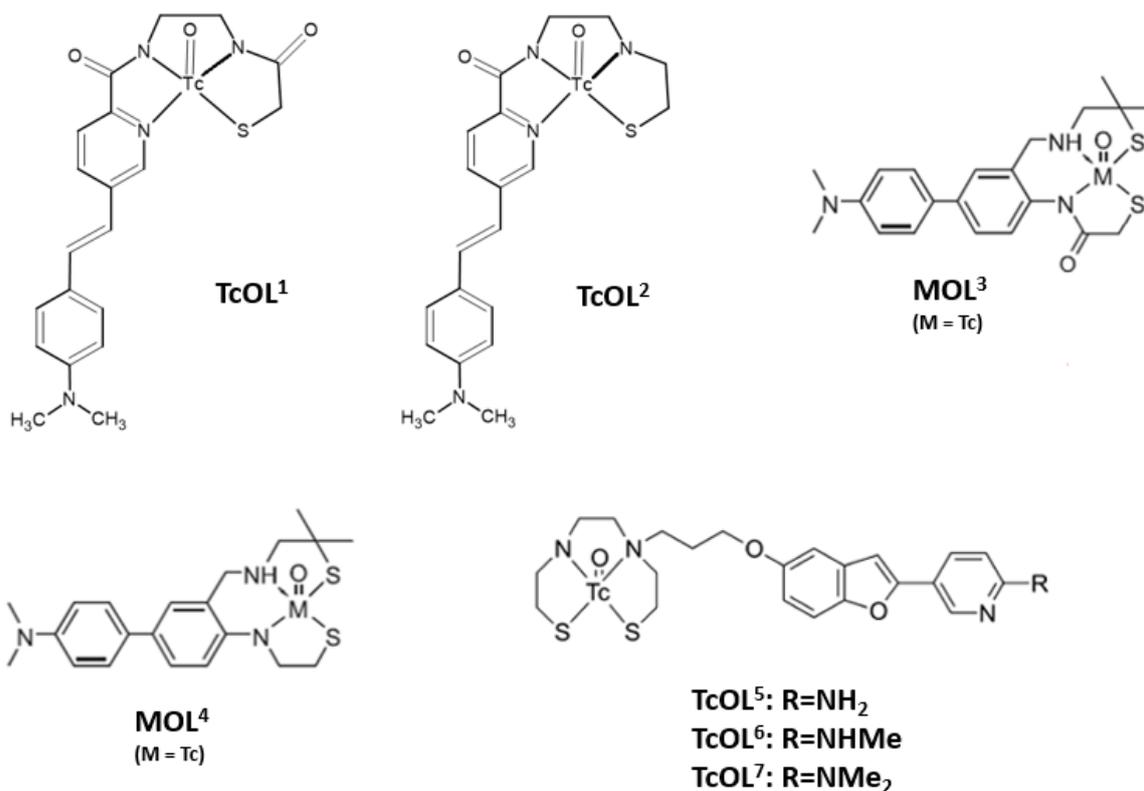


Figura 13: Estructuras moleculares de los compuestos TcOL¹, TcOL², MOL³, MOL⁴, TcOL⁵, TcOL⁶ y TcOL⁷ (Adaptado de las referencias 47, 49 y 50).^{47,49,50}

Los estudios de biodistribución de estos compuestos se realizaron en ratones sanos para evaluar la facilidad con la que estos se distribuyen en organismos biológicos. En la Tabla 4, se pueden observar los valores de porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g) de TcOL¹⁻⁷, los cuales indican la asimilación que el cerebro tiene respecto a cada una de las moléculas. Idealmente, para producir una imagen de buena calidad se debería obtener un 4.0 %ID/g a los 2 minutos postinyección (mpi), sin embargo valores de hasta 1.0 %ID/g son aceptables debido a que estas moléculas siguen en una fase de investigación.⁵¹

Los compuestos TcOL⁴⁻⁷ obtuvieron mejores resultados de asimilación cerebral a los 2 mpi, tal y cómo puede observarse en la tabla. En esta se puede apreciar que, entre los compuestos TcOL¹ y TcOL², que solo se diferencian por la ausencia de un grupo amida en este último, el TcOL² muestra una mejor permeabilidad a través de la BBB.⁴⁷ Dicho fenómeno

también se observa entre TcOL³ y TcOL⁴, ya que se tienen estructuras análogas, en las cuales la ausencia de un grupo amida incrementa la asimilación cerebral.⁴⁹ Esto, se cree, es debido a que la presencia de grupos amida promueve la formación de enlaces de hidrógeno con moléculas de agua, y dicha interacción incrementa la hidrofiliidad y el tamaño de los compuestos empeorando la permeabilidad a través de la BBB, tal y como se puede apreciar en la Figura 14.⁴⁷ Por otro lado, en las estructuras de TcOL⁵⁻⁷ se observa que la permeabilidad a través de BBB es mayor cuando el sustituyente R es igual a NHMe, en comparación a NH₂ y NMe₂.⁵⁰ Se sugiere que NHMe dota a la molécula TcOL⁶ de la lipofiliidad y tamaño ideal para atravesar BBB. De igual manera, las asimilaciones de TcOL⁵⁻⁷ sugieren que la estructura base de estas moléculas es mucho más permeable a través de la BBB que TcOL¹⁻⁴.

Tabla 4: Resultados de biodistribución de los compuestos de Tc-99m discutidos en este trabajo (Adaptado de las referencias 47, 49 y 50).^{47,49,50}

	Moléculas	Grupos amida	%ID/g a los 2 mpi	%ID/g a los 30 mpi	%ID/g a los 60 mpi
Referencia	TcOL ¹	2	0.15	0.17 ^a	-
47	TcOL ²	1	0.36	0.15 ^a	-
Referencia	TcOL ³	1	0.29	0.20	0.19
49	TcOL ⁴	0	1.18	0.89	0.46
Referencia	TcOL ⁵	0	1.59	0.89	0.97
50	TcOL ⁶	0	1.80	0.99	0.79
	TcOL ⁷	0	1.41	1.08	0.79

a= datos tomados a los 35 mpi.

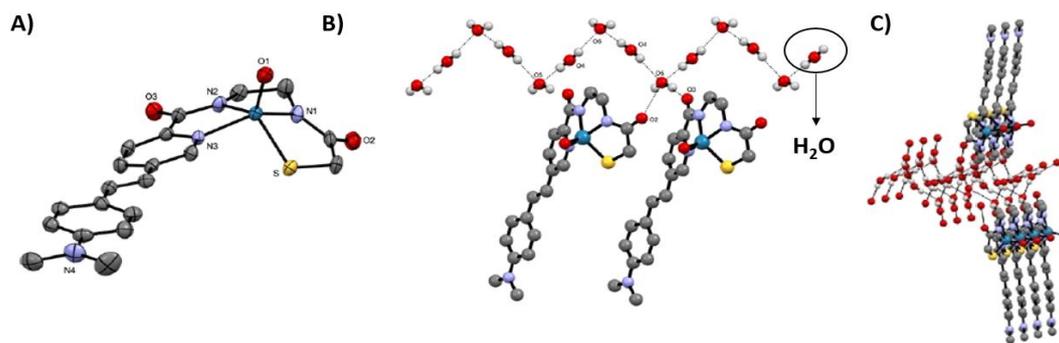


Figura 14: Representación tridimensional de TcOL¹ y sus interacciones intermoleculares con el agua. En A) se observa la estructura de la molécula TcOL¹; en B) y C) se aprecian las conformaciones estructurales que TcOL¹ mantiene con las moléculas de agua (Adaptado de la referencia 47).⁴⁷

Por otro lado, con respecto a la afinidad de las moléculas por A β , TcOL⁴ y TcOL⁶ resaltaron por su capacidad de recopilar imágenes a través de pruebas de autorradiografía, en las cuales fue posible identificar las zonas afectadas por los agregados (Figura 15).^{49,50} Es importante mencionar que TcOL⁴ y TcOL⁶ no son estructuras análogas entre sí, sino más bien son compuestos que presentan diferencias estructurales relativamente marcadas. Por ello, el corroborar que ambos son capaces de adherirse e identificar a los agregados A β permite concluir que, si bien la afinidad hacia los péptidos está relacionada a una serie de condiciones, estas últimas engloban a una amplia gama de estructuras moleculares, las cuales no necesariamente deben ser idénticas o muy parecidas entre sí.

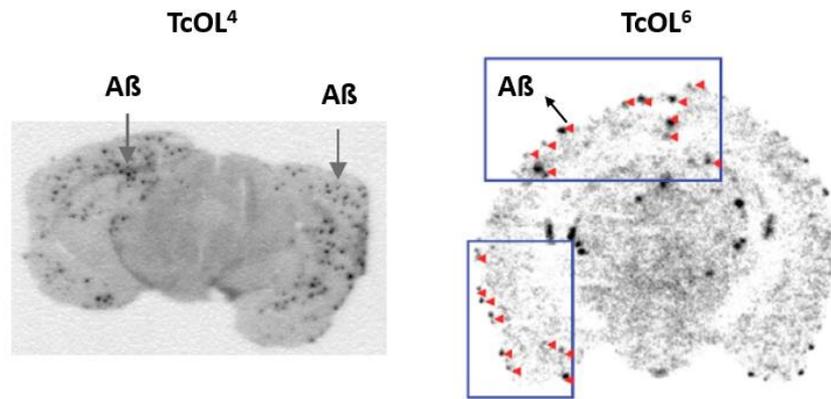


Figura 15: Imágenes recopiladas por autorradiografía del tejido cerebral de ratones transgénicos haciendo uso de TcOL⁴ y TcOL⁶ (Adaptado de las referencias 49 y 50).^{49,50}

En resumen, los compuestos de Tc presentan una propuesta interesante para el diagnóstico por imagen del Alzheimer por medio de la técnica SPECT. Los estudios realizados en las pruebas de biodistribución sugieren que las interacciones de puente de hidrógeno entre agentes de contraste y moléculas de agua son capaces de reducir la permeabilidad a través de la BBB, debido a un aumento en la hidrofiliidad y tamaño. Por otro lado, la afinidad Aβ puede ser alcanzada mediante distintas combinaciones estructurales que cumplan con la condición de generar interacciones del tipo π - π en la zona hidrofóbica de los agregados Aβ. Por último, si bien el ^{99m}Tc es uno de los metales más investigados para el diagnóstico del Alzheimer por SPECT, el ¹¹¹In es otro elemento menos explorado que puede ser usado como alternativa extra al ^{99m}Tc en investigaciones futuras.⁵²

3.3. Tomografía por emisión de positrones (PET)

El último método de diagnóstico, y también el más ampliamente utilizado para la detección de las placas Aβ, es la técnica de imagen PET. Esta funciona bajo el concepto de la emisión de positrones, que plantea que existen radioisótopos inestables que tienden a desintegrarse y emitir positrones, los cuales al entrar en contacto con un electrón, se convierten en dos fotones de 511 keV.²² Estos pueden ser captados por detectores de cristales de

centelleo⁵³ que, por medio de un software especializado, pueden identificar la posición de donde provino cada grupo de fotones.²² Por ello, uno de los métodos para diagnosticar el Alzheimer por medio de PET es sintetizar una radiomolécula muy afín a interactuar con las placas A β , la cual es inyectada por vía intravenosa y se adhiere a los agregados presentes en el cerebro para, posteriormente, emitir señales que son detectadas y permiten reconstruir una imagen cerebral, en donde los agregados A β resaltan respecto al resto de tejidos (Figura 2).²²

Como se mencionó anteriormente, los radioisótopos más utilizados para la toma de imagen por PET son el ¹¹C y el ¹⁸F, los cuales dado a su corto tiempo de vida media tienden a desintegrarse muy rápido. Dicho problema ha impulsado la exploración de radionúcleos alternativos con $t_{1/2}$ mayores. Por ello, diversos autores han propuesto el empleo de radioisótopos como el ⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga y ⁸⁹Zr como radionúcleos de moléculas para el diagnóstico del Alzheimer por PET.⁵² A continuación se describirán algunos de los compuestos con estos metales que han sido reportados en la literatura para esta aplicación.

3.3.1. Cobre-64

El cobre es un metal de transición de número atómico 29, que posee una gran cantidad de isótopos emisores de positrones como el ⁶⁰Cu, ⁶¹Cu, ⁶²Cu y ⁶⁴Cu, los cuales tienen $t_{1/2}$ de 20 minutos, 3.4 horas, 9.7 minutos y 12.7 horas, respectivamente.⁵⁴ Naturalmente, el isótopo más prometedor para ser usado en PET es el ⁶⁴Cu, ya que al tener un $t_{1/2}$ de casi 13 horas solucionaría muchos de los problemas del ¹¹C y ¹⁸F mencionados anteriormente.⁵⁵ Para lograr la síntesis de un radiofármaco de ⁶⁴Cu es indispensable el uso de un agente quelante que cumpla con ciertas características, como la capacidad de mantener quelado al Cu⁺² en un ambiente fisiológico, la facilidad para atravesar la barrera hematoencefálica, y la afinidad por los agregados A β presentes en el cerebro.^{54,56}

El ligando bis-tiosemicarbazona (atsm) es capaz de quelar al cobre para formar el compuesto Cu(atsm) (Figura 16), el cual ha sido investigado para la producción de imágenes de tumores de cuello y cabeza por medio de PET. Esta molécula presenta resultados prometedores, ya que es capaz de atravesar parcialmente la BBB y generar imágenes de diagnóstico de buena calidad.^{26,54} Por ello, McInnes y colaboradores, decidieron utilizar la estructura base de esta molécula para sintetizar derivados que se adhieran selectivamente a los agregados A β , sin perder la afinidad que ha demostrado por el Cu⁺², ni la capacidad que tiene para atravesar la barrera BBB.⁵⁴

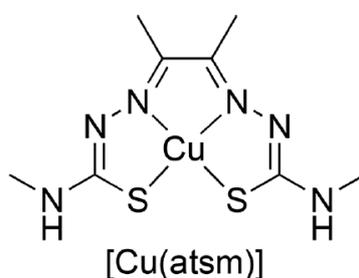


Figura 16: Estructura molecular del Cu(atsm) (Adaptado de la referencia 54).⁵⁴

En la Figura 17, se pueden observar tres complejos derivados del Cu(atsm), a los cuales se les ha agregado un grupo funcional benzofurano que dota a las moléculas de la capacidad de adherirse a los agregados peptídicos A β .⁵⁴ De igual manera, se modificó el esqueleto tiosemicarbazona con distintos grupos alquilo R, que alteran el tamaño de la molécula, y, en consecuencia, afectan la capacidad que esta tiene para atravesar la barrera BBB.

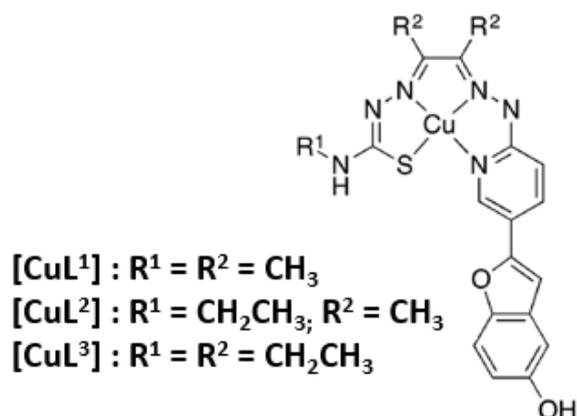


Figura 17: Estructuras moleculares del CuL¹, CuL² y CuL³ (Adaptado de la referencia 54).⁵⁴

En la Tabla 5, se presentan los coeficientes de las reacciones de disociación de los ligandos de las moléculas CuL¹, CuL² y CuL³ en presencia de EDTA y albúmina (una proteína quelante del Cu⁺² que está presente en el suero sanguíneo). Como se puede apreciar, dichos coeficientes están en un orden de 10⁻¹⁸ a un pH de 7.4.⁵⁴ Estos valores demuestran la estabilidad que estas moléculas poseen en condiciones fisiológicas y en presencia de agentes quelantes del Cu⁺². A su vez, es importante que los núcleos de cobre no sean activos en reacciones redox, ya que la formación de Cu⁺ podría implicar la separación del metal respecto del ligando. Por ello, en dicho estudio se realizaron pruebas de voltametría, que permitieron determinar que el potencial de reducción de todos los núcleos de Cu⁺², en sus ligandos respectivos, es de aproximadamente -1.16 V, lo cual indica que la reducción del cobre es improbable en un ambiente fisiológico.⁵⁴

El coeficiente de distribución (Log D) indica la lipofilidad de una molécula y señala su capacidad para atravesar la BBB, ya que, como se mencionó anteriormente, esta barrera es muy selectiva respecto a dos características moleculares: la lipofilidad y el tamaño. Idealmente un Log D en el rango de 0.9 a 2.5 indica cierta permeabilidad a través de la BBB,⁵⁷ y en este caso, tal y como se puede observar en la Tabla 5, todas las moléculas sintetizadas por McInnes

presentaron resultados dentro de este intervalo, sugiriendo que todos estos compuestos serán capaces de atravesar efectivamente la BBB, al igual que el compuesto original Cu(atm) que tiene un Log D de 1.73.⁵⁴

Tabla 5: Coeficientes de reacción y de distribución de las moléculas sintetizadas por McInnes y colaboradores a un pH de 7.4 (Adaptado de la referencia 54).⁵⁴

	Coeficientes de disociación (x10⁻¹⁸)	Log D
CuL¹	3.9	1.84
CuL²	2.7	1.81
CuL³	1.3	1.48

Se realizaron pruebas de biodistribución, con el objetivo de determinar la asimilación cerebral que CuL¹⁻³ presentaban en los organismos de ratones sanos (Tabla 6). En este caso, todas las moléculas sintetizadas por McInnes y colaboradores obtuvieron valores mayores al 1.0 %ID/g a los 2 mpi superando incluso la asimilación obtenida por la molécula Cu(atm), siendo CuL³ la que obtuvo un porcentaje de asimilación mayor. Por otro lado, teniendo en cuenta que estas pruebas fueron realizadas en ratones sanos, sin concentraciones altas de A β , se espera que los compuestos CuL^{1,2y3}, al no tener agregados a los cuales adherirse, se eliminen lo más rápido posible del organismo, que es exactamente lo que sucede, ya que a los 30 mpi se puede observar que todas las moléculas disminuyen radicalmente su %ID/g. Se sugiere que el incremento de asimilación cerebral de los compuestos de McInnes y colaboradores respecto a la molécula base de Cu(atm), se debe a que la presencia de los sustituyentes R y el benzofurano mejoran la permeabilidad a través de la BBB, posiblemente debido al incremento de tamaño.⁵⁴

Tabla 6: Resultados de biodistribución de los compuestos de Cu-64 discutidos en este trabajo (Adaptado de las referencias 54, 56, 58 y 59).^{54,56,58,59}

	Moléculas	%ID/g a los 2 mpi	%ID/g a los 30 mpi	%ID/g a los 60 mpi
Referencia 54	Cu(atsm)	0.9	-	-
	CuL ¹	1.39	1.06	-
	CuL ²	1.06	0.49	-
	CuL ³	1.54	0.77	-
Referencia 56	CuL ⁴	2.2	-	0.32
	CuL ⁵	1.1	-	0.22
Referencia 58	CuL ⁶	0.36	-	0.04
	CuL ⁷	0.46	-	0.14
	CuL ⁸	0.23	-	0.02
Referencia 59	CuL ⁹	0.76	-	0.35
	CuL ¹⁰	0.38	-	0.13
	CuL ¹¹	0.83	-	0.27

Posteriormente, McInnes y colaboradores continuaron estudiando a la molécula CuL³ para determinar la afinidad que esta tiene por las placas A β . En este trabajo se trató tejido cerebral humano de pacientes de Alzheimer con el anticuerpo 1E8, el cual es capaz de adherirse y teñir de color rojo a los agregados A β presentes, permitiendo su identificación. De igual manera se utilizó la técnica de estudio de espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo por ablación con láser (LA-ICP-MS) para determinar la relación de ⁶⁵Cu/⁶³Cu vigente en las muestras, la cual idealmente debe ser de 0.46.⁵⁴ Posteriormente, se trataron los tejidos con ⁶⁵CuL³ y luego se midió, nuevamente, la relación ⁶⁵Cu/⁶³Cu, en donde se observó un incremento a 2.71 y 1.89 en las secciones de materia gris (GM) y blanca (WM), respectivamente, lo cual se atribuye a que la molécula de cobre, marcada con ⁶⁵Cu, se adhiere a las placas A β presentes en la GM y WM, aumentando en consecuencia la razón ⁶⁵Cu/⁶³Cu. En las Figuras 18A y 18B se pueden observar las zonas tratadas con 1E8, en donde los puntos rojos representan la presencia de agregados A β . Por otro lado, la Figura 18C muestra el contenido de ³¹P en la muestra, que permite diferenciar las zonas de GM y WM. Adicionalmente, la Figura 18D muestra el contenido de ⁶⁵Cu/⁶³Cu en tejido sin tratamiento de ⁶⁵CuL³, mientras que en las Figuras 18E y 18F se observan los tejidos tratados con ⁶⁵CuL³ de

un paciente sano y de otro con Alzheimer, respectivamente. En este último se ve que efectivamente el compuesto de cobre se adhiere a los agregados A β presentes, ya que coincide con lo visto en la Figura 18A. De igual manera, en las muestras de tejido sano (Figura 18E) se observa poca concentración de ^{65}Cu , debido a que el $^{65}\text{CuL}^3$ no tiene agregados A β a los cuales adherirse.⁵⁴

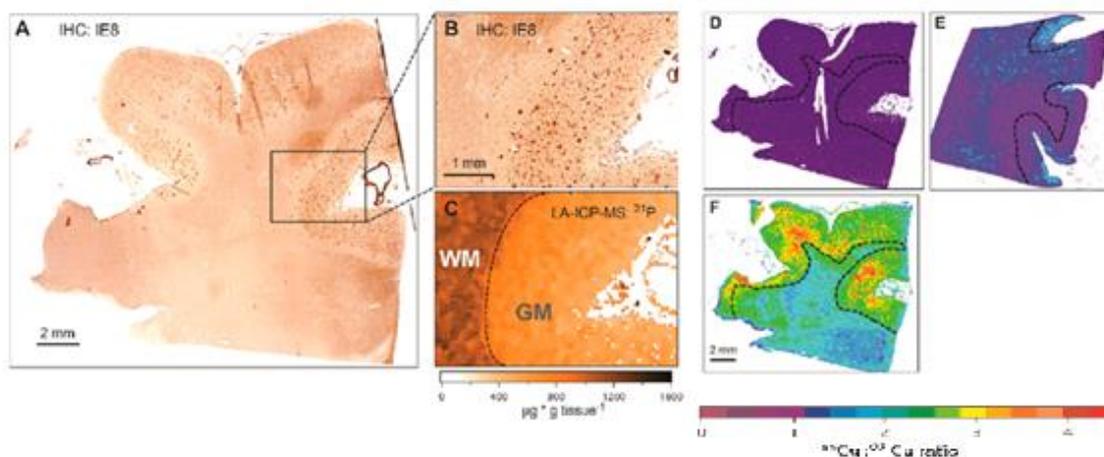
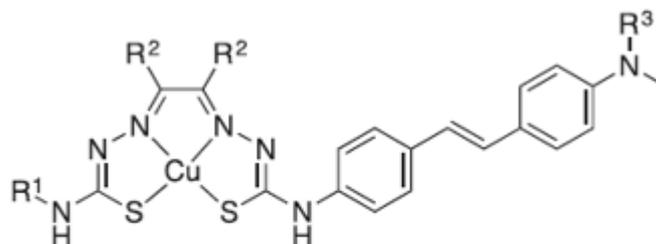


Figura 18: Imágenes adquiridas con LA-ICP-MS y microscopía haciendo uso de CuL^3 en tejido cerebral. En A) y B) se observa el tejido cerebral tratado con IE8; en C) se puede ver la zona de materia gris y blanca; en D) se aprecia la concentración natural de $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$; en E) se observa el tejido sano tratado con $^{65}\text{CuL}^3$; y en F) se puede ver el tejido dañado por A β tratado con $^{65}\text{CuL}^3$ (Adaptado de la referencia 54).⁵⁴

De acuerdo con el trabajo de McInnes y colaboradores, se puede afirmar que la molécula CuL^3 es capaz de adherirse selectivamente a las placas A β presentes en el tejido cerebral humano. De igual manera, este compuesto posee la mejor asimilación cerebral de todas las moléculas sintetizadas por McInnes y colaboradores.⁵⁴ Se presume que esta capacidad para atravesar la BBB radica en los sustituyentes $\text{R} = \text{CH}_2\text{CH}_3$, los cuales al ser ligeramente más largos y lipofílicos que los sustituyentes metilo presentes en CuL^1 y CuL^2 , permiten que CuL^3 atraviese BBB con mayor facilidad.⁵⁴

En otro estudio realizado por Noor y colaboradores, se optó por seguir investigando a derivados del $\text{Cu}(\text{atsm})$ como agentes de diagnóstico PET, sin embargo, se empleó al estilbenu en vez del benzofurano como grupo enlazante a las placas A β .⁵⁸ En la Figura 19 se pueden ver

dos de las moléculas sintetizadas por Noor, las cuales poseen cuatro grupos sustituyentes R, a diferencia de las de McInnes que poseen tres.⁵⁸



[CuL⁴]: R¹ = R² = R³ = CH₃

[CuL⁵]: R¹ = R² = CH₂CH₃; R³ = CH₃

Figura 19: Estructuras moleculares de CuL⁴ y CuL⁵ (Adaptado de la referencia 58).⁵⁸

Estos complejos también presentaron estabilidad redox, evidenciada por un potencial de reducción de, aproximadamente, -1.16 V en ambos casos, al igual que los compuestos de McInnes. De igual manera, CuL⁴ y CuL⁵ tienen coeficientes de distribución (Log D) de 1.61 y 1.56 a pH 7.4, respectivamente, valores que sugieren la capacidad de estos compuestos para atravesar la barrera BBB.⁵⁸

En la Tabla 6, se pueden ver los resultados de los estudios de biodistribución de CuL⁴ y CuL⁵ realizados en ratones sanos. Los valores a los 2 mpi muestran que ambas moléculas poseen mejores resultados a los obtenidos por la molécula base de Cu(atSm). En concreto, el complejo CuL⁴ es el que presenta mayor facilidad de atravesar la BBB, de igual manera, debido a que los ratones sanos no poseen grandes concentraciones de A β , se espera que los compuestos se limpien rápidamente del cerebro, tal y como se observa en los resultados medidos a los 60 mpi.⁵⁸

Para estos compuestos se realizaron pruebas *ex vivo* en tejidos cerebrales de pacientes de AD empleando el compuesto Tioflavina T (ThT), un tinte fluorescente muy selectivo de los

agregados A β . De esta forma, mediante los exámenes de fluorescencia se pudieron identificar las zonas del tejido afectadas.⁵⁸ Posteriormente, se trataron los mismos tejidos con CuL⁴ y CuL⁵, lo cual redujo la fluorescencia emitida de la ThT en un 40 y 27%, respectivamente. Se sugiere que los compuestos en investigación reemplazan las moléculas de ThT adheridas a A β , lo cual reduce la luz emitida y, en consecuencia, indica la selectividad de las moléculas de cobre por los agregados frente a la ThT. De igual manera, se realizaron pruebas de fluorescencia en las cuales se trataron tejidos cerebrales con 1E8 y con las moléculas en investigación tanto en tejido afectado por A β (Figura 20a) como en tejido sano (Figura 20b). Con ello se observó que, efectivamente, los compuestos y el anticuerpo 1E8 se adhieren a las mismas zonas en el tejido dañado y a ninguna en la muestra sana, comprobando la afinidad de los complejos por las placas A β .⁵⁸

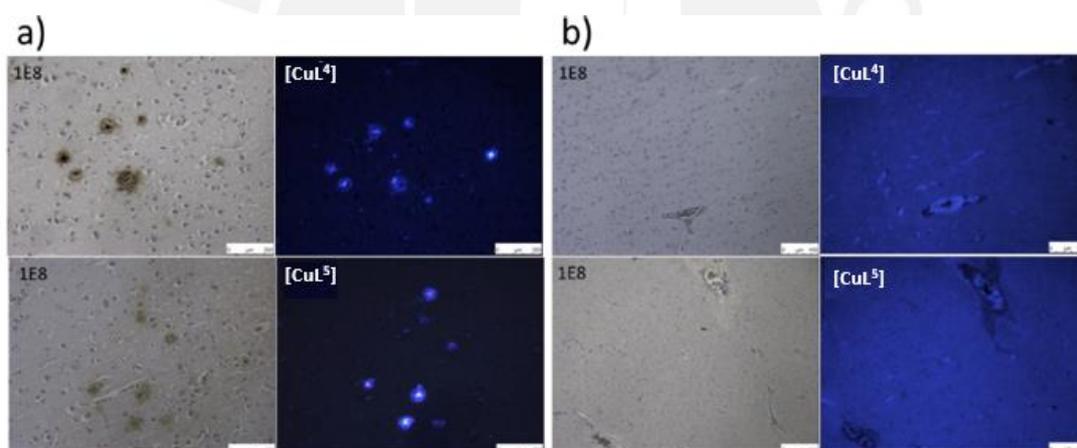


Figura 20: Imágenes de tejido cerebral tratado con CuL⁴, CuL⁵ y 1E8. En a) se puede ver el tejido cerebral dañado por A β tratado con 1E8, CuL⁴ y CuL⁵; y en b) se observa el tejido cerebral sano tratado con 1E8, CuL⁴ y CuL⁵. Las imágenes de los tejidos tratados con 1E8 fueron obtenidas por microscopía de campo brillante, mientras que las de CuL⁴ y CuL⁵ fueron obtenidas por microscopía de epifluorescencia (Adaptado de la referencia 58).⁵⁸

Los complejos CuL⁴ y CuL⁵ sintetizados por Noor y colaboradores demuestran que el uso de otras moléculas como el estilbena, también permite obtener compuestos prometedores para el diagnóstico del Alzheimer por PET, siendo la molécula CuL⁴ la más destacada por tener los mayores índices de biodistribución. Esto último, sostienen los autores, se explicaría por la

presencia de cuatro grupos $R = CH_3$, los cuales permiten a la molécula atravesar la BBB con mayor facilidad, a diferencia de CuL^5 que al tener tres sustituyentes $R = CH_2CH_3$ y uno $R = CH_3$ no podría hacerlo de la misma forma.⁵⁸ Estos resultados podrían parecer contradictorios con los obtenidos por McInnes y colaboradores, ya que en este trabajo la presencia de tres grupos $R = CH_2CH_3$ aparentemente facilitaba la permeabilidad del CuL^3 a través de la BBB. La diferencia en los compuestos de Noor es que poseen cuatro sustituyentes y uno de ellos se posiciona en el grupo estilbeno, a diferencia de las moléculas de McInnes, en donde ningún grupo R estaba situado en el benzofurano. Por ello, se atribuye que las características estructurales de los compuestos CuL^3 (McInnes) y CuL^4 (Noor), tanto en su grupo selectivo de $A\beta$, como en la ubicación e identidad de sus diferentes sustituyentes R , parecen ejercer un efecto positivo en la bioabsorción cerebral. A pesar de que los dos compuestos presentan estructuras ligeramente diferentes, se observa una buena biodistribución para ambos casos, indicando que la permeabilidad a través de la BBB puede ser alcanzada mediante distintas combinaciones estructurales que alteren, principalmente, los factores del tamaño y lipofilidad.

Por otro lado, Wang y colaboradores propusieron la síntesis de moléculas muy diferentes a las mencionadas anteriormente. En este caso, se optó por usar derivados del 1,4,7-triazaciclononano (TACN) acoplado a un benzotiazol como estructura base de los profármacos. El TACN es un muy buen quelante del Cu^{+2} , mientras que el benzotiazol cumple el rol de adherirse a las placas $A\beta$ y, de igual manera, se añadió un sustituyente R diferente en cada molécula.⁵⁹

Los compuestos CuL^6 , CuL^7 y CuL^8 mostrados en la Figura 21, son capaces de mantener quelado al ion Cu^{+2} y también poseen valores óptimos de $\log D$ a un pH de 7.4, lo cual sugiere que podrían atravesar efectivamente la barrera BBB.⁵⁹ Sin embargo, los resultados de los estudios de biodistribución mostrados en la Tabla 6, demostraron que la asimilación de CuL^6 ,

CuL⁷ y CuL⁸ era menor a 0.5 %ID/g a los 2 mpi, en todos los casos. Estos valores son demasiado bajos e indican que, si bien los compuestos tienen un coeficiente de distribución dentro del rango ideal, no son capaces de atravesar óptimamente la membrana BBB de los ratones sanos.⁵⁹

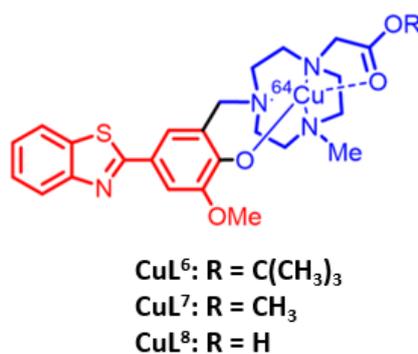


Figura 21: Estructuras moleculares de CuL⁶, CuL⁷ y CuL⁸ (Adaptado de la referencia 59).⁵⁹

Se realizaron también estudios de fluorescencia con el tinte HJ3.4, usado por su gran afinidad hacia las placas A β . Estas pruebas demostraron que los compuestos CuL⁶, CuL⁷ y CuL⁸ poseen cierta afinidad hacia las formaciones de A β presentes en el tejido cerebral de ratones transgénicos del tipo 5xFAD (con altas concentraciones de placas A β), tal y como se puede ver en la primera columna de la Figura 22. En dicha figura se observa que varios puntos azules, correspondientes a los radiocompuestos, están en las mismas posiciones que los puntos rojos de la segunda columna, los cuales corresponden al tinte HJ3.4.⁵⁹ Sin embargo, en la tercera columna de la Figura 22, se puede ver que el compuesto HJ3.4 es capaz de detectar ciertas solidificaciones A β que las radiomoléculas no pueden. Idealmente, el índice de relación (R) visto en la Figura 22 debería ser muy cercano a 1.0 para sugerir que las moléculas tienen una afinidad idéntica a la del tinte, sin embargo, en todos los casos se observan valores menores a 0.8. Por ello, se puede afirmar que estas moléculas no tienen mejor afinidad hacia los agregados A β que HJ3.4.⁵⁹

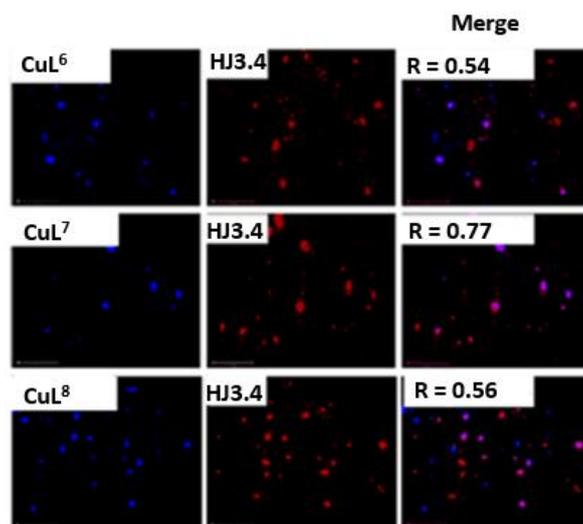


Figura 22: Imágenes del tejido cerebral de ratones transgénicos tratado con CuL⁶, CuL⁷, CuL⁸ y HJ3.4. En la primera columna se ve el tejido cerebral de ratones 5xFAD tratado con los compuestos de cobre; en la segunda columna se ve el mismo tejido tratado con el tinte HJ3.4; y en la tercera columna se aprecia el tejido tratado con ambos compuestos. Todas las imágenes fueron recopiladas por microscopía de fluorescencia (Adaptado de la referencia 59).⁵⁹

En general, las moléculas sintetizadas por Wang y colaboradores presentan una relativa selectividad en presencia de los agregados A β del tejido cerebral de ratones 5xFAD, aunque estos también presentan índices de biodistribución cerebral bajos si se los compara con las moléculas sintetizadas por McInnes y Noor. Como se mencionó anteriormente, los sustituyentes R juegan un rol muy importante en la biodistribución, ya que pueden dotar al compuesto de la lipofilidad y tamaño ideal para atravesar BBB,^{54,58} y en este caso, CuL⁶, CuL⁷ y CuL⁸ poseen solo un R igual a t-butil, metil e hidrógeno, respectivamente. En el caso del CuL⁶ se tiene una molécula muy grande y voluminosa, mientras que para el CuL⁷ y CuL⁸ se tienen sustituyentes muy pequeños. Se propone que estos sustituyentes deben tener un tamaño intermedio para mejorar la permeabilidad a través de BBB, y de igual manera, deberían ser distribuidos idealmente alrededor de la molécula, tal y como se vio en los trabajos de McInnes y Noor, en donde las moléculas más permeables eran las que tenían etilos o metilos distribuidos de manera equitativa alrededor de todo el compuesto, dotándolo de propiedades ideales para atravesar la BBB con mayor facilidad.

Finalmente, en la Figura 23 se puede observar el trabajo de Cho y colaboradores, que propusieron un diseño molecular muy interesante, en el cual se agregaron dos grupos benzofurano en cada compuesto, ya que se sospechaba que la presencia de dos grupos aumentaría considerablemente la afinidad de estos por los agregados A β .⁵⁶ De igual manera, se utilizó a la molécula ácido 1,4,7-triazaciclonona-1,4,7-triacético (NOTA) y a distintos grupos X, como agente quelante del Cu⁺² y espaciadores moleculares, respectivamente.⁵⁶

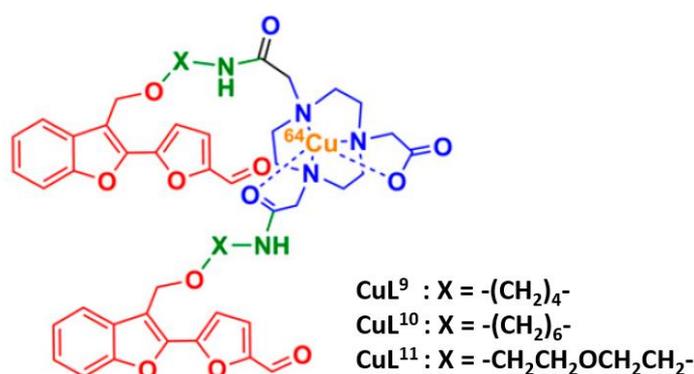


Figura 23: Estructuras moleculares de los compuestos divalentes sintetizados por Cho: CuL⁹, CuL¹⁰ y CuL¹¹ (Adaptado de la referencia 56).⁵⁶

Los compuestos $^{64}\text{CuL}^9$ y $^{64}\text{CuL}^{10}$ fueron comparados con sus homólogos monovalentes $^{64}\text{CuL}^{12}$ y $^{64}\text{CuL}^{13}$ (Figura 24), en una prueba de autorradiografía en secciones cerebrales de ratones transgénicos 5xFAD para comprobar cuál de los dos presentaba mayor selectividad por los agregados A β .⁵⁶ En la Figura 25, se puede ver que los compuestos $^{64}\text{CuL}^9$ y $^{64}\text{CuL}^{10}$ presentan señales 1.5 y 1.6 veces más intensas que $^{64}\text{CuL}^{12}$ y $^{64}\text{CuL}^{13}$, respectivamente. En consecuencia, se sugiere que los compuestos divalentes presentan mayor actividad radioactiva y selectividad que los monovalentes.⁵⁶

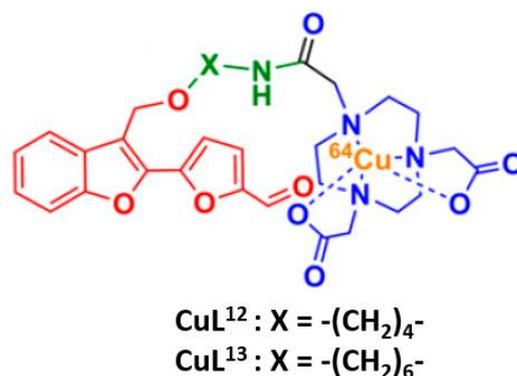


Figura 24: Estructuras moleculares de los compuestos monovalentes sintetizados por Cho: CuL^{12} y CuL^{13} (Adaptado de la referencia 56).⁵⁶

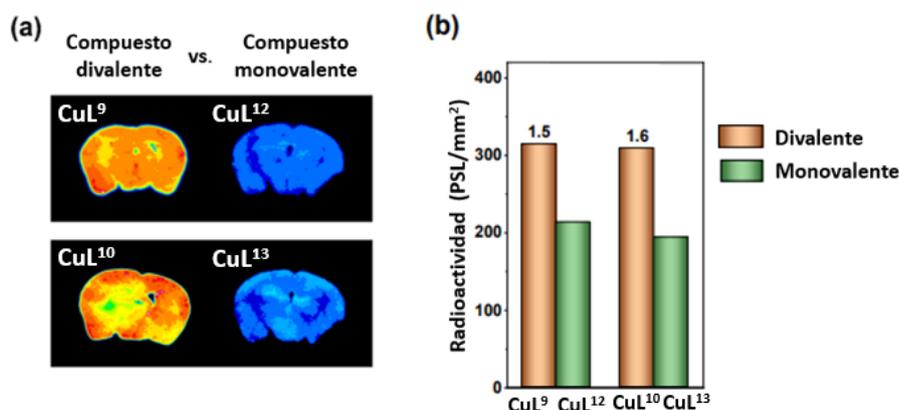


Figura 25: Imagen de los resultados correspondientes a las pruebas de autorradiografía de los compuestos divalentes con sus homólogos monovalentes. En a) se observa la intensidad emitida por los compuestos monovalentes y divalentes; y en b) se aprecia un gráfico que compara la intensidad de las señales (Adaptado de la referencia 56).⁵⁶

En la Figura 26, se pueden ver las pruebas de fluorescencia realizadas, en las cuales se usó al compuesto AF594-HJ3.4 como punto de referencia. Se puede observar que los compuestos CuL^9 , CuL^{10} y CuL^{11} son capaces de identificar algunos agregados presentes en los tejidos cerebrales de ratones transgénicos.⁵⁶ Sin embargo, en la columna 3 se observa que los compuestos CuL^9 y CuL^{11} no identifican a muchas solidificaciones que el tinte AF594-HJ3.4 sí muestra, a diferencia del compuesto CuL^{10} , el cual parece ser el más selectivo de las placas $\text{A}\beta$, ya que se observa que coincide con el tinte base casi en su totalidad. De igual

manera, en la Figura 27, se pueden apreciar los resultados de una prueba de autorradiografía realizada en el tejido cerebral de un ratón sano y otro transgénico, los resultados de dicha prueba indican que los compuestos CuL^9 y CuL^{10} son capaces de recrear imágenes cerebrales con una intensidad de señal muy alta, lo cual se atribuye a que ambas moléculas son capaces de adherirse a los agregados $\text{A}\beta$ presentes.⁵⁶ A su vez, la ausencia de péptidos $\text{A}\beta$ genera que CuL^9 y CuL^{10} sean eliminados del organismo y no generen señales de alta intensidad, tal y como puede observarse en los exámenes realizados en el ratón sano.⁵⁶

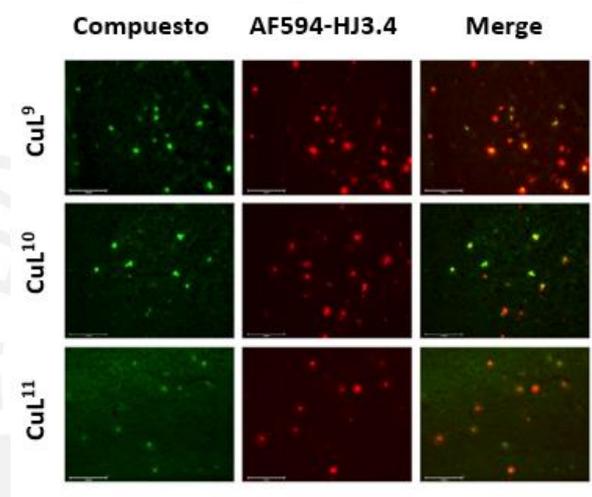


Figura 26: Imágenes de los tejidos cerebrales de ratones transgénicos tratados con las moléculas CuL^9 , CuL^{10} , CuL^{11} y AF594-HJ3.4. En la primera columna se puede ver el tejido cerebral de ratones tratados con los radiocompuestos; en la segunda columna se aprecian los tejidos tratados con el tinte AF594-HJ3.4 y en la tercera columna se observa el tejido tratado con ambos. Todas las imágenes fueron recopiladas por microscopía de fluorescencia (Adaptado de la referencia 56).⁵⁶

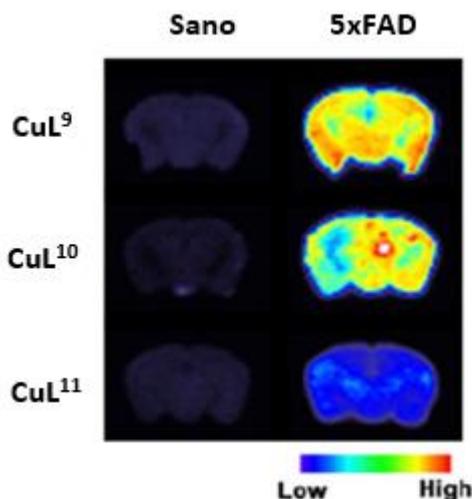


Figura 27: Imágenes de los tejidos cerebrales de ratones transgénicos y sanos recopiladas por autorradiografía. En cada fila se puede apreciar el tratamiento de tejido cerebral con cada uno de los compuestos, por otro lado, en la primera y segunda columna se aprecian los resultados de ratones sanos y 5xFAD, respectivamente (Adaptado de la referencia 56).⁵⁶

En la Tabla 6 se presentan los estudios de biodistribución de los compuestos CuL⁹⁻¹¹ en ratones sanos. A los 2 mpi las moléculas CuL⁹ y CuL¹¹ son capaces de atravesar la BBB con mayor facilidad que CuL¹⁰, lo cual se atribuye a que en esta última molécula el grupo X es una cadena de 6 carbonos, probablemente demasiado grande para atravesar la BBB. Por otro lado, en CuL⁹ y CuL¹¹ se tienen cadenas X más pequeñas, que, de acuerdo con la evidencia experimental, facilitan la permeabilidad de dichos compuestos a través de la BBB a los 2 mpi en comparación a CuL¹⁰.⁵⁶

En general, el trabajo de Cho y colaboradores permite observar que el uso de dos grupos afines a las placas A β también es válido en la síntesis de radiomoléculas para el diagnóstico del Alzheimer, ya que la selectividad e intensidad aumentan en gran medida respecto a sus análogos monovalentes. Por otro lado, si bien la selectividad aumentó en los compuestos divalentes, en las pruebas de fluorescencia también se pudo observar que las moléculas CuL⁹ y CuL¹¹ no eran capaces de identificar todos los agregados A β presentes.⁵⁶ De igual manera, la biodistribución se vio muy afectada, ya que se observan valores menores a los que se

obtuvieron en los compuestos sintetizados por McInnes y Noor, lo cual se atribuye a que el gran tamaño de las moléculas de Cho dificulta la permeabilidad de estas a través de la membrana BBB.⁵⁶

En resumen, existen diversos proyectos centrados en la síntesis de radiocompuestos de ^{64}Cu utilizados en el diagnóstico de Alzheimer por medio de PET; el objetivo es sintetizar compuestos estables, selectivos a los agregados $\text{A}\beta$ y con la capacidad de distribuirse fácilmente en el cerebro. A partir de los estudios de McInnes, Noor, Wang y Cho se puede concluir la eficacia de los ligandos atsm, TACN y NOTA como complejantes del Cu^{+2} ; de igual manera, el uso de benzofurano, estilbena y benzotiazol permitió generar complejos parcialmente afines a las placas $\text{A}\beta$. Sin embargo, los exámenes de biodistribución mostraron la gran diferencia que existe entre los derivados del $\text{Cu}(\text{atsm})$ sintetizados por McInnes y Noor con el resto de moléculas, siendo el compuesto CuL^4 el que mostró los mejores resultados con un índice de 2.2 %ID/g a los 2 mpi.⁵⁸ Se atribuye que estas diferencias en asimilación se deben, en parte, a los sustituyentes usados en cada molécula, ya que los derivados de McInnes y Noor tienen como mínimo tres grupos R, los cuales se distribuyen alrededor de todas las moléculas dotándolas del tamaño y lipofilidad ideales para atravesar la BBB. Por su parte, los compuestos de Wang sólo poseen un sustituyente, el cual no provee de las características necesarias para atravesar la BBB. De igual manera, la presencia de dos grupos benzofurano en los compuestos de Cho dificulta la biodistribución de estas moléculas, posiblemente, debido al gran tamaño que estas adquieren.

3.3.2. Galio-68

El galio es un metal de número atómico 31, el cual generalmente se encuentra como Ga^{+3} y tiene una especie isotópica de ^{68}Ga , que tiene un tiempo de vida media de 68 minutos y decae al 89% por emisión de positrones.⁶⁰ A pesar de que el ^{68}Ga tiene un tiempo de vida media

menor al del ^{18}F , este sigue presentando ventajas que justifican la investigación de nuevos fármacos con este elemento. Una de ellas es que, al ser un metal, reacciona rápidamente con ciertos agentes complejantes para producir radiocompuestos utilizados en PET, a diferencia del ^{18}F que está involucrado en reacciones de síntesis mucho más largas y complejas. De igual manera, el ^{68}Ga es obtenido a partir de un generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, que es una opción significativamente más económica y accesible a la de un ciclotrón médico *in situ*.^{51,60} Dicho generador hace uso del ^{68}Ge como isótopo padre, que se descompone en ^{68}Ga en un periodo de ~270 días; a medida que el ^{68}Ge se desintegra, el ^{68}Ga es retirado y utilizado para el marcaje de distintas moléculas (Figura 28).⁶¹

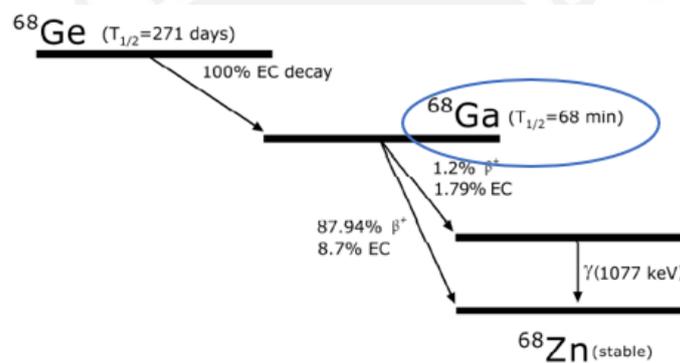


Figura 28: Esquema de descomposición del ^{68}Ge (Adaptado de la referencia 62).⁶²

En este trabajo de investigación bibliográfica se han identificado al menos diez compuestos de ^{68}Ga en exploración para la identificación de placas $\text{A}\beta$ por medio de PET. Dichos compuestos, nombrados en este trabajo como GaL^0 - GaL^9 , resaltan por distintas características relacionadas a la biodistribución y afinidad por las placas $\text{A}\beta$, como se discutirá en los siguientes párrafos.^{51,63-65}

Con respecto a las pruebas de biodistribución realizadas en ratones sanos, la molécula GaL^4 es la que obtiene mejores resultados, con una asimilación cerebral de 1.24 %ID/g a los 2 mpi (Tabla 7).⁶⁴ En la Figura 29 se puede apreciar el ligando de dicha molécula, el cual posee

una masa molar de, aproximadamente, 1 000 Da y es uno de los más grandes del grupo. De acuerdo con la teoría, la permeabilidad a través de la BBB se incrementa con un peso molar de ~600 Da,⁵¹ por lo que es contradictorio observar que GaL⁴ es capaz de atravesar la BBB con mayor facilidad que otras moléculas más pequeñas. Sin embargo, dicha observación permite afirmar que el tamaño no es el único factor importante cuando se habla de permeabilidad cerebral, ya que otros factores como las interacciones moleculares o el mecanismo de difusión celular (pasivo o activo) de GaL⁴ pueden ser incluso más determinantes que el tamaño.³⁷

Tabla 7: Resultados de biodistribución de los compuestos de Ga-68 discutidos en este trabajo (Adaptado de las referencias 51, 63, 64 y 65).^{51,63-65}

	Moléculas	%ID/g a los 2 mpi	%ID/g a los 60 mpi
Referencia 51	GaL ⁰	0.45	0.16
Referencia 63	GaL ¹	0.9 – 1.1 ^{a, b}	-
	GaL ²	0.9 – 1.1 ^{a, b}	-
	GaL ³	1.3 ^{a, b}	-
Referencia 64	GaL ⁴	1.24	0.20
Referencia 65	GaL ⁵	0.12	0.08
	GaL ⁶	0.17	0.04
	GaL ⁷	0.31	0.11
	GaL ⁸	0.21	0.11
	GaL ⁹	0.22	0.07

a: Los resultados se encuentran en %ID/cc (porcentaje de dosis inyectada por centímetro cúbico de tejido).

b: Las pruebas de biodistribución fueron realizadas en ratones transgénicos y no en sanos.

NOTA: La biodistribución de GaL^{0,4-9} fue evaluada en ratones sanos

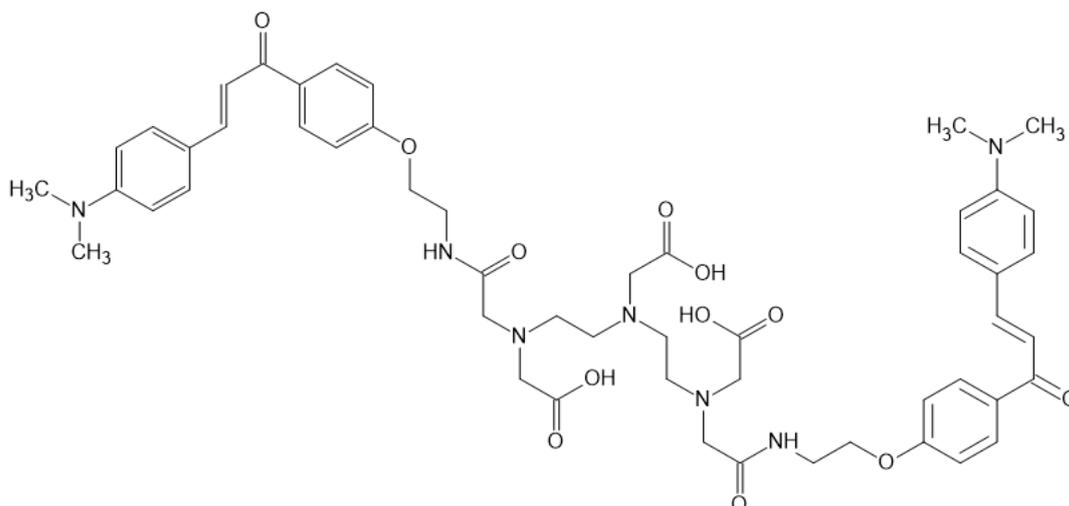


Figura 29: Estructura del ligando de GaL⁴ sintetizado por Chauhan (Adaptado de la referencia 64).⁶⁴

Por otro lado, los compuestos GaL⁵⁻⁹ (Figura 30A) poseen dos sustituyentes R afines a formaciones A β y, de igual manera, fueron capaces de identificar a los agregados peptídicos presentes en el tejido cerebral de ratones transgénicos, lo cual se observó mediante exámenes de autorradiografía.⁶⁵ En estas pruebas se utilizó al compuesto IMPY como punto de referencia, que permitió marcar las zonas cerebrales de alta concentración de agregados peptídicos. Posteriormente, el tratamiento con GaL⁵⁻⁹ permitió identificar un patrón de señal muy similar al identificado por IMPY (Figura 30B), por ello se puede afirmar que dichos compuestos son capaces de adherirse exitosamente a los agregados A β presentes en el tejido cerebral de ratones transgénicos.⁶⁵

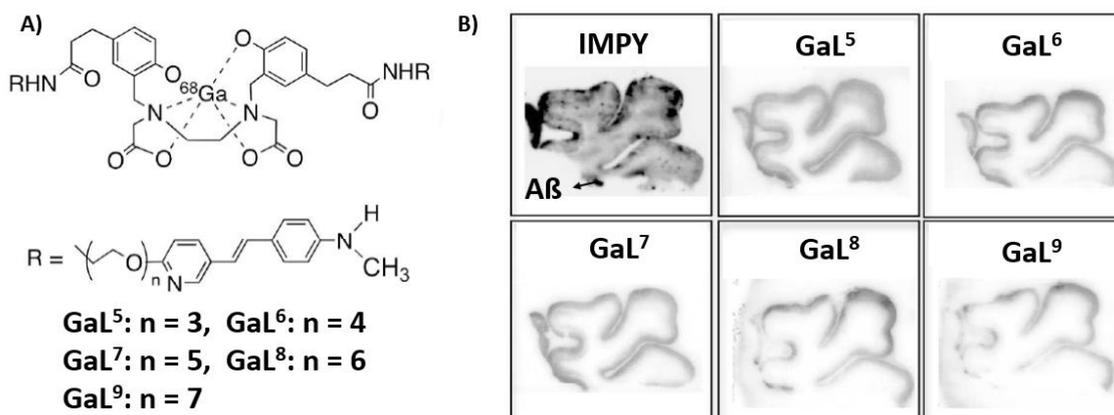


Figura 30: Estructuras moleculares de GaL⁵⁻⁹ y sus imágenes cerebrales respectivas, recopiladas por autorradiografía (Adaptado de la referencia 65).⁶⁵

Adicionalmente, GaL⁴ fue sometido a pruebas *in vitro*, en las cuales se detectaron los espectros de emisión del compuesto puro y en presencia de agregados A β . Tal y como se puede observar en la Figura 31, el compuesto GaL⁴ mezclado con una muestra de A β , presenta una intensidad 5.5 veces mayor a la del compuesto puro.⁶⁴ Dicho fenómeno se genera debido a que, al iluminar GaL⁴ con su longitud de excitación respectiva, la molécula se desexcita mediante dos procesos diferentes: la fluorescencia y el movimiento. Sin embargo, al momento que GaL⁴ se adhiere a los agregados A β se produce una restricción al movimiento de la molécula, generando que toda la energía de excitación sea eliminada por medio de la fluorescencia.^{66,67}

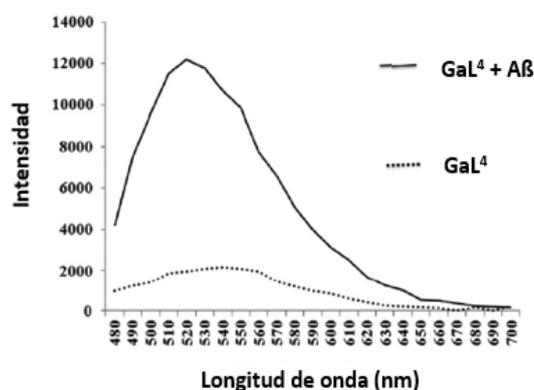


Figura 31: Espectro de emisión de GaL⁴ puro y en presencia de A β (Adaptado de la referencia 64).⁶⁴

Por otro lado, la molécula GaL⁰ (Figura 32A) fue utilizada para tratar directamente el tejido cerebral de ratones transgénicos, en donde se identificó que dicha molécula mantiene un patrón de distribución exactamente igual al del compuesto de tioflavina S utilizado como punto de referencia (Figuras 32B y 32C).⁵¹

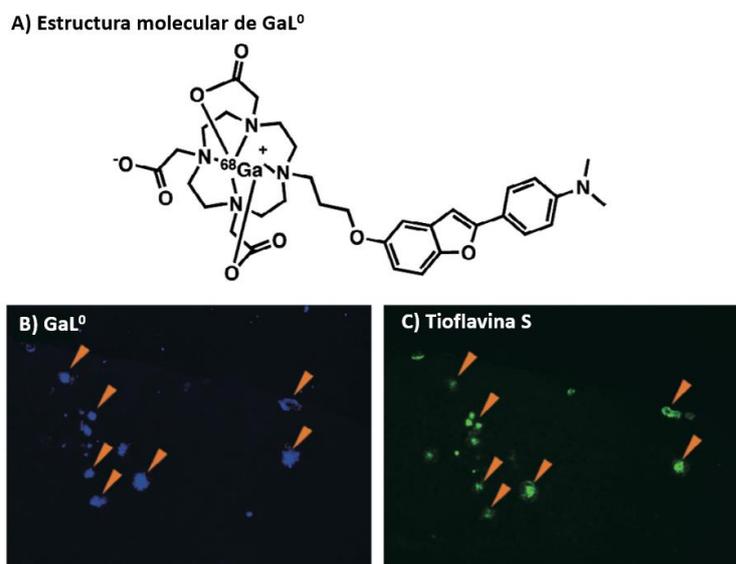


Figura 32: Estructura molecular y resultados de selectividad A β de GaL⁰. En A) se puede observar la estructura de la molécula; en B) se aprecia el patrón de distribución de GaL⁰ comparado con la tioflavina S en C) (Adaptado de la referencia 51).⁵¹

Se propone que la neurodegeneración producida por las placas A β es capaz de dañar distintas estructuras celulares del cerebro, entre ellas, la BBB, generando que esta última pierda cierta selectividad respecto a las moléculas que permite ingresar.⁶³ Por ello, Cressier y colaboradores decidieron realizar los exámenes de asimilación de las moléculas GaL¹⁻³ (Figura 33) en ratones transgénicos. Como se puede apreciar en la Tabla 7, los compuestos GaL¹⁻³ poseen resultados de biodistribución aceptables, que superan los valores obtenidos en ratones sanos (~0.5 %ID/cc), lo que sugiere que el uso de ratones transgénicos mejora la asimilación cerebral de GaL¹⁻³. De igual manera, se observa que las estructuras de GaL¹⁻³ son análogas entre sí, salvo en el uso de espaciadores moleculares que alteran la lipofiliidad y tamaño molecular; entre estos tres compuestos el GaL³ es el que posee una mejor asimilación, atribuido a que su espaciador le permite una mejor permeabilidad en comparación a GaL¹ y GaL².⁶³

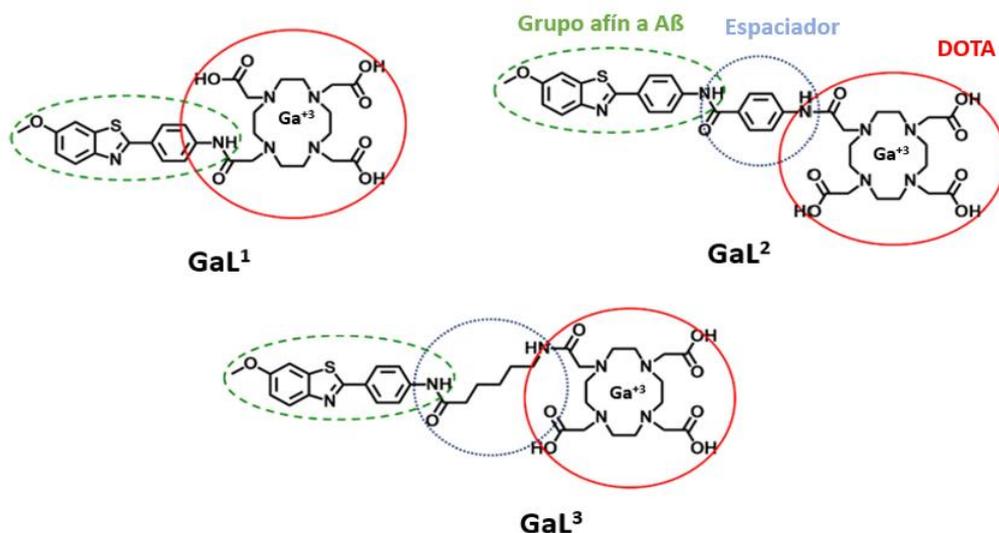


Figura 33: Estructuras moleculares de GaL¹⁻³ (Adaptado de la referencia 63).⁶³

En resumen, las investigaciones realizadas con las moléculas GaL⁰⁻⁹ permiten identificar que el uso de este elemento como agente de contraste presenta diversas ventajas en la identificación de agregados Aβ. De igual manera, el estudio realizado por Cressier y colaboradores permitió identificar que el uso de ratones transgénicos en las pruebas de biodistribución presentó un incremento de asimilación cerebral en los compuestos GaL¹⁻³.⁶³ Por ello, se sugiere que el uso de estos sujetos de prueba podría incrementar los resultados de biodistribución vistos en las moléculas GaL⁵⁻⁹, que fueron capaces de identificar las placas Aβ en tejido cerebral, pero no eran fácilmente asimiladas por el cerebro (Tabla 7).

3.3.3. Zirconio-89

El Zirconio es un metal de número atómico 40, el cual se encuentra en la naturaleza, mayormente, en cinco formas isotópicas muy comunes, ⁹¹Zr, ⁹²Zr, ⁹³Zr, ⁹⁴Zr y ⁹⁶Zr. Sin embargo, también existe el ⁸⁹Zr, el cual es investigado como agente de contraste por medio de PET, ya que tiene un decaimiento del 23% por emisión de positrones y un 77% por captura de electrones que culmina en la formación de ⁸⁹Y.^{68,69} El Zr generalmente posee un estado de oxidación de +4 y su reducción a Zr⁺² tiene un potencial de -1.4 V en medio fisiológico, por

ello, el descomplejamiento por reducción no será un problema.⁶⁸ De igual manera, el número de coordinación ideal del Zr es 8,⁶⁹ lo cual implica el uso de un ligando octadentado con una carga de -4, para dar lugar a una molécula neutra y estable.

El ^{89}Zr tiene un tiempo de vida media de 78.4 h, lo cual lo hace ideal para la síntesis de radiomoléculas, con una biodistribución muy lenta pero selectiva. En este caso, se tiene como objetivo la síntesis de derivados de anticuerpos ligados al ^{89}Zr .⁶⁸ Este metal es ideal para estas investigaciones, ya que los anticuerpos son selectivos a sus antígenos correspondientes, en este caso las placas A β , pero debido a que son moléculas proteicas de gran tamaño, su proceso de asimilación puede demorar muchas horas o incluso días. Por ello el uso de ^{89}Zr garantiza que cuando las radiomoléculas lleguen a las placas A β , estas seguirán emitiendo positrones, a diferencia de otros isótopos con tiempos de vida media menores.⁷⁰

Así, Fissers y colaboradores utilizaron un derivado del anticuerpo monoclonal JRF/A β N/25 como grupo selectivo de los agregados A β , acoplado a una molécula de deferoxamina (Df), utilizada como agente quelante del Zr^{+4} , sin embargo, el Df complejaba al metal en 6 puntos, y no en 8 como es lo ideal. El resultado final fue la molécula [^{89}Zr]Df-Bz-JRF/A β N/25 (ZrL^1) (Figura 34).⁷⁰

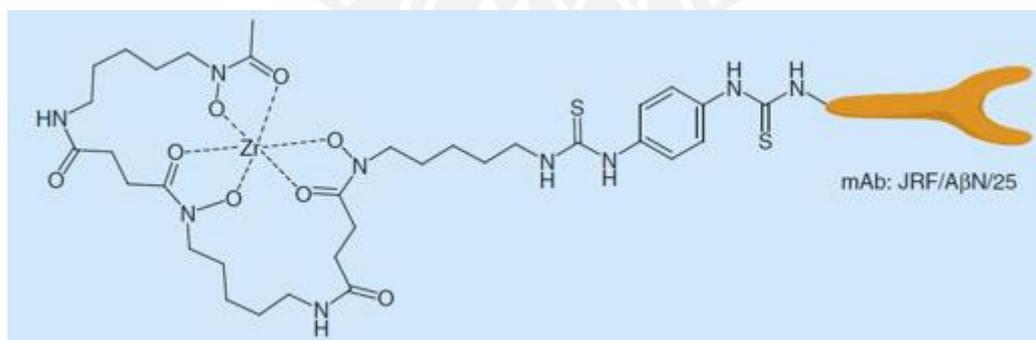


Figura 34: Estructura molecular del complejo ZrL^1 (Adaptado de la referencia 52).⁵²

En la Tabla 8 se pueden observar los resultados de las pruebas de biodistribución del ZrL^1 en ratones sanos; en esta se puede ver que los valores llegan a un máximo de 0.5 %ID/g a la hora postinyección (hpi) y que, posteriormente, el valor empieza a reducirse. Esta tendencia indica que, efectivamente, la permeabilidad a través de la BBB es muy baja en ratones sanos, posiblemente debido al gran tamaño de las moléculas.⁷⁰ Sin embargo, otros problemas identificados fueron el desacoplamiento del Zr^{+4} respecto al ligando y la acumulación de este metal en los huesos de los ratones, incluyendo el cráneo, en el que se encontró un índice de 4.0 %ID/g a las 48 hpi (Tabla 8), lo cual puede comprometer el análisis y la identificación de los agregados $A\beta$, ya que el cráneo empezará a emitir señales de alta intensidad que se confundirán con las placas.⁷⁰

En busca de una solución a esta problemática, se volvieron a realizar las pruebas de biodistribución en ratones transgénicos. Se realizaron las mediciones a los 2, 4 y 7 días postinyección (dpi) en donde se observó que los valores de asimilación cerebral iban creciendo a medida que los días pasaban.⁷¹ Por otro lado, cuando las mediciones fueron realizadas en ratones sanos esos mismos días, se observaron asimilaciones mucho menores. Por ello, los autores sospechan que en un ambiente fisiológico dañado por la presencia de agregados $A\beta$, la retención de $^{89}ZrL^1$ aumenta notablemente, al punto en que demora varios días en ser eliminada. Sin embargo, si bien la asimilación se incrementa un poco, este valor sigue siendo menor a 1.0 %ID/g. De igual manera, el metal continúa desligándose del ligando para ser capturado por el cráneo, en donde se siguen obteniendo valores de %ID/g demasiado altos, ya sea en un modelo de ratón sano o transgénico (Tabla 8). Se sugiere que los 6 puntos de coordinación presentes en el ligando no son suficientes para mantener quelado al metal, ya que el número de coordinación ideal es de 8.⁷¹

Tabla 8: Resultados de biodistribución cerebral y craneal en ratones sanos y transgénicos del compuesto ZrL¹ discutido en este trabajo (Adaptado de las referencias 70 y 71).^{70,71}

		Asimilación cerebral				
		%ID/g a 1 hpi	%ID/g a las 24 hpi	%ID/g a los 2 dpi	%ID/g a los 4 dpi	%ID/g a los 7 dpi
Referencias 70 y 71	Ratón sano	0.5	0.38	~0.2	~0.2	~0.2
Referencia 71	Ratón transgénico	-	-	0.2	0.4	0.5
		Asimilación del cráneo				
		%ID/g a 2 los dpi		%ID/g a los 7 dpi		
Referencia 71	Ratón sano	5.23		6.43		
Referencia 71	Ratón transgénico	3.92		5.84		

Se realizaron pruebas de autorradiografía en secciones cerebrales de ratones transgénicos, en las cuales se trató a las muestras con el compuesto ZrL¹, para determinar su afinidad por las placas A β (Figura 35A), usando un compuesto de afinidad conocida como punto de referencia (Figura 35B).⁷⁰ Los resultados mostraron que el ZrL¹ presenta cierta selectividad por los agregados A β , ya que generó un patrón de distribución ligeramente similar al que se obtuvo haciendo uso del compuesto de referencia, especialmente en la zona del rectángulo rojo, en donde se aprecia una tonalidad muy oscura en la Figura 35A y una gran cantidad de puntos naranjas en la Figura 35B. Estas imágenes sugieren que la molécula ZrL¹ posee cierta afinidad por los agregados A β .⁷⁰

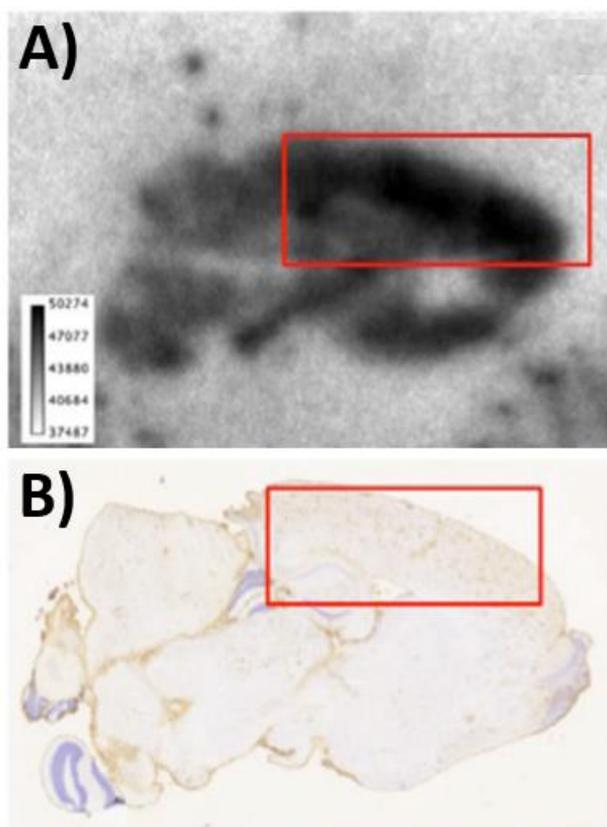


Figura 35: Resultados de las pruebas de autorradiografía realizadas en ratones transgénicos. En A) se observan los resultados obtenidos por el compuesto ZrL^1 y en B) los resultados obtenidos con el compuesto de referencia (Adaptado de la referencia 70).⁷⁰

En resumen, el compuesto ZrL^1 presenta una permeabilidad a través de la membrana BBB muy baja y tiempos de retención cerebral muy altos en presencia de grandes concentraciones de agregados $A\beta$. De igual manera, el ligando de la molécula no es capaz de retener al ^{89}Zr , ya que, con el paso de las horas, gran parte de este es capturado por los huesos, específicamente en la zona del cráneo, lo cual puede afectar la identificación de agregados $A\beta$.^{70,71} Se atribuye esta labilidad del complejo de ZrL^1 a la necesidad del Zr^{+4} de contar con 8 puntos de coordinación. Por otro lado, las pruebas de autorradiografía sugieren que el radiocompuesto tiene cierta afinidad por los agregados $A\beta$.⁷⁰ En comparación a los compuestos de ^{64}Cu y ^{68}Ga , las radiomoléculas de ^{89}Zr presentan muchos inconvenientes relacionados a la biodistribución y estabilidad, lo cual genera que los proyectos de investigación relacionados al

diagnóstico del Alzheimer sean muy escasos, siendo la molécula ZrL¹ uno de los pocos ejemplos de compuestos de Zr en investigación para esta aplicación.

Para concluir, se puede afirmar que el uso de ⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga y ⁸⁹Zr en el diseño de agentes de contraste PET presenta propuestas interesantes centradas a solucionar el problema de degradación rápida vigente en los radiofármacos de ¹¹C y ¹⁸F. Sin embargo, todavía hay una gran cantidad de retos por superar relacionados, principalmente, a la asimilación cerebral de los radiocompuestos en exploración.



4. Conclusiones

Esta investigación bibliográfica ha demostrado que el uso de distintos agentes de contraste metálicos permite la identificación de agregados A β *in vivo* mediante técnicas de diagnóstico como MRI, SPECT y PET. Si bien es cierto que las tres técnicas permiten generar imágenes cerebrales de gran calidad, si lo que se quiere es identificar las zonas de alta concentración de agregados A β , las técnicas de PET y SPECT presentan una cierta ventaja respecto a MRI, ya que ambas son capaces de producir imágenes en donde las zonas de alta densidad de señal se diferencian muy fácilmente respecto a las zonas de poca señal, debido al drástico cambio de color que se observa en las imágenes. En cambio, si bien la técnica de MRI logra generar imágenes muy exactas del cerebro, el contraste de los agregados A β respecto al tejido sano no es tan pronunciado como en el caso de PET y SPECT.

La técnica de MRI hace uso de agentes de contraste a base de Gd⁺³ y nanopartículas de óxidos de hierro. Estos permiten producir imágenes cerebrales muy detalladas y, de igual manera, ambos presentan propuestas de compuestos en investigación que, aunque no poseen un grupo funcional afín a las formaciones A β , son capaces de generar cierto contraste en los péptidos A β haciendo uso de otros mecanismos de detección y transporte.

La técnica de SPECT presenta distintos compuestos en exploración hechos a base de ^{99m}Tc, los cuales mediante distintas combinaciones y arreglos estructurales permiten atravesar la BBB y detectar los agregados A β . La importancia de los compuestos de ^{99m}Tc radica en que su tiempo de vida media de 6 horas y su producción a través de un generador de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc, son dos factores que solucionan los problemas actuales de los radiofármacos de ¹¹C y ¹⁸F, que son el corto tiempo de vida media de los isótopos y la necesidad de un ciclotrón médico *in situ* para su producción.

A su vez, el radioisótopo de ^{68}Ga discutido en la técnica de PET, también está presente en una gran variedad de moléculas con diferentes arreglos estructurales que, en algunos casos, dotaban a los agentes de contraste de afinidad por las formaciones $\text{A}\beta$ y/o permeabilidad a través de la BBB. Por otro lado, el ^{89}Zr posee un tiempo de vida media muy grande, el cual lo hizo objeto de estudio para la síntesis de agentes de contraste derivados de anticuerpos muy afines a las formaciones $\text{A}\beta$. Sin embargo, los resultados experimentales muestran que la biodistribución de los compuestos de ^{89}Zr es uno de los desafíos a solucionar.

Por último, se resalta la capacidad del ^{64}Cu para generar una gran variedad de moléculas de diagnóstico, capaces de producir imágenes PET de gran calidad y, de igual manera, se reconoce que la permeabilidad a través de la BBB es el desafío principal en el diagnóstico por imagen del Alzheimer por PET. Es de vital importancia sintetizar nuevos ligandos capaces de producir complejos de ^{64}Cu estables y que además tengan la capacidad de biodistribuirse en el cerebro de los pacientes y de adherirse a los agregados $\text{A}\beta$.

Se espera que este documento contribuya al diseño de nuevos agentes de contraste afines a las placas $\text{A}\beta$ y permeables a través de la BBB con el objetivo de mejorar las técnicas de diagnóstico del Alzheimer, ya que, si bien es cierto que no existe un tratamiento que cure los daños producidos por la neurodegeneración, un diagnóstico en una etapa temprana de la enfermedad podría detener su desarrollo y, en consecuencia, mejorar la calidad de vida de muchas personas alrededor del mundo.

5. Bibliografía

- (1) Kepp, K. P. Bioinorganic Chemistry of Alzheimer ' s Disease. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (10), 5193–5239. <https://doi.org/10.1021/cr300009x>.
- (2) Gaeta, A.; Hider, R. C. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: The basis for a promising therapeutic strategy. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *146* (8), 1041–1059. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706416>.
- (3) Vermunt, L.; Sikkes, S. A. M.; van den Hout, A.; Handels, R.; Bos, I.; van der Flier, W. M.; Kern, S.; Ousset, P. J.; Maruff, P.; Skoog, I.; Verhey, F. R. J.; Freund-Levi, Y.; Tsolaki, M.; Wallin, Å. K.; Olde Rikkert, M.; Soininen, H.; Spuru, L.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; Scheltens, P.; Muniz-Terrera, G.; Visser, P. J.; Vellas, B.; Reynish, E.; Ousset, P. J.; Andrieu, S.; Burns, A.; Pasquier, F.; Frisoni, G.; Salmon, E.; Michel, J. P.; Zekry, D. S.; Boada, M.; Dartigues, J. F.; Olde-Rikkert, M. G. M.; Rigaud, A. S.; Winblad, B.; Malick, A.; Sinclair, A.; Frölich, L.; Scheltens, P.; Ribera, C.; Touchon, J.; Robert, P.; Salva, A.; Waldemar, G.; Bullock, R.; Tsolaki, M.; Rodriguez, G.; Spuru, L.; Jones, R. W.; Stiens, G.; Stoppe, G.; Eriksdotter Jönhagen, M.; Cherubini, A.; Lage, P. M.; Gomez-Isla, T.; Camus, V.; Agüera-Morales, E.; Lopez, F.; Savy, S.; Cantet, C.; Coley, N. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's Dement.* **2019**, *15* (7), 888–898. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.04.001>.
- (4) Scharre, D. Preclinical, Prodromal, and Dementia Stages of Alzheimer's Disease. **2019**, 36–42. <https://practicalneurology.com/articles/2019-june/preclinical-prodromal-and-dementia-stages-ofalzheimers-disease/pdf>.
- (5) Braak, H.; Thal, D. R.; Ghebremedhin, E.; Del Tredici, K. Stages of the pathologic process in alzheimer disease: Age categories from 1 to 100 years. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2011**, *70* (11), 960–969. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318232a379>.
- (6) Wolozin, B.; Takashima, A.; Buee, L. Tau Biology. En *Tau Biology*; Wolozin, B., Takashima, A., Buee, L., Eds.; Springer Nature: Singapore, 2019; pp 1–12. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8>.
- (7) Perry, G.; Moreira, P.; Santos, M.; Oliveira, C.; Shenk, J.; Nunomura, A.; Smith, M.; Zhu, X. Alzheimer Disease and the Role of Free Radicals in the Pathogenesis of the Disease. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **2008**, *7* (1), 3–10. <https://doi.org/10.2174/187152708783885156>.
- (8) Reitz, C. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: A critical review. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2012**, *2012*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/369808>.
- (9) Barage, S. H.; Sonawane, K. D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* **2015**, *52*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>.
- (10) Korszyn, A. D. The amyloid cascade hypothesis. *Alzheimer's Dement.* **2008**, *4* (3), 176–178. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.11.008>.
- (11) Emerit, J.; Edeas, M.; Bricaire, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed. Pharmacother.* **2004**, *58* (1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2003.11.004>.

- (12) Nunomura, A.; Castellani, R. J.; Zhu, X.; Moreira, P. I.; Perry, G.; Smith, M. A. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, *65* (7), 631–641. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000228136.58062.bf>.
- (13) Lane, D. J. R.; Ayton, S.; Bush, A. I. Iron and Alzheimer's Disease: An Update on Emerging Mechanisms. *J. Alzheimer's Dis.* **2018**, *64* (s1), S379–S395. <https://doi.org/10.3233/JAD-179944>.
- (14) Zhao, Z. Iron and oxidizing species in oxidative stress and Alzheimer's disease. *Aging Med.* **2019**, *2* (2), 82–87. <https://doi.org/10.1002/agm2.12074>.
- (15) Eskici, G.; Axelsen, P. H. Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **2012**, *51* (32), 6289–6311. <https://doi.org/10.1021/bi3006169>.
- (16) Castellani, R. J.; Moreira, P. I.; Liu, G.; Dobson, J.; Perry, G.; Smith, M. A.; Zhu, X. Iron: The redox-active center of oxidative stress in Alzheimer disease. *Neurochem. Res.* **2007**, *32* (10), 1640–1645. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9360-7>.
- (17) Mathys, Z. K.; White, A. R. Copper and Alzheimer's Disease Copper and Alzheimer's Disease. **2018**, Núm. June, 143–158. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-60189-2>.
- (18) Kozłowski, H.; Luczkowski, M.; Remelli, M.; Valensin, D. Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (19–20), 2129–2141. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.013>.
- (19) Yuan, Y.; Niu, F.; Liu, Y.; Lu, N. Zinc and its effects on oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurol. Sci.* **2014**, *35* (6), 923–928. <https://doi.org/10.1007/s10072-014-1668-x>.
- (20) Wang, C. Y.; Wang, T.; Zheng, W.; Zhao, B. L.; Danscher, G.; Chen, Y. H.; Wang, Z. Y. Zinc Overload Enhances APP Cleavage and A β Deposition in the Alzheimer Mouse Brain. *PLoS One* **2010**, *5* (12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015349>.
- (21) Rocchi, L.; Niccolini, F.; Politis, M. Recent imaging advances in neurology. *J. Neurol.* **2015**, *262* (9), 2182–2194. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7711-x>.
- (22) Tai, Y. F.; Piccini, P. Applications of positron emission tomography (PET) in neurology. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2004**, *75* (5), 669–676. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.028175>.
- (23) Martí-Bonmatí, L.; Sopena, R.; Bartumeus, P.; Sopena, P. Multimodality imaging techniques. *Contrast Media Mol. Imaging* **2010**, *5* (4), 180–189. <https://doi.org/10.1002/cmimi.393>.
- (24) Zhu, G.; Jiang, B.; Tong, L.; Xie, Y.; Zaharchuk, G.; Wintermark, M. Applications of deep learning to neuro-imaging techniques. *Front. Neurol.* **2019**, *10* (AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00869>.
- (25) Nordberg, A.; Rinne, J. O.; Kadir, A.; Lngström, B. The use of PET in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2010**, *6* (2), 78–87. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.217>.

- (26) 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.; Price, R. I.; Barnham, K. J.; Donnelly, P. S. 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>.
- (27) Balafar, M. A.; Ramli, A. R.; Saripan, M. I.; Mashohor, S. Review of brain MRI image segmentation methods. *Artif. Intell. Rev.* **2010**, *33* (3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/s10462-010-9155-0>.
- (28) 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), 1–24. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006213>.
- (29) 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. *J. Clin. Exp. Hepatol.* **2015**, *5* (3), 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2015.08.001>.
- (30) Shokrollahi, H. Contrast agents for MRI. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33* (8), 4485–4497. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.012>.
- (31) Qiao, R.; Yang, C.; Gao, M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: From preparations to in vivo MRI applications. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (35), 6274–6293. <https://doi.org/10.1039/b902394a>.
- (32) Alcaraz, L. A.; Donaire, A. Resonancia Magnética Nuclear en Sistemas Paramagnéticos. *An. Química* **2006**, *102* (1), 27–33. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1996645>.
- (33) Petiet, A.; Santin, M.; Bertrand, A.; Wiggins, C. J.; Petit, F.; Houitte, D.; Hantraye, P.; Benavides, J.; Debeir, T.; Rooney, T.; Dhenain, M. Gadolinium-staining reveals amyloid plaques in the brain of Alzheimer's transgenic mice. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33* (8), 1533–1544. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.009>.
- (34) Matharu, B.; Spencer, N.; Howe, F.; Austen, B. Gadolinium-complexed A β -binding contrast agents for MRI diagnosis of Alzheimer's Disease. *Neuropeptides* **2015**, *53*, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.07.001>.
- (35) Badachhape, A. A.; Working, P. K.; Srivastava, M.; Bhandari, P.; Stupin, I. V.; Devkota, L.; Tanifum, E. A.; Annapragada, A. V.; Ghaghada, K. B. Pre-clinical dose-ranging efficacy, pharmacokinetics, tissue biodistribution, and toxicity of a targeted contrast agent for MRI of amyloid deposition in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73233-7>.
- (36) Tovar, G. N.; Maldonado, L. A. Liposomas: nanoburbujas de lípidos. **2018**, 4–10. <http://www.uaslp.mx/Comunicacion-Social/Documents/Divulgacion/Revista/Quince/229/229-1.pdf>.
- (37) Bort, G.; Catoen, S.; Borderies, H.; Keksi, A.; Ballet, S.; Louin, G.; Port, M.; Ferroud, C. Gadolinium-based contrast agents targeted to amyloid aggregates for the early diagnosis of Alzheimer's disease by MRI. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 843–861. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.016>.

- (38) Beltrán-Gracia, E.; López-Camacho, A.; Higuera-Ciapara, I.; Velázquez-Fernández, J. B.; Vallejo-Cardona, A. A. Nanomedicine review: Clinical developments in liposomal applications. *Cancer Nanotechnol.* **2019**, *10* (1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12645-019-0055-y>.
- (39) Sangaiya, P.; Jayaprakash, R. A Review on Iron Oxide Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *J. Supercond. Nov. Magn.* **2018**, *31* (11), 3397–3413. <https://doi.org/10.1007/s10948-018-4841-2>.
- (40) Beckmann, N.; Gérard, C.; Abramowski, D.; Cannet, C.; Staufenbiel, M. Noninvasive magnetic resonance imaging detection of cerebral amyloid angiopathy-related microvascular alterations using superparamagnetic iron oxide particles in APP transgenic mouse models of Alzheimer's disease: Application to passive A β immunotherapy. *J. Neurosci.* **2011**, *31* (3), 1023–1031. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4936-10.2011>.
- (41) Zhang, D.; Fa, H. B.; Zhou, J. T.; Li, S.; Diao, X. W.; Yin, W. The detection of β -amyloid plaques in an Alzheimer's disease rat model with DDNP-SPIO. *Clin. Radiol.* **2015**, *70* (1), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2014.09.019>.
- (42) Cai, J.; Dao, P.; Chen, H.; Yan, L.; Li, Y. L.; Zhang, W.; Li, L.; Du, Z.; Dong, C. Z.; Meunier, B. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles-bound NIR dyes: Novel theranostic agents for Alzheimer's disease. *Dye. Pigment.* **2020**, *173* (October 2019), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107968>.
- (43) Pino Sorroche, F. Reconstrucción y cuantificación de estudios SPECT en animal pequeño, **2014**, 58 http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/65741/1/FPS_TESIS.pdf.
- (44) Perera Pintado, A.; Torres Aroche, L.; Vergara Gil, A.; Batista Cuéllar, J.; Prats Capote, A. SPECT/CT: principales aplicaciones en la medicina nuclear. *Nucl. (La Habana)* **2017**, Núm. 62, 2–9. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-084X2017000200002&script=sci_arttext&tlng=en.
- (45) Valotassiou, V.; Malamitsi, J.; Papatriantafyllou, J.; Dardiotis, E.; Tsougos, I.; Psimadas, D.; Alexiou, S.; Hadjigeorgiou, G.; Georgoulas, P. SPECT and PET imaging in Alzheimer's disease. *Ann. Nucl. Med.* **2018**, *32* (9), 583–593. <https://doi.org/10.1007/s12149-018-1292-6>.
- (46) Khalil, M. M.; Tremoleda, J. L.; Bayomy, T. B.; Gsell, W. Molecular SPECT Imaging: An Overview. *Int. J. Mol. Imaging* **2011**, *2011*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2011/796025>.
- (47) Spyrou, B.; Hungnes, I. N.; Mota, F.; Bordoloi, J.; Blower, P. J.; White, J. M.; Ma, M. T.; Donnelly, P. S. Oxorhenium(V) and Oxotechnetium(V) Complexes of N3S Tetradentate Ligands with a Styrylpyridyl Functional Group: Toward Imaging Agents to Assist in the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Inorg. Chem.* **2021**, *60* (17), 13669–13680. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c01992>.
- (48) HARPER, P. V.; LATHROP, K. A.; JIMINEZ, F.; FINK, R.; GOTTSCHALK, A. Technetium 99M As a Scanning Agent. *Radiology* **1965**, *85*, 101–109. <https://doi.org/10.1148/85.1.101>.

- (49) Zhuang, Z. P.; Kung, M. P.; Hou, C.; Ploessl, K.; Kung, H. F. Biphenyls labeled with technetium 99m for imaging β -amyloid plaques in the brain. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32* (2), 171–184. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2004.10.002>.
- (50) Cheng, Y.; Ono, M.; Kimura, H.; Ueda, M.; Saji, H. Technetium-99m labeled pyridyl benzofuran derivatives as single photon emission computed tomography imaging probes for β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (5), 2279–2286. <https://doi.org/10.1021/jm201513c>.
- (51) Watanabe, H.; Ono, M.; Iikuni, S.; Yoshimura, M.; Matsumura, K.; Kimura, H.; Saji, H. A ^{68}Ga complex based on benzofuran scaffold for the detection of β -amyloid plaques. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (20), 4834–4837. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.08.058>.
- (52) 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>.
- (53) Conde Castellanos, P. E.; Eloy, P. Bloque detector PET basado en cristales monolíticos y fotomultiplicadores de silicio, **2017**. 24. <http://roderic.uv.es/handle/10550/57749>.
- (54) 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.; Donnelly, P. S. 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>.
- (55) 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>.
- (56) Cho, H. J.; Huynh, T. T.; Rogers, B. E.; Mirica, L. M. Design of a multivalent bifunctional chelator for diagnostic ^{64}Cu PET imaging in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117* (49), 30928–30933. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014058117>.
- (57) Huang, Y.; Cho, H. J.; Bandara, N.; Sun, L.; Tran, D.; Rogers, B. E.; Mirica, L. M. Metal-chelating benzothiazole multifunctional compounds for the modulation and ^{64}Cu PET imaging of A β aggregation. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (30), 7789–7799. <https://doi.org/10.1039/d0sc02641g>.
- (58) Noor, A.; Hayne, D. J.; Lim, S. C.; Van Zuylekom, J. K.; Cullinane, C.; Roselt, P. D.; McLean, C. A.; White, J. M.; Donnelly, P. S. Copper Bis(thiosemicarbazonato)-stilbenyl Complexes That Bind to Amyloid- β Plaques. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (16), 11658–11669. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c01520>.
- (59) Wang, Y.; Huynh, T. T.; Cho, H.-J.; Wang, Y.-C.; Rogers, B. E.; Mirica, L. M. Amyloid β -Binding Bifunctional Chelators with Favorable Lipophilicity for ^{64}Cu Positron Emission Tomography Imaging in Alzheimer's Disease. *Inorg. Chem.* **2021**, *60* (16), 12610–12620. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c02079>.
- (60) Maecke, H. R.; André, J. P. ^{68}Ga -PET radiopharmacy: A generator-based alternative to ^{18}F -radiopharmacy. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* **2007**, Núm. 62, 215–242. https://doi.org/10.1007/978-3-540-49527-7_8.

- (61) Rosch, F. Theranostics, Gallium-68, and Other Radionuclides A Pathway to Personalized Diagnosis and Treatment. *Recent Results Cancer Res.* **2013**, *194* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27994-2>.
- (62) Martiniova, L.; De Palatis, L.; Etchebehere, E.; Ravizzini, G. Gallium-68 in Medical Imaging. *Curr. Radiopharm.* **2016**, *9* (3), 187–207. <https://doi.org/10.2174/1874471009666161028150654>.
- (63) Cressier, D.; Dhilly, M.; Cao Pham, T. T.; Fillesoye, F.; Gourand, F.; Maïza, A.; Martins, A. F.; Morfin, J. F.; Geraldes, C. F. G. C.; Tóth, É.; Barré, L. Gallium-68 Complexes Conjugated to Pittsburgh Compound B: Radiolabeling and Biological Evaluation. *Mol. Imaging Biol.* **2016**, *18* (3), 334–343. <https://doi.org/10.1007/s11307-015-0906-9>.
- (64) 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>.
- (65) Zha, Z.; Song, J.; Choi, S. R.; Wu, Z.; Ploessl, K.; Smith, M.; Kung, H. 68Ga-Bivalent Polypegylated Styrylpyridine Conjugates for Imaging A β Plaques in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (5), 1314–1323. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00127>.
- (66) Zhang, Y.; Ding, C.; Li, C.; Wang, X. Advances in fluorescent probes for detection and imaging of amyloid- β peptides in Alzheimer's disease. *Adv. Clin. Chem.* **2021**, *103* (August), 135–139. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2020.08.008>.
- (67) Chang, W. M.; Dakanali, M.; Capule, C. C.; Sigurdson, C. J.; Yang, J.; Theodorakis, E. A. ANCA: A Family of Fluorescent Probes that Bind and Stain Amyloid Plaques in Human Tissue. *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2* (5), 249–255. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3129977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- (68) Dilworth, J. R.; Pascu, S. I. The chemistry of PET imaging with zirconium-89. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (8), 2554–2571. <https://doi.org/10.1039/c7cs00014f>.
- (69) Marquez-Nostra, B.; Viola, N. The Radiopharmaceutical Chemistry of Zirconium-89. *Radiopharm. Chem.* **2019**, *4* (5), 371–390. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98947-1_21.
- (70) Fissers, J.; Waldron, A. M.; De Vijlder, T.; Van Broeck, B.; Pemberton, D. J.; Mercken, M.; Van Der Veken, P.; Joossens, J.; Augustyns, K.; Dedeurwaerdere, S.; Stroobants, S.; Staelens, S.; wyffels, L. Synthesis and Evaluation of a Zr-89-Labeled Monoclonal Antibody for Immuno-PET Imaging of Amyloid- β Deposition in the Brain. *Mol. Imaging Biol.* **2016**, *18* (4), 598–605. <https://doi.org/10.1007/s11307-016-0935-z>.
- (71) Waldron, A. M.; Fissers, J.; Van Eetveldt, A.; Van Broeck, B.; Mercken, M.; Pemberton, D. J.; Van Der Veken, P.; Augustyns, K.; Joossens, J.; Stroobants, S.; Dedeurwaerdere, S.; Wyffels, L.; Staelens, S. In vivo amyloid- β imaging in the APPPS1-21 transgenic mouse model with a 89Zr-labeled monoclonal antibody. *Front. Aging Neurosci.* **2016**, *8* (MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00067>.