

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



Compuestos teragnósticos aplicados a la enfermedad de Alzheimer

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

AUTOR

Yesenia Nuñez Gonzales

ASESOR:

Dra. Paloma Friedda Salas Fernández

Lima, Agosto, 2023


Informe de Similitud

Yo, Paloma Friedda Salas Fernández, docente de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesora del trabajo de investigación titulado **Compuestos teragnósticos aplicados a la enfermedad de Alzheimer**, de la autora *Yesenia Núñez Gonzales* dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 6%. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 04/04/2024.
- He revisado con detalle dicho reporte y el Trabajo de Investigación, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha:

Lima, 4 de abril de 2024

Apellidos y nombres del asesor / de la asesora: <u>Salas Fernández, Paloma Friedda</u>	
DNI: 41656539	Firma 
ORCID: 0000-0002-3410-5885	

RESUMEN

La demencia es un conjunto de síntomas que incluyen dificultades con la memoria, lenguaje y comunicación, entre otros. Es causada por muchas enfermedades, siendo la enfermedad de Alzheimer la más común. Esta enfermedad neurodegenerativa afecta a millones de personas en el mundo y, como otras, presenta sellos patológicos los cuales, en este caso, son la formación de placas amiloide extracelulares y de ovillos neurofibrilares intracelulares. La primera consiste en una agregación extracelular anormal de péptidos amiloide y la segunda involucra la agregación intracelular anormal de proteínas tau hiperfosforiladas. Si bien es cierto que no se conoce la etiología de la enfermedad, se sabe que en esta ocurren una gran variedad de cambios cerebrales que conllevan a una pérdida de sinapsis y muerte neuronal.

Existen dos métodos para su detección temprana, el análisis del fluido cerebroespinal y las técnicas de neuroimagen del cerebro como, por ejemplo, la tomografía de emisión de positrones (PET). La técnica de imagen PET es muy útil, no obstante, presenta limitaciones como su elevado costo, así como la disponibilidad y las cortas vidas medias de los isótopos emisores de positrones, y el acceso a equipos de radioquímica. Por otro lado, las imágenes ópticas están llegando a obtener un mayor reconocimiento en este campo permitiendo la obtención de imágenes *in vivo* e *in vitro* de los agregados amiloide. Por otro lado, en el campo de tratamiento de Alzheimer se tienen fármacos aprobados por la FDA que presentan en el individuo solamente un alivio sintomático sin tener un efecto en la progresión de la enfermedad. Actualmente se están llevando a cabo investigaciones sobre tratamientos modificadores de la enfermedad con el fin de detener o retrasar su progreso.

En los últimos años ha surgido un campo llamado Teragnosis, en el cual se combina simultáneamente la modalidad de terapia con agentes de diagnóstico por imagen, trayendo como beneficio una mejora en la eficacia dirigida, así como también la minimización de los

efectos secundarios adversos. Este campo ha sido bastante explorado para la enfermedad del cáncer y han surgido nuevas oportunidades para adaptarlo a la enfermedad de Alzheimer. En el presente estudio se mencionan cinco agentes teragnósticos en los cuales el método de diagnóstico se basa en la obtención de imágenes fluorescentes de los agregados amiloide, mientras que sus propiedades terapéuticas se basan en terapia quelante y/o modificadores de las estructuras secundarias de los agregados A β .



TABLA DE CONTENIDOS

1. Panorama general del Alzheimer	1
1.1. Etapas de la enfermedad y sintomatología.....	3
1.1.1. Fase Preclínica	4
1.1.2. Deterioro cognitivo leve	5
1.1.3. Demencia debido al Alzheimer	5
1.2. Biomarcadores	7
1.2.1. Placas amiloides	7
1.2.2. Ovillos neurofibrilares	12
2. Diagnóstico y terapia de la enfermedad de Alzheimer	14
2.1. Diagnóstico	14
2.2. Terapia	18
3. Agentes terapéuticos para el Alzheimer	22
3.1. Moléculas pequeñas orgánicas e inorgánicas	26
4. Conclusiones	45
5. Referencias	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Imagen de los cambios cerebrales en un paciente con Alzheimer.....	3
Figura 2: Progresión de la enfermedad de EA.....	4
Figura 3: Representación esquemática del proceso secuencial proteolítico de la APP.....	9
Figura 4: Representación esquemática del proceso de agregación amiloide.....	10
Figura 5: Esquema gráfico de la hipótesis de la cascada amiloide.....	11
Figura 6: Representación esquemática de la patología tau.....	13
Figura 7: Sondas de imagen PET.	16
Figura 8: Comparación entre un cerebro con EA y un cerebro normal usando ^{18}F -Florbetapir como agente de imagen y usando como técnica Tomografía de Emisión de positrones.....	17
Figura 9: Fármacos aprobados por la FDA contra el Alzheimer.....	18
Figura 10: Estrategias para la elaboración de agentes teragnósticos.....	23
Figura 11: Estructura de los agentes teragnósticos descritos en este trabajo.	27
Figura 12: Espectro de fluorescencia de SLOH en un buffer de fosfato tras la adición de diferentes equivalentes del péptido $\text{A}\beta_{1-40}$ y de la fibrilla $\text{A}\beta_{1-40}$	27
Figura 13: Espectro de fluorescencia del fluoróforo SLOH con fibrillas y péptidos $\text{A}\beta$	29
Figura 14: Imágenes TIRFM de las fibrillas $\text{A}\beta_{1-40}$ marcadas con SLOH.	30
Figura 15: Imágenes TIRFM de las fibrillas amiloide en (a) ausencia y (b) presencia de SLOH	30
Figura 16: La relación de intensidad de las emisiones de $\text{ThT}(\text{F}/\text{F}_0)$ vs la concentración de BTTA.....	32
Figura 17: Interacciones hidrofóbicas entre fibrillas, monómeros y BTTA.....	33
Figura 18: Imágenes TEM de las especies $\text{A}\beta_{40}$ con 24 horas (a, b y c) y 48 horas de incubación (d, e y f).....	34
Figura 19: Espectro de fluorescencia de TBT tras la adición del ion $\text{Zn}(\text{II})$	36

Figura 20: Espectro de fluorescencia de ThT en presencia de agregados A β ₄₀-Zn tras la adición continua de TBT..37

Figura 21: Gráfico de la intensidad de fluorescencia de emisión del CBMDP en presencia de A β ₄₀.39

Figura 22: Interacciones en 2D y 3D del péptido A β con CBMDP..40

Figura 23: Monitoreo de la cinética de agregación de A β ₄₀ utilizando el agente de tinción ThT, en presencia de péptido, CBMDP y el ion Cu(II).41

Figura 24: Espectro de fluorescencia de CRANAD-28 en presencia de especies A β43



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores del incremento de la intensidad de fluorescencia y de las constantes de disociación (K_D) de SLOH.....	30
--	----



ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
APP	Proteína precursora amiloide
A β	β -amiloide
NFTs	Ovillos neurofibrilares
PET	Tomografía de Emisión de Positrones
CSF	Líquido Cefalorraquídeo
DCL	Deterioro Cognitivo Leve
BACE1	β -secretasa
MBDs	Domino de unión a microtúbulos
GSK-3 β	Glucógeno sintasa quinasa 3
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ThT	Tioflavina-T
CAA	Angiopatía amiloide cerebral
BBB	Barrera hematoencefálica
PIB	Compuesto B de Pittsburgh
SNC	Sistema Nervioso Central
NIRF	Sondas fluorescentes de infrarrojo cercano
MARKs	Quinasas reguladoras de la afinidad de los microtúbulos
anti-A β	Anticuerpos monoclonales
TIRFM	Microscopía de fluorescencia de reflexión total interna
CD	Espectroscopía de dicroísmo circular
FCS	Mediciones espectroscópicas de correlación de fluorescencia
SDS	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
P-tau	Proteína fosfotau
K _i	Constante de inhibición
K _D	Constante de disociación
BTA	Anilina benzotiazol
TEM	Microscopía electrónica de transmisión

1. Panorama general del Alzheimer

La demencia es un síndrome de naturaleza progresiva en el cual se presenta un deterioro de la función cognitiva.¹ Las funciones cognitivas son procesos mentales regulados por el cerebro, que involucran la adquisición de conocimientos, la manipulación de la información, el razonamiento, la atención, la concentración, la orientación y la memoria, entre otros.^{1,2} La demencia no es una enfermedad en sí, ni es una consecuencia inevitable del envejecimiento (aunque este es un factor de riesgo), sino un amplio conjunto de síntomas. Entre los más característicos se encuentran las dificultades con la memoria, el lenguaje y la comunicación, la reducida capacidad de aprendizaje y razonamiento, y el deterioro del juicio, entre otras habilidades disminuidas que afectan la capacidad y desenvolvimiento de las personas que lo padecen en la realización de sus actividades diarias.^{1,3,4}

La demencia es causada por muchas enfermedades, entre ellas, la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad de cuerpos de Lewy, el Parkinson y el Alzheimer.³ Cada una de estas enfermedades mencionadas tienen cambios cerebrales específicos, como es el caso de la enfermedad de cuerpos de Lewy en la que se observan agregaciones anormales de la proteína alfa sinucleína en las neuronas.³ Incluso, existen individuos con demencia que presentan cambios cerebrales debido a más de una causa, a ello se le conoce como demencia mixta y esta es común en personas con edades avanzadas (de 85 años a más).³

El Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa y es la causa más común de demencia, la cual se estima que representa entre el 60 y el 80% de los casos, afectando a millones de personas en el mundo.^{3,5} Actualmente existen aproximadamente 40 millones de personas en todo el mundo que están afectadas por la enfermedad de Alzheimer (EA) y se prevé que la cifra incremente a más de 100 millones en el 2050.⁶ Uno de los factores de riesgo predominante es la edad, ya que es más común que la EA se desarrolle en individuos mayores

de 65 años.⁷ Estados Unidos es uno de los países más afectados por la EA, de hecho, actualmente esta enfermedad es la quinta causa de muerte entre las personas mayores de 65 años.³

Los sellos histopatológicos de la EA son la formación de placas amiloides (A β) extracelulares y la acumulación intraneuronal de ovillos neurofibrilares (NFTs).^{8,9} Estos consisten en la agregación anormal de péptidos amiloide (A β) y de proteínas tau hiperfosforiladas, respectivamente.⁵ Si bien es cierto que estos dos cambios cerebrales son resaltantes para esta enfermedad, no son los únicos cambios patológicos significativos que se producen debido a la EA. Existen otros cambios cerebrales estructurales y funcionales como, por ejemplo, la neuroinflamación debido a la presencia de las agregaciones A β y la proteína tau hiperfosforilada que ocurre cuando el sistema no puede eliminar por completo estas proteínas y se activan las células del sistema inmune del cerebro llamadas microglías.^{3,10} Además, la pérdida neuronal causa atrofia y disminución del volumen cerebral.³ Finalmente, también se evidencia que las funciones normales del cerebro quedan comprometidas debido a la disminución de la habilidad del cerebro para metabolizar glucosa, la cual es su principal combustible.³

Estos cambios cerebrales provocan la pérdida de sinapsis y, además, inducen la muerte neuronal que empieza en las regiones de hipocampo y luego se extiende a todo el cerebro generando que el individuo presente un deterioro cognitivo de la memoria, el lenguaje, y cambios sintomáticos en el comportamiento.⁷⁻⁹ Las regiones del cerebro como el lóbulo frontal y temporal, los cuales están involucrados en el proceso de aprendizaje y el pensamiento, se ven reducidos de tamaño en pacientes con esta enfermedad (Figura 1a).¹¹ A su vez, ocurre una disminución de la captación de glucosa en la corteza frontal y los lóbulos temporales, como ya ha sido mencionado, y como se muestra en la Figura 1b.¹¹

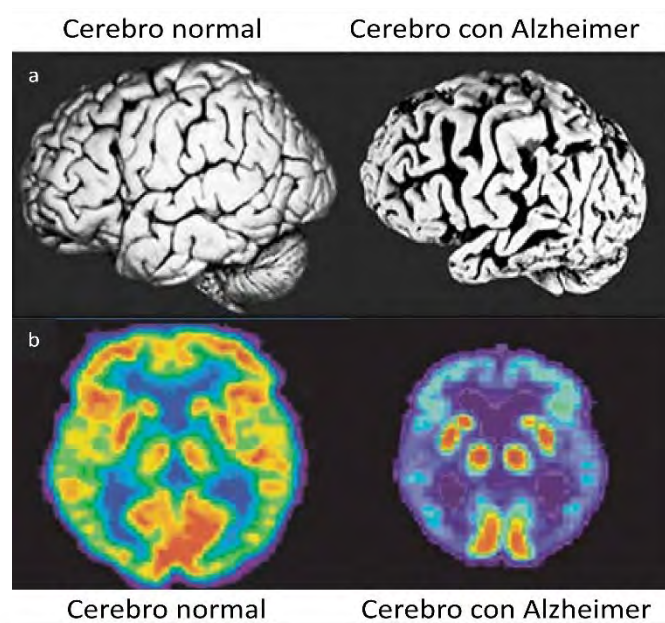


Figura 1: Imagen de los cambios cerebrales en un paciente con Alzheimer. En (a) se observa una fotografía de un cerebro con y sin EA. En (b) se observa imágenes generadas por PET. Se observa una menor captación glucosa en el cerebro de un paciente con EA, mientras que en un cerebro normal se observa altos niveles de glucosa (zonas rojas y amarillas) (Adaptado de la referencia 11).

1.1 Etapas de la enfermedad y sintomatología

Se piensa que la enfermedad del Alzheimer empieza a desarrollarse, al menos, 20 años antes de que el individuo presente los síntomas.³ Esta inicia con los cambios cerebrales mencionados previamente, los cuales son imperceptibles para el paciente pues no interfieren con su rutina diaria. Años después de estos cambios, el individuo empieza a experimentar síntomas como la pérdida de memoria.³ A medida que va pasando el tiempo, la enfermedad va empeorando, trayendo consigo consecuencias más drásticas. Esto es debido a que las neuronas de otras zonas del cerebro se ven afectadas generando que se comprometan funciones básicas como el caminar.³

Esta enfermedad se divide en tres etapas, las cuales se muestran en la Figura 2: fase preclínica, deterioro cognitivo leve (DCL) y demencia debido al Alzheimer. Esta última a su vez se divide en tres: leve, moderada y severa. Cada una de estas etapas no tiene la misma duración;

ya que el tiempo en el cual un individuo está en cada una de estas etapas varía dependiendo de diversos factores, entre ellos la edad, la genética y el sexo biológico, entre otros.³

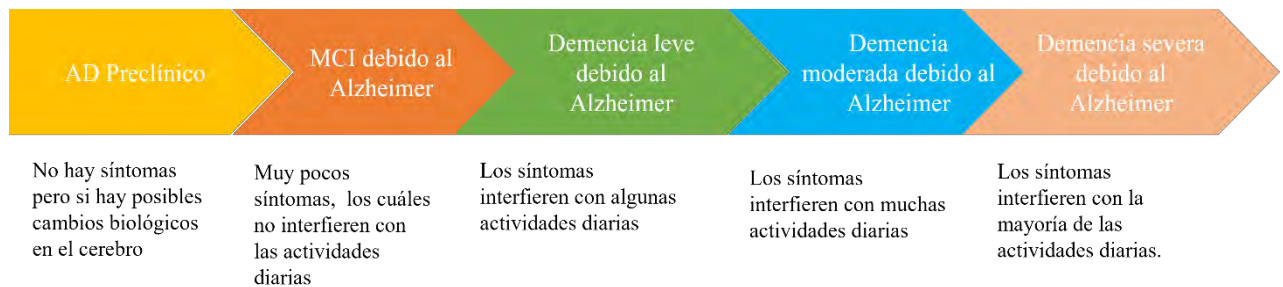


Figura 2: Progresión de la enfermedad de EA (Adaptado de la referencia 3).

1.1.1. Fase preclínica

En esta fase el individuo presenta cambios cerebrales, como niveles anormales de péptidos amiloides ($A\beta$), cambios en la proteína tau y una disminución del metabolismo de la glucosa, los cuales pueden ser medibles por Tomografía de Emisión de Positrones (PET) o por un análisis del líquido cefalorraquídeo (CSF).³ Estos cambios indican las primeras señales de esta enfermedad. Estos marcadores biológicos se evidencian en esta fase en individuos cognitivamente normales, es decir, que no presentan síntomas como pérdida de memoria.¹² Si bien es cierto que se dan estos cambios cerebrales, el cerebro lo compensa con un mecanismo de eliminación de $A\beta$, por lo que no interfiere con sus actividades rutinarias.³ A la fase preclínica se la considera como una fase larga asintomática y, según algunos ensayos clínicos, se prevé la posibilidad de aplicar intervenciones terapéuticas en esta fase con el fin de poder tratar la enfermedad de una manera óptima antes del deterioro cognitivo significativo.¹³ Cabe resaltar que está demostrado también que no todos los individuos que presentan los cambios cerebrales mencionados progresan a las fases clínicas de la enfermedad (el deterioro cognitivo leve o la demencia).¹³

1.1.2. Deterioro cognitivo leve (DCL)

En esta etapa el individuo presenta los cambios cerebrales anteriormente mencionados, además de síntomas que son lo suficientemente notorios como para que tanto el individuo como su entorno familiar puedan percibirlos.¹⁴ Este deterioro cognitivo leve se puede clasificar en función de las habilidades cognitivas afectadas. El DCL amnésico implica que se afecta a la memoria. En el caso de DCL no amnésico se afectan a otras características cognitivas como, por ejemplo, el lenguaje, la percepción visual y las habilidades visuoespaciales, entre otras.^{14,15} Generalmente no afecta a la capacidad del individuo de realizar sus actividades cotidianas, pero el individuo con DCL puede presentar problemas para realizar tareas complejas que solía hacer anteriormente. Puede que la actividad le tome más tiempo, se equivoque con más frecuencia de lo que solía o que la realice con menos eficiencia.¹⁶ Es importante tener en cuenta que algunas personas que presentan DCL pueden volver a su cognición normal o que la enfermedad no progrese a un deterioro cognitivo mayor. La progresión a la fase de demencia se observa con mayor frecuencia en aquellos pacientes que presentan un deterioro de la memoria episódica (involucra la habilidad de almacenar y aprender información sobre experiencias personales en la vida diaria del individuo, un deterioro de esta impide el recuerdo de acontecimientos recientes).^{10,16,17} Los estudios estiman que 10 a 15 % de los individuos con DCL desarrollan demencia cada año.³

1.1.3 Demencia debido al Alzheimer

La etapa de demencia se caracteriza por un deterioro de la memoria y del pensamiento, cambios en el comportamiento, dificultad en el lenguaje y la comunicación, entre otros, los cuales impiden que el individuo realice con normalidad sus actividades diarias. Como se sabe, esta enfermedad es progresiva, por lo que a medida que va transcurriendo el tiempo se va a generar un mayor daño a las células neuronales en diferentes zonas del cerebro, y ello se ve reflejado

en los síntomas. Este estadio de la enfermedad se subdivide en tres etapas: leve, moderado y severo.^{3,18}

En la demencia leve por Alzheimer, las personas pueden realizar muchas de las actividades de forma independiente (como, por ejemplo, conducir y trabajar), pero necesitan asistencia en algunas otras actividades. Los pacientes pueden experimentar lapsos de memoria en los que, por ejemplo, se olvidan de la ubicación de objetos.^{3,18} Además, pueden presentar alguna dificultad para comunicarse o tener dificultades para tomar decisiones.⁷

La demencia moderada es la etapa más larga; en esta etapa los síntomas son más pronunciados, los individuos presentan problemas para comunicarse y realizar actividades rutinarias, además de que presentan dificultades para su cuidado personal en actividades como vestirse y asearse.⁷ Son incapaces de recordar información sobre sí mismos, tienen dificultad para expresar sus pensamientos, se desorientan y, además, se observan cambios de personalidad y comportamiento que incluyen desconfianza, delirio y agitación.^{3,18}

La demencia severa es la última etapa de la enfermedad y en ella el paciente necesita cuidados las 24 horas del día. El daño neuronal es pronunciado, incluso en las zonas del cerebro relacionadas con el movimiento, por lo que el paciente puede ser incapaz de caminar o estar confinado a una silla de ruedas.⁷ Ello lo hace vulnerable a infecciones cutáneas y a sepsis. De igual forma, hay daño neuronal en la zona de cerebro que afecta la capacidad de ingesta de alimentos y bebidas, por lo que es incapaz de comer sin asistencia y presenta dificultades para tragar, lo cual puede provocar que el individuo inhale alimentos o bebidas hacia las vías respiratorias y que esto provoque que el paciente presente infecciones pulmonares.^{3,19} El individuo también pierde la capacidad de responder a su entorno y de mantener una conversación, además de que puede presentar cambios en el comportamiento que incluye agresión y agitación.^{7,18}

En promedio se menciona que los individuos viven con demencia de Alzheimer aproximadamente por 7 años; en algunos progresa la enfermedad más rápido y en otros más lento. Aquellas personas afectadas por esta enfermedad suelen fallecer debido a complicaciones relacionadas con otras enfermedades como, por ejemplo, neumonía.⁶

1.2. Biomarcadores

Los biomarcadores son sustancias generadas en el organismo por cambios biológicos, que se pueden cuantificar y que sirven como indicadores de un proceso biológico normal, un proceso patogénico o también una respuesta a una intervención terapéutica.^{3,8} Si bien es cierto que existe una serie de biomarcadores que indican la presencia de patologías y de lesiones neuronales provocadas por EA, las que caracterizan esta enfermedad neurodegenerativa en particular son las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares.²⁰ Las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares se encuentran en las estructuras del lóbulo temporal medio y las áreas corticales del cerebro.²¹ Es importante recalcar que la etiología de la enfermedad no está del todo bien entendida pero se tiene evidencia de la deposición de placas amiloides en exámenes *post mortem* del cerebro de pacientes con EA.⁵

1.2.1. Placas amiloides

Las placas amiloides son depósitos extracelulares de fibrillas y agregados amorfos de péptidos β -amiloides ($A\beta$). Estos se encuentran principalmente en regiones cerebrales involucradas en la memoria, el aprendizaje y los comportamientos emocionales, tales como la corteza entorrinal, el hipocampo, el prosencéfalo basal y la amígdala.¹¹ Los péptidos $A\beta$ se producen a partir de un rompimiento secuencial proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP).⁵ APP es una glicoproteína transmembrana con un dominio C-terminal corto intracelular y un dominio N-terminal largo extracelular que se expresa en las células de todo el cuerpo y que presenta varias isoformas que varían según su tamaño entre 695 y 770 aminoácidos.⁵ La isoforma más

abundante en el cerebro es la APP-695 y es producida principalmente por las neuronas. No se conocen aún las funciones de la APP, pero existen pruebas de que puede tener un papel importante en la regulación de la supervivencia neuronal, el crecimiento de las neuritas y la plasticidad sináptica.¹¹

Existen dos vías principales para la escisión de la APP: amiloidogénica y no amiloidogénica, siendo esta última la más común (Figura 3).^{5,10} Ambas vías pueden ocurrir en un organismo normal y sano.^{5,9} Este proceso se logra con la participación de grupos de enzimas o complejos enzimáticos denominados: α , β , γ -secretasa.¹⁰ La vía no amiloidogénica consiste en una escisión de la APP por la proteasa α -secretasa que libera un fragmento soluble N-terminal (sAPP α) al medio extracelular y deja un fragmento C-terminal de 83 aminoácidos (α CTF). La γ -secretasa posteriormente escinde a α CTF formando un péptido P3 no amiloidogénico y un dominio APP intracelular.^{5,11} Por otro lado, la vía amiloidogénica involucra una escisión secuencial de APP por acción de la β -secretasa (BACE1) lo que libera a un producto N-terminal (sAPP β) y deja un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos (β CTF).¹¹ Posteriormente, una escisión secuencial de la β CTF con la proteasa γ -secretasa genera la formación amiloidogénica de dos péptidos en el espacio extracelular, los péptidos A β ₄₀ y A β ₄₂, de 40 y 42 aminoácidos, respectivamente.^{5,11} El péptido A β presenta un dominio N-terminal hidrofílico (1-28) y un dominio C-terminal hidrofóbico (29-39/43). Además, las interacciones hidrofóbicas y de enlaces de hidrógeno entre los aminoácidos del núcleo hidrofóbico (KLVFF) y el extremo C son las responsables de la formación de las hojas β , a los cuales inducen el proceso de agregación de A β .^{5,22}

Si bien el péptido A β ₄₀ se produce en una mayor proporción (aproximadamente un 90%), la isoforma predominante en las placas es el A β ₄₂, debido a que su cinética de agregación es más rápida y presenta una mayor estabilidad.⁵ Así, el péptido A β ₄₂, que presenta dos residuos

adicionales hidrofóbicos isoleucina y alanina, es más neurotóxico y es más propenso a agregarse que el A β_{40} .²³

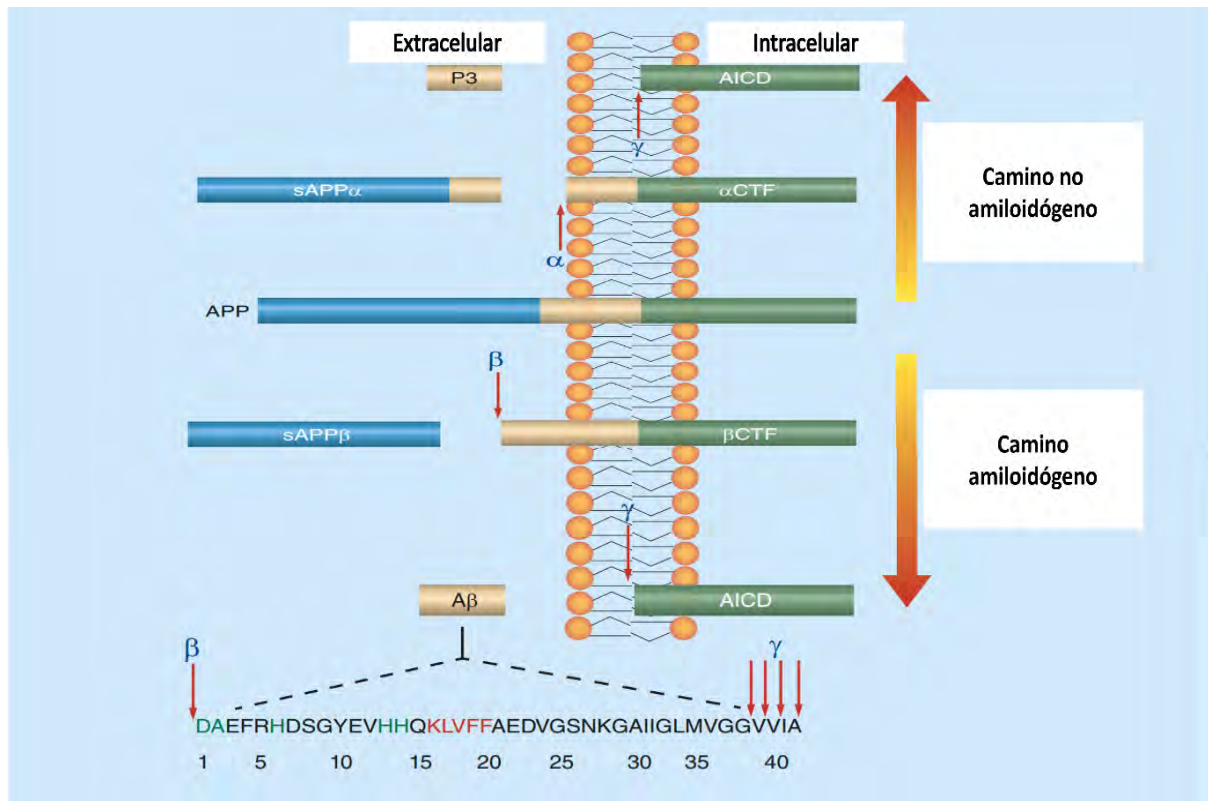


Figura 3: Representación esquemática del proceso secuencial proteolítico de la APP (Adaptado de la referencia 5).

Si bien es cierto que existe un equilibrio entre la agregación y la eliminación de estos péptidos, cuando este equilibrio se ve afectado por algunos factores patológicos como la disminución de pH o la hipoxia, se produce la agregación de los mismos, a partir de un mecanismo de crecimiento por nucleación.⁵ El péptido A β_{40-42} como monómero no es tóxico; este presenta una conformación de su estructura secundaria aleatoria desplegada con cierto contenido α -helicoidal y hojas β . Las estructuras secundarias de los monómeros A β_{40-42} se convierten de hélices alfa desordenadas y enriquecidas en hojas β . Estas estructuras enriquecidas en hojas β tienen tendencia a asociarse con otros monómeros para formar oligómeros, protofibrillas y fibrillas, como se muestra en la Figura 4.^{24,25} Posteriormente, las fibrillas se depositan para

formar placas amiloides en el parénquima del cerebro, desencadenando una cascada patogénica, que puede provocar disfunción sináptica y muerte neuronal.⁵ En el proceso de eliminación de A β se tiene la participación de proteasas, entre ellas la neprilisina, la enzima degradante de insulina, y la enzima convertidora de angiotensina.⁹

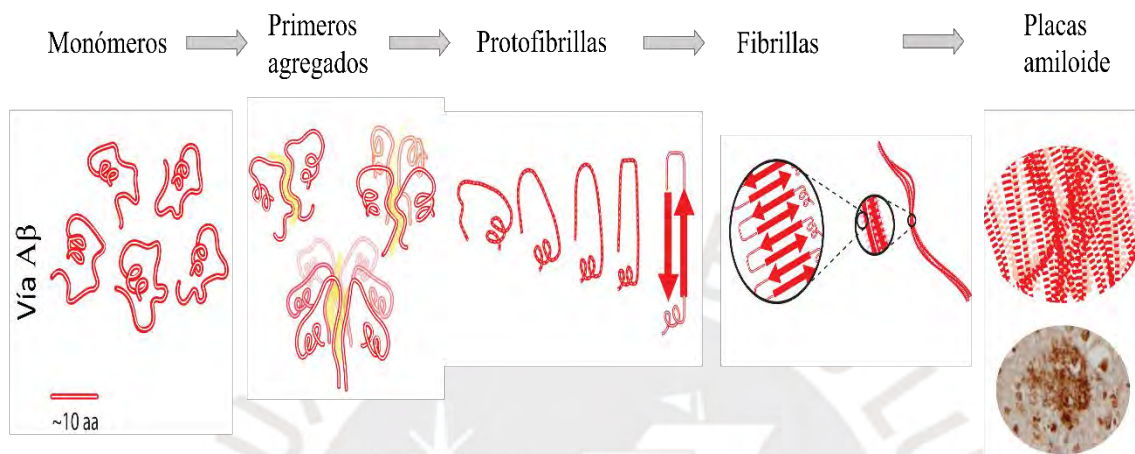


Figura 4: Representación esquemática del proceso de agregación amiloide (Adaptado de la referencia 24).

Existen diversas hipótesis que explican el origen de la enfermedad de Alzheimer, entre ellas la hipótesis de la cascada amiloide.⁹ Esta hipótesis actualmente sigue siendo la más influyente y la que presenta un mayor grado de aceptación dentro de la comunidad científica. Esta propone que la acumulación y deposición de los agregados de péptidos A β son el evento inicial y el agente causante de esta enfermedad neurodegenerativa, lo cual es producido por la alteración del proceso proteolítico de APP y genera una acumulación de formas neurotóxicas de A β en el cerebro.^{11,26} Esto desencadena diferentes eventos patológicos perjudiciales como, por ejemplo, la dishomeostasis de iones metálicos, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la apoptosis celular, la activación de la microglía y astrocitos en respuesta a la inflamación crónica, la disminución de la liberación de neurotransmisores y la formación de ovillos neurofibrilares (NFTs).^{5,27-29}

Como consecuencia de la deposición de los agregados de péptidos A β , se genera una respuesta inflamatoria crónica mediada por la microglía (se da la liberación de citoquina), lo que da lugar a más eventos patológicos como apoptosis celular e interrupción de las conexiones sinápticas como se muestra en la Figura 5. Ello conlleva la disminución de los neurotransmisores y defectos en la cognición y plasticidad sináptica.^{21,28}

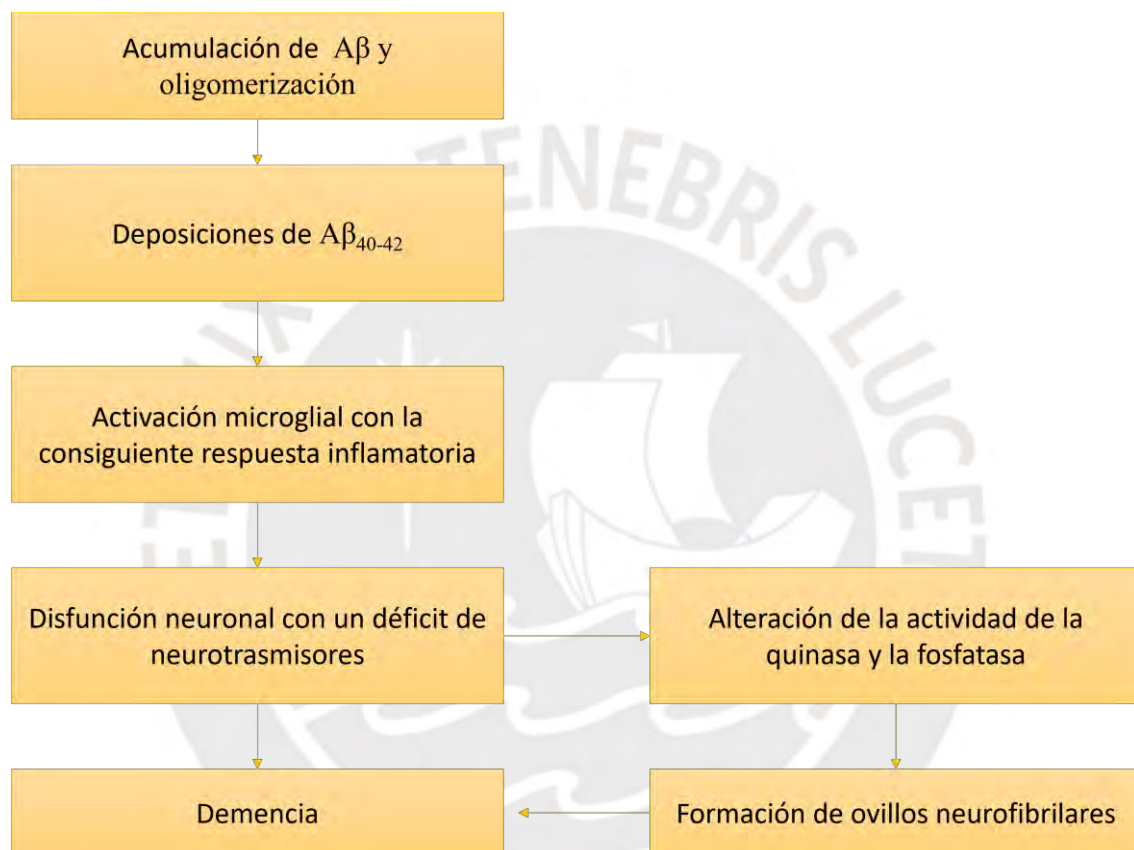


Figura 5: Esquema gráfico de la hipótesis de la cascada amiloide (Adaptado de la referencia 21).

1.2.2. Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares están compuestos, en gran parte, por filamentos helicoidales emparejados formados por la proteína tau hiperfosforilada asociada a microtúbulos.^{5,27,30} Esta patología, en ausencia de la patología amiloide, es característica de la demencia frontotemporal, la segunda forma de demencia más prevalente antes de los 65 años.³⁰ Esta demencia es un término general para un grupo de trastornos cerebrales que afectan al lóbulo frontal y temporal del cerebro.³¹

La proteína tau se encuentra en el cerebro humano en seis isoformas (las cuales presentan una longitud de cadena entre 352 aminoácidos y 441 aminoácidos) y presenta tres dominios importantes: el dominio N-terminal, el dominio C-terminal de unión a microtúbulos (MBDs) y una secuencia corta.³⁰ En la región C-terminal se tienen tres o cuatro unidades repetitivas, las cuales son los dominios de enlace a microtúbulos y, a su vez, son las responsables de la agregación a filamentos helicoidales (Figura 6).²⁴ Los sitios fuera de los dominios de repetición son fosforilados por quinasas como la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), mientras que la fosforilación dentro de los dominios de repetición se da por las quinasas reguladoras de la afinidad de los microtúbulos (MARKs), los cuales pueden generar que haya una separación entre tau y los microtúbulos.³² Esta proteína hidrofílica se encuentra predominantemente en los axones, en las dendritas y también asociada a membranas celulares.^{30,33} Esta proteína presenta 84 sitios de fosforilación, de los cuales 45 son serinas, 35 treoninas y 4 tirosinas.³⁰ Una fosforilación correcta de la proteína tau a una concentración óptima puede estabilizar a los microtúbulos manteniendo un equilibrio dinámico entre la proteína tau libre y la unida a microtúbulo. No obstante, cuando ocurre un desequilibrio entre las quinasas y las fosfatasa, se generará una hiperfosforilación anormal de la proteína tau. Esta puede secuestrar a la proteína tau normal y a proteínas asociadas a microtúbulos lo cual trae como consecuencia el

deterioro del transporte axonal y la disminución de la neurotransmisión, y tiene un impacto negativo en las funciones cognitivas.³²

La proteína tau excesivamente fosforilada se acumula en los compartimientos somato dendríticos de las neuronas y se agregan eventualmente formando los ovillos neurofibrilares. La fosforilación de la proteína tau es controlada por la concentración de calcio intracelular.²⁷ No se conoce del todo el mecanismo por el cual los péptidos A β (según la hipótesis de la cascada amiloide) alteran la homeostasis del calcio y generan un aumento de su concentración intraneuronal, no obstante, se sabe que a consecuencia de ello se da la fosforilación excesiva de esta proteína.²⁷ En la Figura 6 se muestra la representación esquemática de la patología tau.²⁴

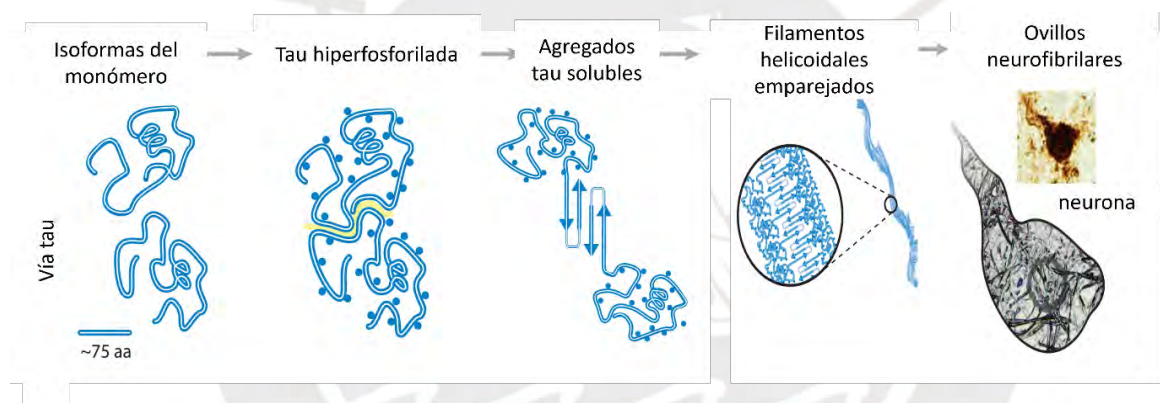


Figura 6: Representación esquemática de la patología tau. Se parte de monómeros, factores externos ya sea mutaciones, asociaciones a poliaminas u otros factores que generan una hiperfosforilación de la proteína tau (indicada por puntos azules). Los agregados solubles de tau se ensamblan y forman filamentos helicoidales y posteriormente ovillos neurofibrilares intracelulares. Esto último genera la muerte neuronal (Adaptado de la referencia 24).

Así, tanto las placas amiloides como los ovillos neurofibrilares son considerados biomarcadores y, a su vez, dianas farmacológicas de la enfermedad de Alzheimer, por lo que en el siguiente capítulo se describirán los métodos de diagnóstico y terapia de esta enfermedad basados en estos biomarcadores.

2. Diagnóstico y terapia de la enfermedad de Alzheimer

A través de los años se han desarrollado varias estrategias con la finalidad de diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en sus primeras fases, así como también se ha observado un incremento del número de investigaciones farmacológicas con el fin de encontrar intervenciones terapéuticas que permitan tratar la enfermedad antes de que el individuo desarrolle síntomas irreversibles, no obstante, hasta el momento no se ha materializado ningún fármaco eficaz.²⁵ A continuación, se describirán algunas de las estrategias de diagnóstico y de tratamiento empleados teniendo como base la hipótesis de la cascada amiloide.

2.1. Diagnóstico

Actualmente, el diagnóstico clínico de EA se basa en la historia clínica del paciente seguido de observaciones neurológicas, neuropsicológicas y antecedentes colaterales.²⁸ Además de ello, para confirmar el cuadro clínico, debería ser necesario la identificación de los dos sellos patológicos de la enfermedad, las formaciones amiloides y los ovillos neurofibrilares.²⁰ Por otro lado, el diagnóstico definitivo de esta enfermedad se puede hacer solo a partir de una biopsia o una autopsia del tejido cerebral *post mortem* con el fin de evaluar la existencia de las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares.^{20,28}

Como se mencionó en el capítulo anterior, la EA empieza 20–30 años antes de que se evidencien los síntomas clínicos.³ La agregación de los péptidos A β ocurre en la fase preclínica del Alzheimer por lo que su detección como biomarcador es crucial para la detección temprana de EA. Existen actualmente dos formas que permiten su detección, a partir de ensayos de fluido cerebroespinal y a partir de técnicas de neuroimagen del cerebro.⁸

El péptido A β_{40-42} puede medirse en el fluido cerebroespinal (CSF) a través de técnicas basadas en anticuerpos, pruebas de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) y a través de técnicas

independientes como la espectrometría de masas. La disminución de la concentración normal en el CSF es interpretada como indicación de la agregación de este péptido en placas amiloide del cerebro.^{8,34} Esta disminución se puede detectar en el CSF de pacientes con deterioro cognitivo leve y también en la fase preclínica de la enfermedad. Por otro lado, las neuronas que contienen ovillos neurofibrilares liberan proteína tau fosforilada la cual puede medirse en el CSF mediante ELISA, utilizando anticuerpos que reconocen específicamente los epítomos del dominio medio de la proteína fosfotau (P-tau).⁸

Las técnicas de imagen que se utilizan para la obtención de imágenes *in vivo* de placas A β son la Tomografía de Emisión de Positrones (PET), la Resonancia Magnética por Imagen (MIR), la Tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) e imágenes ópticas.

Los agentes de unión a A β que se han tomado como punto de partida para el desarrollo de sondas por imagen, especialmente para las técnicas SPECT y PET son: la Tioflavina-T, el rojo Congo, el estilbeno y la curcumina.⁵ Estos compuestos destacan por su habilidad de enlazarse a las formaciones A β debido a que presentan una estructura en común que las hace ideales para este fin: son moléculas aromáticas relativamente planas e hidrofóbicas que pueden interactuar con las estructuras secundarias (hojas β) de las formaciones amiloides.²⁰ Específicamente, la diana de estos agentes de imágenes son las placas y fibrillas amiloides; se ha intentado realizar trazadores que se dirijan a la especie oligomérica precursora, pues son consideradas más neurotóxicas, pero las imágenes *in vivo* que se obtienen no son representativas de estas especies, dado que presentan una baja concentración con respecto a las placas A β insolubles.²⁵

La tomografía de emisión de positrones (PET) es una de las técnicas de imagen más populares y usadas para monitorear los cambios en los depósitos amiloides en pacientes con EA, y por ello, en esta sección solo se desarrollarán ejemplos de radiofármacos utilizados esta técnica.

En la tomografía PET se utilizan radiotrazadores, es decir trazadores con elementos radioactivos, y muchos de estos son derivados de la Tioflavina-T (ThT) y del rojo Congo.^{20,25}

Los radioisótopos más comunes usados en sondas PET para la obtención de imágenes de formaciones A β son ^{11}C y ^{18}F . La primera sonda química PET desarrollada para la detección de formaciones amiloides fue un derivado del colorante ThT modificado con ^{11}C , al que se le conoce como ^{11}C -PiB (Figura 7).^{26,35} Esta es una de las sondas de imágenes PET más estudiadas para las placas amiloides en humanos, aunque presenta limitaciones pues el tiempo de vida media de este radioisótopo es relativamente corto (aproximadamente 20 minutos). Para superar esta limitación se generaron otras sondas marcadas con ^{18}F , el cual tiene un tiempo de vida media mayor (alrededor de 110 minutos). En la actualidad existen tres trazadores amiloides autorizados para su uso clínico, ^{18}F -florbetapir (Amyvid[®]), ^{18}F -flutemetamol (Vizamyl[®]) y ^{18}F -florbetaben (Neuraseq[®]).^{8,34} Las estructuras de estos agentes de imagen se observan en la Figura 7.^{26,35}

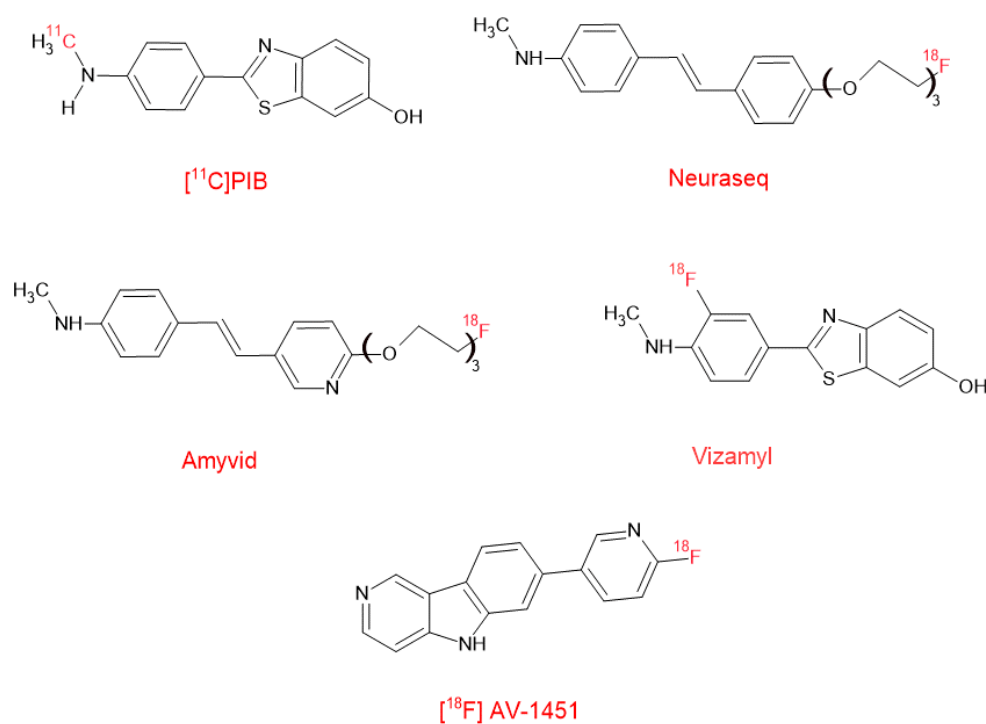


Figura 7: Sondas de imagen PET.

Un ejemplo de las imágenes generadas por estos agentes se muestra en la Figura 8. El radiofármaco empleado en este caso es el ^{18}F -Florbetapir (Amyvid[®]). Este agente de imagen se enlaza a las placas amiloides, desde donde el ^{18}F libera positrones que generarán radiación gamma que será detectada por el tomógrafo. En la Figura 8, las zonas de color rojo muestran una elevada acumulación del agente de imagen, lo que se compara con la imagen de un control normal, que acumula muy poco de este agente.⁸

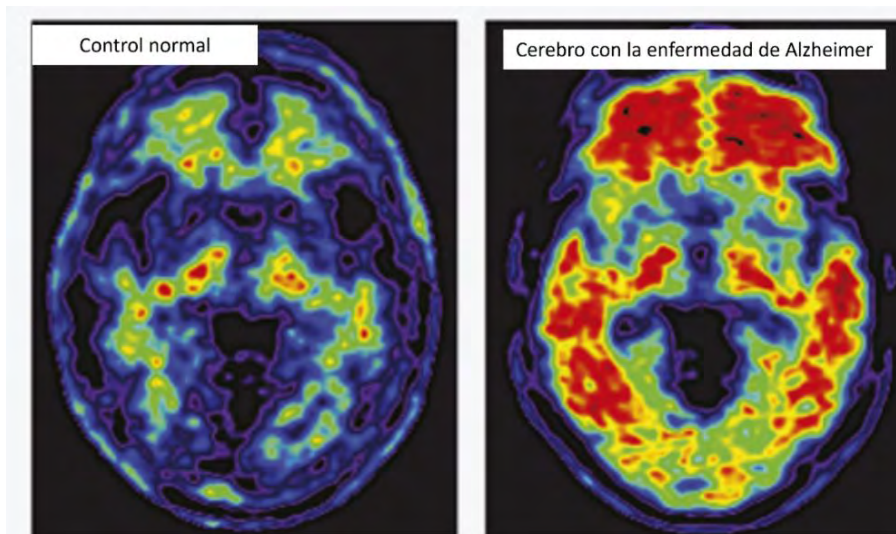


Figura 8: Comparación entre un cerebro con EA y un cerebro normal usando ^{18}F -Florbetapir como agente de imagen y usando como técnica Tomografía de Emisión de positrones (Adaptado de la referencia 8).

De igual forma, los trazadores PET también permiten visualizar las inclusiones de proteína tau *in vivo* en pacientes con EA. Uno de los agentes de imagen que se utilizan para visualizar los ovillos neurofibrilares es AV-1451(Flortaucipir) cuya estructura se muestra en la Figura 7.³⁵ Este agente de imagen se une a los ovillos neurofibrilares produciendo la emisión de radiación gamma que es detectada por el tomógrafo.⁸

A pesar de ser una técnica de imagen muy útil, la tomografía PET presenta algunas desventajas. Entre ellas, su costo, lo cual limita su uso en algunos países, el corto tiempo de vida media de los isótopos emisores de positrones por lo que se requiere la síntesis *in situ* de estos

radioisótopos, además de que se requiere tener acceso a un ciclotrón y expertos en el uso y mantenimiento de equipos de radioquímica.³⁶

2.2. Terapia

Actualmente no existe cura para la enfermedad de Alzheimer. Los fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) solo consiguen un alivio sintomático en el paciente, mas no permiten disminuir la progresión de la enfermedad.²⁵ Estos fármacos son cuatro inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) (tacrina, donepezilo, rivastigmina y galantamina) y el antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (memantina); estos se pueden observar en la Figura 9.^{5,20,37} Los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) solo consiguen un efecto paliativo en el paciente durante las primeras fases de la enfermedad, mientras que el inhibidor de NMDA (memantina), por otro lado, mejora los síntomas relacionados con la toxicidad aunque su actividad protectora sigue en debate.²⁵

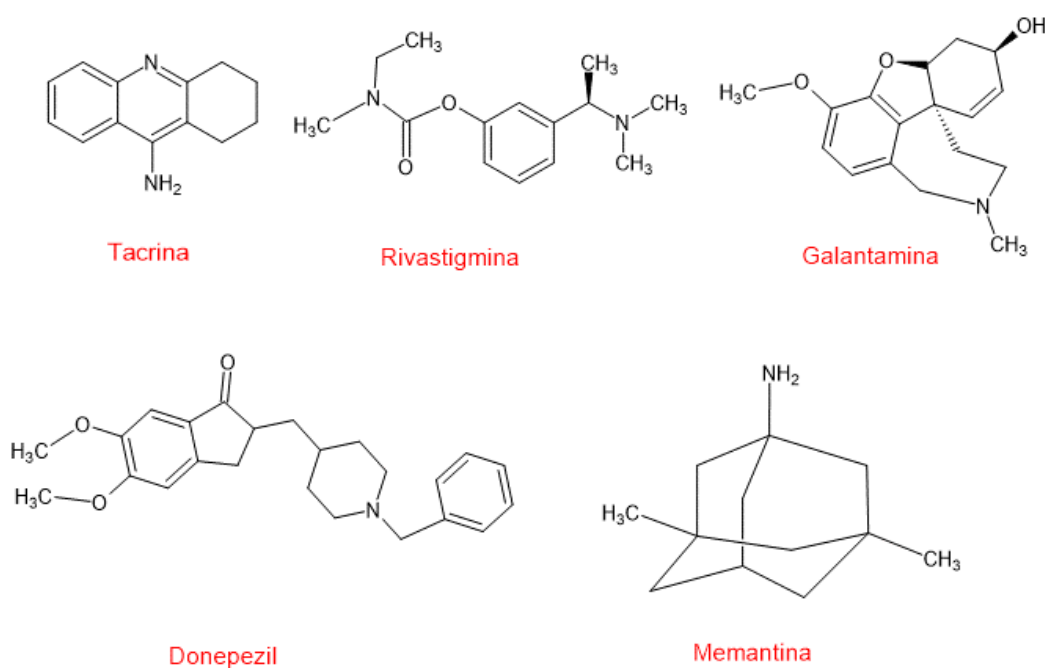


Figura 9: Fármacos aprobados por la FDA contra el Alzheimer.

Existen varias limitaciones por las cuales no se han podido obtener fármacos eficaces para el tratamiento de esta enfermedad neurodegenerativa, entre las que destaca la comprensión incompleta de la etiología de EA. Además, los candidatos a fármacos fracasan debido a que principalmente se estudian en pacientes que exhiben una patología que ya está muy avanzada.²⁵ El no tener la certeza de saber quién ocupa el papel causal y cuáles son las interacciones entre los diferentes cambios cerebrales que ocurren en esta enfermedad, genera que existan muchas dianas farmacológicas y, como ninguna de estas está validada, se complica encontrar un tratamiento modificador de la enfermedad.²⁰ Otra dificultad que presentan estos fármacos es la alta selectividad de la barrera hematoencefálica, que debe ser permeable a todos los fármacos dirigidos al Sistema Nervioso Central (SNC).²⁰ Se debe tener en cuenta que la barrera hematoencefálica (BBB) es una barrera estructural fisiológica especializada que tiene como función proteger al SNC de sustancias exógenas. Esta controla estrictamente las moléculas que transitan de la sangre al cerebro generando que cerca de un 98% de las moléculas pequeñas y casi el 100% de moléculas grandes no puedan atravesarlo.³⁸

Con el fin de mejorar la limitada eficacia de estos tratamientos, se ha propuesto encontrar tratamientos modificadores de la enfermedad teniendo como principal objetivo el detener o retrasar significativamente su progreso. Basándose en la hipótesis amiloide, eliminar la neurotoxicidad de los agregados A β puede traer la posibilidad de alterar el curso de esta enfermedad. Es por esta razón que actualmente se ha adoptado un enfoque con los siguientes objetivos: inhibir y modular la agregación de A β , mejorar la eliminación de A β , e inhibir y modular las secretasas involucradas en la producción de estos péptidos (γ y β -secretasas).^{5,32}

Los moduladores de la agregación A β son aquellos que pueden bloquear la formación de hojas β , prevenir su fibrillogénesis, disolver los agregados A β a especies no tóxicas, así como también desestabilizar a los oligómeros o acelerar su conversión a otros agregados A β .³⁹ Hay un gran potencial en los inhibidores de BACE1; que se han desarrollado con el fin de reducir la

concentración de A β en ratones transgénicos con EA. Por otro lado, los inhibidores de las γ -secretasas tienen un ligero inconveniente con los efectos adversos, pues estas no solo escinden a la APP sino también a otros sustratos.²¹

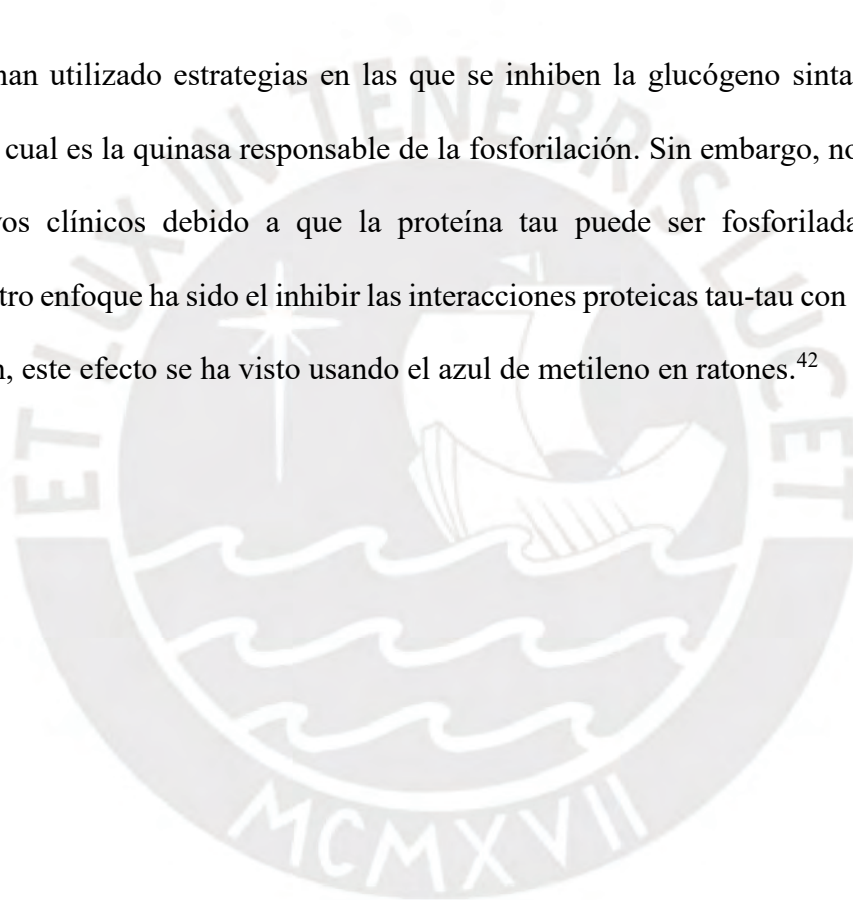
Otra de las alternativas terapéuticas es la basada en inmunoterapia A β , en la cual participan anticuerpos monoclonales (anti-A β) que tienen como objetivo eliminar las placas amiloide que se hayan formado antes de la administración del tratamiento de anticuerpos y evitar su deposición en el cerebro. La base de la acción de estos anticuerpos podría ser la interacción con placas amiloides induciendo su eliminación por la microglía, o, la unión a los A β solubles en la periferia y conducir a su eliminación fuera del cerebro.^{21,40} Basándose en este enfoque, en el año 2021 la FDA aprobó el uso clínico del fármaco Aducanumab (Aduhelm™) para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en pacientes con DCL y con demencia leve.⁴¹ El Aducanumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano que tiene como característica principal el que puede unirse y eliminar eficientemente las placas y otros agregados A β del cerebro por lo que promete ser el primer fármaco que pueda reducir significativamente el deterioro cognitivo de las personas con EA temprana.⁴¹

A su vez, se han propuesto quelantes metálicos como agentes terapéuticos. Estos tienen gran potencial pues pueden inhibir la agregación de A β y disgregar su agregación inducida por metales de transición, principalmente Cu(II), Zn(II) y Fe(III). Estos iones metálicos pueden acelerar la agregación de los péptidos A β ₄₀₋₄₂, al coordinarse con residuos específicos, como la His6, His13 y His14, y como consecuencia pueden incrementar su efecto neurotóxico en células neuronales.⁵ El modo de acción de estos agentes quelantes es la captura de estos iones enlazados a los agregados A β .⁵

De igual forma, se han investigado diversas estrategias que permiten la inhibición de los ovillos neurofibrilares. La proteína tau es una proteína que puede ser modificada de diversas formas,

entre ellas, a través de la fosforilación, acetilación y nitración. Esto genera que interfiera en su función de unión a microtúbulos y posteriormente conlleva a su agregación. La fosforilación es una de las principales modificaciones que impulsa la agregación de esta proteína, por lo que se han planteado como enfoque terapéutico la desfosforilación de tau, usando como agente terapéutico a la metformina.⁴² La metformina ha demostrado su capacidad como agente terapéutico debido a que este activa a la fosfatasa tau y así reduce la fosforilación de tau en modelos de ratones *wild-type*.⁴²

También se han utilizado estrategias en las que se inhiben la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), la cual es la quinasa responsable de la fosforilación. Sin embargo, no se tuvo éxito en los ensayos clínicos debido a que la proteína tau puede ser fosforilada por muchas quinasas.⁴² Otro enfoque ha sido el inhibir las interacciones proteicas tau-tau con el fin de evitar su agregación, este efecto se ha visto usando el azul de metileno en ratones.⁴²



3. Agentes teragnósticos para el Alzheimer

El término teragnóstico fue acuñado en 1998 por John Funkhouser, y aunque su definición sigue en constante cambio, en general implica a un material que combina la modalidad de terapia con un agente de diagnóstico por imagen y seguimiento de una enfermedad en una sola dosis.^{36,43} Este agente químico, el cual tiene integrado el fármaco y el agente de imagen, va a permitir marcar una diferencia con respecto a una combinación clásica de prueba diagnóstica y tratamiento por separado, trayendo consigo beneficios como, por ejemplo, el superar las diferencias que existen entre los perfiles de biodistribución de ambos, generando una mejora en su eficacia dirigida y minimizando los efectos secundarios adversos.^{36,43,44} Este concepto está estrechamente relacionado con la medicina personalizada y se ha explotado con éxito en el campo de oncología, en donde, a pesar de ser una estrategia que recién se está desarrollando, algunos de estos agentes están llegando rápidamente a ensayos clínicos.⁴³

Existen dos clases de compuestos reportados en la literatura como agentes teragnósticos para el Alzheimer: los nanofármacos (nanomedicinas) y los compuestos orgánicos e inorgánicos pequeños. En el campo del cáncer los nanofármacos tienen un alto protagonismo pues son extremadamente versátiles y permiten integrar una imagen ultrasensible y una terapia en un mismo sistema.³⁶ No obstante, no son tan atractivos en el campo del Alzheimer ya que presentan un gran número de limitaciones. Entre ellas está la limitada permeabilidad que presentan hacia la BBB, la selectividad de la diana y la escasa reproducibilidad.⁴⁵ Por otro lado, las pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas tienen un mejor potencial teragnóstico debido a que pueden cruzar la BBB y pueden ser fácilmente modificables de tal forma que permita una mejora en sus propiedades.³⁶

Existen dos estrategias para la elaboración de estos agentes teragnósticos. La primera implica la elaboración de una molécula conjugada en donde hay dos unidades, una de ellas es el agente

de diagnóstico y el otro es el agente terapéutico, y ambas están unidas químicamente por un espaciador de naturaleza y longitud variable.³⁶ La otra estrategia implica un “solapamiento” entre el agente de diagnóstico y el agente terapéutico altamente integrados en una sola molécula (Figura 10).³⁶ Esta estrategia de solapamiento tiene una aplicabilidad más limitada pues tanto el agente que presente propiedades terapéuticas como el de diagnóstico deben compartir un andamiaje en común.³⁶ Una molécula que pueda ser capaz de obtener imágenes *in vivo* de especies A β u ovillos NFT, e inhibir su agregación, representaría un gran potencial como agente teragnóstico del Alzheimer.⁴⁴

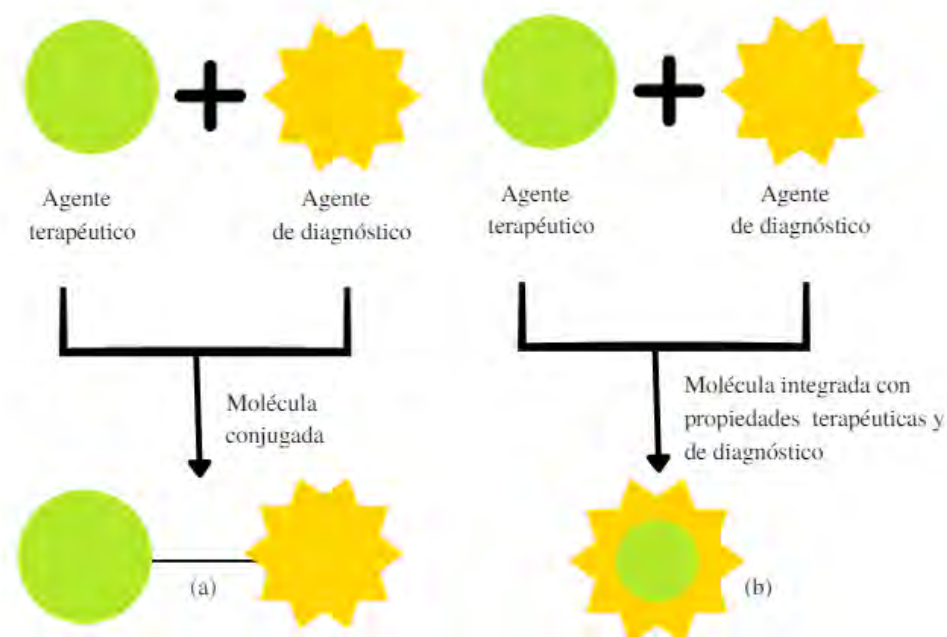


Figura 10: Estrategias para la elaboración de agentes teragnósticos. En (a) se tiene la estrategia en la que se forma una molécula conjugada utilizando un espaciador. En (b) se tiene la estrategia en la que hay un solapamiento de las propiedades terapéuticas y de diagnóstico integradas en una molécula (Adaptado de la referencia 36).

Se han desarrollado varias sondas de obtención de imagen de moléculas pequeñas que se dirigen hacia el biomarcador A β . Entre estas sondas se encuentran los agentes fluorescentes.²⁵ A diferencia de la técnica de imágenes PET, mencionada en el capítulo anterior, se ha propuesto utilizar imágenes ópticas para el desarrollo de estos agentes teragnósticos. Esta técnica de

imagen trae como ventaja el bajo costo, una alta resolución (aunque no tan alta como PET), alta especificidad y el no ser invasiva.³⁶ Las imágenes ópticas utilizan luz en el espectro visible e infrarrojo cercano para llegar a visualizar diferentes procesos celulares, y las sondas de imagen que utilizan para la obtención de imágenes *in vivo* son agentes fluorescentes.⁴⁶

Uno de los requisitos fundamentales en su estructura es que presenten sistemas planos π conjugados extendidos los cuales permiten una interacción con los agregados amiloide.³⁶ Un ejemplo representativo de estos agentes fluorescentes es la Tioflavina-T (ThT), un colorante que se utiliza para la detección de la presencia de fibrillas amiloide en tejidos cerebrales *post mortem* y ,además, para estudios *in vitro* en el monitoreo de la formación de fibrillas.²⁵ Este agente de tinción presenta una estructura óptima para el reconocimiento de fibrillas amiloide, ya que consiste en una molécula aromática relativamente plana e hidrofóbica y las interacciones que existen entre estas y las fibrillas son una combinación de interacciones hidrofóbicas e interacciones π - π .²⁰ En su modo de acción, al unirse a las fibrillas amiloide con una composición de láminas β se observa un desplazamiento batocrómico en su espectro de fluorescencia y además se observa un incremento de la intensidad en el espectro de emisión.²⁵ A pesar de su potencial como agente de tinción, este presenta limitaciones lo cual genera que no se pueda utilizar en estudios *in vivo*. Entre ellas está el que presenta una carga positiva lo cual genera dificultades para atravesar la barrera hematoencefálica. Por otro lado, su afinidad de unión a las fibrillas no es lo suficientemente alta. El esqueleto estructural de este colorante hispatológico ha servido como inspiración para la creación de derivados que presentan propiedades mejoradas con el fin de poder utilizarlos en estudios *in vivo* como, por ejemplo, un incremento de la lipofilidad con el fin de incrementar la permeabilidad a la BBB y que sea más potente.^{20,25}

Por otro lado, también se han reportado algunas sondas fluorescentes de infrarrojo cercano (NIRF) para EA que permiten la obtención de imágenes de formaciones A β y,

simultáneamente, inhiben su agregación.⁴⁴ La luz NIR es adecuada para la obtención de imágenes *in vivo* de un proceso molecular debido a su óptima profundidad de penetración, su funcionamiento no invasivo, y porque minimiza la autofluorescencia de la materia biológica (hemoglobina, melanina y lípidos) debido a que el rango espectral que se usa es entre los 650 y 990 nm.^{28,47}

Para que un compuesto sea un buen agente de imagen óptico debe cumplir lo siguiente: presentar una alta selectividad y una afinidad de unión a las placas A β (constante de inhibición (K_i) < 20nM), presentar una alta estabilidad metabólica, tener un alto rendimiento cuántico con un alto desplazamiento Stokes y, a su vez, ser capaz de entrar rápidamente en el cerebro tras una inyección intravenosa penetrando rápidamente la BBB.^{28,46} Para lograr las características descritas de un buen agente de imagen óptico, es necesario que el compuesto sea ligeramente lipofílico, que no presente carga y que, además, sea relativamente pequeño, con un límite de peso molecular de 600 Da.^{28,46} Esto es logrado principalmente por moléculas como las que se presentan a continuación. Debido al poco éxito en el desarrollo de nanomedicinas como agentes teragnósticos del Alzheimer, en la siguiente sección se desarrollarán aquellos agentes que presentan mejor prospecto: las moléculas orgánicas e inorgánicas pequeñas. Es importante recalcar que las moléculas que se van a mencionar no entran en el rango espectral NIR, no obstante, presentan un gran potencial teragnóstico.

3.1 Moléculas pequeñas orgánicas e inorgánicas

Los agentes que se describirán en este apartado se pueden apreciar en la Figura 11. El primer ejemplo a describir de este tipo de compuestos es el SLOH (Figura 11), un fluoróforo de cianina a base de carbazol que fue sintetizado por Li, Yung y Wong en el año 2012 y que ha mostrado un alto potencial como agente teragnóstico para la EA.⁴⁸ Su potencial radica en que permite visualizar la dinámica de la fibrillogénesis de A β (el cual implica la fase de nucleación y elongación) y, simultáneamente, inhibe su agregación previniendo el crecimiento de fibrillas.^{36,48} La estructura base en la cual se han enfocado para la síntesis de este agente teragnóstico son los fluoróforos de cianina a base de carbazol, estos tintes presentan propiedades que permiten la obtención de bioimágenes a partir de la excitación de dos fotones.^{48,49} Adicionalmente estos cromóforos de monocianina pueden enlazarse a los monómeros y agregados A β , seguido de un fuerte incremento de la fluorescencia.

Cuando SLOH está en presencia de péptidos o agregados A β_{1-40} en un medio de buffer de fosfato ocurre un incremento fuerte y progresivo de la intensidad de fluorescencia, seguido de un desplazamiento hipsocrómico del máximo de emisión (*blue shift*) debido a que cuando el péptido se enlaza con el fluoróforo este aumenta su rigidez, reduciendo el decaimiento no radiativo de la cianina fotoexcitada. Este comportamiento se puede observar en la Figura 12, en la cual se presenta esta molécula con una concentración variada de los péptidos y agregados A β_{1-40} en un buffer de fosfato.⁴⁶

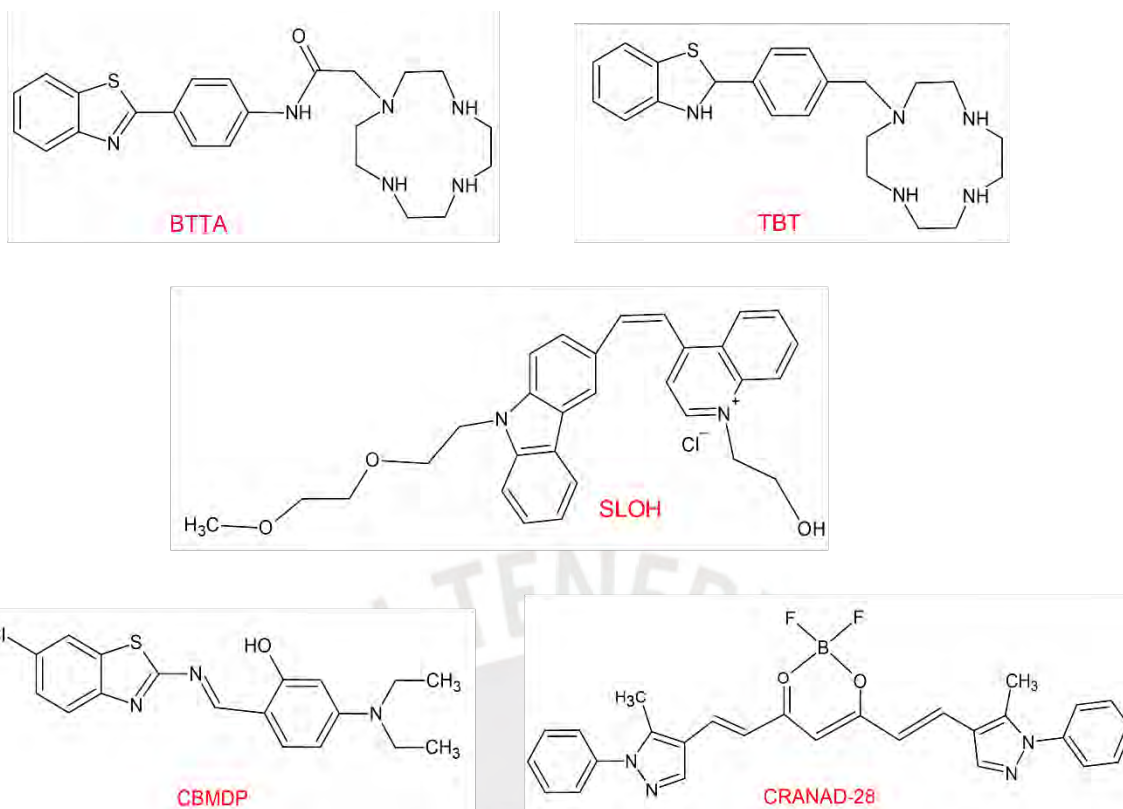


Figura 11: Estructura de los agentes teragnósticos descritos en este trabajo.

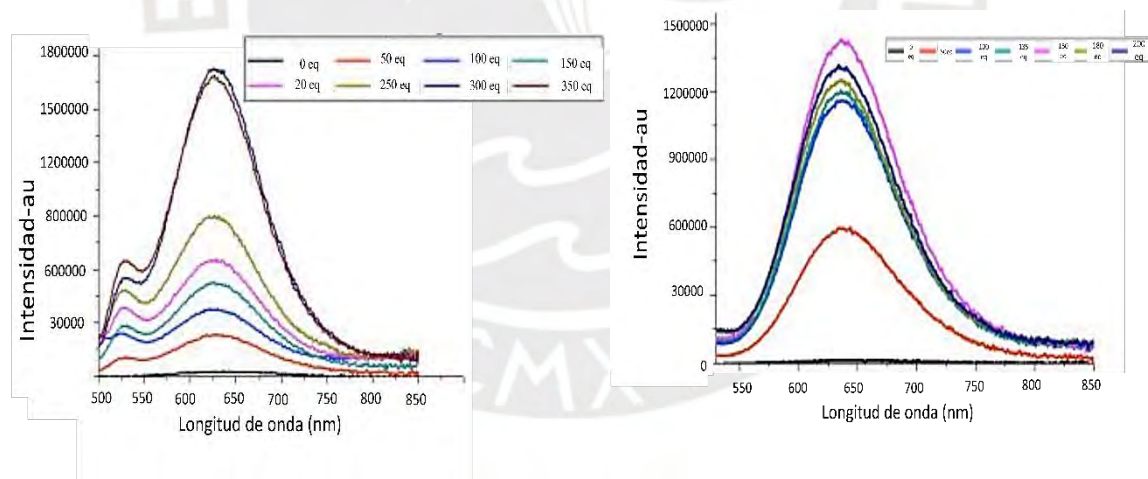


Figura 12: Espectro de fluorescencia de SLOH en un buffer de fosfato tras la adición de diferentes equivalentes del péptido A β ₁₋₄₀ y de la fibrilla A β ₁₋₄₀. El gráfico de la izquierda muestra el espectro de fluorescencia de SLOH en presencia de péptidos A β ₁₋₄₀ y en el de la derecha se muestra el espectro en presencia de fibrillas (Adaptado de la referencia 48).

El incremento de la fluorescencia de SLOH fue mucho más pronunciado con las fibrillas A β que con los péptidos A β ₁₋₄₀ monoméricos, lo cual es una virtud de este agente pues se sabe que las primeras son las especies más neurotóxicas. Ello se puede observar en la Figura 13 en la

que se muestra el espectro de fluorescencia de SLOH solo, SLOH con 100 equivalentes de péptido A β ₁₋₄₀ y SLOH con 100 equivalentes de fibrillas A β . En la tabla 1 se muestra la relación del aumento de la intensidad de fluorescencia medidos con 100 equivalentes de monómeros y con 100 equivalentes de fibrillas A β ₁₋₄₀, incremento que llega a ser de aproximadamente 82 veces al interactuar con las fibrillas amiloides.⁴⁸

Asimismo, se halló la constante de disociación (K_D) para determinar la afinidad de este fluoróforo hacia las fibrillas A β ₁₋₄₀ y se comparó con la de la Tioflavina-T (ThT). Este último colorante es el que comúnmente se usa para teñir a las fibrillas amiloides, el cual se une a las hojas β de estas últimas.⁴⁸ En la Tabla 1 se muestran los valores de ambas constantes de disociación medidas bajo las mismas condiciones.⁴⁸ Una menor constante de disociación de este fluoróforo implica que presenta una mayor afinidad hacia las fibrillas amiloides que el ThT, lo que indica que es un buen agente de tinción para las fibrillas, monómeros y placas amiloide.⁴⁸ Su potencial como agente de imagen se puede evidenciar en la Figura 14, en la que se puede visualizar una imagen directa de los péptidos A β y de las fibrillas utilizando microscopia de fluorescencia de reflexión total interna (TIRFM).⁴⁸

Por otro lado, su efecto terapéutico implica la inhibición de la agregación de los péptidos A β ₁₋₄₀.⁴⁸ Los autores de este estudio investigaron el mecanismo de la inhibición de la fibrillogénesis de A β ₁₋₄₀ por medio de la espectroscopía de dicroísmo circular (CD) con la que se evidencia que las fibrillas amiloide, al interactuar con esta molécula pierden o reducen su conformación de hojas β pasando a una nueva conformación lo cual puede darse por la formación de un aducto A β -SLOH.⁵⁰ El efecto inhibitor se puede observar en la Figura 15, en donde se muestra imágenes de las fibrillas que resultaron de la incubación de los monómeros A β ₁₋₄₀ por 24 horas en ausencia y en presencia de SLOH.

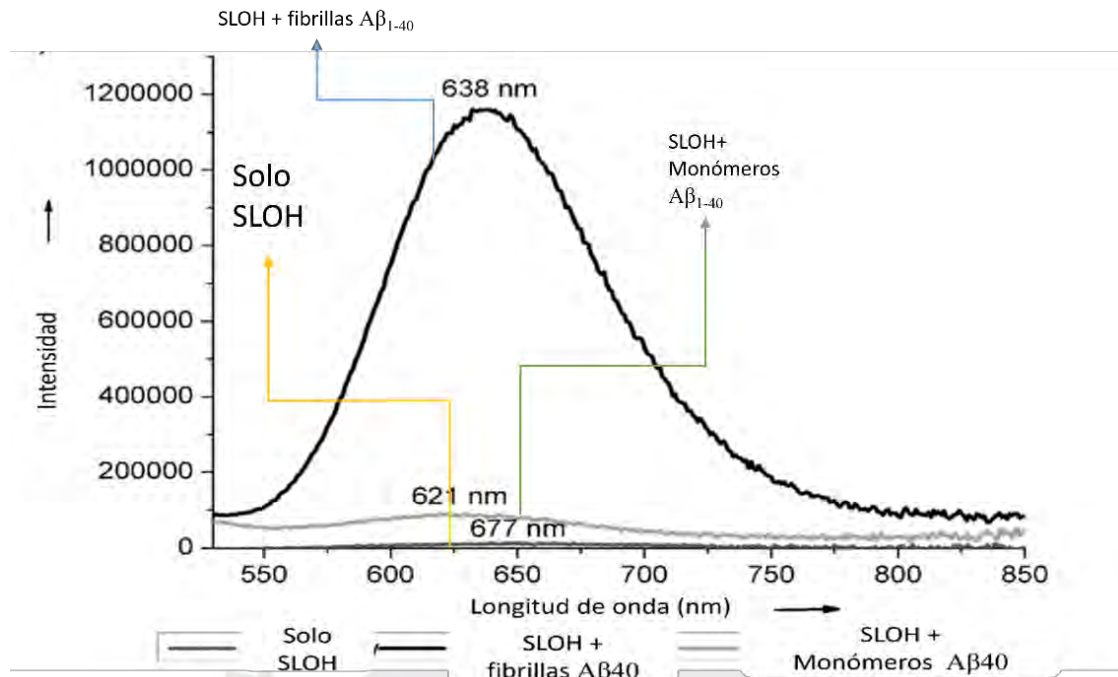


Figura 13: Espectro de fluorescencia del fluoróforo SLOH con fibrillas y péptidos A β (Adaptado de la referencia 48).

Se evaluó la citotoxicidad de este compuesto frente a células humanas del neuroblastoma SH-SY5Y observándose que no hay un efecto citotóxico significativo. Por otro lado, se observó un fuerte efecto neuroprotector de SLOH frente a la citotoxicidad inducida por oligómeros y fibrillas A β hacia las células SH-SY5Y y células corticales primarias de ratón.⁴⁸ Asimismo, es importante recalcar que llegó a atravesar con éxito la BBB en ratones transgénicos y además se obtuvo una tinción de las placas amiloide en estos ratones.⁴⁸

Tabla 1: Valores del incremento de la intensidad de fluorescencia y de las constantes de disociación (K_D) de SLOH. (Adaptado de la referencia 48)

$F_{\text{péptido}}/F_{\text{tinte}}$	6,3
$F_{\text{fibrillas}}/F_{\text{tinte}}$	81,5
K_D SLOH [μM]	92
K_D ThT [mM]	101

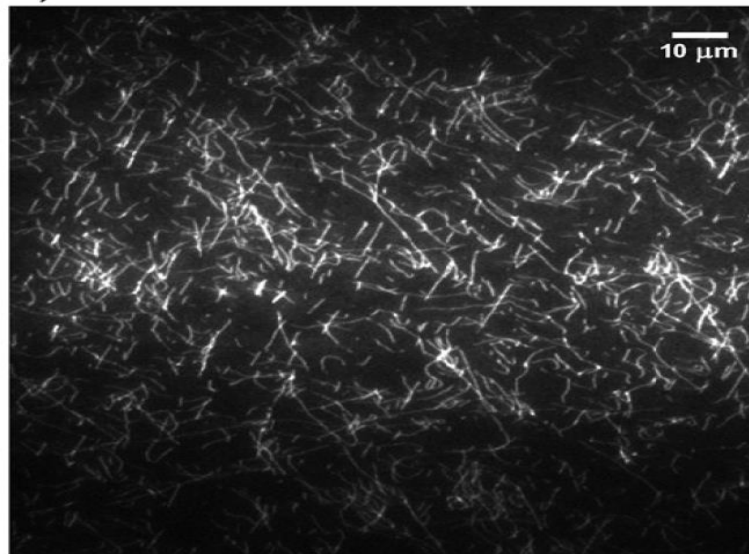


Figura 14: Imágenes TIRFM de las fibrillas $A\beta_{1-40}$ marcadas con SLOH (Adaptado de la referencia 48).

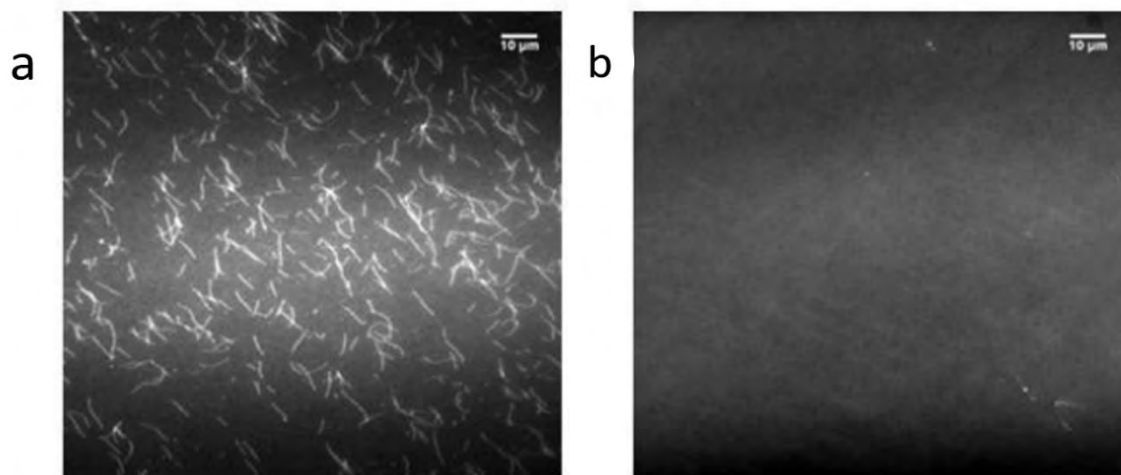


Figura 15: Imágenes TIRFM de las fibrillas amiloide en (a) ausencia y (b) presencia de SLOH (Adaptado de la referencia 48).

Otra investigación que muestra el diseño de un quelante fluorescente que actúa como un agente teragnóstico es la desarrollada por Tao *et al.*⁴⁵ Este quelante fluorescente BTTA (Figura 11), a diferencia del SLOH, basa su enfoque terapéutico en el protagonismo que presentan los iones metálicos en esta patología.⁴⁵ Ello se debe a que los complejos Cu-A β pueden acelerar la agregación A β y desencadenar los diversos efectos patológicos que conlleva esta enfermedad. Es por esta razón que la diana terapéutica de este agente es la especie Cu-A β . El agente quelante BTTA (Figura 11) tiene la capacidad de dirigirse hacia los agregados A β los cuales presentan iones Cu(II), y permite retirar este ion de estos agregados, y simultáneamente permite monitorear la disgregación de metal - A β a través de cambios en la fluorescencia.⁴⁵ La estrategia para la síntesis de este agente ha sido el crear una molécula conjugada en la cual se presentan dos motivos estructurales unidos por un enlace amida (el cual evita el efecto de transferencia de electrones fotoinducida): el ciclono y la BTA. El ciclono cumple el rol de unidad terapéutica, este es un agente quelante el cual se caracteriza por su alta eficacia en la modulación de la agregación A β inducida por metales. Por otro lado, se tiene a la anilina benzotiazol (BTA), análogo neutro de Tioflavina-T, la cual cumple el rol de agente de imagen. A diferencia de este agente fluorescente, BTA no presenta al nitrógeno heterocíclico cuaternario cargado positivamente por lo que presenta una carga neutra a pH fisiológico, además es más lipofílico y presenta una mayor afinidad de enlace hacia las fibrillas A β ₁₋₄₀.^{20,45,50}

BTTA no muestra ningún cambio en la fluorescencia al estar en contacto con la mayoría de iones metálicos, no obstante, presenta un cambio significativo al interactuar con el ion Cu(II), generando una disminución de su fluorescencia. Este comportamiento puede ser explicado debido a que hay una transferencia de energía del ligando excitado a los orbitales d del metal y/o a partir de una transferencia de carga del ligando al metal (LMCT). Ello conlleva a afirmar que presenta una alta selectividad hacia este ion metálico.⁵¹

En este estudio se calculó la constante de disociación de BTTA hacia el ion metálico Cu(II) y se corroboró que este quelante es lo suficientemente fuerte para competir con los agregados A β asociados al metal.^{45,52} Por otro lado, se confirmó que existe una alta sensibilidad y afinidad de este compuesto hacia este ion metálico.

Igualmente, se evaluaron las propiedades de enlace del compuesto hacia los agregados A β_{40} inducidos por Cu(II) y libres de este ion. Para ello, se añadió este compuesto a una solución de fibrillas A β_{40} en presencia de ThT. En la Figura 16 se muestran los resultados de este ensayo.⁴⁵ En este gráfico se observa la relación de intensidad de las emisiones de ThT *versus* la concentración de BTTA en soluciones de fibrillas A β_{40} con y sin iones Cu(II) y, como se puede evidenciar, hay una disminución de la intensidad de fluorescencia de ThT más notoria en la solución de agregados asociados a estos metales que a los que están libres. Ello lleva a pensar que BTTA presenta una mayor afinidad hacia los agregados A β_{40} asociados a este metal. Por otro lado, tiene sentido observar una disminución de la fluorescencia de ThT en la solución de agregados sin la presencia de Cu(II), ya que el grupo BTA tiene una estructura similar a ThT y es lógico que exista una competencia entre ambos por los mismos sitios de enlace, lo cual conlleva a una disminución de la intensidad de fluorescencia de Tioflavina-T.⁴⁵

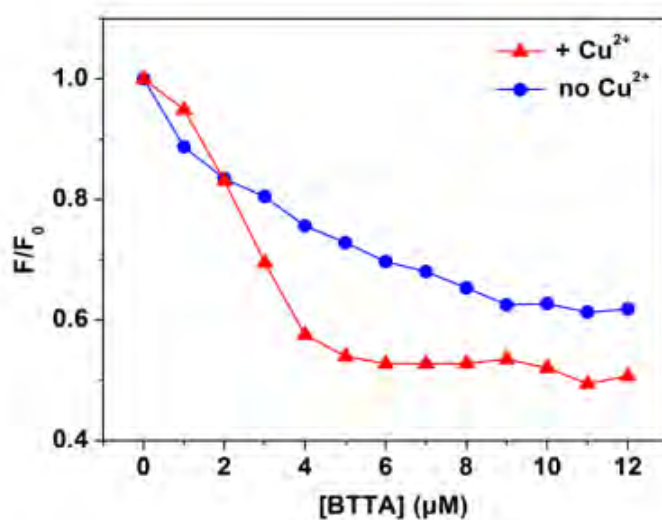


Figura 16: La relación de intensidad de las emisiones de ThT(F/F_0) vs la concentración de BTTA (Adaptado de la referencia 45).

El modo de enlace de BTTA hacia las especies $A\beta_{40}$ fue descrito utilizando estudios de *docking* usando AutoDock4. La interacción de los monómeros $A\beta_{40}$ con BTTA consiste primero en ubicar el grupo BTA entre los aminoácidos hidrofóbicos (Asn27, Ala30, Ile31, Leu 34 y Met35) e interacciones de puente de hidrógeno entre el cicleno y las cadenas laterales de Asp1, Ala2, Glu3 y Asp23 ubicadas en el fragmento N-terminal del péptido.⁴⁵ Por otro lado, con respecto a la interacción con fibrillas $A\beta_{40}$, el grupo BTA se sigue ubicando en las regiones centrales con los aminoácidos hidrofóbicos, mientras que en este caso hay una interacción de enlace de hidrógeno entre el grupo cicleno e Ile31.⁴⁵ En la Figura 17 se muestran las interacciones de puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de los aminoácidos mencionados. En la derecha se observa interacciones entre BTTA y fibrillas $A\beta_{40}$ y en la imagen de la izquierda se observan las interacciones entre BTTA y monómeros $A\beta_{40}$.⁴⁵ Adicionalmente, si se consideran agregados $A\beta_{40}$ asociados a Cu(II) se tendrían las interacciones mencionadas y, además, el enlace de coordinación fuerte entre este ion metálico (que está unido a los agregados $A\beta$) y el grupo cicleno del BTTA. Aquí el grupo cicleno captura a los iones Cu(II) enlazado a los agregados $A\beta$, atenuando su agregación.⁴⁵

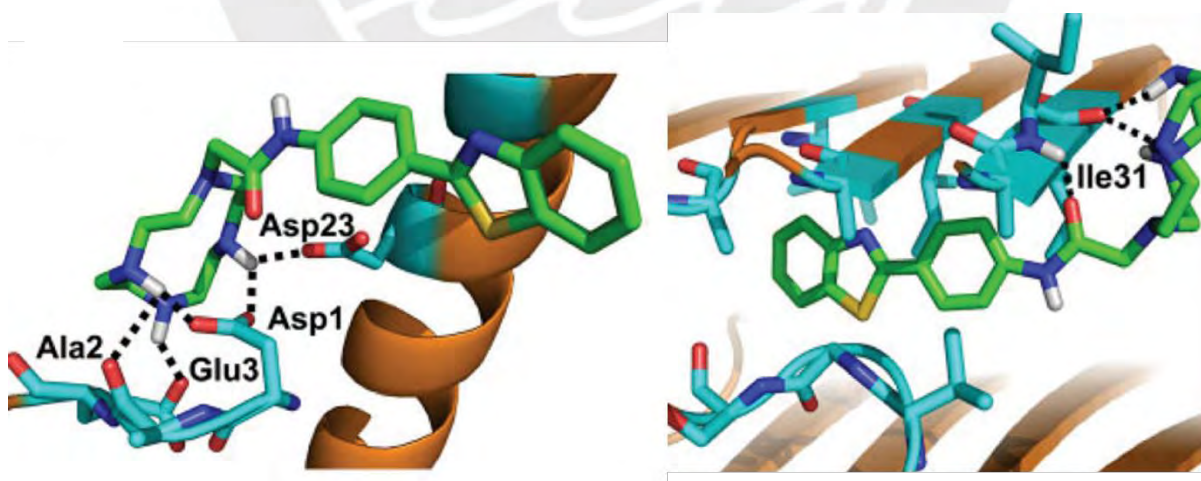


Figura 17: Interacciones hidrofóbicas entre fibrillas, monómeros y BTTA (Adaptado de la referencia 45).

Finalmente, mediante espectroscopia de dicroísmo circular (CD), se logró observar la capacidad de BTTA de desagregar los agregados A β asociados a Cu(II). Así, se observó que los agregados A β inducidos por este ion se pueden revertir convirtiendo su estructura enriquecida de hojas beta a una conformación amorfa.⁴⁵ Ello se corroboró con el ensayo de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 18), en el que se puede evidenciar el cambio conformacional de la estructura secundaria de los agregados A β inducidos por Cu(II) a estructuras amorfas al añadirles BTTA. Entre sus beneficios, además de atenuar la agregación A β también puede suprimir la neurotoxicidad provocada por Cu-A β *in vitro* en células PC12, además de ser capaz de penetrar la BBB *in vivo*. Sin embargo, este agente presenta limitaciones para la obtención de imágenes *in vivo* de estos agregados debido a su corta longitud de onda de fluorescencia, pero da pie a que investigaciones futuras puedan modificar sus propiedades funcionales y estructurales a partir de este andamiaje para lograr su aplicabilidad *in vivo*.⁴⁵

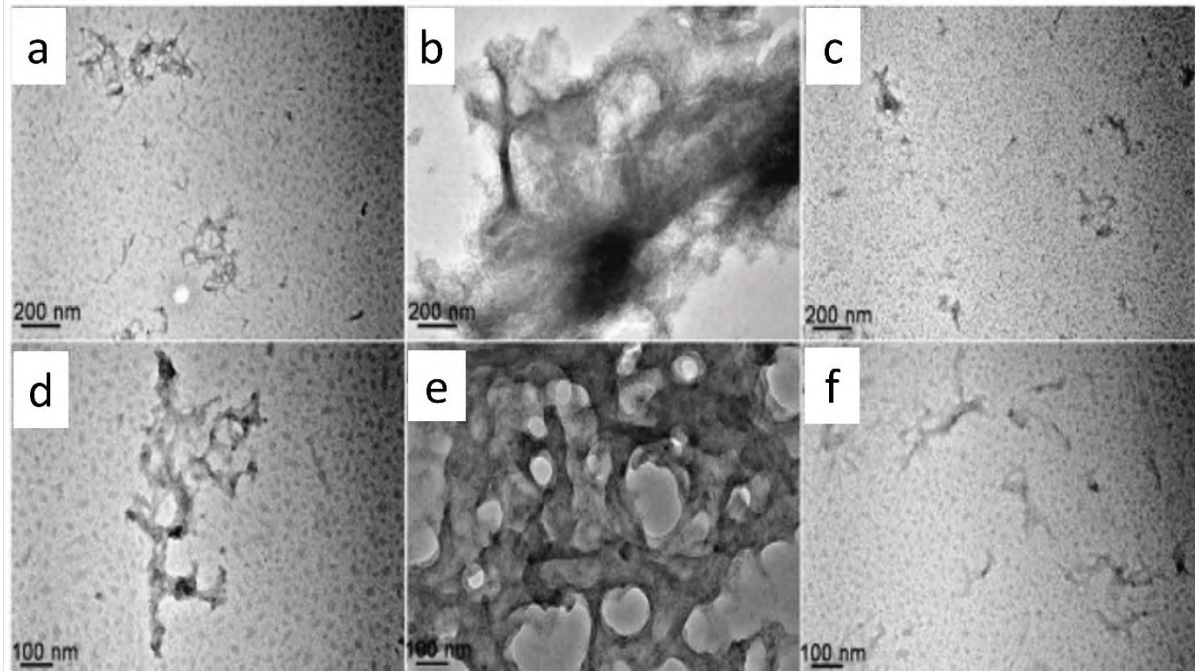


Figura 18: Imágenes TEM de las especies A β_{40} con 24 horas (a, b y c) y 48 horas de incubación (d, e y f). La figura a y d muestran al péptido A β , b y e muestra a A β + Cu(II), c y f muestran A β + Cu(II) + BTTA. (Adaptado de la referencia 45).

Yang y colaboradores también han sintetizado un agente teragnóstico que tiene un enfoque terapéutico parecido al de BTTA, este se llama TBT (Figura 11).⁵³ Este compuesto, al igual que el anterior, es una molécula conjugada que presenta una unidad de imagen y un agente terapéutico unidos por un enlace. La unidad terapéutica, la cual se encarga de modular la agregación de A β ₄₀ inducida por Cu(II) y Zn(II), es el ciclono y la unidad de imagen es 2-fenilbenzotiazol, análogo neutro de la ThT.⁵³ Este agente teragnóstico, además de atenuar la agregación de estas especies amiloides, permite visualizar y monitorear *in situ* la desagregación de las mismas a partir de su fluorescencia en tejido cerebral de ratón con EA. A diferencia de BTTA, el cual presenta selectividad hacia un ion metálico en específico, TBT presenta una alta afinidad hacia dos iones metálicos que están unidos a los agregados A β . Ello se ve reflejado en los cambios en la fluorescencia que presenta este agente bifuncional al coordinar con los iones metálicos de las especies Zn-A β y Cu-A β . Al interactuar con la especie Zn-A β se observa un incremento de la intensidad de fluorescencia de TBT, debido a que este ion metálico, tras la coordinación con el ciclono, bloquea el efecto de transferencia de electrones fotoinducido intramolecular (el cual desactiva la fluorescencia pues implica una transferencia de electrones de un donador a un aceptor en estado excitado).^{54,55} Este comportamiento no se observó en BTTA debido a que el enlace amida que unía a la molécula conjugada separaba lo suficiente a ambos grupos funcionales, evitando este efecto, por lo que no había una respuesta significativa en el cambio de fluorescencia cuando este quelante fluorescente estaba en presencia del ion Zn(II). Este efecto del incremento de la intensidad de fluorescencia de TBT en presencia de Zn(II) se puede observar en la Figura 19. Por otro lado, se observa una respuesta diferente al coordinarse con Cu(II) pues se observa una desactivación de la fluorescencia.

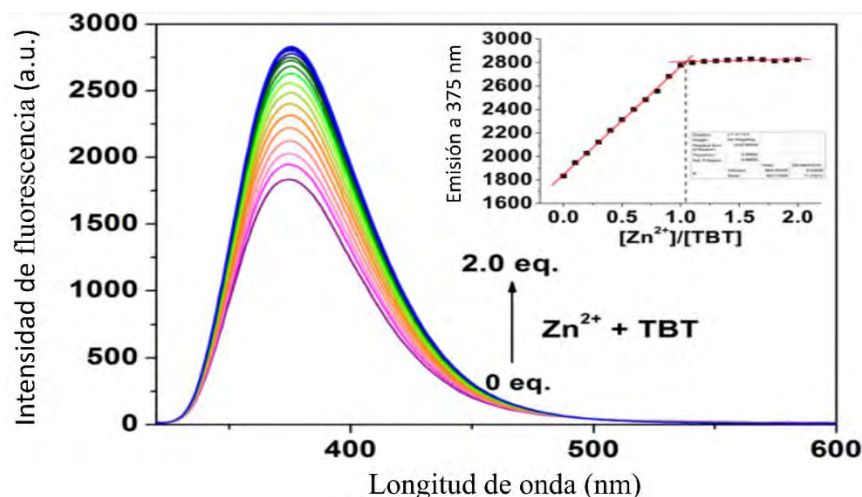


Figura 19: Espectro de fluorescencia de TBT tras la adición del ion Zn(II) en un buffer de 20mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 8% v/v DMSO, pH 7.4. En este gráfico se puede observar un incremento de la intensidad de fluorescencia al incrementar el número de equivalentes del ion. Por otro lado, se muestra una gráfica en donde se tienen a la intensidad de emisión a 375 nm variando la proporción de $[Zn]/[TBT]$ (Adaptado de la referencia 53).

La afinidad de enlace del agente teragnóstico hacia los agregados $A\beta_{40}$ fue estudiada utilizando un ensayo de competencia de fluorescencia con ThT (Figura 20). Para ello a una solución de agregados $A\beta_{40}$ -Zn/ $A\beta_{40}$ -Cu y agregados $A\beta_{40}$ libres de iones que contienen ThT se le añadió TBT. Lo que se observó es una disminución drástica de la intensidad de fluorescencia de ThT en la solución de agregados $A\beta_{40}$ -Zn/ $A\beta_{40}$ -Cu lo cual da a entender que TBT desplaza al agente fluorescente y se enlaza con estas especies a través de enlaces coordinativos con los metales e interacciones hidrofóbicas (los cuales fueron corroborados con estudios de *Docking* molecular).⁵³ Esta afinidad de enlace hacia los agregados $A\beta_{40}$ -Zn se corrobora con la constante de inhibición obtenida de TBT que fue de 1,62 μ M. Si bien se evidenció también una disminución de la intensidad de fluorescencia de ThT en la solución libre de iones metálicos, ello no fue tan notorio, lo cual respalda el que este agente quelante fluorescente presente una mayor afinidad hacia los agregados $A\beta_{40}$ -metales.⁵³

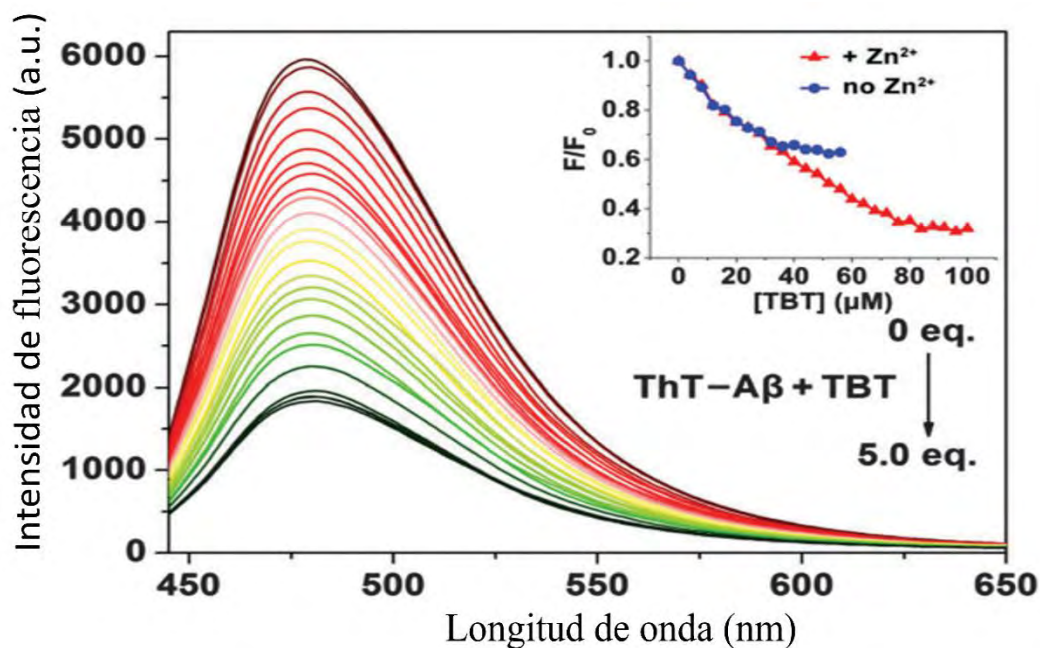


Figura 20: Espectro de fluorescencia de ThT en presencia de agregados $A\beta_{40}$ -Zn tras la adición continua de TBT. En la gráfica ubicada en la zona superior derecha se observa la relación de intensidad de emisión de ThT (F/F_0) vs la concentración de TBT. Tal y como se puede observar hay una disminución mucho más marcada de la intensidad de fluorescencia de ThT cuando TBT lo desplaza e interactúa con la especie $A\beta_{40}$ -Zn (Adaptado de la referencia 53).

Tal y como se mencionó, las interacciones entre las especies metal- $A\beta_{40}$ fueron estudiadas por *docking* molecular. En ella se pudo observar que la unidad de imagen se enlaza con los residuos hidrofóbicos de la región 23-30 del péptido $A\beta_{40}$ mientras que la unidad terapéutica se sitúa en la región N-terminal de $A\beta_{40}$ (cercano a los sitios de enlace de Zn(II) y Cu(II)). Se observan además puentes de hidrógeno entre TBT y Ser23, Asp23, Glu3 y Asp1. Su potencial como atenuador se comprobó utilizando espectroscopía de dicroísmo circular, en ella se pudo observar el cambio conformacional de la estructura secundaria de $A\beta_{40}$ cuando se le añadió TBT, pasando de estructuras enriquecidas en hojas β hacia conformaciones aleatorias. Se ha evidenciado que este compuesto presenta como beneficio el detoxificar la neurotoxicidad inducida por las especies metal- $A\beta_{40}$ en las células PC12 y, además, que puede atravesar la BBB en ratones de forma eficiente y puede ser fácilmente eliminado.⁵³

Otro compuesto con potencial teragnóstico fue sintetizado por Jadhao y colaboradores en el año 2016. Este compuesto es la base de Schiff basada en benzotiazol (*E*)-2-((6-

clorobenzo[d]tiazol-2-ylimino)metil)-5-dietilamino)fenol (CBMDP) (Figura 11), la cual presenta propiedades multifuncionales.⁵⁶ Por ejemplo, este compuesto actúa como un quelante de metales (Fe(II), Zn(II), Cu(II)), tiene las propiedades para atravesar la BBB, tiene una alta afinidad hacia los agregados A β así como también permite la obtención de imágenes de estos (es un fluoróforo que absorbe en UV) y también tiene la peculiaridad de actuar como un agente oxidante el cual permite frenar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).⁵⁶ Como unidad de diagnóstico presenta en su estructura a un derivado neutro y lipofílico de la ThT enlazado a la unidad terapéutica, la cual es el agente quelante clioquinol. Es importante recalcar que este compuesto cumple con la regla de cinco de Lipinski, la cual lista las características químicas que deben tener los compuestos que se quieran usar de forma farmacológica, y, además, presenta como ventaja el que pueda estabilizar a los monómeros, así como también retardar su proceso de agregación.⁵⁶

El reconocimiento y el enlace de CBMDP hacia los péptidos A β ₄₀ se evaluó a partir de mediciones espectroscópicas de fluorescencia en estado estacionario, así como también se utilizaron mediciones espectroscópicas de correlación de fluorescencia (FCS). Aquí se incubó A β ₄₀ con CBMDP y se midió la emisión de fluorescencia dando como resultado un incremento continuo de la intensidad de emisión del fluoróforo a medida que incrementaba el tiempo de incubación, lo que da a entender que puede haber una interacción entre ambos. Lo mencionado se puede observar en la Figura 21. Para distinguir si estas interacciones entre CBMDP se daban con agregados A β ₄₀ o con monómeros A β ₄₀, se utilizó la técnica de FCS. Gracias a estos estudios se pudo corroborar que este agente diagnóstico puede llegar a reconocer a los oligómeros A β ₄₀ y, lo que indica que este fluoróforo puede ser un agente de tinción específico hacia agregados amiloide, como lo es la ThT.

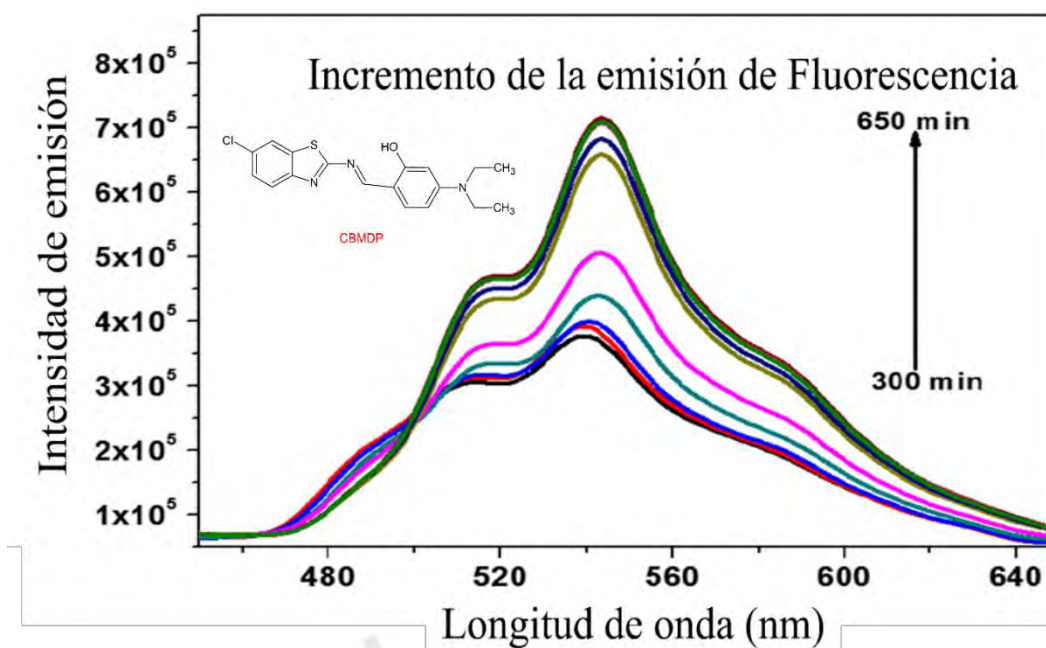


Figura 21: Gráfico de la intensidad de fluorescencia de emisión del CBMDP en presencia de $A\beta_{40}$. En este gráfico se puede observar un incremento de la intensidad de fluorescencia a medida que va incrementando el tiempo de incubación entre CBMDP y $A\beta_{40}$ (Adaptado de la referencia 56).

Por medio de técnicas como el *docking* molecular *in silico* y la simulación de la dinámica molecular (MD), se ha probado la especificidad de esta molécula hacia los péptidos $A\beta_{40}$, así como también se evaluó su propiedad de estabilizar a la estructura monomérica con el propósito de poder retrasar el proceso de agregación al enlazarse con la región amiloidógena. En estos estudios computacionales se comparó a CBMDP con el agente ThT. Según los datos computacionales de *docking* molecular, la interacción más favorable entre el CBMDP y $A\beta_{40}$ involucra interacciones de enlaces de hidrógeno e interacciones π - π .⁵⁶ Los enlaces de hidrógeno se pueden observar entre el oxígeno del hidroxilo y el nitrógeno del tiazol de CBMDP con los residuos polares de los aminoácidos Glu22 y Gln15 respectivamente.⁵⁶ Además, se dan interacciones *edge-to-face* π - π entre los anillos fenilos del compuesto y el anillo imidazol de His6 e His14 de $A\beta_{40}$. Según lo que se reporta en el estudio la distancia de enlace entre esta interacción es de menos 5.5 Å, por lo que se comprueba es que esta interacción es muy fuerte. Además, este compuesto presenta una mejor interacción con el péptido que la ThT, en el cual solo se puede observar interacciones *edge-to-face* π - π con His6 y con Phe4.⁵⁶ Las interacciones

de CBMDP con el péptido A β ₄₀ se observan en la Figura 22. Se menciona de igual forma que CBMDP se enlaza a la región amiloidogénica (KLVFFA), especialmente cerca a los sitios de enlace con metales.⁵⁶

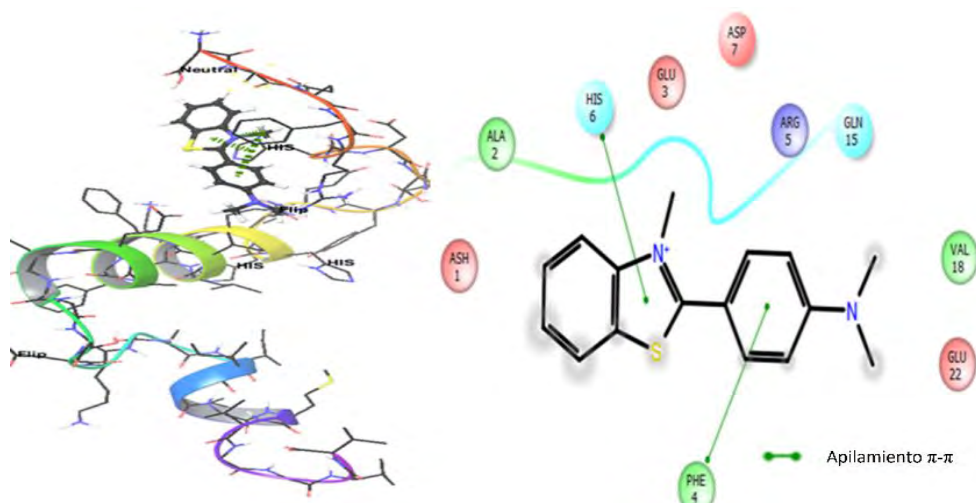


Figura 22: Interacciones en 2D y 3D del péptido A β con CBMDP. Las interacciones encerradas en círculo amarillo son interacciones π - π , mientras que los encerrados en blanco son de puentes de hidrógeno (Adaptado de 56).

El ligando CBMDP es un ligando bidentado, el cual forma complejos del tipo ML₂ con una geometría cuadrada plana al coordinarse con los metales, y forma complejos termodinámicamente estables con Fe(II), Cu(II) y Zn(II) (el ligando presenta una mayor afinidad hacia el Cu(II)).⁵⁶ Se estudió la actividad quelante de CBMDP al incubarlo con iones Cu(II) y lo que se observó fue una disminución drástica de la intensidad de fluorescencia de CBMDP, así como también un efecto hipsocrómico en el espectro de absorción. La constante de formación del complejo Cu-CBMDP es de $2,4235 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, lo que implica que están fuertemente enlazados.⁵⁶

A su vez, se investigó el efecto de este ligando en la agregación de A β ₄₀ inducidos por Cu(II). Para ello se realizó ensayos con ThT y se monitoreó su agregación. Se comparó la fluorescencia de ThT en presencia de A β ₄₀ y ThT en presencia de A β ₄₀-Cu y se observó un incremento notorio

de la intensidad de fluorescencia en el segundo caso, lo cual puede atribuirse a la presencia de este ion, el que induce una rápida agregación. Por otro lado, cuando se añadió CBMDP, la intensidad de la fluorescencia se redujo en ambos casos, lo que indicaría que CBMDP puede reducir la agregación de $A\beta_{40}$ inducida por este metal a través de la captura de este ion metálico o interfiriendo en los sitios de coordinación entre $Cu(II)$ y $A\beta_{40}$, tal como se puede observar en la Figura 23.⁵⁶ Es importante recalcar que, tal y como se observa en la Figura 23, hay un efecto de retardo en la agregación de $A\beta_{40}$ en presencia de CBMDP. Este último no impide la agregación del péptido, pero, ciertamente, retarda su rápida agregación.⁵⁶

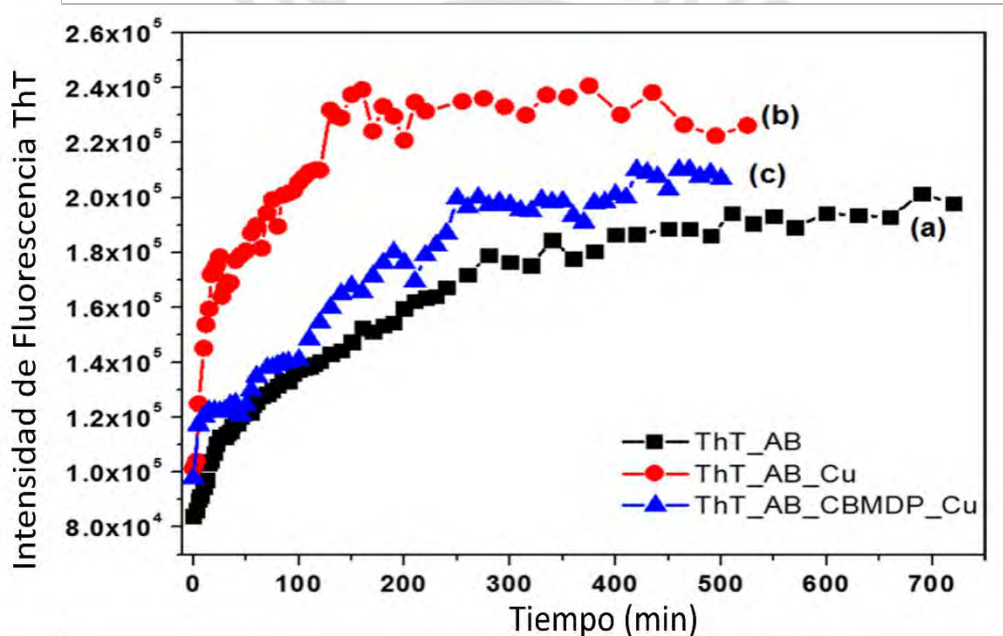


Figura 23: Monitoreo de la cinética de agregación de $A\beta_{40}$ utilizando el agente de tinción ThT, en presencia de péptido, CBMDP y el ion $Cu(II)$ (Adaptado de la referencia 56).

Finalmente, Zhang y colaboradores reportaron en el año 2014 un derivado de curcumina CRANAD-28 (Figura 24) que presenta propiedades teragnósticas.⁵⁷ Este compuesto permite la obtención de imágenes *in vivo* de las placas amiloide y la angiopatía cerebral amiloide utilizando la técnica de microscopía de dos fotones o también conocida como multifotónica. Entre sus propiedades terapéuticas se encuentra el que puede atenuar la agregación de $A\beta$

inducida por iones metálicos o por condiciones naturales. El andamiaje base que se utiliza en este compuesto es la curcumina, la cual presenta propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, además de ser un agente antiagregante de especies amiloides.⁵⁸⁻⁶⁰ El CRANAD-28 presenta en su estructura tautomerismo ceto-enol que genera que la molécula posea una larga cadena de carbonos conjugada presentando propiedades fluorescentes.⁵⁸⁻⁶⁰ Asimismo, este análogo de curcumina exhiben su estructura al anillo pirazol (sustituido en la posición N-1 por un fenilo) el cual le confiere un mayor rendimiento cuántico debido a que este grupo minimiza la tautomerización generando una disminución de los mecanismos del decaimiento de emisión no radiativa.⁵⁷ Además de ello, los autores de este estudio especulan que este compuesto presenta propiedades de atenuación de la agregación de A β inducida por Cu(II) debido a que puede coordinar con este ion.⁵⁷

Para evaluar la interacción de CRANAD-28 con los agregados A β , se incubaron los monómeros A β_{40} y A β_{42} , dímeros y oligómeros A β , así como también agregados A β_{40} con este compuesto y lo que se pudo observar en todos los casos fue que la intensidad de emisión del fluoróforo disminuyó, tal como se muestra en la Figura 24. Ello da a entender de que hay una interacción entre este agente teragnóstico y las especies A β , aunque el mecanismo por el cual ocurre esta desactivación no se conoce. Asimismo, para evaluar su potencial como agente de tinción se comparó su actividad con la Tioflavina-S (el cual es un agente de tinción de las placas amiloide) tiñendo cortes cerebrales de un ratón transgénico de 18 meses APP/PS1. Se corroboró que los patrones de distribución de las placas amiloide teñidas obtenidas con CRANAD-28 eran muy similares al obtenido con el agente de Tioflavina.⁵⁷

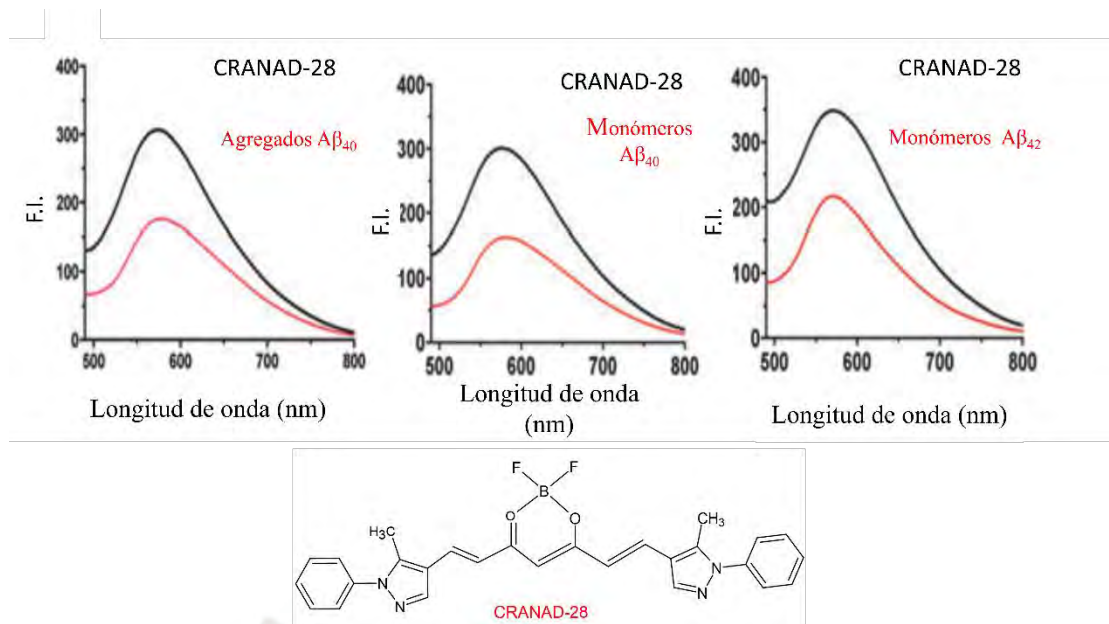


Figura 24: Espectro de fluorescencia de CRANAD-28 en presencia de especies A β (Adaptado de la referencia 57).

La propiedad atenuante sobre la agregación A β_{42} inducida por el Cu(II) y bajo condiciones naturales se comprobó con la técnica *Western Blot*. Para ello se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) y se usó FAM como colorante afin hacia A β_{42} . Se sospecha que la propiedad como agente quelante de este compuesto recae en el anillo pirazol de su estructura pues este puede coordinar con el ion cobre compitiendo con los aminoácidos H13 e H14 de los agregados A β , removiendo a este ion de los agregados Cu - A β y atenuando su formación.⁵

Así, en este trabajo se han presentado cinco moléculas pequeñas que muestran características bifuncionales, por un lado, como agentes de imagen de fluorescencia y como agentes terapéuticos en base a su acción inhibitoria de la agregación de A β . En la gran mayoría de los agentes que se han mencionado, sus funciones terapéuticas se basan en sus propiedades atenuantes por medio de la quelación de metales (Cu(II), Zn(II)) enlazados a agregados A β y/o por la modificación de la estructura secundaria (hojas β) de estos hacia estructuras amorfas. Por otro lado, es importante recalcar que cada una de las moléculas mencionadas tiene un gran potencial teragnóstico, presenta una respuesta resaltante en su intensidad de fluorescencia al

estar en contacto con fibrillas A β y, como característica adicional, algunas de ellas presentan un efecto neuroprotector de la toxicidad inducida por estos agregados.



4. Conclusiones

Existen diversos inconvenientes para encontrar un tratamiento eficaz para el Alzheimer y entre ellos está la compleja naturaleza de esta enfermedad y los limitados medios de diagnóstico certero de la misma. Por ello, se tiene como objetivo el diagnóstico temprano de la enfermedad, el seguimiento de esta y, además, encontrar tratamientos modificadores que permitan un retraso o detención del progreso de EA.

El campo teragnóstico representa la posibilidad de incluir en el mismo vehículo, el método de diagnóstico y tratamiento, de forma simultánea. Tal y como se ha descrito en el documento estos cinco agentes teragnósticos, en su mayoría, presentan una mayor afinidad hacia las placas amiloide que la Tioflavina-T e inclusive pueden discriminar a las fibrillas amiloide de los monómeros amiloide lo cual es muy ventajoso. Muchos de estos compuestos presentan, además de su afinidad por formaciones amiloides, propiedades antiagregantes a partir de la terapia quelante, son modificadores de la superficie de las fibrillas o inclusive han llegado a cambiar las estructuras secundarias de los agregados A β . Se puede observar que estas presentan un gran potencial pues han logrado atravesar la BBB con éxito, y han permitido una tinción de las fibrillas amiloide en estudios *in vitro*, lo cual abre la posibilidad de que algunas puedan utilizarse en estudios *in vivo*. Por otro lado, es importante resaltar que la gran mayoría presenta un efecto neuroprotector de la toxicidad inducida por estos agregados lo cual es una ventaja adicional que dan estos agentes teragnósticos además de cumplir con su propósito de antiagregante e imagen fluorescente. Algunas de estas moléculas presentan un gran potencial para la obtención de imágenes *in vivo*, mientras que otras se ven limitadas por su corta longitud de onda de emisión. Por ello, se sugiere el estudio de agentes teragnósticos que presenten motivos estructurales parecidos a los ya mencionados pero con modificaciones estructurales que permita que su longitud de onda de emisión se encuentre en el rango NIR pues, como se

mencionó, esto garantizaría una óptima profundidad de penetración y minimizaría la autofluorescencia, lo cual haría adecuados a estos agentes para su aplicación *in vivo*.



5. Referencias

- (1) *Dementia*. World Health Organization (WHO). <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/dementia> (accedido el 2022-10-07).
- (2) Kiely, K. M. Cognitive Function. En *Encyclopedia of Quality of Life and Well-Being Research*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2014; pp 974–978. DOI: 10.1007/978-94-007-0753-5_2939
- (3) 2022 Alzheimer’s Disease Facts and Figures. *Alzheimer’s Dementia*. **2022**, *18* (4), 700–789. DOI: 10.1002/alz.12638
- (4) Alzheimer’s Association. *¿Qué es la demencia?*. <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/que-es-la-demencia> (accedido el 2022-10-07).
- (5) Liu, H.; Qu, Y.; Wang, X. Amyloid β -Targeted Metal Complexes for Potential Applications in Alzheimer’s Disease. *Future Med. Chem.* **2018**, *10* (6), 679–684. DOI: 10.4155/fmc-2017-0248
- (6) Golde, T. E. Alzheimer’s Disease – the Journey of a Healthy Brain into Organ Failure. *Mol. Neurodegener.* **2022**, *17* (1), 1-19. DOI: 10.1186/s13024-022-00523-1
- (7) Duthey, B; Tanna, S. Priority Medicines for Europe and the World “A Public Health Approach to Innovation” Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias - Update on 2004 Background Paper. **2013**.
- (8) Lashley, T.; Schott, J. M.; Weston, P.; Murray, C. E.; Wellington, H.; Keshavan, A.; Foti, S. C.; Foiani, M.; Toombs, J.; Rohrer, J. D.; Heslegrave, A.; Zetterberg, H. Molecular Biomarkers of Alzheimer’s Disease: Progress and Prospects. *Dis. Models Mech.* **2018**, *11* (5), 1–9. DOI: 10.1242/dmm.031781
- (9) Kepp, K. P. Bioinorganic Chemistry of Alzheimer’s Disease. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (10), 5193–5239. DOI: 10.1021/cr300009x
- (10) LaFerla, F. M.; Green, K. N.; Oddo, S. Intracellular Amyloid- β in Alzheimer’s Disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8* (7), 499–506. DOI: 10.1038/nrn2168
- (11) Mattson, M. P. Pathways towards and Away from Alzheimer’s Disease. *Nature* **2004**, *430*, 631–639. DOI:1038/nature02621
- (12) Dubois, B.; Hampel, H.; Feldman, H. H.; Scheltens, P.; Aisen, P.; Andrieu, S.; Bakardjian, H.; Benali, H.; Bertram, L.; Blennow, K.; Broich, K.; Cavado, E.; Crutch, S.; Dartigues, J.-F.; Duyckaerts, C.; Epelbaum, S.; Frisoni, G. B.; Gauthier, S.; Genthon, R.; Gouw, A. A.; Habert, M.-O.; Holtzman, D. M.; Kivipelto, M.; Lista, S.; Molinuevo, J.-L.; O’Bryant, S. E.; Rabinovici, G. D.; Rowe, C.; Salloway, S.; Schneider, L. S.; Sperling, R.; Teichmann, M.; Carrillo, M. C.; Cummings, J.; Jack, C. R. Preclinical Alzheimer’s Disease: Definition, Natural History, and Diagnostic Criteria. *Alzheimer’s Dementia*. **2016**, *12* (3), 292–323. DOI: 10.1016/j.jalz.2016.02.002
- (13) Sperling, R. A.; Aisen, P. S.; Beckett, L. A.; Bennett, D. A.; Craft, S.; Fagan, A. M.; Iwatsubo, T.; Jack, C. R.; Kaye, J.; Montine, T. J.; Park, D. C.; Reiman, E. M.; Rowe, C. C.; Siemers, E.; Stern, Y.; Yaffe, K.; Carrillo, M. C.; Thies, B.; Morrison-Bogorad, M.; Wagster, M. V.; Phelps, C. H. Toward Defining the Preclinical Stages of Alzheimer’s Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer’s Disease. *Alzheimer’s Dementia*. **2011**, *7* (3), 280–292. DOI: 10.1016/j.jalz.2011.03.003
- (14) Alzheimer’s Association. *Deterioro cognitivo leve (DCL)*. https://www.alz.org/demencia-alzheimer/que-es-demencia/condiciones_relacionados/deterioro-cognitivo-leve (accedido el 2022-10-07).
- (15) Petersen, R. C.; Lopez, O.; Armstrong, M. J.; Getchius, T. S. D.; Ganguli, M.; Gloss, D.; Gronseth, G. S.; Marson, D.; Pringsheim, T.; Day, G. S.; Sager, M.; Stevens, J.; Rae-Grant,

- A. Practice Guideline Update Summary: Mild Cognitive Impairment. *Neurology* **2018**, *90* (3), 126–135. DOI: 10.1212/WNL.0000000000004826
- (16) Albert, M. S.; DeKosky, S. T.; Dickson, D.; Dubois, B.; Feldman, H. H.; Fox, N. C.; Gamst, A.; Holtzman, D. M.; Jagust, W. J.; Petersen, R. C.; Snyder, P. J.; Carrillo, M. C.; Thies, B.; Phelps, C. H. The Diagnosis of Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer's Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Dementia*. **2011**, *7* (3), 270–279. DOI: 10.1016/j.jalz.2011.03.008
- (17) Dickerson, B. C.; Eichenbaum, H. The Episodic Memory System: Neurocircuitry and Disorders. *Neuropsychopharmacology* **2010**, *35* (1), 86–104. DOI: 10.1038/npp.2009.126
- (18) Alzheimer's Association. *Alzheimer's Stages - Early, Middle, Late Dementia Symptoms*. <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/stages> (accedido el 2022-10-07).
- (19) MedlinePlus enciclopedia médica. *Neumonía por aspiración*. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000121.htm> (accedido el 2022-12-02).
- (20) Bolognesi, M. L. From Imaging Agents to Theranostic Drugs in Alzheimer's Disease. En *Comprehensive Medicinal Chemistry III*; Elsevier, 2017; pp 74–106. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.12285-1
- (21) Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H. Alzheimer's Disease. *Lancet* **2006**, *368* (9533), 387–403. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69113-7
- (22) Bu, XL.; Rao, P. P. N.; Wang, YJ. Anti-Amyloid Aggregation Activity of Natural Compounds: Implications for Alzheimer's Drug Discovery. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53* (6), 1–11. DOI: 10.1007/s12035-015-9301-4
- (23) Storr, T. Multifunctional Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Can. J. Chem.* **2020**, *99* (1), 1–9. DOI: 10.1139/cjc-2020-0279
- (24) Graham, W. V.; Bonito-Oliva, A.; Sakmar, T. P. Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu. Rev. Med.* **2017**, *68* (1), 413–430. DOI: 10.1146/annurev-med-042915-103753
- (25) Bolognesi, M. L. Amyloid Chemical Probes and Theranostics: Steps Toward Personalized Medicine in Neurodegenerative Diseases. En *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*; Lackey, K., Roth, B. D., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2013; pp 211–225. DOI: 10.1002/9783527677252.ch09
- (26) Kung, H. F. The β -Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease: Seeing Is Believing. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3* (4), 265–267. DOI: doi.org/10.1021/ml300058m
- (27) Hardy, J. A.; Higgins, G. A. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* **1992**, *256* (5054), 184–185. DOI: 10.1126/science.1566067
- (28) Cui, M. Past and Recent Progress of Molecular Imaging Probes for β -Amyloid Plaques in the Brain. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21* (1), 82–112. DOI: 10.2174/09298673113209990216
- (29) Amiri, H.; Saeidi, K.; Borhani, P.; Manafirad, A.; Ghavami, M.; Zerbi, V. Alzheimer's Disease: Pathophysiology and Applications of Magnetic Nanoparticles as MRI Theranostic Agents. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4* (11), 1417–1429. <https://doi.org/10.1021/cn4001582>
- (30) Ittner, L. M.; Götze, J. Amyloid- β and Tau — a Toxic Pas de Deux in Alzheimer's Disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, *12* (2), 67–72. DOI: 10.1038/nrn2967
- (31) Olney, N. T.; Spina, S.; Miller, B. L. Frontotemporal Dementia. *Neurol. Clin.* **2017**, *35* (2), 339–374. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2017.01.008>
- (32) Jakob-Roetne, R.; Jacobsen, H. Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angew. Chem.* **2009**, *48* (17), 3030–3059. DOI: 10.1002/anie.200802808
- (33) Hernández, F.; Avila, J. Tauopathies. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64* (17), 2219–2233. DOI: 10.1007/s00018-007-7220-x

- (34) Blennow, K.; Mattsson, N.; Schöll, M.; Hansson, O.; Zetterberg, H. Amyloid Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36* (5), 297–309. DOI: 10.1016/j.tips.2015.03.002
- (35) Drake, L. R.; Pham, J. M.; Desmond, T. J.; Mossine, A. V.; Lee, S. J.; Kilbourn, M. R.; Koeppe, R. A.; Brooks, A. F.; Scott, P. J. H. Identification of AV-1451 as a Weak, Nonselective Inhibitor of Monoamine Oxidase. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10* (8), 3839–3846. DOI: 10.1021/acschemneuro.9b00326
- (36) Bolognesi, M. L.; Gandini, A.; Prati, F.; Uliassi, E. From Companion Diagnostics to Theranostics: A New Avenue for Alzheimer's Disease?. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (17), 7759–7770. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00151
- (37) Santos, M. A.; Chand, K.; Chaves, S. Recent Progress in Repositioning Alzheimer's Disease Drugs Based on a Multitarget Strategy. *Future Med. Chem.* **2016**, *8* (17), 1-30. DOI: 10.4155/fmc-2016-0103
- (38) Wong, K.; Riaz, M.; Xie, Y.; Zhang, X.; Liu, Q.; Chen, H.; Bian, Z.; Chen, X.; Lu, A.; Yang, Z. Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (2), 1-26. DOI: 10.3390/ijms20020381
- (39) Rajasekhar, K.; Chakrabarti, M.; Govindaraju, T. Function and Toxicity of Amyloid Beta and Recent Therapeutic Interventions Targeting Amyloid Beta in Alzheimer's Disease. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (70), 13434–13450. <https://doi.org/10.1039/C5CC05264E>
- (40) Mayo Clinic. ¿Qué nuevos tratamientos de la enfermedad de Alzheimer se acercan?. <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers-treatments/art-20047780> (accedido el 2022-11-10).
- (41) Alzheimer's Association. *Aducanumab Approved for Treatment of Alzheimer's Disease*. <https://alz.org/alzheimers-dementia/treatments/aducanumab> (accedido el 2022-11-10).
- (42) Sala Frigerio, C.; De Strooper, B. Alzheimer's Disease Mechanisms and Emerging Roads to Novel Therapeutics. *Annu. Rev. Neurosci.* **2016**, *39* (1), 57–79. DOI: 10.1146/annurev-neuro-070815-014015
- (43) Kelkar, S. S.; Reineke, T. M. Theranostics: Combining Imaging and Therapy. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (10), 1879–1903. DOI: 10.1021/bc200151q
- (44) Cantore, M. New Perspective in Alzheimer's Disease: Theranostic Strategy. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* **2019**, *15* (1). DOI: 10.26717/BJSTR.2019.15.002648
- (45) Yang, T.; Yang, L.; Zhang, C.; Wang, Y.; Ma, X.; Wang, K.; Luo, J.; Yao, C.; Wang, X.; Wang, X. A Copper–Amyloid- β Targeted Fluorescent Chelator as a Potential Theranostic Agent for Alzheimer's Disease. *Inorg. Chem. Front.* **2016**, *3* (12), 1572–1581. DOI: 10.1039/C6QI00268D
- (46) Nesterov, E. E.; Skoch, J.; Hyman, B. T.; Klunk, W. E.; Bacskai, B. J.; Swager, T. M. In Vivo Optical Imaging of Amyloid Aggregates in Brain: Design of Fluorescent Markers. *Angew. Chem.* **2005**, *44* (34), 5452–5456. DOI: 10.1002/anie.200500845
- (47) Dao, P.; Ye, F.; Liu, Y.; Du, Z. Y.; Zhang, K.; Dong, C. Z.; Meunier, B.; Chen, H. Development of Phenothiazine-Based Theranostic Compounds That Act Both as Inhibitors of β -Amyloid Aggregation and as Imaging Probes for Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8* (4), 798–806. DOI: 10.1021/acschemneuro.6b00380
- (48) Yang, W.; Wong, Y.; Ng, O. T. W.; Bai, L.-P.; Kwong, D. W. J.; Ke, Y.; Jiang, Z.-H.; Li, H.-W.; Yung, K. K. L.; Wong, M. S. Inhibition of Beta-Amyloid Peptide Aggregation by Multifunctional Carbazole-Based Fluorophores. *Angew. Chem.* **2011**, *51* (8), 1804–1810. DOI: 10.1002/anie.201104150
- (49) Feng, X. J.; Wu, P. L.; Bolze, F.; Leung, H. W. C.; Li, K. F.; Mak, N. K.; Kwong, D. W. J.; Nicoud, J.-F.; Cheah, K. W.; Wong, M. S. Cyanines as New Fluorescent Probes for

- DNA Detection and Two-Photon Excited Bioimaging. *Org. Lett.* **2010**, *12* (10), 2194–2197. DOI: 10.1021/ol100474b
- (50) Klunk, W. E.; Wang, Y.; Huang, G. F.; Debnath, M. L.; Holt, D. P.; Mathis, C. A. Uncharged Thioflavin-T Derivatives Bind to Amyloid-Beta Protein with High Affinity and Readily Enter the Brain. *Life Sci.* **2001**, *69* (13), 1471–1484. DOI: 10.1016/s0024-3205(01)01232-2
- (51) Jung, H. S.; Kwon, P. S.; Lee, J. W.; Kim, J. I.; Hong, C. S.; Kim, J. W.; Yan, S.; Lee, J. Y.; Lee, J. H.; Joo, T.; Kim, J. S. Coumarin-Derived Cu²⁺-Selective Fluorescence Sensor: Synthesis, Mechanisms, and Applications in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (5), 2008–2012. DOI: 10.1021/ja808611d
- (52) Faller, P.; Hureau, C. Bioinorganic Chemistry of Copper and Zinc Ions Coordinated to Amyloid- β Peptide. *Dalton Trans.* **2009**, No. 7, 1080–1094. DOI: 10.1039/B813398K.
- (53) Yang, T.; Wang, X.; Zhang, C.; Ma, X.; Wang, K.; Wang, Y.; Luo, J.; Yang, L.; Yao, C.; Wang, X. Specific Self-Monitoring of Metal-Associated Amyloid- β Peptide Disaggregation by a Fluorescent Chelator. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (11), 2245–2248. DOI: 10.1039/C5CC08898D
- (54) Tamanini, E.; Flavin, K.; Motevalli, M.; Piperno, S.; Gheber, L. A.; Todd, M. H.; Watkinson, M. Cyclam-Based “Clickates”: Homogeneous and Heterogeneous Fluorescent Sensors for Zn(II). *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (8), 3789–3800. DOI: 10.1021/ic901939x
- (55) Escudero, D. Revising Intramolecular Photoinduced Electron Transfer (PET) from First-Principles. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49* (9), 1816–1824. DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00299.
- (56) Jadhao, M.; Das, C.; Rawat, A.; Kumar, H.; Joshi, R.; Maiti, S.; Ghosh, S. K. Development of Multifunctional Heterocyclic Schiff Base as a Potential Metal Chelator: A Comprehensive Spectroscopic Approach towards Drug Discovery. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, *22* (1), 47–59. DOI: 10.1007/s00775-016-1407-2.
- (57) Zhang, X.; Tian, Y.; Yuan, P.; Li, Y.; Yaseen, M. A.; Grutzendler, J.; Moore, A.; Ran, C. A Bifunctional Curcumin Analogue for Two-Photon Imaging and Inhibiting Crosslinking of Amyloid Beta in Alzheimer’s Disease. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (78), 11550–11553. DOI: 10.1039/C4CC03731F
- (58) Shishodia, S.; Sethi, G.; Aggarwal, B. B. Curcumin: Getting Back to the Roots. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1056* (1), 206–217. DOI: 10.1196/annals.1352.010
- (59) Ran, C.; Xu, X.; Raymond, S. B.; Ferrara, B. J.; Neal, K.; Bacskai, B. J.; Medarova, Z.; Moore, A. Design, Synthesis, and Testing of Difluoroboron-Derivatized Curcumins as Near-Infrared Probes for in Vivo Detection of Amyloid- β Deposits. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (42), 15257–15261. DOI: 10.1021/ja9047043
- (60) Yang, H.; Zeng, F.; Luo, Y.; Zheng, C.; Ran, C.; Yang, J. Curcumin Scaffold as a Multifunctional Tool for Alzheimer’s Disease Research. *Molecules* **2022**, *27* (12), 1–19. DOI: 10.3390/molecules27123879