

RESEÑA

Síntesis y evaluación de un potencial radiodiagnóstico PET de placas β -amiloides presentes en la enfermedad de Alzheimer

Samila León Chaviano

Departamento de Neuroquímica, Dirección de Neuroinvestigaciones, Centro de Neurociencias de Cuba.

1 de julio de 2016

Trabajo de Diploma en opción al título de Licenciatura en Radioquímica

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que conlleva a la pérdida de las capacidades cognitivas y de la memoria, desorientación, trastornos del lenguaje y cambios de conducta; problemas que se agravan rápida e indeteniblemente en el tiempo, incidiendo de manera desfavorable en la calidad de vida de los pacientes. Es devastadora, tanto para la persona que la sufre, como para su entorno familiar y social.

Dadas las tendencias demográficas actuales, ha sido llamada la epidemia del siglo, por lo que se encuentra entre las seis afecciones incluidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una prioridad en relación a la salud mental. Se calcula que a escala mundial 46,8 millones de personas sufren de la EA o alguna demencia relacionada, cifra que deberá alcanzar los 131,5 millones en el año 2050. En Cuba los adultos mayores representaron el 19,4% de la población al cierre del 2015, donde unas de cada 10 personas mayores de 65 años padecen de EA o una demencia relacionada, por lo que se estiman 150 000 enfermos, cifra que llegará a los 273 000 para el 2030. En países desarrollados y en Cuba, la EA ocupa la sexta causa de mortalidad y años de vida potencial perdidos por enfermedad. Las características neuropatológicas de la EA están dadas por la presencia en el cerebro de depósitos proteicos: enrejados neurofibrilares (EN) y placas seniles, los cuales están implicados en el proceso que conduce a la degeneración neuronal progresiva y a la muerte neuronal. Las placas seniles están formadas por depósitos de péptidos β -amiloides de 39-42 aminoácidos, mientras que los EN resultan de la hiperfosforilación de la proteína tau.

El diagnóstico de la EA implica la visualización de estas estructuras patológicas y esto solo se realiza, de forma certera, *post mortem*. Está descrito que la implementación de una terapia temprana puede retardar el inicio de la manifestación de la EA en cinco años y disminuir su prevalencia en un 50%, por lo que se requiere un diagnóstico precoz de la enfermedad.

Los depósitos de péptidos β -amiloides aparecen hasta 20 años antes de que se manifiesten los síntomas de esta enfermedad, por lo que esta estructura es considerada como un blanco adecuado para su diagnóstico temprano. Es por ello que en el mundo se trabaja hace más de 10 años en el desarrollo de métodos de neuroimágenes que permitan el diagnóstico precoz de la EA.

Varios son los compuestos desarrollados con el fin de visualizar la presencia de las placas seniles o los EN. Estos compuestos han sido seleccionados sobre la base de algunas de sus características físico-químicas, como son su lipofilicidad moderada, especificidad y afinidad por los depósitos β -amiloides. Uno de los métodos empleados para la elección de estos compuestos son las técnicas de evaluación *in silico*, las cuales permiten predecir y estimar el modo y la estabilidad de la interacción receptor-ligando mediante estudios de asociación molecular (*docking*) y dinámica molecular.

Recientemente, han sido aprobados por la Agencia Reguladora de Alimentos y Medicamentos de los E.U.A. (FDA, por sus siglas en inglés: *Food and Drug Administration*) tres compuestos como agentes de diagnóstico en humanos: el Florbetapir, el Flutemetamol y el Florbetaben, para su uso mediante la Tomografía de Emisión Positrónica (PET, por sus siglas en inglés: *Positron Emission Tomography*). El costo aproximado de una dosis de cualquiera de estos tres radiofármacos es de alrededor de 1 600 dólares, precio que resulta inaccesible para el Sistema Nacional de Salud cubano.

En el Centro de Neurociencias de Cuba han sido sintetizados diferentes derivados mono-sustituídos de naftaleno que, de acuerdo con las evaluaciones realizadas *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, resultan afines a las placas β -amiloides. Estos compuestos tienen como característica la posibilidad de ser marcados versátilmente con diferentes radioisótopos como ^{99m}Tc , ^{131}I , ^{123}I y ^{11}C . Asimismo, se espera que la medicina nuclear cubana alcance mayores progresos con el montaje y puesta en marcha de un ciclotrón (18 MeV)-PET, lo cual repercutirá beneficiosamente en la calidad del sistema de salud cubano.

Con el propósito de obtener un nuevo derivado di-sustituído de naftaleno se trazó como objetivo general de este trabajo sintetizar el 2-(3-fluoropropil)-6-metoxinaftaleno con afinidad *in silico* por los péptidos β -amiloides y un valor de log P, adecuados para ser empleado como un potencial radiotrazador PET en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

La síntesis del 2-(3-fluoropropil)-6-metoxinaftaleno requiere la obtención del precursor 3-(6-metoxi-2-naftil) propil-4-metilbencenosulfonato, el cual se obtiene producto de una reacción de acoplamiento cruzado con el reactivo de Grignard bromo(6-metoxi-2-naftil) magnesio y el 1,3-dipropanodiol-p-ditosilato con el empleo de catalizadores de hierro o cobre. Se realizaron nueve experimentos con el empleo de cinco catalizadores: $\text{Fe}(\text{acac})_3$, $(\text{FeCl}_3)_2$ (TMEDA) $_3$, FeCl_3 , nanopartículas de hierro y Li_2CuCl_4 .

En este trabajo, se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular o *docking* y de dinámica molecular para predecir la afinidad o no del 2-(3-fluoropropil)-6-metoxinaftaleno por las placas β -amiloides, a través del péptido β -amiloide. Estas técnicas de simulación permitieron estimar la zona de interacción con el péptido y evaluar la estabilidad temporal del complejo péptido-ligando formado.

Por último, en este trabajo se realizó el cálculo del log P a partir de datos experimentales obtenidos de la distribución del compuesto marcado [^{18}F]-2-(3-fluoropropil)-6-metoxinaftaleno en *n*-octanol/agua, con el objetivo de valorar su lipofilicidad y, de esta forma, su potencialidad para atravesar la BHE (Barrera Hematoencefálica).

El trabajo está estructurado en tres capítulos, además de presentar Introducción, Conclusiones, Recomendaciones, Referencias Bibliográficas y Anexos. En la Introducción se realiza una descripción de la situación actual en el mundo y en nuestro país de la enfermedad de Alzheimer, así como se describen las características principales y el diagnóstico de esta dolencia, los compuestos afines a las placas β -amiloides empleados en el estudio de dicha enfermedad, los métodos computacionales aplicados al estudio de la interacción proteína-ligando, el diseño de precursores para la obtención de radiotrazadores para PET, con énfasis en las reacciones de acoplamiento cruzado, los métodos de fluoración de cadenas alquílicas y aspectos generales del marcaje de moléculas con ^{18}F .

En el capítulo de Materiales y Métodos se presentan los reactivos y equipos utilizados, así como los procedimientos de síntesis, purificación y caracterización de los compuestos obtenidos. También se describen la preparación de los ficheros de configuración para las simulaciones péptido-ligando, mediante los estudios de docking y dinámica molecular, los programas utilizados para los cálculos y el análisis de los resultados. Por último, se presenta la metodología de la determinación del log P del 2-(3-fluoropropil)-6-metoxinaftaleno.

En la discusión de los resultados, se exponen los diferentes experimentos realizados en la síntesis del 3-(6-metoxi-2-naftil) propil-4-metilbencenosulfonato. La tesis consta de 69 páginas, 17 figuras y 4 tablas. Cuenta con una abundante bibliografía, que comprenden un total de 122 referencias, las cuales muestran un nivel de actualización adecuado. De estas el 13,1% corresponden a los últimos 5 años (2011-2016), el 41,8% a los últimos 10 años y el 77,0% son del 2000 a la fecha. En el acápite de los Anexos se reportan la información espectroscópica que avala la caracterización de los compuestos sintetizados. Así, se reportan los procedimientos de obtención del isótopo ^{18}F , marcaje, control de calidad y los estudios PET/TAC en ratones sanos y enfermos tipo Alzheimer.

Como conclusiones, pudo afirmarse que la reacción de acoplamiento cruzado entre el bromo (6-metoxi-2-naftil) magnesio y el 1,3-dipropanodiol-p-ditosilato tiene lugar en presencia del catalizador $\text{Fe}(\text{acac})_3$ y TMEDA (este último como coligando) en una relación molar de 1:1,3 a temperatura ambiente o con el empleo del complejo Li_2CuCl_4 como catalizador, entre -10 y -5 °C, para dar lugar al 3-(6-metoxi-2-naftil) propil-4-metilbencenosulfonato con rendimientos moderados. La sal fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) resulta un agente fluorante adecuado para la obtención del 2-(3-fluoropropil)-6-metoxinaftaleno, a partir del 3-(6-metoxi-2-naftil) propil-4-metilbencenosulfonato, cuando la reacción se lleva a cabo en alcohol *t*-amílico a 70 °C. El 2-(3-fluoropropil)-6-metoxinaftaleno, evaluado *in silico* mediante las técnicas de *docking*, interactúa con el péptido β -amiloide, específicamente con los aminoácidos Q15 K16 V18 F19 F20 (Zona II del péptido), mediante interacciones hidrofóbicas del tipo π - π , fundamentalmente entre el anillo aromático del compuesto y los de los residuos fenilalanina 19 y 20. El 2-(3-fluoropropil)-6-metoxinaftaleno forma un complejo estable con el péptido β -amiloide, en la región comprendida entre los a.a. 12 y 26 (Zona II), con valores de energías promedios de Van der Waals y electrostáticas de $-82,7$ kJ/mol y $-0,8$ kJ/mol, respectivamente, y energía libre promedio de $-21,53$ kJ/mol; todas menores que 0 kJ/mol, de acuerdo con las simulaciones de dinámica molecular, realizadas en un intervalo de tiempo 30 ns. El 2-(3- ^{18}F -fluoropropil)-6-metoxinaftaleno tiene un valor experimental de log P de $1,10 \pm 0,14$ lo que justifica que atraviese la Barrera Hematoencefálica indemne, de acuerdo con las imágenes PET, con una retención mayor en el cerebro de un animal transgénico tipo Alzheimer que en un animal sano, debido a su afinidad por los péptidos β -amiloides, predicha en los estudios *in silico*, lo que lo convierte en un potencial radiodiagnosticador PET de la enfermedad de Alzheimer.

Este trabajo se inscribe en un Proyecto de investigación que desarrolla el Centro de Neurociencias de Cuba, con el objetivo de disminuir los efectos sociales, económicos y emocionales de la EA en la sociedad cubana. Con el desarrollo del mismo se podrá contar con un radiofármaco de ^{18}F para PET, que permitirá la visualización de las placas amiloides y diagnosticar precozmente la EA. Los compuestos obtenidos y sus procedimientos de síntesis son novedosos, descritos en la Patente del Centro de Neurociencias de Cuba, otorgada por la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial (CU 2010/0204 y CU 23844 B1), Europa (EP 2 436 666 A20), Sudáfrica (P58243ZA00) y México (MX/2015/092431); y en proceso de aprobación en diferentes países como EE.UU, Brasil, Canadá, entre otros. Este trabajo también forma parte de uno más abarcador titulado "Nuevos compuestos, afines a las placas β -amiloides, para el manejo potencial de la enfermedad de Alzheimer", que recientemente fue galardonado con el Premio de la Academia de Ciencias de Cuba 2016.

9no Congreso Internacional de Química, Ingeniería Química y Bioquímica, QUIMICUBA 2015, presentación de dos trabajos en la sesión de póster: “Síntesis de un precursor para el radiodiagnóstico de la enfermedad de Alzheimer” y “AMYLOVIS®: Marcaje con ^{18}F y su evaluación preliminar como radiofármaco para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer”.

V Seminario Internacional y V Taller Nacional "Uso y desarrollo de productos de la industria isotópica para la salud" CENTIS 2016, presentación del trabajo “Nuevos compuestos, como radiodiagnosticadores potenciales de la enfermedad de Alzheimer”.

Jornada Científica Estudiantil InSTEC 2016, presentación del trabajo “Síntesis y evaluación de un potencial radiodiagnosticador PET de placas β -amiloides presentes en la enfermedad de Alzheimer”, Premio Relevante (Primer Lugar) en la Comisión de Radioquímica.

La presente investigación deberá tener un aporte social debido a la alta tasa de envejecimiento poblacional de Cuba, por lo que lograr implementar un método de diagnóstico precoz *in vivo* de la EA permitirá llevar a cabo una intervención terapéutica farmacológica o no, así como cambios en el estilo de vida del individuo, con el objetivo de retrasar la aparición de la sintomatología de la enfermedad y disminuir la carga social de la misma.

Hoy día, los costos aproximados de cualquiera de los tres radiofármacos comercializados son muy altos e inaccesibles para el sistema de salud cubano. Por tales razones, desde el punto de vista económico, un nuevo radiofármaco para el estudio de la EA, pudiera constituir un reglón de ingresos económicos para el país, en caso de concluir exitosamente las fases preclínica y clínica.

Este trabajo responde, además, al Lineamiento 144 de la Política Económica y Social trazada en el VI Congreso del PCC, que plantea: ... “Brindar particular atención al estudio e implementación de estrategias en todos los sectores de la sociedad para enfrentar los elevados niveles de envejecimiento de la población”.