



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: TÉCNICAS ANALÍTICAS
ESPECTROFOTOMÉTRICAS Y
ESPECTROFLUORIMÉTRICAS PARA
EVIDENCIAR LAS INTERACCIONES
FÁRMACOS-BIOMETALES.**

Autor: JORGE HUMBERTO QUISPE ABREGÚ

Fecha: FEBRERO 2020

Tutor: ANA ISABEL OLIVES BARBA

ÍNDICE:

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 3 |
| ABREVIATURAS..... | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 2. OBJETIVOS | 5 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 5 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 6 |
| 4.1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS-ALZHEIMER: LA EPIDEMIA SILENCIOSA | 6 |
| 4.1.1. Amieloidogénesis-la teoría de la cascada amiloide | 6 |
| 4.1.2. Deshomeostasis | 7 |
| 4.1.3. Hiperfosforilación de Tau | 8 |
| 4.2. Nuevas vías: Técnicas para evidenciar la interacción fármacos-biometales..... | 10 |
| 4.2.1. Selectividad..... | 11 |
| 4.2.2. Sensibilidad | 11 |
| 4.2.3. Potencia: capacidad quelante | 13 |
| 5. CONCLUSIONES | 15 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 16 |

RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas han aumentado su incidencia de manera exponencial a nivel global siendo una de las principales causas de muerte en el mundo.

La enfermedad de Alzheimer destaca por la gran implicación social que conlleva y la dificultad de su diagnóstico.

Ante la nueva evidencia de la implicación de la alteración del equilibrio intrínseco de las neuronas (deshomeostasis), los metales toman mayor relevancia siendo objetivo de estudio por la facilidad que tienen de generar los plegamientos causantes de la enfermedad y la degeneración neuronal (teoría amieloidogénica).

La tendencia actual de la búsqueda de nuevos fármacos favorece la utilización de técnicas capaces de optimizar el proceso de obtención y mejora de las características de los mismos; entre ellas, técnicas espectrofluorimétricas y espectrofotométricas, capaces de gestionar la evidencia y facilitar la información a la investigación, siendo herramientas de futuro.

Palabras clave: Alzheimer, deshomeostasis, metales, quelación, espectrofotometría, espectrofluorimetría, técnicas analíticas, interacción.

SUMMARY

The incidence of neurodegenerative diseases have experimented an exponential increase and are one of the main causes of death in the world.

Among them, Alzheimer disease is highlighted due to its important social repercussion and the difficulty of diagnosis.

Metals play a relevant role in this type of illness, related to changes in the intrinsic neuronal balance. They produce an incorrect folding of proteins that cause neuronal degeneration (amielogenic theory).

This evidence is been used to develop new drugs by spectrophotometry and spectrofluorometry techniques that optimize the production and improve the characteristics of these drugs. These techniques are useful tools for future investigations.

Key words: Alzheimer disease, dyshomeostasis, metals, chelation, spectrophotometry, spectrofluorometry, analytical techniques, interaction.

ABREVIATURAS

AE → Enfermedad de Alzheimer

ATP → Adenosin trifosfato

aa → Aminoácido

MTs → Metaloproteína

NMDA → ácido N-metil-D-aspartico

Fco → Fármaco

UV-vis → ultravioleta visible

END → Enfermedad neurodegenerativa

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas(END), son un grupo de patologías crónicas, hereditarias o adquiridas, que afectan al sistema nervioso central produciendo una degeneración gradual y permanente de la actividad cognitiva y/o motora (vulnerabilidad selectiva) de la persona que lo padece, llevando a los afectados a tener una peor calidad de vida, repercutiendo también sobre sus familiares⁽¹⁾.

Estas enfermedades afectan a personas de edad avanzada como consecuencia de diferentes causas teniendo en común la acumulación de proteínas que se pliegan mal, formando agregados que se depositan en el interior o el exterior celular, provocando la inflamación neuronal y estrés oxidativo y posterior muerte neuronal.

En los últimos años las END se consideran una epidemia moderna debido al envejecimiento progresivo de la población, que incrementan exponencialmente su auge, siendo una de las principales causas de muerte y situándose a la par de las enfermedades cardiovasculares o el cáncer; con un gran impacto, sobre todo, en países desarrollados. Según la OMS, a causa de estas patologías mueren 6,8 millones de personas en todo el mundo.

En España la prevalencia de las END sigue la tendencia de muchos países europeos, siendo la principal la enfermedad de Alzheimer (EA), que afecta con mayor frecuencia a la población mayor de 65 años, generalmente mujeres, aumentando su porcentaje progresivamente a medida que aumenta la edad de la población, conllevando una gran carga social, económica y sanitaria (se alcanza un gasto total para estas patologías de 18.806 millones de euros anuales). Se considera que en España, la prevalencia de las END es de un 1,90%, llegando a estimar, según la bibliografía, un total de 988.000 personas afectadas⁽²⁾. De entre ellas, destacan por su prevalencia las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington y la esclerosis múltiple^(1,3,4).

| Enfermedad | Prevalencia global | Población afectada |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Alzheimer y otras demencias | 1,53% | 717.000 |
| Enfermedad de Parkinson | 0,34% | 160.000 |
| Esclerosis Múltiple | 0,08% | 47.000 |
| Enfermedades Neuromusculares | 0,12% | 60.000 |
| Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) | 0,008% | 4.000 |
| TOTAL AFECTADOS | 2,08% | 988.000 |

Tabla 1. Prevalencia de la enfermedades neurodegenerativas en España.⁽²⁾

A nivel global se espera un aumento de estas patologías llegando a afectar a un total de 65 millones de personas en 2030 y a 115 millones en 2050, alcanzando una prevalencia de un 2% de la población mundial y con una incidencia de un enfermo cada 4 segundos⁽²⁾.

Cada vez más estas patologías van adquiriendo mayor importancia tanto a nivel social como económico, siendo de suma importancia la prevención y el diagnóstico precoz⁽³⁾; esto

conlleva una respuesta inmediata para la búsqueda de soluciones y tratamientos que puedan revertir este avance .

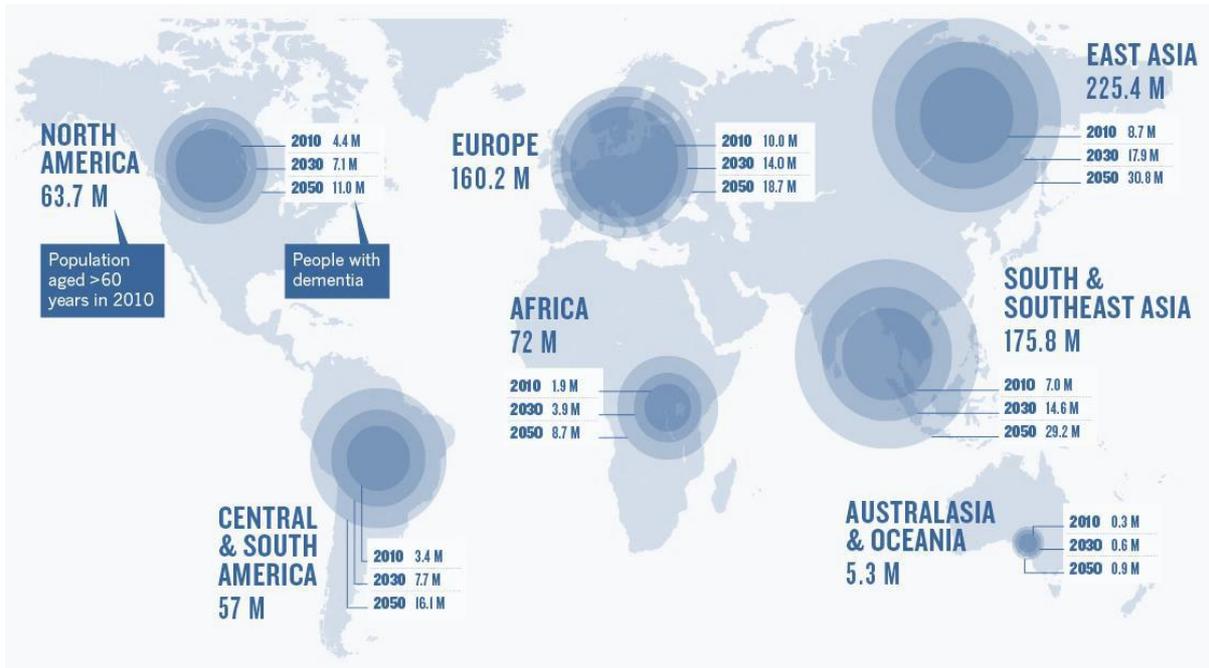


Figura1.- Pronóstico del crecimiento de la demencia en el mundo⁽²⁾. Fuente :Abbott,2011

2. OBJETIVOS

Debido al incremento de las END se han planteado, en este trabajo, los siguientes objetivos:

- **Conocer** las enfermedades neurodegenerativas (causas, síntomas, etc.), especialmente la enfermedad de Alzheimer y **la implicación que tienen sobre ellas la acumulación de biometales.**
- Valorar el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, **nuevas vías de tratamiento** en relación a la **quelación** de los biometales.
- Estudiar la aplicación de **técnicas espectrofotométricas y/o fluorimétricas** para la determinación de la **sensibilidad, selectividad y potencia** de diversos fármacos encaminados al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la elaboración de esta revisión, se realizó una búsqueda bibliográfica usando como fuentes bases de datos respaldadas como: Pubmed, Elsevier, Sciondirect, Scopus, Springer e ISI Web of Knowledge; así como páginas webs de organismos oficiales como: la Organización Mundial de la Salud (OMS / WHO) y el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

Para la búsqueda se usaron palabras claves, tanto en español como en inglés, como: "neurodegenerativedisease", "β-amyloid", "folding", "deshomeostasis", "Alzheimer disease", "chelation", "clioquinol", "treatment", etc.

Se seleccionaron artículos que correspondían con la temática a evaluar y que tenían fecha de publicación en los últimos 15 años.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS-ALZHEIMER: LA EPIDEMIA SILENCIOSA

Como se ha descrito en la introducción, las enfermedades neurodegenerativas están creciendo exponencialmente a medida que la población envejece (debido a la mejora de la calidad de vida y la disminución de la población neonatal) siendo así, con el paso de los años, una de las principales causas de muerte.

Debido a su gran prevalencia en el mundo y por ser la primera en España afectando en mayor medida a mujeres mayores de 65 años con un nivel educativo bajo, residentes en el área metropolitana y con una profesión relacionada con el ámbito del hogar, la enfermedad de Alzheimer (EA) se ha convertido en el punto crucial de este estudio, pudiendo afectar a un 10,97% de la población en un futuro no muy lejano⁽¹⁻³⁾.

La EA es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al área tempoparietal del cerebro atrofiándola y provocando un deterioro cognitivo (pérdida de la memoria inmediata) y trastornos conductuales (déficit de atención, cambios en el estado de ánimo, etc.). Este deterioro conlleva una disminución de la independencia del individuo que lo padece, con lo que también tiene un efecto a nivel del entorno que lo rodea (familiares)⁽¹⁾.

La enfermedad se caracteriza por la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares, que provocan pérdida de la continuidad sináptica⁽⁵⁾. Son acúmulos de proteínas "mal plegadas" producidas por un mal metabolismo de las mismas o por la interacción de iones presentes en el entorno de las neuronas que acarrean consigo una alteración del mismo sistema llegando a alcanzar el estrés oxidativo causante de la degeneración neuronal. Se pueden considerar como "un desorden intrínseco de proteínas"⁽⁶⁾.

La patogénesis de la enfermedad no tiene una causa definida (multifactorial), pero se trata de esclarecer mediante dos teorías: **la hiperfosforilación de la proteína Tau** y, como teoría más asentada, **la formación de placas amiloides**. Esta última teoría está muy estrechamente relacionada con la primera

4.1.1. Amieloidogénesis-la teoría de la cascada amiloide:

En condiciones normales, la proteína precursora amiloide (APP), proteína insertada en la membrana, se escinde por dos peptidasas (β y γ secretasas), las cuáles dan lugar a péptidos: uno largo que proviene de la β -secretasa, sApp β , quedando anclado a la membrana un fragmento más pequeño, de 99 aminoácidos (aa), que es cortado por la γ -secretasa. La cual puede generar dos fragmentos de diferente longitud, A β 40 ó A β 42, siendo más abundantes los fragmentos

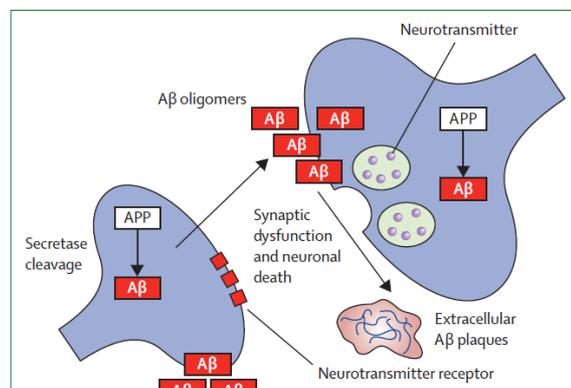


Figura2.-Esquema de la formación y localización de las estructuras amiloides.⁽⁷⁾

cortos, mientras que las formas un poco más alargadas son más insolubles y propensas a formar fibrillas^(5,7-10). Estas fibrillas se pueden acumular tanto en el exterior como en el interior de la neurona⁽⁷⁾.

En condiciones patológicas, estos últimos péptidos, tienden a plegarse de una manera incorrecta con una estructura de lámina- β debido a la interacción de los aa en posiciones 16-23 y 18-35⁽⁵⁾. Debido a esto, los fragmentos tienden a agruparse formando oligómeros para formar fibrillas amieloides que se acumulan formando las placas. Por otra parte, estos fragmentos de dímeros pueden formar poros causando la entrada de iones que provocarán la degeneración neuronal.

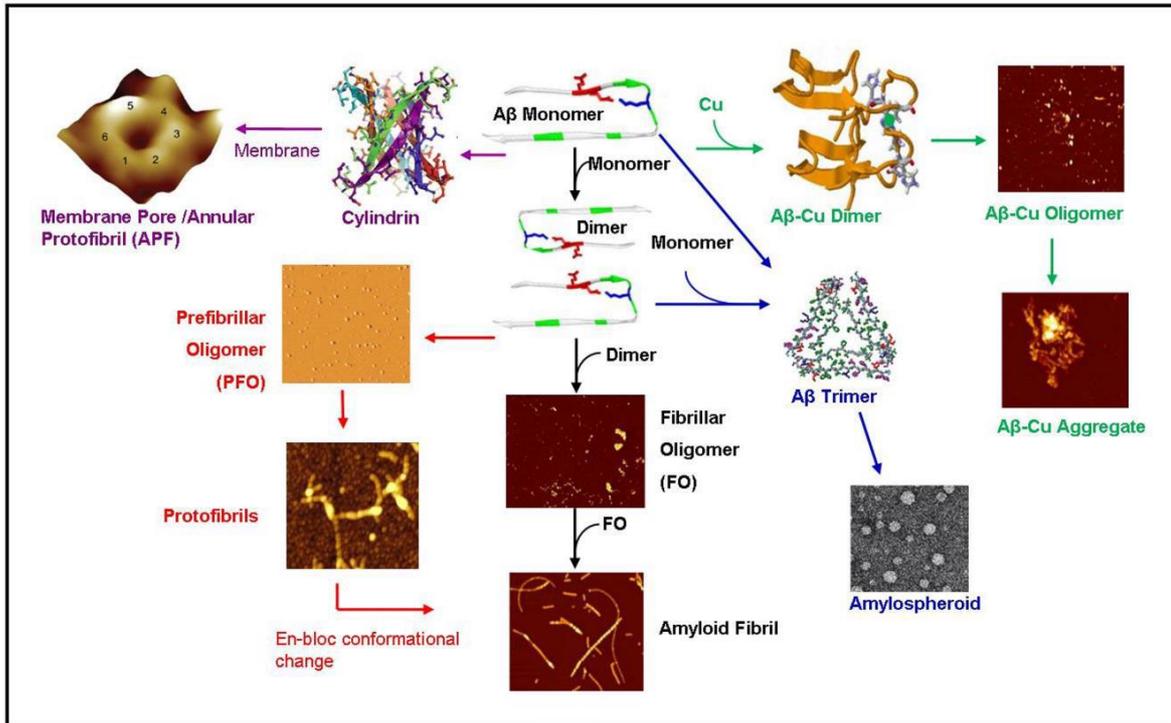


Figura3.-Esquema de generación de las fibrillas amieloides y otros derivados.⁽⁹⁾

4.1.2. Deshomeostasis:

Para poder explicar el mal plegamiento de los péptidos amieloides, tenemos que hablar del entorno, es decir, del ambiente que propicia este proceso. Como bien sabemos estas proteínas se encuentran en un ambiente fluido en disolución junto con otros elementos que componen su "ambiente"(entre ellos, nutrientes necesarios para la actividad y subsistencia de la neurona). Al igual que todas las células, en su interior están presentes *iones* que permiten mantener la actividad, la estructura y el equilibrio de la misma para evitar una alteración del sistema.

El intercambio de los iones con el medio se produce a través de la BHE, que en función de su permeabilidad y la capacidad que tienen los astrocitos (células que regulan el metabolismo de las neuronas) determinarán el equilibrio de los mismos gracias a canales o proteínas que los acumulan, transportan o intercambian de un medio a otro.

Estos iones se mantienen en concentración adecuada gracias a la autorregulación que proporciona el sistema de la neurona, pero cuando este sistema falla, sucede lo que se conoce por *deshomeostasis*, provoca alteraciones dentro la célula. Este desequilibrio, ya sea

disminución o acumulación de los mismos, se puede dar como consecuencia de una disfunción genética (modificación de canales, alteración en estructuras proteicas, etc.), una dieta inadecuada, interacción con medicamentos o una exposición a un ambiente con un alto contenido de los elementos, en especial metales.

El aumento de estos elementos puede producir alteraciones a nivel cinético, permitiendo un mal ensamblamiento de las fibrillas, dando lugar a estructuras amorfas tanto intramolecular (Cu) como intermolecular (Zn).

Al observar que muchos de estos elementos son intrínsecos en la célula y que tienen un alto potencial etiológico, se ha puesto en el punto de mira a los bioelementos (forman parte del centro prostético de enzimas y metaloproteínas) como una causa que pueda explicar el plegamiento de las proteínas y como la variación de sus niveles pueden generar las placas seniles y las neurofibrillas. Se ha observado la disminución de los niveles de estos bioelementos en diferentes regiones donde se concentran estos acúmulos proteicos, debido a que los bioelementos forman parte del "core" de los mismos.

Entre los bioelementos que más destacan por su abundancia en las células, se encuentran el cinc, el cobre y el hierro. Por este motivo, este trabajo se centra en estos tres elementos (tabla 2), sin dejar de lado otros metales, como aluminio o magnesio, que pueden considerarse factores etiológicos de la enfermedad.

Estos metales pueden unirse a las proteínas con una afinidad relativa provocando la alteración del sistema: aumentado el número de radicales libres, permitiendo así una activación descontrolada del sistema ROS, produciendo la degeneración neuronal y, con ello, su muerte^(6,8-15).

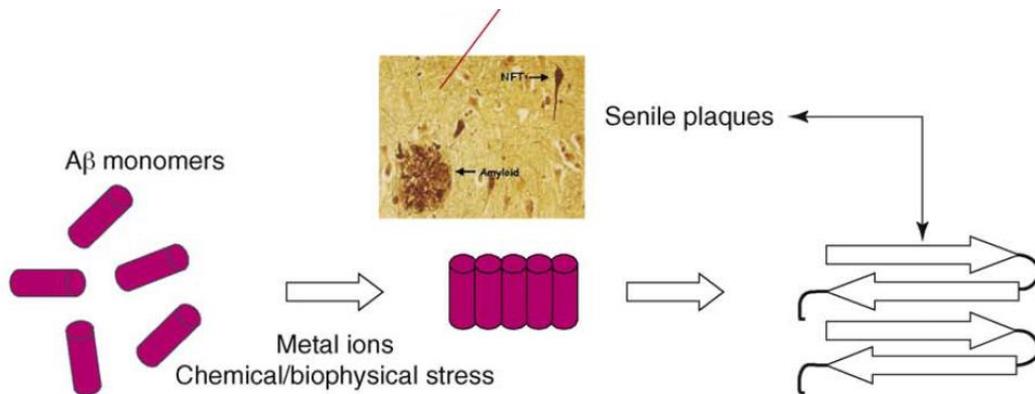


Figura 4.-Formación de una placa senil debido a la agregación inducida por un metal⁽¹⁰⁾

La unión a estos metales hace que esta configuración que adoptan sea más resistente a α -secretasas (corrección de fallos) favoreciendo así la rotura de más APP y la generación de más monómeros continuamente y, así, permitiendo la aparición de más placas seniles culminando incluso en la formación de neurofibrillas.^(6,11,16)

4.1.3. Hiperfosforilación de Tau:

Otro de los fenómenos ligados con la EA es la hiperfosforilación de la proteína Tau que está estrechamente ligada con la alteración de los niveles de los iones, en especial Cu y Fe, que llegan a afectar a la bioquímica del sistema, activando el sistema CDK-5/GSK-3 β quinasa, permitiendo la fosforilación de los microtúbulos de las neuronas, haciendo que estos se

agrupen en estructuras helicoidales interrumpiendo la estabilidad estructural de la neurona, haciendo que disminuya la concentración de β -amiloide ($A\beta_{42}$), favoreciendo el aumento de su escisión desde la APP, generando un mayor número de radicales favoreciendo el estrés oxidativo (H_2O_2) y la aparición de más placas^(7-9,17).

Tabla 2.-Análisis de los metales que afectan a la enfermedad de Alzheimer-desequilibrio y causas.^(7,10,13-15)

| | Zn | Cu | Fe |
|---------------------------------------|---|---|---|
| Homeostasis | Sistema regulado por: - Metaloproteínas (MTs), en especial la MT3(mayor reservorio), que se expresa en astrocitos, que se mantiene por un estado redox Zn/cys. - Mitocondria sistema Zn/Ca. | Sistema regulado por: - MTs y formando parte de la cadena de la ATPasa. - Receptores NMDA a nivel postsináptico. | Sistema regulado por: - Transferrina, ferritina y la glucoproteína sérica. |
| Niveles a nivel cerebral | Normales:56,7-75,9 μ g/g Patológicos: > 85,0 μ g/g | Normales:3,1-5,1 μ g/g Patológicos:>6,5 μ g/g | Normales:216-272 μ g/g Patológicos: >280 μ g/g |
| Efectos en la cascada amiloide | \uparrow [Zn] permite la recolocación de los monómeros, dejando expuestas sus zonas hidrófobas y facilitando el rápido y mal plegamiento de las mismas provocando la acción cadena oxidativa facilitando la formación de las placas seniles en la hendidura sináptica y así permitiendo la activación y contribuyendo a la apoptosis, la disfunción sináptica y la muerte neuronal. | La variación de la concentración puede verse afectada sobre todo por variaciones a nivel de los transportadores de este ión(GPI-Cp/ATP7B polimorfismo); disminuyendo la parte unida a proteínas y aumentando la parte libre y fácil de quelar, permitiendo su acumulación a nivel de los astrocitos que permiten la unión a la neurona favoreciendo la acumulación en ambas células evitando su regulación y favoreciendo la apoptosis(\uparrow de la inflamación y estrés oxidativo). | \uparrow [Fe]provoca alteraciones en zonas donde hay una menor producción de ferritina, permitiendo su aumento como ión libre, favoreciendo así su unión a monómeros haciendo que se plieguen de manera rápida facilitando así la interacción con otros continuando con la generación de los acúmulos y la formación de las placas seniles. |

4.2. Nuevas vías: Técnicas para evidenciar la interacción fármacos-biometales:

Se han observado distintos elementos que son capaces de desencadenar la AE, por consiguiente, podemos considerarles *alertantes* del inicio de la misma (diagnóstico) y *dianas* como alternativa de tratamiento. Se buscan fármacos que puedan *modular la enfermedad* frente a las terapias habituales que actúan directamente sobre el foco y ayudan a mejorar los síntomas⁽¹⁸⁾.

Esta nueva línea está basada en la combinación de fármacos (fco) ya empleados en la enfermedad combinándolos con otras estructuras capaces de regular la influencia de estos biometales (disminuir su concentración o regular los cambios de oxidación) planteando así la disminución de la agregación de la proteína β -amiloide, la producción de radicales libres y así evitando el estrés oxidativo, la apoptosis y la degeneración neuronal.

En general, se buscan estructuras con la facultad de atravesar la BHE, compuestos pequeños de bajo peso molecular, sin carga o con poca variación de ella y que sea selectivo para evitar comprometer otras estructuras dentro de la neurona.

Estas estructuras que se acoplan se fundamentan en la teoría de la quelación (terapia empleada en la eliminación de metales) utilizando radicales libres como brazos para captar los metales y evitar sus efectos^(19,20).

Tabla 3.- Tratamiento frente a la enfermedad de Alzheimer- Fármacos en fase de investigación.^(7,11,18)

| | Grupo | Acción | Ejemplos |
|----------------------------|--|---|--|
| Tratamiento clásico | Inhibidores de la Acetilcolinesterasa | Aumentan la transmisión colinérgica (\uparrow conc. de Ach). | Donepezilo, rivastigmina, galantamina. |
| | Antagonista de NMDA | Disminución de la acción ionotrópica del receptor (\downarrow la acción del glutamato). | Memantina. |
| Nuevas vías de tratamiento | Inmunoterapia | Enfocada en la aclaramiento (activo o pasivo) de la proteína β -amiloide, reduciendo su agregación. | Bapineuzumab. |
| | Inhibidores de GSK-3 | Reducción de la hiperfosforilación de Tau | Litio. |
| | Inhibidores de β y γ secretasas | Reducir la formación de β -amiloide evitando el corte de la APP. | MK-8931. Semagasetat. Acitretina. |
| | Antiagregantes amieloides | Evitan la formación de fibrillas ya que interfieren en ese proceso, reduciendo la toxicidad. | Colostrina. Glucosaminoglicanos. |
| | Moduladores de Fe, Cu y Zn | Quelación | Clioquinol PBT ₂ RTHLVFFARK-NH ₂ |

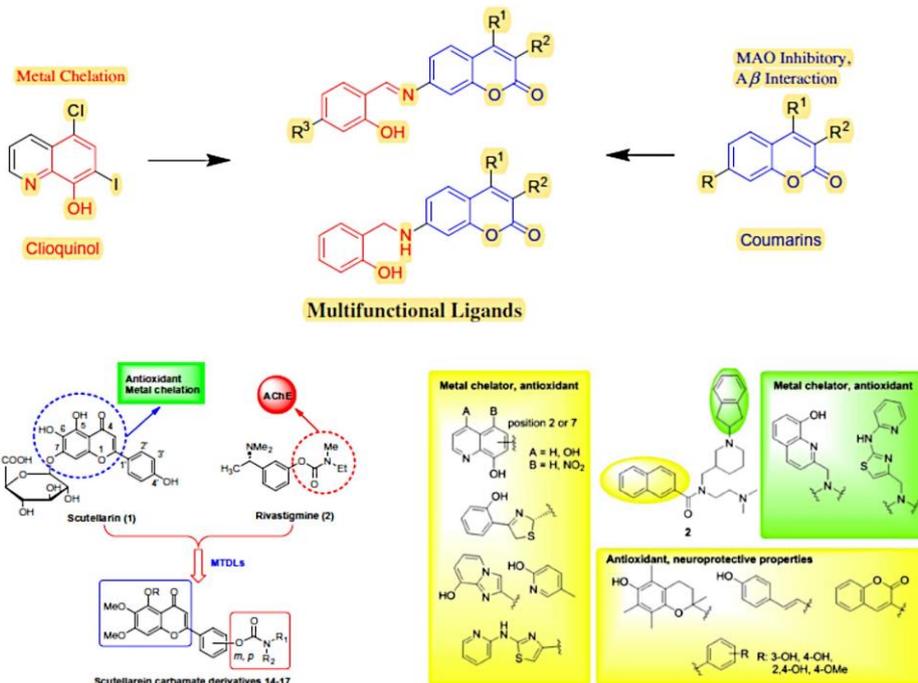


Figura 5.-Ejemplo de la combinación de fármacos con estructuras quelantes⁽¹⁹⁾.

Los cuerpos suelen ser estructuras cíclicas con dobles enlaces capaces de generar resonancia; derivados de indol, piperazinas, quinolinas, etc.. Se utilizan como base debido a

sus propiedades lipofílicas, que les facilitan la entrada a la neurona, además constituyen bases de Schiff (imina, $C=N-R$) que facilitan la coordinación de estos biometales y actuando a su vez como sensores.

Para evaluar la *capacidad* de estos fármacos como terapia es imprescindible determinar su **sensibilidad, selectividad y potencia**, mediante técnicas espectrofotométricas y espectrofluorimétricas, ya que la mayoría presentan estructuras resonantes que pueden emitir fluorescencia, facilitando la obtención de un espectro en el que se pueden apreciar cambios significativos y poder cuantificarlos.

4.2.1. Selectividad:

Para evaluar la selectividad de uno de estos fármacos con respecto a un biometal determinado se realiza un espectro de absorción UV-vis del fármaco solo y del mismo con la adición de un metal en concentración creciente para evaluar si hay variaciones con respecto a las absorbancias o posiciones de los máximos de absorción del espectro inicial, evidenciando que hay interacción entre el fármaco y el metal y dejando constancia de su capacidad quelante (figura 6-gráfico A).

Posteriormente, se realiza un estudio fluorimétrico para evidenciar, con respecto a otros metales, su selectividad observando un aumento de la intensidad de fluorescencia en los máximos de emisión con respecto a la intensidad que emite en presencia de los distintos metales (figura 6-gráfico B). Así para constatar aún más la selectividad del fco, se realiza un control de la señal de fluorescencia emitida por el metal con interferencias de otros metales, es decir, todos en la misma disolución. Se valora la variación del espectro inicial del fco. con respecto al espectro que se muestra con interferencia de otros metales.

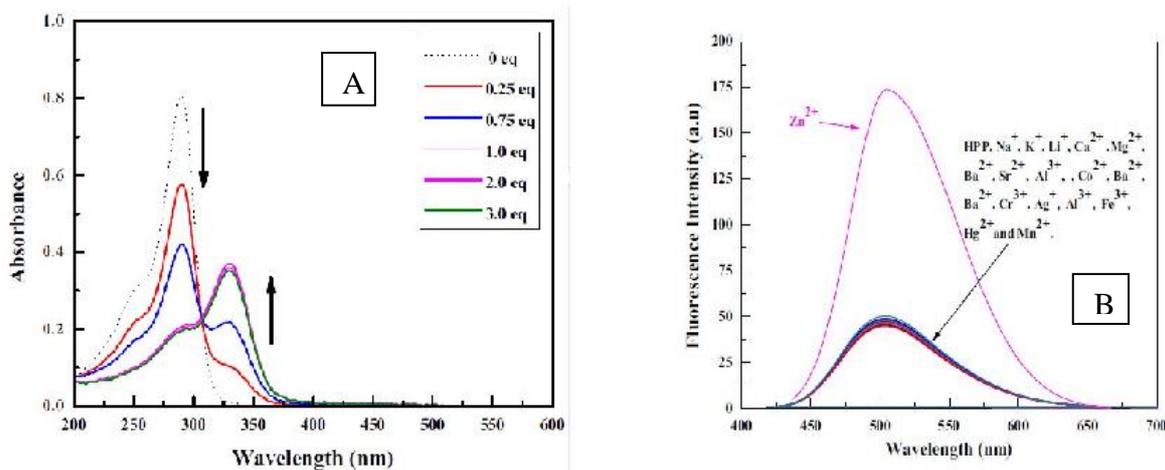


Figura 6.-Gráficos :A la línea discontinua representa el espectro de absorción UV-vis del fármaco sin metal y las líneas de color representan las distintas variaciones con la adición creciente del metal. B representa el espectro de emisión fluorescente del fármaco con respecto a otros metales sin interferencias de los mismos⁽²¹⁾.

4.2.2 Sensibilidad:

En cuanto a la sensibilidad del fármaco por el biometal, nos referimos a la capacidad que tiene para permitirnos detectar concentraciones pequeñas del biometal en entornos distintos, para ello tenemos que hablar del **efecto del pH**.

El pH juega un papel muy importante sobre la activación de los radicales que poseen estas estructuras facilitando o dificultando su actividad en su zona de actuación (atravesar o no la BHE) Además, nos permitirá caracterizar y obtener una idea del mecanismo coordinación con el biometal.

Para evidenciar su actividad como sensor se somete a distintas disoluciones con una concentración constante de analito, en este caso el metal, obteniendo variaciones en las intensidades de los máximos de absorbancia o emisión (ΔA ó ΔF) con respecto al pH correspondiente.

Las disoluciones suelen ser: HCl, ácido cítrico para generar un rango de acidez que abarca del 3,0-6,2 de pH; por otra parte, para el rango alcalino se usan disoluciones tampón de $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ o disoluciones de NaOH para el rango de 9,2-10,8 de pH. Como estos fármacos se van a usar en un entorno parecido al de la sangre, se utilizan disoluciones con un rango de pH que abarque la zona no cubierta por las otras disoluciones, $\text{pH} = 7,0\text{-}9,0$, entre ellas encontramos el HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinestanosulfónico), un medio que recrea las condiciones fisiológicas parecidas a las del cuerpo humano permitiendo establecer correlaciones de estudios *in vitro* con estudios *in vivo*⁽²¹⁾.

Una vez determinado el entorno más óptimo para el fco, se realiza un estudio de la capacidad del mismo para detectar las concentraciones máximas y mínimas donde puede emitir señal haciendo un barrido dentro de un rango estimado de concentraciones lógico (entorno a $10^{-10}\text{M}\text{-}10^{-2}\text{M}$) y determinar mediante una recta de calibrado la concentración mínima capaz de detectar.

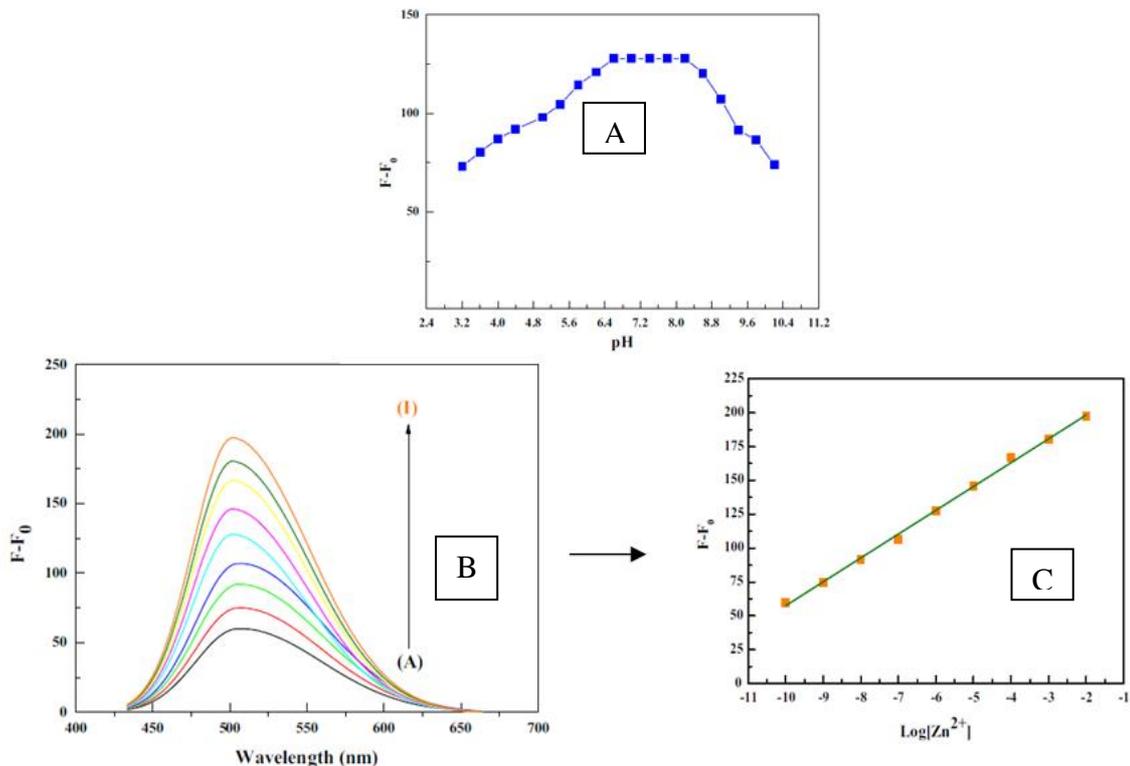


Figura 7.-A representación gráfica de la variación de emisión de fluorescencia en los máximos de emisión a diferentes pH. B representación gráfica del incremento de la intensidad de fluorescencia con respecto al aumento de la concentración de Zn(A→I) en HEPES. C representación gráfica del incremento de fluorescencia respecto al incremento de la concentración de Zn²⁺ (muestra los datos presentados en B)⁽²¹⁾.

4.2.3. Potencia: capacidad quelante

Se hace referencia a la aptitud que tiene el fco para poder establecer una interacción "fuerte" con el biometal, facilitando que la coordinación perdure, es decir, formando una estructura estable con una cinética adecuada.

Para estudiar la fuerza de estos fármacos se debe determinar: la constante de afinidad y la estequiometría del compuesto con el analito.

La constante de afinidad permitirá saber la intensidad con la que se produce la coordinación entre ambos, cuanto más grande sea su valor mejor será la fuerza de su unión. Para ello se utiliza el método de relación molar, mediante la obtención de los espectros de absorción UV-Vis de disoluciones en las que se varía las concentraciones tanto de biometal como fco para establecer distintas relaciones estequiométricas, y así poder representar las variaciones de absorbancia en los picos característicos que muestran la interacción fco-metal frente al ratio de las concentraciones de metal y fco.

Una vez obtenida la curva se aplica el método de doble recíproco que permite linealizar la representación anterior y a través de los datos obtenidos por regresión lineal obtener el valor de la constante de afinidad. También se puede aplicar el método de Beni-Hildebrand que permite obtener la constante de afinidad y la estequiometría del compuesto.

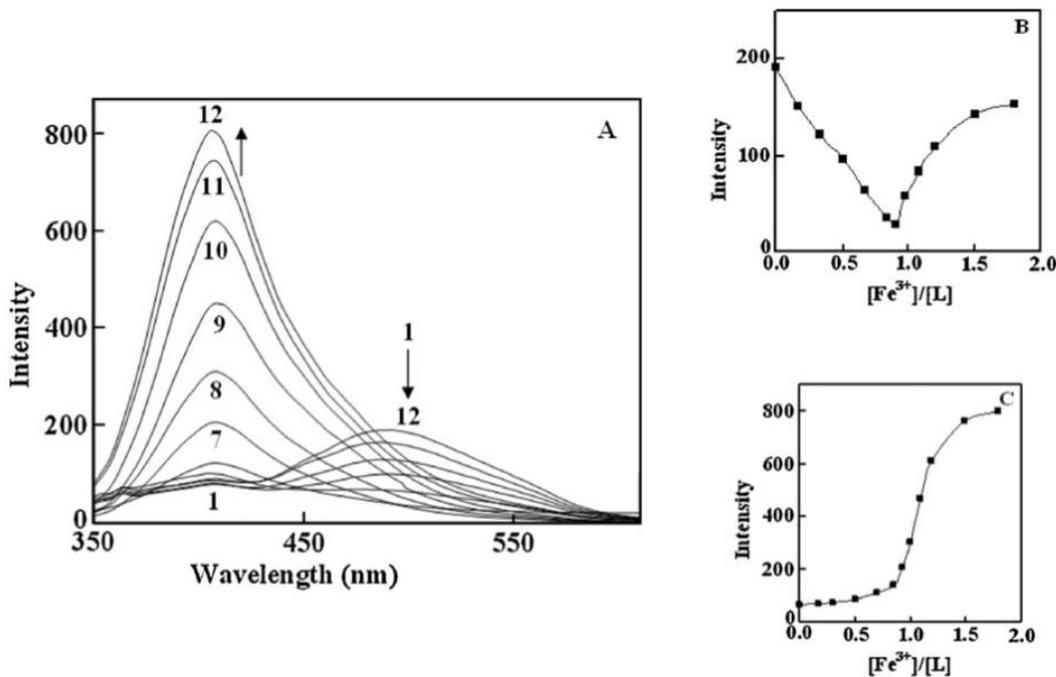


Figura 8.- A Espectros de absorción del fármaco solo, y tras adiciones sucesivas de catión obteniendo relaciones molares distintas. B y C Representación gráfica de la intensidad de absorbancia frente a la relación molar catión/sensor (fco)⁽³⁰⁾.

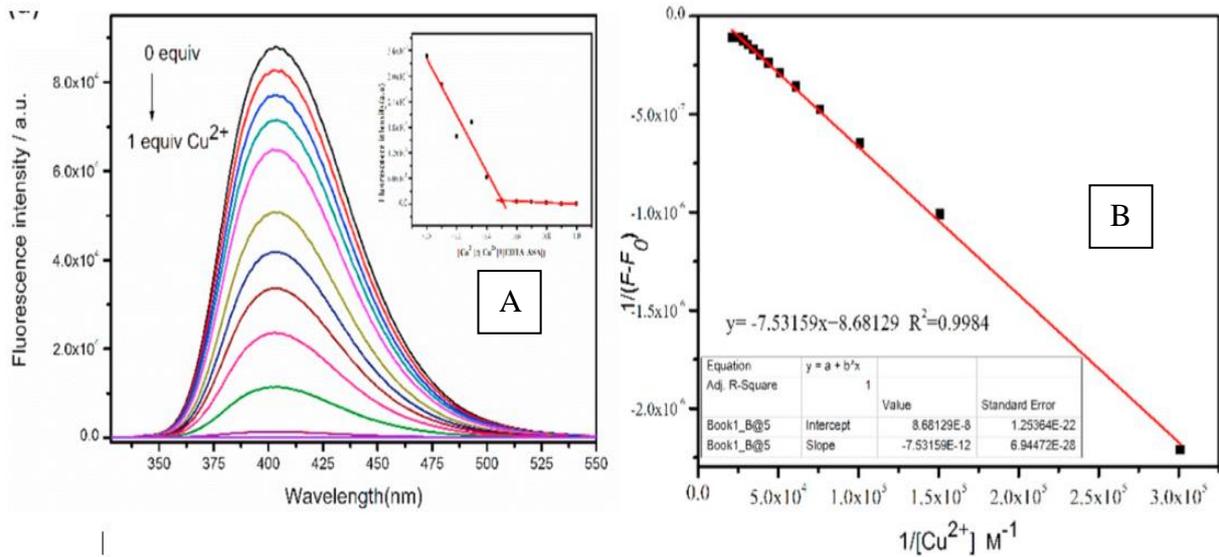


Figura 9.-A Espectros de absorción del fármaco solo, y tras adiciones sucesivas de catión hasta un equivalente obteniendo relaciones molares distintas, juntamente con un gráfico de Job. Representación gráfica del método Benesi-Hildrebrand para la obtención de la constante de afinidad^(29,31).

El índice de coordinación de los complejos que se forman entre el fármaco y el biometal, se puede establecer mediante el método de Job (método de las variaciones continuas) que consiste en mezclar alicuotas de disoluciones equimoleculares de forma que la concentración final de los dos se mantenga constante, obtener los espectros de absorción o fluorescencia de estas disoluciones y, a continuación, representando la absorbancia o la fluorescencia frente a la fracción molar que corresponda. La intersección de las rectas obtenidas en la representación gráfica permite conocer la estequiometría del complejo formado por el fco y el catión metálico.

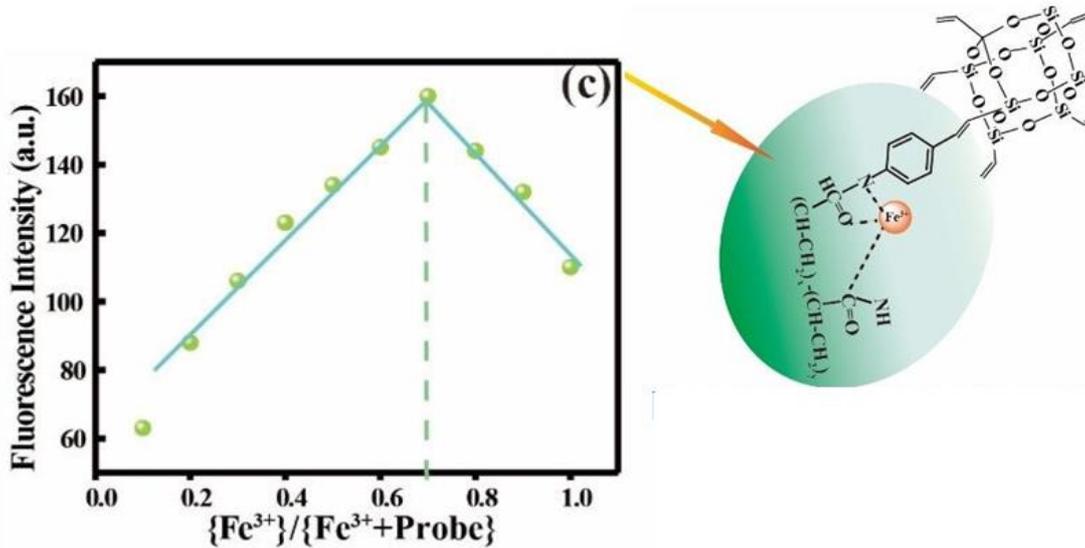


Figura 10.- Representación gráfica del método de Job y esquema de la coordinación del fármaco con el metal⁽²⁸⁾.

5. CONCLUSIONES

1. Las enfermedades neurodegenerativas, en especial la enfermedad de Alzheimer, se han convertido en una epidemia global, por lo que buscar soluciones es una prioridad.
2. Con el análisis desarrollado en este trabajo, puede observarse que esta enfermedad no tiene una etiología determinada, siendo un campo donde investigar, permitiendo desarrollar teorías cada vez más contundentes y desarrollar nuevas estrategias para poder frenar su avance.
3. El papel que juegan los biometales en esta enfermedad va tomando más peso, su acción a nivel celular plantea la generación de fármacos capaces de detectarlos y atraparlos permitiendo frenar el avance progresivo de la enfermedad y al mismo tiempo su diagnóstico precoz, favoreciendo una mejor calidad de vida, lo que se conoce como fármacos terapidiagnósticos (teranóstica).
4. Las técnicas analíticas, espectrofotometría de absorción UV-vis y/o espectrofluorimetría, son herramientas indispensables para esta tarea, ya que permiten caracterizar y optimizar la actividad de estos fármacos a través de los cambios espectrales, tanto a nivel de máximos como a nivel de intensidad de las magnitudes medidas, que se observan, siendo útiles para el control de estas enfermedades, lo que permite "**La Mejora**".

6. BIBLIOGRAFÍA:

1. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Estrategia en Enfermedades Neurodegenerativas del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Centro de Publicaciones. Madrid; 2016. 148 p.
2. Neuroalianza(AEEN).Estudio sobre las enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y social.Universidad Complutense de Madrid.2016. Disponible en: <http://neuroalianza.org/wp-content/uploads/Informe-neuroalianza-Completo-v-5-optimizado.pdf>
3. Jurczynska CP, Ortiz ME, Luque L, Galende AV. Informe de la fundación del cerebro. Impacto social de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. actualización 2017.
4. World Health Organization. Neurological disorders: Public Health challenges. Geneva: World Health Organization; 2006. 218 p.
5. Estrada Rodriguez AE, Zomosa Signoret VC. Papel de la agregación del péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Revista de Educación Bioquímica. 2017;36:2-11.
6. Faller P, Hureau C, La Penna G. Metal Ions and Intrinsically Disordered Proteins and Peptides: From Cu/Zn Amyloid- β to General Principles. Acc Chem Res. 2014;47:2252-9.
7. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. The Lancet. 2011;377:1019-31.
8. Kim A, Lim S, Kim Y. Metal Ion Effects on A β and Tau Aggregation. Int J Mol Sci. 2 de 2018;19:128-43.
9. Hane F, Leonenko Z. Effect of Metals on Kinetic Pathways of Amyloid- β Aggregation. Biomolecules. 2014;4:101-16.
10. Zatta P, Drago D, Bolognin S, Sensi SL. Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. Trends Pharmacol Sci. 2009;30:346-55.
11. D'Acunto CW, Kaplánek R, Gbelcová H, Kejík Z, Bříza T, Vasina L, et al. Metallomics for Alzheimer's disease treatment: Use of new generation of chelators combining metal-cation binding and transport properties. Eur J Med Chem. 2018;150:140-55.
12. Kim J-J, Kim Y-S, Kumar V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. J Trace Elem Med Biol. 2019;54:226-31.
13. Sensi SL, Granzotto A, Siotto M, Squitti R. Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease. Trends Pharmacol Sci. 2018;39:1049-63.
14. Mezzaroba L, Alfieri DF, Colado Simão AN, Vissoci Reiche EM. The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. Neurotoxicology. 2019;74:230-41.

15. Greenough MA, Camakaris J, Bush AI. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2013;62:540-55.
16. Sensi SL, Granzotto A, Siotto M, Squitti R. Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2018;39:1049-63.
17. Zhang Y, Meng S, Ding J, Peng Q, Yu Y. Transition metal-coordinated graphitic carbon nitride dots as a sensitive and facile fluorescent probe for β -amyloid peptide detection. *The Analyst.* 2019;144:504-11.
18. Perez DR, Sklar LA, Chigaev A. Clioquinol: To harm or health. *Pharmacol Ther.* Julio de 2019;199:155-63.
19. Huang M, Xie S-S, Jiang N, Lan J-S, Kong L-Y, Wang X-B. Multifunctional coumarin derivatives: Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition, anti- β -amyloid (A β) aggregation and metal chelation properties against Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015;25:508-13.
20. Knez D, Coquelle N, Pišlar A, Žakelj S, Jukič M, Sova M, et al. Multi-target-directed ligands for treating Alzheimer's disease: Butyrylcholinesterase inhibitors displaying antioxidant and neuroprotective activities. *Eur J Med Chem.* 2018;156:598-617.
21. Naddaf Dezfuli S, Huan Z, Mol JMC, Leeflang MA, Chang J, Zhou J. Influence of HEPES buffer on the local pH and formation of surface layer during in vitro degradation tests of magnesium in DMEM. *Prog Nat Sci Mater Int.* 2014;24:531-8.
22. Choi BY, Jang BG, Kim JH, Seo J-N, Wu G, Sohn M, et al. Copper/zinc chelation by clioquinol reduces spinal cord white matter damage and behavioral deficits in a murine MOG-induced multiple sclerosis model. *Neurobiol Dis.* 2013;54:382-91.
23. Wehbe M, Malhotra AK, Anantha M, Lo C, Dragowska WH, Dos Santos N, et al. Development of a copper-clioquinol formulation suitable for intravenous use. *Drug Deliv Transl Res.* 2018;8:239-51.
24. Tang L, Zhou P, Huang Z, Zhao J, Cai M. New Application of 2-(4-N-Phenyl-3-thiosemicarbazone)-8-hydroxyquinoline as a Sensor for Relay Recognition of Cu^{2+} and Sulfide in Aqueous Solution. *Bull Korean Chem Soc.* 2013;34:2905-8.
25. Sang Z, Li Y, Qiang X, Xiao G, Liu Q, Tan Z, et al. Multifunctional scutellarin-rivastigmine hybrids with cholinergic, antioxidant, biometal chelating and neuroprotective properties for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem.* 2015;23:668-80.
26. Meng J, Zhang H, Dong X, Liu F, Sun Y. RTHLVFFARK-NH 2 : A potent and selective modulator on Cu^{2+} -mediated amyloid- β protein aggregation and cytotoxicity. *J Inorg Biochem.* 2018;181:56-64.
27. Abdel Aziz AA. A novel highly sensitive and selective optical sensor based on a symmetric tetradentate Schiff-base embedded in PVC polymeric film for determination of Zn^{2+} ion in real samples. *J Lumin.* 2013;143:663-9.

28. Mcmillan KS, mccluskey AG, Sorensen A, Boyd M, Zagnoni M. Emulsion technologies for multicellular tumour spheroid radiation assays. *The Analyst*. 2016;141:100-10.
29. González del Moral, P. Análogos de Clioquinol con doble funcionalidad: sensores de bio-metales y relevancia terapéutica en enfermedades neurodegenerativas. Trabajo Fin de Máster, Máster Interuniversitario en Descubrimiento de Fármacos, UCM, UAH, CEU San Pablo, Madrid. 2019
30. Shamsipur M, Sadeghi M, Garau A, Lippolis V. An efficient and selective fluorescent chemical sensor based on 5-(8-hydroxy-2-quinolinylmethyl)-2,8-dithia-5-aza-2,6-pyridinophane as a new fluoroionophore for determination of iron(III) ions. A novel probe for iron speciation. *Anal Chim Acta*. 2013;761:169-77.
31. Chang R, Chen X, Yu H, Tan G, Wen H, Huang J, et al. Modified EDTA selectively recognized Cu²⁺ and its application in the disaggregation of β -amyloid-Cu (II)/Zn (II) aggregates. *J Inorg Biochem*. 2020;203:110-929.