

Agents quelants multifuncionals per a la malaltia d'Alzheimer



Cristina Rodríguez Rodríguez

Tesi Doctoral dirigida per la Dra. Pilar González Duarte
Programa de Doctorat en Química
Departament de Química - Facultat de Ciències
2009

per a més informació

cristina.rodriguez@uab.cat

Agents quelants multifuncionals per a la malaltia d'Alzheimer

Tesi doctoral

Cristina Rodríguez Rodríguez

Dirigida per la **Dra. Pilar González Duarte**

Programa de doctorat en Química

Departament de Química

Facultat de Ciències

2009

Memòria presentada per aspirar al Grau de Doctor per
Cristina Rodríguez Rodríguez

Vist-i-plau de la directora de la tesi

Aspirant a doctora

Dra. Pilar González Duarte

Cristina Rodríguez Rodríguez

Bellaterra, 22 de Juny del 2009

AGRAÏMENTS

Aquesta *excursió* va començar tot just quan havia acabat una etapa important de la meva vida. Aquells primers passos plens d'il·lusió, d'entusiasme però fins i tot amb certa por al desconegut em van dur per camins cada cop més segurs gràcies a l'ajuda, la col·laboració i el suport d'un gran nombre de persones que han participat, s'han implicat i han estimat aquest treball tant com jo. Per aquest motiu voldria expressar en aquest full el meu agraïment a totes elles.

En primer lloc a la meva directora de tesi, la Dra. Pilar González Duarte, de la qual he tingut el privilegi de ser la seva darrera doctoranda. Li agraeixo l'haver-me donat l'oportunitat de treballar en allò que més m'agrada dins d'una línia que m'ha atret moltíssim i que ha despertat en mi un gran interès per la química inorgànica dins el món de la medicina. Gràcies per la confiança que ha dipositat sempre en mi, pel seu suport, la seva dedicació i l'haver-me mostrat el camí per arribar a ser algun dia una bona científica.

La interdisciplinarietat d'aquesta tesi ha requerit la col·laboració amb experts de diferents àrees, els quals mereixen una especial menció en aquest apartat. El més bo de tot plegat és sens dubte l'intercanvi de coneixements i les noves coneixences que he fet. Cal destacar a la Dra. Mariona Sodupe i el seu grup format pel Dr. Albert Rimola, Dr. Luis Rodríguez i el Dr. Piero Ugliengo, experts en càlculs teòrics dins de sistemes biològics, pel seu interès, suport i magnífic treball teòric que es presenta en aquest treball. Al Dr. Hugo Gutiérrez de Terán, expert en *docking* i dinàmica molecular, pel seu interès i disponibilitat en tot moment. El grup liderat pel Dr. Josep Vendrell, integrat pel Dr. Salvador Ventura i la Natàlia Sánchez de Groot, per la valuosa aportació en els estudis bioquímics presentats en aquesta tesi. El Dr. José Vidal-Gancedo i la Dra. Vega Lloveras, per l'enregistrament i l'anàlisi dels espectres d'EPR així com al Dr. Ángel Álvarez per la resolució d'estructures cristal·lines.

M'agradaria expressar el meu agraïment també, a tots aquells que m'heu fet un lloc al vostre laboratori, heu fet que em senti com a casa des del primer dia i que part de la meva formació ha estat gràcies a col·laboracions puntuals amb vosaltres. Així, m'agradaria agrair al grup de Glicoconjugats del CSIC-IIQAB liderat pel Dr. Gregori València i la Dra. Gemma Arsequell el seu entusiasme contagiós, la seva confiança i l'haver-me ensenyat com "fer química" en un laboratori orgànic. Al Dr. Antoni Planas i Joan Nieto de l'IQS, l'haver-me mostrat com es treballa en un laboratori bioquímic i ajudar-me a interpretar les dades obtingudes. A la Natàlia Sánchez de Groot del Dept. de Bioquímica de la UAB per la seva disponibilitat i per iniciar-me en l'interessant món de la microscòpia de fluorescència.

Al Dr. Jordi Mestres de l'IMIM per despertar en mi un gran interès en una nova disciplina fins aleshores desconeguda per a mi: la quimioinformàtica. Al Dr. Santiago Maspoch i al Dr. José Manuel Amigo, per les seves orientacions en la part més analítica d'aquesta tesi.

Vull donar les gràcies a tots els companys del departament que m'heu ajudat, m'heu animat i amb qui tan bones estones he passat, en especial, als meus companys del laboratori i als autèntics *sèniors* que m'han deixat moltes coses bones. L'Òscar que m'ha ajudat sempre amb les masses que no veia clares i qui sempre ha tingut una frase divertida quan es necessitava. Al Roger per la seva felicitat contagiosa. A la Laura Villarreal pel seu humor característic i els seus consells. Al Fernando Novio per fer que mai m'hagi sentit sola al laboratori experimentalment parlant. A la Montse per la seva alegria i el seu recolzament. Al recent Dr. Rubén Orihuela per ser un molt bon company de laboratori amb el que estic compartint dia a dia el que significa acabar aquesta etapa. I a les tres noies més simpàtiques de la planta, la Sílvia, la Cata i l'Ester per omplir d'alegria el laboratori!

I anant ja a nivell més personal vull agrair a tots els amics/amigues i companys de llicenciatura que m'heu aconsellat, animat, fet costat i escoltat mil i una vegades les presentacions en powerpoint! Sobretot, per preocupar-vos per la meua "vida científica". També agrair al meu *company de viatge*, Quim, qui ha estat un suport molt important animant-me a seguir endavant per aquest dur camí de la recerca i confiant plenament en que aconseguiria les fites!

I finalment però no menys important, agraeixo i dedico aquesta tesi als meus pares i al meu germà Jordi, pel suport incondicional que m'han donat en aquest projecte que vaig decidir començar ara farà uns anys, per tots els nervis que han hagut de neutralitzar transformant en ànims i per haver-me donat l'oportunitat d'estudiar sense haver-me de preocupar per moltes de les adversitats que presenta la vida.

CRISTINA RODRÍGUEZ



A la meva família,

*Sorprendre'ns per alguna cosa
és el primer pas cap al descobriment*

Louis Pasteur

*Quan arribi la inspiració,
que em trobi treballant*

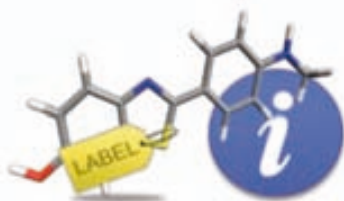
Pablo Picasso



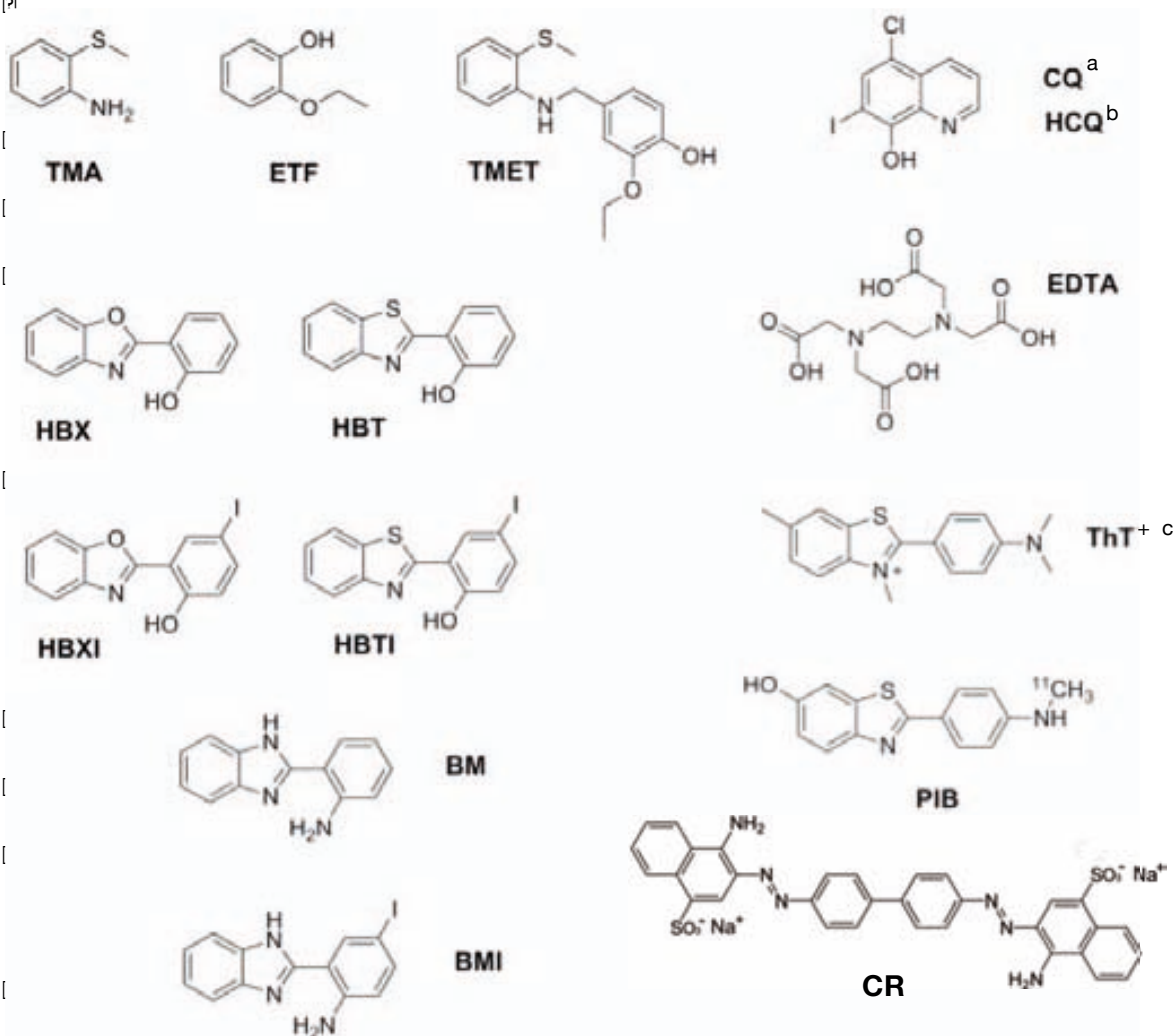
ABREVIATURES

3D	tridimensional
8-HQ	8-hidroxiquinoleïna
Abs	absorbància
Abs calc	absorbància calculada
Abs cor	absorbància corregida
Abs exp	absorbància experimental
AINE	antiinflamatoris no-esteroïdals
Ala	alanina
APA	Associació de psiquiatria americana
APOE	apolipoproteïna E
APP	proteïna precursora amiloide
Asp	aspàrtic
A β	pèptid β -amiloide
BBB	barrera hematoencefàlica
BM	2-(2-aminofenil)-1 <i>H</i> -benzimidazol
BMI	2-(1 <i>H</i> -benzo[d]imidazol-2-il)-4-iodoanilina
CAMD	tècniques de disseny molecular assistides per ordinador
CAT	N-monocloro-p-toluensulfonamida
CD	dicroïsme circular
clog P	logaritme del coeficient de partició calculat teòricament
CNS	sistema nerviós central
CQ	clioquinol
CR	roig Congo
CSD	base de dades estructural de Cambrigde
Cys	cisteïna
DB-file	fitxer corresponent a una base de dades
DFO	desferrioxamina
DFT	teoria del funcional de la densitat
DM	dinàmica molecular
DMSO	dimetilsulfòxid
DTPA	àcid dietilentriaminopentaacètic
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
EETs	encefalopaties espongiformes transmissibles
EPR	ressonància paramagnètica d'espín
ESI-MS	espectrometria de masses amb ionització per electroesprai
ETF	l·ligand 2-(etoxi)fenol
FDA	Food and Drug Administration
FDG	fluorodesoxiglucosa
Glu	glutàmic
HBA	àtoms acceptors d'enllaç d'hidrogen
HBD	àtoms donadors d'enllaç d'hidrogen
HBT	2-(2-hidroxifenil)benzotiazol
HBTI	2-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-iodofenol
HBX	2-(2-hidroxifenil)ibenzoxazol
HBXI	2-(benzo[d]oxazol-2-il)-4-iodofenol
His	histidina
I	força iònica

IAPP	proteïna amilina
ID	nombre identificatiu
Ile	isoleucina
Ka	constant d'acidesa
Kd	constant d'afinitat lligand-proteïna
Leu	leucina
log BB	logaritme del coeficient de partició en el sistema de distribució cervell - sang
log P	logaritme del coeficient de partició
log Pow	logaritme del coeficient de partició en el sistema de distribució octanol - aigua
Lys	lisina
MA	malaltia d'Alzheimer
Met	metionina
MPACs	compostos atenuadors de metalls enllaçats a proteïnes
MPO	mieloperoxidasa
MRI	ressonància magnètica d'imatge
MS-IQ	espectrometria de masses amb ionització química
NFTs	cabdells neurofibril·lars
NIRI	mètodes de diagnosi per imatge no invasiva amb radiotracadors
OMS	Organització Mundial de la Salut
PBS	tampó fosfat salí (pH 7.4)
PDB	base de dades de proteïnes amb estructura tridimensional coneguda
PET	tomografia d'emissió per positrons
Phe	fenilalanina
PIB	compost de Pittsburgh B
pKa	logaritme decimal de la constant d'acidesa canviat de signe (-log Ka)
PM	pes molecular
PS1	proteïna Presenilina 1
PS2	proteïna Presenilina 2
PSA	àrea de la superfície polar
QSAR	relacions quantitatives estructura-activitat
QSPR	relacions quantitatives estructura-propietat
RMN	ressonància magnètica nuclear
ROS	espècies reactives d'oxigen
SD-file	fitxer de dades estructurals
SMARTS	fitxer <i>Smile Arbitrary Target Specification</i>
SMILES	fitxer <i>Simplified Molecular Input Line Entry Specification</i>
SPECT	tomografia computeritzada per emissió de fotons simples
T	temperatura
TAC	tomografia axial computaritzada
tcAChE	acetilcolinesterasa del peix <i>Torpedo californica</i>
TETA	trietilentetraamina
ThT	tioflavina T
TMA	2-(tiometil)anilina
TMET	N-[(3-etoxi-4-hidroxil)benzil]-2-metiltioanilina
TPSA	àrea de la superfície polar topològica
Trp	aminoàcid triptòfan
TTR	proteïna transtirretina
Tyr	tirosina
UV-vis	radiació Ultravioleta-visible
V _{eq}	volum afegit en el punt d'equivalència
β	constant de formació
ε	coeficient d'extinció molar
λ	longitud d'ona



ÍNDEX DE MOLÈCULES



^a abreviatura comú

^b abreviatura utilitzada quan es fa referència al comportament àcid-base

^c catió del compost (ThT)Cl, el qual freqüentment s'anomena tioflavina-T



TAULA DE CONTINGUTS

I. INTRODUCCIÓ	1
1. LA MALALTIA D'ALZHEIMER	3
1.1 Aspectes generals	5
1.2 Impacte socioeconòmic	6
1.3 Factors de risc	7
1.4 Histopatologia : els cabdells neurofibril·lars i les plaques senils	8
1.5 Origen de les plaques senils : La formació del pèptid A β	10
1.6 Característiques comunes de les fibres amiloides	11
1.7 Model d'estructura 3D d'una protofibril·la del pèptid A β_{1-42}	12
1.8 Interacció de l'agent de tinció tioflavina T amb el pèptid A β	14
1.9 El paper dels ions metàl·lics en la MA	16
1.10 Diagnòstic de la MA	17
1.11 Teràpia en la MA	21
1.12 La nova generació d'agents quelants en la MA : multifuncionalitat	23
2. LA QUIMIOINFORMÀTICA: UNA NOVA EINA AL LABORATORI QUÍMIC	27
2.1 Aspectes generals	29
2.2 Contribució de la quimioinformàtica en la indústria farmacèutica. Perspectives de futur en el laboratori químic	30
II. OBJECTIUS	33
Objectiu 1	35
Objectiu 2	36
Objectiu 3	37
<i>Estructura general del treball</i>	37
<i>Col·laboracions</i>	37
III. RESULTATS I DISCUSSIÓ	39
3. UTILITZACIÓ DE TÈCNiques QUIMIOINFORMÀTIQUES EN EL DISSENY I SELECCIÓ D'AGENTS QUELANTS MULTIFUNCIONALS AMB POTENCIAL APLICACIÓ EN LA MA	41
3.1 Disseny dels esquelets dels lligands per enllaçar Cu(II) i Zn(II)	44
3.2 Selecció dels lligands òptims mitjançant eines quimioinformàtiques	46
3.2.1 Cerca dels lligands que contenen els esquelets moleculars establers en bases de dades comercials. Generació de quimiotèques virtuals	47

3.2.2	Capacitat d'una molècula de travessar la barrera hematoencefàlica (BBB). Càlcul teòric del paràmetre log BB	49
3.3	Determinació de les constants de formació dels complexos dels lligands TMA, ETF i TMET envers Cu(II) i Zn(II)	59
3.3.1	El programa pHab2000	60
3.3.2	Determinació de les constants d'acidesa	61
3.3.2.a	Lligand 2-(metiltio)anilina (TMA)	62
3.3.2.b	Lligand 2-(etoxi)fenol (ETF)	64
3.3.2.c	Lligand N-[(3-etoxi-4-hidroxibenzil)-2-metiltioanilina (TMET)	66
3.3.3	Determinació de les constants de formació dels complexos dels lligands TMA,ETF i TMET amb Cu(II) i Zn(II)	68
3.3.3.a	Lligand TMA vs. Cu(II)	71
3.3.3.b	Lligand TMA vs. Zn(II)	72
3.3.3.c	Lligand ETF vs. Cu(II)	73
3.3.3.d	Lligand ETF vs. Zn(II)	74
3.3.3.e	Lligand TMET vs. Cu(II)	76
3.3.3.f	Lligand TMET vs. Zn(II)	77
3.4	Conclusions.....	79
4.	AGENTS TERAPÈUTICS I DE DIAGNOSI EN LA MA: DISSENY, SELECCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE COMPOSTOS QUELANTS AMB PROPIETATS INTERCALANTS EN FIBRES AMILOIDES.....	81
4.1	Disseny de l'esquelet molecular d'un agent quelant multifuncional	84
4.2	Selecció dels lligands òptims mitjançant tècniques quimiinformàtiques.....	85
4.2.1	Selecció de la base de dades i generació de quimioteques virtuals que contenen M1.....	85
4.2.2	Cribatge virtual : Aplicació de filtres i selecció dels millors candidats	86
4.3	Reacció de iodació dels compostos HBX, HBT i BM	89
4.3.1	Propietats estructurals de HBXI, HBTI i BMI. Difracció de raigs-X i càlculs DFT .	90
4.3.2	Determinació de les constants d'acidesa del HBXI, HBTI,BMI i HCQ	92
4.4	Síntesi i caracterització dels complexos ML ₂ (M= Cu(II), Zn(II) i L = BXI, BTI, BMI)....	94
4.4.1	Caracterització dels complexos de Cu(II) per EPR.....	95
4.4.2	Estudi de l'estructura 3D dels complexos ML ₂ (M = Cu(II), Zn(II) ; L = BXI, BTI, BMI).....	95
4.4.3	Determinació de les constants de formació dels complexos ML ₂ (M = Cu(II) i Zn(II) i L = BXI, BTI, BMI i CQ).....	98
4.5	Avaluació de la capacitat inhibidora de la formació de fibres A β en absència i presència de Cu(II) i Zn(II) dels lligands HBXI, HBTI i BMI	100
4.6	Avaluació de la capacitat intercaladora dels lligands HBX, HBT, BM i els seus derivats iodats en fibres amiloides.....	102

4.6.1 Propietats fluorescents dels lligands HBXI, HBTI i BMI : Transferència protònica fotoinduïda.....	104
4.7 Conclusions.....	106
5. INTERACCIÓ DEL CATIÓ ThT⁺ AMB LES FIBRES AMILOIDES: DETERMINACIÓ DE L'ESTRUCTURA 3D I ESTUDI DE LA SEVA POSICIÓ, ORIENTACIÓ I ENERGIA EN LES FIBRES Aβ₁₋₄₂	109
5.1 Aspectes generals del catió ThT ⁺	112
5.2 Estructura cristal·lina del catió ThT ⁺	115
5.3 Predicció de la interacció ThT ⁺ -pèptid A β ₁₋₄₂	121
5.3.1 Estudis d'acoblament lligand-proteïna (<i>Docking</i>)	121
5.3.2 Estudis de dinàmica molecular	122
5.3.3 Estudis químic-quàntics del catió ThT ⁺ amb la cadena polipeptídica de l'estructura tipus fulla β	124
5.4 Conclusions.....	126
IV. CONCLUSIONS GENERALS	129
V. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL I TÈCNiques UTILITZADES.....	139
V.1 Consideracions generals.....	140
V.2 Estudi espectrofotomètric de les constants d'acidesa i les constants de formació dels lligands vs. Cu(II) i Zn(II)	141
V.2.1 Muntatge experimental	141
V.2.2 Determinació de les constants d'acidesa	141
V.2.2.1 Lligands TMA, ETF i TMET	142
V.2.2.2 Lligands HBXI, HBTI, BMI i HCQ.....	142
V.2.3 Determinació de les constants de formació dels lligands envers Cu(II) i Zn(II).....	143
V.2.3.1 Sistema TMA-Cu(II)	143
V.2.3.2 Sistema TMA-Zn(II).....	144
V.2.3.3 Sistema ETF-Cu(II)	144
V.2.3.4 Sistema ETF-Zn(II).....	144
V.2.3.5 Sistema TMET-Cu(II)	144
V.2.3.6 Sistema TMET-Zn(II).....	145
V.2.3.7 Sistema L-Cu(II) on L = BXI, BTI i BMI	145
V.2.3.8 Sistema L-Zn(II) on L = BXI, BTI i BMI.....	145
V.2.3.9 Sistema CQ-Cu(II)	146
V.2.3.10 Sistema CQ-Zn(II).....	146
V.3 Síntesi dels derivats iodats dels lligands HBX, HBT i BM	146
V.4 Síntesi dels complexos ML ₂ (M = Cu(II) i Zn(II) ; L = BXI, BTI i BMI)	148

V.5 Formació de fibres amiloides.....	149
V.6 Estudi de la capacitat intercalant dels lligands mitjançant fluorescència.....	150
V.6.1 Mesures de fluorescència.....	150
V.6.2 Microscopia de fluorescència.....	152
V.7 Estudi de la capacitat coordinant dels lligands en presència del pèptid A β ₁₋₄₀ incubat amb Cu(II) i Zn(II). Assajos de turbidimetria	153
V.8 Cristal·lització del catió ThT ⁺	154
V.9 Programari utilitzat	154
VI. BIBLIOGRAFIA.....	156
VII. ANNEX.....	164
Espectres corresponents a les valoracions UV-vis dels lligands ETF, TMA i TMET. Dades de RMN corresponents a la reacció de iodació dels lligands precursors del compost TMET	166
Article 1	176
Design, Selection and Characterization of Thioflavin-Based Intercalation Compounds with Metal Chelating Properties for Application in Alzheimer's Disease	
<i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2009 , 131(4), 1436	
Article 2	204
Crystal structure of thioflavin-T and its binding to amyloid fibrils : insights and implications at the molecular level	
<i>Chem. Commun.</i> , 2010 , 46, 1156–1158	

I. INTRODUCCIÓ



CAPÍTOL 1

La malaltia d'Alzheimer

1.1. Aspectes generals

El terme demència (del llatí de mentis) ja s'utilitzava en el segle I a.C. per tal d'expressar que algú tenia les pertorbades les facultats mentals. Si bé al llarg dels segles, el concepte demència s'ha confós amb el terme bogeria i amb d'altres trastorns mentals psiquiàtrics, aquest ha anat adquirint un significat més homogeni i precís. Actualment, segons la *American Psychiatry Association* (APA), el terme demència es pot definir com una disminució de la capacitat intel·lectual acompanyada de canvis psicològics i de comportament que provoquen una alteració a la qualitat de vida de la persona. Com bé es pot comprovar amb la mateixa definició, no es refereix a cap malaltia en concret, sinó a un conjunt de símptomes relacionats amb una disminució de les capacitats mentals que van afectant de manera gradual a la memòria, al llenguatge i a la capacitat d'actuar. Avui existeixen més de 20 malalties que presenten aquests símptomes, les més conegudes són la malaltia de Parkinson, la malaltia d'Alzheimer, la demència vascular i la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (la variant humana de l'encefalopatia espongiforme bovina, popularment coneguda com *la malaltia de les vaques boges*).¹



Figura 1.1. Alois Alzheimer (1864-1915)

El descobriment de la malaltia d'Alzheimer (MA) es remunta a finals del segle XIX, quan la demència era considerada per a la majoria de psiquiatres com un trastorn mental únicament relacionat amb l'edat. Emil Kraepelin (1856-1926) i Alois Alzheimer (1864-1915), patòlegs i psiquiatres de la Universitat de Múnic, van ser els pioners en estudiar la histologia de cervells que patien alteracions mentals amb la finalitat de comprendre millor l'origen dels trastorns.

El 4 de Novembre de 1906, A. Alzheimer (Figura 1.1) presentà per primera vegada a la *37th Conference of South-West German Psychiatrists* a Tübingen, una observació anatomo-clínica amb la descripció de plaques senils, cabdells neurofibril·lars i canvis arterioscleròtics. Aquestes lesions, les quals no havien estat mai descrites, provenien d'una pacient, Augusta

D., la qual va morir als 51 anys d'edat després d'haver estat més de 4 anys ingressada. Durant aquest temps va presentar un quadre clínic constituït per un progressiu deteriorament cognitiu, disminució de la memòria, al·lucinacions auditives i trastorns de conducta.²⁻⁴ Es tractava,

doncs, del primer cas descrit de malaltia d'Alzheimer (MA), la malaltia neurodegenerativa* més estudiada des del punt de vista bioquímic i genètic durant la darrera dècada.

1.2. Impacte socioeconòmic

Actualment, la MA és la forma més comú de demència en la tercera edat, la qual no només té una forta repercussió social sinó també es preveu un increment de la seva prevalença degut a l'augment de l'esperança de vida (Figura 1.2). S'estima que cada vint anys es doblarà el nombre de casos en els països desenvolupats, amb 40 milions de persones afectades al 2020 i 81 milions al 2040.⁵ Pel que fa a la incidència, es considera que augmenta exponencialment a partir dels 65 anys. Com es pot comprovar a la Figura 1.2, la MA afecta entre un 5 i un 10% de la població que supera els 75 anys i fins a un 40% de la de més de 95 anys.⁶ L'increment de la incidència es posa de manifest si es comparen les xifres actuals amb els dos casos que va trobar A. Alzheimer a principis de segle XX. Aquesta intensificació de casos és conseqüència de l'augment d'esperança de vida que s'ha reflectit en un increment del nombre de malalties neurodegeneratives, entre les quals destaca la malaltia d'Alzheimer que representa un 60-70% dels casos de demència. Respecte la distribució geogràfica, a Catalunya s'estima que actualment hi ha més de 40.000 persones afectades per aquesta malaltia; a Espanya, com a mínim, 200.000 persones i, segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), la xifra arriba als 20 milions de casos només als Estats Units.⁷⁻¹⁰ Com a mitjana, la durada de la MA és de 8 a 12 anys, al començament dels quals sol haver-hi un període de 2 a 3 anys en el qual la simptomatologia pot passar inadvertida.⁹

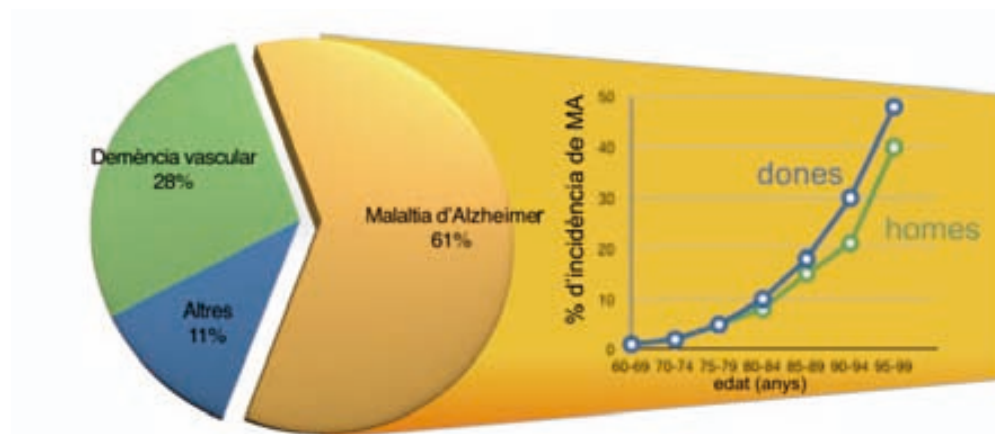


Figura 1.2. Prevalença i incidència de la MA: a) respecte les malalties que causen demència i, b) respecte el gènere de les persones

* alteració greu neuronal, la qual pot comportar demència

1.3. Factors de risc

Donada la important repercussió individual, familiar i social que té la MA s'estan duent a terme nombrosos estudis sobre els possibles factors de risc implicats en l'origen de la malaltia. Com es pot comprovar a la Figura 1.2, els estudis epidemiològics mostren que un dels factors de risc més importants en aquesta malaltia és la pròpia edat de l'individu. A la mateixa figura es pot observar que la prevalença de la MA és més gran en dones que en homes per a tots els grups d'edat. Aquest fet s'ha relacionat amb l'efecte protector dels estrògens com a antioxidants.^{11,12}

Des de fa anys s'estudien les bases genètiques de la malaltia d'Alzheimer (MA). S'ha demostrat que les formes primerenques de la patologia (aparició entre els 30 i els 60 anys) estan causades per tres gens que segueixen un patró d'herència autosòmic dominant.¹³ Aquest patró mendelià sols explica un 5-10% d'aquests casos.¹⁴ No obstant, si bé aquests tres gens causen la MA "familiar", encara no es coneix bé la base genètica que explicaria les formes tardanes que són, amb diferència, les més freqüents. La MA no familiar (o esporàdica) apareix a partir dels 60 anys, presenta unes característiques clíniques semblants a les formes primerenques i té una base genètica complexa. Com tota malaltia genèticament complexa hi ha diverses variants genètiques, possiblement un nombre elevat i difícil d'estimar, que juntament amb l'ambient juguen un paper molt important com factors de predisposició a la MA. Fins avui s'han descrit set variants genètiques associades a la MA, entre elles APO ε4, una variant del gen que codifica l'apolipoproteïna E, APOE, que es troba en el 40% dels pacients MA d'aparició tardana.¹³ Malgrat les "potents" eines avui a l'abast dels investigadors per a l'estudi dels genomes, el fet que hi hagi molts factors genètics potencialment implicats i que cadascun d'ells tingui un efecte lleu sobre el fenotip, dificulta molt la tasca d'identificació. Sense menysprear l'efecte de l'ambient, tant extern com "intern", és a dir el fons genètic de cada pacient.

Molts estudis genètics han demostrat que les formes primerenques són degudes a mutacions en tres gens diferents: el que codifica per la proteïna precursora del pèptid β-amiloide (APP) i els gens de la presenilina 1 (PS1) i 2 (PS2).¹³ Les mutacions en aquests gens comporten tant la sobreproducció de la proteïna APP com un augment en l'activitat d'algunes de les proteases implicades en la formació del pèptid Aβ que, com es veurà en l'apartat 1.5, és l'origen de la MA.^{13,15,16} No és d'estranyar que pacients amb Síndrome de Down manifestin lesions cerebrals pròpies de la MA a edats inferiors als 50 anys, atès que el gen que codifica a l'APP està localitzat en el cromosoma 21, el qual es troba triplicat en aquests casos.¹⁷

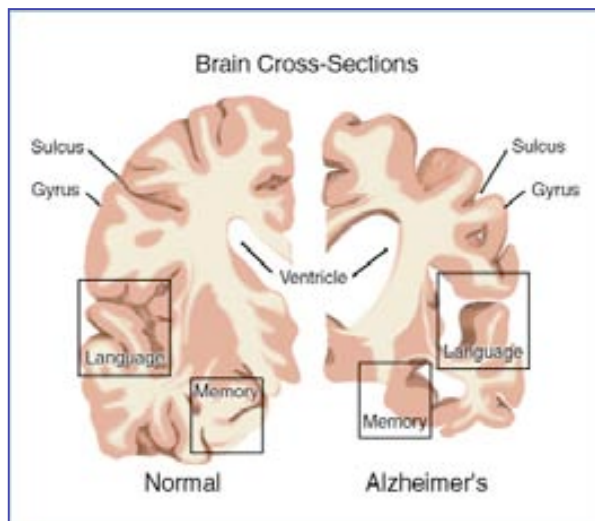
El gen que codifica l'APOE és un factor de risc que incrementa la susceptibilitat a la malaltia. L'APOE és una proteïna lipídica que transporta el colesterol i els triglicèrids actuant com a reparadora de membranes cel·lulars. El fet que aquesta proteïna hagi estat identificada a les lesions més freqüents que presenten els cervells de pacients MA (les plaques senils i els cabdells neurofibril·lars) ha suggerit una relació entre el gen de l'APOE i la sobreproducció del pèptid A β , per tant, amb la predisposició a patir la MA.¹⁸

Si bé s'han descrit molts altres factors de risc, encara avui molts són motiu de controvèrsia. A mode d'exemple es poden esmentar les lesions cranials,¹⁹ la relació entre el nivell educatiu i la MA,^{20,21} la diabetis²²⁻²⁵ i la concentració d'alumini en aigües potables.^{26,27}

1.4. Histopatologia: els cabdells neurofibril·lars i les plaques senils

La MA clínicament es caracteritza per l'alteració progressiva i irreversible de les funcions cognitives deguda a la mort neuronal, localitzada sobretot en el còrtex cerebral i en l'hipocamp.¹⁰ Pel que fa a les lesions macroscòpiques, el cervell afectat en comparació amb un cervell sa presenta, a nivell anatomopatològic, una atròfia del còrtex cerebral molt important, acompanyada per una disminució en el pes de la massa cerebral, un retall en els solcs i plegaments del cervell i un augment del volum ventricular (Figura 1.3).^{6,28}

Figura 1.3. Esquema de la secció vertical del cervell d'un individu sa (esquerra) i d'un afectat per la malaltia d'Alzheimer (dreta).



D'altra banda, un anàlisi histopatològic del teixit cerebral permet obtenir una confirmació definitiva del diagnòstic neurològic. Aquesta comprovació s'obté si s'observen cabdells neurofibril·lars (NFTs acrònim de *neurofibrillary tangles*), formats per la proteïna Tau, i les plaques senils, formades pel pèptid β -amiloide (A β) (Figura 1.4). Altres característiques microscòpiques remarcables són la degeneració neuronal i la pèrdua sinàptica. Si bé aquestes lesions es localitzen inicialment en el còrtex cerebral i a l'hipocamp, en estadis més avançats

de la malaltia es troben en gran part del teixit cerebral. Aquestes alteracions també es produeixen el procés d'envelliment normal, però amb menys intensitat i amb una distribució diferent en el cervell.⁶

Els cabdells neurofibril·lars (NFT) són dipòsits intracel·lulars compostos principalment per la proteïna Tau, que està associada als microtúbuls neuronals als quals estabilitza perquè puguin establir la polaritat cel·lular i intervenir en el transport intracel·lular. En el desenvolupament de la MA, la proteïna Tau, habitualment soluble, és hiperfosforilada anormalment per diferents quinases, el que causa la seva dissociació i la formació d'estructures filamentosos. Aquests filaments són insolubles, contribueixen a la formació dels cabdells dins el citoplasma de la neurona i, en darrer terme, provoquen canvis en el citoesquelet de les neurones afectades. El nombre de neurones amb cabdells neurofibril·lars s'incrementa amb la progressió de la malaltia i es correlaciona força amb el grau de severitat de la mateixa.

Les plaques senils són les lesions més abundants observades en cervells post-mortem de pacients afectats per la MA.²⁹ Es caracteritzen per ser estructures esfèriques, relativament grans (10-200 μm) que es disposen a l'espai extracel·lular. Aquests dipòsits estan formats principalment pel pèptid β -amiloide ($\text{A}\beta$). L'esmentat pèptid $\text{A}\beta$, d'uns 4 kD, es produeix a partir d'una proteïna precursora transmembranaral que es coneix amb les sigles APP, de l'anglès *Amyloid Precursor Protein*, d'acord amb el procés que es descriu en el següent epígraf.

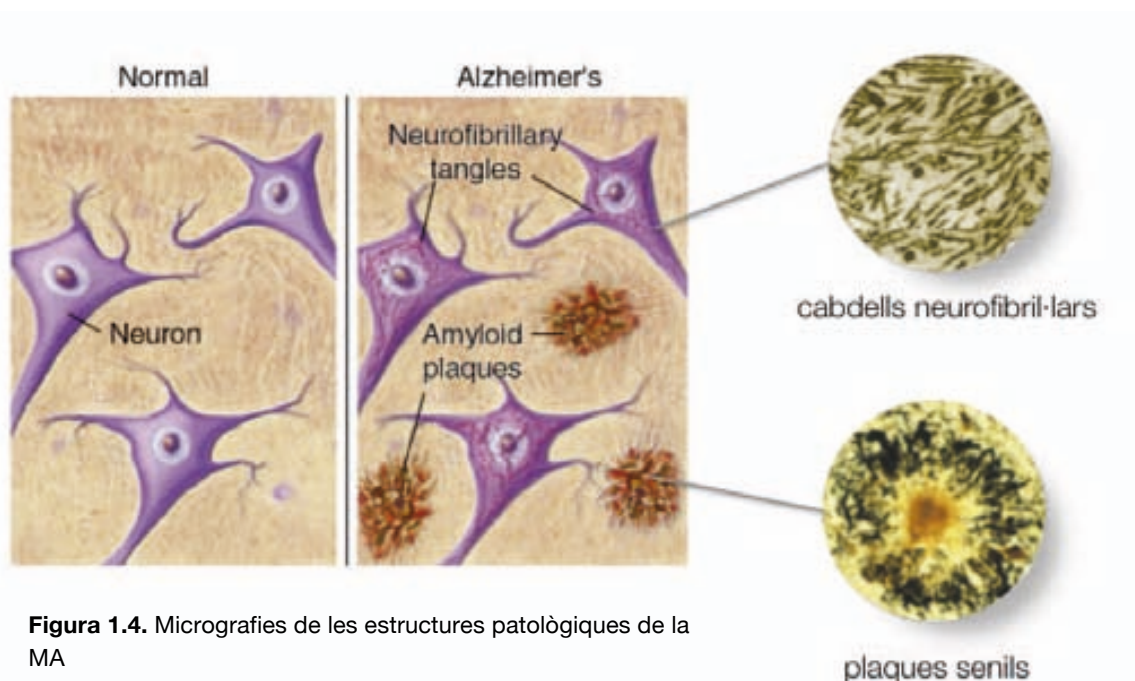


Figura 1.4. Micrografies de les estructures patològiques de la MA

La presència de les dues estructures patològiques diferents, NFTs i les plaques senils, va suscitar una controvèrsia al voltant de la importància de cadascuna d'elles a l'inici de la malaltia: certs investigadors van reivindicar el rol de la proteïna Tau com a desencadenant de tots els esdeveniments patològics de la MA, mentre que d'altres, el varen atribuir principalment al pèptid A β formulant la *hipòtesi amiloide*.³⁰ Aquesta hipòtesi és una de les principals teories sobre els processos patològics que succeeixen a la MA. Postula que la producció, agregació i deposició de l'A β en les plaques amiloides és causant d'una cascada de processos que desemboquen en la mort neuronal. La resposta inflamatòria, el dany vascular i el deteriorament de les capacitats cognitives pròpies d'aquesta alteració serien conseqüència de la formació d'aquestes plaques.

1.5. Origen de les plaques senils: Formació del pèptid β -amiloide

El component principal de les plaques senils és el pèptid A β , el nom del qual fa referència a una família de pèptids relativament petits, de 39-43 aminoàcids. Aquest pèptid en condicions normals és segregat a l'espai extracel·lular de la neurona degut al processament de la proteïna transmembrana APP de 695 aminoàcids, present en totes les cèl·lules neuronals. El seu extrem C-terminal es troba en el citoplasma de la cèl·lula, mentre que l'extrem N-terminal es localitza cap a l'exterior cel·lular.³¹ La seva funció biològica és encara desconeguda, tot i que es creu que pot estar relacionada amb l'adhesió cel·lular, la inhibició de serin-proteases o bé el creixement i protecció neuronal.^{32,33} L'APP és processada proteolíticament per uns enzims específics anomenats secretases. Se sap que l'acció conjunta d'almenys tres tipus de secretases (α , β i γ) pot alliberar diferents pèptids, que varien en la seva longitud.³⁴ Així doncs, el processament de l'APP pot tenir lloc mitjançant dues vies:

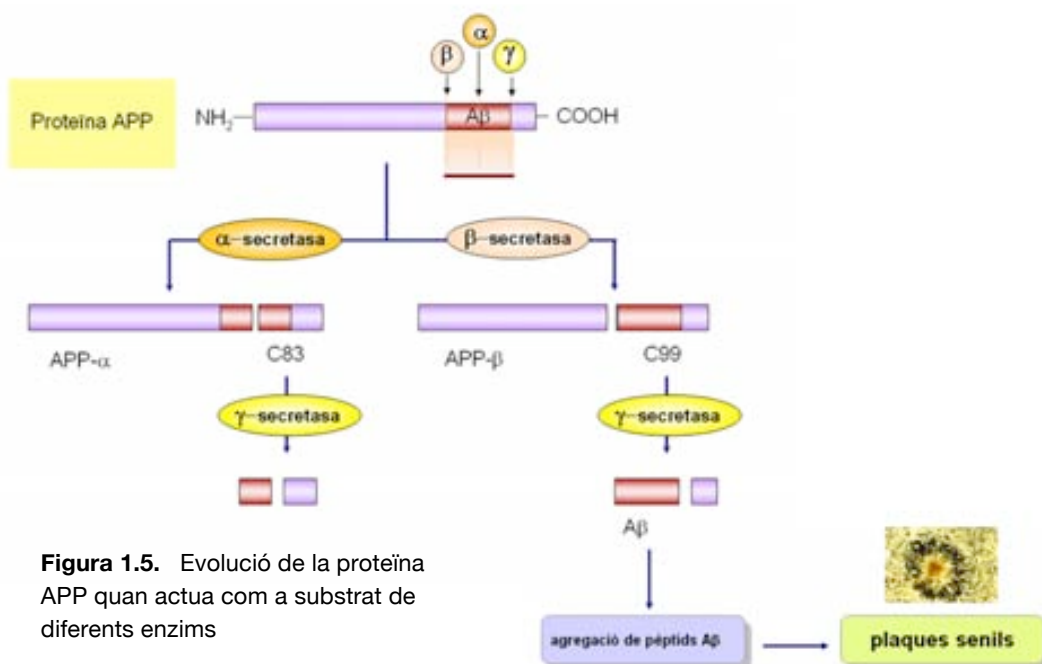


Figura 1.5. Evolució de la proteïna APP quan actua com a substrat de diferents enzims

Tal com s'indica a la Figura 1.5, la APP actua com a substrat de tres enzims anomenats α -, β - i γ -secretasa. La naturalesa del primer enzim, α o β , que hidrolitza la proteïna APP determina la seva posterior evolució.³⁰

A la via més freqüent, l' α -secretasa talla l'APP alliberant un fragment extracel·lular soluble, mentre que la part que queda integrada a la membrana és posteriorment processada per la γ -secretasa, alliberant la part C-terminal del pèptid per a la seva posterior degradació. Aquesta és la via no amiloidogènica, ja que l'acció de l' α -secretasa evita la formació del pèptid A β i la seva conseqüent acumulació en forma de fibres amiloides.³⁴ Una altra via possible és l'acció de la β -secretasa, que un cop processa la proteïna APP dóna lloc a un fragment C-terminal més llarg sobre el qual actua la γ -secretasa donant lloc al pèptid A β , de baixa solubilitat que forma els agregats. Aquesta és la via amiloidogènica que pot produir diferents tipus de pèptids, majoritàriament de 40 aminoàcids, i en menor proporció de 42 aminoàcids.³⁵ Si bé, les formes més abundants del pèptid A β són A β_{1-40} i A β_{1-42} , encara avui existeix controvèrsia sobre quin dels dos és la forma desencadenant del procés d'agregació *in vivo*, si bé molts autors mantenen que és la variant de 42 aminoàcids, la que presenta major capacitat amiloidogènica *in vitro* i, addicionalment, forma part del nucli central de plaques senils trobades *in vivo*.³⁶ Estudis *in vitro* apunten que el pèptid A β és neurotòxic, no obstant no es coneix encara en quina etapa comença la toxicitat: si aquesta es pot atribuir a les espècies solubles³⁷ o a les formes agregades d'estructura fibril·lar³⁸⁻⁴⁰; per tant, l'estudi del procés de fibril·logènesi i dels seus factors formen part de la comprensió de la malaltia.

1.6. Característiques comunes de les fibres amiloides

Un bon nombre de patologies s'associa a aberracions durant el procés de plegament de proteïnes, provocant la formació irreversible d'uns agregats fibril·lars insolubles, coneguts amb el nom de fibres amiloides. L'elevat interès en l'estudi d'aquestes proteïnes es justifica pel fet que aquests dipòsits amiloides estan implicats en malalties tan diverses i rellevants com són la MA, la malaltia de Parkinson, la diabetis de tipus II i la malaltia de Creutzfeldt-Jacob. Aquestes proteïnes, sense cap relació seqüencial, estructural o d'origen biològic, formen uns agregats inerts i resistent a les proteases que comparteixen unes característiques estructurals i morfològiques comunes.⁴¹ Estructuralment, totes les fibres amiloides presenten un patró de raigs X típic d'estructura tipus fulla β creuada ordenada en direcció perpendicular a l'eix de la fibra.⁴² Pel que fa a la morfologia de les fibres, pot observar-se fàcilment al microscopi electrònic que aquestes presenten un diàmetre entre 7 i 12 nm i es troben generalment formades per un conjunt de 2 a 6 protofilaments, cadascun d'entre 2 i 5 nm de diàmetre, entortolligants entre ells (Figura 1.6).^{43,44}

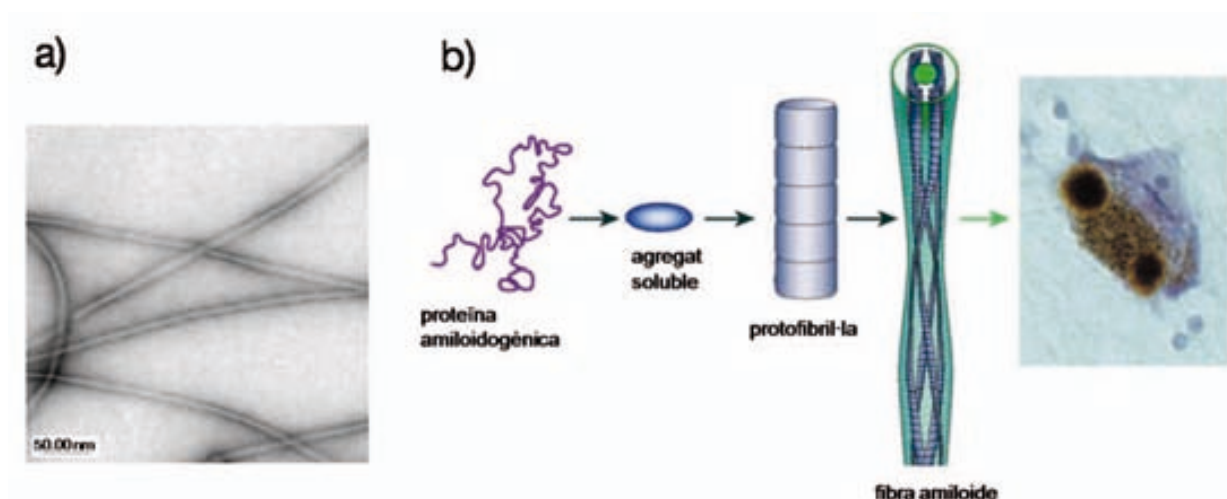


Figura 1.6. a) Morfologia de les fibres amiloides corresponents al pèptid $A\beta_{1-40}$ obtingudes mitjançant microscòpia electrònica; b) Representació esquemàtica de la formació de les fibres amiloides. Les proteïnes amiloidogèniques s'associen entre si per formar agregats solubles, protofibril·les i fibres madures (formades per un conjunt de 2 a 6 protofilaments).⁴³

A més de caracteritzar-se per la seva morfologia, també poden ser identificades mitjançant agents de tinció com el roig Congo (CR) (Figura 1.10) o la tioflavina-T (ThT) (Figura 1.8). Així la seva ordenació en forma d'estructura β creuada fa que el CR s'orienti en presència de fibres amiloides i doni, en ser observat sota llum polaritzada, birefringència d'un color verd poma característic. Un comportament similar s'observa amb la ThT, un compost que augmenta la seva fluorescència a l'unir-se a fibres amiloides. Si bé aquests dos agents de tinció són àmpliament utilitzats des de fa dècades, encara avui es desconeix a nivell molecular com s'enllacen, quines interaccions tenen lloc i per què canvien les seves propietats òptiques a l'interaccionar amb les fibres amiloides.⁴⁵

1.7. Model d'estructura 3D d'una protofibril·la del pèptid $A\beta_{1-42}$

Quina és l'estructura tridimensional de les plaques senils? La resposta a aquesta qüestió ens permetria esbrinar quina és la conformació que presenta el pèptid a l'interior d'aquesta estructura i, per tant, es podrien identificar els residus aminoacídics responsables de l'agregació, i en conseqüència desenvolupar inhibidors i disruptors de les plaques senils amb finalitats terapèutiques. Malauradament, el fet que les plaques senils siguin agregats insolubles, no cristal·lins i de composició heterogènia ($A\beta_{1-40}$ i $A\beta_{1-42}$) impossibilita la caracterització de l'estructura tridimensional mitjançant les tècniques d'alta resolució com són la ressonància magnètica nuclear (RMN) en solució o en fase sòlida, així com la difracció de raigs X sobre cristall. Aquesta limitació va portar a Lührs i col·laboradors a aïllar suspensions

fibril·lars en els estadis inicials de l'agregació i posteriorment estudiar-les mitjançant tècniques de RMN en solució, mutagènesi dirigida i microscòpia crioelectrònica.⁴⁶ El conjunt de resultats obtinguts mitjançant totes les tècniques anteriorment esmentades va permetre proposar el millor model estructural fins ara conegut de l'estructura 3D d'una protofibril·la del pèptid A β_{1-42} . En aquest model els residus 1-16 es troben desordenats i els corresponents 17-42 formen un motiu estructural cadena β_1 - gir - cadena β_2 (estructura tipus forquilla) (Figura 1.7). Com es mostra a les Figures 1.7a i 1.7b, cada motiu estructural representat per diferents colors, està format per dues cadenes β paral·leles, residus 17-26 (β_1) i 31-42 (β_2), enllaçades per un gir d'inversió que comprèn els residus 27-30 (Figura 1.7c). Aquest gir d'inversió està format gràcies a una interacció tipus pont d'hidrogen entre els aminoàcids Lys28-Asp23, que alhora formen contactes amb els residus Ile32 i Leu34 de β_2 . A més a més de les interaccions d'enllaç d'hidrogen que defineixen les estructures tipus fulla β , cada cadena s'estabilitza mitjançant interaccions intermoleculars hidrofòbiques que tenen lloc entre els aminoàcids Leu17, Phe19 i Ala21 de la cadena β_1 amb els residus parells de la β_2 (Figura 1.7a i 1.7c). Com a conseqüència d'aquestes interaccions resulta una cavitat hidrofòbica (vegi's Figura 1.7b i 1.7c). Si aquesta estructura 3D de la protofibril·la A β_{1-42} es perpetua al llarg del creixement de la fibra s'obté un protofilament que entortolligat amb altres formen la fibra amiloide. (Figura 1.6b).

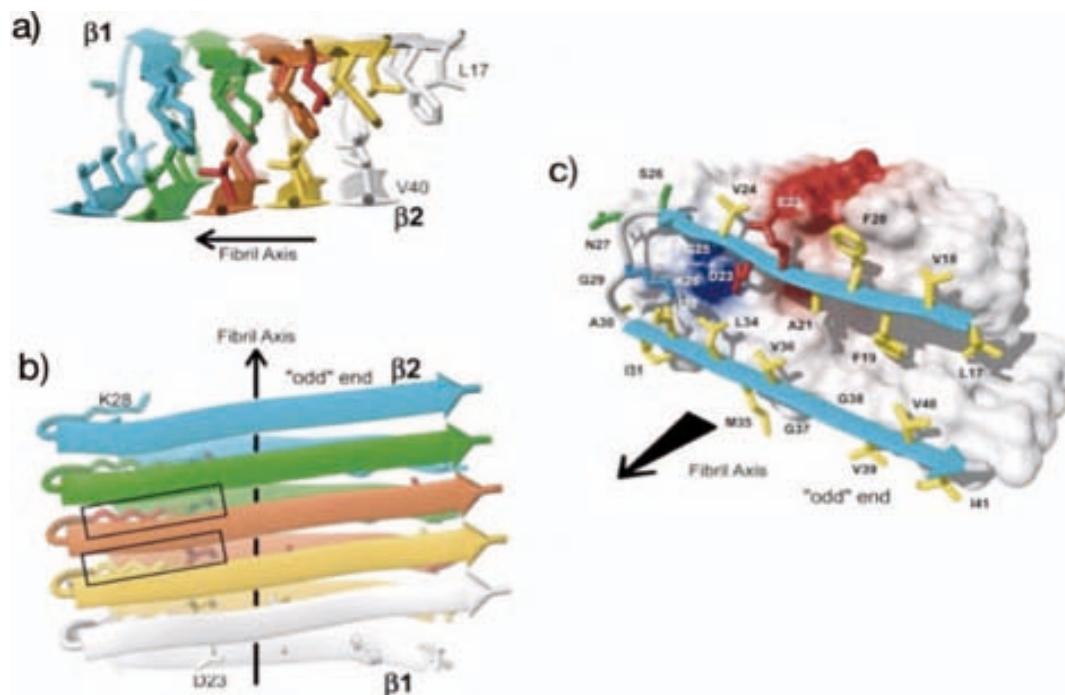


Figura 1.7. Estructura tipus forquilla d'una protofibril·la del pèptid A β_{1-42} . a) Les cadenes β_1 i β_2 entre elles estan estabilitzades mitjançant interaccions intermoleculars hidrofòbiques que tenen lloc entre els aminoàcids Leu17, Phe19 i Ala21 de la cadena β_1 amb els residus parells de la β_2 ; b) El motiu estructural cadena β_1 -gir-cadena β_2 es repeteix al llarg de l'eix de creixement de la fibra. Les interaccions pont d'hidrogen entre els residus Lys28-Asp23 que forma el gir d'inversió s'indiquen en un quadrat; c) Cavitat hidrofòbica que resulta de l'estructura tipus forquilla.

1.8. Interacció de l'agent de tinció ThT amb el pèptid A β

L'agent de tinció ThT és un compost fluorescent (Figura 1.8) que inclou un fragment benzotiazol i un anell dimetilanilina. Comercialment és el clorur d'un catió ThT⁺ que s'uneix de forma específica a les fibres amiloides. Aquesta unió potencia la fluorescència del catió ThT⁺, el qual inicialment presenta un màxim d'excitació a 415 nm i quan s'uneix a les fibres aquest màxim es desplaça a 450 nm incrementant la seva intensitat. La variació en l'espectre d'excitació va acompanyada per una banda d'emissió molt intensa a 482 nm.⁴⁷ Aquesta propietat ha fet que el compost ThT s'utilitzi des de l'any 1959 com a agent histològic per a la caracterització de dipòsits amiloides en teixits⁴⁸ i posteriorment, com a sonda fluorescent per a la identificació i quantificació de fibres amiloides *in vitro*.^{47,49}

Encara avui, després de 50 anys d'utilitzar-se àmpliament, el mecanisme i els tipus d'interaccions que fan que el catió ThT⁺ reconegui, s'enllaci a les fibres i com a conseqüència incrementi la seva fluorescència, són encara poc coneguts. Per aquesta raó, en la bibliografia es poden trobar treballs on, basant-se en diverses aproximacions, intenten explicar per una banda com es disposa estructuralment el catió ThT⁺ a l'unir-se a les fibres i per altra, per què canvia les seves propietats òptiques en fer-ho.

Pel que fa a la fluorescència, el canvi espectral a l'interaccionar amb les fibres s'ha atribuït a la formació de dímers,⁵⁰⁻⁵² excimers⁵³ i micel·les⁵⁴ de ThT⁺. Una altra hipòtesi, basada en mètodes de càlcul quàntics indiquen que el catió ThT⁺ presenta lliure rotació al voltant de l'enllaç C-C que uneix el fragment benzotiazol i l'anell dimetilanilina. Aquest catió al trobar-se en un medi altament viscos o en un entorn que impedeixi la seva rotació provoca una disminució de la seva relaxació torsional, la qual cosa es tradueix en l'augment de la intensitat fluorescent de la ThT⁺. Segons aquests estudis, la influència de la polaritat del medi no és suficient per explicar l'increment d'intensitat de la banda que presenta el catió ThT⁺ un cop enllaçat a les fibres.⁵⁵⁻⁵⁷

Des d'un punt de vista estructural, en la bibliografia són escassos els treballs que aporten informació sobre els llocs d'unió que ocupa el catió ThT⁺ en les fibres amiloides així com la conformació que adopta aquest. Una de les primeres hipòtesis que es van formular al respecte fou que donat que l'element estructural majoritari de les fibres amiloides és l'estructura tipus fulla β , el catió ThT⁺ interaccionava exclusivament amb aquest tipus d'estructura secundària.⁴⁹ Treballs posteriors demostren que aquesta hipòtesi no es compleix per aquelles proteïnes com l'acetilcolinesterasa, que sense contenir fulla β en la seva estructura indueixen fluorescència en incubar-les juntament amb el compost ThT.⁵²

Fins avui, només existeix un treball que basant-se en dades experimentals de microscòpia confocal, ha aportat informació sobre quina conformació adopta el catió ThT⁺ a l'interaccionar amb les fibres amiloides.⁵⁸ Els resultats demostren que les estructures fibril·lars s'organitzen deixant canals amples, de l'ordre de 6.5-6.95 Å, al llarg del creixement de la fibra i que el catió ThT⁺ es col·loca pla seguint la direcció del canal tal i com mostra la Figura 1.8. En aquest model, Krebs i col·laboradors calculen les dimensions moleculars del catió ThT⁺ mitjançant programes informàtics per al dibuix de molècules químiques (CS ChemDraw Ultra v.6.0 i CS Chem3D Std. v.5.0) i conclouen que el catió es confina bé dins els canals de la fibra adoptant una conformació totalment plana. Tot i que des d'un punt de vista estructural semblaria més adequat utilitzar les dimensions moleculars obtingudes mitjançant l'estructura cristal·lina de la molècula, durant la realització d'aquesta tesi no es va trobar el compost ThT en la base de dades cristal·logràfica de Cambridge (*Cambridge Structural Database* (CSD)).

Molt recentment, però, ha estat cristal·litzat el catió ThT⁺ enllaçat a la proteïna acetilcolinesterasa del peix *Torpedo californica* (tcAChE).⁵⁹ Si bé, com s'ha dit anteriorment, aquesta proteïna no conté estructura secundària tipus fulla β i per tant no és un model per al pèptid A β_{1-42} , no deixa de ser un bon i únic punt de partida per estudiar quines interaccions estableix el catió ThT⁺ amb els residus de la tcAChE que formen la cavitat on està ubicat. En aquesta estructura, s'observa que el catió ThT⁺ adopta una conformació totalment plana per raons estèriques i per interaccions tipus π que s'estableixen entre el catió ThT⁺ i els residus aromàtics de la mateixa proteïna com es veurà en més detall al capítol 3 d'aquesta tesi.

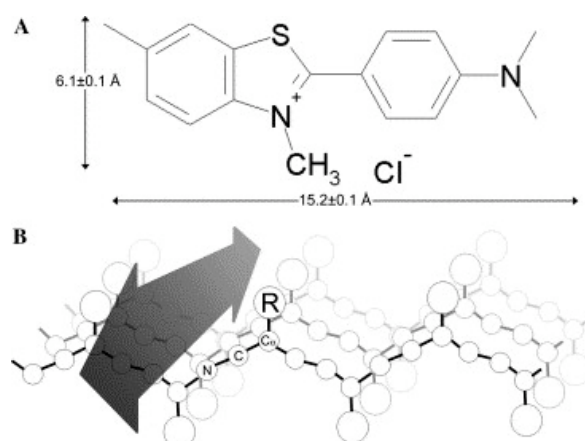


Figura 1.8. A) Estructura i dimensions moleculars el catió ThT⁺ obtingudes mitjançant el programa ChemDraw i Chem3D. B) Representació esquemàtica d'una estructura tipus fulla β on s'indica el canal on es disposa el catió ThT⁺, el qual es representa per una doble fletxa.

1.9. El paper dels ions metàl·lics a la malaltia d'Alzheimer

Actualment encara es desconeixen els factors que indueixen el procés d'agregació del pèptid A β i la conseqüent formació de les plaques senils dins el cervell dels malalts d'Alzheimer. Inicialment s'havia proposat que aquests dipòsits provenien de l'autoagregació espontània del pèptid A β .⁶⁰ No obstant, aquesta hipòtesi de l'autoagregació com a possible desencadenant de les plaques senils deixa moltes incògnites per resoldre. Es coneix que cervells sans contenen A β soluble en el fluid cerebrospinal i que aquesta concentració no s'incrementa al llarg dels anys. Una qüestió a la qual no pot donar resposta aquesta hipòtesi és perquè els dipòsits amiloides estan clarament focalitzats en determinades zones del cervell i no es troben a totes les regions del mateix.⁶¹ Un altre estudi, *in vitro*, que també ens allunya de l'autoagregació de A β , demostra que la formació de fibres amiloides a partir de la forma soluble de la proteïna A β no té lloc de manera immediata sinó que es tracta d'un procés lent.^{62,63} Aquesta cinètica depèn de la capacitat amiloidogènica del pèptid inicial i d'altres factors com el pH, la força iònica del medi, la temperatura i la presència de metalls. Aquestes observacions juntament amb evidències com el desequilibri en el contingut d'ions metàl·lics i la seva presència en fibres aïllades de cervells post-mortem han atribuït als ions metàl·lics un paper important en la formació de les plaques senils.⁶⁴⁻⁶⁷ Un fet que demostra la implicació de Cu(II), Zn(II) i Fe(III) és que la seva concentració està significativament alterada en teixits cerebrals de pacients malalts, concretament en aquelles regions riques en plaques senils, on les quantitats són més grans respecte a les que s'observen en individus sans.⁶⁸ En conseqüència, el paper del Zn(II), Cu(II) i Fe(III) en la patogènesi de la malaltia és avui objecte de molts estudis. Tot i que fins ara s'han esmentat els ions metàl·lics Zn(II), Cu(II) i Fe(III) per igual, el paper del ferro en aquesta malaltia és avui motiu de controvèrsia. A diferència dels ions Zn(II) i Cu(II), l'ió Fe(III) no es troba coordinat al pèptid A β extret de teixits cerebrals.⁶⁹ Els darrers estudis, atribueixen al ferro un paper secundari, ja que es creu que juntament amb la ferritina forma part d'altres processos més complexos que tenen lloc com a conseqüència de la formació de les plaques senils.⁷⁰ Per aquest motiu, durant la realització dels experiments d'aquesta tesi vam considerar no incloure Fe(III).

La diferent naturalesa dels metalls Zn(II) i Cu(II) i els seus possibles estats d'oxidació determinen un paper diferenciat per cadascun dels metalls al llarg dels processos bioquímics que tenen lloc en el cervell. Els nombrosos estudis duts a terme per A.I. Bush sobre el que ell anomena la *metal·lobiologia de la MA*⁶⁷ li han permès proposar una cascada de reaccions, per explicar la formació de plaques senils i les propietats neurotòxiques que les caracteritzen. D'acord amb aquesta proposta, l'ió Zn(II), que normalment s'allibera en la transmissió sinàptica, és el factor principal causant de l'agregació del pèptid A β . L'ió Cu(II) també és

responsable d'una certa agregació, la qual augmenta en condicions lleugerament àcides (pH = 6.6), però la seva activitat redox li confereix el protagonisme en la formació d'espècies reactives d'oxigen, també conegudes com ROS (acrònim de *Reactive Oxygen Species*).⁶⁷ La cronologia del conjunt de processos bioquímics (Figura 1.9) es pot resumir segons:

1. La concentració de Cu(II) augmenta en el còrtex cerebral degut a l'edat, això produeix una sobreexpressió de la APP i A β amb la finalitat de disminuir aquestes concentracions anormalment altes.
2. El pèptid A β enllaçat als metalls catalitza la reacció de formació de H₂O₂ a partir de O₂ i agents biològics reductors.
3. La metal·loproteïna A β Cu₂ reacciona amb H₂O₂ generant espècies oxidades i formes entrecruades resistents a les proteases, que són alliberades a l'exterior de la cèl·lula.
4. Les formes oxidades, inicialment solubles, precipiten en presència de Zn(II) provinent de la sinapsi i donen lloc a les plaques senils característiques de la malaltia.
5. Les formes oxidades també inicien l'activació microglial. La microglia es caracteritza per produir altes concentracions de H₂O₂ i mieloperoxidasa (MPO). La MPO, a la vegada, provoca un major entrecruament de A β i producció de H₂O₂ extracel·lular.
6. El H₂O₂ és totalment permeable a la membrana cel·lular i reacciona amb Cu(I) i Fe(II) donant lloc a la reacció de Fenton ($M^{z+} + H_2O_2 \rightarrow M^{(z+1)+} + OH^- + OH^\cdot$), el que provoca la formació d'espècies reactives d'oxigen, també conegudes com ROS, que en darrer terme oxiden els àcids nucleics, proteïnes i lípids, tal com s'observa en els cervells afectats per la MA.

1.10. Diagnòstic de la MA

Actualment, realitzar un diagnòstic clínic de la MA no és una tasca senzilla donat que els primers símptomes de la malaltia poden passar inadvertits i són molt semblants als que presenten altres tipus de demència. Addicionalment, els canvis neuropatològics (les plaques senils i els cabdells neurofibril·lars) comencen molt abans de que apareguin els primers símptomes de la malaltia. Avui en els hospitals es realitza una avaluació neuropsicològica en base a qüestions tipus test^y als pacients que manifesten símptomes propers als de la MA,

^y DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition*) complementats amb els NINCDS/ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*),

aquesta avaluació és el que s'estableix com a protocol sistemàtic per a realitzar el diagnòstic amb un grau de certesa probable o possible. No obstant, la confirmació definitiva de la MA només es realitza mitjançant l'examen *postmortem* del cervell de la persona afectada.

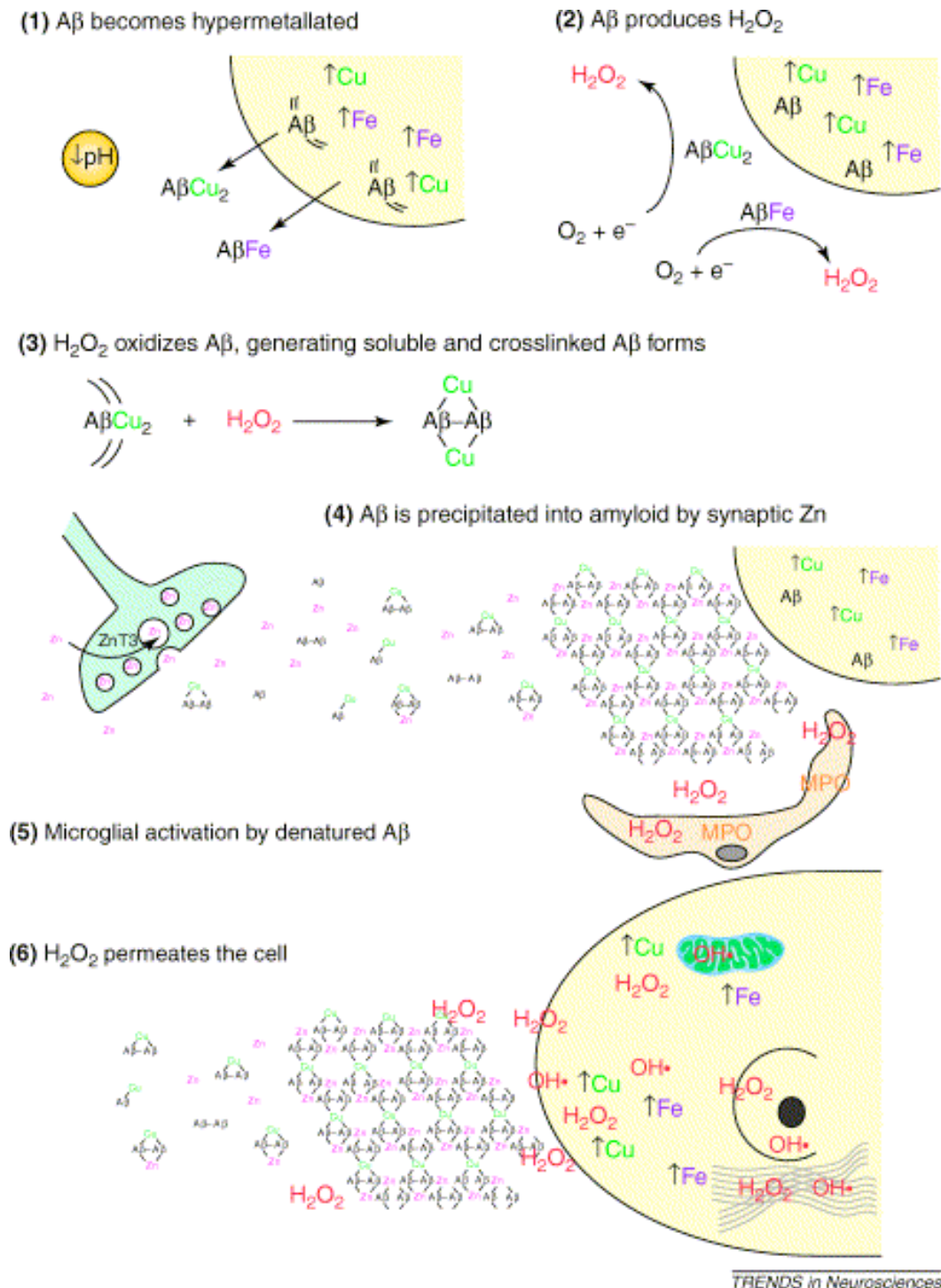


Figura 1.9. El rol dels metalls en la MA⁶⁷

Per aquest motiu, un dels grans reptes dels investigadors és aconseguir sondes biològiques que permetin el diagnòstic precoç i el seguiment de la malaltia a partir dels primers símptomes. Dins aquesta recerca, el desenvolupament de noves tècniques de neuroimatge no invasives i la cerca de radiotracadors⁵ que permetin diferenciar les diferents malalties neurodegeneratives, així com identificar les zones cerebrals més afectades en els diferents estadis és avui una fita necessària dins la recerca de la MA.⁷¹⁻⁷³

Dins d'aquestes tècniques d'imatge existeixen dues modalitats: la *neuroimatge estructural* (Tomografia Axial Computaritzada, TAC i les imatges de ressonància magnètica, MRI) i la *neuroimatge funcional* (Tomografia per Emissions de Positrons, PET i la Tomografia per Emissió de Fotons Simple, SPECT). Les tècniques TAC i MRI permeten observar els canvis estructurals que pateix un cervell en els estadis més avançats de la malaltia. Aquests canvis, que ja es van descriure al principi d'aquest capítol, comprenen la presència d'una atròfia hipocampal i l'augment de solcs corticals així com del volum ventricular. En canvi, les tècniques PET i SPECT permeten avaluar els diversos patrons de funció cerebral i observar la retenció de radiotracadors que presenten els cervells afectats. En tots dos casos, s'utilitzen traçadors radioactius que s'injecten intravenosament en quantitat de traça i proporcionen imatges d'alta resolució *in vivo*. En el cas del PET els emissors de positrons (β^+) més utilitzats són el ^{11}C i ^{18}F , en canvi el SPECT utilitza l'isòtop ^{123}I , emissor de raigs γ .⁷¹

Actualment, dins el camp de la imatge amb PET, la fluorodesoxiglucosa (FDG) és el traçador més àmpliament utilitzat clínicament. La FDG, és un anàleg de la glucosa endògena que incorpora un radioisòtop ^{18}F en la seva estructura (Figura 1.10). Aquesta molècula penetra dins les cèl·lules mitjançant transportadors específics de membrana, fent que un cop administrada, permeti mesurar *in vivo* el metabolisme glucídic dels teixits. Així, s'utilitza per diagnosticar determinats teixits tumorals, malalties cardiovasculars i neoplàsiques malignes entre d'altres. Atès que el cervell requereix una aportació contínua i adequada de glucosa, juntament amb el fet que els malalts d'Alzheimer pateixen una alteració important del metabolisme energètic dins el cervell, l'ús de la FDG com a traçador PET en la MA ha estat una de les primeres propostes dins aquest camp.²⁸ Com es pot observar a la Figura 1.11, les imatges obtingudes amb FDG demostren que en un cervell sa, el consum metabòlic de glucosa és clarament superior a la del cervell afectat d'Alzheimer. No obstant, tot i que s'observa un patró funcional, aquest no permet distingir les diferents malalties neurodegeneratives donat que totes elles presenten patrons funcionals molt semblants.

⁵ Molècula que en la seva estructura inclou un àtom marcat radioactivament emissor de raigs γ

Amb l'objectiu de trobar radiotracadors amb afinitat per les plaques amiloides i que permetin realitzar un diagnòstic diferencial i específic de la MA s'han sintetitzat compostos derivats dels agents de tinció més coneguts de les estructures amiloides: el CR (Figura 1.10) i la ThT (Figura 1.8). S'han generat moltes molècules que han estat estudiades *in vitro*, però fins a la data, únicament 3 molècules han estat avaluades *in vivo*. Aquestes molècules són [^{18}F]FDDNP, [^{11}C]PIB i [^{11}C]SB-13 (Figura 1.10). El compostos [^{18}F]FDDNP i [^{11}C]SB-13 són fragments derivats del CR que tenen la capacitat de travessar la BBB i mostren alta afinitat per les plaques senils. Nogensmenys, s'ha comprovat que s'uneixen també als cabdells neurofibril·lars els quals també es manifesten en altres tipus de demències frontotemporals i les provocades pels cossos de Lewy.[†] El compost [^{11}C]PIB^{71,74} ha estat el radiotracador amb el qual s'han realitzat més proves amb malalts d'Alzheimer i ha donat lloc a resultats força prometedors pel que fa a la intensitat de senyal PET. A la Figura 1.11 es pot comprovar que la retenció d'aquest traçador en un cervell sa és molt més petita que la que s'observa en un cervell afectat per la MA. Cal remarcar, però, que recentment s'ha demostrat que la molècula PIB no presenta una unió específica al pèptid A β com inicialment es pensava.⁷⁵

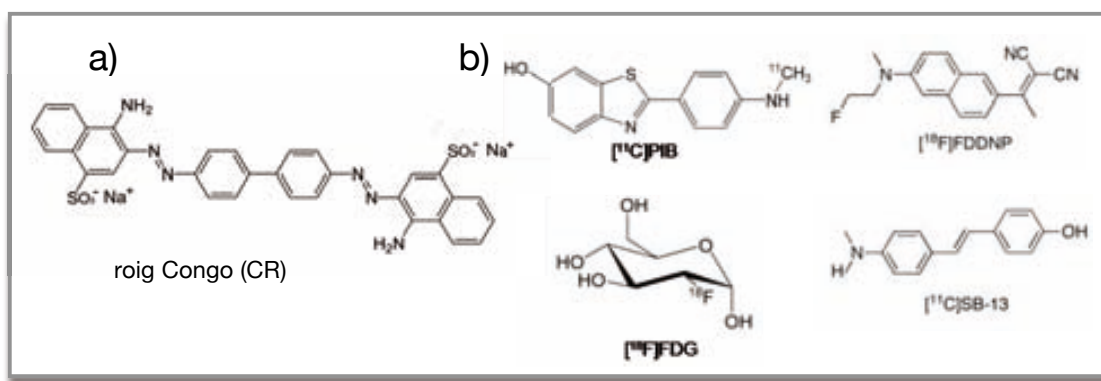


Figura 1.10. a) Estructura molecular de l'agent de tinció roig Congo (CR) b) Molècules que han estat utilitzades *in vivo* com a radiotracadors per tècniques de neuroimatge PET

En conjunt, cercar molècules que s'uneixin específicament al pèptid A β per poder realitzar un diagnòstic diferencial de la MA amb una polaritat adequada per travessar la barrera hematoencefàlica (BBB), estables en un medi fisiològic i que permetin incorporar fàcilment un àtom radioactiu és encara un repte per al diagnòstic *premortem* de la MA.⁷¹

† malaltia neurodegenerativa que es caracteritza per la presència d'agregats d'una proteïna, l' α -sinucleïna, en el citoplasma neuronal. Els símptomes d'aquesta malaltia inclouen un deteriorament cognitiu i parkinsonisme (lentitud de moviments, rigidesa articular i tremolor)

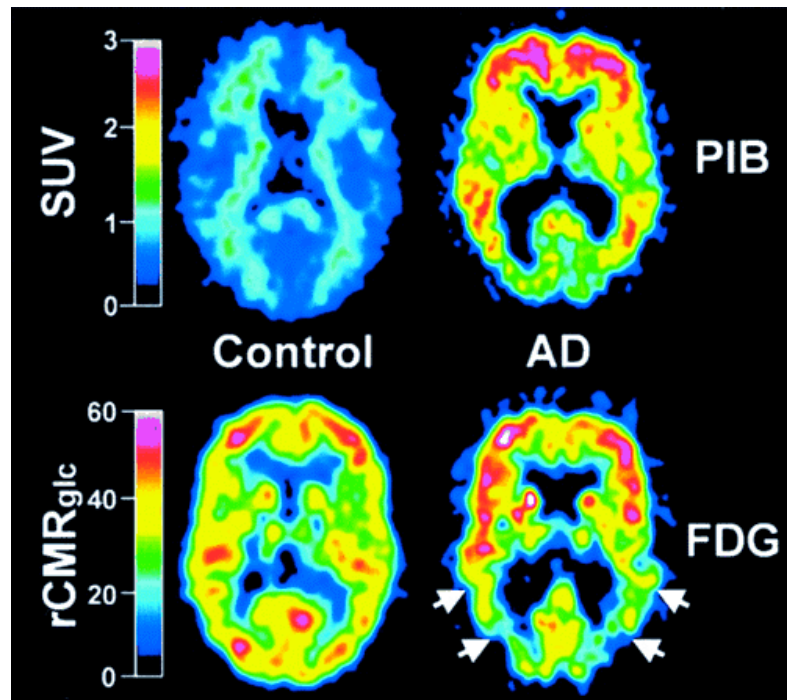


Figura 1.11. Imatges obtingudes per tècniques PET amb els traçadors $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ i $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$

1.11. Teràpia en la MA

La complexitat del cervell i la multifactorialitat que s'observa durant el desenvolupament de la MA fa que no es disposi encara d'un tractament curatiu ni preventiu, però sí d'uns tractaments simptomàtics que almenys als inicis de la malaltia poden alleujar i frenar la progressió de la MA, tot i que molts d'ells tenen efectes adversos. Aquests fàrmacs actuen sobre les alteracions que tenen lloc en les neurones colinèrgiques (utilitzen l'acetilcolina com a transmissor) per evitar la pèrdua de sinapsi, la qual esdevé més important en estadis avançats de la malaltia.⁷⁶ Les primeres teràpies s'han adreçat a millorar aquesta transmissió utilitzant inhibidors de l'acetilcolinesterasa a fi d'evitar el dèficit d'acetilcolina durant la neurotransmissió.^{77,78} Els fàrmacs que clínicament s'utilitzen són el Donezepil (Aricept®)⁷⁹, la Rivastigmina (Exelon®)⁸⁰ i la Tacrina (Cognex®).^{81,82} Addicionalment, existeixen fàrmacs i aliments que han estat proposats per al tractament pal·liatiu de la pèrdua cognitiva: (1) els antiinflamatoris no-esteroidals (AINE) com l'ibuprofè, el naproxè, el paracetamol, el diclorfenal i l'aspirina® que bloquegen l'activitat microglia,⁸³⁻⁸⁵ i (2) Compostos antioxidants com la vitamina C, B i E,⁸⁶⁻⁸⁹ el té verd,⁹⁰⁻⁹⁴ el vi negre^{95,96} i el curry⁹⁷⁻¹⁰⁰ que poden actuar com a segrestants d'espècies ROS.

Pel que fa a la recerca actual dins el tractament de la MA s'intenten buscar diferents teràpies que aturin i/o estabilitzin el procés de la malaltia. Tenint en compte que el pèptid A β està considerat com el responsable de l'origen de les plaques senils, moltes línies de recerca dediquen els seus esforços a trobar: (1) inhibidors de les secretases (β i γ -secretases) que originen el pèptid A β ;^{101,102} (2) inhibidors i/o disruptors dels dipòsits amiloides;¹⁰³⁻¹¹¹ i (3) agents quelants.^{112,113}

En el context d'aquesta tesi, de totes aquestes línies de recerca, ens centrem en aquesta darrera estratègia. Dins d'aquest punt, com ja s'ha explicat anteriorment, les evidències aportades sobre la participació dels metalls en la precipitació del pèptid A β han obert la possibilitat d'utilitzar aquests ions metàl·lics com a possibles dianes terapèutiques. Així, A.I. Bush a fi de poder segrestar els ions i dissoldre les plaques amiloides va ser el pioner en utilitzar agents quelants amb major afinitat pels ions metàl·lics que el pèptid A β .^{113,114} D'entre els quelants estudiats, el clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinoleïna, CQ) ha resultat ser particularment útil per aquests propòsits (Figura 1.12).¹¹⁵⁻¹¹⁸ El CQ, derivat de la 8-hidroxiquinoleïna (8-HQ), és un lligand relativament poc selectiu que pot coordinar molts metalls, entre ells Zn(II) i Cu(II). A més a més, té la capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica (BBB) i és un fàrmac enregistrat per la FDA (*Food and Drug Administration, U.S.*), si bé actualment no es troba en el mercat farmacèutic atès que una neuropatia mielo-òptica apareguda al Japó i relacionada amb un dèficit de vitamina B12, va causar la seva retirada.¹¹⁹ L'acció del CQ ha estat estudiada *in vitro* sobre teixits cerebrals post-mortem afectats per la MA, així com *in vivo* en ratolins transgènics Tg2576 i s'ha comprovat que és capaç de competir amb la proteïna A β per coordinar els ions metàl·lics Zn(II) i Cu(II), solubilitzar les plaques amiloides i disminuir la concentració d'espècies ROS.¹²⁰⁻¹²² Aquests resultats van permetre realitzar estudis preliminars d'assaigs clínics, els quals van demostrar que l'administració de CQ en pacients malalts durant un període de 24 mesos, alienta els símptomes de la malaltia respecte pacients control.^{117,118} Tot i l'èxit d'aquests resultats, els darrers estudis d'aquest fàrmac en Fase Clínica II han mostrat toxicitat en diversos pacients la qual cosa ha bloquejat la continuació de posteriors proves clíniques.¹²³ No obstant això, el CQ ha obert una nova línia de recerca en el tractament de la MA que anat adquirint cada cop més importància. Com a conseqüència, el nombre de publicacions sobre agents quelants i la MA des dels inicis d'aquesta tesi (2003) fins avui s'ha incrementat notablement.

L'èxit del clioquinol com a segrestant dels ions metàl·lics que contenen les plaques senils, ha portat a molts investigadors a cercar agents quelants que millorin les propietats del CQ. Una de les primeres estratègies per abordar aquest problema ha estat assajar lligands quelants que presenten una gran afinitat per diversos metalls, alguns d'ells utilitzats en tractaments d'intoxicació per metalls pesants com l'àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA), l'àcid dietilentriaminopentaacètic (DTPA), la trietilentetraamina (TETA) i la desferrioxamina (DFO)

(Figura 1.12; **5**). Si bé els resultats obtinguts *in vitro* amb aquests lligands han estat positius, s'ha demostrat que no és adequada ni la inespecificitat ni l'alta afinitat coordinativa que presenten aquests lligands.¹²⁴

Per evitar aquests problemes, molts grups de recerca han dissenyat lligands amb entorns de coordinació més favorables per al Cu(II) i el Zn(II). Així, inspirats en el CQ, s'han dissenyat agents quelants en base a la 8-HQ i a la 8-aminoquinoleïna, unint dos fragments 8-HQ (Figura 1.12; **2**) o 8-AQ mitjançant un espaiador^{125,126}. Altres, inspirant-se en lligands analítics ben coneguts per al Cu(II), com la batocuproïna, han sintetitzat lligands cíclics amb motius 1,10-fenantrolina que anomenen *Cyclophen*¹²⁷ (Figura 1.12; **4**). Estudis en solució realitzats amb aquests lligands i el pèptid A β han demostrat la seva capacitat per segrestar els ions metàl·lics així com la d'inhibir la producció de H₂O₂. Si bé aquests resultats són un bon punt de partida per a continuar estudis posteriors *in vivo*, aquests no s'han dut a terme ni s'ha comprovat la seva capacitat de travessar la BBB.

Contràriament, el DP-109 (Figura 1.12; **5**), ha estat estudiat *in vitro* en ratolins transgènics Tg2576 i, tot i que s'han observat uns efectes molt semblants al CQ, problemes relacionats amb l'especificitat, la capacitat de penetrar la BBB i la pertorbació en la homeòstasi de molts biometalls essencials per al correcte funcionament del metabolisme dels éssers vius, van inadequar-lo per a posteriors estudis.¹²⁸ En base a aquests resultats, d'una banda s'ha comprovat que cal evitar que l'agent quelant s'enllaci als diferents metalls que es troben formant part de metal·loproteïnes i/o vitamines pròpies del món fisiològic i d'altra, que un cop arribat a la diana terapèutica, redistribueixi els ions metàl·lics respectant les concentracions dins el rang vital. Això és el que es coneix com a lligands atenuadors de metalls enllaçats a proteïnes (MPACs de l'anglès *Metal-Protein Attenuating Compounds*)¹¹³ entre els quals es troba el CQ.¹¹⁸

1.12. La nova generació d'agents quelants en la MA: multifuncionalitat

Les múltiples causes que poden concórrer en la MA, juntament amb les diferents alteracions que tenen lloc durant el transcurs de la malaltia, ha generat els anomenats *agents quelants multifuncionals*. Una nova generació de lligands que inclouen un fragment capaç de coordinar als ions metàl·lics i alhora contenen altres grups funcionals que faciliten l'arribada a la diana terapèutica i asseguruen la seva eficàcia. A la Figura 1.13 es mostren els exemples més representatius: l'agent bifuncional **6**, combina un agent quelant clàssic com el DPTA amb dos fragments benzotiazolfenil, que per proximitat a l'estructura del compost ThT facilita la seva interacció amb les fibres A β .¹²⁹

Altres casos com els compostos **7** i **8**, utilitzen l'estratègia d'incorporar carbohidrats en l'estructura del lligand per facilitar el seu pas a través de la BBB, millorar la solubilitat del compost i reduir la seva toxicitat. Aquests lligands, mitjançant transportadors de membrana, travessen la BBB i un cop dins el citosol neuronal on té lloc el procés de glicòlisi, transformen el grup O-glucosa en O-H, millorant la seva capacitat coordinant i antioxidant.¹³⁰⁻¹³⁴ En **7**, el lligand utilitzat és una piridinona, aquest esquelet no presenta toxicitat i s'utilitza com agent terapèutic en pacients de talassèmia. Es coneix que l'hidroxi-piridinona és un lligand efectiu ($\log \beta_2 = 20-22$ per Cu(II); 11-18 per Zn(II); 27-37 per Fe(III)).¹³³ Estudis *in vitro* amb aquest lligand han demostrat que redueixen els agregats amiloides a l'interaccionar amb els ions metàl·lics i presenten propietats antioxidants. La capacitat del compost **7** de travessar la BBB ha estat avaluada realitzant un marcatge amb ¹²⁵I i administrant-lo per tècniques de perfusió en rates. Després de mesurar la radiació gamma emesa pel cervell van observar que els senyals radioactius eren molt febles, la qual indica que la molècula no arriba fàcilment al cervell i per tant, proposen millorar el disseny del lligand per resoldre aquest problema.¹³³

El lligand **8**, utilitza com agent quelant el lligand N,N'-etilenbis(salicilamina) (també conegut com a lligand *salen*) el qual conté en la seva estructura anells fenol que incrementen les seves propietats antioxidants. S'ha demostrat que aquest lligand competeix amb el pèptid A β_{1-40} per coordinar els ions metàl·lics Cu(II) i Zn(II) i alhora té la capacitat d'actuar com a captador de radicals.¹³² Si bé els resultats obtinguts *in vitro* amb el lligand **8** i el pèptid A β_{1-40} en presència de metalls són esperançadors per trobar un possible agent multifuncional per a la MA, encara no s'han realitzat estudis *in vivo* amb aquest darrer lligand.

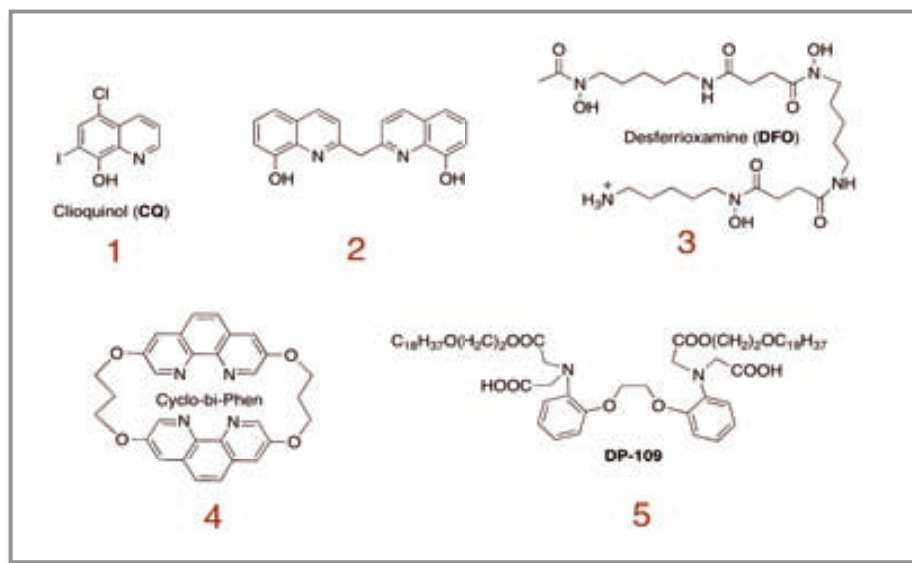


Figura 1.12. Agents quelants estudiats amb finalitat terapèutica per a la malaltia d'Alzheimer.

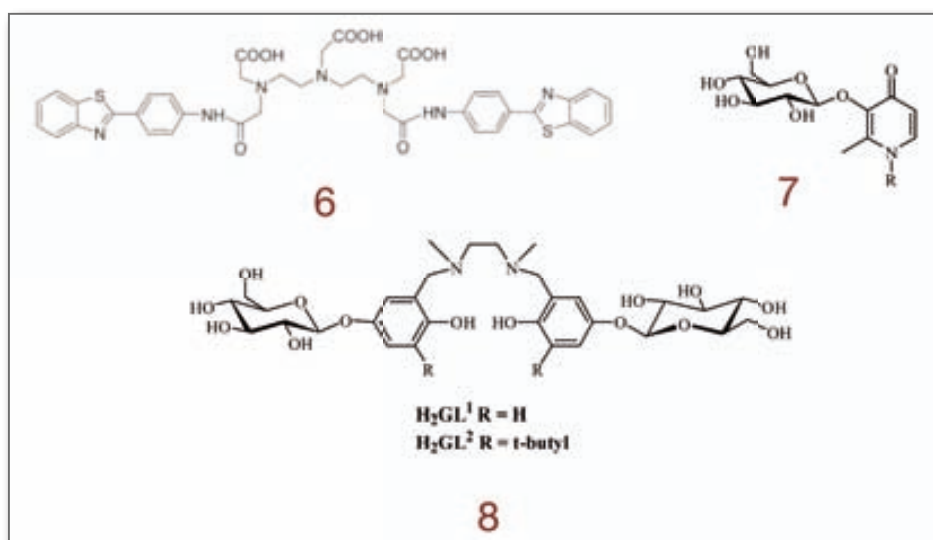


Figura 1.13. Lligands multifuncionals per a la MA



CAPÍTOL 2

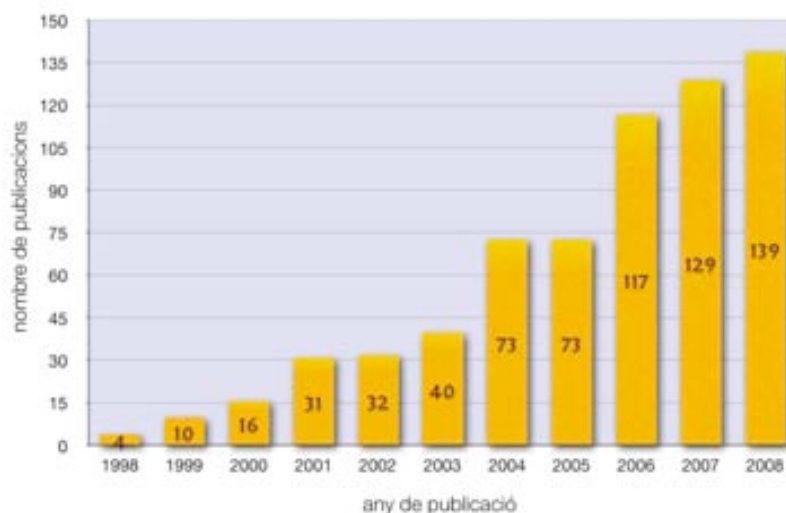
La quimioinformàtica:
una nova eina al laboratori químic

2.1. Aspectes generals

La quimiinformàtica és una disciplina científica emergent que utilitza la tecnologia informàtica per obtenir informació biològica i/o química amb la finalitat de respondre qüestions complexes des d'un punt de vista experimental. El seu objectiu és reunir, organitzar, emmagatzemar i manipular bases de dades de compostos químics coneguts amb la finalitat d'obtenir informació sobre el comportament i les propietats fisicoquímiques de compostos nous abans de procedir a la seva síntesi. És una àrea d'investigació multidisciplinària, la qual pot ser àmpliament definida com a l'interfase entre quatre ciències: la química, la biologia, la farmàcia i la informàtica.¹³⁵⁻¹³⁷

En els darrers anys, la quimiinformàtica ha experimentat un important progrés, tal com es mostra a la Figura 1.14.

Figura 1.14. Nombre de publicacions que contenen la paraula *chemoinformatics* o *cheminformatics* en la base de dades Scifinder Scholar des de l'any 1998



El naixement d'aquesta disciplina es pot situar l'any 1962 quan Hansch i Fujita proposen que tant l'activitat biològica com les propietats d'una molècula poden ser relacionades quantitativament amb paràmetres fisicoquímics (*descriptors moleculars*) característics de la mateixa.¹³⁸ Ara bé, no és fins a la dècada dels 90 que la quimiinformàtica s'estableix com a nova disciplina, per la seva implicació i ressonància en la indústria farmacèutica on l'aplicació de tècniques de disseny molecular assistides per ordinador (*computer-aided molecular design*, *CAMD*) esdevenen clau per reduir els costos econòmics i en temps associats a l'obtenció de nous fàrmacs.¹³⁹

En els darrers anys i degut en part a la importància que ha adquirit la informàtica dins de totes les disciplines, s'han desenvolupat nous i potents mètodes que estableixen les relacions estructura-activitat (QSAR acrònim de *quantitative structure activity-relationship*) o estructura-propietats (QSPR acrònim de *quantitative structure property-relationship*) d'una molècula.

Aquestes relacions es basen en considerar que l'estructura de qualsevol molècula està formada per un conjunt de fragments, la combinació dels quals determina les seves propietats químiques o biològiques. És a dir, cadascun dels fragments estructurals té una contribució específica a un paràmetre o descriptor molecular (solubilitat, punt d'ebullició, polaritat, ...). En base a això, es construeixen relacions estructura-propietat considerant que la propietat d'una molècula és el resultat de la combinació de múltiples descriptors, els quals actuen de forma independent i es combinen emprant un model de correlació multilíneal.¹⁴⁰⁻¹⁴⁵

2.2. La contribució de la quimioinformàtica en la indústria farmacèutica. Perspectives de futur en el laboratori químic

Tradicionalment en química farmacèutica i com s'ha vist en el cas concret de la MA, el mètode de descobriment de nous agents quelants amb finalitat terapèutica consisteix en dissenyar molècules considerant determinats grups funcionals per a la seva aplicació en medis fisiològics i, una vegada sintetitzat el compost, es procedeix a realitzar diferents proves biològiques en cultius cel·lulars, en animals i finalment en humans.

En moltes ocasions, unes característiques farmacocinètiques inadequades, l'aparició d'efectes secundaris inacceptables o la biotransformació a un metabòlit tòxic poden fer que el compost, en principi prometedor, torni als laboratoris de recerca com un intent fallit i s'hagi de començar el procés de nou, redissenyant la molècula per optimitzar alguna de les seves característiques. Aquestes tècniques d'assaig i error consumeixen molt de temps i diners.

En la indústria farmacèutica, en canvi, la creixent necessitat de sintetitzar i identificar nous agents terapèutics reduint al màxim els temps de síntesi i els costos ha conduït al desenvolupament de noves tecnologies. D'entre elles, la quimioinformàtica ha esdevingut una eina clau en el procés de descoberta de nous fàrmacs, ja que permet el disseny molecular assistit per ordinador, la generació de quimiotèques virtuals, el seu posterior cribatge i la predicció de paràmetres farmacocinètics.

Les principals avantatges d'aquestes tècniques són: (1) la possibilitat de treballar virtualment amb un volum de l'ordre de 10^6 - 10^{12} estructures que successivament són filtrades i reduïdes a una col·lecció d'uns 100-1000 candidats; i (2) la determinació de les propietats d'una molècula en base a la seva estructura, la qual no té perquè haver estat sintetitzada prèviament, de manera que es poden estalviar els costos derivats de la recerca experimental o com a mínim reduir-los en base a encarar la recerca sobre aquelles molècules on el mètode teòric fa preveure possibilitats d'èxit.

Aquesta relació entre la química i la indústria farmacèutica és un altre horitzó que ens porta el segle XXI. La col·laboració entre aquestes dues branques de la ciència ha de comportar no tan sols poder dissenyar millors fàrmacs que curin i diagnostiquin malalties, sinó també incorporar una altra eina al laboratori químic, la quimioinformàtica. Aquesta nova disciplina de la química computacional, que en breu podria precedir a la química experimental sense substituir-la, permet seleccionar, optimitzar i preveure quines són les millors molècules per garantir l'èxit en el treball experimental.

Tal com es descriu en els objectius, el treball d'aquesta tesi s'ha centrat en el disseny, selecció i posterior estudi de lligands quelants amb aplicació a la MA. Dins aquest marc, el procés de cerca de molècules comercials així com el cribatge virtual previ al treball experimental ha implicat l'ús de tècniques quimioinformàtiques, sense precedents dins el camp de la MA. Com es veurà en més detall als capítols 3 i 4, l'estudi d'aquesta disciplina així com la seva posterior aplicació dins el camp de la MA no tan sols ha esdevingut una tasca imprescindible abans d'entrar al laboratori químic sinó que ha obert una nova perspectiva dins el camp de la química inorgànica medicinal.

II. OBJECTIUS

L'objectiu en el que s'emmarca aquest treball és contribuir a aportar solucions al problema de la manca d'agents terapèutics i de diagnosi, unívocs i rigorosos, per la malaltia d'Alzheimer (MA). L'interès d'aquest objectiu queda fora de dubte per la gravetat de la MA i per la seva incidència creixent en la població humana. Ara bé, la complexitat del cervell i les múltiples causes que hi concorren en el desenvolupament de la MA indiquen que els intents per trobar respostes i per proposar solucions han de tenir un enfocament multidisciplinari.

Des del camp de la química bioinorgànica és fàcil fixar-se en l'excessiva concentració d'ions Zn(II) i Cu(II) en els cervells de malalts de MA, plantejar-se la seva utilització com a dianes terapèutiques i, en conseqüència, cercar agents quelants que evitin la formació de plaques senils o hi contribueixin a la seva redissolució. D'altra banda, per assegurar la potencialitat d'aplicació *in vivo* cal que els agents quelants compleixin dues condicions: que penetrin al cervell travessant la barrera hematoencefàlica (BBB) i que interaccionin amb les plaques senils on es troben els metalls.

Respecte aquesta segona condició els agents de tinció tradicionals de fibres amiloides *in vitro* - com la tioflavina-T (ThT) o el roig Congo (CR) - són un bon punt de referència. Els canvis que experimenten les propietats òptiques d'aquests compostos en presència d'estructures tipus fulla β , característica de les fibres amiloides, és una prova de la seva interacció mútua, de la qual no es coneix la naturalesa exacta. Obtenir agents quelants de Zn(II) i Cu(II) derivats d'un agent marcador com la ThT i esbrinar com interacciona a nivell molecular la ThT amb les PS originades pel pèptid A β semblen, doncs, fites importants.

Amb aquestes premisses, l'objectiu general de trobar agents de teràpia i/o diagnosi de la MA s'ha concretat amb els objectius específics que es descriuen a continuació.

Objectiu 1. Utilització de tècniques quimiinformàtiques en el disseny i selecció d'agents quelants multifuncionals amb potencial aplicació en la MA

- 1.1. Disseny dels esquelets bàsics de les possibles famílies de lligands quelants capaços d'enllaçar Cu(II) i Zn(II), en base a la química de coordinació i a la química bioinorgànica d'ambdós metalls.
- 1.2. Cerca de compostos comercials amb els esquelets bàsics escollits. Generació de quimiotèques virtuals.
- 1.3. Aplicació de tècniques quimiinformàtiques per al cribatge virtual: propietats químiques essencials per seleccionar els millors candidats.
- 1.4. Comprovació experimental del comportament dels lligands seleccionats envers Zn(II) i Cu(II).

Objectiu 2. Agents terapèutics i de diagnosi en la malaltia d'Alzheimer: disseny, selecció i caracterització de compostos quelants amb propietats d'intercalació en fibres amiloides

- 2.1. Disseny de l'esquelet bàsic de compostos quelants derivats de la tioflavina-T (ThT) i selecció dels millors candidats comercials en base a tècniques quimioinformàtiques.
- 2.2. Assajos experimentals: a) Capacitat de iodació dels compostos comercials escollits, b) Obtenció dels complexos amb Zn(II) i Cu(II) i anàlisi de la seves propietats en fase sòlida i en solució.
- 2.3. Càlculs teòrics per anticipar l'estructura dels diversos complexos i analitzar les seves propietats de fluorescència. Comparació amb les dades experimentals.
- 2.4. Experiments *in vitro*: formació de fibres A β en absència d'ions metàl·lics i comprovació de la capacitat intercaladora dels agents quelants mitjançant microscòpia de fluorescència.
- 2.5. Experiments *in vitro*: estudi de la capacitat inhibidora dels agents quelants en la formació de les fibres A β que es formen en presència d'ions metàl·lics, mitjançant tècniques turbidimètriques.

Objectiu 3. Interaccions del catió ThT⁺ amb les fibres amiloides: determinació de l'estructura 3D del catió ThT⁺ i estudi de la seva posició, orientació i energia en les fibres A β_{1-42}

- 3.1. Obtenció de monocristalls del catió ThT⁺. Anàlisi de la geometria molecular i tipus d'empaquetament des d'un punt de vista experimental i teòric. Relació de l'estructura amb les seves propietats fluorescents.
- 3.2. Determinació de les posicions energèticament més favorables que pot adoptar el catió ThT⁺ en les fibres A β_{1-42} per mètodes de *docking* i dinàmica molecular.
- 3.3. Anàlisi de les posicions més favorables mitjançant mètodes teòrics per esbrinar les interaccions que estableix el catió ThT⁺ amb les fibres amiloides a nivell molecular.

Estructura general del treball

El desenvolupament dels objectius 1-3 esmentats s'ha dut a terme cronològicament. Alhora, cadascun d'aquests objectius constitueix un capítol d'aquest treball, el qual inclou la discussió i anàlisi dels resultats obtinguts. De fet els capítols 3, 4 i 5 d'aquesta tesi constitueixen el gran bloc de *Resultats i Discussió*. Al final de cadascun d'aquests capítols es donen unes conclusions parcials, les globals del treball es troben al capítol VI, on es manté la mateixa ordenació que els objectius i els hi dona resposta detallada. Finalment, s'inclou en forma d'Annex els articles: *Design, selection and characterization of thioflavin-based intercalation compounds with metal chelating properties for application in Alzheimer's disease* *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131 (4), 1436-1451 i *Crystal structure of Thioflavin-T and its binding to amyloid fibrils: insights and implications at the molecular level*, article enviat per a la seva publicació. El primer correspon al desenvolupament de l'objectiu 2, i el segon al del 3. L'article que inclou l'objectiu 1 es troba en fase d'escriptura.

Col·laboracions

La present tesi ha exigít una important interdisciplinarietat entre diferents àrees de coneixement, la qual ha requerit la combinació de diferents tècniques experimentals així com teòriques. Per aquesta raó han estat imprescindibles les col·laboracions amb diversos especialistes.

En primer lloc cal destacar l'estreta col·laboració amb el *Grup d'estudis teòrics d'activació de biomolècules* de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), dirigit per la Prof. Mariona Sodupe i format pel Prof. Piero Ugliengo, Dr. Albert Rimola i Dr. Luis Rodríguez. D'una banda, aquest equip ha dut a terme tots els càlculs teòrics que es presenten en aquesta tesi, així com la seva interpretació. D'altra, les nombroses discussions científiques, els suggeriments resultants i la seva excel·lent disponibilitat mereixen un reconeixement especial.

Pel que fa als estudis de *docking* i de dinàmica molecular, cal considerar al Dr. Hugo Gutiérrez de Terán de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, pel seu treball i interès, i també per les fructíferes discussions i aportacions en el camp de les interaccions del catió ThT⁺ amb les fibres amiloides.

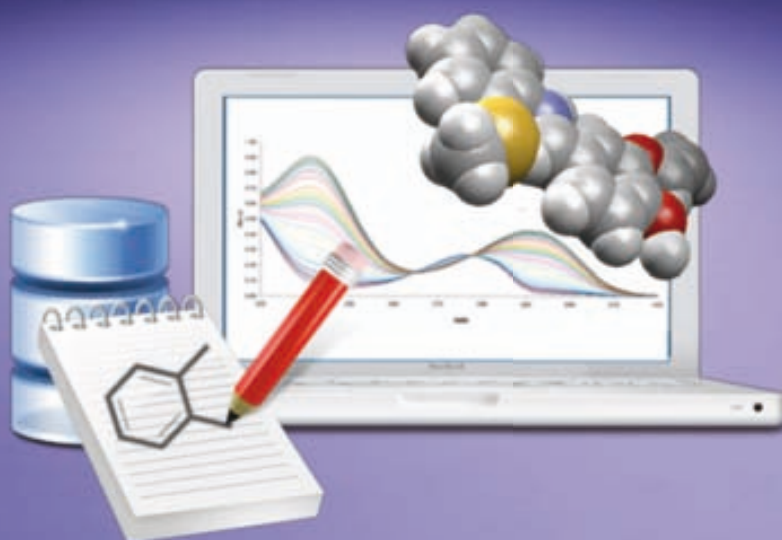
Des d'un punt de vista experimental, ha estat molt valuosa la col·laboració amb el *Grup d'estructura i funció de les proteïnes* del Dept. de Bioquímica de la UAB, dirigit pel Prof. Josep Vendrell, i integrat pel Dr. Salvador Ventura i la Natàlia Sánchez de Groot. Aquest grup, especialista en la formació d'agregats proteics, ha dut a terme la formació de fibres dels pèptids $A\beta_{1-40}$ i $A\beta_{1-42}$, les mesures de fluorescència i de turbidimetria, i la discussió i interpretació dels resultats obtinguts.

Les estructures cristal·lines han estat resoltes per difracció de Raigs X en monocristall pel Dr. Àngel Álvarez Larena del Servei de Difracció de Raigs X de la UAB. Tanmateix, el Dr. José Vidal-Gancedo i la Dra. Vega Lloveras de l'Institut de Ciència dels Materials de Barcelona (ICMAB), han dut a terme l'enregistrament i interpretació dels espectres d'EPR dels complexos de Cu(II) presentats en aquesta tesi.

M'agradaria esmentar altres col·laboracions i estades en altres laboratoris que em van ajudar en els inicis de la tesi. Així les reaccions de iodació van ser dutes a terme per la doctoranda que presenta aquesta tesi sota la supervisió del Dr. Gregori València i Dra. Gemma Arsequell del CSIC-IIQAB. Tanmateix, els primers assajos bioquímics sobre intercalació es van dur a terme amb fibres de transtirretina (TTR) en el laboratori del Dr. Antoni Planas de l'IQS. També cal esmentar al Dr. Jordi Mestres de l'IMIM, per facilitar-me entrar en el món de la Quimioinformàtica i per la seva aportació en el càlcul del paràmetre log BB.

Vull agrair molt sincerament la participació de tots aquests investigadors i la seva aportació de coneixements i destreses. Aquestes col·laboracions han enriquit de manera important el nostre treball i han permès donar una major perspectiva als resultats obtinguts.

III. RESULTATS I DISCUSSIÓ

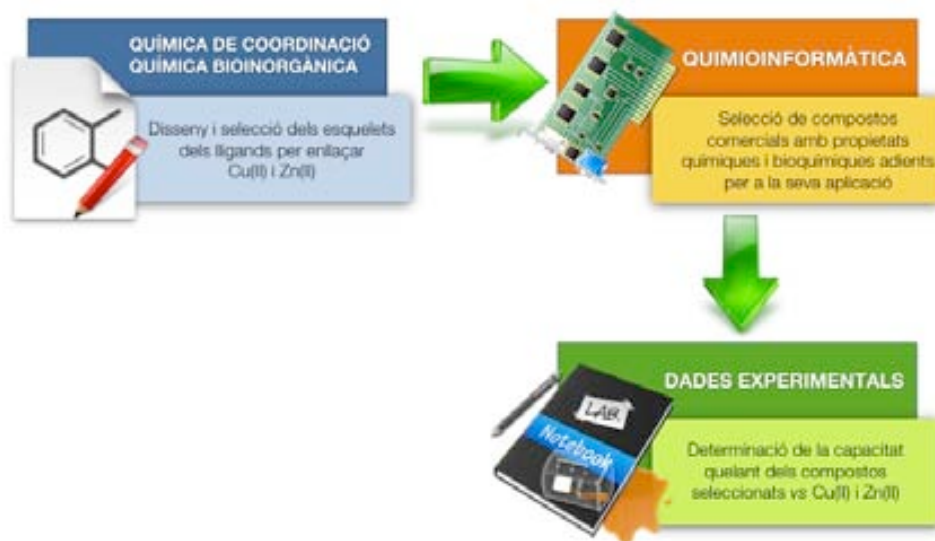


CAPÍTOL 3

Utilització de tècniques quimioinformàtiques en el disseny i selecció d'agents quelants multifuncionals

Aquest capítol correspon als nostres primers intents de trobar uns lligands quelants de metalls amb potencial aplicació en la diagnòsi i/o teràpia de la MA seguint una estratègia propera a la del disseny de nous fàrmacs. Probablement, en un laboratori de química de coordinació el problema esmentat s'abordaria seguint el següent esquema: disseny dels lligands més adients en base a la naturalesa dels metalls, síntesi dels compostos escollits, síntesi i caracterització dels complexos, assajos bioquímics (*in vitro*) i biològics (*in vivo*). Depenent d'aquests darrers resultats, s'optimitzaria el disseny dels lligands i, en conseqüència, es reiniciaria el procés anterior. En conjunt, aquest camí demana una inversió de temps molt important abans de conèixer els resultats d'aplicació pels quals es planteja la síntesi dels lligands. De fet, l'esforç esmerçat en el treball estrictament químic pot quedar molt poc compensat després dels resultats d'aplicació.

A fi d'optimitzar la inversió de temps i reduir costos econòmics la indústria farmacèutica utilitza diverses metodologies. Concretament, les bases de dades i les eines informàtiques són d'ús freqüent en el disseny de nous fàrmacs. Inspirats en aquests procediments, la selecció de lligands quelants de Zn(II) i Cu(II) per la seva possible aplicació en la MA ha comportat tres fases diferenciades, tal com es mostra en el següent esquema:



La primera fase ha consistit en analitzar quins grups funcionals i en quina posició relativa (*esquelet molecular*) són els més adequats per coordinar els ions metàl·lics Cu(II) i Zn(II) en base a la química de coordinació i la química bioinorgànica d'ambdós metalls.

En una segona fase, les dades estructurals s'han ampliat amb uns altres requeriments a fi d'optimitzar els lligands per al diagnòstic i teràpia de la MA. Les condicions addicionals són: (1) el lligand ha de ser comercial, (2) ha de tenir capacitat de travessar la BBB, i (3) ha de

poder incorporar ^{123}I a fi de permetre la detecció en el cervell mitjançant mètodes de diagnosi per imatge no invasiva amb radiotracadors.

Per poder cercar i seleccionar aquelles molècules que compleixen les condicions anteriors ha estat necessària la utilització d'eines quimioinformàtiques les quals han permès, en primer lloc, trobar les molècules que contenen els esquelets preestablerts i posteriorment, predir la seva capacitat de travessar la BBB. Finalment, en base a criteris de química orgànica, s'han descartat d'entre totes les molècules obtingudes aquelles que no permeten un fàcil marcatge radioactiu amb ^{123}I .

En la tercera i darrera fase, s'ha procedit a determinar espectrofotomètricament les constants d'acidesa d'aquests lligands i les constants de formació envers Cu(II) i Zn(II) , així com a analitzar el conjunt de resultats obtinguts.

3.1. Disseny dels esquelets dels lligands per enllaçar Cu(II) i Zn(II)

Les característiques químiques dels ions metàl·lics Cu(II) i Zn(II) ens aporten informació sobre quin entorn i quina geometria afavoreix la seva coordinació. Dins de la seva complexitat, la química dels elements metàl·lics en el món mineral és més sistematitzable que el seu comportament en els sistemes biològics. D'altra banda, l'objectiu d'aquest treball fa inevitable prendre com a referent els entorns de coordinació d'aquests metalls en les metal·loproteïnes que els contenen.

D'acord amb la química de coordinació de l'ió Cu(II) , la seva configuració electrònica d^9 permet nombroses geometries de coordinació amb una estereoquímica fortament influenciada per la distorsió Jahn-Teller. Ambdues característiques expliquen la dificultat de sistematitzar les preferències coordinatives d'aquest ió en l'elevat nombre de complexos avui descrits. Els nombres de coordinació més comuns són 4, 5 i 6 donant lloc a complexos plano-quadrats, octaèdrics, bipiràmide trigonal i tetraèdrics molt sovint distants de la geometria regular. Des del punt de vista de la teoria de Pearson, l'ió Cu(II) és un àcid de Lewis *frontera* amb tendència a enllaçar-se a àtoms donadors com pot ser el N (base frontera), però també amb l'O (base dura) i el S (base tova). Atès a la seva configuració electrònica, el Cu(II) forma complexos acolorits i paramagnètics que poden ser estudiats per tècniques magnètiques (μ_{ef} vs T, EPR) i òptiques (UV-vis).^{146,147}

La química de coordinació de l'ió Cu(I) , en canvi, presenta configuració electrònica d^{10} i per tant els seus complexos són diamagnètics i incolors. Els nombres de coordinació que presenta són 4, 3 i 2 donant lloc a complexos tetraèdrics, plano-trigonals i digonals, éssent la geometria tetraèdrica la preferent. L'ió Cu(I) és un àcid de Lewis tou amb tendència a enllaçar-se a àtoms

?

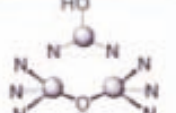
donadors S, N i O marcant preferència pel S atès al seu caràcter de base tova. El diamagnetisme característic de la seva configuració electrònica, permet que els complexos de Cu(I) siguin estudiats per RMN convencional.¹⁴⁷?

No obstant, com ja s'ha comentat en la introducció, l'estat d'oxidació del coure que ens interessa principalment és el Cu(II) atès que segons la bibliografia⁶⁴⁻⁶⁷ és el que dona lloc a la formació de les plaques amiloide que desenvolupen la MA.?

D'altra banda, la química de coordinació de l'ió Zn(II), ve determinada per la configuració electrònica del centre metàl·lic d^{10} , la qual cosa no aporta avantatges energètics en cap geometria de coordinació. És a dir, l'absència d'energia d'estabilització de camp cristal·lí juntament amb el fet de ser un catió petit ($r_{Zn^{2+}} = 69$ pm) afavoreix la formació de complexos amb geometria tetraèdrica. El seu caràcter d'àcid *frontera* marca la seva tendència a enllaçar-se a N, O i S.^{146,147}?

Endinsant-nos en els sistemes biològics, el coure forma part de nombroses proteïnes i les seves funcions estan relacionades principalment amb el transport d'electrons, transport i activació d'oxigen i activitat antioxidant. Sovint, els residus de S-Cys, S-Met i N-His són els responsables de mantenir el coure enllaçat a la proteïna, tal com s'observa a la Taula 3.1, on les proteïnes de coure es classifiquen en funció del tipus de centre actiu que contenen.¹⁴⁸?

Taula 3.1. Classificació de les biomolècules de coure respecte les característiques del seu centre actiu.¹⁴⁸

TIPO DE Cu	FUNCIÓN [ejemplo]	ENTORNO DEL Cu	• UV-V * • EPR *
Tipo 1 (mononuclear)	Transporte de e (plastocianina)		• Absorción intensa (en el visible, BTC L → M) • A ₁₁ pequeño
Tipo 2 (mononuclear)	Catálisis, redox (Cu,Zn-SOD)		• No absorción intensa (solo transiciones prohibidas) • Parámetros normales Cu ²⁺
Tipo 3 (dinuclear)	Transporte de O ₂ (hemocianina)		• Absorciones intensas (BTC L → M) • EPR silente
Tipo [2 + 3] (trinuclear)	Activación de O ₂ (ascorbato oxidasa)		• Absorciones intensas (BTC L → M) • Parámetros normales Cu ²⁺
Cu ₂ (dinuclear)	Transporte de e (citocromo c oxidasa)		• Absorción en IR cercano (BTC M → M) • A ₁₁ muy pequeño
Cu-MT (multinuclear)	Regulación, almacenamiento, transporte		• No forma oxidada

* Características espectroscópicas de la forma oxidada u oxigenada.

?

La importància de l'ió Zn(II) dins la química bioinorgànica rau en que després del ferro, és el segon element de transició més abundant en els organismes vius. Les funcions de les metal·loproteïnes de zinc inclouen una àmplia diversitat de metal·loenzims, proteïnes d'emmagatzematge i transport del propi Zn(II) i metal·loproteïnes que interaccionen amb el DNA. Els residus responsables de l'enllaç al centre metàl·lic segueixen la següent ordenació: N-His >> O-Glu $\approx$ O-Asp > S-Cys.¹⁴⁸

D'acord amb el que s'ha dit anteriorment, es pot concloure que determinar un entorn de coordinació que sigui òptim simultàniament per als ions Zn(II) i Cu(II) és una tasca que demana certa simplificació. Així doncs, en base als criteris bàsics de la química de coordinació juntament amb els models sintètics més freqüents de les metal·loproteïnes de zinc i coure, s'han establert els següents requisits: (1) Lligand bidentat capaç de formar anells quelants de cinc baules; (2) Àtoms donadors: N imidazòlic o piridínic i S de tioèter; (3) Màxima semblança als residus d'histidina i metionina.¹⁴⁹

Aquests criteris han determinat l'elecció dels esquelets bàsics que es mostren a les Figura 3.1.

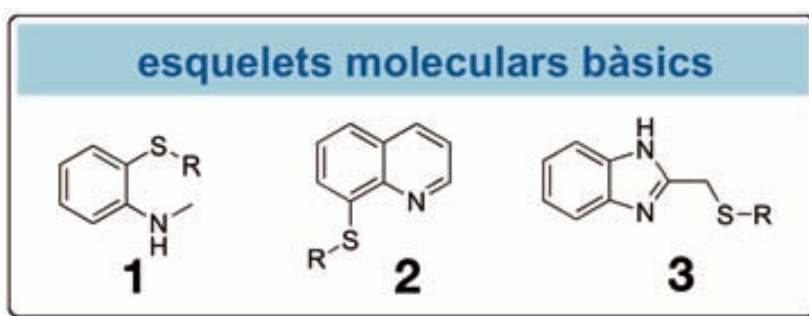


Figura 3.1. Esquelets moleculars proposats 1-3, on R $\neq$ H

3.2 Selecció dels lligands òptims mitjançant eines quimioinformàtiques

Una vegada establerts els tres esquelets moleculars, els objectius d'aquesta segona fase consisteixen en:

1. Realitzar una cerca en bases de dades comercials que ens informi de les molècules comercials que els contenen
2. Predir quines d'aquestes molècules tenen la capacitat de travessar la BBB

3.2.1 Cerca dels lligands que contenen els esquelets moleculars establerts en bases de dades comercials. Generació de quimiotèques virtuals

Actualment, molts proveïdors comercials de productes químics ofereixen els seus catàlegs de manera gratuïta via telemàtica o en CD-ROM. La majoria d'ells ofereixen les molècules en extensió SDF (*Structure Data File*) o DBF (*Database file*), els quals faciliten la importació a programes informàtics que permeten visualitzar aquestes molècules (ISISDraw,¹⁵⁰ ChemDraw,¹⁵¹ ChemSketch,¹⁵² MarvinSketch¹⁵³...).

Taula 3.2. Principals proveïdors comercials. Es pot observar el gran nombre de molècules que contenen els seus catàlegs moltes vegades distribuïdes en diferents col·leccions

Base de dades comercials	Format de molècules	nombre de molècules	nombre de col·leccions
Chembridge	SDF, DBF	423.445	5
ChemDiv	SDF, DBF	359.103	3
Asinex	SDF	552.704	3
Enamine	SDF, DBF	719.828	11
Maybridge	SDF, DBF	45.253	2
Akos	SDF	166.132	10
KeyOrganics	SDF	53.200	3
Interchim	SDF	690.000	5
LifeChemicals	SDF	300.000	6
Otava	SDF	707.500	8

El gran nombre d'estructures que formen part d'aquests catàlegs fa impossible una cerca sense un ajut informàtic. ChemTK¹⁵⁴ és un programa en entorn MS Windows® que permet visualitzar totes les estructures d'una determinada base de dades comercial en 2D a més a d'establir uns paràmetres de cerca constituïts per fragments o esquelets moleculars, seleccionant únicament aquelles molècules que els contenen, tal com s'indica a la Figura 3.2. En el nostre cas els paràmetres de cerca són els esquelets escollits en la fase anterior (Figura 3.1).

El procediment utilitzat per a cercar cada esquelet bàsic dins d'una base de dades comercial es mostra a continuació. Inicialment cal dibuixar l'estructura base en el programa MarvinSketch,¹⁵³ d'aquesta manera s'obté una estructura SDF. Aquest format cal convertir-lo a extensió SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*)^{155,156} i SMART (*SMile ARbitrary Target Specification*).¹⁵⁷ Ambdós formats són un sistema de notació química àmpliament utilitzat en el camp de la bioinformàtica i estan dissenyats per aconseguir alta velocitat en el processament d'informació química i realització de càlculs. Permeten representar qualsevol estructura molecular mitjançant una cadena de caràcters d'acord amb unes regles establertes que proporcionen informació relativa als àtoms, enllaços, anells, ramificacions ... Aquestes regles són les que diferencien les dues notacions anteriorment esmentades. La Figura 3.3 mostra el cas particular per a l'esquelet 1.

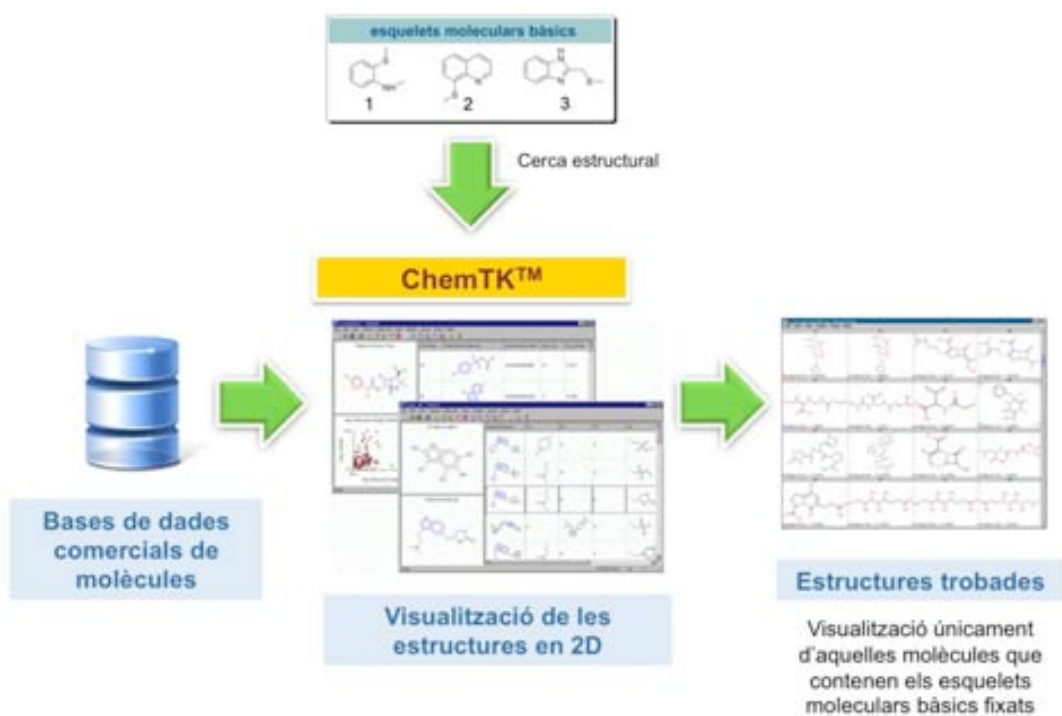
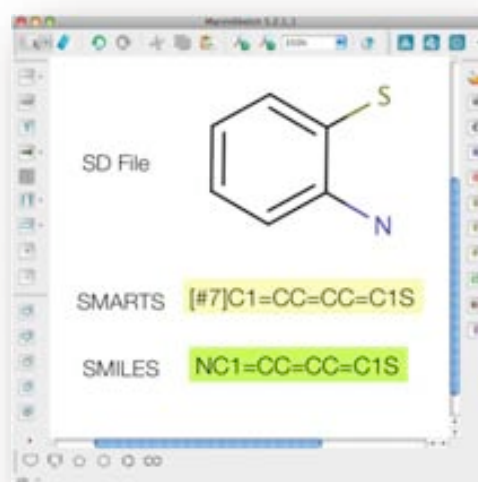


Figura 3.2. Esquema del procés a seguir per a la cerca de molècules amb un determinat esquelet dins una base de dades comercial

Figura 3.3. Representació d'un esquelet molecular en tres formats diferents



Una vegada es disposa del fitxer que conté la llibreria de molècules que facilita la casa comercial, el programa ChemTK mostra els milers de molècules que conté. L'objectiu és disposar de totes aquelles estructures que contenen l'esquelet bàsic pre-establert, per això és necessari indicar un paràmetre de cerca constituït per el fragment en format SMARTS, com mostra a la Figura 3.3. El resultat de la cerca en el catàleg ASINEX per a l'esquelet 1 (Figura 3.3) foren 67 molècules. A la Figura 3.4 es visualitza l'*output* del programa amb alguns dels resultats obtinguts.



Repetint aquest procediment per a tots els esquelets pre-establerts en els catàlegs al nostre abast, s'ha trobat que del més d'un milió de molècules totals amb les quals es comença la cerca, excloses totes aquelles repetides, 199 molècules contenen l'**esquelet 1**, 87 molècules l'**esquelet 2** i 270 molècules l'**esquelet 3**.

Figura 3.4. Output del programa ChemTK mostrant algunes de les molècules que contenen l'esquelet 1



3.2.2 Capacitat d'una molècula de travessar la barrera hematoencefàlica (BBB): càlcul teòric del paràmetre log BB

La hidrofobicitat és un factor d'importància cabdal en el món biològic. Bàsicament, hi ha dues etapes en els processos farmacològics que es regeixen per efectes hidrofòbics: una és el transport de la molècula des del punt d'administració al lloc d'acció i l'altra fa referència a la penetració del fàrmac en les membranes cel·lulars.

La barrera hematoencefàlica, també coneguda com BBB de l'anglès *Blood Brain-Barrier*, separa el cervell del corrent sanguini. El paràmetre que aporta informació sobre la capacitat d'una molècula a ser permeable a la BBB és el log BB que es defineix com el logaritme del coeficient de partició d'una molècula en el sistema de distribució cervell-sang ($\log BB = C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}}$). Lògicament, determinar aquest paràmetre de forma experimental representa una gran inversió de diners i de temps, a més a més de les limitacions avui establertes per treballar amb animals.

Tradicionalment, per quantificar la hidrofobicitat d'un compost químic es determinava la distribució de la molècula entre dues fases immiscibles. És l'anomenat coeficient de partició, i



es representa amb la lletra *P*. El més freqüent és utilitzar l'aigua en qualitat de fase polar i l'octanol com a fase no polar, definint-se el paràmetre molecular $\log P_{ow}$ com el logaritme del coeficient de partició (*P*) en el sistema de distribució octanol-aigua.¹⁵⁸

Actualment, es considera que la hidrofobicitat d'una molècula ve donada pel valor de $\log P$ i per la distribució de càrregues en la seva superfície, el que s'anomena PSA (acrònim de *Polar Surface Area*).¹⁵⁹ La quimioinformàtica permet avui:

- Conèixer el valor dels paràmetres o descriptors moleculars $\log P$ i PSA per a qualsevol molècula
- Calcular el valor de $\log BB$ i en conseqüència establir la seva capacitat de travessar la BBB

Actualment es poden trobar més expressions matemàtiques que permeten el càlcul del paràmetre $\log BB$ utilitzant altres descriptors com el PM, nº d'àtoms donadors i/o acceptors, volum molecular. D'entre totes les possibles es va escollir l'equació de Clark¹⁶⁰ per ser un model fàcilment interpretable i d'altra banda, els estudis de validació d'aquesta equació mostren molt bona concordança entre els valors de $\log BB$ experimentals i els calculats.¹⁶¹

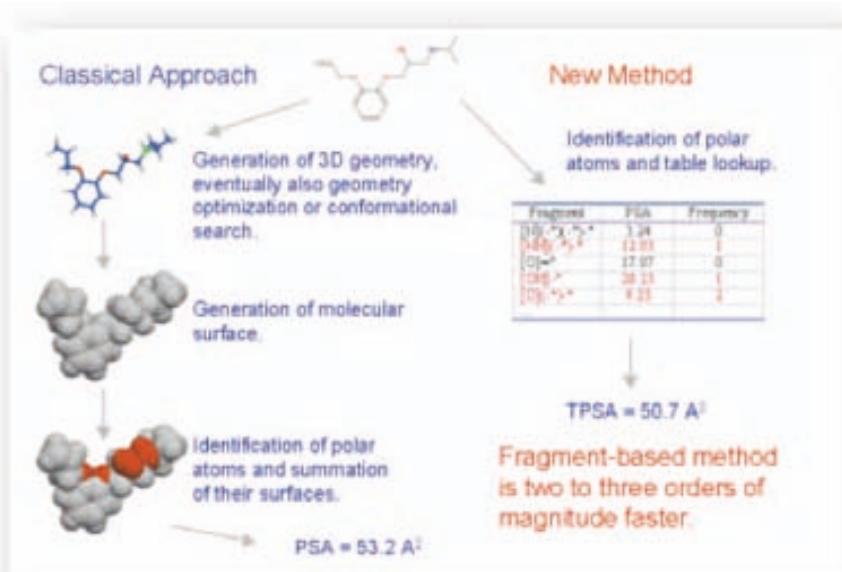
$$\log BB = -0.0148 \cdot TPSA + 0.152 \cdot \text{clog } P + 0.139 \quad (\text{Equació 1})$$

En aquesta expressió, $\text{clog } P$ i TPSA estan directament relacionats amb $\log P$ i PSA, respectivament. Ara bé, un cop s'ha calculat el valor de $\log BB$ per una espècie química cal conèixer el valor mínim que assegura el seu pas a través de la BBB. Per això, és imprescindible disposar de dades experimentals *in vivo* per una família de molècules comparables al compost d'interès. Si bé cal realitzar prèviament el càlcul dels paràmetres TPSA i $\text{clog } P$ per a cadascuna de les molècules trobades, només les molècules amb un valor $\log BB \geq -0.3$ són bones candidates per travessar la BBB.¹⁶²

El valor del paràmetre PSA es calculava tradicionalment en base a l'estructura 3D de la molècula i a la naturalesa dels àtoms polars a la superfície de la mateixa. L'elevat cost de temps de càlcul i la complexitat dels mateixos expliquen el desenvolupament d'altres mètodes per calcular aquest paràmetre. Des de l'any 2000, es disposa de programes de càlcul – avui hi ha varies desenes – que calculen ràpidament el paràmetre PSA, ara anomenat TPSA, com a suma de les contribucions dels diferents fragments que formen la molècula.¹⁵⁹ Una comparació de la metodologia tradicional, PSA, amb l'actual, TPSA, es mostra a la Figura 3.5.

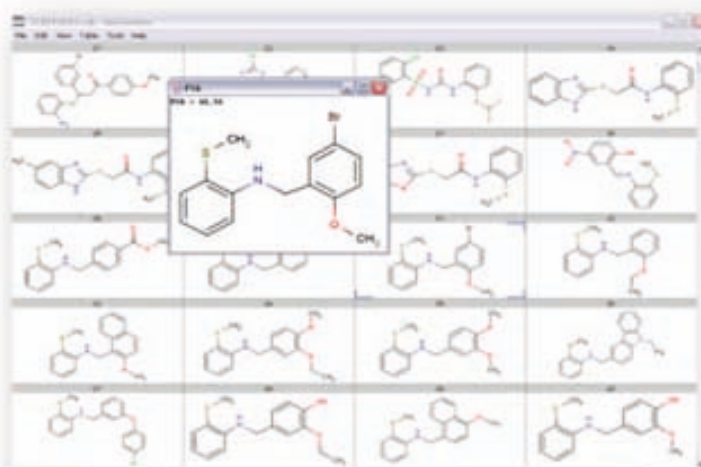


Figura 3.5.
Comparació del càlcul
del paràmetre PSA pel
mètode tradicional
amb el mètode actual,
TPSA



El valor d'aquest paràmetre s'ha obtingut mitjançant el programa MarvinSketch, en entorn *Java*, que permet l'*input* de les molècules en format SDF, cal disposar per tant de les molècules dibuixades per a realitzar el càlcul com es mostra a la Figura 3.6.

Figura 3.6. El valor del paràmetre
TPSA apareix a la part superior
esquerra del requadre que conté la
molècula, aquest ha estat calculat
mitjançant el programa MarvinSketch



D'altra banda, el càlcul del valor del paràmetre clog P^{163} s'ha realitzat mitjançant el programa Daylight,¹⁵⁸ que requereix un *input* d'estructures en format *SMILES* (Figura 3.7). Com ja s'ha comentat anteriorment, la conversió del format SDF a *SMILES* es realitza amb el programa MarvinSketch.¹⁵³

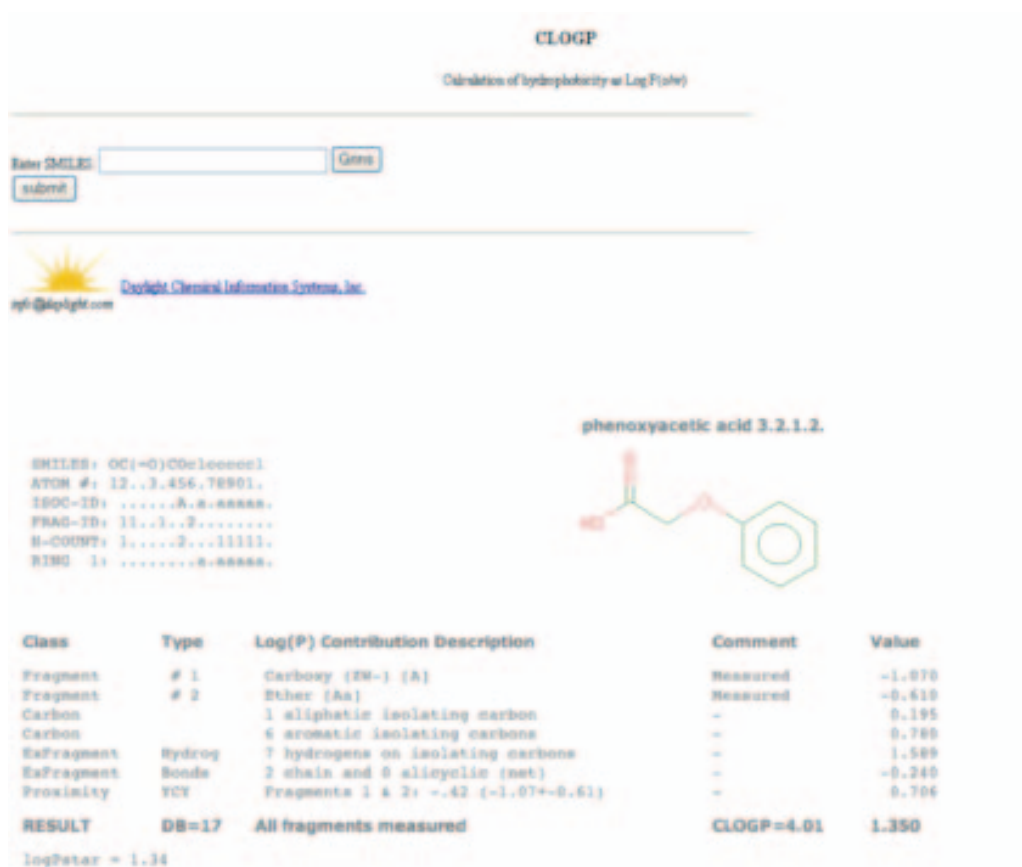
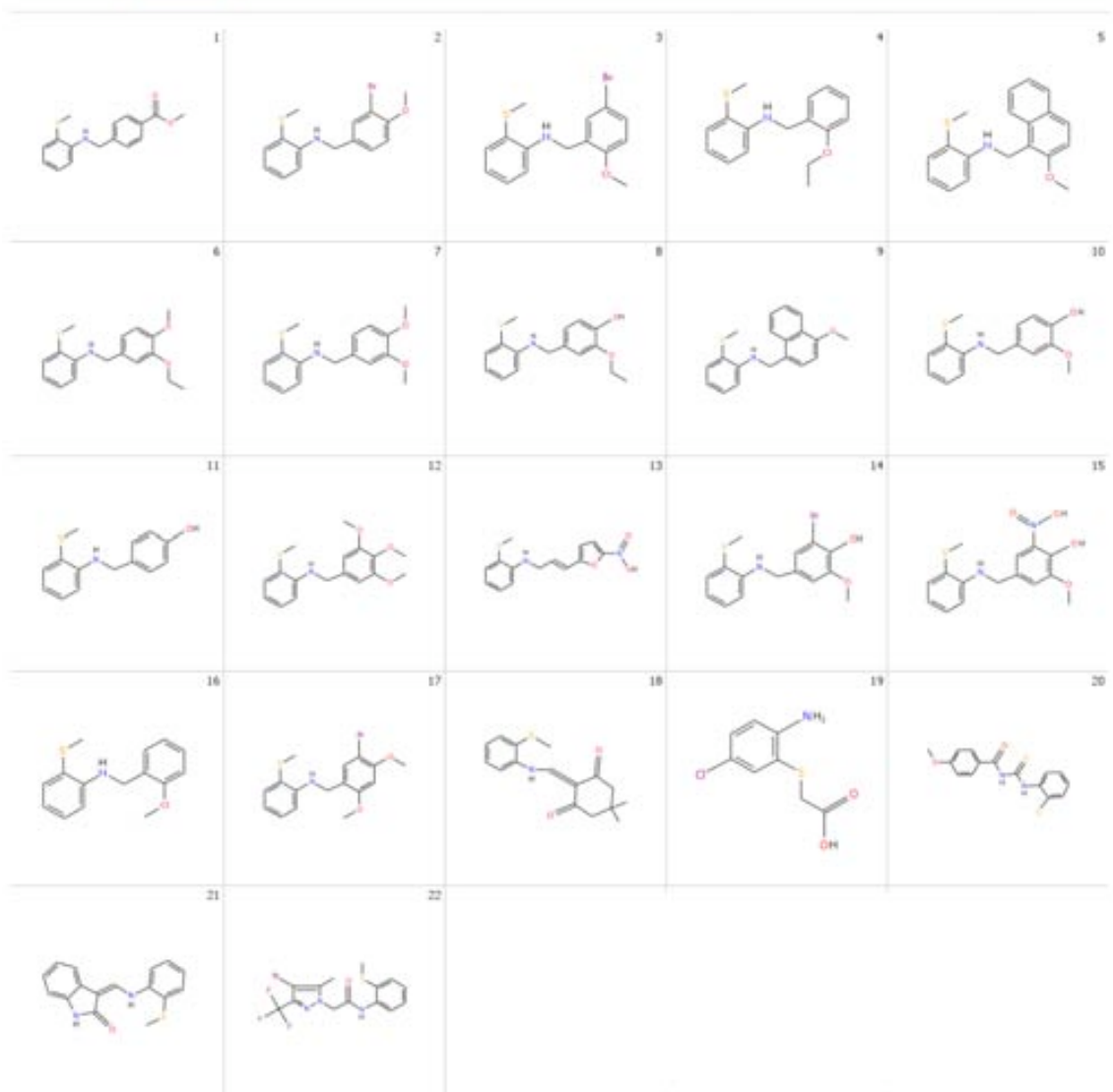


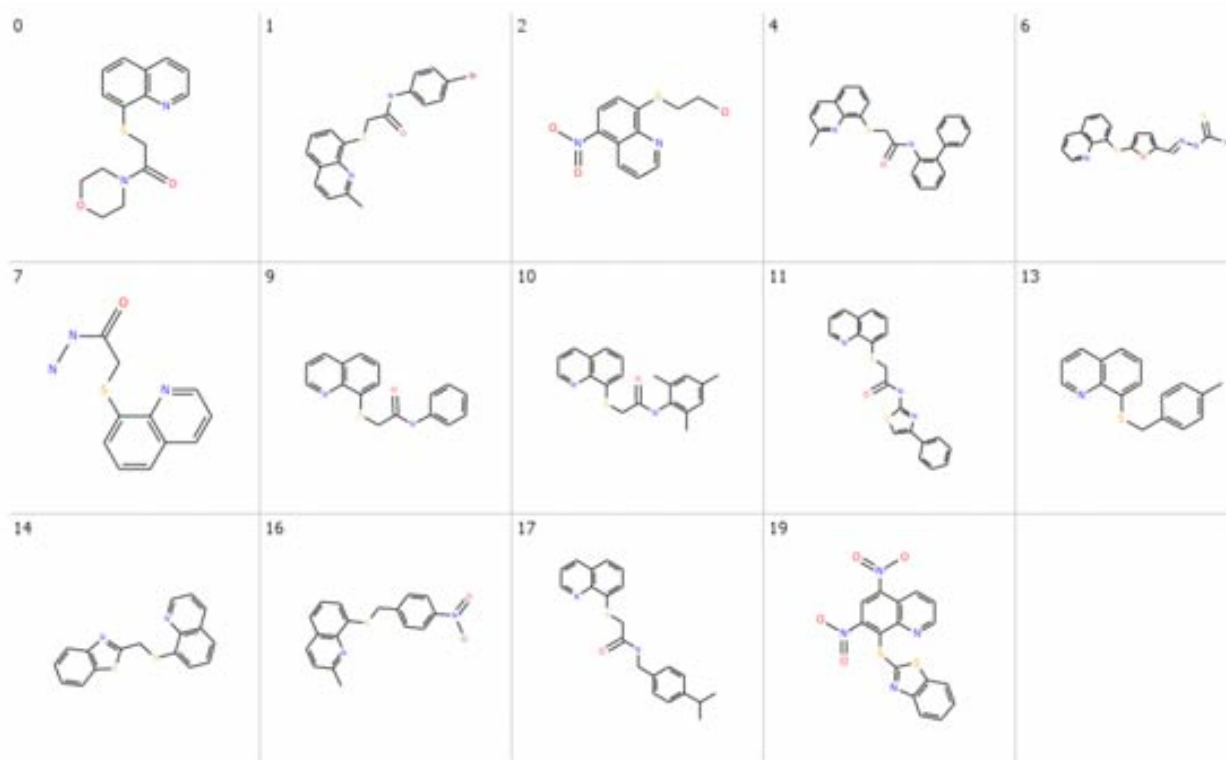
Figura 3.7. Càlcul del paràmetre clog P mitjançant el programa Daylight

Com ja s'ha comentat, el valor del paràmetre log P es pot determinar experimentalment realitzant extraccions en octanol-aigua o bé per mètodes HPLC. L'elevat cost de temps i les limitacions que presenten les metodologies experimentals expliquen el desenvolupament de mètodes per calcular aquest paràmetre. Aquests es basen en la fragmentació de la molècula en subestructures de les quals es coneix el valor del paràmetre log P. L'anomenat clog P (acrònim de *calculated log P*) d'una molècula es defineix com la suma de les contribucions dels diferents fragments que formen la mateixa. Una vegada obtinguts els valors de clogP i TPSA per a cadascuna de les molècules, aquests van ser introduïts a l'equació de Clark per calcular el valor de log BB. Aquelles molècules que complien el requeriment $\log BB \geq -0.3$ es seleccionaren com a possibles candidates, obtenint-se 51 molècules que contenen l'**esquelet 1**, 39 amb l'**esquelet 2** i 16 amb l'**esquelet 3**. A títol d'exemple, es mostra a continuació algunes de les molècules cercades que inclouen els esquelets 1, 2 ó 3 i també s'indica el valor calculat de log BB. Aquelles que mostren la casella log BB en groc tenen la capacitat de travessar la BBB.

ESQUELET MOLECULAR 1



ESQUELET MOLECULAR 2



ESQUELET MOLECULAR 3

3781	27152	27164	36360	36361
44967	46858	49885	58251	71054
71057	71069	71082	74829	74832
74834	78219	78220	78227	82644
82645	82646	82647	86219	86318
102785	109415	109416	109421	112007
112008				

Taula 3.3. Algunes de les molècules cercades que inclouen els esquelets 1, 2 ó 3; també s'indica el valor calculat de clogP, TPSA i log BB. Aquelles que mostren la casella log BB en groc tenen la capacitat de travessar la BBB.

	ID MOLECULA	clogP	TPSA	log BB		ID MOLECULA	clogP	TPSA	log BB
ESQUELET 1	1	3.61	63.63	-0.25	ESQUELET 3	3781	4.00	107.96	-0.85
	2	4.34	46.56	0.10		27152	3.04	140.93	-1.48
	3	4.57	46.56	0.14		27164	2.63	95.11	-0.86
	4	4.09	46.56	0.072		36360	2.79	97.58	-0.88
	5	4.74	55.79	0.033		36361	3.69	82.66	-0.52
	6	3.83	55.79	-0.10		44967	1.37	134.02	-1.63
	7	3.30	66.79	-0.34		46858	3.74	97.58	-0.73
	8	3.36	57.79	-0.20		49885	1.31	95.44	-1.07
	9	4.74	57.56	0.0077		58251	4.64	82.66	-0.38
	10	2.83	66.79	-0.41		71054	4.77	71.80	-0.19
	11	2.98	57.56	-0.25		71057	5.48	71.80	-0.089
	12	2.94	65.02	-0.37		71069	3.54	80.01	-0.50
	13	3.49	96.29	-0.75		71082	6.34	81.03	-0.097
	14	3.63	66.79	-0.30		74829	5.98	81.03	-0.15
	15	3.18	112.61	-1.04		74832	5.98	81.03	-0.15
	16	3.56	46.56	-0.0080		74834	5.22	90.26	-0.40
	17	4.36	55.79	-0.024		78219	4.65	71.80	-0.21
	18	3.33	71.47	-0.41		78220	1.32	84.58	-0.91
	19	1.66	88.62	-0.92		78227	5.58	70.17	-0.050
	20	3.15	121.25	-1.17		82644	4.18	84.58	-0.47
	21	3.42	66.43	-0.32		82645	6.56	60.94	0.23
	22	3.76	72.22	-0.36		82646	3.09	84.58	-0.64
ESQUELET 2	0	1.83	67.73	-0.58	ESQUELET 3	82647	4.58	86.72	-0.44
	1	4.88	67.29	-0.11		86219	4.06	140.93	-1.32
	2	1.57	104.24	-1.16		86318	2.55	115.33	-1.18
	4	4.61	67.29	-0.15		102785	4.19	82.66	-0.44
	6	3.40	133.83	-1.32		109415	3.72	92.9	-0.67
	7	0.67	93.31	-1.14		109416	3.96	97.58	-0.70
	9	3.26	67.29	-0.36		109421	1.72	108.00	-1.19
	10	3.45	67.29	-0.33		112007	3.60	128.48	-1.21
	11	4.59	108.42	-0.76		112008	4.24	84.25	-0.46
	13	4.79	38.19	0.30		3781	4.00	107.96	-0.85
	14	4.22	79.32	-0.39		27152	3.04	140.93	-1.48
	16	4.53	84.01	-0.41		27164	2.63	95.11	-0.86
	17	4.58	67.29	-0.16		36360	2.79	97.58	-0.88
	19	4.60	170.98	-1.69		36361	3.69	82.66	-0.52

Donat que la utilitat d'aquests lligands depèn de la seva capacitat de travessar la BBB i la facilitat d'incorporar iode radioactiu per a fins de diagnosi, el següent pas és seleccionar aquelles molècules que presentin facilitat per al marcatge isotòpic. Cal tenir en compte que la iodació de la molècula incrementa la seva hidrofobicitat i en conseqüència millora les característiques del lligand per travessar la BBB.

El mètode de iodació mitjançant la utilització del reactiu $[Ipy_2]BF_4$ (tetrafluoroborat de bispiridinaiodo(I)), àmpliament estudiat pel professor José Barluenga, és un sòlid blanc, estable a l'aire i que es pot emmagatzemar a temperatura ambient durant llargs períodes de temps. L'avantatge de treballar amb aquest reactiu rau en la possibilitat de realitzar iodacions electròfiles selectives a temperatura ambient, i amb molt bons rendiments, d'un rang molt ample de substrats aromàtics¹⁶⁴ com mostra la Figura 3.8.

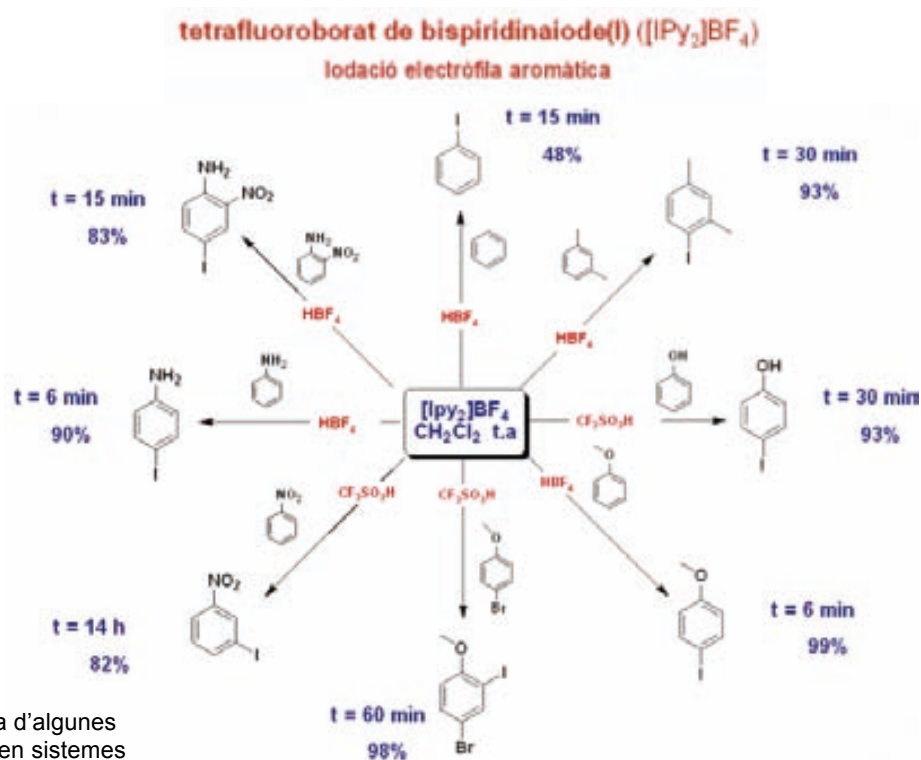
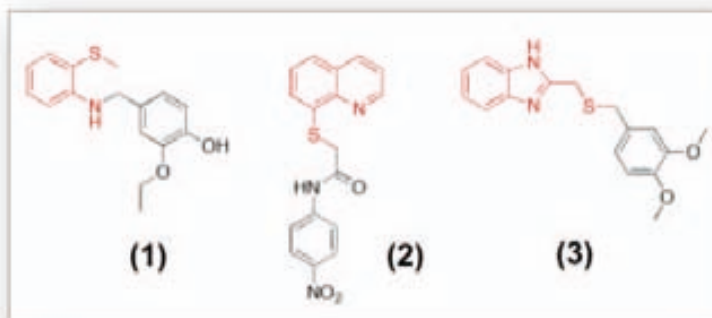


Figura 3.8. Esquema d'algunes reaccions de iodació en sistemes aromàtics. S'indica les condicions experimentals, temps i rendiments obtinguts.

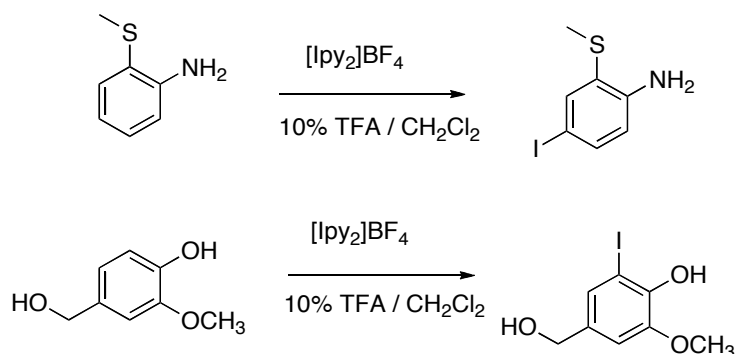
Com es pot observar en l'esquema anterior, els anells que contenen substituents electrodonadors afavoreixen els temps reacció i els rendiments. Així compostos aromàtics com són el fenol, l'anisol i l'anilina són els substrats que asseguren l'èxit front la iodació amb aquest reactiu. Per tant, de totes les molècules que tenen la capacitat de travessar la BBB, s'han escollit aquelles que inclouen els anells aromàtics esmentats.

Tots aquests motius han determinat que les 3 molècules que semblen millors candidates per assolir els objectius del treball són:



D'aquestes, el compost **(1)** ha estat el més assequible en termes comercials i per això s'ha escollit en primer terme per a aquest treball de recerca, al llarg del qual se l'anomena TMET.

A fi d'assajar la posta a punt i optimització de la reacció de iodació de TMET amb el reactiu $[\text{Ipy}_2]\text{BF}_4$, amb iode no radioactiu (^{127}I), i poder establir les condicions òptimes de treball, s'han iodat les molècules precursors obtenint-se uns resultats prometedors. Les dades HPLC indiquen que la reaccions han tingut lloc en 30 min i les dades de RMN de ^{13}C i ^1H confirmen la incorporació de iode a la molècula (consultar l'Annex).



Així, un cop optimitzada la reacció amb $[\text{Ipy}_2]\text{BF}_4$ es iodarà amb $[\text{I}^{123}\text{py}_2]\text{BF}_4$. Cal notar que el procés de iodació amb ^{123}I requereix unes instal·lacions adequades per a la manipulació radiofàrmacs i evitar qualsevol tipus d'exposició a la radiació gamma.

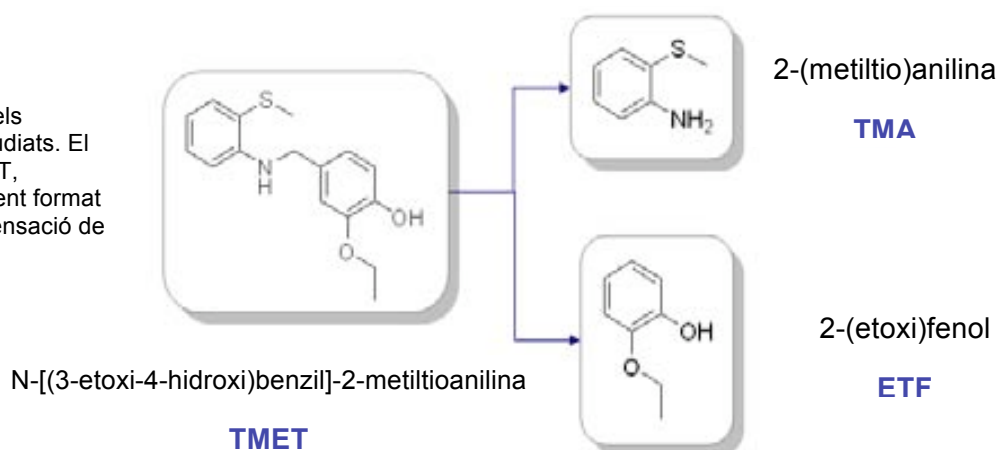
3.3 Determinació de les constants de formació dels complexos dels lligands TMA, EFT i TMET envers Cu(II) i Zn(II)

La finalitat d'aquesta tercera part del treball és: a) comprovar que els lligands dissenyats enllacen els ions Cu(II) i Zn(II), b) conèixer l'estequiometria dels complexos que es formen en solució, i c) en cas de que ambdós metalls foren presents en el medi, saber per quin metall tindria preferència l'esmentat lligand.

Tots aquests objectius es poden assolir determinant les constants de formació i corresponents estequiometries de les espècies complexes Zn(II)-ligand i Cu(II)-ligand que es formen en solució. Sovint, aquesta determinació exigeix conèixer prèviament les constants d'acidesa del lligand a les mateixes condicions experimentals. De les diferents alternatives avui ben establertes pels estudis en solució s'ha escollit la valoració àcid-base del lligand, en presència i en absència de metalls, seguida espectrofotomètricament. Alhora, les condicions de temperatura i força iònica s'han mantingut constants en tots els experiments i s'han fixat de manera que fossin el més proper possible a les del medi fisiològic, és a dir 37°C i NaClO₄ 0.1 M, respectivament. El medi ha estat etanol:aigua (40:60) per assegurar la solubilitat dels lligands estudiats. Aquest medi seria compatible amb la posterior aplicació del lligand en medis fisiològics. Els experiments s'han dut a terme oberts a l'atmosfera.

L'estudi espectrofotomètric per a determinar la capacitat coordinant envers Cu(II) i Zn(II) s'ha realitzat amb el lligand N-[(3-etoxi-4-hidroxi)benzil]-2-metiltioanilina (TMET). Aquest, com es pot observar a la Figura 3.9, té dos entorns de coordinació que poden enllaçar als ions metàl·lics, un provinent de la 2-(metiltio)anilina (TMA) i l'altre provinent del 2-(etoxi)fenol (ETF), que ha de permetre la iodació del TMET i la modulació de la seva hidrofobicitat, tal com s'ha descrit en els epígrafs 3.1 i 3.2.

Figura 3.9.
Esquema dels
ligands estudiats. El
ligand TMET,
hipotèticament format
per la condensació de
TMA i ETF



Establir quina és la preferència de coordinació del Cu(II) i Zn(II), (àcids de Lewis frontera segons Pearson) pel nitrogen (base frontera) i sofre (base tova) o bé els dos àtoms d'oxigen que tenen caràcter de base dura és una informació d'interès sobre el comportament del lligand. Cal notar que les bandes d'absorció al llarg de la seva valoració en presència de metalls seran degudes exclusivament al lligand i procediran de la seva naturalesa aromàtica. Malauradament, el Zn(II), d^{10} , no pot presentar bandes $d-d$ i el Cu(II), d^9 , les acostuma a presentar en el límit de la regió menys energètica (IR proper) de l'espectre UV-vis i en conseqüència són difícils d'observar en els espectrofotòmetres de rutina. Addicionalment, el coeficient d'extinció molar, ϵ ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$), de les bandes $d-d$ és massa petit, de l'ordre de 10, per detectar-les a concentracions a les quals s'observen les bandes de sistemes aromàtics, amb valors de ϵ superiors a 10^4 .

Per facilitar la interpretació de les valoracions del lligand TMET i també per poder esbrinar les bandes característiques de cada entorn de coordinació s'ha seguit la següent estratègia: s'han determinat les constants d'acidesa dels tres lligands TMA, ETF i TMET, així com les constants de formació dels complexos que formen amb Cu(II) i Zn(II). Les condicions experimentals s'han mantingut iguals en tots els experiments i el tractament de les dades s'ha fet amb el programa pHab2000.

3.3.1 El programa pHab2000

Les substàncies acolorides i les molècules orgàniques que contenen insaturacions o àtoms amb electrons no compartits són susceptibles d'interaccionar amb la radiació electromagnètica en la regió UV-vis (200-800 nm) i, en conseqüència, poden presentar un espectre d'absorció característic. D'entre les aplicacions quantitatives cal destacar la determinació de punts d'equivalència en valoracions, la definició del nombre i estequiometria de les espècies formades en solució i el càlcul de constants termodinàmiques d'equilibri (pK_a , $\log \beta$).

Des de l'aparició dels primers treballs realitzats per Sillén¹⁶⁵ (LETAGROP-SPEFO)¹⁶⁶ s'han publicat diferents programes per al càlcul de constants d'estabilitat a partir de dades espectrofotomètriques (APH,¹⁶⁷ SPECFIT,¹⁶⁸ SPECA,¹⁶⁹ pHab2000¹⁷⁰). En general aquests programes permeten el càlcul de constants d'equilibri a partir de dades absorbància-pH utilitzant l'ajustament numèric mitjançant mínims quadrats. L'avantatge que presenta el programa pHab2000 respecte els altres és la possibilitat de treballar en entorn MS Windows, la qual cosa permet la visualització dels resultats de forma gràfica i numèrica.

L'*input* d'entrada del programa consisteix en un fitxer en format ASCII elaborat a partir de les concentracions analítiques de tots els components del sistema, els espectres UV-vis i el valor de pH per a cada punt de la valoració. Prèviament, les dades espectrals s'han de transformar

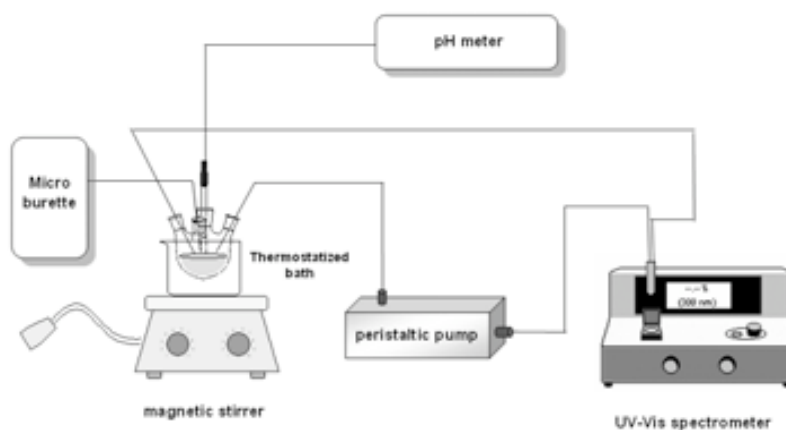
des d'un arxiu en format *.wav que subministra el software associat a l'espectrofotòmetre. Una vegada s'ha introduït aquesta informació cal dissenyar un model químic que inclogui els diferents equilibris que relacionen les possibles espècies presents en solució i les constants associades als mateixos. Aquestes dades són el punt de partida del programa el qual, mitjançant un mètode iteratiu, minimitza el càlcul de residuals entre els valors d'absorbància teòrica i experimental. Quan la suma quadràtica d'errors, $U = \sum (Abs_{calc} - Abs_{exp})^2$, convergeix cap al mínim absolut es considera que el sistema està ben definit en quant a l'estequiometria de les espècies i les constants d'equilibri. Depenent de la complexitat del sistema, pot ser molt convenient utilitzar mètodes gràfics abans de procedir al disseny del model teòric.

3.3.2 Determinació de les constants d'acidesa

L'equipament que ha permès dur a terme les valoracions àcid-base i l'enregistrament simultani dels espectres UV-vis es mostra a continuació:

Esquema 1.

Muntatge experimental



Un estudi preliminar de la concentració de treball ha permès establir que solucions de l'ordre de 10^{-4} M compleixen la llei de Beer. S'ha enregistrat l'espectre UV-vis i s'ha mesurat el valor de pH a cada punt de la valoració del lligand afegint NaOH com a agent valorant. L'addició s'ha dut a terme mitjançant una microbureta que permet treballar amb volums compresos entre 1 – 1000 ml. La metodologia experimental i les solucions *stock* emprades es detallen a la part experimental.

3.3.2.a Lligand 2-(metilito)anilina (TMA)

L'evolució espectral del lligand TMA a mesura que augmenta el pH es mostra a la Figura 3.10b. L'enregistrament dels espectres s'ha realitzat en el rang de longituds d'ona comprès entre 190 i 820 nm; l'estudi preliminar a diferents pH indica que l'interval 240 - 330 nm és el que aporta informació sobre l'equilibri àcid-base. L'espècie protonada present en solucions fortament àcides, pH 2, presenta un màxim d'absorció a 252 nm. A mesura que s'addiciona NaOH en el medi, aquesta banda disminueix significativament i s'observa un nou màxim d'absorció a 298 nm corresponent a l'espècie desprotonada. El desplaçament de la banda inicial dóna lloc a un punt isosbèstic a 280 nm.

La constant d'acidesa calculada mitjançant el programa pHab2000 a partir de 30 punts de la valoració (30 espectres UV-vis i valor corresponent de pH) té el valor $pK_a = 2.810$ (0.003). D'altra banda, la bona concordança entre l'absorbància experimental i l'absorbància teòrica a cada valor de pH per a qualsevol longitud d'ona dins l'interval 240 – 330 nm, permet comprovar que el model s'ha ajustat perfectament i que el valor de la constant d'acidesa ha estat ben refinat (Figura 3.10c). Com a resultat del càlcul de pK_a es pot obtenir el diagrama de distribució d'espècies mitjançant el programa Hyss,¹⁷¹ el qual mostra la regió de pH on predomina cada espècie. D'acord amb la Figura 3.10d es conclou que a pH fisiològic (7.4) el lligand TMA està exclusivament en forma bàsica. El coneixement de pK_a també permet obtenir l'espectre teòric de la solució de TMA a qualsevol valor de pH.

La comparació del valor, $pK_a = 3.57$, trobat en dades bibliogràfiques on determinaren la constant d'acidesa del mateix lligand per mètodes espectrofotomètrics en un medi aquós, força iònica 0.01M i temperatura 25°C, permet observar que la influència de les condicions experimentals en l'acidesa del lligand TMA no és menyspreable.¹⁷²

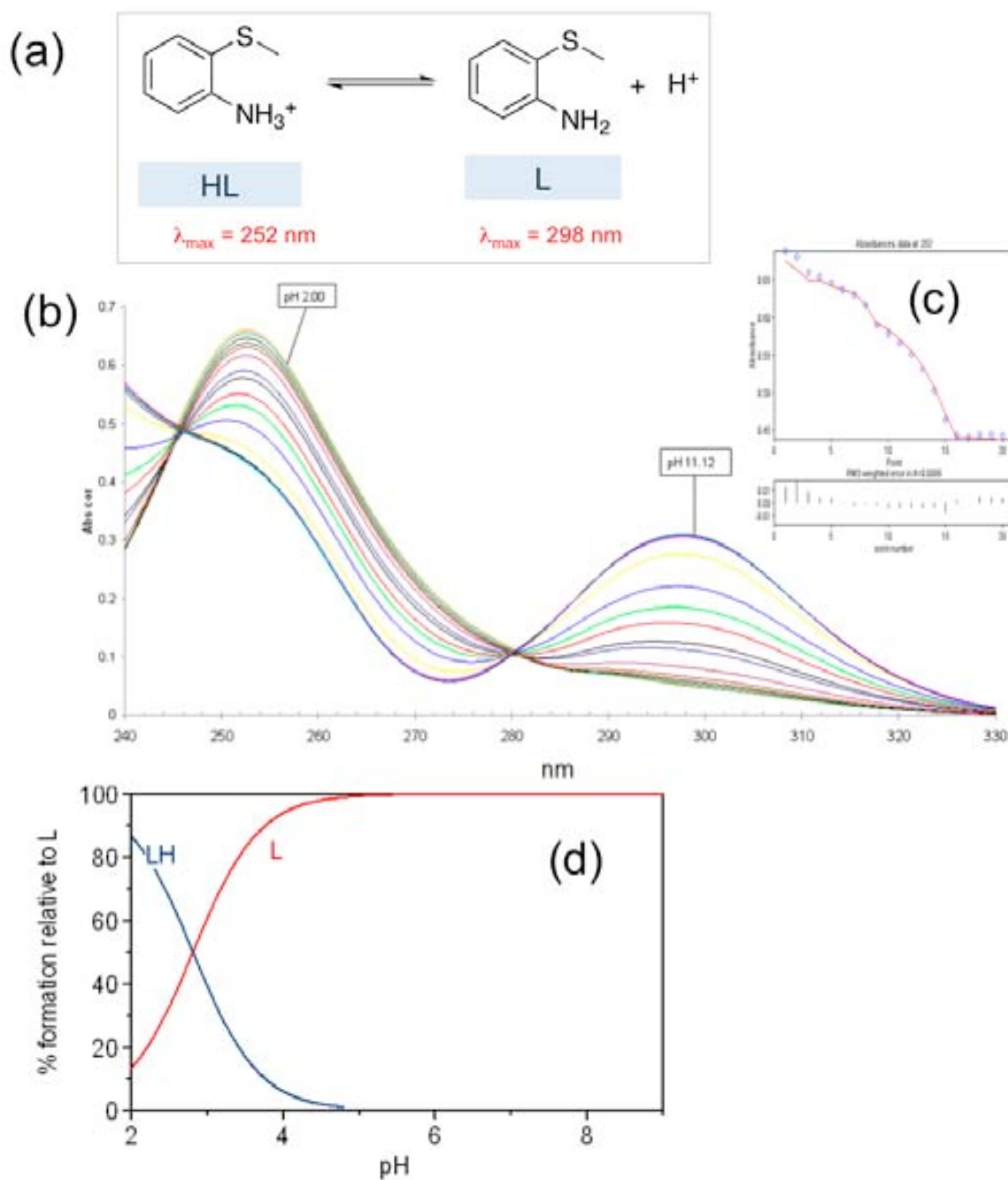


Figura 3.10. (a) Equilibri àcid-base del lligand TMA (b) Espectres UV-vis obtinguts al llarg de la valoració de TMA (c) Grau de concordança entre els valors d'absorbància experimental corregida (◇) i la corba teòrica (—) a $\lambda = 252$ nm (d) diagrama de distribució d'espècies del lligand TMA en funció del pH. (Absorbància corregida (Abs cor) indica que l'absorbància ha estat calculada tenint en compte el factor de dilució utilitzant l'expressió $A_{\text{cor}} = A_{\text{exp}}(V + v)/V$ on V és el volum original de la solució i v el volum de valorant addicionat)

3.3.2.b Lligand 2-(etoxi)fenol (ETF)

L'evolució espectral del lligand ETF a mesura que augmenta el pH, es mostra a la Figura 3.11b. L'enregistrament dels espectres s'ha realitzat en el rang de longituds d'ona de 190 a 820 nm, establint en aquest cas que l'interval de 230 a 320 nm és el que ens aporta informació sobre l'equilibri àcid-base. L'espècie protonada presenta un màxim d'absorció a 278 nm, el qual, a mesura que augmenta el pH del medi, dóna lloc a dues noves bandes d'absorció a 242 i 292 nm que indiquen la presència de l'espècie desprotonada.

El valor calculat mitjançant el programa pHab2000 a partir de 55 punts de la valoració $pK_a = 10.56$ (0.0024), permet comprovar (Figura 3.11c) el bon ajust entre les dades experimentals i teòriques i per tant que el valor de la constant d'acidesa ha estat ben refinat. El diagrama de distribució d'espècies (Figura 3.11d), permet concloure que a pH fisiològic (7.4) el lligand ETF està essencialment en forma àcida.

La comparació la constant d'acidesa obtinguda amb dades bibliogràfiques ($pK_a = 9.89$)¹⁷² on es determinà per mètodes espectrofotomètrics, força iònica 0.04 M i temperatura 35°C, indica que les condicions experimentals emprades influeixen en l'acidesa del lligand ETF.

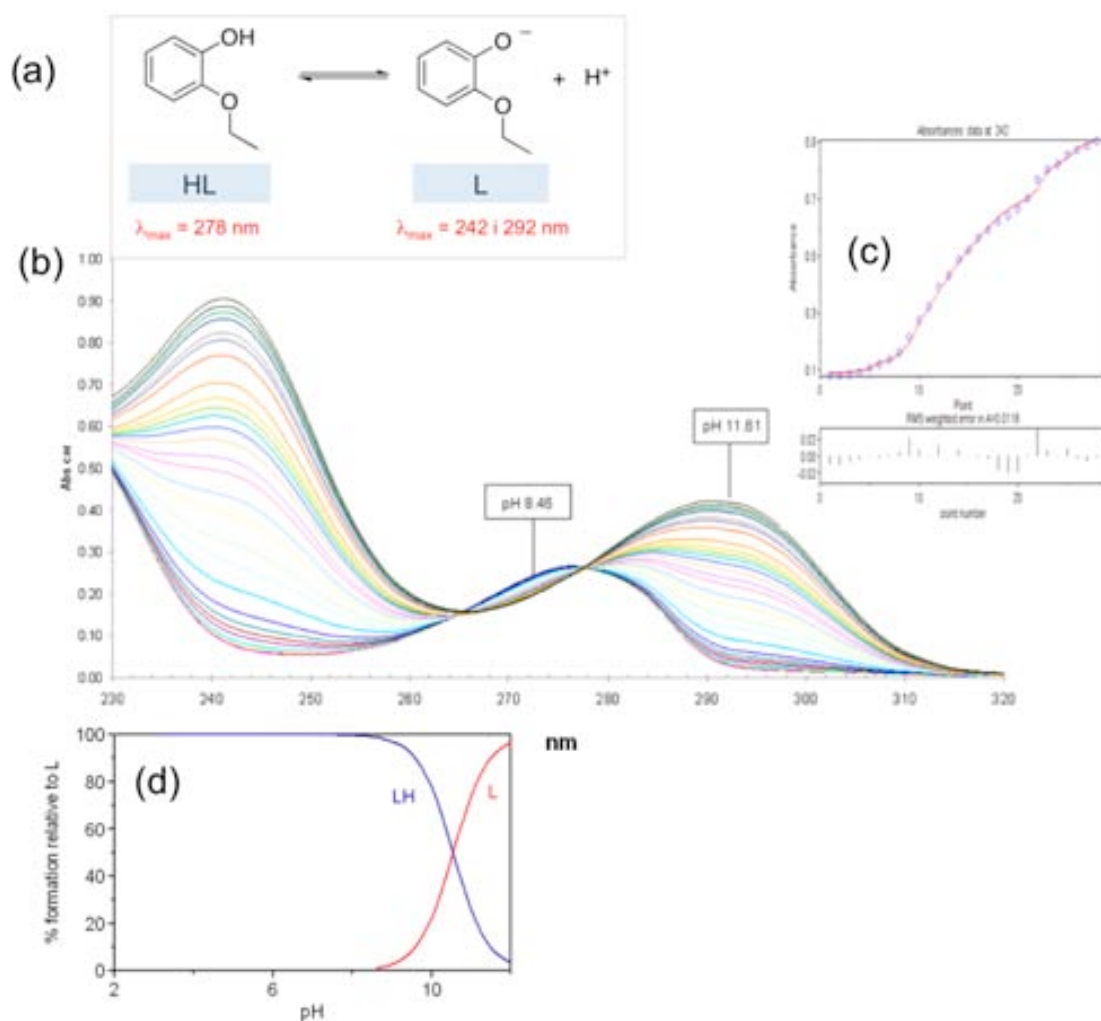


Figura 3.11. (a) Equilibri àcid-base del lligand ETF (b) Espectres UV-vis obtinguts al llarg de la valoració de ETF (c) Grau de concordança entre els valors d'absorbància experimental corregida (◇) i la corba teòrica (—) a $\lambda=242 \text{ nm}$ (d) diagrama de distribució d'espècies del lligand ETF en funció del pH.

3.3.2.c Lligand N-[(3-etoxi-4-hidroxi)benzil]-2-metiltioaniina (TMET)

L'evolució espectral del lligand TMET a l'augmentar el pH es mostra a la Figura 3.12b. L'enregistrament dels espectres s'ha fet en el rang de $\lambda = 190 - 820$ nm, un estudi posterior d'aquests espectres indica que l'interval 220 – 330 nm és el que aporta major informació sobre els equilibris àcid-base. L'espècie diprotonada, present en solucions fortament àcides, pH 2, presenta un espectre poc resolt amb dues bandes amples, els màxims de les quals corresponen a 280 i 232 nm. En l'interval de pH 2.0 – 9.0 l'espectre es modifica molt lleugerament, augmentant la intensitat de l'absorció al voltant de 300 nm i desplaçant-se el màxim de 280 a 284 nm. A partir de pH 9 l'evolució de l'espectre es pot interpretar segons: a) la banda a 232 nm es transforma en una de nova a 250 nm, b) simultàniament, la banda a 284 nm es transforma en una altra a 300 nm. Aquesta interpretació de l'evolució espectral al llarg de la valoració de TMET es posa de manifest al comparar els espectres teòrics de les espècies H_2L , HL i L (Figura 3.12e). Aquests s'obtenen a partir del programa pHab2000, un cop calculades les constants d'acidesa.

En conjunt, si bé els espectres enregistrats permeten un bon càlcul de les constants d'acidesa del lligand TMET, cal notar que les característiques espectrals de les espècies H_2L i HL són força properes. Atès que a pH fisiològic, el lligand TMET està en forma monoprotionada HL, i que les constants d'acidesa de TMA i ETF són 2.81 i 10.56 respectivament, és raonable que l'espectre de TMET en la forma HL sigui la suma dels espectres corresponents al lligand TMA desprotonat i ETF protonat. Amb la finalitat de corroborar aquesta hipòtesi, s'han superposat els espectres dels lligands TMET, ETF i TMA a pH 7.4 tal com mostra la Figura 3.13. D'acord amb aquesta figura, l'espectre de TMET es pot explicar considerant que la banda a 230 nm prové essencialment del fragment ETF protonat i que la banda a 282 nm té contribucions dels dos fragments, de ETF protonat (278 nm) i de TMA desprotonat (298 nm). En altres paraules, la forma desprotonada del fragment TMA no es pot identificar directament en l'espectre de TMET a pH = 7.4.

Els valors trobats mitjançant el programa pHab2000 són: $pK_{a1} = 2.84$ (0.005) i $pK_{a2} = 10.67$ (0.013). La bona concordança entre els valors experimentals i calculats de l'absorbància es mostra a la Figura 3.12c, i la distribució d'espècies en funció del pH a la Figura 3.12d.

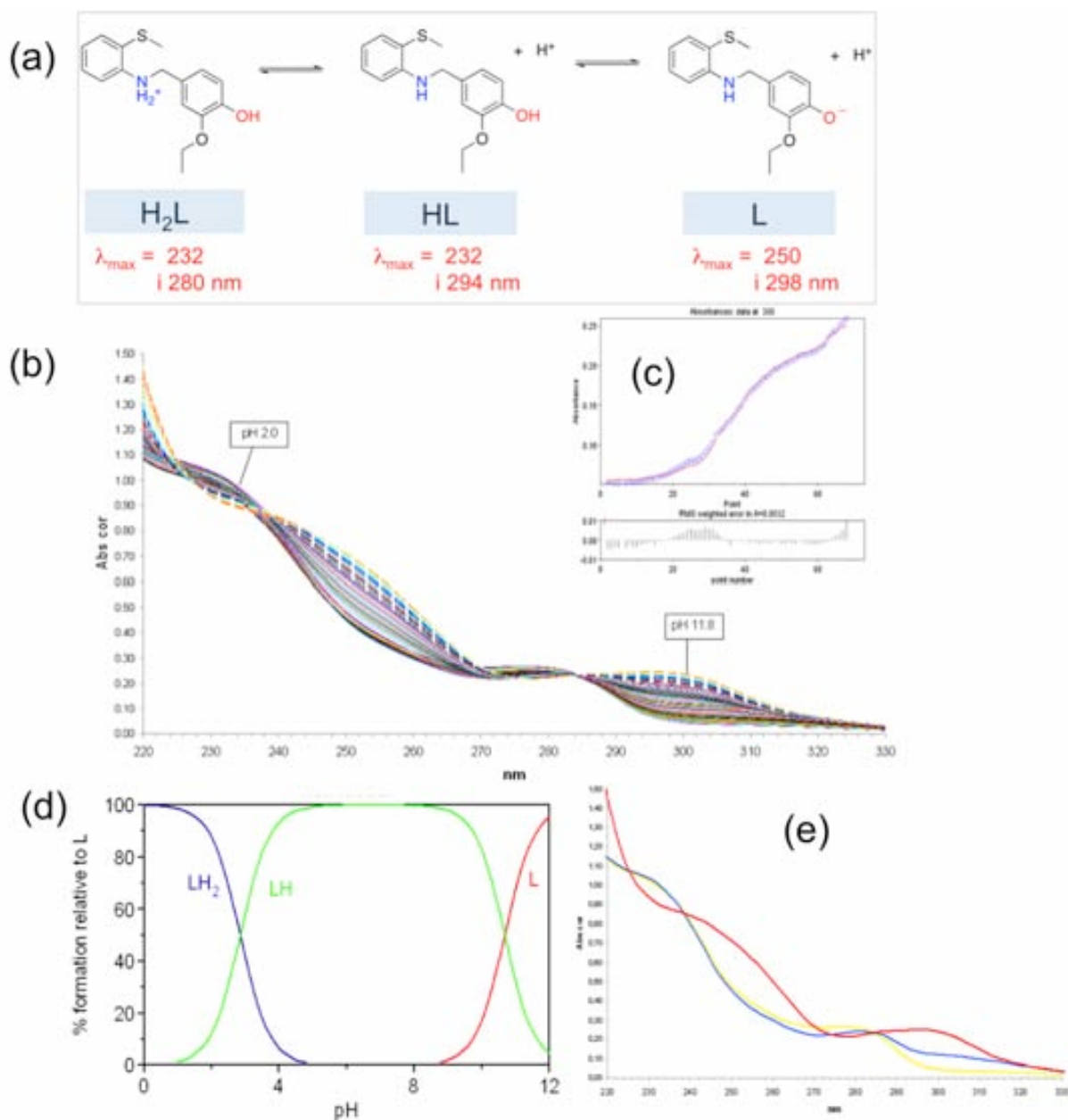


Figura 3.12. (a) Equilibri àcid-base del lligand TMET (b) Espectres UV-vis obtinguts experimentalment (c) Grau de concordança entre els valors d'absorbància experimental corregida ($\diamond$) i la corba teòrica (—) a $\lambda=298 \text{ nm}$ (d) diagrama de distribució d'espècies del lligand TMET en funció del pH (e) Espectres UV-vis teòrics de les espècies H_2L (—), HL (—) i L (—)

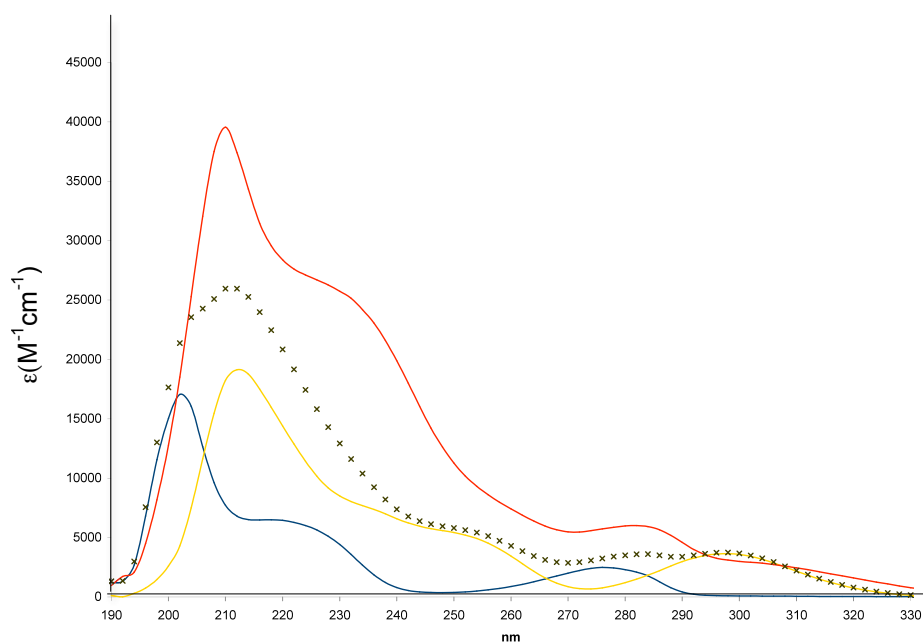


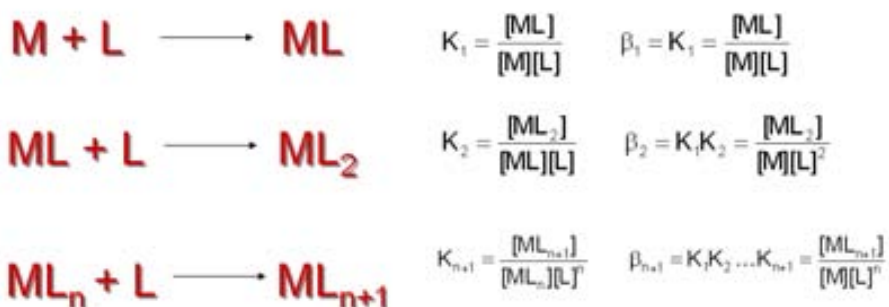
Figura 3.13. Superposició dels espectres TMET (—), ETF (—), TMA (—), i suma ETF + TMA (x)

3.3.3 Determinació de les constants de formació dels complexos dels lligands TMA, ETF i TMET amb Cu(II) i Zn(II)

Per dur a terme la determinació de l'estequiometria de les espècies complexes presents en solució i les constants de formació corresponents s'han mantingut les mateixes condicions experimentals que les emprades en la valoració àcid-base dels lligands i s'ha utilitzat el mateix equipament.

Per a cada sistema L-M (on L representa les formes desprotonades dels lligands TMA, ETF i TMET; i M els ions metàl·lics Zn(II) i Cu(II)), el procediment experimental ha consistit en valorar, mitjançant l'addició de NaOH, una solució que conté L i M en una determinada relació de concentracions que es manté fixa durant tot l'experiment. A cada punt de la valoració es mesura el valor de pH i s'enregistra l'espectre UV-vis.

Els equilibris que poden tenir lloc en solució durant la formació de complexos metàl·lics i les constants associades als mateixos es mostren a continuació:



El càlcul de les constants de formació, que hem dut a terme, esdevé més complex que el càlcul de les constants d'acidesa que s'han determinat en l'epígraf 3.3.2. Això és degut al major nombre d'espècies que poden existir en el medi pel fet que M hi és present, la qual cosa provoca que el disseny del model que cal realitzar previ al càlcul de constants no sigui una tasca tan simple i evident com en el cas de la determinació dels pKas, on únicament existeixen les espècies associades al canvi de pH del L en qüestió. És per això que per assolir uns valors de $\log \beta$ ben refinats és necessari dissenyar un model químic el més proper possible al que té lloc en solució. Per tal de conèixer el sistema de treball i simplificar el càlcul de les constants de formació, cal controlar les condicions experimentals. Així doncs per a cada sistema lligand-metall, sembla raonable partir de la hipòtesi de que les espècies ML i ML_2 han de ser presents a les solucions que es formen al barrejar L i M. A fi d'afavorir el predomini d'una de les espècies, ML o ML_2 , i poder calcular el corresponent valor de $\log \beta_1$ o $\log \beta_2$ s'han dut a terme dues famílies de valoracions. En la primera solució valorada es manté una relació $[L]/[M] = 0.5$, condició que implica "excés de metall" i per tant afavoreix la formació del complex ML (valoració 1). En la segona, la relació $[L]/[M] = 2$, implica un "excés de lligand" i afavoreix la presència de ML_2 (valoració 2). D'aquesta manera, la introducció de les dades espectrals de cada valoració per separat en el programa pHab2000 simplifica el disseny del model químic i en darrer terme, permet una millor estimació de $\log \beta_1$ o $\log \beta_2$. Cal esmentar que depenent dels valors K_1 i K_2 treballar amb un excés de lligand (valoració 2) pot provocar la coexistència de les espècies ML i ML_2 .

Moltes vegades és recomanable utilitzar mètodes gràfics abans d'introduir les dades al programa de càlcul. Per a tal fi es comparen els espectres obtinguts en les valoracions 1 i 2 anteriorment esmentades amb els espectres corresponents a la valoració àcid-base del lligand en qüestió. La representació de l'absorbància - a la λ que presenti un canvi atribuïble a la presència de metall en el medi - envers el pH, indica el rang de pH en el qual es forma el complex. Els espectres corresponents a aquest interval són cabdals en el tractament numèric.

L'*input* d'entrada en el programa consisteix en un fitxer en format ASCII elaborat a partir de les concentracions analítiques de L i M, els espectres UV-vis i els valors de pH a cada punt de la valoració. Una vegada introduïda aquesta informació cal: 1) dissenyar un model químic que inclogui els diferents equilibris que relacionen les possibles espècies presents en solució i les constants associades als mateixos, 2) Facilitar al programa informació prèvia del sistema, com són les dades trobades a partir de la valoració àcid-base del lligand (pK_a , ϵ_{HL} , ϵ_L) (epígraf 3.3.2); 3) escollir l'interval de λ que aporta informació sobre l'equilibri de complexació; i 4) conèixer les constants d'hidròlisi dels metalls que existeixen en el medi.^{173,174} Cal tenir en compte que abans de procedir a la introducció de les dades espectrals en el programa pHab2000, és molt important excloure tots aquells espectres que evidencïin la presència de sòlid en el medi el qual es manifesta per l'augment de línia base dels mateixos d'una manera constant.

Una vegada el càlcul de les constants ha tingut lloc, és necessari avaluar els resultats per determinar si són acceptables. El primer criteri consisteix en observar el valor de s que indica la concordança entre l'absorbància experimental i l'absorbància teòrica. Si aquest valor és $s \leq 0.005$ es pot considerar que el refinament s'ha realitzat amb èxit. D'altra banda, la discrepància dels coeficients d'extinció molar obtinguts experimentalment (ϵ_{exp}) amb els que el programa calcula (ϵ_{calc}) per a les espècies proposades, o bé l'observació de valors de $\epsilon_{\text{calc}} < 0$, és indicatiu de que cal tornar a refer el model.

Com es pot comprovar a la Figura 3.14 la determinació de les constants de formació consisteix en un mètode assaig-error fins a trobar el model òptim que s'ajusti bé a les dades experimentals obtingudes. Quan això es compleix, s'obté un bon refinament de la constant d'estabilitat i es determina l'estequiometria de les espècies existents.

Finalment, en base a les constants obtingudes per a cada sistema lligand-metall, el programa Hyss permet obtenir el diagrama de distribució d'espècies que mostra la regió de pH on predomina cada espècie present en el medi. Donat que aquest treball de recerca té com a fi una aplicació dins un medi fisiològic, els diagrames de distribució es mostren fins a pH 8 atès que el pH d'interès en el nostre cas és 7.4.

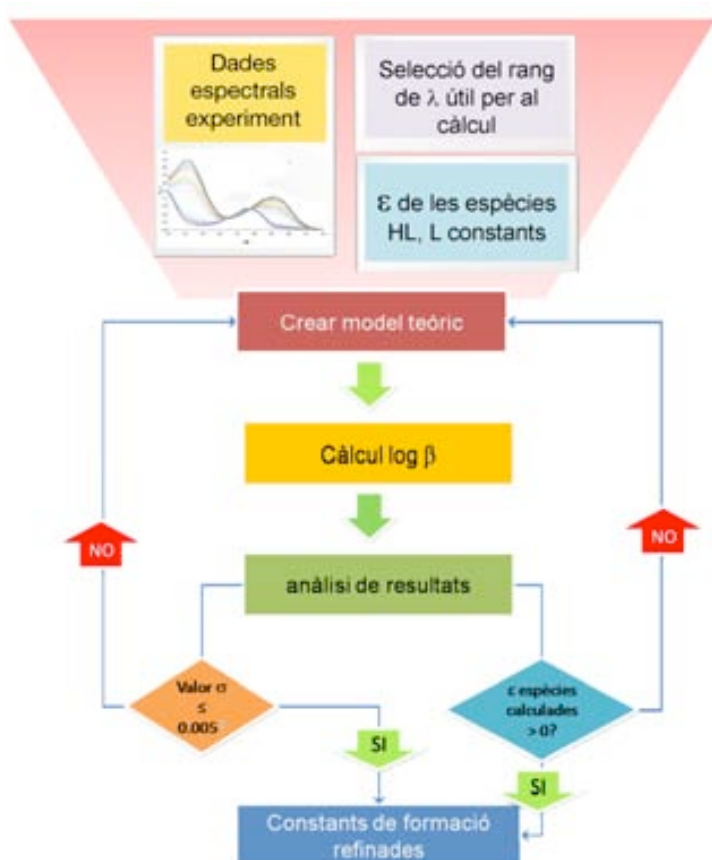


Figura 3.14. Esquema del funcionament del programa pHab2000 per a la determinació de constants de formació

A continuació, per a cada sistema lligand-metall estudiat es mostra: (1) els espectres teòrics per a les espècies trobades en solució HL, L, ML i ML_2 , (2) el valor de les constants de formació $\log \beta_1$ i $\log \beta_2$ calculades i (3) El diagrama de distribució d'espècies per a la valoració 1 i 2 realitzades en cada sistema, és a dir, en presència d'excés de metall i excés de lligand, respectivament.

És necessari que previ a la determinació de les constants de formació d'aquests lligands amb els ions metàl·lics Cu(II) i Zn(II) s'estudiï la possible influència del temps en la formació dels complexos així com la seva estabilitat en solució. En tots els casos, s'ha comprovat que es formen instantàniament i són estables durant més d'una hora.

Per motius de claredat i espai, les evolucions espectrals obtingudes en cada sistema es poden trobar a l'Annex d'aquest treball.

3.3.3.a Lligand TMA vs Cu(II)

Les evolucions espectrals de les valoracions del sistema TMA-Cu(II) amb NaOH 0.5017 M es donen a l'Annex (Figura A.1a i A.1b). El tractament numèric de les valoracions 1 i 2 del sistema TMA-Cu(II) permet obtenir els espectres teòrics de les espècies CuL i CuL_2 (Figura 3.15a). Aquests mostren un eixamplament de la banda situada a 298 nm.

Les constants de formació calculades per als complexos CuL i CuL_2 són $\log \beta_1 = 4.01$ (0.02) i $\log \beta_2 = 9.71$ (0.04). El diagrama de distribució d'espècies per a la valoració 1 (Figura 3.15b) indica que en el rang de pH de 3.5 a 6.5, l'espècie CuL està present en una abundància del 55% mentre que el lligand lliure es troba en un 40%. La coexistència del complex amb lligand lliure indica que la constant de formació és petita i per tant, la tendència d'aquest lligand a complexar Cu(II) és poc favorable. Cal notar que la formació d'hidroxocomplexos de Cu(II) a partir de pH 6.5 provoca l'alliberament de lligand lliure al medi. En aquest cas, la valoració 2 dona lloc a l'espècie CuL_2 en un 70% dins l'interval de pH de 3.5 a 7.4 (Figura 3.15c).

Tal com calia esperar, la presència de metalls en la valoració àcid-base dels lligands causa l'augment de l'acidesa dels grups funcionals que es coordinen al centre metàl·lic. Així s'observa en el diagrama de distribució d'espècies que el pKa aparent en presència de Cu(II) és 2.1 aproximadament (Figura 3.15c).

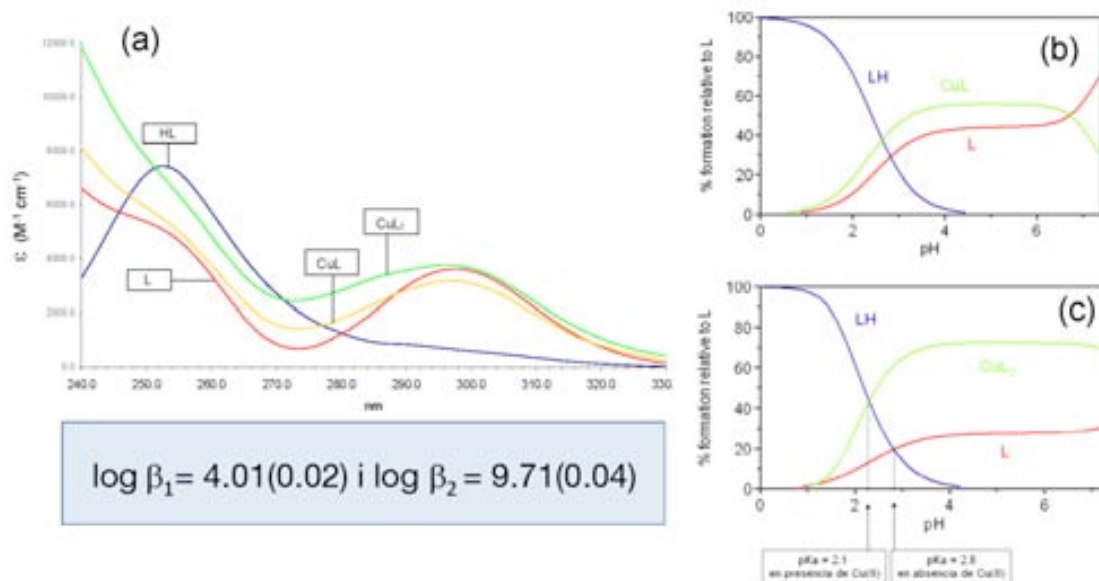


Figura 3.15. (a) Espectres teòrics UV-vis de les espècies HL, L, CuL i CuL₂ (b i c) Diagrama de distribució d'espècies per al sistema TMA-Cu (b) *Valoració 1. Excés de metall*. Concentracions analítiques inicials són [TMA] = $1.03 \cdot 10^{-4}$ M i [Cu(II)] = $1.92 \cdot 10^{-4}$ M (c) *Valoració 2. Excés de lligand*. [TMA] = $1.03 \cdot 10^{-4}$ M i [Cu(II)] = $4.80 \cdot 10^{-5}$ M.

3.3.3.b Lligand TMA vs Zn(II)

Les evolucions espectrals de les valoracions del sistema TMA-Zn(II) amb NaOH 0.5017 M es donen a l'Annex (Figura A.2a i A.2b).

El tractament numèric de les valoracions 1 i 2 del sistema TMA-Zn(II) permet obtenir els espectres teòrics de les espècies ZnL i ZnL₂ (Figura 3.16a). Aquests mostren un eixamplament de la banda situada a 298 nm. Les constants de formació trobades per als complexos ZnL i ZnL₂ són $\log \beta_1 = 3.81 (0.04)$ i $\log \beta_2 = 9.84 (0.09)$. Les característiques del sistema TMA-Zn(II) són anàlogues a les trobades per al sistema TMA-Cu(II). En cap cas es dona la coexistència de les espècies ML i ML₂ en solució (Figura 3.16b i 3.16c).

El lligand més proper del qual es disposen dades bibliogràfiques és la tioanilina. En presència de Zn(II), els valors $\log \beta_1$ i $\log \beta_2$, determinats per mètodes potenciomètrics en un medi 50% dioxà i a 25°C són 7.33 i 14.1, respectivament.¹⁷⁵ Cal notar que el tiol té major capacitat coordinant que el tioèter, i en conseqüència és raonable que els valors trobats en aquest treball de recerca siguin menors.

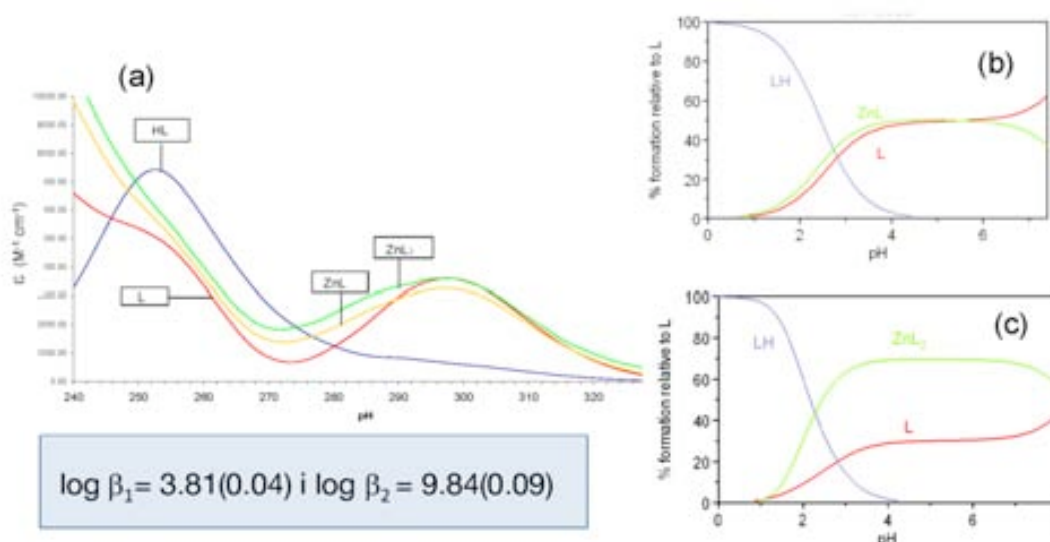


Figura 3.16. (a) Espectres teòrics UV-vis de les espècies HL, L, ZnL i ZnL₂ (b i c) Diagrama de distribució d'espècies per al sistema TMA-Zn (b) *Valoració 1. Excés de metall.* Concentracions analítiques inicials són [TMA] = $1.03 \cdot 10^{-4}$ M i [Zn(II)] = $1.68 \cdot 10^{-4}$ M (c) *Valoració 2. Excés de lligand.* [TMA] = $1.03 \cdot 10^{-4}$ M i [Zn(II)] = $4.80 \cdot 10^{-5}$ M.

3.3.3.c Lligand ETF vs Cu(II)

Les evolucions espectrals de les valoracions del sistema ETF-Cu(II) amb NaOH 0.5017 M es donen a l'Annex (Figura A.3a i A.3b).

El tractament numèric de les valoracions 1 i 2 del sistema ETF-Cu(II) permet obtenir els espectres teòrics de les espècies CuL i CuL₂ (Figura 3.17a). S'observa que la formació del complex CuL provoca que la banda amb màxim a 278 nm s'eixampli i augmenti d'intensitat. En canvi, el complex CuL₂ presenta un espectre molt més proper a l'espectre del lligand ETF desprotonat.

Les constants de formació calculades per als complexos CuL i CuL₂ són $\log \beta_1 = 7.89 (0.05)$ i $\log \beta_2 = 16.38 (0.08)$. Els diagrames de distribució d'espècies mostren que a partir del pH fisiològic, 7.4, en totes dues valoracions predomina l'espècie complexa en un 95% (Figura 3.17a i 3.17b).

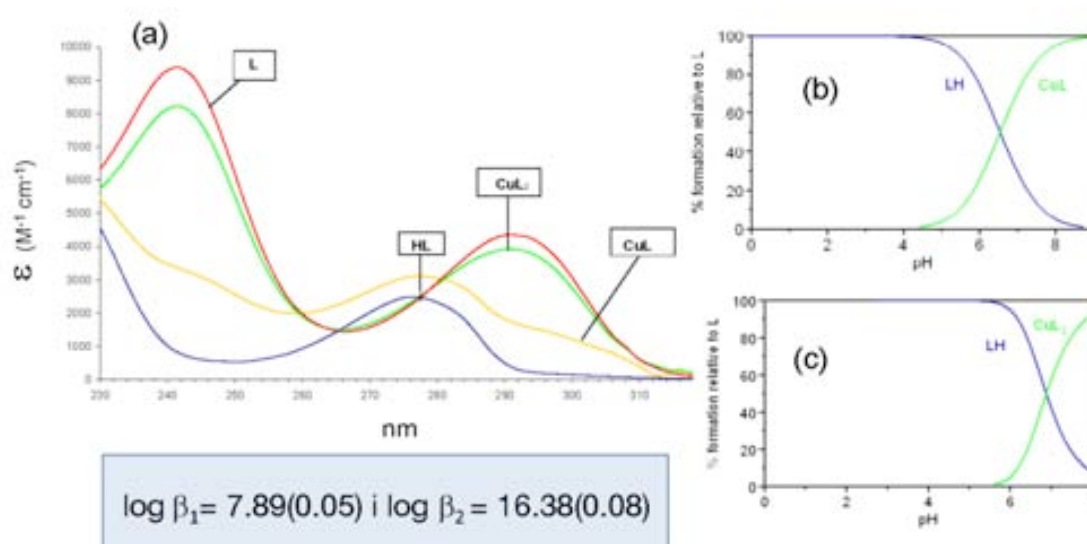


Figura 3.17. (a) Espectres teòrics UV-vis de les espècies HL, L, CuL i CuL₂ (b i c) Diagrama de distribució d'espècies per al sistema ETF-Cu (b) *Valoració 1. Excés de metall.* Concentracions analítiques inicials són [ETF] = $1.07 \cdot 10^{-4}$ M i [Cu(II)] = $1.92 \cdot 10^{-4}$ M (c) *Valoració 2. Excés de lligand.* [ETF] = $1.07 \cdot 10^{-4}$ M i [Cu(II)] = $4.80 \cdot 10^{-5}$ M.

3.3.3.d Lligand ETF vs Zn(II)

Les evolucions espectrals de les valoracions del sistema ETF-Zn(II) amb NaOH 0.5017 M es donen a l'Annex (Figura A.4a i A.4b).

El tractament numèric de les valoracions 1 i 2 del sistema ETF-Zn(II) permet obtenir els espectres teòrics de les espècies ZnL i ZnL₂ (Figura 3.18a). S'observa que la formació del complex ZnL provoca que la banda amb màxim a 278 nm s'eixampli. En canvi, el complex ZnL₂ presenta un espectre molt més proper a l'espectre del lligand ETF desprotonat.

Les constants de formació calculades per als complexos ZnL i ZnL₂ són $\log \beta_1 = 8.94 (0.13)$ i $\log \beta_2 = 16.47 (0.05)$. El diagrama de distribució d'espècies per a la valoració 1 (Figura 3.18b) indica que en el rang de pH de 6 a 9, el complex ZnL està present en una abundància del 80% mentre que l'espècie ZnL₂ hi és en un 20%. D'altra banda, la valoració 2 dóna lloc majoritàriament al complex ZnL₂. A pH fisiològic, aquest es troba en un 60% mentre que el complex ZnL i el lligand lliure en el medi hi són presents en un 10 i un 30% respectivament (Figura 3.18c).

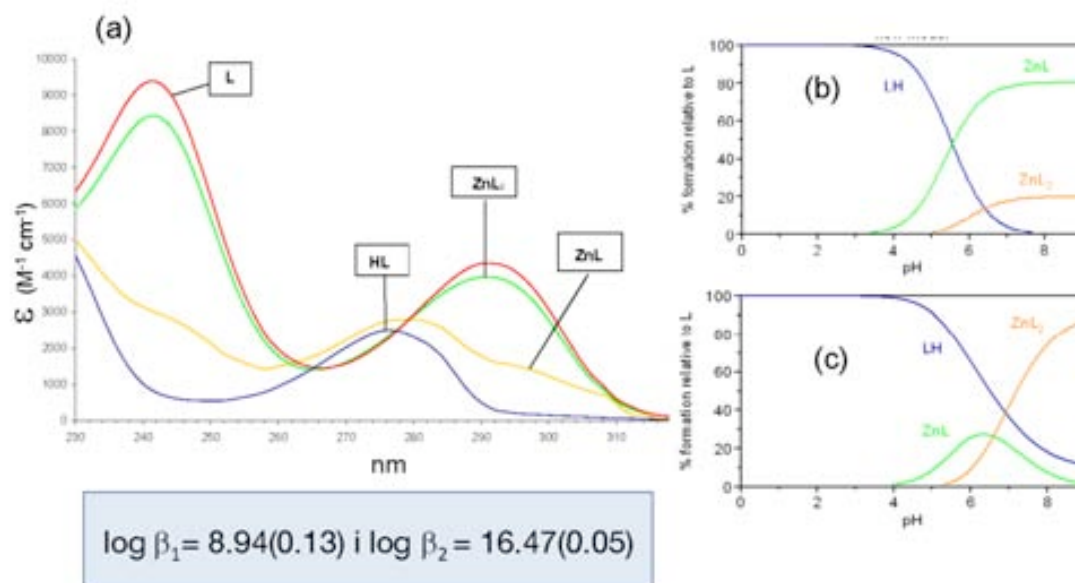


Figura 3.18. (a) Espectres teòrics UV-vis de les espècies HL, L, ZnL i ZnL₂ (b i c) Diagrama de distribució d'espècies per al sistema ETF-Zn (b) *Valoració 1. Excés de metall.* Concentracions analítiques inicials són [ETF] = 1.07·10⁻⁴ M i [Zn(II)] = 1.68·10⁻⁴ M (c) *Valoració 2. Excés de lligand.* [ETF] = 1.07·10⁻⁴ M i [Zn(II)] = 4.80·10⁻⁵ M.

La comparació dels resultats obtinguts amb les dades bibliogràfiques més properes s'indiquen a la següent taula:

Taula 3.4. Comparació dels resultats obtinguts experimentalment amb les dades bibliogràfiques trobades més properes

Lligand	Cu(II)		Zn(II)		Condicions experimentals	Referència bibliogràfica
	log β_1	log β_2	log β_1	log β_2		
ETF	7.89	16.38	8.95	16.91	40% EtOH, 37°C, 0.1M NaClO ₄	Aquest treball
pirocatecol*	7.85	16.87	-	-	50% MeOH, 25°C, 0.1M KNO ₃	176
	8.18	16.96	-	-	H ₂ O, 20°C, 0.1M NaClO ₄	176
			9.15	16.4	H ₂ O, 25°C, 0.1M KNO ₃	177

*pirocatecol = 2-hidroxifenol

3.3.3.e Lligand TMET vs Cu(II)

Les evolucions espectrals de les valoracions del sistema TMET-Cu(II) amb NaOH 0.5017 M es donen a l'Annex (Figura A.5a i A.5b). El tractament numèric de les valoracions 1 i 2 del sistema TMET-Cu(II) permet obtenir els espectres teòrics de les espècies CuL i CuL₂ (Figura 3.19a). Si es compara l'evolució espectral obtinguda per a la valoració àcid-base del lligand amb les observades per a la valoració 1 i 2, s'observa que la formació d'ambdós complexos, CuL i CuL₂, intensifica les bandes situades a 250 i 300 nm.

Les constants de formació calculades per als complexos CuL i CuL₂ són $\log \beta_1 = 8.93 (0.03)$ i $\log \beta_2 = 15.21 (0.09)$.

Els diagrames de distribució d'espècies ens permeten observar que a pH 7.4, en la valoració 1 el complex CuL és present en un 100% (Figura 3.19b), en canvi, en la valoració 2 el mateix complex es troba en un 40% i pràcticament no existeix complex CuL₂. (Figura 3.19c)

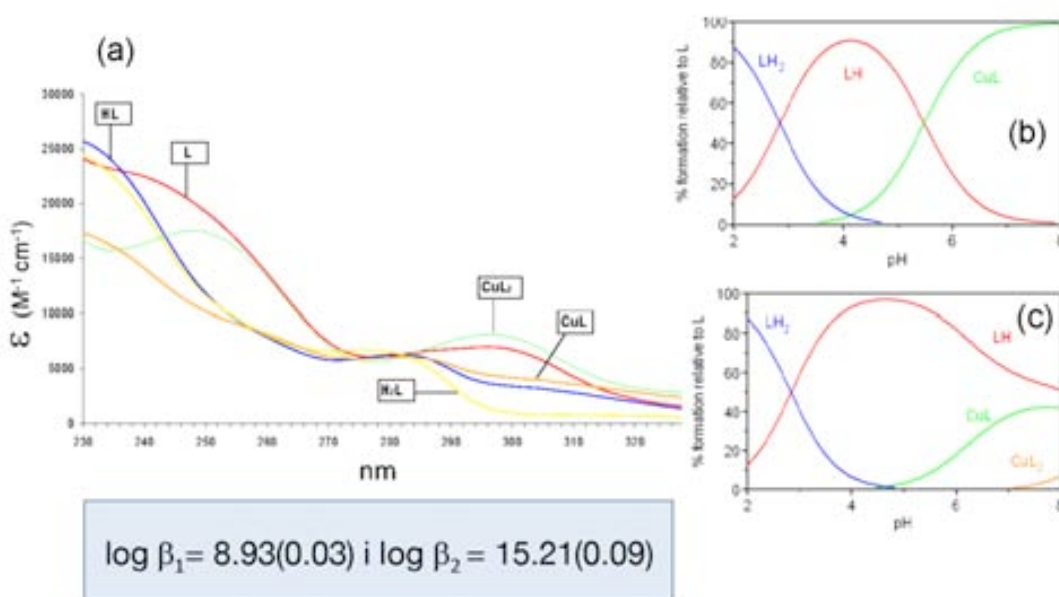


Figura 3.19. (a) Espectres teòrics UV-vis de les espècies HL, L, CuL i CuL₂ (b i c) Diagrama de distribució d'espècies per al sistema TMET-Cu (b) *Valoració 1. Excés de metall.* Concentracions analítiques inicials són [TMET] = $4.15 \cdot 10^{-5}$ M i [Cu(II)] = $1.92 \cdot 10^{-4}$ M (c) *Valoració 2. Excés de lligand.* [TMET] = $4.15 \cdot 10^{-5}$ M i [Cu(II)] = $4.80 \cdot 10^{-5}$ M.

3.3.3.f Lligand TMET vs Zn(II)

Les evolucions espectrals obtingudes al llarg de l'addició de NaOH als sistemes Zn-TMET (valoració 1 i valoració 2) es poden trobar a les Figures A.6a i A.6b de l'Annex.

El tractament numèric de les valoracions 1 i 2 del sistema TMET-Zn(II) permet obtenir els espectres teòrics de les espècies ZnL i ZnL_2 (Figura 3.20a). Si es compara l'evolució espectral obtinguda per a la valoració àcid-base del lligand amb les observades per a la valoració 1 i 2, s'observa que la formació d'ambdós complexos, ZnL i ZnL_2 , intensifica les bandes situades a 250 i 300 nm. Les constants de formació calculades per als complexos ZnL i ZnL_2 són $\log \beta_1 = 8.52 (0.03)$ i $\log \beta_2 = 14.12 (0.09)$.

Els diagrames de distribució d'espècies evidencien que a pH 7.4, en la primera valoració predomina el complex ZnL , en canvi per a la valoració 2, s'observa el complex ZnL en un 40% i pràcticament no existeix complex ZnL_2 . (Figura 3.20b i 3.20c).

El conjunt de resultats obtinguts es mostren a la Taula 3.5 en la qual es pot observar que els valors de pKa obtinguts per als fragments ETF i TMA mostren que aquest últim presenta major acidesa ($\text{pKa}(\text{TMA}) < \text{pKa}(\text{ETF})$). S'obté una bona concordança entre els valors de pKa del lligand TMET amb els dels fragments TMA i ETF.

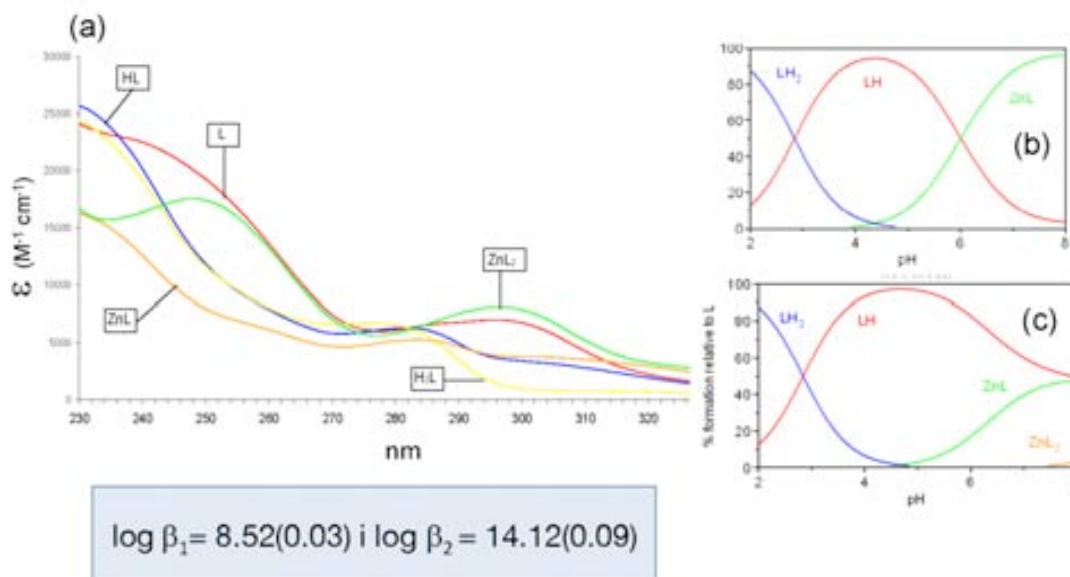


Figura 3.20. (a) Espectres teòrics UV-vis de les espècies HL, L, ZnL i ZnL_2 (b i c) Diagrama de distribució d'espècies per al sistema TMET-Zn (b) *Valoració 1. Excés de metall.* Concentracions analítiques inicials són $[\text{TMET}] = 8.32 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ i $[\text{Zn(II)}] = 1.68 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (c) *Valoració 2. Excés de lligand.* $[\text{TMET}] = 8.32 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ i $[\text{Zn(II)}] = 4.80 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Les constants de formació obtingudes ($\log \beta$) anticipen que la coordinació del lligand TMET procedirà de manera diferent al que s'havia previst, és a dir que l'entorn de coordinació provinent de la TMA fos responsable de la coordinació al Cu(II) i Zn(II) i en canvi, el fragment provinent del ETF, modulés la hidrofobicitat de la molècula i permetés la iodació. Les dades experimentals de $\log \beta_1$ i $\log \beta_2$ per $M = \text{Cu(II)}$ i Zn(II) amb TMET corroboren que en els complexos ML i ML_2 la coordinació té lloc a través del fragment provinent de l'ETF. Cal notar que les constants de formació corresponents al complex ML_2 per $M = \text{Cu(II)}$, Zn(II) són lleugerament menors per al lligand TMET en comparació amb el ETF, el que pot ser atribuïble al major impediment estèric del primer lligand. És per això que per al lligand TMET, a pH fisiològic, el complex majoritari és ML per $M = \text{Cu(II)}$, Zn(II) tal com mostren els diagrames de distribució d'espècies (Figura 3.19 i Figura 3.20).

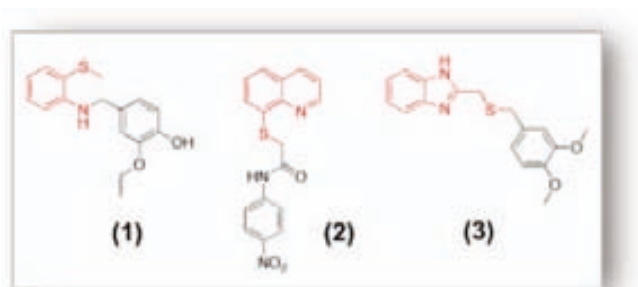
Taula 3.5. Constants d'acidesa dels lligands TMA, ETF i TMET i constants de formació dels seus complexos amb Cu(II) i Zn(II) a les mateixes condicions experimentals (NaClO_4 0.1M, 37°C , etanol:aigua (40:60))

Lligand		$\text{pK}_{\text{a}1}$	$\text{pK}_{\text{a}2}$	$\log \beta_1$	$\log \beta_2$
TMA	H^+	2.810(3)			
	Cu(II)			4.01(2)	9.71(4)
	Zn(II)			3.81(4)	9.84(9)
ETF	H^+	10.560(2)			
	Cu(II)			7.89(5)	16.38(8)
	Zn(II)			8.940(13)	16.47(5)
TMET	H^+	2.840(5)	10.62(1)		
	Cu(II)			8.93(3)	15.21(9)
	Zn(II)			8.52(3)	14.12(9)

3.4. Conclusions

Els nostres primers intents de trobar agents quelants adequats per als metalls Cu(II) i Zn(II) amb potencial aplicació en la diagnosi i/o teràpia de la MA, ens han portat a plantejar una estratègia inspirada en els procediments que avui utilitza la indústria farmacèutica. Per assolir aquest objectiu, ha estat necessari posar a punt unes eines quimiinformàtiques que ens han permès treballar amb un gran volum de bases de dades comercials i posteriorment, realitzar un cribatge virtual per a seleccionar els millors candidats en base a la seva posterior aplicació *in vivo*. El desenvolupament d'aquesta primera part del treball, ha comportat els següents passos:

1. Dissenyar 3 esquelets bàsics en base a la química de coordinació i la química bioinorgànica dels ions metàl·lics Cu(II) i Zn(II). Aquests esquelets s'han basat principalment en àtoms donadors N i S (tioèter) i s'han inspirat en els residus aminoacídics que es troben més freqüentment en les metalloproteïnes responsables d'enllaçar a aquests ions metàl·lics.
2. Aquests esquelets s'han cercat en diferents bases de dades comercials mitjançant el programa ChemTK i han permès generar 3 quimioteques virtuals. El cribatge virtual i la posterior selecció dels millors candidats, s'ha dut a terme en base a la capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica (log BB) i la seva susceptibilitat de ser iodats, arribant-se a les molècules **1**, **2** i **3**.



3. Dels tres lligands establerts com a òptims, l'estudi espectrofotomètric per a determinar les constants d'acidesa i la capacitat coordinant envers Cu(II) i Zn(II) s'ha realitzat amb el lligand **1**, N-[(3-etoxi-4-hidroxi)benzil]-2-metiltioanilina (TMET). Les condicions experimentals s'han mantingut constants i properes a les condicions fisiològiques (pH = 7.4, T = 37°C i I = 0.1 M NaClO₄) i les dades espectrals s'han tractat amb el programa pHab2000. A fi de facilitar la interpretació de les dades obtingudes per al lligand TMET també s'han determinat les constants d'acidesa i les constants de formació vs Cu(II) i Zn(II) dels compostos 2-(metiltio)anilina (TMA) i 2-(etoxi)fenol (ETF), atès que la seva condensació representa bé el lligand TMET objecte d'estudi.

4. Els resultats obtinguts de les valoracions espectrofotomètriques indiquen que la capacitat del lligand TMET per coordinar Cu(II) ($\log \beta_1 = 8.93$; $\log \beta_2 = 15.21$) i Zn(II) ($\log \beta_1 = 8.52$; $\log \beta_2 = 14.12$) és comparable. Els valors de β evidencien que els àtoms donadors són els àtoms d'oxigen dels grups etoxi i fenolat. Aquests valors són concordants amb els trobats a la bibliografia pel 2-hidroxifenol.
5. L'absència de participació dels grups funcionals tioèter i amina del lligand TMET en la coordinació a Cu(II) i Zn(II) contrasta amb la capacitat del lligand 2-(metiltio)anilina per enllaçar els esmentats metalls. El comportament del fragment TMA com a lligand neutre i possibles efectes estèrics podrien ser la causa de que el lligand TMET s'enllaci als metalls mitjançant només els àtoms d'oxigen.

Aquests resultats juntament amb els infructuosos intents de iodació del lligand TMET, ens proposen replantejar el disseny del lligand, considerant la substitució del sofre per oxigen i fent que aquest O pertanyi a grups funcionals on actuï com a anió i no com a espècie neutra, quan s'enllaci als centres metàl·lics. Addicionalment, els següents passos aniran dedicats a millorar l'esquelet molecular bàsic conferint-li menys flexibilitat, evitant la coexistència de dos entorns coordinants dins la mateixa molècula i fent-la més susceptible de ser iodada afegint algun fragment que faciliti la incorporació de iode.