

Informe final publicable de proyecto

Caracterización preclínica por imágenes multimodales funcionales y cultivos celulares de un agente de diagnóstico PET en procesos de astrocitosis en Enfermedad de Alzheimer

Código de proyecto ANII: FMV_3_2020_1_162870

10/10/2023

KREIMERMAN FRANCO, Ingrid (Responsable Técnico - Científico)

SAVIO QUEVEDO, Eduardo Osvaldo (Investigador)

ARREDONDO UNANUA, Maria Florencia (Investigador)

DAPUETO CAPUCCIO, Rosina (Investigador)

IBARRA VIÑALES, Manuel (Investigador)

CENTRO URUGUAYO DE IMAGENOLOGÍA MOLECULAR (Institución Proponente) \ \

CENTRO URUGUAYO DE IMAGENOLOGÍA MOLECULAR

Resumen del proyecto

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo del sistema nervioso central (SNC), que se caracteriza neuropatológicamente por la presencia de numerosas placas de amiloide y ovillos neurofibrilares.

Recientemente se comprobó que la EA presenta un importante componente neuroinflamatorio, en el que se ven comprometidos también los astrocitos. Estos responden al daño celular mediante un proceso de reactividad, que se observa tempranamente. A medida que la patología avanza, numerosos astrocitos reactivos se disponen alrededor de las placas amiloide y los ovillos neurofibrilares.

El diagnóstico temprano de las enfermedades neurodegenerativas representa un problema para la clínica médica debido a la compleja manifestación sintomática y a la falta de biomarcadores específicos. La imagenología molecular por Tomografía por Emisión de Positrones (PET) permite obtener información cuantitativa in vivo de procesos biológicos y/o patológicos, así como el diagnóstico de numerosas patologías, entre ellas las enfermedades neurodegenerativas. El radiofármaco de referencia empleado es el [11C]Deuterodeprenil, el cual presenta ciertas limitaciones.

Siendo la Sulforrodamina 101 un marcador de astroglia, nuestro grupo había efectuado su marcación a partir de un derivado ([18F]2B-SRF101) y una primera evaluación a nivel preclínico, obteniendo resultados promisorios.

En base a ello, en el presente trabajo realizamos estudios para completar la caracterización preclínica con la finalidad de dilucidar el rol potencial del radiofármaco como agente para la detección de la respuesta astrocitaria.

Los ensayos realizados nos permitieron confirmar la especificidad celular de [18F]2B-SRF101 en el SNC y modelizar su farmacocinética. Los hallazgos encontrados en las imágenes PET podrían indicar que el radiofármaco en estudio estaría marcando el proceso de astrocitosis reportado en el modelo animal con EA utilizado.

Esto nos brinda herramientas para explorar la posibilidad de avanzar hacia una etapa clínica exploratoria en humanos con la finalidad de realizar la caracterización del agente en voluntarios sanos y pacientes de esta patología.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Inorgánica y Nuclear / Radiofarmacia PET

Palabras clave: astrocitosis / sulforrodamina 101 / PET/MRI /

Introducción

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo del sistema nervioso central (SNC), que se caracteriza por el deterioro progresivo de las funciones mentales. Neuropatológicamente, se destaca por la presencia de numerosas placas de amiloide y ovillos neurofibrilares. En estos últimos años se ha comprobado que la EA presenta un importante componente neuroinflamatorio, en el que se ven comprometidas también las células gliales, en particular los astrocitos. Estos cumplen una función homeostática importante en el funcionamiento del SNC, tal como la modulación de la excitabilidad neuronal y neurotransmisión. Por esta razón, la disfunción de los mismos ha sido implicada en diversas enfermedades neurológicas, entre ellas en la EA. (1)

Los astrocitos responden al daño en el SNC mediante un proceso llamado reactividad astrocitaria, caracterizado por hipertrofia celular y algunas veces por proliferación celular y un aumento en la expresión de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), así como importantes cambios a nivel de la expresión de proteínas. Debido a esto último es que se plantea que alteraciones patológicas de estas células gliales subyacen a la pérdida de sinapsis y muerte neuronal progresiva en enfermedades neurodegenerativas (2,3,4). El estudio de enfermedades crónicas, como enfermedades neurodegenerativas, ha impulsado el desarrollo de la Imagenología Molecular.

En particular, la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) es una técnica no invasiva que provee la capacidad de obtener información cuantitativa in vivo de diversos procesos biológicos y/o patológicos, así como el diagnóstico de numerosas patologías, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas. Debido a ello, es una modalidad prometedora para la detección temprana y estadificación de la EA en pacientes con esta patología (5).

Los radiotrazadores PET más utilizados para la evaluación de los cambios cerebrales relacionados con la EA son aquellos que detectan los fenómenos moleculares que se observan a nivel fisiopatológico, como ser placas de amiloide y ovillos neurofibrilares, así como marcadores de lesión neuronal.

La [18F]-2-desoxi-glucosa ([18F]FDG), es de gran utilidad en las enfermedades neurodegenerativas, dado que permite visualizar los cambios regionales del metabolismo de la glucosa a nivel cerebral asociados a estas patologías. En el caso de la EA, permite predecir la conversión de un deterioro cognitivo leve a EA, así como evaluar la progresión de dicha

enfermedad (6)

Por otro lado, se han desarrollado diferentes radiotrazadores para la detección de la placa de amiloide. El más utilizado es el compuesto de Pittsburgh marcado con ^{11}C (^{11}C PIB), el cual presenta gran afinidad por las placas de amiloide (7). Recientemente, otros radiofármacos similares pero marcados con ^{18}F han sido desarrollados por compañías farmacéuticas, como ser ^{18}F florbetapir (Eli Lilly & company), ^{18}F florbetaben (Piramal) y ^{18}F flutemetamol (GE Healthcare). De hecho, estos tres últimos fueron aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (8,9). A su vez, hace unos años en la Universidad de California en los Ángeles, se desarrolló el ^{18}F FDDNP, un compuesto disponible hoy en día en la clínica, que se une tanto a las placas de amiloide extracelulares, como a los ovillos neurofibrilares (10,11).

La imagen de amiloide, a pesar de ser de gran utilidad, presenta ciertas limitaciones, dado que la detección de las placas es insuficiente por sí misma para un diagnóstico positivo de la EA. Por ello, conjuntamente se han ido desarrollando marcadores específicos de la proteína tau, de modo de combinar ambas imágenes para así mejorar la especificidad del diagnóstico y permitir una detección temprana de la patología. En este sentido, una serie de radiotrazadores para la detección de los ovillos neurofibrilares están siendo desarrollados y evaluados a nivel mundial. Entre ellos se encuentran: ^{11}C PBB3, ^{18}F THK-5317, ^{18}F THK-5351 y ^{18}F AV-1451, entre otros. En particular, ^{18}F AV-1451 (también conocido como ^{18}F flortaucipir) fue la primera molécula de esta gama en aprobarse para uso clínico por la FDA (Mayo 2020) (12).

Asimismo, se ha demostrado que la astrogliosis podría modular la neuroinflamación en etapas tempranas y tardías de la enfermedad (13). En este sentido, dado que cuando los astrocitos se activan expresan niveles elevados de monoaminoxidasa B (MAO-B), con la finalidad de visualizar este proceso se desarrolló el ^{11}C deutero-L-deprenil (^{11}C DED). Este es un radiofármaco antagonista que se une de forma irreversible a la MAO-B, por lo que se ha utilizado para la detección de astrocitos reactivos en la EA (14), así como también en otras enfermedades neurodegenerativas que presentan astrocitosis, como ser Creutzfeldt-Jakob (15,16), Esclerosis Lateral Amiotrófica (17), entre otras.

Algunos radiotrazadores presentan limitaciones en el análisis de las imágenes, lo que genera dificultades a la hora de sacar conclusiones. Por ello, para sobrellevar estas dificultades es necesario continuar con la búsqueda de nuevos agentes diagnósticos. En este sentido, considerando que la astrocitosis es un proceso que se manifiesta en etapas tempranas de la EA, nuestro grupo de investigación ha trabajado en la identificación de moléculas marcadoras de astrocitos para su posterior marcación con radionucleidos PET, con el objetivo de aportar nuevas herramientas al diagnóstico precoz de la EA, así como al de otras enfermedades neurológicas que involucren procesos de astrocitosis reactiva.

En base a esto se trabajó con Sulforrodamina 101 (SR101), un colorante utilizado tradicionalmente como marcador específico de astrogliosis (18,19). En el marco de Tesis de Doctorado en Química de la Dra. Ingrid Kreimerman, se realizó la marcación de este compuesto con ^{18}F . Para ello se derivatizó la SR101 con la finalidad de marcarla con ^{18}F , obteniéndose el radiofármaco PET: SR101 N-(3- ^{18}F -Fluoropropil)-sulfonamida (^{18}F 2B-SRF101) (20). Se realizaron estudios fisicoquímicos e in vitro, que permitieron verificar sus características apropiadas para el diagnóstico PET, manteniendo la capacidad de marcar los astrocitos. En la evaluación biológica de la ^{18}F 2B-SRF101 se llevaron a cabo estudios ex vivo de biodistribución e imagenológicos in vivo en ratones sanos y en un modelo de ratón transgénico con EA (3xTg-AD) desarrollado por LaFerla y colegas (21). Para la adquisición de imágenes PET/CT se utilizaron ratones de entre 9-10 meses de edad, realizando un análisis de las imágenes del compuesto únicamente a nivel cerebral. Estos estudios demostraron que ^{18}F 2B-SRF101 podría ser un potencial radiotrazador PET para la detección de astrocitosis.

Además, se realizaron estudios comparativos de ^{18}F 2B-SRF101 con ^{11}C DED, lo cual permitió concluir que ambos radiotrazadores presentan roles diferentes como marcadores astrocitarios en el modelo animal estudiado y que los mismos serían útiles en el diagnóstico de la EA, en diferentes estadios, brindando información diferente y complementaria a la vez (22). Esto presentaría ventajas en un enfoque multitrazador, dado que se estaría contando con herramientas útiles para determinar los cambios neuropatológicos en la progresión de la EA.

Adicionalmente, se realizaron estudios toxicológicos y dosimétricos de ^{18}F 2B-SRF101, verificando su seguridad para administrar en humanos (23).

En el mencionado trabajo se dio un primer paso en evaluar una nueva herramienta para el diagnóstico y comprensión de los mecanismos que se observan en la EA, así como el de otras enfermedades neurodegenerativas que involucren este proceso. Se concluyó que ^{18}F 2B-SRF101 sería un radiotrazador promisorio para dar paso a una posible fase clínica piloto exploratoria para caracterizar el agente en humanos. Para ello previamente era necesario complementar y profundizar las evaluaciones biológicas que permitan concluir la validez del radiotrazador en el proceso de astrocitosis que se desarrolla en la EA.

Uno de los puntos que restaba por dilucidar era la especificidad celular de ^{18}F 2B-SRF101. Si bien SR101 ha sido tradicionalmente usado como marcador de astrocitos, diferentes autores postulan que el colorante podría también marcar

oligodendrocitos mielinizantes maduros, ya que difunde a través de las uniones gap desde los astrocitos a los oligodendrocitos (24,25,26). Por ello se ha propuesto que los astrocitos son marcados por la SR101 previo a los oligodendrocitos. Dado que aún no está del todo dilucidado este comportamiento, en el presente trabajo realizamos una comparación en la marcación in vitro de 2B-SRF101 sobre los diferentes tipos celulares del SNC. A su vez, se planteó evaluar si hay una captación diferencial en cultivos con un fenotipo astrocitario derivado de ratones 3xTg-AD sintomáticos, con propiedades neurotóxicas que actualmente está bajo estudio su papel en la progresión de la EA.

En cuanto a los estudios imagenológicos PET/CT de cerebro, en el presente trabajo se realizó un estudio comparativo de ambos radiotrazadores en ratones con EA (comparado con su respectivo grupo control), a lo largo de la progresión de la enfermedad. Se propuso hacer un seguimiento de la misma analizando los diferentes estadios con los dos radiofármacos durante el proceso neurodegenerativo. Para ello nos planteamos hacer un seguimiento de los animales a los 3, 6, 9, 12 y 15 meses de edad.

Si bien con los datos obtenidos había sido posible realizar un primer análisis farmacocinético, este debía ser profundizado para poder llegar a un modelo más preciso a partir de una mayor cantidad de observaciones. Debido a ello en el presente trabajo se planteó obtener datos de distribución del radiofármaco en todo el cuerpo. De este modo se utilizaron los datos obtenidos a partir de imágenes PET/CT para conocer cómo se distribuye el radiofármaco en el cuerpo, con lo cual se podrá realizar una caracterización farmacocinética del mismo mediante la imagenología molecular como herramienta para este estudio. Mediante la obtención de un modelo farmacocinético con base fisiológica, se podría caracterizar procesos de disposición relevantes así como realizar proyecciones en la relación dosis-exposición a seres humanos.

En resumen, nuestro grupo cuenta con una caracterización preclínica preliminar del radiotrazador [18F]2B-SRF101 desarrollado, que ha permitido obtener resultados promisorios alentándonos a profundizar el conocimiento para dilucidar el rol potencial del radiofármaco como agente para la detección de la respuesta astrocitaria.

Con los estudios preclínicos planteados sería posible dilucidar la especificidad celular del radiotrazador en el SNC, establecer los parámetros de su farmacocinética y el aporte de la imagenología molecular PET en el seguimiento de procesos de neurodegeneración en Alzheimer, a través de una nueva mirada: el rol de los astrocitos en el proceso.

El presente trabajo permitirá dilucidar la utilidad del nuevo radiotrazador para la detección de la respuesta astrocitaria. Esto nos habilitaría a avanzar hacia una etapa clínica de fase I en humanos con la finalidad de realizar la caracterización del agente en voluntarios sanos y pacientes. Además, cabe destacar que la detección "in vivo" en pacientes del fenómeno astrocitosis trasciende la enfermedad de Alzheimer, por lo cual se estaría brindando una nueva herramienta que permitiría caracterizar imagenológicamente otras enfermedades neurodegenerativas.

Metodología/diseño del estudio

-Ensayos comparativos de la captación in vitro de SR101 y 2B-SRF101 sobre diferentes tipos celulares del SNC y aproximación a su mecanismo de captación:

Para la dilucidación de la especificidad celular del radiofármaco [18F]2B-SRF101, se realizaron ensayos comparativos de la marcación in vitro con SR101 y 2B-SRF101, sobre los diferentes tipos celulares del SNC. Se trabajó con cultivos primarios de los diferentes tipos celulares del SNC derivados de corteza e hipocampo de ratones no transgénicos neonatos o embrionarios. En la institución ya se contaba con experiencia en la obtención y uso de los cultivos neuronales y astrocitarios, pero no de microglía y oligodendrocitos. Por ello, en el presente trabajo se puso a punto la obtención de cultivos enriquecidos en microglías y en oligodendrocitos obtenidos a partir de la corteza e hipocampo de ratones neonatos (27).

Brevemente, dicha técnica consiste en la disección del cerebro y obtención de las estructuras anatómicas deseadas bajo lupa y su posterior disgregación con tripsina y DNasa. Luego de un paso de centrifugado, las células se dejan adherir en estufa por 24h y posteriormente se las mantiene por 10 días aproximadamente, en presencia de un porcentaje de medio condicionado de la línea celular de fibroblastos L929. El sobrenadante de estas células se utiliza como fuente del factor estimulante de crecimiento (CFS), el cuál es necesario para promover el crecimiento de las microglías. Dicha línea de fibroblastos fue generosamente donada por el Institut Pasteur de Montevideo, la cual se amplificó y cultivó en las instalaciones de CUDIM para la obtención de los medios condicionados. Las microglías crecen en estas condiciones como células redondas y brillantes sobre una monocapa de astrocitos y oligodendrocitos, de la cual en los próximos pasos deben desprenderse mediante agitación. Seguidamente, las microglías se mantienen en el formato deseado para los ensayos en un medio sin suero, utilizando el suplemento N2.

En el caso de los oligodendrocitos, luego del aislamiento de dichas estructuras bajo lupa y posterior disgregación del tejido con tripsina, las células aisladas se siembran para su proliferación in vitro en sustrato de poli-L-lisina (PLL) y medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 10% suero fetal bovino, 10% suero de caballo, 1% antibiótico), durante aprox. 10 días de cultivo. Pasados esos días in vitro, se establece una monocapa de astrocitos y sobre ella una monocapa

de oligodendrocitos inmaduros o precursores de oligodendrocitos. Posteriormente, la monocapa de oligodendrocitos se desprende bajo agitación y luego de un paso de purificación por adhesión, las células se mantienen en el formato deseado para realizar los ensayos utilizando PLL como sustrato y medio de enriquecimiento de oligodendrocitos DMEM/F12 con suplemento N2.

Para la marcación in vitro con SR101 y 2B-SRF101 en los distintos tipos celulares, se siguió la metodología previamente descrita por nuestro grupo (20). Cada cultivo sembrado sobre placas de 35mm se lava con PBS glucosado y posteriormente se incuba durante 1 minuto con SR101 o con 2B-SRF101 (stock 10mg/ml disuelto en DMSO, diluido en solución salina-DMSO 0,5% a una concentración final 10uM). Posteriormente se lavan los cultivos con PBS glucosado y se procede inmediatamente a adquirir imágenes de microscopía de epifluorescencia. Para el registro de todas las imágenes se utilizan los mismos parámetros de adquisición. Se analiza la intensidad de fluorescencia de las imágenes mediante el software FIJI. Cada condición experimental se ejecutó por triplicado, y se registraron 5 campos por placa. Esto permitió evaluar si hay una captación diferencial de 2B-SRF101 por parte de los astrocitos con respecto a los demás tipos celulares del SNC.

Asimismo, se evaluó si existe o no una captación diferencial de SRF101 y 2B-SRF101 por parte de los astrocitos derivados de ratones transgénicos 3xTg, obtenidos tanto de ratones neonatos como de ratones sintomáticos de 10 meses de edad, momento en el cual se espera que la patología se encuentre desarrollada y que los mismos presenten propiedades neurotóxicas in vitro (3xTg-AD).

Con el objetivo de aproximarse al mecanismo de internalización de 2B-SRF101 en astrocitos, se realizaron ensayos de internalización en células utilizando el radiomarcado [18F]2B-SRF101. Si bien esta actividad no estaba prevista en el proyecto original, la misma se realizó dado que consideramos que aporta información relevante.

Para ello se realizó un estudio de internalización in vitro de [18F]2B-SRF101 y competencia con SR101, en astrocitos derivados de ratones no-Tg neonatos y astrocitos 3xTg-AD (10 meses). En el mismo: A) Astrocitos fueron incubadas con [18F]2B-SRF101 durante 20 o 40 min y se midió su internalización celular calculada como el porcentaje sobre el total de cuentas por minuto (cpm) medidas en un contador de centelleo sólido, respecto al número de células en cada caso. B) Astrocitos no-Tg derivados de ratones neonatos fueron incubados durante 20 min con [18F]2B-SRF101 en ausencia o presencia de un exceso de SR101 (no marcado) y se procedió de la misma manera mencionada. C) Astrocitos 3xTg-AD fueron incubados durante 20 min con [18F]2B-SRF101 en ausencia o presencia de un exceso de SR101 (no marcado) y se procedió de la misma manera mencionada.

-Estudios imagenológicos con [18F]2B-SRF101 y [11C]DED:

En este trabajo se llevaron a cabo estudios imagenológicos PET/CT con [18F]2B-SRF101 y [11C]DED. Los mismos se realizaron en ratones sanos B6x129 F2 (grupo control, "F2") y modelo de ratones triple transgénicos (3xTg-AD) de EA (PS1M146V, APPSwe, y tauP301L), provenientes del bioterio de CUDIM. Los animales fueron sometidos a los estudios a los 3, 6, 9, 12 y 15 meses de edad (n=6-8 con cada modelo animal, en cada punto, Tabla 1). La adquisición de imágenes PET/CT se realizó en las cámaras bimodales para pequeños animales (Mediso nanoScan PET-MRI3T y Mediso nanoScan SPECT/CT), durante 45 minutos post inyección de [18F]2B-SRF101 o 30 minutos post inyección de [11C]DED. El tiempo de incorporación para ambos radiofármacos fue de 15 minutos.

Los procesamientos espaciales y estadísticos se realizaron con código de desarrollo propio en MatLab y SPM. Se generó un template a partir de las imágenes de [11C]DED y [18F]2B-SRF101, con una proporción representativa de todos los rangos etarios (3 a 15 meses) en ambos grupos (3xTg-AD y F2). Se aplicó una restricción al campo de adquisición mediante un bounding box en la región cerebral, estimado individualmente en cada animal y aplicado sobre cada frame. A partir del promedio de los frames, luego de un realineado espacial, se generó la imagen estática de cada adquisición como el promedio de los frames realineados. Se redefinió el origen en cada imagen promedio y se co-registró al template correspondiente [11C]DED y [18F]2B-SRF101. Se aplicó normalización en intensidad usando máscaras definidas para cerebro total y cerebelo.

En un modelo multifactorial, se definieron los factores Grupo, Radiofármaco y Edad en el diseño estadístico ANOVA y se estimaron parámetros a partir del modelo general lineal (SPM). Se calcularon los contrastes en T (p:0.05), aplicando corrección por comparaciones múltiples FDR (False Discovery Rate), para las diferencias estadísticas de los grupos en cada Edad y para cada Radiofármaco. Los contrastes resultantes fueron superpuestos con el Atlas de referencia Allen (28).

-Estudios farmacocinéticos con [18F]2B-SRF101:

Se realizó un análisis farmacocinético mediante modelado no lineal de efectos mixtos (NLME) para caracterizar la disposición del radiofármaco [18F]2B-SRF101 en ratones de seis meses de edad (cepa F2), tras administración intravenosa en cola y determinación de radiactividad por imagen PET/CT en diferentes tejidos.

Cabe destacar que inicialmente se estudiaron los datos obtenidos a partir de los mismos ratones a los 3 meses de edad,

pero se encontró gran variabilidad de la captación del radiofármaco en los órganos entre los animales analizados. La administración del radiofármaco para el ensayo se realiza por vía intravenosa en la vena dorsal de la cola. Los ratones a esta edad son pequeños y particularmente en esta cepa las venas son muy finas. Debido a ello, al realizar la inyección del radiofármaco hay mayor probabilidad de infiltración, lo cual explica la variabilidad encontrada. En base a esto, se descartaron los datos de este grupo para la creación del modelo y se continuó trabajando con los datos obtenidos a partir de las imágenes adquiridas en ratones de 6 meses de edad, en los cuales la variabilidad mencionada fue mucho menor en comparación con la de los ratones de 3 meses de edad.

Se trabajó con cuantificación de radiactividad de [18F]2B-SRF101 determinada por imagen en diferentes tejidos en siete ratones de seis meses de edad (cepa F2), en un período de 60 minutos tras la administración en bolo de 17,80 – 35,00 MBq en la vena de la cola. En la Tabla 2 se resumen las principales características experimentales.

La actividad inyectada se determinó como la actividad captada en cuerpo entero observada en el intervalo de tiempo 45-60 minutos, en unidades de kBq.

Para cada ratón se procesó la actividad media en los distintos intervalos de tiempo disponibles y en los siguientes órganos o partes del cuerpo: cola, corazón, cerebro, pulmón, hueso, intestino, hígado, riñón, músculo y vejiga. Se utilizó como variable longitudinal la actividad media reportada en los intervalos 15-30 minutos, 30-45 minutos, y 45-60 minutos, en unidades de kBq/g. La observación reportada para cada intervalo se asignó al tiempo medio de dicho intervalo para realizar el análisis farmacocinético.

El análisis farmacocinético mediante NLME se realizó a través del software MonolixSuite R2023 (Lixoft, Simulation Plus). Inicialmente se determinó la cinética para el cambio de la actividad en función del tiempo en cada órgano de forma independiente, con el fin de evaluar la agrupación de diferentes órganos en compartimientos farmacocinéticos comunes en base a las similitudes cinéticas. Con este criterio se construyó el modelo base en el cual músculo y hueso fueron agrupados en un mismo compartimiento (constante de eliminación de 0,012 min⁻¹), mientras que corazón, pulmón y cerebro se agruparon en otro compartimiento (constantes de eliminación de 0.009 min⁻¹, 0.015 min⁻¹, 0.009 min⁻¹, respectivamente). En el caso del pulmón, si bien tiene una cinética mayor, se lo agrupó con cerebro y corazón bajo el criterio de que este órgano está altamente irrigado. Los órganos eliminadores, hígado y riñones, fueron asignados a compartimientos independientes, a los cuales el radiofármaco llega desde el compartimiento en donde está el corazón (asociado al compartimiento "central"). Adicionalmente, las actividades observadas en intestino y vejiga provienen de la actividad de hígado y riñones respectivamente, en forma independiente. El desarrollo del modelo fue guiado por distintos criterios de diagnóstico de ajuste y precisión en la estimación de parámetros. Como métricas principales se utilizaron el criterio de información de Akaike (AIC) y las herramientas gráficas de diagnóstico (ajuste individual y visual predictive checks - VPCs), así como la incertidumbre reportada por Monolix en la estimación de cada parámetro (en error estándar relativo, E.E.R.%). (29)

El modelo desarrollado final fue exportado a Simulx R2023 (Lixoft, Simulation Plus) para simular las áreas bajo la curva actividad vs tiempo entre tiempo 0 a infinito, para cada órgano. Posteriormente, se realizaron los cocientes entre las áreas con el fin de evaluar la exposición relativa a [18F]2B-SRF101 entre los distintos tejidos en estudio.

Resultados, análisis y discusión

-Ensayos comparativos de la captación in vitro de SR101 y 2B-SRF101 sobre diferentes tipos celulares del SNC y aproximación a su mecanismo de captación:

Los cultivos celulares enriquecidos en los distintos tipos celulares del SNC se obtuvieron exitosamente. En la Figura 1, se muestran imágenes representativas obtenidas en microscopio confocal de cultivos enriquecidos en astrocitos, neuronas, microglías y oligodendrocitos obtenidos a partir de ratones no-transgénicos neonatos o embrionarios, a los cuales se les realizó una inmunocitoquímica utilizando los anticuerpos primarios específicos para cada tipo celular y anticuerpos secundarios correspondientes unidos a fluoróforos.

En estos cultivos se evaluó la captación in vitro de 2B-SRF101 (análogo fluorescente, no marcado, de [18F]2B-SRF101), y de su precursor SR101. En la Figura 2 se muestra la captación in vitro de 2B-SRF101 y SR101, en cultivos primarios de astrocitos, neuronas, microglías y oligodendrocitos. Como se puede observar, existe una captación específica en astrocitos por parte de las sondas 2B-SRF101 y SR101, con una distribución preferencialmente citoplasmática. No se observa captación de las sondas en neuronas sanas así como tampoco se observa internalización en las microglías ni oligodendrocitos. A su vez, es de destacar que ambas sondas presentan un comportamiento semejante, por lo tanto la sonda fluorada 2B-SRF101, actúa como análogo de su precursor SR101 in vitro. Estos resultados demuestran una especificidad de esta sonda por los astrocitos, reforzando el uso de [18F]2B-SRF101 como potencial trazador específico de procesos astrocitarios in vivo.

En la evaluación de la captación de 2B-SRF101 y SR101 en cultivos astrocitarios derivados de ratones transgénicos 3xTg, al

observar la captación de las sondas en los astrocitos derivados de ratones 3xTg neonatos, éstos captan de manera indistinguible respecto a los astrocitos obtenidos de animales no transgénicos (Figura 3), indicando que la presencia de los transgenes en el modelo murino en estudio no afecta la marcación de los astrocitos por parte de 2B-SRF101 o SR101. Por último, no se observó captación de 2B-SRF101 ni SR101 en los astrocitos 3xTg-AD (10 meses), solo observándose marcación inespecífica seguramente por la presencia de debris celulares (Figura 3). Este resultado nos podría indicar que este subtipo astrocitario no expresa los transportadores OATP1C1 descritos como los responsables de la internalización de SR101.

En la Figura 4 se muestran los ensayos de internalización in vitro de [18F]2B-SRF101 y competencia con SR101, en astrocitos derivados de ratones no-Tg neonatos y astrocitos 3xTg-AD. En los mismos observamos una mayor captación de la sonda marcada con 18F en astrocitos no-Tg derivados de ratones neonatos respecto a los astrocitos 3xTg-AD, luego de 20 o 40 minutos de incubación del radiomarcado, siendo la diferencia estadísticamente significativa en ambos tiempos (Figura 4A). Es esperable que la baja captación observada en los astrocitos 3xTg-AD se corresponda al marcado inespecífico de los detritos del propio cultivo, observado mediante microscopía. A su vez, observamos una inhibición significativa de la internalización de [18F]2B-SRF101 en astrocitos no-Tg derivados de ratones neonatos cuando estos fueron expuestos a un exceso de la sonda precursora SR101 no marcada (Figura 4B). Esto podría indicar que [18F]2B-SRF101 es captada mediante los mismos mecanismos que su precursor. Aún más, cuando se analizó la captación de [18F]2B-SRF101 en astrocitos 3xTg-AD (10 meses) en presencia de un exceso de SR101, no se observaron diferencias significativas respecto a los astrocitos que no recibieron el exceso (Figura 4C). De este modo, la captación en los mismos es significativamente menor que en astrocitos derivados de ratones neonatos, ya sean transgénicos o no, y a su vez no es específica.

-Estudios imagenológicos con [18F]2B-SRF101 y [11C]DED:

En la figuras 5 y 6 se muestran las imágenes PET adquiridas post inyección de [18F]2B-SRF101 y [11C]DED respectivamente, en los distintos meses de edad de los ratones estudiados. En las imágenes se visualizan los resultados del análisis estadístico, en el cual se realiza la comparación "F2-3xTg/AD" ($p < 0.05$).

Al analizar los datos de la figura 5, en los primeros meses de edad (3 y 6) no se encuentran diferencias significativas considerables en la captación de [18F]2B-SRF101 entre ambos grupos estudiados. A los 9 meses, se observa una mayor captación del radiofármaco en el grupo control con respecto a los ratones 3xTg-AD. Sin embargo, a partir de los 12 meses de edad comienza a apreciarse una captación de [18F]2B-SRF101 significativamente mayor en ratones 3xTg-AD frente a los F2, en putamen, estriado y corteza (localizada en el cíngulo). A los 15 meses la diferencia de captación en putamen se intensifica, pasando a ser bilateral. A su vez se observa una diferencia significativa en amígdala y en corteza piriforme, somato sensorial y cíngulo.

En el caso del [11C]DED, en la figura 6, se observa a los 3 y 6 meses de edad una mayor captación del radiofármaco en el grupo control con respecto a los ratones 3xTg-AD, la cual no se encuentra a los 9 y 12 meses. En un estudio reportado, donde analizan la captación de [11C]DED a lo largo de la vida del animal, demostraron que la misma no se relacionaba directamente con la edad en el caso de los ratones sanos (30). Esto puede explicar la variación encontrada en los meses descriptos. Por otro lado, a los 15 meses se observa un notorio aumento de la captación del radiofármaco en el hipocampo y putamen de los ratones 3xTg-AD con respecto a los F2.

Recientemente, el grupo que desarrolló el modelo animal de ratones 3xTg-AD, reportó una nueva caracterización fenotípica del mismo (31), basado en un estudio de ratones de 4, 12 y 18 meses de edad, encontrando un retraso en la aparición de los procesos fisiopatológicos, con respecto a lo reportado en los inicios del modelo (21). En el mismo informan que la gliosis comienza a detectarse luego de los 12 meses de edad, reportando diferencias significativas en la densidad de astrocitos reactivos en las regiones corticales e hipocampo a los 18 meses.

Considerando lo expresado anteriormente, la mayor captación de [18F]2B-SRF101 y [11C]DED encontrada en ratones 3xTg-AD con respecto al grupo control en las regiones detalladas, podría indicar que ambos radiofármacos estarían marcando el proceso de astrocitosis reportado en este modelo animal. Cabe destacar que los dos radiofármacos en estudio sensibilizan variaciones en las regiones más afectadas de la evolución de la EA.

Al comparar las imágenes obtenidas tras la inyección de ambos radiofármacos, se observa que la mayor intensidad de captación se aprecia en distintas subregiones para cada compuesto. Es importante destacar esto, dado que hay que tener en cuenta que ambos radiotrazadores actúan mediante blancos moleculares diferentes. En el caso de la [18F]2B-SRF101, se espera que la misma detecte a los astrocitos por un mecanismo directo de unión/entrada a estos, por lo que se esperaría que marcara todos los astrocitos presentes, tanto reactivos como no. Esto es diferente en el caso del [11C]DED, ya que presenta un mecanismo indirecto de marcación de astrocitos, dado que se une a la MAO-B, la cual se ve aumentada principalmente en los astrocitos reactivos. Por ello, la marcación de astrocitos con [11C]DED puede estar más relacionada con el estadio de la enfermedad, que condiciona el nivel de activación de los astrocitos.

-Estudios farmacocinéticos con [18F]2B-SRF101:

*Desarrollo del modelo

El modelo obtenido de mejor ajuste se caracteriza por tres compartimentos. El compartimento "cola", compartimento "central" y compartimento "periférico". El compartimento central incluye al corazón, pulmón y cerebro. El compartimento periférico incluye al músculo y al hueso. Existe eliminación de fármaco desde el compartimento central al hígado-intestino y al riñón-vejiga. La figura 7 ilustra la estructura del modelo desarrollado.

Para cada órgano se utiliza un volumen fijo determinado según:

$$V(\text{órgano?}_i) = f(\text{órgano?}_i) * WT$$

Donde $f(\text{órgano}i)$ corresponde a la fracción de peso corporal (WT) asociada al órgano i. Estos datos fueron tomados del modelo implementado en PKSim - MoBi (Open System Pharmacology) y Olivera Reis et al. (32)

Se toma como unidad de volumen mL asumiendo una densidad de 1,0 g/mL para los distintos tejidos biológicos.

El peso corporal de cada ratón se incluye como covariable en los parámetros Q1 (velocidad de ingreso de fármaco a los compartimentos central y periférico), Q8 (velocidad de eliminación del fármaco desde el riñón), Q7 (velocidad de eliminación del fármaco desde el hígado) y Q intercompartimental del periférico al central, de acuerdo con el siguiente modelo alométrico:

$$?_{\text{Parametro?}_i} = ?_{\text{Parametro?}_i} \left(\frac{WT_i}{WT_{\text{poblacional}}} \right)^{?_{\text{parametro}}}$$

Siendo WT el peso individual de cada animal y $WT_{\text{poblacional}}$ la media ponderada de los animales incluidos en el estudio ($WT_{\text{poblacional}} = 36$ gramos). La inclusión del peso corporal como covariable permitirá luego escalar los parámetros en animales de diferente peso. El valor de ? se fijó en 0,75 para todos los parámetros.

Los datos crudos de las observaciones hechas en cola para el ID=5 fueron ignoradas en el ajuste del modelo por apartarse significativamente del resto de las observaciones en el mismo tejido para los otros ratones.

Los resultados para el modelo se muestran en la Tabla 3. Las Figuras 8 (A-J) ilustran el ajuste de los datos en cada sitio observado y en la Figura 9 se observa el visual predictive check.

En términos generales, dadas las características de los datos y la probable variabilidad en la cantidad inyectada, se considera que el ajuste es adecuado.

*Simulaciones

Considerando los pesos y las administraciones incluidas en la base de datos, se simuló perfiles actividad del radiofármaco en unidades de concentración vs tiempo y actividad del radiofármaco en unidades de cantidad vs tiempo en los distintos tejidos para cien ratones, considerando la distribución de los parámetros poblacionales. Los perfiles fueron simulados entre 0 y 100 horas con un intervalo de una hora entre medidas. Para cada uno de ellos se estimó el área bajo la curva (AUC) y se calcularon los cocientes entre AUC de distintos tejidos y el AUC total (obtenido a partir del perfil de suma de la actividad del radiofármaco en unidades de cantidad en el organismo vs tiempo) y entre AUC de distintos tejidos y AUC de corazón. En las Tablas 4 y 5 se resumen los cocientes de AUC obtenidos tanto con unidades de concentraciones (Tabla 4) como con unidades de cantidades (Tabla 5), que pueden interpretarse como la exposición al radiofármaco relativa de cada tejido, respecto a la exposición total y la exposición de corazón.

Finalmente, con el modelo se estimó el porcentaje de radiofármaco eliminado, el cual se calculó como la cantidad presente a tiempo final respecto a la dosis total administrada. El boxplot obtenido se muestra en la figura 10, en el cual se puede apreciar que el radiofármaco presenta una eliminación y excreción mayoritariamente hepatobiliar.

Conclusiones y recomendaciones

En el presente trabajo se llevaron a cabo diferentes estudios con la finalidad de profundizar la caracterización biológica del radiofármaco [18F]2B-SRF101, que había sido desarrollado y evaluado por nuestro grupo como un potencial agente para la detección de la respuesta astrocitaria.

Con este objetivo se realizaron estudios en cultivos celulares que permitieron dilucidar la especificidad celular del radiotrazador en el SNC, confirmando que existe una captación específica de 2B-SRF101 en astrocitos. Mientras que la sonda no es captada por neuronas sanas, microglías ni oligodendrocitos. Esto refuerza el uso de [18F]2B-SRF101 como potencial trazador específico de procesos astrocitarios in vivo.

Además, se realizaron estudios con la finalidad de conocer la captación del compuesto en cultivos astrocitarios de distinto origen, como ser astrocitos derivados de ratones 3xTg-AD, con propiedades neurotóxicas. Para ello se realizaron ensayos de captación con la sonda fluorescente 2B-SRF101 y estudios de internalización in vivo con el radiofármaco [18F]2B-SRF101. Por otro lado, se lograron obtener imágenes PET/CT con [18F]2B-SRF101 y [11C]DED en distintos momentos de la vida de los ratones transgénicos con EA y controles (3, 6, 9, 12 y 15 meses de edad). Esto permitió realizar un análisis detallado de la distribución de los radiofármacos en el cerebro en distintas etapas de la enfermedad.

A partir de esto, se detectaron mayores captaciones de [18F]2B-SRF101 y [11C]DED en regiones como corteza, hipocampo y

putamen en ratones 3xTg-AD con respecto a los controles en los últimos meses estudiados, regiones donde está reportada la presencia de astrocitosis y que se encuentran afectadas en la evolución de la EA. Esto podría indicar que ambos radiofármacos estarían marcando el proceso de astrocitosis reportado en el modelo animal con EA.

Un punto interesante podría ser adquirir imágenes PET/CT a los 18 meses de edad, de modo de conocer como continua la captación de los radiofármacos frente al desarrollo de la astrocitosis en los ratones con EA.

En cuanto a los estudios farmacocinéticos realizados en el presente trabajo, se arribó a un modelo con ajuste razonable dado la naturaleza de los datos disponibles. Los parámetros fueron estimados con adecuada incertidumbre. A partir del mismo, es posible realizar predicciones respecto a la exposición relativa a [18F]2B-SRF101 entre los distintos tejidos en estudio.

Los resultados obtenidos deben considerarse como preliminares en función de que el modelo se desarrolla a partir de datos escasos y con variabilidad en la actividad inyectada. En este caso se utilizaron datos únicamente de los ratones sanos de 6 meses de edad. Es necesario continuar con el procesamiento de los datos de los ratones en los siguientes meses de edad, de modo de contar con mayor cantidad de datos para desarrollar el modelo. De todas maneras, podría utilizarse este modelo para realizar predicciones de futuros experimentos, apoyar el diseño de experimentos, y utilizarse como prior para futuros análisis farmacocinéticos.

A modo de conclusión, el presente trabajo permite dilucidar la utilidad del nuevo radiotrazador para la detección de la respuesta astrocitaria. Esto nos brinda herramientas para explorar, junto con el equipo médico de Cudim, la posibilidad de avanzar hacia una etapa clínica de fase I en humanos con la finalidad de realizar la caracterización del agente en voluntarios sanos y pacientes. Además, cabe destacar que la detección "in vivo" en pacientes del fenómeno astrocitosis trasciende la enfermedad de Alzheimer, por lo cual se estaría brindando una nueva herramienta que permitiría caracterizar imagenológicamente otras enfermedades neurodegenerativas.

Referencias bibliográficas

- 1) Nordberg A. PET imaging of amyloid in Alzheimer`s disease. *Neurology*; 2004; 4:519-527.
- 2) Connelly D. Closing in on Alzheimer`s disease. *The pharmaceutical journal*. 2015; 295:142-143.
- 3) Li C, Zhao R, Gao K, et al. Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*; 2011 8:67-80.
- 4) Svedberg M, Hellstrom-Lindahl E, Rahman O, et al. PET- Current Clinical and Research Aspects, 2012, chapter 10:254-274
- 5) Mikla, V.I, Mikla, V.V. Positron Emission Tomography In: *Medical Imaging Technology*. Elsevier Insights. 2014; 53-64.
- 6) Teipel S, Drzezga A, Grothe M, et al. Multimodal imaging in Alzheimer`s disease: validity and usefulness fot early detection. www.thelancet.com/neurology; 2015, 14: 1037-1053.
- 7) Engler H, Klunk W, Nordberg A, et al. First PET Study with a Benzothiazol Amyloidimaging Agent (PIB) in Alzheimer's Disease Patients and Healthy Volunteers. En: *The Living Brain and Alzheimer's Disease*. Hyman B.T, Demonet J.F, Christen Y. Springer, Berlin, Heidelberg. 2004, pp.123-137.
- 8) Landau S, Thomas B, Thurfjell L, et al. Amyloid PET imaging in Alzheimer`s disease: a comparison of three radiotracers. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2014; 41(7):1398-1407.
- 9) Fodero-Tavoletti MT, Brockshnieder D, Villemagne VL, et al. In vitro Characterization of 18F-Florebetaben, an A&946; imaging radiotracer. *Nuclear Medicine and Biology*. 2012; 39: 1042-1048.
- 10) Barrio Jr, Huang SC, Cole G, et al. PET imaging of tangles and plaques in Alzheimer disease with a highly hydrophobic probe. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 1999; 42: S194-195.
- 11) Tolboom N, Yaqub M, van der Flier W.M, et al. Detection of Alzheimer Pthology In Vivo Using Both 11C-PIB and 18F-FDDNP PET. *Journal of Nuclear Medicine*. 2009; 50:191-197.
- 12) Cassinelli Petersen G, Roytman M, Chiang G.C, et al. Overview of tau PET molecular imaging. *Curr Opin Neurol*. 2022; 35 (2): 230-239. doi:10.1097/WCO.0000000000001035.
- 13) Verkhatsky A, Olabarria M, Noristani H.N, et al. Astrocytes in Alzheimer`s Disease. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2010; 7: 399-412.
- 14) Santillo AF, Gambini JP, Lannfelt L, et al. In vivo imaging of astrocytosis in Alzheimer's disease: an 11C-L-deuteriodeprenyl and PIB PET study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2011; 38 (12): 2202-2208.
- 15) Engler H, Lunderg P.O, Ekbohm K, et al. Multitracer study with positron emission tomography in Creutzfeldt-Jakob disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2003; 30: 85-95.
- 16) Engler H, Nennesmo I, Kumlien E, et al. Imaging astrocytosis with PET in Creutzfeldt-Jakob disease: case report with histopathological findings. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2012; 5 (2): 201-217.

- 17) Johansson A, Engler H, Blomquist G, et al. Evidence for astrocytosis in ALS demonstrated by [11C](L)-deprenyl-D2 PET. *Journal of the Neurological Sciences*. 2007; 255 (1-2): 17-22.
- 18) Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Kerr JN, et al. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature Methods*. 2004; 1:31-37.
- 19) Nimmerjahn A, Helmchen F. In vivo labeling of cortical astrocytes with sulforhodamine 101 (SR101). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2012; 3: 326-334.
- 20) Kreimerman I, Porcal W, Olivera S, et al. Synthesis of [18F]2B-SRF101: A sulfonamide derivative of the fluorescent dye Sulforhodamine 101. *Current Radiopharmaceuticals*. 2017; 10: 212-20.
- 21) Oddo S, Caccamo A, Shepherd J, et al. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. *Neuron*. 2003; 39 (3): 409-421.
- 22) Kreimerman I, Reyes A.L, Paolino A, et al. Biological Assessment of a 18F-Labeled Sulforhodamine 101 in a Mouse Model of Alzheimer's Disease a Potential Astrocytosis Marker. *Frontiers in Neuroscience*. 2019; doi: 10.3389/fnins.2019.00734
- 23) Kreimerman I, Mora-Rodríguez E, Reyes L, et al. Dosimetry and Toxicity Studies of the Novel Sulfonamide Derivative of Sulforhodamine 101([18F]SRF101) at a Preclinical Level. *Current Radiopharmaceuticals*. 2019; 12: 40-48.
- 24) Wasseff S, Scerer S. Cx3 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiology of Disease*. 2011; 42: 506-513.
- 25) Hill R, Grutzendler I. In vivo imaging of oligodendrocytes with sulforhodamine. *Nature Methods*. 2014; 11: 1081-1082.
- 26) Hagos L, Hülsmann S. Unspecific labelling of oligodendrocytes by sulforhodamine 101 depends on astrocytic uptake via the thyroid hormone transporter OATP1C1 (SLC01C1). *Neuroscience Letters*. 2016; 631: 13-18.
- 27) McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*. 1980;85(3):890-902. doi:10.1083/jcb.85.3.890
- 28) Wang Q, Ding S-L, Li Y, et al. The Allen Mouse Brain Common Coordinate Framework: A 3D Reference Atlas, Cell, Volume 181, Issue 4,2020 previamente normalizado a los templates [11C]DED y [18F]2B-SRF101.
- 29) Nquyen T.H.T, Mouksassi M-S, Holford N. Model Evaluation of Continuous Data Pharmacometric Models: Metrics and Graphics. *Pharmacometric & Systems Pharmacology*. 2017; 6(2): 87-109.
- 30) Rodriguez-Vieitez E, Ni R, Gulyás B, et al. Astrocytosis precedes amyloid deposition in Alzheimer APPswe transgenic mouse brain: a correlative positron emission tomography and in vitro imaging study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015; 42 (7): 1119-1132.
- 31) Javonillo D, Tran K, Phan J, et al. Systematic Phenotyping and Characterization of the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.*; 2022; 15:785276
- 32) Oliveira Reis L, Gaya Sopena J.M, Fávoro W.J, et al. Anatomical features of the urethra and urinary bladder catheterization in female mice and rats. An essential translational tool. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2011; 26(2):106-110.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)