



UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI

# NUEVAS TERAPIAS CON OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DEL ALZHEIMER

Irene Ginés Alcober

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



Tutor académico: Dr. Juan Bautista Fernández Larrea,

Departamento de bioquímica y biotecnología

[juanbautista.fernandez@urv.cat](mailto:juanbautista.fernandez@urv.cat)

Tarragona, junio 2021



Yo, Irene Ginés Alcober, con DNI 73105765N, soy conocedora de la guía de prevención del plagio en la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductos consideradas como plagio en la URV.

Tarragona, 20 de mayo de 2021

Irene Ginés Alcober

*A irene*



## RESUMEN

El Alzheimer es una enfermedad (EA) neurodegenerativa que puede afectar a la memoria, el comportamiento e incluso el movimiento. La presencia de depósitos extracelular de  $\beta$ -amiloide como placas y la acumulación intracelular de tau hiperfosforilada como ovillos neurofibrilares sigue siendo el criterio neuropatológico principal para el diagnóstico de EA. Sin embargo, una serie de descubrimientos fundamentales recientes destacan importantes roles patológicos para otros procesos celulares y moleculares, por ejemplo, el efecto de determinados genes como ApoE o el impacto epigenético causado por diversos componentes ambientales. A pesar de esto, actualmente no existe ningún tratamiento que modifique la enfermedad, y numerosos ensayos clínicos de fase 3 no han logrado demostrar beneficios.

Últimamente, han surgido diferentes ensayos con oligonucleótidos antisentido (ASOs) que permiten actuar contra el mRNA y silenciarlo. Gracias a estos descubrimientos se está aumentando el número de dianas para inhibir la progresión de la EA. El objetivo de este trabajo es revisar los recientes avances en las estrategias de tratamiento actuales basadas en ASOs y discutir las oportunidades para desarrollar futuras terapias modificadoras de la enfermedad.

**Palabras clave:** enfermedad del Alzheimer;  $\beta$ -amiloide, tau hiperfosforilada, ApoE, oligonucleótidos antisentido, RNA de interferencia.

## ABSTRACT

Alzheimer's is a neurodegenerative (AD) disease that can affect memory, behaviour, and even movement. The presence of extracellular deposits of  $\beta$ -amyloid as plaques and the intracellular accumulation of hyperphosphorylated tau as neurofibrillary tangles remains the main neuropathological criterion for the diagnosis of AD. However, recent fundamental discoveries highlight important pathological roles for other cellular and molecular processes, for example the effect of certain genes such as ApoE or the epigenetic impact caused by various environmental components. Despite this, there is currently no disease-modifying treatment, and numerous phase 3 clinical trials have failed to demonstrate benefits.

Lately, different tests with antisense oligonucleotides (ASOs) have emerged that allow it to act against the mRNA and silence it. Thanks to these discoveries, the number of targets to inhibit AD progression is increasing. The aim of this paper is to review the latest advances in current ASO-based treatment strategies and to discuss opportunities to develop future modified therapies for the disease.

**Keywords:** Alzheimer's disease;  $\beta$ -Amyloid, hyperphosphorylated tau, ApoE, antisense oligonucleotides, interfering RNA.

## Índice

Tabla de abreviaciones .....	7
<b>1. Introducción .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Enfermedad de Alzheimer .....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Sintomatología molecular .....	10
1.1.2 Componente genético .....	15
1.1.3 Causa epigenética .....	19
1.1.4 Variables ambientales .....	21
1.1.5 Diagnóstico .....	23
1.1.6 Tratamientos y terapias .....	24
<b>1.2 Oligonucleótidos antisentido (ASOs).....</b>	<b>26</b>
1.2.1 Diversidad y mecanismos de acción .....	27
1.2.2 Transporte y entrada de ASOs .....	30
<b>2. Objetivo.....</b>	<b>33</b>
<b>3. Metodología.....</b>	<b>33</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>34</b>
4.1 ASOs contra APP.....	34
4.2 ASOs contra Tau.....	36
4.3 ASOs contra ApoE.....	39
4.4 ASOs contra HDAC2.....	41
<b>5. Discusión .....</b>	<b>44</b>
<b>6. Conclusión .....</b>	<b>44</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>45</b>
<b>8. Autoaprendizaje.....</b>	<b>49</b>

## Tabla de abreviaciones

**EA:** enfermedad del Alzheimer

**A $\beta$ :** placas beta amiloides

**NFT:** agregaciones intracelulares de ovillos neurofibrilares

**$\tau$ :** proteína Tau

**APP:** molécula precursora del beta amiloide

**SNC:** sistema nervioso central

**AchEI:** inhibidores de la acetilcolina esterasa

**IDE:** enzima degradadora de insulina

**GSK3 $\beta$ :** glucógeno sintasa quinasa 3

**CDK5:** quinasa 5 dependiente de ciclina

**ApoE:** apolipoproteína E

**BACE1:** enzima 1 de escisión de la proteína precursora del beta amiloide

**KO:** knock out (bloqueo de genes)

**GABA:** ácido gamma-aminobutírico

**BHE:** barrera hematoencefálica

**HAT:** histonas acetiltransferasas

**HDAC:** histonas deacetilasas

**ASO:** oligonucleótido antisentido

**RNAm:** RNA mensajero

**RNAasa:** ribonucleasa

# 1. Introducción

## 1.1 Enfermedad de Alzheimer

El incremento de la esperanza de vida ha provocado el aumento de la prevalencia de enfermedades crónicas y una alta concentración de patologías en edades avanzadas. Entre ellas se encuentra la demencia, un síndrome clínico causado por numerosos factores, que engloba varias enfermedades (tales como la Enfermedad de Pick, la Enfermedad de Parkinson o la enfermedad del Alzheimer) y habitualmente genera una disfunción cerebral progresiva y extensa. En 2016 había más de 47 millones de personas con demencia y se estima que en el año 2050 la cifra habrá ascendido a más de 130 millones de personas (1). La enfermedad del Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia. La mayoría de los casos ocurren después de los 65 años, mientras que los casos que ocurren antes de los 65 años son considerablemente más extraños y constituyen menos del 5% (2). La tasa de incidencia en España para mayores de 60 años es de 17,1 por 1.000 personas/año (1).

Según el grado de deterioro cognitivo, la EA suele dividirse en tres etapas: la etapa preclínica, caracterizada por una capacidad cognitiva normal, la etapa prodrómica, caracterizada por un deterioro cognitivo leve, y la etapa de demencia, con deterioro funcional, pero no está claro cuánto tiempo pasan los individuos en cada etapa (3). Al principio, puede aparecer desde una mínima pérdida de memoria, hasta una más constante, conocida como memoria a corto plazo. A medida que la enfermedad avanza, los pacientes comienzan a manifestar problemas en el lenguaje, debido a la incapacidad de recordar vocabulario complejo y también comienzan a perder la capacidad de leer y escribir. Finalmente, en la última etapa ocurre un deterioro de la masa muscular, llegando a perder la movilidad y con ello la incapacidad de alimentarse por sí mismo y la incontinencia (4).

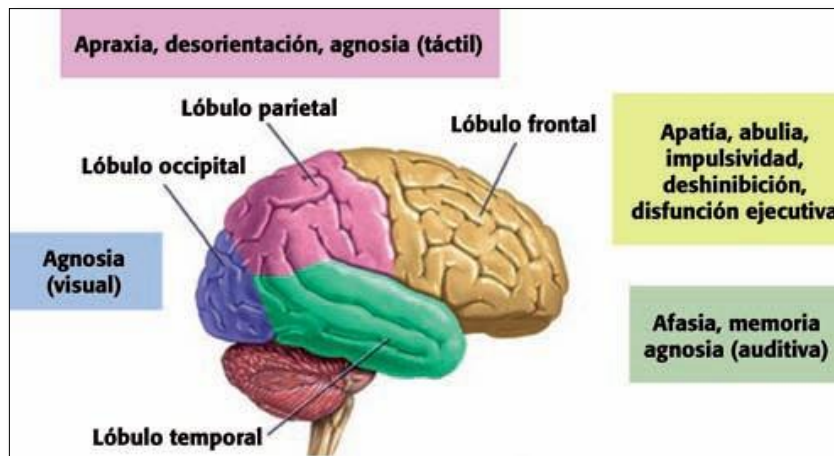


Figura 1 Alzheimer. Partes del Cerebro afectadas por Alzheimer. (5)

La EA también puede presentar síntomas clínicos atípicos en los pacientes con deterioro temprano en dominios no relacionados con la memoria. La atrofia cortical posterior presenta déficits tempranos en las áreas occipito-parietales con ataxia óptica y parálisis psíquica de la mirada o en las áreas occipito-temporales que genera agnosia visual. La variante conductual de la EA situada en la zona del lóbulo prefrontal se presenta con disfunción ejecutiva temprana o deterioro conductual (especialmente apatía y perseveración) (Figura 1) (6).

La tasa de mortalidad y supervivencia global es un indicador epidemiológico muy relevante para observar la salud de la población y descubrir las consecuencias negativas de las patologías. La EA es una de las enfermedades que durante estos últimos 20 años han escalado un mayor número de posiciones y se encuentran entre las 50 principales causas de mortalidad (1).

La supervivencia tras un diagnóstico (ver apartado 1.1.5) es muy variable, la media oscila entre los 5 a 12 años posteriores al inicio de los síntomas. La carga para los cuidadores y el sector de la salud pública es enorme, ya que dependiendo de los recursos disponibles, la esperanza de vida de las pacientes varía (3).

Por todo esto, se necesitan una gran cantidad de terapias que modifiquen y puedan prevenir o ralentizar la velocidad de progresión de la enfermedad, pero lamentablemente no hay ninguna disponible actualmente. No obstante, estos últimos años se han logrado avances significativos que nos han permitido aclarar aspectos clave de la patobiología subyacente de la EA y, por lo tanto, estar más cerca de una terapia efectiva. (4)

Esta revisión analiza los avances recientes en nuestra comprensión de la patobiología

de la EA y resume las estrategias de tratamiento, así como los desafíos y oportunidades en el camino hacia el desarrollo de tratamientos modificadores de la enfermedad.

### 1.1.1 Sintomatología molecular

La enfermedad del Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa causada por el procesamiento aberrante y la polimerización de proteínas solubles. Debido a mutaciones genéticas, envejecimiento o factores ambientales, las proteínas neuronales solubles alcanzan conformaciones alteradas que conlleva a funciones neuronales anormales (7).

Las características histopatológicas de la EA son agregados extracelulares de placas  $\beta$ -amiloides ( $A\beta$ ) y agregaciones intracelulares de ovillos neurofibrilares (NFT), compuesto por tau ( $\tau$ ) asociado a microtúbulos hiperfosforilados. La principal hipótesis es que la deposición de  $A\beta$  en el cerebro es el primer paso de la patogénesis de la EA, lo que lleva a la posterior deposición de Tau, a la pérdida de neuronas sinápticas y al deterioro cognitivo. Esta suposición está respaldada por la genética, ya que una duplicación del locus APP produce un aumento en la proporción  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  y además una mutación de APP (A673T) reduce el riesgo de desarrollar EA porque genera una disminución de la producción de placas  $\beta$ -amiloides (4).

Las placas  $\beta$ -amiloides se desarrollan inicialmente en las regiones del neocórtex basal, temporal y orbitofrontal del cerebro y en etapas posteriores progresan a lo largo del neocórtex, hipocampo, amígdala, diencefalo y ganglios basales. En casos críticos,  $A\beta$  también se encuentra en todo el mesencéfalo, el tronco encefálico inferior y la corteza cerebelosa. Esta concentración de  $A\beta$  desencadena la formación de ovillos  $\tau$ , que se encuentran en el *locus coeruleus* y las áreas transentorrinal y entorrinal del cerebro. En la etapa crítica, se propaga al hipocampo y el neocórtex (7).

Esta acumulación de patología cerebral amiloide y tau es un proceso lento y gradual que es tolerado por las células del SNC al inicio de la enfermedad y sirve como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Pero, la enfermedad solo se manifiesta clínicamente cuando fallan los mecanismos homeostáticos celulares, lo que conduce a una eliminación deficiente de la proteína patológica agregada, un aumento del estrés celular y una descomposición compleja de funciones fisiológicas intercelulares que finalmente conducen a la neurodegeneración. Específicamente, la fase celular se caracteriza por la disfunción de la unidad neurovascular, actividad de la red neuronal aberrante y funciones homeostáticas de astrocitos y microglía deterioradas y / o posible ganancia de funciones tóxicas (4).

La evaluación longitudinal de las imágenes de PET con amiloide y tau sugiere que la tasa de acumulación de amiloide predice el inicio de la acumulación de tau, mientras que la tasa de acumulación de tau predice la aparición de deterioro cognitivo (8).

### 1.1.1.1 Agregados de placas $\beta$ -amiloides

La proteína precursora amiloidea (APP) es una proteína transmembrana con dominios extracelulares, cuya familia incluye proteínas similares a precursoras amiloides de mamíferos (APLP1 y APLP2), y proteínas similares a precursoras amiloides (APPL) en *Drosophila*. Las funciones fisiológicas de la APP no se conocen exactamente, pero en estudios con líneas celulares transfectadas se muestra que modera la supervivencia, el crecimiento y la motilidad celular, junto con el crecimiento y las funciones de axones, que se atribuyen a la liberación de dominios solubles tras la escisión normal de APP (7).

APP contiene 770 aminoácidos (de los cuales  $A\beta$  incluye 28 residuos y 14 residuos adicionales del dominio transmembrana) que codifican la glucoproteína transmembrana tipo 1, esta se puede escindir a través de una vía no amiloidogénica (estado normal) o mediante una vía amiloidogénica (estado de enfermedad) (Figura 2). La APP libera varios polipéptidos que surgen posiblemente debido a empalmes alternativos, glicosilación, fosforilación o proteólisis compleja (7).

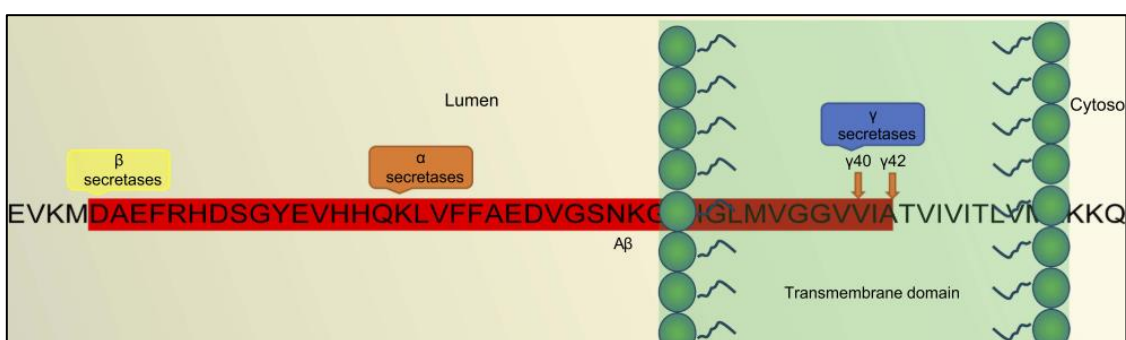


Figura 2. Zona de actuación de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -secretasa en neuronas con la vía amiloidogénica. (7)

En la vía no amiloidogénica la APP sufre escisiones constitutivas y reguladas. La enzima  $\alpha$ -secretasa corta en los residuos 16-17 del dominio  $A\beta$  generando precursores solubles y no patógenos. Su presencia se asocia con señalización sináptica normal, adecuada plasticidad sináptica, aprendizaje, memoria, comportamiento emocional y supervivencia neuronal. Además, libera el dominio intracelular de APP que se transloca en el núcleo y facilita la señalización nuclear. Por otro lado, el procesamiento por  $\alpha$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa produce un pequeño fragmento hidrofóbico p3, que es soluble y tiene un papel en la sináptica normal de señalización (Figura 3) (7).

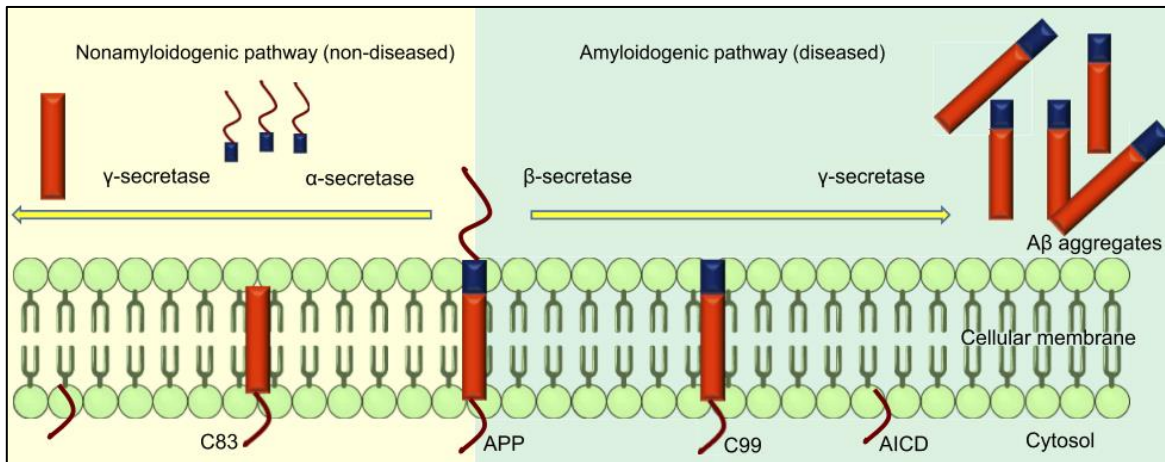


Figura 3. **Splicing alternativo de APP** (7)

En la vía amiloidogénica, la APP se escinde de forma secuencial por las  $\beta$ -secretasa (BACE1) y las  $\gamma$ -secretasa para producir fibrillas  $A\beta$  insolubles y neurotóxicas. Los dos principales polímeros  $A\beta$  ( $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ ) tienden a agregarse en conformaciones de láminas  $\beta$  y tienen un papel fundamental en la formación de placas y la neurotoxicidad inducida (Figura 3). El  $A\beta_{40}$  es abundante y menos neurotóxico que  $A\beta_{42}$ , que es menos abundante, pero altamente insoluble, severamente neurotóxico y debido a la mayor hidrofobicidad de su terminal C expandido tiene una mayor propensión a la agregación (4). La agregación de  $A\beta_{40}$  /  $A\beta_{42}$  da como resultado canales iónicos bloqueados, homeostasis de calcio, aumento del estrés oxidativo en mitocondrias, disminución del metabolismo energético y de la regulación de la glucosa, que contribuye al deterioro de la salud de las neuronas y finalmente a la muerte de las células neuronales (7).

A continuación, el  $A\beta_{42}$  se oligomeriza, se difunde en hendiduras sinápticas e interfiere con la señalización sináptica. En consecuencia, se polimeriza en fibrillas amiloides insolubles que se agregan en placas. Esta polimerización conduce a la activación de quinasas, lo que conduce a la hiperfosforilación de la proteína  $\tau$  asociada a microtúbulos y su polimerización en NFT insolubles (7).

#### 1.1.1.2 Hiperfosforilación de Tau:

La proteína Tau ( $\tau$ ) está codificada por el gen *MAPT* en el cromosoma 17, es expresada principalmente por neuronas en el cerebro y alternativamente se empalma en el dominio N-terminal y el dominio de repetición de unión a microtúbulos para formar seis isoformas distintas que se expresan diferencialmente durante el desarrollo del cerebro (4). El dominio de unión a microtúbulos se ensambla con tubulina para formar microtúbulos maduros y estables que forman una red (7).

La maduración de la proteína natural está sujeta a numerosas modificaciones postraduccionales, Tau se puede fosforilar en 85 residuos diferentes. Los tipos y patrones patológicos de fosforilación de tau pueden ocurrir incluso antes del desarrollo de NFT. En muchos casos, la fosforilación aberrante da como resultado una menor afinidad de unión por los microtúbulos. Este desensamblaje aumenta la reserva citosólica de tau y se cree que promueve la agregación y la fibrilización. Se ha demostrado que la acetilación de tau reduce la degradación de la tau fosforilada y aumenta la patología de la tau, pero también se ha demostrado que inhibe la fosforilación de tau en ciertos residuos y limita la agregación adicional. También se ha demostrado que la acetilación de tau da como resultado una inestabilidad citoesquelética del segmento inicial del axón seguida de una ubicación incorrecta de tau en el compartimento somato-dendrítico (4).

En el caso de que haya una abundancia de A $\beta$  en el medio, se liberan diversas quinasas, entre las que se encuentra la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3 $\beta$ ) y la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5). Cuando entran en contacto con la  $\tau$ , la proteína se hiperfosforila. Su hiperfosforilación conduce a su oligomerización, el túbulo se vuelve inestable debido a la disociación de las subunidades de los túbulos, que se deshacen y luego se convierten en grandes fragmentos de filamentos  $\tau$ , que agregan en NFT. Estos NFT son parches rectos, fibrilares y altamente insolubles en el citoplasma y en los procesos neuronales, lo que conduce a una pérdida anormal de la comunicación entre las neuronas y al procesamiento de señales y finalmente a la apoptosis en las neuronas (Figura 4) (7). Se han propuesto varias de las quinasas como posibles dianas farmacológicas para disminuir la hiperfosforilación y por lo tanto evitar la EA (4).

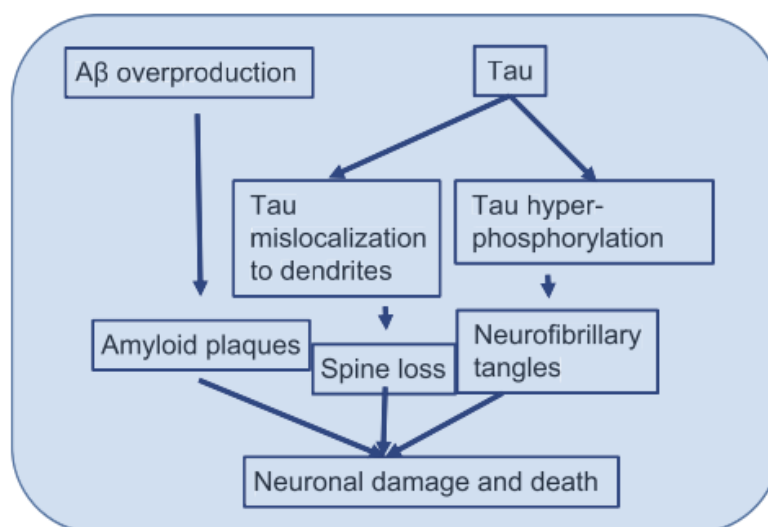


Figura 4 Hiperfosforilación de  $\tau$  (7)

Numerosos estudios durante la última década han demostrado la capacidad similar a un prion de las fibrillas de tau humanas agregadas para autopropagarse. Estos agregados luego se diseminan trans-sinápticamente a regiones cerebrales remotas, anatómicamente conectadas, induciendo una mayor siembra y agregación. Por lo tanto, la siembra y propagación de tipo priónico puede representar un mecanismo por el cual la patología de tau se propaga desde la corteza entorrinal hasta el neocórtex en la EA (Figura 5) (4).

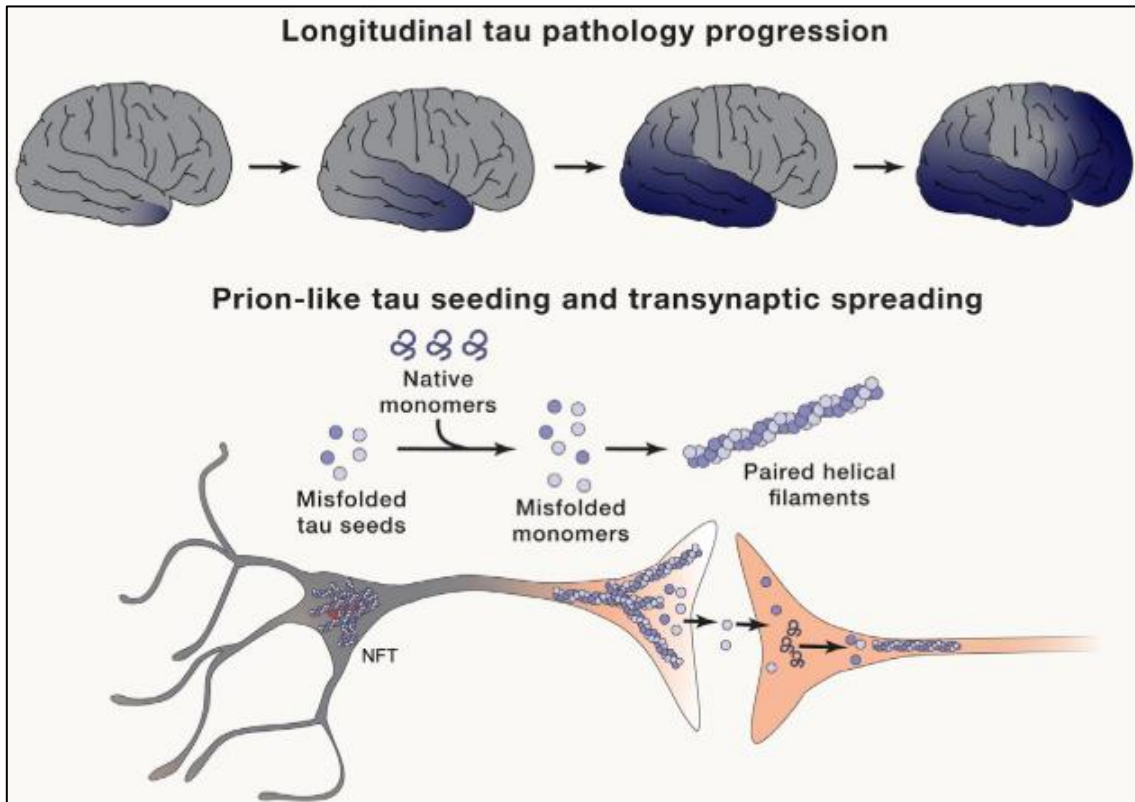


Figura 5. Progresión de tau (4)

### 1.1.1.3 Neurodegeneración

Las beta amiloides y los tau pueden aparecer de forma espontánea e independiente, pero se necesita la combinación de ambas para generar neurodegeneración. Sin embargo, se reconoce cada vez más que la neurodegeneración / lesión, incluso en las regiones cerebrales clásicas de la EA, también ocurre en condiciones distintas de la EA. Esto es particularmente cierto en las personas de edad avanzada en las que las comorbilidades son frecuentes (9).

La agregación de placas y ovillos es seguida por el reclutamiento de microglía alrededor de las placas. Esto promueve la activación microglial y la respuesta inflamatoria local y contribuye a la neurotoxicidad (9).

### 1.1.2 Componente genético

La genética no está incluida en la mayoría de las investigaciones porque el concepto de Alzheimer viene dado por una serie de cambios neuropatológicos. Por el contrario, las variantes genéticas no miden el cambio patológico, si no que indican el riesgo de un individuo de desarrollar un cambio patológico. La penetrancia de las mutaciones autosómicas dominantes en APP, PSEN1 o ApoE es esencialmente del 100%, por lo que se podría afirmar que estas mutaciones confieren un estado patológico. Además, uno puede estar casi seguro de que un portador sintomático de una mutación dominante autosómica tiene un cambio neuropatológico sin necesidad de utilizar biomarcadores como diagnóstico (9).

ApoE es el factor de riesgo genético más fuerte conocido para la enfermedad de Alzheimer. Codifica para una apolipoproteína cuya función principal es servir como proteína de unión a lípidos y participar en el transporte y suministros de lípidos a los tejidos diana. La ApoE se expresa en niveles más altos en el hígado y el cerebro. En el cerebro, la ApoE se expresa principalmente en astrocitos y en menor grado en la microglía (4).

Este gen tiene tres alelos comunes que codifican tres isoformas de proteínas: ApoE4, ApoE3 y ApoE2, cuya diferencia es la sustitución de un único aminoácido en dos posiciones distintas. El alelo ApoE4 disminuye la eliminación de los péptidos de  $\beta$ -amiloides, favoreciendo su producción a partir de APP. Esto ocurre porque puede introducirse en el núcleo y unirse de forma muy eficiente a los promotores de diferentes genes, por ejemplo el gen que produce SirT1, una molécula que se ha relacionado con la longevidad o el factor de activación de NF- $\kappa$ B que favorece la inflamación (10).

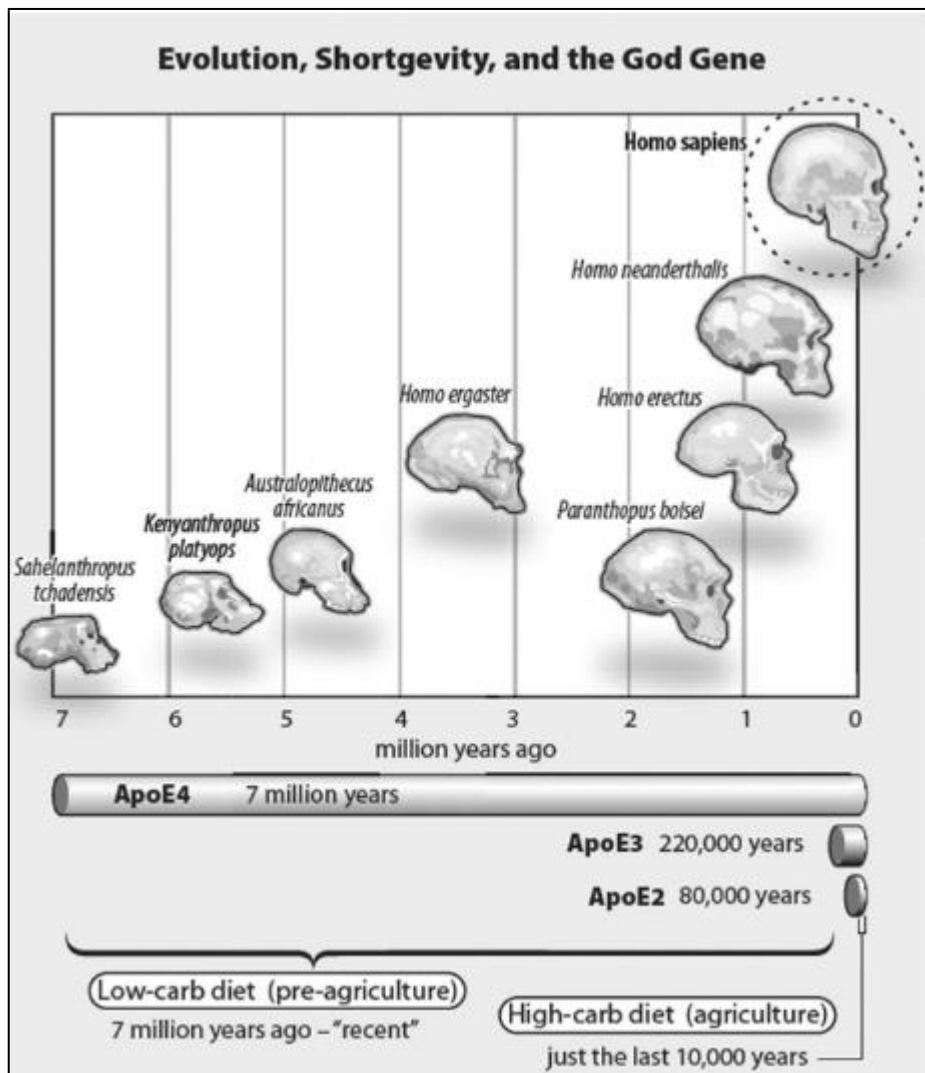


Figura 6. ApoE4 y evolución humana (10)

Llevar un alelo ApoE4 incrementa el riesgo de padecer Alzheimer al 30%, mientras que llevar dos copias lo aumenta sobre el 50%, comparado con el riesgo que tiene una persona que no tiene ninguna copia de este alelo y solo tiene un riesgo del 9% (3). Desde los inicios de la humanidad, todos llevamos dos copias de ApoE4, pero nuestros antepasados llevaban vidas mucho menos sedentarias y por lo tanto la exposición era menos tóxica. Hace unos 220.000 años, un agente mutágeno o una mutación espontánea originó la aparición de ApoE3. Otro evento similar ocurrió hace unos 80.000 años y se generó otro alelo, el ApoE2 (Figura 6). Estos dos últimos genes dan un riesgo genético de Alzheimer de alrededor del 9% en comparación con ApoE4 (10).

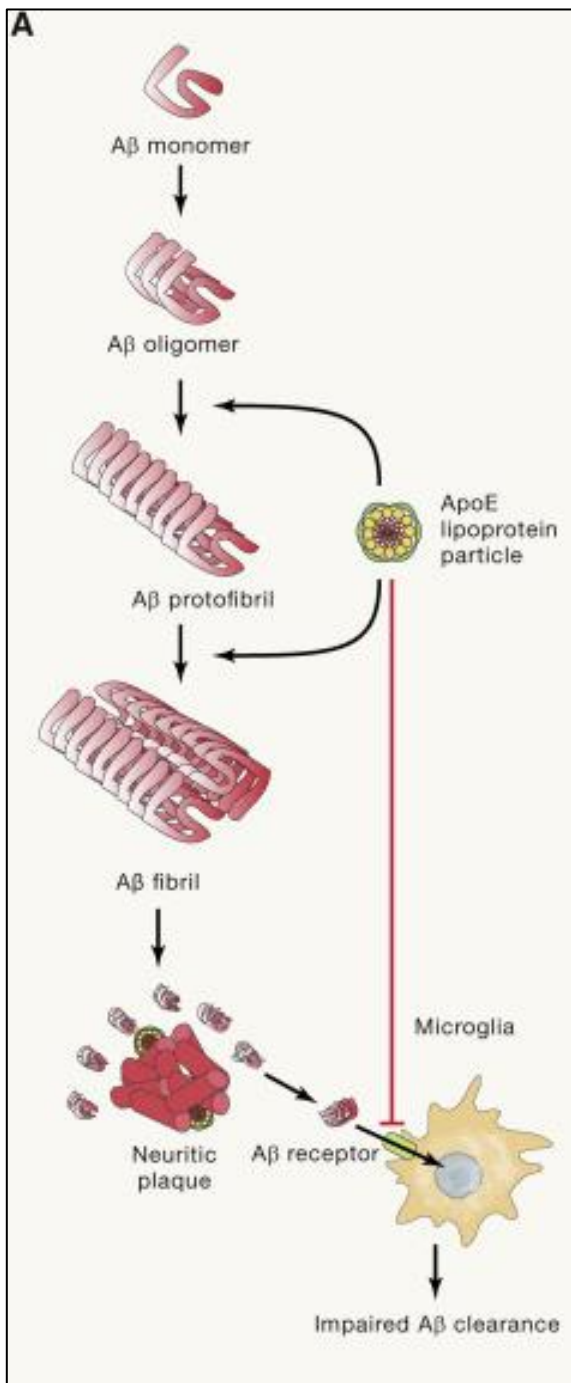
Los estudios de imágenes longitudinales de LCR, MRI y PET de la fase preclínica de la EA han establecido que los portadores del alelo ApoE4 desarrollan un mayor depósito

de amiloide cerebral con la edad, lo hacen a una edad más temprana y acumulan amiloide a una tasa más rápida que los no portadores (4).

Los modelos animales transgénicos de ApoE KO presentan una deposición menor de A $\beta$ , lo que sugiere que la ApoE inhibe el aclaramiento y / o promueve la siembra de A $\beta$ . La ApoE regula el aclaramiento de A $\beta$  uniéndose competitivamente a los receptores de A $\beta$  y bloqueando su captación. De esta manera, los ratones ApoE KO exhiben las tasas más altas de aclaramiento ya que no hay competencia con los receptores A $\beta$ . Los experimentos en los que la expresión de ApoE se controla temporalmente, ya sea mediante la expresión inducible o mediante el uso de oligonucleótidos antisentido

(ASO), resaltan en que la ApoE promueve el cultivo inicial de la deposición de A $\beta$  fibrilar, mientras que el crecimiento de placa posterior después de la siembra parece ser dependiente de otros factores (Figura 7A) (11).

La ApoE también tiene efectos moduladores sobre la patología de tau y la neurodegeneración relacionada con tau (Figura 7B). Tau se une a ApoE3, pero no a ApoE4 *in vitro*. En un estudio reciente que evaluó el efecto de ApoE-TR en el modelo de ratón con tauopatía PS19 (tauP301S), ApoE4 aumentó dramáticamente la neurodegeneración mediada por tau (12). La delección genética de ApoE redujo significativamente el grado de pérdida de neuronas en ratones PS19 y atenuó fuertemente la activación de microglías y astrocitos (4).



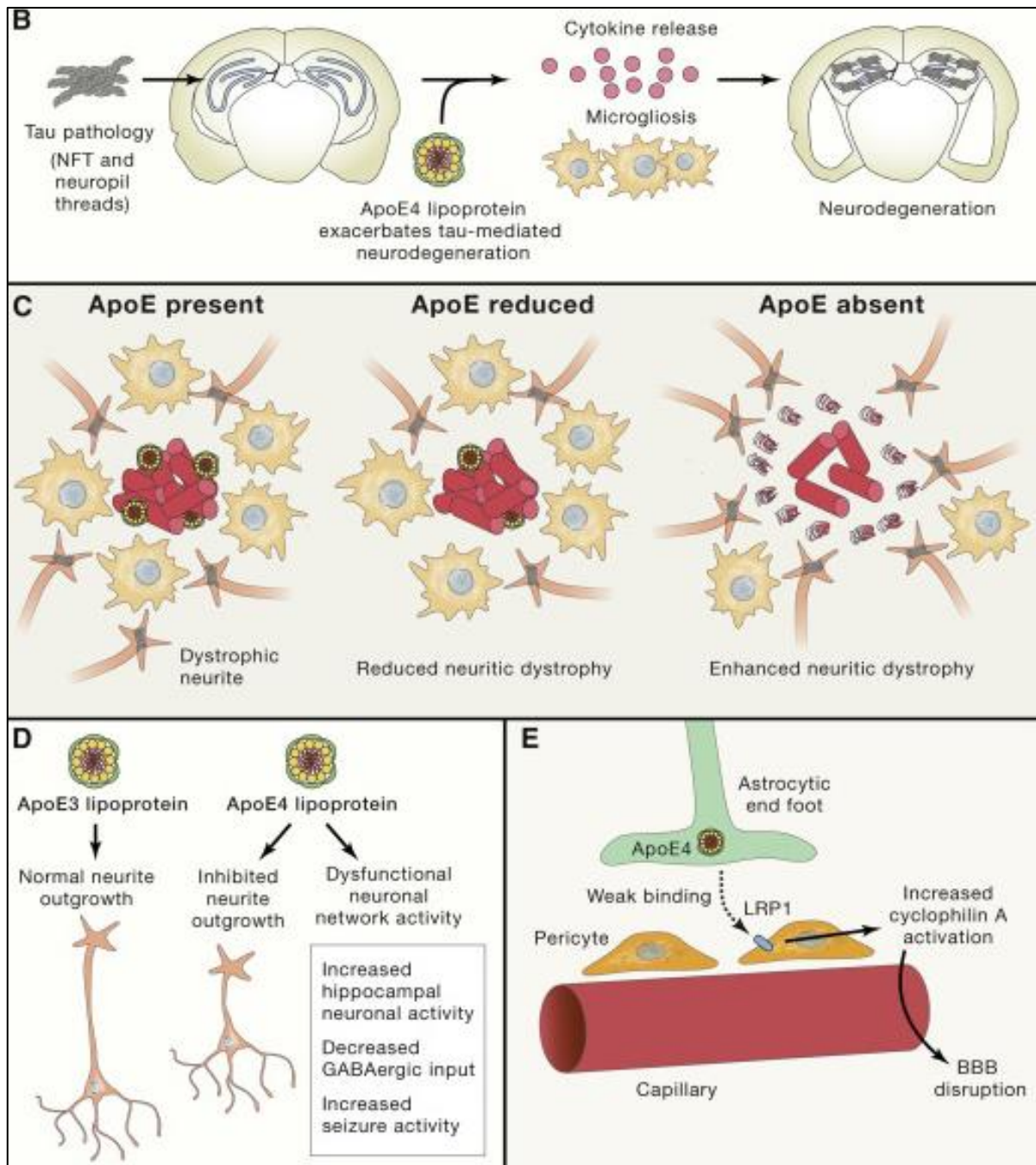


Figura 7 Funciones postuladas de ApoE en la patofisiología de la EA (4)

La ApoE también promueve la agrupación microglial alrededor de las placas de A $\beta$  y, en ausencia de expresión de ApoE, hay una fuerte reducción en la cantidad total de placas fibrilares y el tamaño de la placa, pero un aumento en los depósitos inmunorreactivos de A $\beta$ . Las placas parecen menos compactas con menos microglía y una distrofia neurítica mejorada (13). Esto sugiere que la ApoE juega un papel importante en la mediación de la respuesta microglial a las placas de A $\beta$  (Figura 7C).

En el cultivo de células neuronales primarias, la ApoE4 aplicada exógenamente inhibe directamente el crecimiento de neuritas, mientras que la ApoE3 estimula el crecimiento de neuritas. En un modelo transgénico de ApoE, la expresión de ApoE3 en neuronas fue protectora contra el daño neuronal excitotóxico inducido por el ácido kaínico, mientras que la expresión de ApoE4 neuronal no tuvo efecto protector. En portadores de ApoE4 humanos cognitivamente normales, hay un aumento de la actividad en las redes neuronales del hipocampo. La hiperactividad neuronal puede estar mediada por una entrada alterada de GABA. Los ratones ApoE4-TR tienen un número reducido de interneuronas GABA en el hipocampo, y esto se correlaciona con déficits de aprendizaje y pueden contribuir al deterioro cognitivo (Figura 7D) (14).

ApoE4 también puede mediar efectos neuropatológicos directamente modulando la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE). La falta de señalización mediada por ApoE a través del receptor LRP1 da como resultado la activación de la cascada de señalización proinflamatoria de ciclofilina-A-NFkB-MMP-9. La sobreactivación de esta cascada conduce a la ruptura de la membrana basal de BHE y las uniones estrechas, lo que da como resultado la extravasación de proteínas séricas (p. ej. Fibrina) hacia el parénquima cerebral. La exposición a las proteínas séricas puede contribuir a la neurodegeneración (Figura 7E) (4).

### 1.1.3 Causa epigenética

La epigenética es el estudio de modificaciones en la expresión de genes que no obedecen a una alteración de la secuencia del DNA, si no que estudia las diversas vías moleculares que pueden modificar la expresión de un genotipo en diferentes fenotipos. La epigenética que explora enfermedades neurológicas, neuroepigenética, se ha desarrollado bastante bien y ha sido ampliamente estudiada en enfermedades asociadas al SNC que comprenden entre otras el aprendizaje, patologías y trastornos del comportamiento y cognición. La epigenética es importante para comprender la profundidad del efecto del medio ambiente o genes paternos, hábitos nutricionales, trauma, estrés o discapacidades de aprendizaje, exposición a sustancias químicas o adicción a las drogas en el DNA y alteraciones estructurales resultantes, mutaciones o cambios. En la EA hay una interacción de varios factores como el envejecimiento, los trastornos metabólicos, el efecto y exposición a las variables ambientales y, lo más importante, los factores sociales como la hipertensión, diabetes, obesidad y otros trastornos inflamatorios (7).

Las modificaciones epigenéticas del DNA y de las histonas regulan los perfiles de expresión génica mediante el control de la accesibilidad a la cromatina. Se ha

demostrado que el neuroepigenoma es fundamental en la formación y consolidación de la memoria a través del control dinámico de genes neuronales esenciales para estas funciones. Las alteraciones comunes de metilación asociadas a la EA a menudo aumentan la producción de A $\beta$ . Por ejemplo, los genes APP, apolipoproteína E y BACE1 asociados a EA están hipometilados en cerebros con EA con la activación asociada de BACE1 aumentando los niveles de A $\beta$  a través de la vía amiloidogénica. Por el contrario, el gen de la neprilisina que codifica una enzima que degrada A $\beta$  está hipermetilado y reprimido en la EA, lo que también conduce a un aumento de los niveles de A $\beta$  (Figura 8) (15).

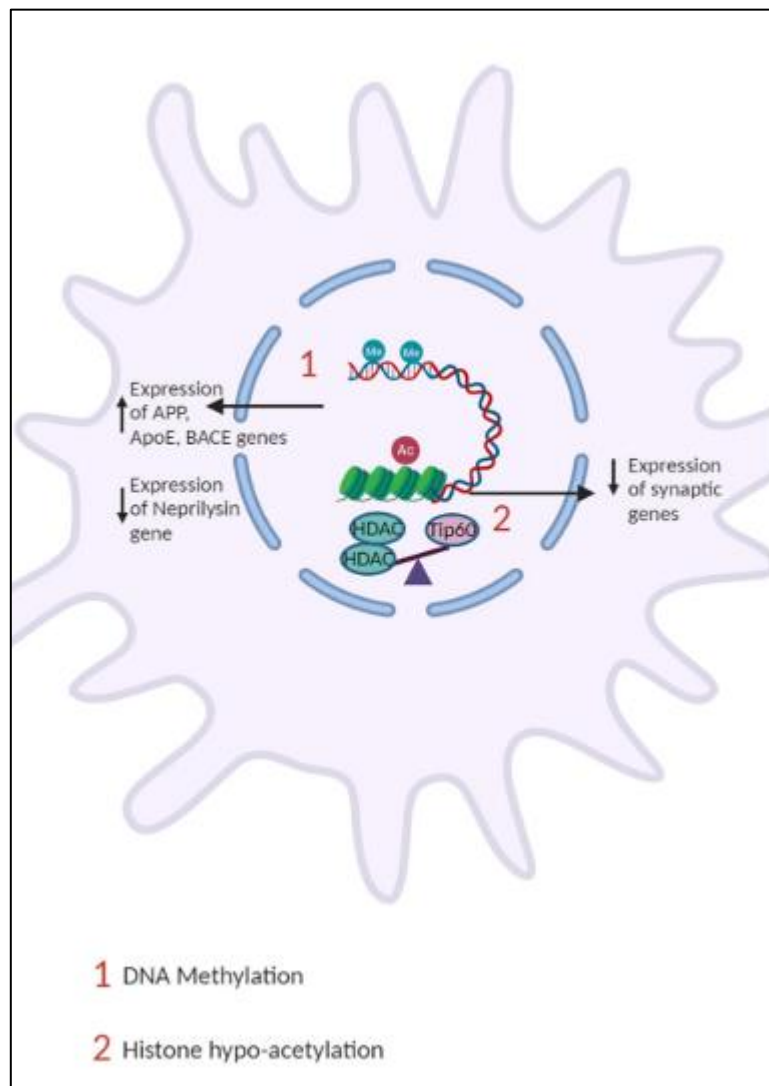


Figura 8. **Control de genes neuroepigenéticos** (15)

Concretamente, los mecanismos epigenéticos mediados por modificaciones de histonas son uno de los principales mecanismos neuropatogénicos en la EA. Dentro del sistema

nervioso de los mamíferos, la enzima modificadora de histonas, la histona deacetilasa 2 (HDAC2) es un regulador negativo crítico de la plasticidad estructural y funcional. El HDAC2 deacetila los sustratos de histonas en el área del promotor de numerosos genes asociados con la plasticidad sináptica. En particular, tanto los cerebros de pacientes con EA como varios modelos de ratones con EA tienen niveles elevados de HDAC2 (16).

Por otro lado, la homeostasis de la acetilación de histonas está regulada por la actividad antagonista de las histonas acetiltransferasas (HAT) y las histonas deacetilasas (HDAC). La desregulación de la acetilación de histonas neurales, causada por un desequilibrio entre HAT Tip60 y HDAC2, es un paso temprano crucial en la patología de la EA. La regulación negativa de HAT y la regulación positiva de HDAC2 provocan la represión epigenética de genes críticos de neuroplasticidad en múltiples tipos de modelos animales y pacientes con EA según diversos estudios. Además, la alteración del control epigenético de Tip60 en el cerebro por la patología de la enfermedad de Alzheimer impulsada por APP o A $\beta$  conduce a la represión de un conjunto de genes neuronales críticos para la función sináptica (Figura 8). Restaurar tales alteraciones en el equilibrio Tip60 / HDAC2 protege contra patologías asociadas a EA en el modelo de EA *Drosophila* que expresa APP (15).

#### 1.1.4 Variables ambientales

##### 1.1.4.1 Infecciones

Estamos constantemente expuestos a posibles invasores, desde virus y bacterias hasta hongos y parásitos. Cuando luchamos contra estos patógenos, una de las formas en que lo hacemos es activando el sistema inmunológico. Aunque sea necesario generar una respuesta inflamatoria para combatir las infecciones agudas, si la amenaza es crónica (puede surgir cuando se está continuamente expuesto a microbios peligrosos) y la respuesta inflamatoria se activa continuamente, es cuando puede surgir un problema (10).

Parte de la forma en que el cuerpo responde a los patógenos invasores es produciendo amiloide, la misma sustancia que forma las placas cerebrales que caracterizan la enfermedad de Alzheimer. Además, al observar el cerebro de un paciente con EA se encuentran diferentes patógenos (*Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *P. gingivalis*, *Herpes simplex virus*...). Cada vez más pruebas científicas apuntan a la conclusión de que después de que un cerebro es invadido por patógenos, produce amiloide, un potente combatiente de patógenos pero que eventualmente se excede, matando las mismas sinapsis y células cerebrales que el amiloide debía proteger (10).

#### *1.1.4.2 Nutrición*

La inflamación también puede surgir sin infección. Se puede desencadenar cuando comemos grasas trans, por ejemplo, las grasas artificiales de los productos horneados y las comidas rápidas, o el azúcar. El cuerpo también genera una respuesta inflamatoria cuando se dañan los intestinos, a menudo por consumir gluten, productos lácteos o cereales. En esta condición, el tracto gastrointestinal desarrolla orificios microscópicos, permitiendo que fragmentos de alimentos o bacterias ingresen al torrente sanguíneo. Todo esto puede desencadenar en inflamación: el sistema inmunológico reconoce estos fragmentos de comida, cree que son invasores extraños y ataca (10).

Cuando la inflamación es causada por la toxicidad del azúcar, generalmente va acompañada de resistencia a la insulina. Cuando se consumen altas concentraciones de glucosa, nuestras células comienzan a producir insulina, que reduce la glucosa en sangre, favoreciendo su entrada en los tejidos. Pero si el cuerpo se vuelve intolerante a la insulina, esta no se degrada y por lo tanto la enzima degradadora de insulina (IDE) se comienza a secretar en altas cantidades. La relación con la EA es que esta enzima también degrada las placas de beta-amiloide, pero la enzima no puede hacer ambas actividades a la vez. Si IDE está descomponiendo la insulina, no puede descomponer el A $\beta$ , por lo que los niveles altos de insulina aumentan el riesgo de EA (10).

Además, el cerebro también necesita factores de apoyo. Entre los compuestos que fortalecen la sinapsis se encuentran el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que se puede aumentar mediante el ejercicio; hormonas como el estradiol y la testosterona, que pueden optimizarse mediante prescripciones o suplementos dietéticos; y nutrientes como vitamina D y ácido fólico. Curiosamente, cuando el cerebro se queda sin compuestos que estimulan la sinapsis y las neuronas, como el BDNF, responde produciendo placas de beta-amiloide (10).

#### *1.1.4.3 Sueño*

La alteración del sueño puede conducir a alteraciones de la atención, la concentración y la memoria de trabajo, pero también puede influir en el desarrollo de la patología subyacente de la EA. Las mujeres con trastornos respiratorios del sueño tienen un mayor riesgo de desarrollar demencia en comparación con los pacientes sin trastornos respiratorios del sueño. Una sola noche de privación del sueño conduce a niveles elevados de A $\beta$ <sub>42</sub> en el líquido cefalorraquídeo (4)

Durante el sueño el espacio entre las neuronas se expande, lo que permite que fluyan más iones de calcio y magnesio. Gracias a estos iones se eliminan los desechos

celulares, entre ellos las placas de amiloide. Además, mientras dormimos no comemos, por lo que el ayuno mejora la sensibilidad a la insulina (10).

Debido a la disminución del metabolismo neuronal nuestras células cerebrales activan la autofagia, que recicla componentes celulares como mitocondrias dañadas y proteínas mal plegadas, mejorando la salud celular. Sin la autofagia, sus células acumularían componentes disfuncionales (4).

El sueño también es un momento de reparación. La hormona del crecimiento aumenta durante el sueño y se producen nuevas células cerebrales de apoyo, entre los muchos procesos reparadores que ocurren durante el sueño (4).

#### 1.1.5 Diagnóstico

Tradicionalmente, un individuo padecía Alzheimer cuando tenía unos determinados síntomas clínicos y se asumió que si un individuo tenía síntomas típicos tendría cambios neuropatológicos en la autopsia. Esta construcción clínico-patológica no se observaba en los pacientes con la enfermedad, por lo que se tuvo que buscar un diagnóstico diferente. Actualmente, se define *in vivo* por biomarcadores y por examen *post-mortem*, no por síntomas clínicos (9).

Los biomarcadores se agrupan en depósitos de  $\beta$ -amiloide, tau patológico y neurodegeneración [AT(N)]. Este sistema de clasificación ATN agrupa diferentes biomarcadores (LCR, resonancia magnética o PET) según el proceso patológico que mide cada uno. El sistema AT(N) es flexible en el sentido de que se pueden agregar nuevos biomarcadores a los tres grupos de AT(N) existentes (9).

Un individuo con evidencia de biomarcadores de depósito de  $A\beta$  (exploración por PET con amiloide anormal o proporción baja de  $A\beta_{42}$  o  $A\beta_{42} / A\beta_{40}$  en LCR) con un biomarcador de tau patológico normal se le asignaría la etiqueta "cambio patológico de Alzheimer" (Tabla 1). El término "enfermedad de Alzheimer" se aplicaría si hubiera evidencia de biomarcadores tanto de  $A\beta$  como de tau patológica (Tabla 1). El cambio patológico de Alzheimer y la EA no se consideran entidades separadas, sino fases anteriores y posteriores del "continuo de Alzheimer" (término que incluye a ambos). Estas definiciones se aplican independientemente de los síntomas clínicos. También cumplen con las especificaciones para funcionar en todo el espectro de la enfermedad: desde el inicio temprano hasta el final de la vida, desde las fases presintomáticas hasta sintomáticas, y para presentaciones clínicas típicas y atípicas (9).

Perfil AT(N)	Categoría de biomarcadores	
A- T- N-	Biomarcador normal	
A+ T- N-	Cambio patológico de Alzheimer	Continuo de Alzheimer
A+ T+ N-	Enfermedad de Alzheimer	
A+ T+ N+	Enfermedad de Alzheimer	
A+ T- N+	Enfermedad de Alzheimer, pero sospecha que el cambio patológico no esté asociado	
A- T+ N-	Cambio patológico sin EA	
A- T- N+	Cambio patológico sin EA	
A- T+ N+	Cambio patológico sin EA	

Tabla 1 **Perfiles y categorías de los biomarcadores** (9)

La limitación que tienen estos biomarcadores es que ninguno es tan sensible como el examen directo del tejido en la autopsia. Por ejemplo, una PET con amiloide negativa no debe equipararse con la ausencia completa de A $\beta$  en el cerebro o incluso con placas neuríticas escasas o ausentes. Los estudios clínico-patológicos sugieren que los niveles bajos de cambios patológicos se asocian con déficits cognitivos sutiles. La cantidad de tau patológica que puede estar presente en el cerebro por debajo del umbral detectable de PET *in vivo* se desconoce en este momento. Por lo tanto, no puede identificar individuos que tienen evidencia biológica de la enfermedad porque todavía no presentan signos o síntomas (9).

En muchas situaciones, sin embargo, la caracterización de biomarcadores de los participantes de la investigación no es posible. La investigación sin biomarcadores ha constituido y seguirá siendo una parte vital del esfuerzo para evaluar los síndromes de demencia y deterioro cognitivo leve.

#### 1.1.6 Tratamientos y terapias

Actualmente existen cinco medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento del deterioro cognitivo y la disfunción en las actividades globales de la EA sintomática. Estos incluyen cuatro inhibidores de la colinesterasa (ChEI: tracrina, donepezil, rivastigmina y galantamina) y la memantina (17).

Durante el curso de la patogenia de EA, se pierden las neuronas colinérgicas (neuronas cuyo neurotransmisor es la acetilcolina (ACh)) que se encuentran por toda la corteza, lo que provoca un déficit colinérgico general. Se cree que esta pérdida de entrada colinérgica contribuye a la atención temprana y la disfunción de la memoria en la EA.

Los ChEI trabajan para revertir esta deficiencia aumentando los niveles sinápticos de acetilcolina. La diferencia entre ellos es su perfil farmacocinético (el donepezil tiene una vida media mucho más prolongada que los demás y se dosifica una vez al día) y formulación (la rivastigmina está disponible como parche transdérmico de liberación continua) pero no en la eficacia general. Algunas de las limitaciones de los ChEIs es que son inestables en la circulación, muestran una captación y biodisponibilidad impredecibles y pueden causar complicaciones gastrointestinales. Con todos los datos disponibles se podría decir que el uso de ChEI en EA es muy leve (4).

Por otro lado, la memantina es un modulador del receptor de NMDA no competitivo que puede actuar para inhibir la neurotoxicidad mediada por glutamato que se desarrolla cuando las neuronas mueren durante la progresión de la EA, aunque el mecanismo exacto de su efecto no está claro. Sin embargo, al igual que con ChEI, el tamaño del efecto es bastante pequeño y la medicación no tiene ningún efecto sobre la progresión de la enfermedad a largo plazo (4).

Además de todas las limitaciones, la estructura de la barrera hematoencefálica representa un obstáculo adicional para obtener una administración eficaz de los fármacos (17). Por lo tanto, todas estas opciones sirven como tratamiento paliativo, solo mejoran moderadamente la cognición y el comportamiento en pacientes con Alzheimer, pero no ralentizan la progresión de la enfermedad (18).

En estos últimos años, se han realizado diferentes estudios con más de 20 compuestos, pero ninguno ha demostrado suficiente eficacia para ralentizar el deterioro cognitivo o mejorar el funcionamiento global, debido a las siguientes razones. Primero, la mayoría de los ensayos fallidos de fase 3 intervinieron en pacientes con EA sintomática leve o moderada. Aunque esto representa una fase intermedia de la enfermedad clínica, esta es en realidad una etapa avanzada de la enfermedad biológica cuando se considera que la patología se acumula en el cerebro con EA 15-20 años antes del inicio de los síntomas clínicos (3). En esta etapa de la patogénesis de la enfermedad, se ha producido una pérdida neuronal y sináptica significativa e irreversible, y la cascada patológica probablemente sería muy difícil de revertir (4). En segundo lugar, es importante reconsiderar los supuestos y comprender la patogenia de la enfermedad. Si bien la hipótesis de la cascada amiloide sigue siendo sólida, los nuevos descubrimientos deben informar y actualizar continuamente nuestra comprensión de la patobiología de la enfermedad, lo que eventualmente conducirá al desarrollo de nuevos enfoques de tratamiento. La cartera clínica actual de EA tiene más de 100 compuestos diferentes que se están probando en varias fases de ensayos clínicos (4).

Algunos de estos ensayos se dirigieron hacia las placas A $\beta$ , porque se consideran moléculas efectoras primarias en la patogénesis de la EA. Las estrategias terapéuticas se centran en el desarrollo de agentes que puedan bloquear la producción de A $\beta$  o eliminar las placas A $\beta$ . Los ensayos clínicos están en curso, pero los resultados iniciales hasta ahora no son alentadores. Los inhibidores de la secretasa  $\beta$  y  $\gamma$ , destinados a bloquear la producción de A $\beta$ , se suspendieron debido a un perfil desfavorable de riesgo / beneficio y al empeoramiento cognitivo. Además, las inmunoterapias A $\beta$ , destinadas a eliminar las placas A $\beta$ , se terminaron debido a la toxicidad y al empeoramiento cognitivo (16).

Otros estudios se dirigieron hacia HAT, ya que, a diferencia de los HDAC, tienen funciones fisiológicas no redundantes. Diferentes HAT muestran una preferencia especializada por las marcas de cromatina específicas del sitio que regulan la expresión génica sináptica y la función cognitiva. Por tanto, los activadores de HAT son una herramienta terapéutica epigenética potencialmente poderosa para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Alternativamente, las moléculas / rutas posteriores reguladas por HAT también pueden ser dirigidas para efectos terapéuticos (16).

En conclusión, la mayoría de los tratamientos para la EA han tenido problemas en los ensayos clínicos con pocos medicamentos que avanza hacia el mercado en los últimos 30 años. Como alternativa al desarrollo terapéutico de moléculas pequeñas, las terapias contra el RNA son una buena plataforma para el tratamiento de trastornos neurológicos, ofreciendo alteraciones seguras y duraderas en la expresión génica después de la administración directa al sistema nervioso central.

## 1.2 Oligonucleótidos antisentido (ASOs)

El RNA representa una diana única para el desarrollo de terapias. Existen varias ventajas en el uso de RNA como una diana terapéutica, como una amplia aplicabilidad a la mayoría de los RNA en la célula, incluidos los RNA no codificantes, la traducción directa de descubrimientos genéticos a programas de descubrimiento de fármacos y la velocidad y eficiencia del proceso de descubrimiento de fármacos (19).

La primera vez que se formuló la idea de los oligonucleótidos antisentido fue en 1967. Se propuso que la unión de sustancias químicas activas a oligonucleótidos dirige estos compuestos a un cierto fragmento de un ácido nucleico complementario al oligonucleótido, de modo que la reacción química ocurre en una región específica del ácido nucleico diana. Desafortunadamente, a mediados de la década de los 80, el progreso se estancó, principalmente por tres razones. En primer lugar, se creía que la estructura hidrófila del fosfato de azúcar de un oligonucleótido impedía que entrara en

las células eucariotas. En segundo lugar, la síntesis de un oligonucleótido diana era difícil y consumía mucho tiempo; los procedimientos y equipos necesarios para automatizar la síntesis de oligonucleótidos aún no se habían desarrollado. Y, en tercer lugar, la información sobre la secuencia genómica de los seres humanos y otros organismos objetivo era escasa (20).

No fue hasta 1998 que la FDA aprobó el primer fármaco antisentido, Fomivirsén, elaborado con un esqueleto de fosforotioato para el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus. Aunque el Fomivirsén se administró localmente como una inyección intravítrea, su uso demostró la posibilidad de que los fármacos desarrollados a partir de oligonucleótidos antisentido pudieran administrarse sistémicamente en el tratamiento de enfermedades humanas (20). A partir de la aprobación de este fármaco, el número de medicamentos aprobados por la FDA ha ido aumentando, lo que indica que son una terapia que está en creciente investigación (Tabla 2).

ASO	Fecha de aprobación	Enfermedad	Nombre comercial
Fomivirsén	1998	Retinitis por citomegalovirus (CMV)	Vitravene™
Inotersén	2018	Amilosis hereditaria mediada por transtirretina (TTR) con polineuropatía (hATTR-PN)	Tegsedi™
Pegatinib	2019	Degeneración muscular de la retina (AMD)	Macugen™
Mipomersén	2013	Hipercolesterolemia familiar homocigótica (HoFH)	Kynamro™
Eteplirsén	2016	Distrofia muscular de Duchenne (DMD)	Exondys 51™
Defibrotide	2016	Enfermedad venooclusiva hepática grave (sVOD) después de un trasplante de médula ósea	Defitelio™
Nusinersén	2016	Atrofia muscular espinal (SMA)	Spinraza™

Tabla 2. Medicamentos ASOs aprobados por la FDA (21)

### 1.2.1 Diversidad y mecanismos de acción

Los ASO son oligonucleótidos de DNA (o RNA) de cadena sencilla u análogos de oligonucleótidos sintéticos, generalmente de entre 12 y 30 nucleótidos de longitud, que están diseñados para unirse al RNA mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick. Los ASO pueden diseñarse para unirse a RNA codificadores de proteínas (RNA mensajeros), así como a RNA no codificantes, como microRNA o long RNA. Después de unirse al RNA diana, el fármaco antisentido puede modular la función del RNA diana mediante diferentes mecanismos. Los mecanismos moleculares a través de los cuales un ASO modula la función del RNA dependen de las modificaciones químicas, la

posición en que se incorporan las modificaciones en el oligonucleótido y en qué parte del RNA diana se une el oligonucleótido (22).

ASO	Entrada en las células	Estabilidad <i>in vivo</i>	Unión al RNA diana	Nivel de eficiencia	Efectos inespecíficos
Fosfodiéster	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado
Fosforotioato	Moderado	Alta	Baja	Alta	Alta
2- MOE	Moderado	Muy elevada	Alta	Alta	Alta

Tabla 3. **Propiedades de los oligonucleótidos antisentido modificados** (20)

Los ASO generalmente incorporan modificaciones en la ribosa para mejorar la afinidad de unión al RNA diana, aumentar la estabilidad metabólica y disminuir los efectos adversos, y modificaciones en el grupo fosfato del enlace fosfodiéster para mejorar la estabilidad metabólica y aumentar la unión a proteínas que favorecen la distribución tisular y la captación celular (Tabla 3). Las modificaciones más utilizadas para aplicaciones del SNC son los oligonucleótidos que contienen modificaciones de fosforotioato y 2'-O-metoxietilo (MOE) (Figura 9) (19). El problema de las modificaciones MOE es que mejoran la unión al RNA diana, pero casi todas reducen significativamente la RNasaH que no escinde el RNA diana. Una de las estrategias utilizadas para evitar esta limitación ha sido el diseño "*gapmer*", mediante el cual las regiones de residuos modificados flanquean una región central no modificada más larga. Estas "alas" modificadas en 2' aumentan aún más la afinidad de unión y la resistencia a las nucleasas, al mismo tiempo que permiten que la región de la brecha central reclute RNasaH (22).

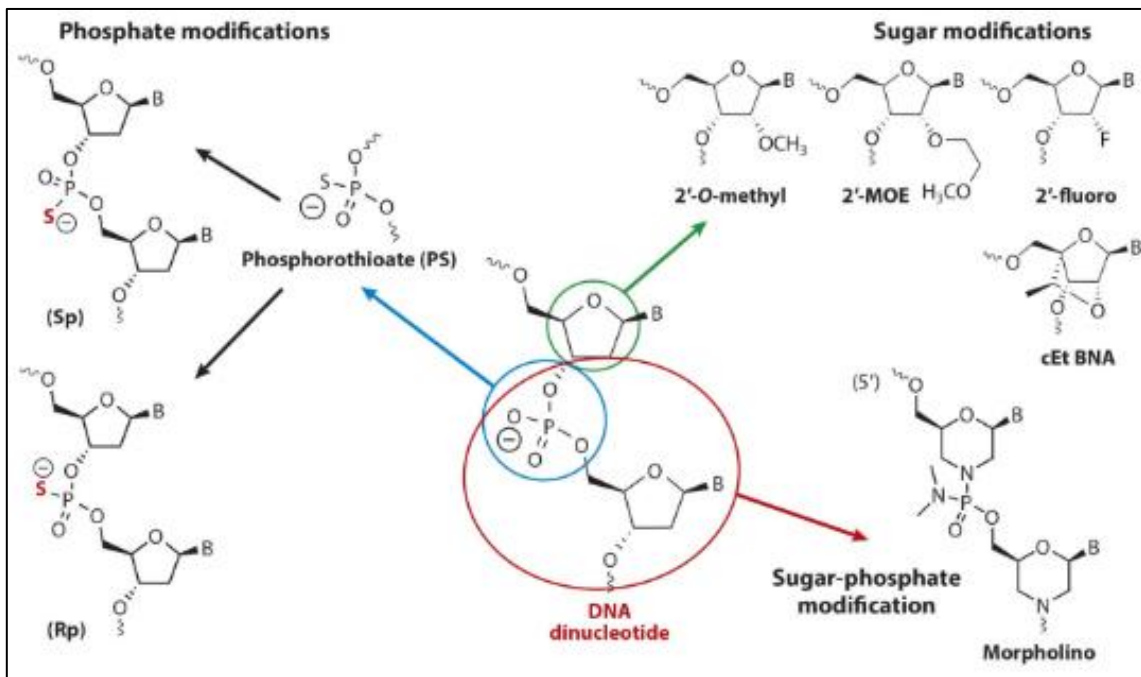


Figura 9. Estructuras químicas de los oligonucleótidos antisentido. (19)

Existen múltiples mecanismos por los cuales los ASOs pueden interferir con la función del RNA (Figura 10). Por un lado, los ASOs pueden bloquear la expresión génica, uniéndose de forma específica al mRNA y estimulando la degradación del híbrido RNA:DNA gracias a las enzimas celulares RNAasa. Por otro lado, también pueden diseñarse para modular el procesamiento de la molécula de RNA, uniéndose a las señales que regulan el splicing para inducir la exclusión de un exón o intrón o mediante la selección o inhibición del lugar de poliadenilación. Finalmente, los ASO se pueden diseñar para interrumpir las estructuras de RNA que inhiben la traducción, bloquear codones AUG cadena arriba (marcos de lectura abiertos corriente arriba o uORF) o unirse a microRNA, que regulan la expresión del gen, para bloquear su interacción con el RNA mensajero (19).

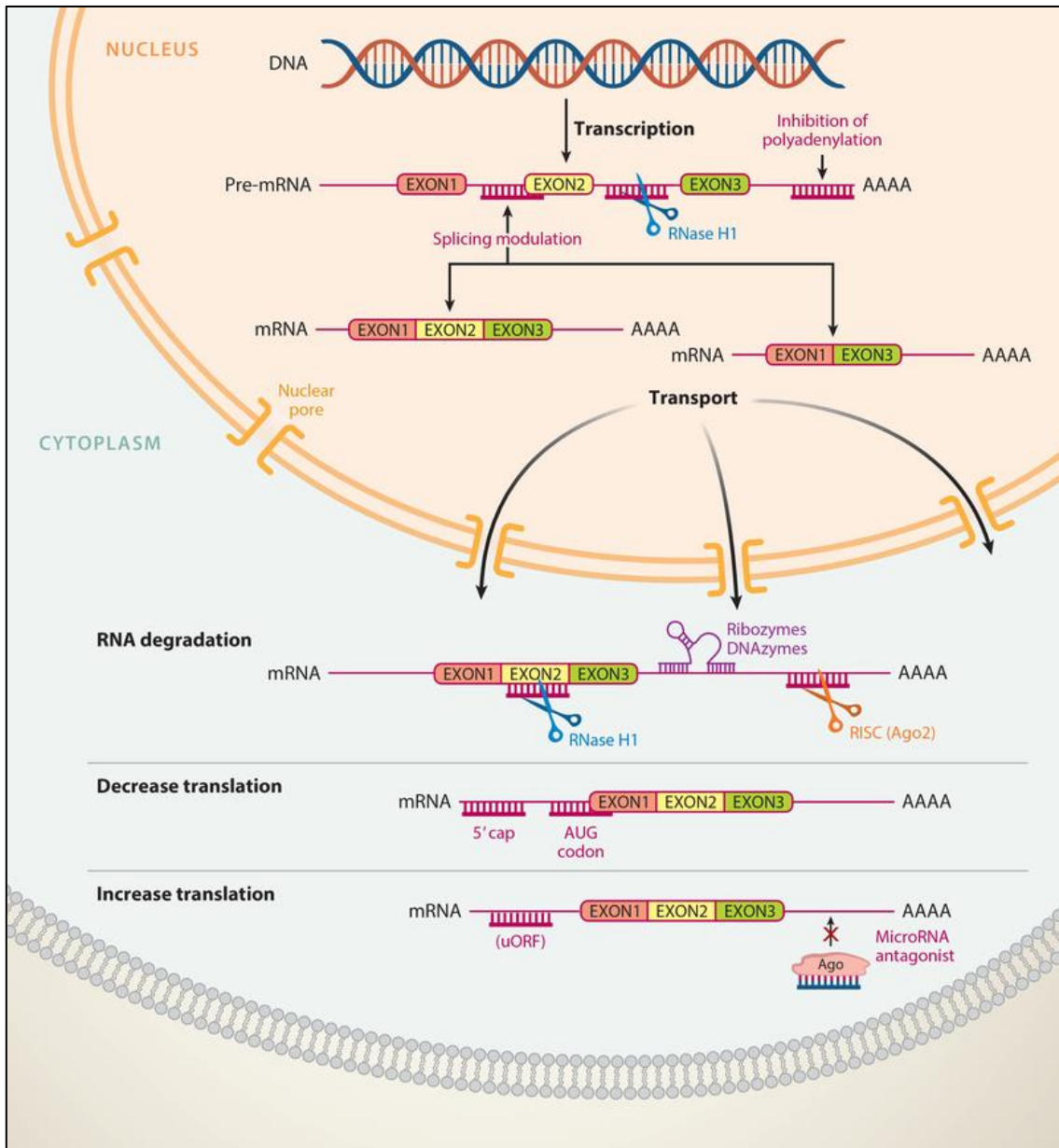


Figura 10. **Mecanismos de acción de los oligonucleótidos antisense** (19)

### 1.2.2 Transporte y entrada de ASOs

Dado que la regulación de la expresión génica es un proceso muy dinámico, que depende del tejido, el entorno y el desarrollo, es deseable regular únicamente la diana del fármaco pretendida en los tejidos afectados por la enfermedad. Dirigir un tratamiento a un tejido específico depende de que el fármaco abandone el sistema circulatorio, ingrese a las células apropiadas y, si está contenido en un vaso portador, se libere en el citoplasma, antes de ser filtrado por los riñones y excretado. Mientras está en circulación, el agente terapéutico está amenazado por la fagocitosis y la destrucción por parte de las células inmunitarias. Los fármacos se introducen más fácilmente en las

células, ya que carecen de las estructuras secundarias o terciarias que pueden formar las moléculas grandes. Sin embargo, estos medicamentos pueden ser degradados por nucleasas, tienen dificultad para cruzar la membrana celular ya que están cargados negativamente y pueden desencadenar una respuesta inmune. Para asegurar una absorción eficiente del fármaco en la ubicación deseada, mientras se minimiza la toxicidad, se están desarrollando una variedad de agentes de administración selectiva (Figura 11) (23).

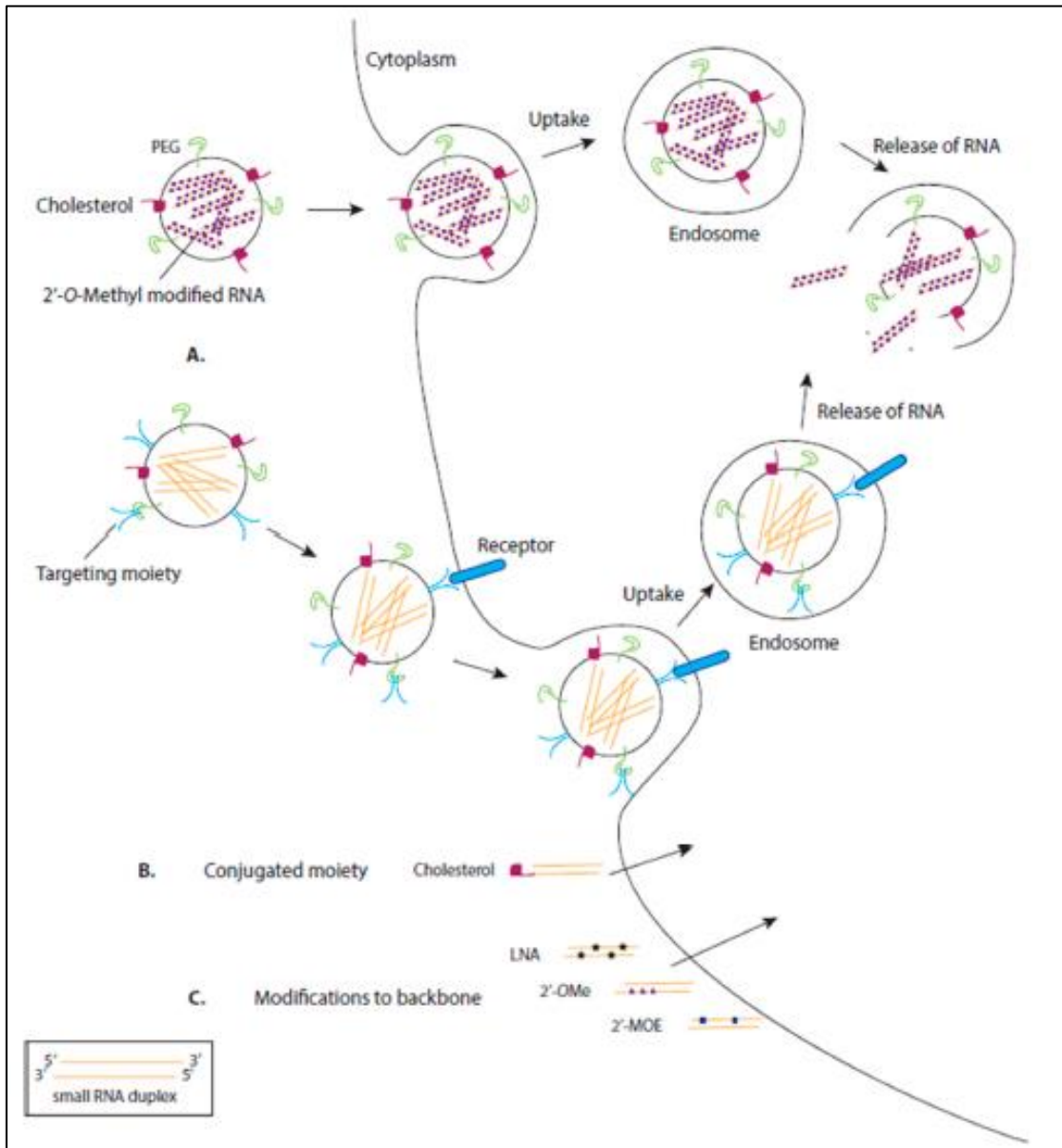


Figura 11. Métodos de administración para terapias basadas en RNA (23)

Algunos fármacos en desarrollo son "autoadministrados", lo que significa que no requieren vehículos de administración adicionales para la distribución dirigida en el cuerpo. Además, las diferentes modificaciones de la estructura química explicadas anteriormente ayudan a superar estos obstáculos, ya que son más específicos, estables y tienen una menor toxicidad al administrarlo por vía intravenosa en comparación con los ASOs no modificados (23).

Sin embargo, muchos fármacos requieren sistemas de suministro de nanopartículas específicos. Para la administración específica de células de terapias, una estrategia que se está investigando es unir un aptámero al fármaco. Un aptámero es una secuencia de ácido nucleico con una estructura 3D única que tiene una alta afinidad por una célula diana elegida (23).

Otra estrategia de administración que protege al fármaco de la degradación y facilita su transferencia a través de la membrana celular es encapsular el fármaco en una vesícula lipídica (Figura 11). Sin embargo, la vía endosómica endógena de la célula a menudo provoca la degradación de las vesículas internalizadas. Para superar este desafío, se han diseñado lípidos catiónicos sintéticos para permitir la liberación del fármaco contenido una vez internalizado en una célula. La adición de conjugados de PEG-lípido al liposoma formando partículas de lípidos de ácidos nucleicos estables mejora la concentración plasmática, la internalización celular y la liberación del fármaco (23).

Finalmente, otro método alternativo son los polímeros sintetizados para formar nanopartículas de fármacos. Los polímeros deben ser biocompatibles para evitar la citotoxicidad y la acumulación del polímero en células y tejidos. Los sistemas de administración de polímeros envuelven el ASO, lo que proporciona protección frente a la degradación y proporciona especificidad al objetivo mediante la adición de ligandos de superficie. Sin embargo, la eficiencia de entrega de estos transportistas es baja. Al igual que con otros métodos de administración, la modificación del polímero con PEG mejora la estabilidad, especificidad y solubilidad del polímero. De forma similar a la administración de liposomas, este sistema requiere un mecanismo para liberar el fármaco del polímero una vez que la nanopartícula se ha internalizado. Algunos polímeros dependen del entorno reductor del citoplasma para escindir los enlaces disulfuro en el polímero, liberando el fármaco unido (23).

## 2. Objetivo

El objetivo es describir los últimos avances terapéuticos basados en ASOs, dirigidos contra RNAs diana involucrados en la Enfermedad del Alzheimer.

## 3. Metodología

El método consiste en una búsqueda bibliográfica de los artículos. En primer lugar, se ha realizado la búsqueda en el NCBI y en la Web Of Science (WOS) siguiendo el posterior criterio:

- Alzheimer: artículos generales que explican las causas, diagnósticos, síntomas y tratamientos
- Alzheimer [AND] Therapies [AND] Tau: artículos más específicos que detallan las diferentes estrategias para minimizar la prolongación de la enfermedad
- Alzheimer [AND] Therapies [AND] ASOs: artículos específicos sobre diversos estudios clínicos que modifican la EA utilizando ASOs

En segundo lugar, se han utilizado artículos referenciados en las publicaciones encontrados usando el anterior criterio, a criterio discrecional.

## 4. Resultados

La enfermedad del Alzheimer se caracteriza patológicamente por dos características principales: placas de beta amiloide difuso y ovillos neurofibrilares intraneuronales, los cuales son posibles dianas de RNA. Los RNA contra la proteína precursora de amiloide (APP), el precursor de los péptidos beta-amiloide tóxicos que se generan en el desarrollo y progresión de la EA, se han mostrado prometedores *in vivo*. Cuando se inyectaron en un modelo de ratón que sobreexpresa hAPP, los RNA de APP dieron como resultado una reducción significativa de los niveles de proteína hAPP en el cerebro y un rescate del aprendizaje y la memoria en ratones jóvenes y ancianos (22). Además de apuntar a la beta amiloide, los RNA contra tau, la proteína que compone los enredos neurofibrilares intraneuronales, también puede proporcionar beneficios terapéuticos. Cuando se cruzó con líneas de ratón que depositaban beta amiloide, la eliminación de tau rescató significativamente los déficits cognitivos inducidos por beta amiloide, lo que sugiere que una terapia de reducción de tau puede ser beneficiosa para el tratamiento de la EA. Es importante destacar que la desactivación de tau *in vivo* parece ser sorprendentemente normal, aunque algunos estudios han informado recientemente que una falta completa de tau durante largos períodos de tiempo puede resultar en un fenotipo de parkinsonismo (22)

### 4.1 ASOs contra APP

Actualmente, hay más de 50 mutaciones diferentes en la APP que están asociadas con la EA. Tanto las mutaciones de APP asociadas a la EA más común, V717I, como las menos comunes dan como resultado un aumento del péptido  $A\beta_{42}$ . Además, se han identificado más de 200 mutaciones de PSEN1 o PSEN2 en la EA de inicio temprano, que conducen a su sobreproducción. Aunque también se ha demostrado, que hay otras mutaciones en la APP que pueden reducir la eficiencia de escisión de  $A\beta$  y proteger contra el desarrollo de Alzheimer (4,24).

Previamente, se han diseñado estrategias antisentido dirigidas contra la expresión de APP *in vivo*. Por ejemplo, en estudios anteriores se informó que la administración de un ASO dirigido a APP en ratones reduce los niveles de proteína APP y mejora la patología fisiológica y conductual en modelos animales de envejecimiento y EA (25). Sin embargo, es importante tener en cuenta que los ASO utilizados en estudios previos están compuestos, en parte, de desoxinucleótidos, que, tras el apareamiento de bases con el RNA crean un sustrato para la RNAasa H, lo que resulta en la escisión del RNA duplicado y una predicción de disminución general en los niveles de proteína APP (24).

Actualmente, se emplean ASOs que puedan inducir un empalme alternativo de APP y produzcan un RNAm que codifica una proteína APP que no puede producir placas de beta amiloide. Es un enfoque novedoso que permite regular a la baja la APP y su proteólisis, pero que no altera los niveles totales de proteína APP. Para ello, se ha generado una isoforma de la proteína APP humana que carece del exón 17, APP $\Delta$ ex17, no codifica los sitios de escisión de la  $\gamma$ -secretasa y por lo tanto no produce el péptido A $\beta$  tóxico (Figura 12). La isoforma APP $\Delta$ ex17 se puede inducir en las células usando un ASO que bloquea la unión y redirige el empalme al exón 18, eliminando el exón 17 del RNAm (24).

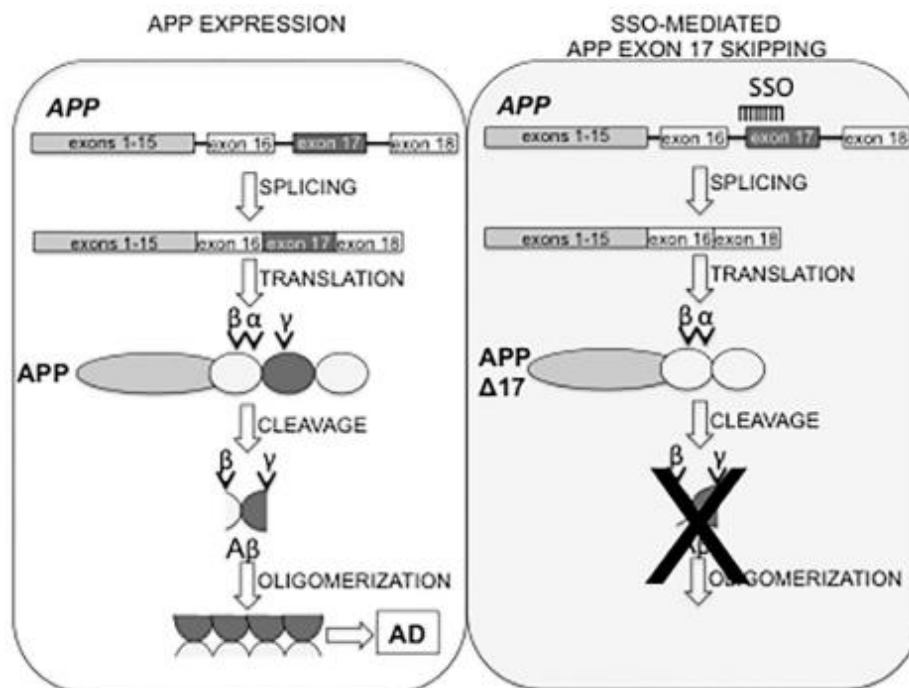


Figura 12. Escisión del exón 17 de la APP inhibe la producción de A $\beta$  (24)

Es importante destacar que el enfoque antisentido tiene como objetivo regular a la baja la sobreexpresión patológica de APP para normalizar los niveles de APP y no se espera que produzca un cambio completo a la isoforma de la proteína APP $\Delta$ ex17. Por tanto, habrá APP de longitud completa disponible para realizar funciones importantes de la proteína intacta después del tratamiento con ASOs. Además, se ha demostrado que la isoforma APP $\Delta$ ex17 se secreta en los medios de cultivo y, por lo tanto, puede preservar algunas de las funciones de la APP secretada, que se ha informado que son neuroprotectoras y están implicadas en la mejora de la potenciación y la memoria a largo plazo (24).

Se necesitarán estudios más detallados que investiguen los efectos a largo plazo de la expresión de APP $\Delta$ ex17 *in vivo* para evaluar de manera definitiva cualquier posible efecto tóxico o beneficioso asociado con la expresión de la nueva isoforma de APP.

Otro estudio relacionado con la formación de A $\beta$  se basa en la escisión secuencial de APP por BACE1 y la  $\gamma$ -secretasa, siendo la escisión de BACE1 el paso limitante de esta vía en el desarrollo de EA esporádica. BACE1 es la principal  $\beta$ -secretasa *in vivo*, por lo que su inhibición podría reducir los niveles de A $\beta$  y evitar el desarrollo del Alzheimer (26).

Durante el año pasado, se estuvieron realizando ensayos clínicos de fase 3 con un parche para la piel que tenía agentes terapéuticos inhibidores de BACE1. Sin embargo, las compañías farmacéuticas han decidido prescindir de este tipo de inhibidores de moléculas pequeñas de BACE1 debido a la toxicidad fuera del objetivo y otras razones de seguridad (18).

Para evitar estos problemas de inespecificidad, el siguiente paso fue desarrollar con éxito un sistema de administración de genes dirigidos a neuronas cerebrales. Los nanocomplejos formados (nanotecnología unida al ASO) penetraron eficazmente en la BHE y entregaron específicamente los ASOs a las neuronas. Después de internalizarse en las neuronas a través de la vía de endocitosis, los nanocomplejos escaparon efectivamente de los lisosomas y ejercieron el efecto de silenciamiento de BACE1. Los hallazgos confirmaron que los nanocomplejos CT / ASO no solo reducen las placas seniles, sino que también proporcionan mejores efectos neuroprotectores y restauran la neurogénesis deteriorada, promoviendo así el rendimiento cognitivo de los ratones transgénicos con EA. Además, los nanocomplejos de CT / ASO no causan hemólisis ni efecto adverso sobre la mielinización, exhibiendo una buena biocompatibilidad. Estos resultados evidenciaron que los nanocomplejos CT / ASO tienen un gran potencial para la terapia de la EA (26).

#### 4.2 ASOs contra Tau

Dirigirse a la producción, desagregación y depuración de  $\beta$ -amiloide ha sido un área activa de descubrimiento e investigación de fármacos durante los últimos 20 años, pero ha tenido un éxito limitado. Las posibles explicaciones incluyen que los tratamientos se inician demasiado tarde, los diseños de los ensayos son inadecuados, se está apuntando a la forma incorrecta de  $\beta$ -amiloide o la hipótesis de  $\beta$ -amiloide es incorrecta (19).

Por ello, recientemente se han comenzado estudios que investigan los efectos de un ASO que disminuya selectivamente el RNAm y la proteína de tau humana (27). Tau es una proteína asociada a microtúbulos codificada por el gen de la proteína Tau asociada a microtúbulos (*MAPT*) localizado en el cromosoma 17 y se expresa principalmente en neuronas. Curiosamente, aunque tau es una proteína intracelular, se ha demostrado que la tau oligomerizada puede propagarse de una célula a otra, provocando la agregación de tau en la célula recién infectada (19).

Para el primer estudio, se generó un ASO *gapmer* MOE que se dirigía hacia *MAPT*, y que consiguió reducir la expresión de Tau en todo el SNC. Los ratones transgénicos (PS19) que expresaban una Tau mutante de P301S humana que fueron tratados con Tau ASO, disminuyeron los agregados de Tau neuronales y prolongaron la vida útil entre 312 y 348 días. (28). En general, los autores observaron una disminución de la carga de tau fosforilada, pérdida de volumen del hipocampo y reducida muerte neuronal, acompañada por una supervivencia prolongada en animales de experimentación, incluidos primates no humanos. Disminuir la abundancia de Tau dirigiendo la expresión del gen *MAPT* puede ser terapéutico para EA. (27).

Aunque también es importante señalar las limitaciones asociadas con este estudio. Si bien se predice que la reducción de tau con oligonucleótidos antisentido en cualquier modelo de tauopatía mostraría un beneficio similar, en este estudio se restringió al modelo de tauopatía de ratón PS19. Para lograr una patología rápida en ratones, el transgén tau se muta con una mutación puntual TauP301S y se expresa en niveles altos. Por lo tanto, es posible que algunos de los efectos que se observan estén asociados con una expresión artificialmente alta de una forma mutante de tau, una advertencia importante al considerar el tratamiento de pacientes con EA que no tienen ni una mutación de tau ni una sobreexpresión de tau. Además, correlacionar los cambios de comportamiento de ratones con déficits cognitivos en humanos es un desafío y no está claro si los beneficios que se observan se traducirían en humanos. Y, por último, aunque los estudios previos de ASO en humanos son alentadores, los ASO empleados en el estudio deben probarse en estudios de toxicología formales antes de que puedan avanzar hacia ensayos clínicos en humanos (28).

Otra de las estrategia terapéuticas contra el gen *MAPT* se basa en emplear otro ASO 2'-MOE. Este tratamiento se centra en las mutaciones que alteran los procesos de empalme del exón 10 (27).

La proteína tau está fisiológicamente involucrada en la estabilización de los microtúbulos, en la señalización intracelular y en la neurogénesis. El cerebro humano

expresa típicamente seis isoformas de la proteína tau derivadas de un solo *MAPT*. Las isoformas difieren según el empalme alternativo dentro del extremo N y una región de dominio de repetición del gen. Una exclusión del exón 10 da como resultado productos de empalme que expresan tau con tres repeticiones de unión a microtúbulos (MTBR), mientras que la inclusión de una región repetida imperfecta que codifica el exón 10 conduce a la expresión de tau que contiene cuatro MTBR (Figura 13). Mientras que el cerebro humano normalmente expresa niveles iguales de proteína tau con tres y cuatro MTBR, se ha observado una alteración de esta relación en varias tauopatías (27). La ventaja de la reducción específica de la proteína tau con cuatro MTBR radica en su selectividad y deja inalterada la cantidad total de tau.

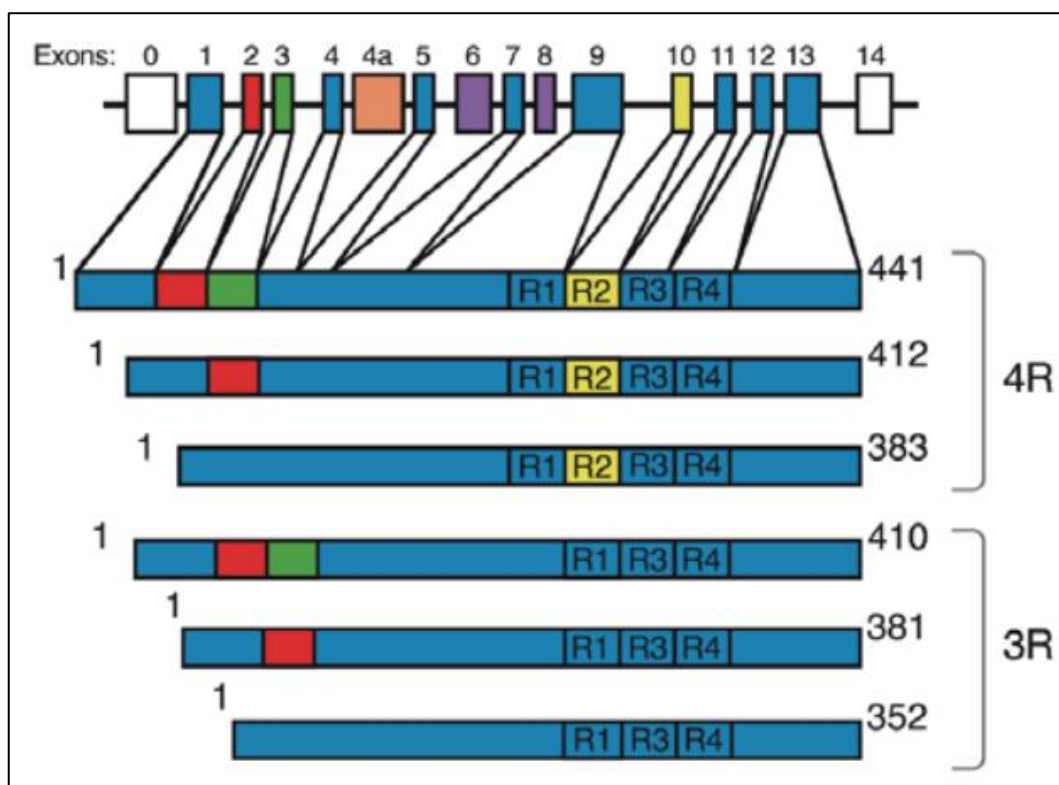


Figura 13. Diferentes isoformas del gen tau *MAPT*. (29)

En relación con este segundo ensayo, una vez finalizaron los estudios de toxicología, se inició un ensayo clínico de fase 1 en pacientes con enfermedad de Alzheimer leve (<https://clinicaltrials.gov> NCT03186989). El ensayo consta de 46 participantes que se encuentran distribuidos por todo el mundo y donde evalúan la seguridad, tolerancia, farmacocinética y farmacodinámica de múltiples dosis del fármaco.

### 4.3 ASOs contra ApoE

El genotipo de apolipoproteína E (ApoE) es el factor de riesgo genético conocido más prevalente para la EA de aparición tardía. ApoE interactúa con varios receptores que son miembros de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR). Estos receptores parecen estar implicados en la mayoría de los aspectos de la función ApoE normal. Por esta razón, los receptores de ApoE pueden ser dianas terapéuticas prometedoras para mitigar los efectos de la toxicidad en la EA (30).

Un miembro de la familia LDLR, el receptor 2 de la apolipoproteína E (ApoER2 o LRP8), provoca efectos celulares a través de sus interacciones con ApoE. La señalización de ApoER2 requiere 59 aminoácidos que están codificados por el penúltimo exón del gen empalmado alternativamente, documentado como exón 19 en ratones y exón 18 en humanos. Las isoformas de la proteína ApoER2 que carecen del exón 19 (o 18 en humanos) están asociadas con defectos en el almacenamiento de la memoria a largo plazo y el aprendizaje espacial, quizás a través de un efecto negativo dominante sobre la isoforma activa incluida en el exón 19. Curiosamente, se ha observado una disminución significativa en la abundancia de isoformas de RNAm de ApoER2 que incluyen el exón 19 y codifican la forma activa de ApoER2 en muestras de tejido cerebral de autopsia de individuos con EA en comparación con muestras con deterioro cognitivo leve (MCI) y no cognitivo (NCI) (31).

El efecto de la disminución en la inclusión del exón 19 de ApoER2 y la consecuente mejora en el aprendizaje cuando la inclusión aumenta en ratones EA probablemente esté mediada por ligandos de ApoER2 como Reelin y ApoE. Se puede deducir que la desregulación de ApoER2 crea un desequilibrio en la vía de señalización, que puede verse agravado por cambios adicionales en la abundancia o forma de sus ligandos. Por ejemplo, se ha demostrado que una disminución de Reelin está asociada con la acumulación de amiloide, y que su sobreexpresión mejora la cognición en modelos de ratón de EA (Figura 14). Un informe reciente también ha demostrado que cuando Reelin se elimina en ratones, se vuelven sensibles a la supresión sináptica inducida por amiloide y tienen déficits de aprendizaje y memoria. Los modelos proponen que estos efectos están mediados por una interacción directa entre el péptido A $\beta$  y Reelin, lo que limita la señalización de Reelin a través de sus receptores (31).

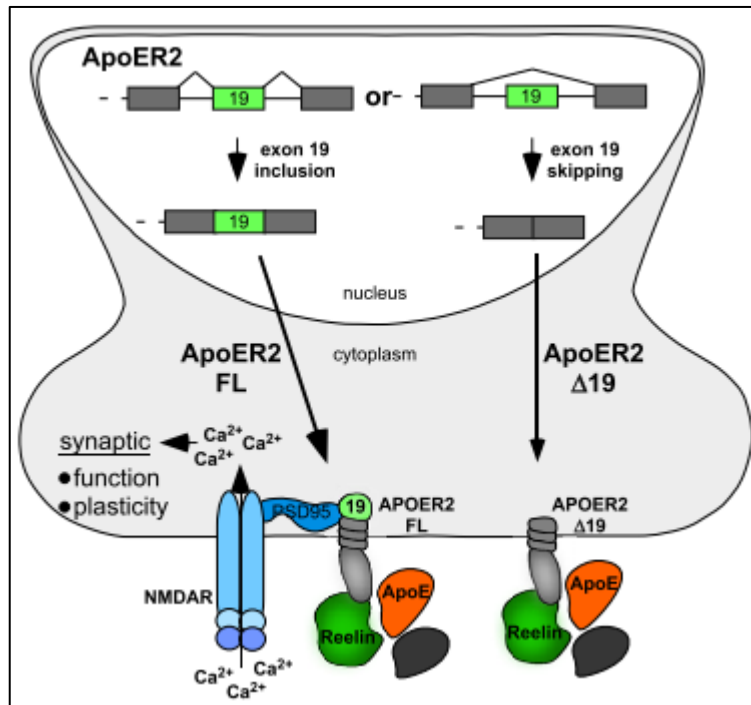


Figura 14. Esquema de la expresión y señalización de ApoER2 a través de la unión de ligandos (31)

La causa exacta de la disminución de la inclusión del exón 19 de ApoER2 en cerebros con EA no está clara. Hay dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los exones que flanquean al exón 19 (rs3737983 (2622T> C) y rs5174 (R952Q)), aunque no se ha demostrado claramente una asociación de estos SNP con la EA ni un efecto sobre el empalme. Aparte de las variaciones de la secuencia genómica, pueden producirse alteraciones en la expresión de proteínas implicadas en el corte y empalme alternativo en la EA y provocar cambios en la inclusión del exón 19 de ApoER2. De hecho, se han informado cambios generalizados en el empalme alternativo en la EA. La regulación del empalme alternativo del exón 19 es probablemente un proceso complejo que puede controlarse mediante una serie de factores (31).

En el estudio se sugiere que la interrupción del sitio de unión de SRSF1 (regulador del empalme del exón 19) puede ser un mecanismo por el cual ASO-21 activa el empalme del exón 19 (Figura 15). Se ha demostrado que este ASO aumenta la inclusión del exón 19 en un modelo de ratón transgénico para la EA y también mejora la función sináptica y los déficits de comportamiento en estos ratones que están asociados con la neurodegeneración y la función cognitiva deteriorada en el aprendizaje y la memoria. El problema es que no hay evidencias en que la expresión de SRSF1 esté aumentada en

la EA y, por lo tanto, no se puede concluir que SRSF1 esté involucrada en el corte y empalme del exón 19 desregulado que se observa en el Alzheimer (31).

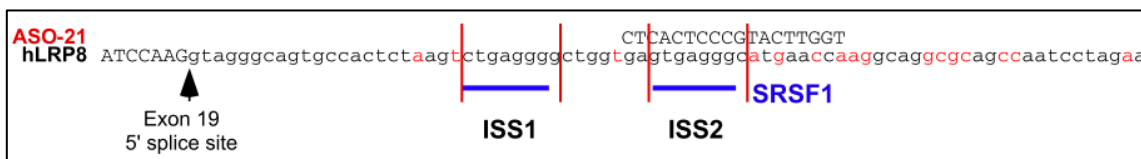


Figura 15. **Secuencia y región objetivo de ApoER2 de ASO-21.** Las secuencias exónicas e intrónicas están en mayúsculas y minúsculas, respectivamente. Los nucleótidos conservados entre ApoER2 humana y de ratón se muestran en negro y los nucleótidos no conservados están en rojo. Los sitios de unión previstos y conservados para los factores de empalme se etiquetan como silenciadores de empalme intrónico (ISS1 e ISS2). (31)

Además, tampoco se encuentran evidencias de que el tratamiento con ASO-21 altere la abundancia de A $\beta$  en ratones AD. Esto sugiere que la mejora en la función sináptica asociada con el aumento en el empalme del exón 19 no está mediada por una reducción directa en A $\beta$ , sino más bien puede resultar de una mayor competitividad de la isoforma ApoER2 que contiene el exón 19 para Reelin. En consecuencia, la probabilidad mejorada de formar un complejo de señalización ApoER2 / Reelin funcional. Independientemente del mecanismo exacto, nuestro estudio demuestra un vínculo entre ApoER2 y la EA y valida el receptor como un objetivo para la terapéutica de la EA (31).

En conclusión, el ASO que se describe en el artículo, ASO-21, podría considerarse un potenciador de la actividad del receptor ApoER2 en la señalización a través del receptor gracias a ligandos como ApoE y Reelin. Los receptores han sido el objetivo de muchos programas de descubrimiento de fármacos para la EA, en los que se persiguen tanto agonistas como antagonistas de la actividad. Un fármaco que ha sido aprobado para el tratamiento de la EA, la memantina, es un antagonista de un receptor LDLR, aunque ha tenido efectos variables sobre la memoria y la cognición en humanos y no ralentiza la progresión de la enfermedad. En general, la evidencia sugiere que las intervenciones terapéuticas que modulan la neurotransmisión pueden ser una forma eficaz de tratar los síntomas conductuales y psicológicos de la enfermedad de Alzheimer si se puede desarrollar un efector lo suficientemente potente (31).

#### 4.4 ASOs contra HDAC2

La formación y retención de la memoria a largo plazo requieren cambios transcripcionales coordinados que están regulados por modificaciones en el epigenoma. La disminución de la acetilación mediante la inhibición de las histonas acetiltransferasas (HAT) deteriora la memoria a largo plazo, mientras que el aumento de la acetilación

mediante la inhibición de las histonas deacetilasas (HDAC) mejora la memoria a largo plazo. En los mamíferos existen once isoformas de proteínas HDAC clásicas. Concretamente, HDAC2 y HDAC3, son responsables de regular la plasticidad sináptica y la formación de memoria en relación con otras isoformas de HDAC (32).

La eliminación condicional de HDAC2 en el cerebro provoca una mejora de la memoria, sin afectar la locomoción ni la ansiedad. Esto lo convierte en un objetivo atractivo para la represión sostenida, y nuestros estudios indican que los ASO HDAC2 proporcionan una vía poderosa para generar cambios beneficiosos duraderos en la organización epigenómica en el sistema nervioso central. El bloqueo de la expresión conduce a una mejora cognitiva en ratones de tipo salvaje, lo que indica que la supresión de isoformas de HDAC individuales puede ser beneficiosa para mejorar la memoria a largo plazo (32).

Aún no se entiende completamente qué cambios transcripcionales provocados por la supresión a largo plazo de los niveles de HDAC2 son necesarios para la mejora de la memoria. Sin embargo, en el estudio se encuentra que la represión inducida por ASO está asociada con cambios secundarios en la expresión de redes de genes en el cerebro que previamente han estado implicados en la formación de recuerdos. Por ejemplo, los genes asociados con la señalización de ERK se alteran en el hipocampo después de reducir la expresión de HDAC2, y esta vía de señalización es esencial para la formación de la memoria y la potenciación a largo plazo de la actividad sináptica. También observan cambios en los genes asociados con las funciones inmunes en el hipocampo y la corteza. Los genes de esta categoría funcional juegan un papel en la promoción de la cognición y la plasticidad sináptica (32).

Años atrás, un grupo de científicos diseñaron un ASO dirigido al RNAm de HDAC2. Este ASO HDAC2 provocó una mejora sustancial de la memoria en ratones de tipo salvaje en las pruebas de memoria de ubicación de objetos, y rescató la memoria deteriorada en un modelo de ratón con autismo. Sin embargo, las características farmacológicas de este ASO no se han explorado lo suficiente, por lo que se desconocen sus propiedades en los humanos (32).

Los ASO pueden diseñarse para utilizar varios mecanismos de alteración de la expresión génica mediante la modulación de la estabilidad, el empalme y la traducción del RNAm. El estudio revela otro mecanismo más para bloquear directamente la progresión transcripcional a través del gen. Los RNA no codificantes que promueven la transcripción, como el RNAc y los RNA potenciadores, alteran la accesibilidad del DNA a la RNA Pol II. La transcripción no poliadenilada de HDAC2 que es potencialmente parte de un RNAc podría reducir la accesibilidad después de que un ASO se ensamble.

Esto puede explicar la interrupción de la progresión de la RNA Pol II a través del gen *HDAC2*. Los hallazgos obtenidos en el artículo demuestran que un ASO dirigido reduce el RNAm de HDAC2 y que el estancamiento de la transcripción está corriente arriba del sitio de destino del ASO (Figura 16). El bloqueo directo de la transcripción podría ayudar a explicar la resistencia del efecto de una sola aplicación de ASO. Parece que al menos una cuarta parte de los genes tiene una señal suficiente para ser un candidato potencial para esta estrategia de represión (32).

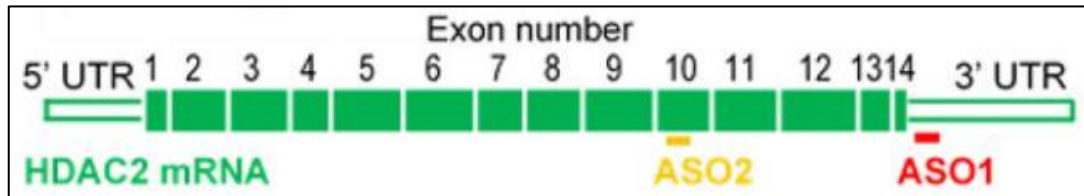


Figura 16. Posición de ASOs en HDAC2. (32)

En el estudio se informa que el ASO dirigido a HDAC2 es duradero y específico. Una sola inyección de ASO dirigido a HDAC2 *in vivo* redujo el RNAm de HDAC2 durante 16 semanas y aumentó la memoria durante 8 semanas. Tiene una alta selectividad por HDAC2, pero no por otras isoformas de histona deacetilasa relacionadas. Además, afecta los niveles de expresión de otros genes en el cerebro. Aunque el ASO HDAC2 utilizado en este documento fue diseñado para mediar la degradación del RNAm diana, también encontramos que el ASO provoca la represión de la transcripción del RNA del sitio final de la postranscripción reguladora de HDAC2, que estimula la supresión transcripcional de su gen objetivo y detiene la RNA polimerasa II (Figura 16) (32).

En general, estos resultados apuntan a la necesidad de una mejor comprensión de las funciones multifacéticas que desempeñan los genes relacionados con la inmunidad para comprender completamente su papel en la actividad sináptica y la formación de recuerdos

## 5. Discusión

Como se ha podido observar en los resultados, se están investigando diferentes ASOs para disminuir la EA. Aquellos que están enfocados en las placas de beta-amiloide y la proteína tau podrían disminuir la sintomatología de la enfermedad, inhibiendo su progresión. En cambio, los ASOs enfocados en el gen *ApoE* y las histonas deacetilasas podrían prevenir su aparición completa. Por ello en algunos artículos proponen realizar terapias combinadas que actúen contra diferentes partes de la afección.

El problema general que aún no se ha conseguido eliminar es que, al no conocer exactamente todos los mecanismos de acción de la enfermedad del Alzheimer, no se puede actuar de una única forma. Además, cada individuo puede tener diferentes afecciones, lo que dificulta el estudio de una única terapia. La solución sería conseguir realizar diagnósticos completos y personalizados para cada paciente y con ello decidir la terapia más efectiva y segura.

En general, los ASOs se han convertido en una terapia muy eficaz en las últimas décadas y por ello se han realizado muchos estudios en diversas enfermedades. Siguiendo esta marcada tendencia por otros medicamentos ASO que ya se encuentran en el mercado (Tabla 2), se podría suponer que también son el futuro inmediato para el tratamiento y la prevención de la enfermedad del Alzheimer.

## 6. Conclusión

Las investigaciones de la EA se encuentran en un momento único. A pesar de los avances significativos en nuestra comprensión de la patobiología de la EA, aún no hemos identificado una terapia modificadora de la enfermedad que haya demostrado su eficacia en humanos. Si bien los análisis bioquímicos, los estudios *in vitro* e *in vivo*, los análisis genéticos y los estudios de imágenes longitudinales apoyan firmemente el papel de la agregación de A $\beta$  en el inicio de la patogénesis de la enfermedad, los ensayos clínicos realizados no han dado resultado. Hasta ahora, las terapias basadas en amiloide parecen ser ineficaces para modificar el curso de la enfermedad de la EA sintomática.

Por ello, los ASOs son la actual alternativa a las terapias clásicas debido a sus ventajas. Son muy específicos gracias al apareamiento de bases de Watson y Crick y muy baratos y estables en comparación con otras terapias. Además, poseen la capacidad de manipular selectivamente el procesamiento del RNA con el fin de aumentar o disminuir los niveles objetivo totales. Actualmente hay varios medicamentos que se encuentran en ensayos clínicos para determinar si son modificadores de la enfermedad.

## 7. Bibliografía

1. Garre-Olmo J. Epidemiology of alzheimer's disease and other dementias. *Revista de Neurologia* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 Feb 2];66(11):377–86. Available from: <https://www.neurologia.com/articulo/2017519>
2. CEAFA. Censo de las personas con alzheimer y otras demencias en España [Internet]. 2017 [cited 2021 Feb 1]. Available from: <https://www.ceafa.es/es/que-comunicamos/publicaciones/censo-de-las-personas-con-alzheimer-y-otras-demencias-en-espana>
3. Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, et al. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2021 Feb 1];15(7):888–98. Available from: </pmc/articles/PMC6646097/?report=abstract>
4. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* [Internet]. 2019 Oct 3 [cited 2021 Jan 29];179(2):312–39. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
5. Alzheimer | Empresas Paré [Internet]. [cited 2021 May 15]. Available from: <https://empresaspare.wordpress.com/alzheimer/>
6. Donoso A, Behrens I. Clinical variants of Alzheimer disease. *Rev Méd Chile*. 2004;133:477–82.
7. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis,diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2019;14:5541–54. Available from: <http://doi.org/10.2147/IJN.S200490>
8. Hanseeuw BJ, Betensky RA, Jacobs HIL, Schultz AP, Sepulcre J, Becker JA, et al. Association of Amyloid and Tau with Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. *JAMA Neurol* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2021 Feb 4];76(8):915–24. Available from: </pmc/articles/PMC6547132/?report=abstract>
9. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease [Internet]. Vol. 14, *Alzheimer's and Dementia*. Elsevier Inc.; 2018 [cited 2021 Jan

- 29]. p. 535–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
10. Bredesen D. The End of Alzheimer's: The First Programme to Prevent and Reverse the Cognitive Decline of Dementia. 2017. 271 p.
  11. Liu CC, Zhao N, Fu Y, Wang N, Linares C, Tsai CW, et al. ApoE4 Accelerates Early Seeding of Amyloid Pathology. *Neuron*. 2017 Dec 6;96(5):1024-1032.e3.
  12. Shi Y, Yamada K, Liddel SA, Smith ST, Zhao L, Luo W, et al. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* [Internet]. 2017 Sep 28 [cited 2021 Feb 5];549(7673):523–7. Available from: </pmc/articles/PMC5641217/?report=abstract>
  13. Ulrich JD, Ulland TK, Mahan TE, Nyström S, Peter Nilsson K, Song WM, et al. ApoE facilitates the microglial response to amyloid plaque pathology. *J Exp Med*. 2018 Apr 1;215(4):1047–58.
  14. Najm R, Jones EA, Huang Y. Apolipoprotein E4, inhibitory network dysfunction, and Alzheimer's disease [Internet]. Vol. 14, *Molecular Neurodegeneration*. BioMed Central Ltd.; 2019 [cited 2021 Feb 7]. p. 1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0324-6>
  15. Karisetty BC, Bhatnagar A, Armour EM, Beaver M, Zhang H, Elefant F. Amyloid- $\beta$  Peptide Impact on Synaptic Function and Neuroepigenetic Gene Control Reveal New Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease [Internet]. Vol. 13, *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2020 [cited 2021 Feb 8]. Available from: </pmc/articles/PMC7693454/?report=abstract>
  16. Atluri VSR, Tiwari S, Rodriguez M, Kaushik A, Yndart A, Kolishetti N, et al. Inhibition of Amyloid-Beta Production, Associated Neuroinflammation, and Histone Deacetylase 2-Mediated Epigenetic Modifications Prevent Neuropathology in Alzheimer's Disease in vitro Model. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2020 Jan 15 [cited 2021 Feb 9];11. Available from: </pmc/articles/PMC6974446/>
  17. Binda A, Murano C, Rivolta I. Innovative therapies and nanomedicine applications for the treatment of alzheimer's disease: A state-of-the-art (2017–2020). *Int J Nanomedicine*. 2020;15:6113–35.
  18. Zhou Y, Zhu F, Liu Y, Zheng M, Wang Y, Zhang D, et al. Blood-brain barrier-penetrating siRNA nanomedicine for Alzheimer's disease therapy. *Sci Adv*. 2020;6(41).

19. Bennett CF, Krainer AR, Cleveland DW. Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Neurosci*. 2019;42:385–406.
20. Oberemok V V., Laikova K V., Repetskaya AI, Kenyo IM, Gorlov M V., Kasich IN, et al. A half-century history of applications of antisense oligonucleotides in medicine, agriculture and forestry: we should continue the journey. *Molecules*. 2018;23(6).
21. AccessMedicine – Internal Medicine Clinical Resource [Internet]. [cited 2021 May 22]. Available from: <https://accessmedicine.mhmedical.com/>
22. DeVos SL, Miller TM. Antisense Oligonucleotides: Treating Neurodegeneration at the Level of RNA. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2013 Jul 18 [cited 2021 Feb 23];10(3):486–97. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13311-013-0194-5>
23. Bajan S, Hutvagner G. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells*. 2020;9(1):1–27.
24. Chang JL, Hinrich AJ, Roman B, Norrbom M, Rigo F, Marr RA, et al. Targeting Amyloid- $\beta$  Precursor Protein, APP, Splicing with Antisense Oligonucleotides Reduces Toxic Amyloid- $\beta$  Production. *Mol Ther* [Internet]. 2018 Jun 6 [cited 2021 Feb 24];26(6):1539–51. Available from: </pmc/articles/PMC5986716/>
25. Kumar VB, Farr SA, Flood JF, Kamlesh V, Franko M, Banks WA, et al. Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides*. 2000 Dec 1;21(12):1769–75.
26. Wang P, Zheng X, Guo Q, Yang P, Pang X, Qian K, et al. Systemic delivery of BACE1 siRNA through neuron-targeted nanocomplexes for treatment of Alzheimer's disease [Internet]. Vol. 279, *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V; 2018. 220–233 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.034>
27. Wurster CD, Ludolph AC. Antisense oligonucleotides in neurological disorders [Internet]. Vol. 11, *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. SAGE Publications Ltd; 2018 [cited 2021 Feb 23]. Available from: </pmc/articles/PMC5971383/>
28. DeVos SL, Miller RL, Schoch KM, Holmes BB, Kebodeaux CS, Wegener AJ, et al. Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition

- and seeding in mice with tauopathy. *Sci Transl Med*. 2017 Jan 25;9(374).
29. Lane RM, Holly Kordasiewicz B, Smith AE, Mignon L, Miller T, Narayanan P, et al. Rationale for and development of Ionis-MAPTRx, the first tau-lowering antisense oligonucleotide, in patients with mild AD [Internet]. 2017 [cited 2021 May 22]. Available from: [www.ionispharma.com](http://www.ionispharma.com)
  30. Lane-Donovan C, Herz J. The ApoE receptors Vldlr and Apoer2 in central nervous system function and disease [Internet]. Vol. 58, *Journal of Lipid Research*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2017 [cited 2021 Mar 2]. p. 1036–43. Available from: [/pmc/articles/PMC5454520/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35454520/)
  31. Hinrich AJ, Jodelka FM, Chang JL, Brutman D, Bruno AM, Briggs CA, et al. Therapeutic correction of ApoER2 splicing in Alzheimer's disease mice using antisense oligonucleotides. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2016 Apr [cited 2021 Feb 23];8(4):328–45. Available from: [/pmc/articles/PMC4818756/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26818756/)
  32. Poplawski SG, Garbett KA, McMahan RL, Kordasiewicz HB, Zhao H, Kennedy AJ, et al. An Antisense Oligonucleotide Leads to Suppressed Transcription of Hdac2 and Long-Term Memory Enhancement. *Mol Ther - Nucleic Acids* [Internet]. 2020 Mar 6 [cited 2021 Feb 23];19:1399–412. Available from: [/pmc/articles/PMC7047133/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33047133/)

## 8. Autoaprendizaje

Gracias a la realización de este trabajo he aprendido muchos conceptos de la enfermedad del Alzheimer que desconocía, y aquellos que ya me sonaban los he acabado de profundizar. Me ha hecho darme cuenta de las pocas terapias que existen actualmente para modificar la enfermedad y lo importante que es conocer la patobiología de cada afección para determinar qué proceso se puede reducir/inhibir.

Por otro lado, me ha permitido conocer los oligonucleótidos modificados ya que es un tema muy novedoso y que no había llegado a estudiar hasta este año. Además, me parece muy interesante que conociendo la secuencia y utilizando los mecanismos propios de las células se pueda conseguir la inhibición del RNA.

Estoy muy agradecida a los cursos y los conocimientos impartidos en algunas asignaturas que me han permitido que la búsqueda de artículos y el uso de mendeley me haya resultado sencillo.

Finalmente, con los resultados me he dado cuenta todo lo que nos queda por investigar tanto en esta enfermedad como en muchas otras que son incluso más raras. Y que gracias a estas investigaciones se puede tener un rayo de esperanza para que en un futuro haya una terapia efectiva que consiga eliminar la enfermedad del Alzheimer.