



BIOTECNOLOGÍA Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

SILVIA CUBILES TROYA



TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA



BIOTECNOLOGÍA Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

- Lugar y fecha de presentación: **Sevilla, septiembre 2021**
- Departamento: **Microbiología y parasitología**
- Tutora: **Montserrat Argandoña Bertrán y Rosa María García Valero**
- Tipología: **Revisión bibliográfica**

SILVIA CUBILES TROYA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

RESUMEN

La Biotecnología abarca una gran variedad de técnicas basadas en el uso de organismos vivos o sus componentes subcelulares. Presenta un amplio espectro de aplicaciones y ofrece nuevas vías para el desarrollo de tratamientos o terapias preventivas para un conjunto diverso de enfermedades como son el cáncer, las enfermedades infecciosas o las enfermedades neurodegenerativas. Dos de las técnicas biotecnológicas más utilizadas y en las que se centra esta revisión son la terapia génica (uso de vectores virales) y la inmunoterapia (uso de anticuerpos monoclonales). Los avances y usos de estas técnicas se explican en su aplicación a las enfermedades neurodegenerativas. Estas se caracterizan por la pérdida progresiva de la función neuronal y la muerte selectiva de poblaciones de neuronas vulnerables. La mayoría son trastornos multigénicos, con distinta penetración de los genes alterados, y multifactoriales, influencia de factores genéticos, ambientales y envejecimiento, donde los eventos críticos son el plegamiento incorrecto, la agregación y la acumulación de proteínas en el cerebro. Su evaluación se basa en la diferenciación de los depósitos de proteínas anormales y la valoración de las distintas etapas de cada enfermedad. En esta revisión se han escogido tres patologías: la enfermedad de Alzheimer, caracterizado por ovillos neurofibrilares y placas neuríticas, la enfermedad de Parkinson, caracterizado por cuerpos de Lewys, y la enfermedad de Corea de Huntington, caracterizada por agregados de huntingtina. Estas técnicas demuestran los beneficios terapéuticos del uso de la biotecnología en estas patologías. No obstante, actualmente estas enfermedades siguen siendo incurables y tampoco existe ningún marcador de enfermedad presintomática, por lo que no es posible identificar el inicio de la pérdida de neuronas cerebrales. Se siguen necesitando investigaciones que muestren ensayos clínicos satisfactorios para encontrar nuevas vías en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas previstas para un futuro no muy lejano.

Palabras clave: *inmunoterapia, terapia génica, Alzheimer, Parkinson, Huntington.*

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

PALABRA	ABREVIACIÓN
ÁCIDO GAMMA-AMINO BUTÍRICO	GABA
ÁCIDO GLUTÁMICO DESCARBOXILASA	GAD
ADENOVIRUS	Adv
ADMINISTRACIÓN MEJORADA POR CONVECCIÓN	CED
ALFA-SINUCLÉINA	ASN
ANTICUERPOS MONOCATENARIOS	scFv
ANTICUERPOS MONOCLONALES	mABs
ANTICUERPOS MONOCLONALES RECOMBINANTES	R-mABs
APOLIPOPROTEÍNA E	ApoE
ARN GUÍA	gARN
BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	BHE
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	MSC
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	EN
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	EA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER ESPORÁDICA	LOAD
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER FAMILIAR	EOAD
ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	EH
ENFERMEDAD DE PARKINSON	EP
ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA	ELISA
ENZIMA L-AMINOÁCIDO AROMÁTICO DESCARBOXILASA	AADC
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA	ELA
FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO	NGF
FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE B	TGF- β
FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DE CÉLULAS GLIALES	GDNF
FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO	BDNF
FRAGMENTO CRISTALIZABLE	Fc
FRAGMENTO DE UNIÓN AL ANTÍGENO	Fab
HUNTINGTINA	HTT
HUNTINGTINA MUTADA	mHTT
INMUNOGLOBULINA ISOTIPO G	IgG
LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO	LCR
MICROARN	miARN
NÚCLEO SUBTALÁMICO	STN
OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO DE ARN	shARN
OVILLOS NEUROFIBRILARES	NFT
PÉPTIDO B-AMILOIDE	A β
PROTEÍNA PRECURSORA AMILOIDE	APP
PROTEÍNA PRIÓNICA	PrPc
REGIONES DETERMINANTES DE LA COMPLEMENTARIEDAD	CDR
REPETICIONES TERMINALES INVERTIDAS	ITR
SISTEMA NACIONAL DE SALUD	SNS
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	SNC
SUSTANCIA NEGRA PARS COMPACTA	SNc
TOMOGRFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES	PET
TOMOGRFÍA DE EMISIÓN DE POSITRONES-6-[¹⁸ F]FLUORO-L-M-TIROSINA	PET-FMT
TRANSCRIPTASA INVERSA	Tert
VALOR DE CAPTACIÓN ESTANDARIZADO DEL PÉPTIDO AMILOIDE CORTICAL	SUV
VÍA INTRAVENOSA	IV
VÍA SUBCUTÁNEO	SC
VIRUS ADENOASOCIADOS	AAV
VIRUS ADENOASOCIADOS RECOMBINANTES	rAAV

ÍNDICE

ÍNDICE	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Biotecnología	5
1.1.1. Clasificación	6
1.1.2. Biotecnología Farmacéutica	7
1.2. Enfermedades neurodegenerativas.....	8
1.2.1. Características generales.....	8
1.2.2. Clasificación	10
1.2.3. Prevalencia y actualidad.....	11
1.2.4. Tratamiento	12
2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN	13
3. METODOLOGÍA.....	13
3.1. Procedimiento de búsqueda	13
3.2. Criterios de inclusión/exclusión	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1. La Terapia Génica.....	14
4.2. La Inmunoterapia	17
4.3. Biotecnología en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA).....	20
4.3.1. Empleo de la terapia génica para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.....	22
4.3.2. Empleo de la Inmunoterapia en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.....	24
4.4. Biotecnología en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP)	26
4.4.1. Empleo de la terapia génica para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson	28
4.4.2. Empleo de la Inmunoterapia en el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson.....	29
4.5. Biotecnología en el tratamiento de la enfermedad de Huntington (EH)	31
4.5.1. Empleo de la terapia génica para el tratamiento de la Enfermedad de Huntington.....	32
4.5.2. Empleo de la Inmunoterapia en el tratamiento de la Enfermedad de Huntington.....	34
5. CONCLUSIONES.....	34
6. BIBLIOGRAFÍA	35

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biotecnología

La biotecnología se define como un conjunto de técnicas que involucran la utilización de organismos vivos (bacterias, levaduras, células animales y vegetales en cultivo), o sus componentes subcelulares, cuyo metabolismo y capacidad de biosíntesis están dirigidas hacia el desarrollo de nuevos productos, la modificación de procesos tradicionales para hacerlos más competitivos con los actuales o para reducir el impacto ambiental (Rendueles y Díaz, 2014).

La biotecnología abre nuevas vías para la investigación farmacéutica. Gracias al "diseño racional de drogas" se puede obtener un producto por un camino menos complicado y aleatorio (Agustín-Pavón, 2016). Las bases tecnológicas en las que se basa la biotecnología son muy variadas y muestran un amplio espectro de aplicaciones, por lo que la biotecnología no es en sí misma una ciencia, sino un enfoque multidisciplinar que involucra a diferentes ciencias y prácticas tales como: la microbiología, la biología, la bioquímica, la ingeniería genética, la virología o la medicina (Peláez, 2020).

La biotecnología surgió como disciplina a principios del siglo XX en la industria alimentaria y, después, se han ido sumando otros sectores como la medicina o el medio ambiente (Figura 1). Posee una ilimitada capacidad para investigar y adaptarse a los beneficios de la humanidad, lo que hace que su auge sea cada vez mayor. Este avance también se refleja en el número de patentes biotecnológicas. Así, las investigaciones biotecnológicas han conseguido clasificarse entre los diez campos técnicos más importantes en términos de solicitudes de patente presentadas ante la Oficina Europea de Patentes (Mozafari y Tariverdian, 2020).

Esta disciplina tiene un impacto global que se debe en gran parte a las siguientes ventajas o aspectos impulsores (Rendueles y Díaz, 2014; Sánchez Montero, 2007):

- Puede aplicarse a una gran variedad de áreas o sectores como son la medicina, la farmacia, la agricultura, la alimentación, el medio ambiente, la producción industrial o la energía.
- Puede resolver la demanda de atención sanitaria de calidad, así como ofrecer una adecuada gestión y conservación de los recursos naturales.
- Puede considerarse como uno de los principales motores del crecimiento económico mundial.

- Tiene menos costes de inversión y mayor eficacia tecnológica por trabajar en condiciones más suaves y por la capacidad de obtener procesos más sostenibles.
- Da la seguridad y diversidad de ofrecer el suministro de materias primas, combustible, alimentos, agua.

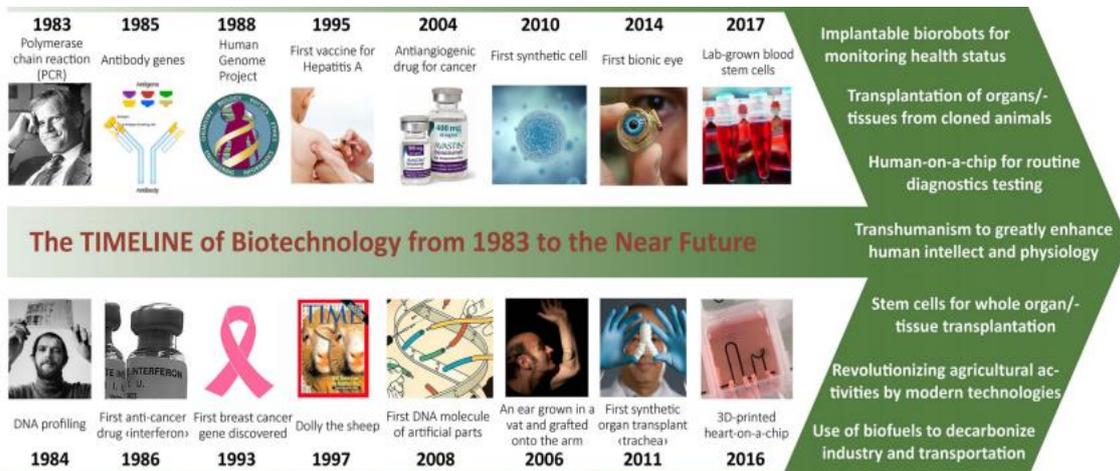


Figura 1: Cronología de los acontecimientos clave en biotecnología desde finales del siglo XX hasta el presente. En la imagen se ilustran una serie de tecnologías y productos importantes de la biotecnología, desde 1983, con el descubrimiento de la PCR, hasta 2017, con el cultivo de células madre sanguíneas cultivadas en el laboratorio. A la derecha se incluyen algunas predicciones de posibles avances biotecnológicos para un futuro cercano (Mozafari y Tariverdian, 2020).

1.1.1. Clasificación

Por su aplicación a una gran variedad de sectores, la biotecnología posee muchas ramas de estudio, donde, según la rama a la que se haga referencia, se vinculará con un código de colores que, siendo orientativo, ha sido aceptado como leyenda para la clasificación de las distintas áreas de biotecnología (Peláez, 2020; Sánchez Montero, 2007):

- Biotecnología roja: aplicaciones biotecnológicas en el área de salud humana y animal, expectativas de vida, diagnóstico de enfermedades, tratamientos farmacológicos, etc.
- Biotecnología verde: aplicaciones biotecnológicas en agricultura y agroalimentación, elaboración de biofertilizantes y biopesticidas, etc.
- Biotecnología blanca: utilización de sistemas biológicos para la fabricación, transformación o degradación de moléculas.
- Biotecnología gris: centrada en aplicaciones ambientales, disminuir la explotación de los medios naturales, reducir las actividades que generan dióxido de carbono, etc.
- Biotecnología azul: aplicaciones biotecnológicas de origen marino, búsqueda de sustancias de interés biomédico en organismos marinos, acuicultura, etc.

1.1.2. Biotecnología Farmacéutica

Esta revisión se centra en el área de estudio de la biotecnología roja, actualmente conocida como biotecnología farmacéutica. La biotecnología farmacéutica se centra en todas las aplicaciones tecnológicas que estudian y producen mecanismos e interacciones biológicas de los seres vivos. Los productos biofarmacéuticos o biofármacos son producidos en procesos biotecnológicos que utilizan métodos de biología molecular (Kesik-brodacka, 2018). Estos productos pueden estar compuestos de azúcares, proteínas, ácidos nucleicos o combinaciones de ellos o pueden ser células y tejidos vivos. Son aislados de diversas fuentes naturales como la humana, la animal o mediante microorganismos, por medio de métodos biotecnológicos (Crommelin et al., 2020). Algunas de sus características más representativas son: a) elevada actividad y especificidad para dirigirse a moléculas específicas, b) rara vez causan efectos secundarios, c) tienen estructuras bastante complejas debido a las cadenas poliméricas, d) tiene elevada sensibilidad a la degradación por el sistema digestivo, e) no tienen una gran capacidad para atravesar el epitelio intestinal, f) se administran por vía parenteral mediante una inyección directa, g) poseen mecanismos complejos y h) son potencialmente inmunogénicos. Los componentes activos que poseen son, en su mayoría, proteínas recombinantes y ácidos nucleicos (Kesik-brodacka, 2018).

En la actualidad, la mayoría de biofármacos disponibles comercialmente contienen como una proteína recombinante como componente activo. Su producción se realiza en distintos sistemas de expresión de acuerdo con las propiedades específicas de esta proteína. Los sistemas de expresión pueden ser de mamíferos, de bacterias, de levaduras, de líneas celulares de insectos, de animales transgénicos, de vegetales o de síntesis de proteínas *in vitro*. Por otro lado, los que contienen un ácido nucleico son más comúnmente empleados en técnicas de terapia génica. Esta se centra en la inducción o inhibición de distintos procesos celulares que subyacen a diversas enfermedades (Kesik-brodacka, 2018).

El uso de los productos biofarmacéuticos está cada vez más extendido en todas las ramas de la medicina. Están presentes en el tratamiento clínico de diversas enfermedades, incluidos cánceres, trastornos metabólicos, enfermedades infecciosas y enfermedades neurodegenerativas (EN) (Kesik-brodacka, 2018). En lo que respecta a las EN, las nuevas herramientas que ofrece la biotecnología prometen nuevas metas para el tratamiento de las mismas en un futuro no muy lejano (Agustín-Pavón, 2016).

Se han escogido estas patologías para desarrollar los conceptos y la utilidad de las técnicas biotecnológicas, y si pueden ofrecer tratamientos eficaces o terapias preventivas para estas enfermedades. Antes, es necesario conocer el concepto de enfermedad neurodegenerativa, sus características, clasificación y rasgos más importantes.

1.2. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) son trastornos neurológicos crónicos que cursan con una amplia diversidad de afecciones que afectan a las neuronas del cerebro, produciéndose la degradación de las funciones neuronales debido a la muerte de estas neuronas. Esta pérdida de la función neuronal ocurre tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico (Rekatsina et al., 2020).

1.2.1. Características generales

Las EN se caracterizan por un mecanismo patogénico común que consiste en un deterioro neurológico lento, progresivo e irreversible que conlleva la pérdida selectiva de neuronas y sus conexiones (Reith, 2018). La causa de estas enfermedades no está definida, aunque existen estudios que sugieren un origen multifactorial. Algunos de estos factores son: agregación proteica, alteraciones del metabolismo energético, estrés oxidativo, estrés proteotóxico, efectos excitotóxicos, neuroinflamación, muerte celular y factores genéticos (Dugger y Dickson, 2017; Niedzielska et al., 2016). Además, las EN pueden ser esporádicas y/o hereditarias (Kovacs, 2014).

Uno de los principales factores que desencadenan la pérdida de neuronas es el acúmulo de proteínas cuyas propiedades fisicoquímicas se encuentran alteradas (Kovacs, 2016). Esta alteración se debe al plegamiento incorrecto de las mismas provocando así que su conformación estructural fisiológica cambie, dando como resultado una alteración de la función y/o acumulación intra o extracelular (Kovacs, 2018).

Estos trastornos tienen asociados una serie de manifestaciones clínicas que son comunes para la mayoría de las enfermedades que conforman el grupo. Las características comunes son:

1. Por lo general, son enfermedades de aparición tardía, cuyo inicio suele ser insidioso y su curso clínico progresivo, donde se produce una desintegración lenta y paulatina del Sistema Nervioso. Son enfermedades crónicas, sin remisiones y

que suelen tardar años hasta llegar a la etapa final de la enfermedad (Davis et al., 2018).

2. El mecanismo patológico se inicia con un procesamiento anómalo en una proteína y prosigue con la agregación y acumulación de esta proteína anormal en el cerebro. Esto conduce a disfunción celular, pérdida de conexiones sinápticas y daño cerebral (Soto et al., 2018). Las proteínas involucradas serán diferentes para cada enfermedad. El proceso anormal que ocurre en estas proteínas neuronales, según el neurólogo y bioquímico Stanley B. Prusiner, puede ser (Sánchez, 2017):
 - Plegamiento incorrecto de proteínas.
 - Alteraciones en las modificaciones post-traduccionales de proteínas.
 - Anormalidades en el proceso proteolítico.
 - Anomalías en los genes que intervienen en el acoplamiento (“splicing”).
 - Expresión impropia.
 - Disminución del aclaramiento de las proteínas degradadas.
3. Otros denominadores comunes que intervienen en el mecanismo son: estrés oxidativo y respuestas inflamatorias. Este proceso finaliza con la muerte celular por apoptosis que ocurre más comúnmente por la vía intrínseca de señalización celular (DiMauro y Schon, 2008).
4. Los síntomas clínicos típicos son deterioro cognitivo, demencia, alteraciones del comportamiento y de las funciones cerebrales, desmielinización y muerte neuronal. Las estructuras anatómicas involucradas son: hipocampo, corteza entorrinal, sistema límbico y áreas neocorticales (Rekatsina et al., 2020).

Otras manifestaciones son trastornos del movimiento, síntomas relacionados con la disfunción cerebelosa o la participación de neuronas motoras superiores e inferiores. Las regiones anatómicas involucradas son: ganglios basales, tálamo, núcleos del tronco encefálico y del cerebelo, áreas corticales motoras y neuronas motoras inferiores de la médula espinal (Kovacs, 2019, 2018).

Así mismo, existen diferencias en cada uno de los casos de EN, tanto en los síntomas clínicos como en la progresión de la enfermedad. La característica distintiva por excelencia es la proteína que sufre el proceso anómalo. Esta proteína será diferente para cada enfermedad, y adquirirá una determinada conformación incorrecta que provocará su agregación y acumulación (Kovacs, 2014; Kovacs, 2018; Rekatsina et al., 2020).

1.2.2. Clasificación

Clasificar estas enfermedades atendiendo únicamente a la clasificación clínico-patológica resulta impreciso y tiene muchas limitaciones. Gracias al desarrollo de importantes estudios en genética y biología molecular se ha podido establecer una clasificación mucho más precisa (Kovacs, 2014). La clasificación más aceptada tiene que contar con varios apartados: presentación clínica, regiones anatómicas y tipos de células afectadas, proteínas alteradas conformacionalmente que intervienen en el proceso patogénico y etiología de la enfermedad (Kovacs, 2014). Así, la clasificación de las EN se basa en lo siguiente (Kovacs, 2018):

1. Síntomas clínicos determinados por la región anatómica que presenta disfunción neuronal. Para las principales EN, estos síntomas son (Kovacs, 2016):
 - Síndrome demencial en la enfermedad de Alzheimer (EA).
 - Trastornos del movimiento y la postura en la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Huntington (EH).
 - Debilidad y atrofia muscular en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
2. Estudio de proteinopatías (Tabla 1): proteínas alteradas por distintas modificaciones bioquímicas que se agregan y acumulan en el tejido nervioso intracelularmente, en neuronas o células gliales, o extracelularmente. Se puede observar en la Tabla 1 una selección de las principales enfermedades neurodegenerativas y las proteínas anómalas características de cada trastorno.

Gracias al estudio de proteinopatías se han identificado marcadores celulares específicos de cada enfermedad que han dado lugar a los sellos neuropatológicos claves para determinar cada trastorno (Lázaro et al., 2020; Sánchez, 2017).

- Placas seniles, ovillos neurofibrilares (NFT), pérdidas neuronales y deficiencia en acetilcolina caracterizan la EA.
- Cuerpos de Lewy y depleción de dopamina caracterizan la EP.
- Inclusiones celulares y axones motores alterados caracterizan la ELA.
- El ácido gamma-aminobutírico (GABA) está disminuido o ausente en las neuronas del neocórtex caracterizan la EH.

Tabla 1: Selección de enfermedades neurodegenerativas (EN) según las principales proteínas depositadas (Elaboración propia).

ENFERMEDAD	AGREGACIÓN DE PROTEÍNAS	DE PRINCIPALES MARCADORES CELULARES	FUENTE BIBLIOGRÁFICA
Enfermedad de Alzheimer	Péptido β -amiloide Proteína TAU	Placas seniles NFT	(Knowles et al., 2014)
Espingiformencefalopatías	Proteína priónica (PrP ^c)	Presencia de proteína priónica patogénica (PrP ^{Sc})	(Knowles et al., 2014)
Enfermedad de Parkinson	α -sinucleína	Cuerpos de Lewy y depleción de dopamina	(Knowles et al., 2014)
ELA	Superóxidosmutasa 1/ TDP-43	Inclusiones celulares y axones motores alterados	(Knowles et al., 2014)
Enfermedad de Huntington Ataxia de Friedreich	Fragmentos de huntingtina Frataxina	GABA disminuido en las neuronas del neocórtex	(Knowles et al., 2014) (Sánchez, 2017)
FTLD-TDP: Tipo AD MND FTLD-FET: aFTLD-U, NIFID, BIBD FUS: MND	TDP-43 FET / FUS	Inclusiones de proteínas neuronales y citoplasmáticas gliales	(Kovacs, 2019)
Enfermedad de pick Degeneración corticobasal	Proteína TAU	Cuerpos de Pick Placas astrocíticas	(Kovacs, 2019)

1.2.3. Prevalencia y actualidad

Las EN son enfermedades cada vez más frecuentes ya que su principal factor de riesgo es la edad/envejecimiento. En nuestra sociedad, la esperanza de vida ha pasado de estar en torno a los 40 años a principios del siglo XX hasta los aproximadamente 80 años. Esto se debe a múltiples motivos como avances científicos y técnicos, mejores condiciones higiénicas, control de enfermedades infecciosas, etc. (Garcés, 2016).

El Programa Conjunto de la Unión Europea-Investigación de Enfermedades Neurodegenerativas prevé para 2030 un aumento del número de personas mayores de 65 años, ascendiendo hasta un 25% de la población, un significativo aumento frente al 16% actual (Rekatsina et al., 2020). Esto se corresponde con los datos estimados para la población española, para la que se prevé que en el año 2026, más del 22% de la población tendrá una edad superior a los 65 años (Sánchez, 2017). Por ejemplo, en España se calcula que hay unos 400.000 casos de EA, pero la previsión para los próximos 50 años es que esta cifra de

cuadruple, según un estudio realizado por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad en 2016.

España tiene uno de los mayores ritmos de envejecimiento de la población, por ello, es de los países más vulnerables al aumento de casos de EN (Garcés, 2016). Actualmente, la prevalencia de estas enfermedades en España es del 1,90%, lo que supone unas 988.000 personas afectadas, aunque algunos informes elevan la cifra hasta 1,5 millones (Tabla 2).

Tabla 2: Prevalencia de las principales enfermedades neurodegenerativas (EN) en España (Garcés, 2016).

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

1.2.4. Tratamiento

Según *La estrategia de enfermedades neurodegenerativas del Sistema Nacional de Salud (SNS) aprobada por el Consejo Interterritorial del SNS en 2016*, las EN no tienen un tratamiento etiológico específico y las actuaciones terapéuticas son paliativas en todos los casos y, solo en algunos, sintomáticas.

Los medicamentos que se han usado tienen una eficacia clínica reducida y tampoco existe ningún marcador de enfermedad presintomática, por lo que no se puede identificar el inicio de la pérdida de neuronas (Garcés, 2016). Por esto, la mayor parte de estas enfermedades siguen siendo incurables, teniendo como objetivo terapéutico prevenir o retrasar su aparición, así como alargar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes (Garcés, 2016). Estas condiciones hacen que sea necesario desarrollar nuevas y más eficaces estrategias terapéuticas. Aun así, la perspectiva hacia el futuro es esperanzadora, ya que cada vez se conocen mejor los hechos que provocan la neurodegeneración y la muerte por apoptosis (Sánchez, 2017).

En este sentido se están investigando distintos enfoques terapéuticos, algunos de ellos empleando estrategias basadas en Biotecnología, dirigidos a detener el desarrollo de la neurodegeneración (Rekatsina et al., 2020) como son: i) modelos de sistemas basados en células (Gitler et al., 2017); ii) búsqueda de nuevos fármacos capaces de reducir las

concentraciones y las tasas de formación de proteínas anómalas como fármacos antioxidantes, antiinflamatorios, inhibidores de la apoptosis, entre otros (Knowles et al., 2014); iii) explorar terapias biotecnológicas como la inmunoterapia y la terapia génica (Agustín-Pavón, 2016).

2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre las distintas aplicaciones biotecnológicas que se pueden emplear para el tratamiento o prevención de las principales enfermedades neurodegenerativas.

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta revisión son:

- Seleccionar algunos de los principales trastornos dentro de las EN.
- Seleccionar un conjunto de aplicaciones biotecnológicas para el tratamiento de estos trastornos.
- Argumentar el éxito del uso de la biotecnología para el tratamiento de las EN.
- Discutir la necesidad de investigaciones futuras.

3. METODOLOGÍA

3.1. Procedimiento de búsqueda

La metodología seguida para la realización de este trabajo bibliográfico se ha centrado en la búsqueda sistemática de información en distintas bases de datos científicas, con el objetivo de recabar toda la información necesaria para cumplir con los objetivos planteados. Se ha hecho uso de libros de texto, revistas, artículos y revisiones científicas, tanto en inglés como en español, obtenidos a través de bases de datos como son *FAMA*, *Google Scholar*, *Scencedirect*, *Pubmed*, *Scopus* y *Web of Science*, recursos que ofrece la Universidad de Sevilla. La mayoría de los resultados utilizados proceden de fuentes inglesas y de la base de datos *Pubmed* ya que resultaron más relevantes e interesantes.

Para la búsqueda, se consultaron sobre todo artículos acerca del concepto de biotecnología y concretamente de la biotecnología farmacéutica, su aplicación al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas y el concepto y características principales de estas enfermedades. Para ello, los términos de búsqueda utilizados incluyeron: “*neurodegenerative*

diseases”, *“neurodegeneration”*, *“biotechnology”*, *“Alzheimer”*, *“Parkinson”*, *“Huntington”*, *“Amyotrophic Lateral Sclerosis”*, *“ bioechnological application”*. Se realizaron también búsquedas más específicas sobre terapia génica e inmunoterapia, las técnicas biotecnológicas escogidas para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Para ello, algunas de las palabras clave utilizadas fueron: *“gene therapy”*, *“antibody”*, *“immunotherapy”*, *“Crezerumab”*, *“adenoassociated viral vectors”*, *“mesenchymal stem cells”*, *“PRX002”*, *“monoclonal antibody”*.

3.2. Criterios de inclusión/exclusión

Los criterios de inclusión fueron utilizar artículos y revisiones de los últimos 5 años en adelante, artículos donde el tema principal sean las enfermedades neurodegenerativas y/o sus aplicaciones biotecnológicas, texto completo disponible y más reciente. Aun así, hay casos en los que hubo que usar artículos con fechas anteriores a 2016, se hizo de forma puntual para apoyar definiciones o características generales de las enfermedades que se plantean.

Los criterios de exclusión principalmente fueron artículos y revisiones anticuados cuya información estaba desactualizada y no era relevante para el trabajo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se ha comentado, las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida de la función neuronal, que se lleva a cabo a través de un proceso anómalo que involucra principalmente al plegamiento y metabolismo de determinadas proteínas y tienen como principal factor de riesgo el envejecimiento. Actualmente no tienen un tratamiento preventivo o eficaz para eliminar la enfermedad (Wyss-coray, 2016). Ante esto, se han seleccionado algunas de las aplicaciones que posee la biotecnología y que abren nuevas vías para encontrar un tratamiento o terapia preventiva para hacer frente a este tipo de enfermedades. En concreto nos hemos centrado en la terapia génica y la inmunoterapia:

4.1. La Terapia Génica

Se basa en la introducción de material genético en un organismo o paciente, ya sea directamente o mediante virus con la finalidad de restablecer una función celular, introducir una nueva función o interferir en una función existente. El objetivo final es prevenir, paliar o curar una enfermedad (Kesik-brodacka, 2018). La terapia génica posee una gran variedad de aplicaciones, tales como: tratamiento de enfermedades genéticas hereditarias, terapia contra

el cáncer, tratamiento de enfermedades infecciosas y enfermedades terapéuticas habituales (Lukashev y Zamyatnin, 2016).

La terapia génica hace uso de un ácido nucleico (ADN o ARN) para producir un efecto terapéutico en una célula diana. Este efecto se consigue gracias a la expresión de un gen codificado por este ácido nucleico. Puede codificar la expresión de una proteína o ARN alterados, revirtiendo el trastorno biológico que producen (Lukashev y Zamyatnin, 2016). Según el tipo de célula diana en la que tenga lugar el proceso, se distinguen la terapia génica somática y germinal (células sexuales masculinas y femeninas). Todos los ensayos llevados a cabo deben realizarse en células somáticas según la legislación y por consideraciones éticas (Miguel et al., 2020). Por otro lado, según donde se produzca la manipulación genética de las células se puede distinguir entre (Miguel et al., 2020) (Figura 2):

- Terapia génica *in vivo*: se introduce el material genético directamente en el paciente, normalmente mediante virus.
- Terapia génica *ex vivo*: se extraen las células del paciente, se modifica el material genético *in vitro* y se introducen las células modificadas genéticamente al paciente.

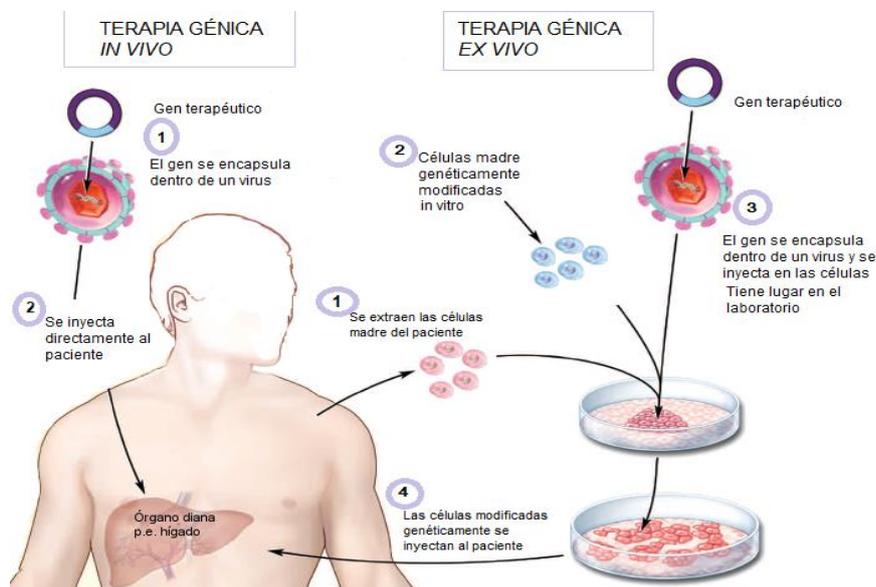


Figura 2: Diferencias entre la terapia génica *in vivo* y la terapia génica *ex vivo* (Modificado de CMC_A_Machado).

Como se ha nombrado anteriormente, es necesario el uso de vectores para facilitar la introducción del material genético, ya que este no penetra fácilmente en las células (Wang y Gao, 2014). Los vectores se clasifican en dos clases:

- **Vectores virales**: virus modificados con reducida patogenicidad y con su capacidad de replicación intacta, que llevan incorporado el material genético que se quiere introducir en las células diana. Entre los más utilizados se encuentran los adenovirus (Adv), lentivirus y los virus adenoasociados (AAV) (Wang y Gao, 2014).
- **Vectores no virales**: compuestos sintéticos basados en lípidos, sustancias catiónicas y nanopartículas que contienen el material genético con capacidad para adentrarse en las células (Wahane et al., 2020).

Esta revisión se centra en el uso de AAV para el tratamiento de los trastornos neurológicos mencionados. Estos virus pertenecen a la familia *Parvoviridae* y se caracterizan por poseer una cápside icosaédrica sin envoltura que contiene un genoma de ADN monocatenario de 4,7 kb (Hudry y Vandenberghe, 2019). Son de los vectores virales más utilizados en los ensayos clínicos del Sistema Nervioso Central (SNC) y sus características principales son (Choudhury et al., 2017):

- Median la transferencia de genes en células mitóticas y postmitóticas.
- Tienen gran afinidad y avidez por el tejido nervioso.
- Se establecen como episomas estables en el núcleo celular.
- No presentan ni patogenicidad ni citotoxicidad.
- Presentan inmunogenicidad muy débil, principalmente humoral.
- Median la expresión transgénica estable durante más de 10 años.
- Se subdividen en serotipos según las diferencias antigénicas en las proteínas de la cápside. Existen 12 serotipos de AAV conocidos hasta el momento (AAV1-AAV12). Estos serotipos muestran diferentes eficacias de transfección y diferente tropismo en células o tejidos.

En la Figura 3 puede verse la estructura y el proceso de replicación de este tipo de vectores hasta obtener el virión, la partícula vírica completa y madura. El genoma está compuesto por tres genes, *rep*, *cap*, y *AAP*, flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) que funcionan como el punto de origen viral de replicación y de la señal de empaquetamiento.

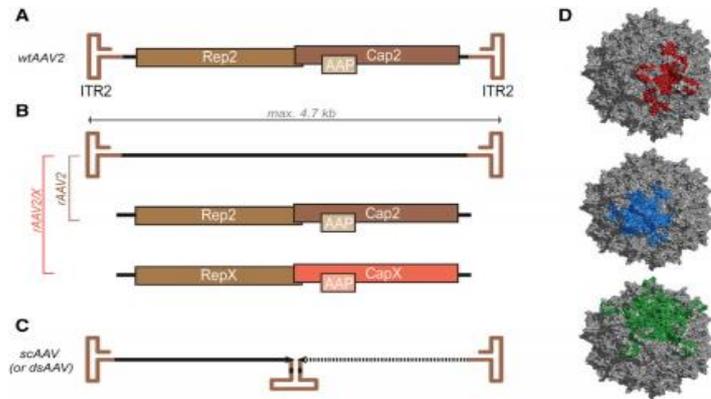


Figura 3: Virus y vector de AAV. (A) Estructura genómica del virus (AAV); (B) Se genera un vector recombinante a partir del genoma de AAV2 y se produce la replicación viral; (C) Estructura genómica del AAV autocomplementario; (D) Virión AAV que es una proteína multimérica (Hudry y Vandenberghe, 2019).

Estos virus requieren de un virus auxiliar, como un Adv, que les proporcione las proteínas necesarias para llevar a cabo su replicación. En ausencia de estos virus auxiliares permanecen de forma latente en la célula (Mena-enriquez et al., 2012). Por ello, se generaron virus adenoasociados recombinantes (rAAV) que poseen una mayor seguridad en aplicaciones clínicas y transducen células tanto en división como en reposo. La diferencia entre AAV y rAAV se da en los genes *rep* y *cap*, que son sustituidos por el promotor y transgén deseado en los rAAV (Figura 4). En la práctica, los distintos serotipos de AAV son los más empleados en las diversas aplicaciones clínicas de la terapia génica (Mena-enriquez et al., 2012).

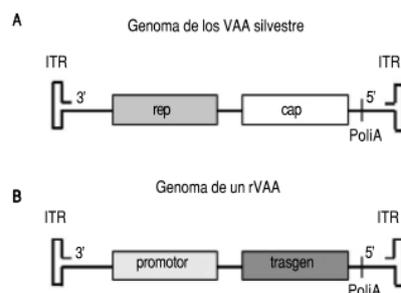


Figura 4: Genoma de los AAV y rAAV. En los rAAV los genes virales son sustituidos por el cassette de expresión que contiene el transgén, los elementos reguladores (promotor y cola de poli A) y los ITRs, estos últimos se mantienen intactos (Mena-enriquez et al., 2012).

4.2. La Inmunoterapia: anticuerpos monoclonales recombinantes

Es una terapia biológica que utiliza distintos componentes del sistema inmune (anticuerpos, citocinas, células, etc.) para combatir enfermedades como cánceres, enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas, infecciosas o alérgicas (Varadé et al., 2020). Durante muchos años, en la inmunoterapia, se han empleado principalmente los anticuerpos

monoclonales para el tratamiento de las distintas enfermedades mencionadas, aunque actualmente se emplean los anticuerpos monoclonales recombinantes, en los que se centra este apartado.

Los anticuerpos monoclonales (mAB) son inmunoglobulinas que reconocen específicamente una parte del antígeno, es decir un epítipo concreto, y resultan de la fusión de un clon de linfocitos B y una célula madre totipotencial que dan lugar a una célula híbrida o hibridoma que son los que producen estos mAB (Flores et al., 2019). Inicialmente, se desarrollaron mAB de ratón y rata (murinos) para tratar a los pacientes. Pronto se observó que, aunque estos anticuerpos eran verdaderamente útiles en los ensayos de investigación y diagnóstico, pero no eran buenos agentes terapéuticos debido a las reacciones inmunes y de hipersensibilidad del paciente contra la proteína extraña del ratón (Varadé et al., 2020). Para evitar la inmunogenicidad de estos anticuerpos, se realizaron modificaciones genéticas mediante ingeniería genética para intentar crear mAB de origen humano. Así se crearon los anticuerpos monoclonales recombinantes (R-mABs). Estos anticuerpos se clasifican en murinos, quiméricos, humanizados y humanos, según el tipo de cadenas que compone la estructura del anticuerpo (Figura 5) (Varadé et al., 2020).

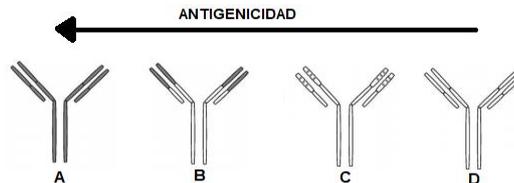


Figura 5: Tipos de anticuerpos monoclonales según su origen. Se distinguen principalmente por su composición y su antigenicidad en el organismo. A) Anticuerpo monoclonal murino. B) Anticuerpo monoclonal quimérico, las regiones variables son de origen murino siendo humano el resto de las cadenas. C) Anticuerpo monoclonal humanizado, sólo incluye los segmentos hipervariables de origen murino. D) Anticuerpo monoclonal humano (Elaboración propia).

La arquitectura natural de los anticuerpos consta de dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H) en forma de Y (Figura 6). Las cadenas ligeras contienen un dominio variable (VL) y uno constante (CL), y las cadenas pesadas contienen un dominio variable (VH) y tres o más dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). Los dominios VL y CL se asocian con los dominios VH y CH1 para formar el fragmento de unión al antígeno (Fab), que interviene en el reconocimiento del antígeno a través de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios CH2 y CH3 se unen para formar el fragmento cristalizante (Fc), que interviene en la función efectora uniéndose a moléculas receptoras inmunológicas tales como proteínas del complemento y receptores Fc. Las cadenas pesadas presentan regiones bisagra entre CH1 y

CH2, lo que les confiere gran flexibilidad para interactuar con el antígeno (Tiller y Tessier, 2015).

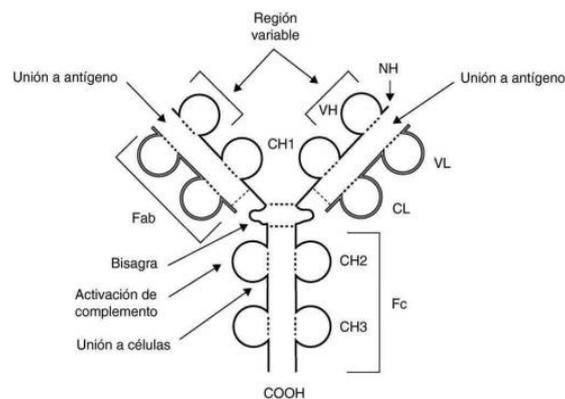


Figura 6: Estructura molecular de un anticuerpo. Se observan las cadenas ligeras (L) y pesadas (H) con las regiones variables (VL, VH) y constantes (CL, CH1, CH2, CH3). Las líneas discontinuas se corresponden con puentes disulfuro. La unión al antígeno se da en los dominios VH/VL, mientras que las funciones efectoras están mediadas por el fragmento Fc (fragmento cristalizante), el cual forma parte de la cadena pesada (CH). Fab: fragmento de unión al antígeno (García, 2011).

Las estructuras de los R-mABs tienen diversas variaciones con la estructura natural (Figura 6). Estas modificaciones incluyen cambios en los carbohidratos (glicosilación) y/o regiones de anticuerpos, con el objetivo de mejorar su acción como agente terapéutico (Varadé et al., 2020). Los R-mAB con estructuras artificiales más comunes son de tres tipos: los fragmentos Fab; los anticuerpos biespecíficos, que poseen dos especificidades distintas por lo que son capaces de unirse a dos antígenos diferentes a la vez; y los scFv, son anticuerpos monocatenarios que poseen las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras (VH y VL) fusionadas mediante una secuencia de unión flexible reconstituyendo el sitio de unión al antígeno (Kesik-brodacka, 2018).

En lo que respecta a la producción de los R-mABs, se produce en distintos pasos: primero se determina la secuencia de genes que codifican para el anticuerpo deseado, se seleccionan y clonan estos genes y, posteriormente, se genera un vector de expresión y se introduce al huésped que sintetizará el R-mAB. Este proceso presenta algunas ventajas frente a los mAB, como son: mayor reproducibilidad y control, niveles de producción mayores, menor tiempo de producción de anticuerpos, entre otros (Varadé et al., 2020).

Estos anticuerpos monoclonales se caracterizan por su elevada especificidad y afinidad por la diana terapéutica, y por lo tanto poseen también menos toxicidad. Estas características compensan en la mayoría de los casos los efectos adversos que se producen cuando se usan

como fármacos de primera línea en el tratamiento de distintas enfermedades (Shepard et al., 2017). Para el uso correcto de mAB en terapéutica es necesario optimizar varias de sus principales características (Figura 7): afinidad y especificidad de unión, farmacocinética, funciones efectoras y compatibilidad en la unión a anticuerpos adicionales (biespecíficos) y fármacos citotóxicos (conjugados anticuerpo-fármaco). Un punto clave es que la optimización de una propiedad puede generar impactos nocivos en otras (Tiller y Tessier, 2015).

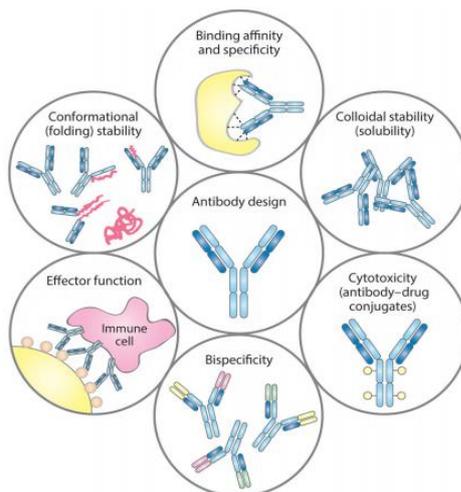


Figura 7: Atributos clave que deben optimizarse para generar anticuerpos eficaces para lograr buenos resultados terapéuticos. Estos atributos pueden estar dirigidos a mejorar la función efectora, la estabilidad del plegamiento o la solubilidad (Tiller y Tessier, 2015).

Esta revisión se ha centrado en el empleo de anticuerpos monoclonales recombinantes, así como el uso de diferentes estrategias de terapia génica para algunas de las enfermedades neurodegenerativas más importantes, para así conocer sus beneficios y potencial terapéutico.

4.3. Biotecnología en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA)

La enfermedad de Alzheimer (EA) descrita por primera vez en 1907 por Alöis Alzheimer (Bondi et al., 2017). La EA es la causa más común de demencia y, como tal, se caracteriza por un deterioro cognitivo lento y progresivo que afecta a la memoria, el lenguaje, la función ejecutiva y visoespacial, la personalidad y el comportamiento, y a la capacidad para realizar actividades diarias tales como hablar, tragar o caminar (Weller y Budson, 2018).

Dentro de la EA existen dos subtipos: (i) esporádica o de inicio tardío (LOAD) (95% casos), en la que intervienen factores ambientales y genéticos, y (ii) familiar o de inicio temprano (EOAD) (5% casos), que se debe a mutaciones en distintos genes (Mendiola-Precoma et al., 2016). Ambos tipos cursan con las mismas distintas fases clínicas (Breijyeh y Karaman, 2020; Dubois et al., 2019) que son:

1. Etapa preclínica o presintomática que puede durar varios años. Existe una leve pérdida de memoria y cambios patológicos en la corteza y el hipocampo, sin deterioro funcional grave y ausencia de signos y síntomas clínicos.
2. Etapa leve o temprana. Comienza la pérdida de concentración y memoria, desorientación de lugar y tiempo, cambio de humor y depresión.
3. Etapa moderada. Existe mayor pérdida de memoria, pérdida del control de impulsos y trastornos en la lectura, escritura y habla.
4. EA grave o etapa tardía. Existe una acumulación severa de placas neuríticas y NFT, lo que origina un gran deterioro funcional y cognitivo. Los pacientes presentan dificultad en la deglución y micción, y eventualmente conduce a la muerte del paciente.

En base a diferentes datos epidemiológicos, clínicos y experimentales se han propuesto varios mecanismos para explicar esta patología, entre los que se encuentran la hipótesis de la cascada amiloidea (basada en la acumulación del péptido β -amiloide ($A\beta$)), la hipótesis de TAU (basada en la hiperfosforilación de TAU), la hipótesis colinérgica (basada en la reducción de la actividad de colinacetyltransferasa y acetilcolina), la hipótesis mitocondrial (basada en la alteración de las mitocondrias cerebrales) y la excitotoxicidad (basada en la sobreexposición al neurotransmisor NMDA) (Briggs et al., 2016).

Las principales características neuropatológicas son agregados extracelulares de $A\beta$ (placas neuríticas o amiloides) y agregaciones intracelulares de la proteína TAU hiperfosforilada en NFT (Naseri et al., 2019). En la Figura 8 pueden observarse estas características identificadas por técnicas inmunohistoquímicas.

Los agregados de $A\beta$ se desarrollan inicialmente en las regiones del neocórtex basal, temporal y orbitofrontal y en etapas posteriores a lo largo del hipocampo, la amígdala, el diencefalo y los ganglios basales (Breijyeh y Karaman, 2020). Estos se forman por el plegamiento anómalo de proteínas solubles, que cuando alcanzan conformaciones alteradas se agregan, lo que lleva a una pérdida y funciones neuronales anormales (Tiwari et al., 2019; Villain y Dubois, 2019). Por otro lado, los NFT se concentran en los núcleos del tronco encefálico, especialmente en la sustancia negra y el *locus coeruleus*, y suelen aparecer a una edad más temprana que las placas de $A\beta$. Son agregados intracelulares que se producen por la múltiple fosforilación de proteínas asociadas a microtúbulos, esta es la proteína TAU (Naseri et al., 2019).

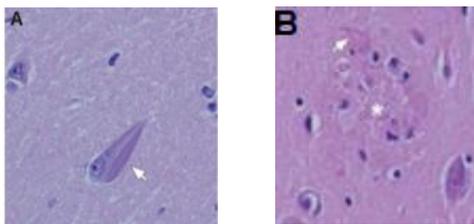


Figura 8: Patología en EA: ovillos neurofibrilares (A) y placas neuríticas amiloides (B). Mediante inmunohistoquímica se observan los NFT intracelulares en forma de llama (flecha) en la imagen A y las placas neuríticas (asterisco) en la imagen B (Dugger y Dickson, 2017).

Los factores de riesgo incluyen edad, antecedentes familiares, genotipo ApoE4 (mutación del gen ApoE que causa un desequilibrio del metabolismo lipídico y se relaciona con un gran riesgo de padecer Alzheimer), hipermocisteinemia, diabetes, hipertensión, obesidad, hipercolesterolemia, lesiones como traumatismo cerebral y diabetes mellitus 2 (Cummings et al., 2019). En la actualidad, la EA es la causa más común de demencia y representa hasta el 80% de los casos. Se estima que 40 millones de personas (la mayoría mayores de 60 años), padecen demencia y se prevé que esta cifra se triplique para 2050 (Scheltens et al., 2016).

El conocimiento de esta enfermedad ha evolucionado bastante, sin embargo, a pesar de los numerosos estudios realizados, aún persisten interrogantes sobre un tratamiento eficaz para frenar el curso de la enfermedad, y esto supone un objetivo importante con enormes necesidades médicas (Piguet et al., 2017). La investigación clínica avanza hacia un tratamiento definitivo de esta patología con la expectativa de que estas terapias atenúen el deterioro cognitivo (Weller y Budson, 2018), así se van a describir a continuación un conjunto de aplicaciones biotecnológicas cuyo objetivo es mejorar la calidad de vida y el curso de la enfermedad en los pacientes.

4.3.1. Empleo de la terapia génica para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

Teniendo en cuenta el mecanismo patológico de esta enfermedad, se han escogido una serie de estrategias llevadas a cabo por vectores virales en las que se observan beneficios, tales como buena tolerabilidad, mejora de la función cognitiva o reducción del péptido amiloide cerebral.

Una de las estrategias escogidas se basó en la **administración de genes del factor de crecimiento nervioso (NGF) mediante el uso de virus adenoasociados de serotipo 2 (AAV2)**. El NGF aumenta la función de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y se ha demostrado su función protectora en la reducción de la actividad de neuronas colinérgicas en primates de

edad avanzada (Sudhakar y Richardson, 2019). Esta estrategia se realizó para evaluar la función protectora del NGF en pacientes con EA de leve a moderada. Inicialmente se realizó un ensayo de Fase I en el que se demostró la seguridad y viabilidad del proceso a largo plazo. Posteriormente, se desarrolló un ensayo de Fase II con 49 pacientes que fueron asignados al azar en dos grupos: un grupo asignado con placebo y otro grupo asignado a recibir inyecciones intracraneales de AAV2-NGF. Al no observarse diferencias significativas entre ambos grupos se detuvo el experimento. Sería necesario verificar que el vector se administró correctamente, ya que no se ha utilizado ningún sistema para ello, como puede ser el sistema CED, conocido como administración mejorada por convección (Sudhakar y Richardson, 2019).

A diferencia de la estrategia anterior, una técnica llevada a cabo mediante la **administración del gen transgénico de la transcriptasa inversa (Tert) de la telomerasa a través del virus adenoasociado de serotipo 9 (AAV9)**, sí que obtuvo beneficios relevantes a nivel terapéutico, aunque el ensayo se realizó en ratones y no en humanos. La telomerasa es una enzima transcriptasa inversa (Tert) que puede alargar los telómeros *de novo* adicionando repeticiones teloméricas en los extremos de los cromosomas, compensando así el desgaste de los telómeros debido a la división celular. La telomerasa consta de dos componentes, la transcriptasa inversa (Tert) y el ARN (Terc), que se utiliza como plantilla para la síntesis de nuevas repeticiones teloméricas. Los telómeros cortos son considerados característicos del envejecimiento y están presentes en la EA avanzada (Whittemore et al., 2019). Esta estrategia se basa en la reactivación de la telomerasa en tejidos de ratones adultos mediante la administración de AAV9-Tert. Se escogió el serotipo AAV9 porque pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y transducir un gran número de células. Se observaron un número significativamente menor de células con daño en el ADN para los grupos de ratones tratados con AAV9-Tert en el hipocampo, la circunvolución dentada y la neocorteza en comparación con los grupos controles. También se observaron niveles reducidos de senescencia, un aumento de la coordinación neuromuscular, una mejora de la memoria y de la aptitud mitocondrial. Para evaluar su impacto en la función cerebral, se midió la memoria de los ratones utilizando la prueba del laberinto de Barnes. A las 30 semanas de tratamiento, el rendimiento de la mayoría de los grupos tratados con AAV9-Tert fue mejor que el rendimiento de los grupos no tratados (Whittemore et al., 2019).

De forma similar, se llevó a cabo en ratones una estrategia basada en la **administración del gen que expresa el genotipo ApoE2 a través del vector AAV4**, administrándolo directamente

en el hipocampo del ratón. Se ha demostrado que la herencia de la variante ApoE4 (mutación de la apolipoproteína E (ApoE)) aumenta el riesgo de desarrollar EA, mientras que la variante ApoE2 protege de la EA de aparición tardía. Esta estrategia AAV4-APOE2 se desarrolló para prevenir la EA en portadores del genotipo ApoE4. Se demostró un fuerte efecto protector sobre el riesgo de EA, con una reducción significativa y rápida de la carga del péptido amiloide cerebral y las placas neuríticas (Rosenberg et al., 2018). Otros estudios basados en la misma técnica, también administraron un AAV4-APOE2 mediante infusión intracerebroventricular prolongada en ratones, y se demostró la reducción de la formación de placa amiloide y la pérdida de sinapsis asociada (Choudhury et al., 2017).

4.3.2. Empleo de la Inmunoterapia en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer

Al igual que en el apartado anterior, teniendo en cuenta la patología se han seleccionado unas técnicas basadas en el uso de anticuerpos monoclonales (mAB) que han mostrado proporcionar beneficios al tratamiento de la EA.

Uno de los anticuerpos que se ha escogido es **Solanezumab**, un anticuerpo monoclonal anti-amiloide de inmunoglobulina isotipo G1 (IgG1), cuya función es unirse al dominio medio del péptido A β aumentando su aclaramiento. Inicialmente, se realizaron estudios preclínicos en ratones mediante la administración de anti-A β murino, anticuerpo monoclonal del que deriva Solanezumab. Los resultados mostraron una reducción significativa del depósito de placa amiloide en el cerebro. También se realizaron estudios de Fase I y Fase II con Solanezumab en pacientes con EA de leve a moderada. Los resultados mostraron que Solanezumab tiene similar afinidad por dos isoformas del péptido A β , A β 42 y A β 40, cuya abundancia en la placa amiloide es distinta, siendo A β 42 la de mayor concentración. Tras la administración de Solanezumab, las concentraciones de A β 42 y A β 40 se vieron alteradas (Siemers et al., 2016). También se iniciaron estudios de Fase III (EXPEDITION y EXPEDITION2) que examinaron el efecto de Solanezumab frente a placebo. Participaron 80 pacientes con EA de leve a moderada para evaluar su deterioro cognitivo. Aunque los resultados no mostraron beneficios significativos, sí que se mostró aproximadamente un 34% menos de deterioro cognitivo y funcional con Solanezumab versus placebo (Honig et al., 2018).

De forma similar, se estudió **Gantenerumab**, un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al péptido A β y lo elimina por fagocitosis mediada por receptor Fc. Se realizó un estudio de Fase I que reunió a 16 pacientes con EA de leve a moderada para la administración de

Gantenerumab. Los resultados iniciales mostraron una rápida reducción de la carga amiloide cerebral. Se administró Gantenerumab intravenoso (IV) en dos dosis, 60 mg y 200 mg cada 4 semanas. Los resultados mostraron una reducción de la tasa del valor de captación estandarizado del péptido amiloide cortical (SUV) dependiente de la dosis en comparación con el placebo. Se concluyó que la dosis óptima se encontraba por encima de 100 mg y por debajo de 330 mg, ya que a 200 mg se detectaron 4 edemas vasogénicos y microhemorragias (Ostrowitzki et al., 2017). Posteriormente, se realizaron dos estudios de Fase III denominados SCarlet RoAD y Marguerite RoAD con dosis iniciales de 105 o 225 mg de Gantenerumab administrado por vía subcutánea (SC), que se incrementó a una dosis máxima de 1200 mg cada mes. Se evaluaron los efectos del tratamiento sobre los biomarcadores del líquido cefalorraquídeo (LCR) y de la tomografía por emisión de positrones (PET) y los resultados mostraron que las dosis fueron seguras y bien toleradas. Se observó una disminución del péptido A β dependiente de la dosis y efectos farmacodinámicos, como la reducción de los biomarcadores del LCR tau fosforilado, tau total y neurogranina (proteína cerebral relacionada con la memoria y el aprendizaje) dependiente de la dosis. Estas observaciones mostraron que aumentos en la dosis de Gantenerumab se correspondía con efectos relevantes sobre la cognición y la función, especialmente en las primeras etapas de la enfermedad. Finalmente, se concluyó que Gantenerumab sí es eficaz para el tratamiento de la EA, y que los resultados mostrados proporcionan la justificación para realizar una mayor investigación de la eficacia clínica de este anticuerpo (Klein et al., 2019).

Otra estrategia del tratamiento se basó en **Crenezumab**, un anticuerpo monoclonal humanizado de inmunoglobulina isotipo G4 (IgG4) que se une con alta afinidad a oligómeros A β , manteniendo la capacidad de unirse a otras formas de A β (monómeros, fibrillas y placas) (Salloway et al., 2018). Se realizó un estudio de Fase II para evaluar los efectos de Crenezumab sobre la carga de placa amiloide cerebral. Se escogieron a pacientes con EA de leve a moderada que fueron aleatorizados 2:1 (crenezumab: placebo). Un grupo recibió Crenezumab vía SC a dosis baja de 300 mg o placebo cada 2 semanas y el otro grupo Crenezumab vía IV a dosis alta de 15 mg/kg o placebo cada 4 semanas. Los datos mostraron que el 89% de los pacientes del grupo por vía SC y el 86% de los pacientes del grupo por vía IV tenían niveles más bajos de A β en la semana 69 de tratamiento. También se observó reducción de la placa amiloide en el LCR tras la administración de Crenezumab en la mayoría de los pacientes. Los resultados sugirieron que la administración más temprana y/o a dosis más altas pueden mejorar los efectos beneficiosos de Crenezumab (Cummings et al., 2018; Yang et al., 2019).

4.4. Biotecnología en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP)

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por James Parkinson en 1817 (Salari y Bagheri, 2019). Es un trastorno multifactorial caracterizado por el deterioro progresivo del control motor voluntario. Consta de signos y síntomas motores como bradicinesia, hipocinesia, rigidez de brazos, piernas y tronco, temblor en reposo, etc. (Lotankar et al., 2017), y de síntomas no motores (Cabreira y Massano, 2019) como deterioro cognitivo, depresión, apatía, infarto, retención urinaria, hipotensión ortostática, ilusiones, síndrome diurno, estreñimiento (presente en el 80% de los casos de EP, etc (Parashar y Udayabanu, 2017). Hay pruebas de que el sistema nervioso entérico es un sitio de afectación temprana (Rodger, 2018). Estos síntomas se consideran de gran importancia para el diagnóstico precoz de la EP ya que pueden ocurrir años antes del inicio de los síntomas motores (Gazerani, 2019).

Este trastorno pertenece al grupo de las sinucleinopatías y tiene una fisiopatología compleja que engloba su origen en el tallo cerebral, el plegamiento incorrecto de la alfa-sinucleína (ASN), el depósito de proteínas amiloides y TAU, neuroinflamación, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y factores genéticos y epigenéticos (Titova et al., 2017). Los sellos neuropatológicos de esta complicada fisiopatología son la degeneración progresiva de neuronas en la sustancia negra pars compacta (SNc) de los ganglios basales, cuya función es la transmisión de dopamina, y las inclusiones de cuerpos de Lewy que se componen principalmente ASN, una proteína presináptica que tiene un papel fundamental en la liberación vesicular de neurotransmisores, el transporte axonal y mecanismos de autofagia (Salari y Bagheri, 2019).

Los cuerpos de Lewy son agregados fibrilares insolubles anormales que se desarrollan dentro de las células nerviosas (Lotankar et al., 2017). La pérdida de neuronas dopaminérgicas se relaciona con los síntomas motores de la enfermedad y la degeneración de neuronas noradrenérgicas, colinérgicas o serotoninérgicas se relaciona con los síntomas no motores (Cabreira y Massano, 2019).

Esta enfermedad presenta una etiopatogenia heterogénea, basada en la interacción genético-ambiental y el envejecimiento. Hay distintos factores que predicen un peor pronóstico como son la edad avanzada, sexo masculino, epigenética, deterioro motor axial, deterioro cognitivo temprano, disfunción autonómica, el traumatismo craneoencefálico, la exposición a pesticidas agrícolas y otras toxinas como el manganeso o el zinc (Cabreira y Massano, 2019; Reiner et al., 2021). Entre los factores genéticos, un historial positivo de EP

conduce a un mayor riesgo de incidencia del trastorno, y entre el 5% y el 10% de los pacientes con diagnóstico de EP tienen mutaciones en los genes asociados (Salari y Bagheri, 2019).

El primer gen identificado fue SNCA (α -sinucleína). Posteriormente, se descubrieron otros genes familiares ligados a la enfermedad, como parkin, DJ-1, PINK1 y LRRK2 (Chia et al., 2020). Recientemente se ha sugerido que el COVID-19 puede mejorar la progresión de la enfermedad, pero aún se necesitan estudios adicionales para investigar esta hipótesis en profundidad (Reiner et al., 2021).

La enfermedad afecta al 2% de la población mayor de 65 años y al 4% de la población mayor de 85 años (Opara et al., 2017). El inicio de la EP suele ser a partir de los 65 años y aparece más frecuentemente en hombres que en mujeres (Gazerani, 2019). En las últimas décadas, la prevalencia de la EP ha ido en aumento. Se estima la existencia de unos 6,1 millones de personas diagnosticadas con EP en todo el mundo, cifra que no superaba los 2,5 millones en 1990. La incidencia de la EP ha aumentado de 5 a más de 35 / 100.000 casos nuevos al año y aumenta de 5 a 10 veces desde la sexta a la novena década de la vida (Simon et al., 2020).

En las últimas décadas ha habido un gran progreso en la comprensión de la base molecular de la neurodegeneración en la EP, lo que ayudará a obtener terapias eficaces para modificar la enfermedad (Simon et al., 2020). A continuación, se describen una serie de aplicaciones biotecnológicas adaptadas al tratamiento o prevención de la EP.

4.4.1. Empleo de la terapia génica para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson

Conociendo el mecanismo patológico de la EP, se han seleccionado una serie de estrategias basadas en la transferencia génica, que se lleva a cabo a través de vectores virales. Estas estrategias proporcionan beneficios, tales como mejora de los síntomas motores, garantías de seguridad o prevención de la degeneración.

Una de las estrategias llevadas a cabo fue la **administración del gen del enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) mediante el uso del virus adenoasociado AAV2**. La GAD es una enzima neuronal que media la síntesis del neurotransmisor inhibitorio GABA en el núcleo subtalámico (STN). Esta estrategia se basó en aumentar la producción de GABA y contrarrestar la hiperactividad patológica de esta enfermedad que se produce por la pérdida de estimulación dopaminérgica en el STN. Se realizaron ensayos de Fase I y Fase II en los que se

administró por infusión AAV2-GAD al STN de pacientes con EP. Se llevó a cabo a través de la administración mejorada por convección (CED), un sistema que ayuda a verificar si la administración de los vectores ha sido correcta. Ambos estudios mostraron que la administración de AAV2-GAD condujo a la formación de nuevas vías neuronales en el cerebro, que conectan el STN a otras regiones motoras, mejorando síntomas motores en los pacientes con EP (Sudhakar y Richardson, 2019).

De forma similar se realizó otra estrategia basada en la **administración del gen de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) mediante el uso de AVV2**. AADC es la enzima limitante en la conversión de levodopa en dopamina y se utilizó como profármaco, para aumentar esta conversión. La levodopa es el medicamento más eficaz contra el Parkinson, se convierte en dopamina en el cerebro a través de esta enzima. Esta estrategia tuvo como diana el cuerpo estriado poscomisural ya que se ha demostrado que las células de esta zona pueden expresar transgenes durante un largo período de tiempo. Se realizó un ensayo clínico de Fase I donde se administró AAV2-AADC a 10 pacientes con EP divididos en dos grupos de dosificación, alta y baja dosis, monitoreados durante 5 años. Se evaluaron los resultados obtenidos a través de las exploraciones de PET-FMT (tomografía de emisión de positrones-6-[¹⁸F]fluoro-L-m-tirosina (marcador de la actividad de AADC)) posoperatorias y demostraron un aumento del 25% y 65% en los niveles de captación de AADC en los grupos de dosis baja y alta, respectivamente. El estudio demostró la seguridad de esta terapia, aunque la eficacia clínica no fue elevada y por ello el ensayo no continuó en fases posteriores (Sudhakar y Richardson, 2019). Con la misma terapia, se desarrolló otro ensayo donde se administró AAV2-AADC en el putamen, donde se encontraron niveles bajos de dopamina, obteniéndose resultados clínicos modestos y garantías de seguridad. (Choudhury et al., 2017).

Siguiendo con esta estrategia, se realizó un ensayo clínico de Fase I con 15 pacientes a los que se les **administró el gen que codifica la AADC a través de un virus adenoasociado**. El objetivo de la estrategia fue aumentar los niveles de dopamina en el cuerpo estriado mediante la introducción de genes que median la síntesis de dopamina. Los pacientes recibieron el tratamiento en tres dosis distintas, teniendo como diana el putamen. Los resultados iniciales sugirieron que el tratamiento era bien tolerado y garantizaba su seguridad. Los efectos obtenidos fueron prometedores, puesto que el volumen de agente administrado cubría una gran parte de la estructura diana, produciéndose así un aumento de la actividad enzimática en

la zona. Además, estos beneficios se correlacionaron con una reducción en la dosis de levodopa administrada a los pacientes (Stoker et al., 2020).

Otra estrategia utilizada se basa en la **administración del gen del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) mediante el uso de un virus adenoasociado AVV2**. El GDNF es miembro de la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y se considera una neurotrofina restauradora. Estas son proteínas cuya función es la diferenciación, crecimiento y supervivencia de neuronas periféricas, y que tienen efectos neuroprotectores y neuroregenerativos. La terapia tuvo como diana el cuerpo estriado y la sustancia negra de primates. Como resultado, se consiguió prevenir de la degeneración nigroestriatal y de fibras degeneradas en un alto porcentaje. Los animales no demostraron respuesta inmunológica y continuaron la expresión de GDNF 8 meses después de la infusión. La misma técnica aplicada a pacientes con EP mostró una elevada protección frente a la neurodegeneración, más función protectora que restauradora del GDNF. En este caso, la administración del vector solo se realizó cuando los síntomas de la EP estaban presentes más de 6 meses. En ambos estudios también se evaluó la seguridad y eficacia de administrar dosis más elevadas de AAV2-GDNF, garantizando la seguridad del proceso. Como conclusión, la estrategia mostró signos de prevención frente a la neurodegeneración que provoca la EP y se observó también un aumento de la presencia de dopamina. Estos resultados reafirmaron el uso de esta estrategia y su estudio en nuevas investigaciones (Sudhakar y Richardson, 2019).

4.4.2. Empleo de la Inmunoterapia en el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson

Atendiendo al mecanismo patológico de la enfermedad, se han seleccionado una serie técnicas basadas en el uso de anticuerpos monoclonales (mAB) que han proporcionado beneficios al tratamiento de la EP.

Una de las técnicas escogidas se basa en el uso de **anticuerpos monocatenarios D10 o D5 (scFv)** que se dirigen a los agregados de α -syn en pacientes con EP. D10 mostró una alta afinidad por el monómero α -syn y D5 por oligómeros de α -syn mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y microscopía de fuerza atómica. Ambos anticuerpos redujeron los niveles de α -syn y mostraron indicios de prevenir la agregación de α -syn (Wang et al., 2019).

Otro anticuerpo que destaca es **BIIB054**, un anticuerpo monoclonal humano que se une a agregados de α -syn, concretamente a un epítipo N-terminal con una alta especificidad por los

agregados oligoméricos y las formas fibrilares de α -syn, y que presenta buena eficacia en modelos de ratón con EP. BIIB054 se generó a partir de linfocitos sanguíneos recolectados de individuos ancianos sanos sin signos de trastornos neurodegenerativos mediante la clonación de genes (Weihofen et al., 2019). Los estudios revelaron que el tratamiento con BIIB054 redujo la propagación de α -syn, rescató deficiencias motoras, redujo la pérdida de densidad del transportador de dopamina en las terminales dopaminérgicas del cuerpo estriado y se dirigió preferentemente a las formas tóxicas de α -syn. Los beneficios reportados proporcionaron una justificación válida para el desarrollo clínico de BIIB054, facilitando su uso en el tratamiento y la prevención de la EP (Weihofen et al., 2019). Por otro lado, se realizó un ensayo de Fase I con 48 voluntarios sanos y 18 pacientes con EP. Los pacientes sanos recibieron una dosis única del anticuerpo (1-135 mg/kg) o placebo por vía IV; los enfermos recibieron una dosis única de anticuerpo (15 o 45 mg/kg) o placebo. Tras las evaluaciones, se obtuvieron resultados favorables en cuanto a seguridad, tolerabilidad y propiedades farmacocinéticas, se consiguió reducir los agregados de α -syn y los eventos adversos que se notificaron fueron leves en ambos grupos de tratamiento, lo que apoya que se desarrolle más su aplicación clínica (Brys et al., 2019).

De forma similar, el anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 **PRX002** se dirigió contra formas agregadas de α -syn, pero en este caso al epítipo C-terminal. Se administró este anticuerpo a través de un ensayo clínico de Fase IA en pacientes con EP. Estos pacientes mostraron una reducción del 96,5% en la concentración de α -syn en suero libre. Posteriormente, se realizó un ensayo de Fase IB para evaluar la seguridad y la tolerabilidad de la administración por infusión del anticuerpo. Los resultados de ambos ensayos fueron muy similares y se garantizó tanto la seguridad como la tolerabilidad (Fields et al., 2019). Se realizó otro estudio de Fase I que evaluó el impacto de PRX002 administrado por infusión IV a 40 participantes sanos en 5 cohortes de dosis ascendentes en el que los pacientes fueron asignados al azar para recibir el fármaco o el placebo. Los resultados demostraron la seguridad, la tolerabilidad y perfiles farmacocinéticos favorables de las dosis probadas y no hubo procesos de inmunogenicidad. Se observó una reducción significativa dependiente de la dosis de la concentración de α -syn libre en el suero 1 hora después de la administración. Esta reducción persistió durante al menos 2-4 semanas tras la administración del anticuerpo. Este estudio demostró que PRX002 es capaz de modular de forma segura la α -syn en suero tras infusiones IV únicas. Todos estos datos apoyan el desarrollo de nuevas investigaciones basadas en el uso de PRX002 para el tratamiento o prevención de la EP (Schenk et al., 2017).

4.5. Biotecnología en el tratamiento de la enfermedad de Huntington (EH)

La Enfermedad de Huntington (EH) es una afección neurodegenerativa monogénica que suele manifestarse en la edad adulta y que se hereda de forma autosómica dominante. La enfermedad comienza asintomática y es en torno a la tercera década de vida donde aparecen los síntomas y la progresión ya es incesante (Wilton y Stevens, 2020). El trastorno se definió en 1993 cuando se determinó que la EH está causada por una expansión inestable de repeticiones CAG (trinucleótido que codifica la glutamina) en un gen que se encuentra en el cromosoma 4 dentro de la huntingtina (HTT), causando una proteína huntingtina mutada (mHTT) (Maiuri et al., 2019). Esta mutación conduce a la elongación del tracto de poliglutamina dentro de la huntingtina, por lo que la EH se considera una enfermedad poliglutamínica (Illarioshkin et al., 2018).

Dentro de la EH se pueden distinguir la EH juvenil (aparece antes de los 21 años y presenta síntomas clínicos marcados) y la EH de aparición tardía (aparece después de los 60 años). Factores como el abuso de alcohol, drogas y tabaco marcan un inicio más temprano de la enfermedad. El sueño interrumpido, los tics, el dolor, la picazón y la psicosis son los síntomas más comunes de la EH juvenil (Kumar et al., 2020).

Esta enfermedad se manifiesta con síntomas motores (corea, discinesia y distonía), síntomas psiquiátricos que suelen preceder a los motores (depresión, ansiedad y trastornos del sueño), dificultad para concentrarse y retener información, disminución de las habilidades del lenguaje, habla desorganizada y alteraciones de la percepción provocados por el deterioro cognitivo. En estadios avanzados de la enfermedad predominan la rigidez motora y la demencia (Pandey y Rajamma, 2018). Todos estos síntomas se deben a la atrofia de los ganglios basales (principalmente el cuerpo estriado) y la corteza cerebral (Illarioshkin et al., 2018).

La característica neuropatológica más relevante es la apariencia encogida de la zona neocortical con atrofia macroscópica del núcleo caudado y putamen, el agrandamiento de los ventrículos y la pérdida de la sustancia blanca en la zona subcortical. Los cerebros con EH pesan entre un 10 y un 20% menos que los cerebros controles de la misma edad (Pandey y Rajamma, 2018).

La prevalencia media de la EH en el mundo es de 1 caso por cada 10.000, con una progresión irreversible de los síntomas en un período de 10 a 15 años (Blumenstock y Dudanova, 2020). Actualmente, las investigaciones se han centrado en el desarrollo y prueba

de terapias que se dirigen proximalmente en la patogénesis de la EH, es decir, dirigidas al ADN, ARN y la proteína HTT (Tabrizi et al., 2019).

4.5.1. Empleo de la terapia génica para el tratamiento de la Enfermedad de Huntington

Teniendo en cuenta el mecanismo patológico de la enfermedad de Huntington, se han escogido una serie de estrategias llevadas a cabo por vectores virales en las que se observan beneficios, tales como buenos resultados de seguridad y tolerabilidad, reducción de los agregados de mHTT o mejoras en los síntomas motores.

Una de las estrategias seleccionadas se basó en la **administración del vector viral AAV5 que codifica un microARN (miARN) diseñado contra el ARNm de HTT (AAV5-miHTT)**. El objetivo fue reducir los niveles de huntingtina mutada (mHTT) a través de la administración este vector viral. Se llevaron a cabo estudios preclínicos en roedores a los que se les administró una dosis única del anticuerpo vía intracraneal. Se obtuvieron buenos resultados de seguridad y tolerabilidad y se observó que el vector se distribuyó de forma generalizada y que redujo extensamente la concentración de mHTT. Estos resultados apoyaron la evolución de estos estudios preclínicos a ensayos clínicos en pacientes con EH (Evers et al., 2018). Otro estudio con la misma metodología demostró la supresión del ARNm de la mHTT, reduciéndose casi por completo la formación de agregados de mHTT y suprimiéndose también la disfunción neuronal asociada a la fosfoproteína neuronal regulada por dopamina y AMP cíclico (DARPP-32). DARPP-32 interviene en la regulación de las neuronas dopaminérgicas por lo que contrarrestar su disfunción fue un gran resultado. Durante el proceso no se desarrolló inmunogenicidad. Se demostró que el uso de la terapia génica para acabar con la mHTT puede proporcionar importantes beneficios terapéuticos para pacientes con EH ya que los datos de reducción de mHTT fueron muy esperanzadores (Miniarikova et al., 2017).

Otras estrategias se basaron en el **uso del vector viral AAV-HTT-gRNA que expresa una serie de ARN guías (gARN) que van dirigidos a la región de repetición CAG en el ADN y el vector viral AAV-CMV-Cas9 que expresa Cas9, enzima endonucleasa de ADN guiada por ARN y asociada con el sistema CRISPR**. Se demostró que la supresión de la expresión de mHTT en el cuerpo estriado de ratones transgénicos, por medio de la inactivación producida por CRISPR/Cas9, redujo eficazmente los agregados de HTT y atenuó la patología temprana de la enfermedad. Mediante esta técnica se consiguió el alivio de los síntomas motores de la EH y la reducción de la expansión del tracto de poliglutamina. En los ensayos se inyectó AAV-HTT-

gRNA y AAV-CMV-Cas9 en un lado del cuerpo estriado de los ratones y en el cuerpo estriado contralateral se inyectó con AAV-HTT-gRNA o AAV-CMV-Cas9, para evaluar la eficacia de la reducción de mHTT. En la evaluación de los resultados, la inmunotinción mostró una disminución drástica en la acumulación nuclear y la agregación de mHTT en el cuerpo estriado de los ratones tratados con los dos vectores. Esto demostró la eficacia de la técnica para reducir la toxicidad neuronal de esta patología (Yang et al., 2017).

Una estrategia interesante también fue **la combinación de terapia génica y células madre:**

Las células autólogas, es decir, las procedentes del propio paciente son la mejor técnica para la terapia de reemplazo celular ya que el rechazo inmunológico es mínimo o nulo. Sin embargo, es necesario corregir las mutaciones existentes para obtener efectos beneficiosos a largo plazo. De esta manera, la combinación de la terapia génica con el reemplazo de células madre resulta interesante y proporciona varias ventajas como: i) el establecimiento de células inmunocompatibles y genéticamente iguales de los pacientes, ii) la diferenciación de la población de células diana o precursoras y iii) la corrección genética de mutaciones mediante las técnicas knock-down o knock-out (Cho et al., 2019).

Se evaluó la eficacia de esta combinación de técnicas mediante el injerto de células progenitoras neuronales derivadas de monos transgénicos que expresaban oligonucleótidos antisentido de ARN (shARN) contra HTT en ratones con EH. Estos injertos extendieron la vida útil de los ratones en comparación con un grupo control. Además, la inmunotinción realizada demostró que las células injertadas eran capaces de diferenciarse en distintas células neuronales que expresan MAP2, GABA y GFAP, que son marcadores de neuronas y astrocitos. Estos resultados mostraron que la combinación de células madre y terapia génica podría ser una opción de tratamiento eficaz para la EH y proporcionaron una justificación para una mayor investigación de la eficacia clínica de esta terapia (Cho et al., 2019).

En la misma línea que la estrategia anterior, se desarrolló un ensayo basado en el **uso de células madre mesenquimales (MSC) modificadas genéticamente**. Las MSC son células madre adultas multipotentes que pueden diferenciarse en diversos tipos de células manteniendo la capacidad de auto renovación. Son capaces de secretar factores neurotróficos en respuesta a elementos inflamatorios locales, mejorando la neurogénesis y la creación de nuevas sinapsis, e inhibiendo la señalización apoptótica. Entre esos factores se encuentra el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que interviene tanto en la supervivencia como en la función de las neuronas estriatales. Este factor se encuentra a niveles muy bajos en pacientes con EH

provocado por la inhibición a nivel transcripcional por la proteína huntingtina mutante (mHTT), y esta disminución se correlaciona con la aparición de síntomas y la posibilidad de una forma de EH mucho más grave en ratones transgénicos (Deng et al., 2016). Se realizó un estudio con MSC derivadas de ratón y se utilizaron como vehículo de administración para la terapia génica, ya que estas células son fáciles de reprogramar. El objetivo era que estas células sobreexpresaran el BDNF en ratones transgénicos. Así, estas células mostraron una mejora motora y una mayor viabilidad neuronal después del trasplante, así como, la capacidad de migrar a áreas de daño tisular y producir un efecto terapéutico persistente incluso después de la eliminación celular (Deng et al., 2016).

4.5.2. Empleo de la Inmunoterapia en el tratamiento de la Enfermedad de Huntington

De acuerdo con las bases patológicas de la enfermedad, se han seleccionado un conjunto de técnicas basadas en el uso de anticuerpos monoclonales (mAB) que han mostrado beneficios relevantes en el tratamiento de la EP, tales como disminución de la agregación de mHTT y bloqueo de la secreción extracelular de mHTT.

Una de las estrategias llevada a cabo se basó en la utilización del **intracuerpo anti-N-terminal HTT C4**, un anticuerpo recombinante intracelular con gran especificidad y afinidad por la diana, que tiene inmunogenicidad mínima o nula. Mediante un modelo de *Drosophila* de EH, se demostró que este intracuerpo ralentiza la progresión de la neurodegeneración y la formación de agregados de mHTT en cultivos celulares, y aumenta la supervivencia hasta la edad adulta (Manoutcharian et al., 2016). Además, también redujo las características patológicas en ratones transgénicos tras la administración intracraneal del anticuerpo utilizando un vector viral AAV. Sobre la agregación y la toxicidad de mHTT, la administración del vector provocaba un efecto distinto dependiendo de a qué dominio se unía. Su unión a los dominios ricos en prolina mostraba una función protectora, mientras que si reconocía la secuencia de poliglutamina estimulaban la agregación y la apoptosis de HTT (Manoutcharian et al., 2017).

Otra estrategia se basó en la utilización del **anticuerpo monoclonal C6-17**, un anticuerpo que posee una alta afinidad por una región cercana al sitio de escisión de la caspasa-6 en la posición D586 de la proteína HTT humana. Se probó funcionalmente en ensayos *in vitro* basados en células y se observó que se unía eficazmente a la mHTT y que bloqueaba tanto la secreción extracelular como la captación celular de mHTT (Bartl et al., 2020). Esto tiene

importantes implicaciones en el desarrollo de futuras terapias para tratar la EH, aunque todavía es necesario nuevos estudios para evaluar distintos parámetros como la toxicidad. Por tanto, será necesario realizar estudios para validar aún más este anticuerpo, aun así estos hallazgos proporcionaron la base para el desarrollo de terapias basadas en anticuerpos con eficacia clínica relevante para el tratamiento de la EH (Bartl et al., 2020).

5. CONCLUSIONES

Las distintas aplicaciones biotecnológicas desglosadas en este trabajo han demostrado tener beneficios terapéuticos para el tratamiento del Alzheimer, Parkinson y Corea de Huntington.

Con respecto a las estrategias llevadas a cabo por la terapia génica, se ha observado una eficacia clínica relevante en el tratamiento de estas enfermedades. En la enfermedad de Alzheimer, el uso de vectores virales consiguió numerosos beneficios tales como mejora de la función cognitiva, reducción de los agregados del péptido amiloide cerebral y prevención de la degeneración neuronal provocada por el genotipo ApoE4. En la enfermedad de Parkinson se ha observado una mejora de los síntomas motores como bradicinesia, la rigidez de las extremidades o el temblor en reposo, un aumento de las cantidades de dopamina y contrarrestar la pérdida de la actividad enzimática en la zona afectada. En la Corea de Huntington se observó una reducción importante de los agregados de mHTT, aumentos de la esperanza de vida y mejora de los síntomas motores tales como corea o discinesia.

Por su parte, las estrategias llevadas a cabo por la inmunoterapia a través de anticuerpos monoclonales también mostraron unos beneficios clínicos importantes. En la enfermedad de Alzheimer se observó menor daño cerebral, un aumento de la coordinación neuromuscular, mejora de la memoria y reducción del péptido amiloide. En la enfermedad de Parkinson fue notable la reducción de los agregados de α -syn, las mejoras de los síntomas motores y la reducción de la pérdida de dopamina. Por su parte, en la enfermedad de Huntington se observó una reducción de la progresión de la neurodegeneración y de los agregados de mHTT, y aumento de la esperanza de vida de los pacientes.

Todas las estrategias vistas han aportado unos beneficios relevantes para el tratamiento o prevención de estas enfermedades, y han progresado hacia una clínica más eficaz con el paso de los años. Muchas se han quedado en el camino cuando se llevaron a cabo los ensayos

clínicos, aun estando respaldadas por resultados preclínicos prometedores, lo que hace necesario nuevos ensayos más sólidos.

En general, se puede concluir que las aplicaciones biotecnológicas estudiadas tienen efectos beneficiosos sobre el desarrollo de los trastornos neurodegenerativos de forma más precisa e individualizada. El uso de anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes o vectores virales y su evaluación mediante ensayos de alto nivel hacen que cada vez sea mayor su presencia en la práctica clínica. Sin embargo, a día de hoy se requieren futuras investigaciones para encontrar tratamientos con alta eficacia y seguridad para tratar estas patologías, ya sea con aumentos de dosis o dirigidos a la búsqueda de nuevos fármacos o estrategias.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Agustín-Pavón C. Explorant teràpies biotecnològiques contra les malalties neurodegeneratives. Anu l'Agrupació Borrianenca Cult Recer Humanística i Científica. 2016; 27: 89–99.
2. Bartl S, Oueslati A, Southwell AL, Siddu A, Parth M, David LS, et al. Inhibiting cellular uptake of mutant huntingtin using a monoclonal antibody: Implications for the treatment of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 2020; 141: 104943.
3. Blumenstock S, Dudanova I. Cortical and Striatal Circuits in Huntington's Disease. *Front Neurosci.* 2020; 14.
4. Bondi MW, Edmonds EC, Salmon DP. Alzheimer's disease: Past, present, and future. *J Int Neuropsychol Soc.* 2017; 23(9-10): 818–31.
5. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer ' s Disease. *Molecules.* 2020; 25(24): 5789.
6. Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond).* 2016; 16(3): 247–53.
7. Brys M, Fanning L, Hung S, Ellenbogen A, Penner N, Yang M, et al. Randomized phase I clinical trial of anti- α -synuclein antibody BII054. *Mov Disord.* 2019; 34(8): 1154–63.
8. Cabreira V, Massano J. Parkinson's disease: Clinical review and update. *Acta Med Port.* 2019; 32(10): 661–70.
9. Chen YH, Keiser MS, Davidson BL. Viral Vectors for Gene Transfer. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2018; 8(4): e58.
10. Chia SJ, Tan E, Chao YX. Historical Perspective : Models of Parkinson ' s Disease. *Int J Mol*

- Sci. 2020; 21(7): 2464.
11. Cho IK, Hunter CE, Ye S, Pongos AL, Chan AWS. Combination of stem cell and gene therapy ameliorates symptoms in Huntington's disease mice. *Npj Regen Med.* 2019; 4(7).
 12. Choudhury SR, Hudry E, Maguire CA, Sena-Esteves M, Breakefield XO, Grandi P. Viral vectors for therapy of neurologic diseases. *Neuropharmacology.* 2017; 120: 63–80.
 13. Crommelin DJA, Mastrobattista E, Hawe A, Hoogendoorn KH, Jiskoot W. Shifting Paradigms Revisited : Biotechnology and the Pharmaceutical Sciences. *J Pharm Sci.* 2020; 109(1): 30–43.
 14. Cummings JL, Cohen S, Van Dyck CH, Brody M, Curtis C, Cho W, et al. ABBY: A phase 2 randomized trial of crenezumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology.* 2018; 90(21): e1889–97.
 15. Cummings JL, Tong G, Ballard C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *J Alzheimer's Dis.* 2019; 67(3): 779–94.
 16. Davis AA, Leyns CEG, Holtzman DM. Intercellular Spread of Protein Aggregates in Neurodegenerative Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2018; 34: 545–68.
 17. Deng P, Torrest A, Pollock K, Dahlenburg H, Annett G, Nolta JA, et al. Clinical trial perspective for adult and juvenile Huntington's disease using genetically-engineered mesenchymal stem cells. *Neural Regen Res.* 2016; 11(5): 702–5.
 18. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial Disorders in the Nervous System. *Annu Rev Neurosci.* 2008; 31: 91-123.
 19. Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Andrieu S, Bakardjian H, et al. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. 2016; 12(3): 292-323.
 20. Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017; 9(7): a028035.
 21. Evers MM, Miniarikova J, Juhas S, Vallès A, Bohuslavova B, Juhasova J, et al. AAV5-miHTT Gene Therapy Demonstrates Broad Distribution and Strong Human Mutant Huntingtin Lowering in a Huntington's Disease Minipig Model. *Mol Ther.* 2018; 26(9): 2163–77.
 22. Fields CR, Bengoa-Vergniory N, Wade-Martins R. Targeting Alpha-Synuclein as a Therapy for Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci.* 2019; 12: 229.
 23. Flores JF, García H, Morales EU, Islas CU. Usos de anticuerpos monoclonales en medicina. *TEPEXI Boletín Científico De La Escuela Superior Tepeji Del Río.* 2019; 6(11): 25–8.
 24. Garcés M. Enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y

- social. 2016:175.
25. García A. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*. 2011; 26(5): 301-306.
 26. Gazerani P. Probiotics for Parkinson Disease Marked. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(17): 4121.
 27. Gitler AD, Dhillon P, Shorter J. Neurodegenerative disease: Models, mechanisms, and a new hope. *Dis Model Mech*. 2017; 10(5): 499–502.
 28. Honig LS, Vellas B, Woodward M, Boada M, Bullock R, Borrie M, et al. Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer’s Disease. *N Engl J Med*. 2018; 378(4): 321–30.
 29. Hudry E, Vandenberghe LH. Therapeutic AAV Gene Transfer to the Nervous System: A Clinical Reality. *Neuron*. 2019; 101(5): 839–62.
 30. Illarioshkin SN, Klyushnikov SA, Vigont VA, Seliverstov YA, Kaznacheyeva E V. Molecular Pathogenesis in Huntington’s Disease. *Biochemistry (Mosc)*. 2018; 83(9): 1030–9.
 31. Kesik-Brodacka M. Progress in biopharmaceutical development. *Biotechnol Appl Biochem*. 2018; 65(3): 306–22.
 32. Klein G, Delmar P, Voyle N, Rehal S, Hofmann C, Abi-Saab D, et al. Gantenerumab reduces amyloid- β plaques in patients with prodromal to moderate Alzheimer’s disease: A PET substudy interim analysis. *Alzheimer’s Res Ther*. 2019; 11(1): 101.
 33. Knowles TPJ, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(6): 384–96.
 34. Kovacs GG. Molecular pathology of neurodegenerative diseases : principles and practice. *J Clin Pathol*. 2019; 72(11): 725–35.
 35. Kovacs GG. Concepts and classification of neurodegenerative diseases. *Handb Clin Neurol*. 2018; 145: 301–7.
 36. Kovacs GG. Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases : Turning towards Precision Medicine. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(2): 189.
 37. Kovacs GG. Current concepts of neurodegenerative diseases. *EMJ Neurol*. 2014; 1(1): 10-11.
 38. Kumar A, Kumar V, Singh K, Kumar S, Kim YS, Lee YM, et al. Therapeutic advances for huntington’s disease. *Brain Sci*. 2020; 10(1): 43.
 39. Lázaro DF, Bellucci A, Brundin P, Outeiro TF. Editorial : Protein Misfolding and Spreading Pathology in Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Neurosci*. 2020; 12: 321.
 40. Lotankar S, Prabhavalkar KS, Bhatt LK. Biomarkers for Parkinson’s Disease: Recent Advancement. *Neurosci Bull*. 2017; 33(5): 585–97.
 41. Lukashev AN, Zamyatnin AA. Viral Vectors for Gene Therapy : Current State and Clinical

- Perspectives. *Biochemistry (Mosc)*. 2016; 81(7): 700–8.
42. Maiuri T, Suart CE, Hung CLK, Graham KJ, Barba Bazan CA, Truant R. DNA Damage Repair in Huntington's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *Neurotherapeutics*. 2019; 16(4): 948–56.
 43. Manoutcharian K, Perez-Garmendia R, Gevorkian G. Recombinant Antibody Fragments for Neurodegenerative Diseases. *Curr Neuropharmacol*. 2017; 15(5): 779–88.
 44. Mena-enriquez M, Flores-contreras L, Armendáriz-borunda J. Vectores virales adeno-asociados : métodos de producción , purificación y aplicaciones en terapia génica. *Revista de investigación clínica*. 2012; 64(5): 487–94.
 45. Mendiola-Precoma J, Berumen LC, Padilla K, Garcia-Alcocer G. Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 2589276.
 46. Miguel C, Sánchez C, Adalys L, León G, Manuel P, Baeza L, et al. Terapia génica, una alternativa antineoplásica. *Scalpelo*. 2020; 1(1): 41–8.
 47. Miniarikova J, Zimmer V, Martier R, Brouwers CC, Pythoud C, Richetin K, et al. AAV5-miHTT gene therapy demonstrates suppression of mutant huntingtin aggregation and neuronal dysfunction in a rat model of Huntington's disease. *Gene Ther*. 2017; 24(10): 630–9.
 48. Mozafari M, Tariverdian T, Beynaghi A. Trends in Biotechnology at the Turn of the Millennium. 2020; 14(1): 78–82.
 49. Naseri NN, Wang H, Guo J, Sharma M, Luo W. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2019; 705: 183–94.
 50. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016; 53: 4094–125.
 51. Opara JA, Małecki A, Małecka E, Socha T. Motor assessment in parkinson's disease. *Ann Agric Environ Med*. 2017; 24: 411–5.
 52. Ostrowitzki S, Lasser RA, Dorflinger E, Scheltens P, Barkhof F, Nikolcheva T, et al. A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res Ther*. 2017; 9(1): 95.
 53. Pandey M, Rajamma U. Huntington's disease: the coming of age. *J Genet*. 2018; 97(3): 649–64.
 54. Parashar A, Udayabanu M. Gut microbiota: Implications in Parkinson'disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017; 38: 1-7.
 55. Peláez P. La biotecnología: ¿Cómo se ha reconceptualizado la elección de la raza?. *REEPS*. 2020: 1-17.

56. Piguet F, Alves S, Cartier N. Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. *Hum Gene Ther Methods*. 2017; 28(11): 988-1003.
57. Reiner O, Sapir T, Parichha A. Using multi-organ culture systems to study Parkinson's disease. *Mol Psychiatry*. 2021; 26: 725–35.
58. Reith W. Neurodegenerative Diseases. *Radiologe*. 2018; 58: 241–58.
59. Rekatsina M, Paladini A, Piroli A, Zis P, Pergolizzi J V., Varrassi G. Pathophysiology and Therapeutic Perspectives of Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Narrative Review. *Adv Ther*. 2020; 37(1): 113–39.
60. Rendueles M, Díaz M. Biotecnología industrial. *Arbor*. 2014; 190(768): 155.
61. Rodger AL. Parkinson's disease from the gut. *Brain Research*. 2018; 1693: 201-6.
62. Rosenberg JB, Kaplitt MG, De BP, Chen A, Flagiello T, Salami C, et al. AAVrh.10-Mediated APOE2 Central Nervous System Gene Therapy for APOE4-Associated Alzheimer's Disease. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2018; 29(1): 24–47.
63. Salari S, Bagheri M. In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. *Physiol Res*. 2019; 68(1): 17–24.
64. Salloway S, Honigberg LA, Cho W, Ward M, Friesenhahn M, Brunstein F, et al. Amyloid positron emission tomography and cerebrospinal fluid results from a crenezumab anti-amyloid-beta antibody double-blind, placebo-controlled, randomized phase II study in mild-to-moderate Alzheimer's disease (BLAZE). *Alzheimer's Res Ther*. 2018; 10(1): 96.
65. Sánchez LP. Enfermedades neurodegenerativas. En *Actividades integradoras del Aprendizaje por Sistemas AIAS del sistemas nervioso*. Universidad del Rosario. 2017:201–8.
66. Sánchez Montero JM. Biotecnología blanca e industria farmacéutica. *An R Acad Nac Farm*. 2007; 73: 501–35.
67. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2016; 388(10043): 505–17.
68. Schenk DB, Koller M, Ness DK, Griffith SG, Grundman M, Zago W, et al. First-in-human assessment of PRX002, an anti- α -synuclein monoclonal antibody, in healthy volunteers. *Mov Disord*. 2017; 32(2): 211–8.
69. Shepard AHM, Phillips AGL, C BCDT, D MF. Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. *Clin Med (Lond)*. 2017; 17(3): 220–32.
70. Siemers ER, Sundell KL, Carlson C, Case M, Sethuraman G, Liu-Seifert H, et al. Phase 3 solanezumab trials: Secondary outcomes in mild Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's Dement*. 2016; 12(2): 110–20.

71. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med*. 2020; 36(1): 1-12.
72. Soto C, Pritzkow S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strain in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*. 2018; 21(10): 1332–40.
73. Stoker TB, Barker RA. Recent developments in the treatment of Parkinson's Disease. *F1000Res*. 2020; 9: F1000.
74. Sudhakar V, Richardson RM. Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases. *Neurotherapeutics*. 2019; 16(1): 166–75.
75. Tabrizi SJ, Ghosh R, Leavitt BR. Huntingtin Lowering Strategies for Disease Modification in Huntington's Disease. *Neuron*. 2019; 101(5): 801–19.
76. Tiller KE, Tessier PM. Advances in Antibody Design. *Annu Rev Biomed Eng*. 2015; 17: 191–216.
77. Titova N, Padmakumar C, Lewis SJG, Chaudhuri KR. Parkinson's: a syndrome rather than a disease? *J Neural Transm (Vienna)*. 2017; 124: 907–14.
78. Tiwari S, Venkata A, Kaushik A, Adriana Y, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine*. 2019; 14: 5541–54.
79. Varadé J, Magadán S, González-fernández Á. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cell Mol Immunol*. 2020; 18: 805-28.
80. Villain N, Dubois B. Alzheimer's Disease Including Focal Presentations. *Semin Neurol*. 2019; 39(2): 213–26.
81. Wahane A, Waghmode A, Kappahahn A, Dhuri K, Gupta A, Bahal R. Role of Lipid-Based and Polymer-Based Non-Viral Vectors in Nucleic Acid Delivery for Next-Generation Gene Therapy. *Molecules*. 2020; 25 (12): 2866.
82. Wang D, Gao G. STATE-OF-THE-ART HUMAN GENE THERAPY: PART I. GENE DELIVERY TECHNOLOGIES. 2014; 18: 67–77.
83. Wang Z, Gao G, Duan C, Yang H. Progress of immunotherapy of anti- α -synuclein in Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother*. 2019; 115: 108843.
84. Weihofen A, Liu YT, Arndt JW, Huy C, Quan C, Smith BA, et al. Development of an aggregate-selective, human-derived α -synuclein antibody BIIB054 that ameliorates disease phenotypes in Parkinson's disease models. *Neurobiol Dis*. 2019; 124: 276–88.
85. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res*. 2018; 7: F1000.
86. Whittemore K, Derevyanko A, Martinez P, Serrano R, Pumarola M, Bosch F, et al.

- Telomerase gene therapy ameliorates the effects of neurodegeneration associated to short telomeres in mice. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11(10): 2916–48.
87. Wilton DK, Stevens B. The contribution of glial cells to Huntington’s disease pathogenesis. *Neurobiol Dis*. 2020; 143: 104963.
88. Wyss-coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Natures*. 2016; 539(7628): 180–6.
89. Yang S, Chang R, Yang H, Zhao T, Hong Y, Kong Eun H, et al. CRISR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J Clin Invest*. 2017; 127(7): 2719-24.
90. Yang T, Dang Y, Ostaszewski B, Mengel D, Steffen V, Rabe C, et al. Target engagement in an alzheimer trial: Crenezumab lowers amyloid β oligomers in cerebrospinal fluid. *Ann of Neurol*. 2019; 86(2): 215–24.