

Enzimas degradadoras de amiloide en la Enfermedad de Alzheimer: de las moléculas a la terapia genética

Miguel Chin-Chan,^a
 María Guadalupe Maldonado-Velázquez,^a
 Rafael Mex-Álvarez,^a
 Patricia Margarita Garma-Quen,^a
 Luis Cobos-Puc^b

Amyloid-degrading enzymes in Alzheimer's disease: from molecules to genetic therapy

Alzheimer's disease (AD) is the main form of dementia in elderly population worldwide. By 2010 it was estimated that 35.6 million of people were living with this disease, and it was projected that this figure will triple by the year 2050. According to amyloid hypothesis, production and aggregation of amyloid beta (A-beta) peptide is the initial step in AD development. A-beta peptide is generated through proteolytic processing of amyloid precursor protein (APP); whereas its degradation depends on the action of a group of proteins collectively known as amyloid-degrading enzymes (ADE), which are reduced during aging and particularly in AD. Genetic therapy consists in the restoration of the genetic expression of a deficient protein to treat a disease. Brain restoration or overexpression of ADE reduces the levels and aggregates of A-beta, and improves learning and memory in animal models of AD. In this review we will describe the role of ADE in the regulation of A-beta levels, as well as its potential use in genetic therapy against AD.

Keywords

Alzheimer Disease
 Plaque, Amyloid
 Genetic Therapy

Palabras clave

Enfermedad de Alzheimer
 Placa Amiloide
 Terapia Genética

Recibido: 20/07/2016

Aceptado: 15/02/2017

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue inicialmente estudiada por el neuropsiquiatra alemán Alois Alzheimer, hoy en día constituye la principal causa de demencia en adultos mayores.¹ A nivel mundial se estima que existen 35.6 millones de personas viviendo con esta enfermedad, y estudios de proyección indican que la cifra se triplicará para el año 2050.² En México, se estimó que la prevalencia de demencia fue de más de 800 000 personas en el año 2014 y los estudios de proyección indican que llegará a 3.5 millones en el año 2050.³

Existen dos formas de la EA, una es conocida como de inicio temprano o familiar y la otra de inicio tardío o esporádica. La forma familiar se caracteriza por ser hereditaria y de inicio temprano (antes 65 años).⁴ En contraste, la forma esporádica se presenta generalmente después de los 65 años y aunque no posee un componente estrictamente genético, se han identificado polimorfismos en el gen que codifica a la apolipoproteína E (ApoE) que pueden aumentar o disminuir el riesgo de la EA.⁴ La isoforma ApoE4 aumenta el riesgo de EA, mientras que la ApoE2 lo reduce.⁵ También se ha propuesto que factores externos como el estilo de vida y los contaminantes ambientales influyen en el desarrollo de esta enfermedad.⁶

El diagnóstico de la EA incluye pruebas de laboratorio para la determinación de los niveles del péptido beta amiloide (A-beta) y tau en líquido cefalorraquídeo, estudios de imagenología para observar agregados amiloides, la evaluación clínica y los tests neuropsicológicos.⁷ La genotipificación del gen de la ApoE se emplea como biomarcador de riesgo genético,⁸ y recientemente se ha sugerido la detección de micro-ARNs (miRNAs, por sus siglas en inglés) en sangre, suero y plasma como potenciales biomarcadores de la EA.⁹

No existe cura para la EA y la mayoría de los fármacos disponibles solamente reducen los síntomas de la enfermedad, por lo que el tratamiento es básicamente paliativo.¹⁰ Estrategias de inmunidad activa y pasiva contra el péptido A-beta han mostrado resultados positivos en animales experimentales; sin embargo, en humanos los resultados han sido menos alentadores, mostrando mejores resultados en estados tempranos de la EA.¹¹ Recientemente, la terapia genética ha llamado la atención como un tratamiento atractivo y alternativo para la EA, las estrategias se han enfocado en la expresión de genes que actúan a nivel del metabolismo de la proteína precursora amiloidea, del metabolismo de lípidos, a nivel del sistema inmunológico o aquellos asociados con la neuroprotección.¹²

^aUniversidad Autónoma de Campeche, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Cuerpo Académico Ciencias de la Salud y Biotecnología. Campeche, Campeche, México

^bUniversidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Farmacología Molecular. Saltillo, Coahuila, México

Comunicación con: Miguel Chin Chan

Teléfono: (4916) 3443 8930

Correo electrónico: jomiciet@yahoo.com.mx

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal forma de demencia en adultos mayores a nivel mundial. En el año 2010 se estimó que 35.6 millones de personas padecen esta enfermedad y se proyectó que esta cifra se triplicará para el año 2050. De acuerdo con la hipótesis amiloide, la producción y agregación del péptido beta amiloide (A-beta) es el agente inicial en el desarrollo de la EA. El péptido A-beta se genera a partir del procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide (APP), y su degradación depende de un grupo de proteínas colectivamente conocidas como enzimas degradadoras de amiloide (EDA), las cuales se

reducen durante el envejecimiento y particularmente en la EA. La terapia genética consiste en la restauración de la expresión genética de una proteína deficiente para tratar una enfermedad. La restauración o sobreexpresión cerebral de las EDA reduce los niveles y agregados de A-beta, y mejora el aprendizaje y la memoria en modelos animales de la EA. En la presente revisión se describe el papel de las EDA en la regulación de los niveles de A-beta, así como su uso potencial en la terapia genética contra la EA.

Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer: hipótesis de la cascada amiloide

En 1906 cuando el neuropsiquiatra alemán Alois Alzheimer analizó el cerebro de una paciente observó dos características histopatológicas principales: ovillos neurofibrilares a nivel intraneuronal y placas seniles en el espacio extraneuronal.¹³ Después, se reportó que los ovillos neurofibrilares están constituidos principalmente por la proteína tau en un estado anormalmente hiperfosforilado. En contraste, las placas seniles están compuestas mayoritariamente por el péptido A-beta. Actualmente, estas estructuras histopatológicas son las características distintivas de la EA, lo cual ha llevado a plantear dos hipótesis principales para su etiología: una es conocida como la *hipótesis tauista* y establece que la fosforilación anormal y truncación de tau, lleva a la formación de filamentos helicoidales pareados que constituyen los ovillos neurofibrilares y que juegan un papel central en daño cerebral de la EA.¹⁴ Por otro lado, la *hipótesis de la cascada amiloide* sugiere que la producción y agregación del péptido A-beta es el evento inicial para el desarrollo de esta enfermedad.¹⁵

En casos de EA familiar se han identificado mutaciones en genes involucrados en el anabolismo del péptido A-beta¹⁶ y gracias a la ingeniería genética se han logrado producir ratones transgénicos con mutaciones en el gen de la proteína precursora de amiloide (APP por sus siglas en inglés), en las presenilinas (PSNs) y en tau, que manifiestan alteraciones moleculares, celulares y conductuales de la EA.¹⁷

El péptido A-beta se deriva de un precursor APP, que es una proteína transmembranal tipo I, con el extremo amino terminal en el lumen y espacio extracelular y el carboxilo terminal en la región citoplasmática. Esta proteína puede seguir dos vías diferentes de procesamiento: cuando las secretasas beta y gamma la procesan enzimática y secuencialmente, se genera el péptido A-beta, razón por la que esta ruta se conoce como *amiloidogénica*; sin embargo, APP puede ser procesada por una vía no-amiloidogénica, en la que se evita la generación del péptido A-beta. Durante el proceso de síntesis del péptido A-beta se pueden generar

otros productos que se ha reportado poseen funciones específicas, entre ellas el dominio intracelular de amiloide (AICD) que posee actividad transcripcional.¹⁸

Enzimas degradadoras de amiloide

Los casos de EA familiar se deben a mutaciones genéticas en genes involucrados en la síntesis del péptido A-beta; sin embargo, en los casos de EA esporádico no se observan estas mutaciones, sugiriendo que el incremento del péptido A-beta no se debe a un aumento de su síntesis, sino a un impedimento de la depuración o degradación.¹⁹ Es decir, los niveles del péptido A-beta en el tejido cerebral se encuentran en un equilibrio dinámico, de tal manera que el aumento de la carga amiloide puede ser consecuencia de: i) aumento en su síntesis, ii) reducción de su exporte cerebral y iii) reducción de su degradación. En este sentido, estudios previos identificaron a la neprilisina como una proteasa involucrada en la degradación del péptido A-beta, y posteriormente se reportó que la enzima degradadora de insulina (EDI), las enzimas convertidoras de endotelina (ECEs), entre otras, también degradan este neuropéptido. Colectivamente, estas enzimas reciben el nombre de enzimas degradadoras de amiloide (EDA) y han generado un gran interés como potenciales candidatos para el tratamiento de la EA.²⁰

Neprilisina

La neprilisina (NEP) es una glicoproteína transmembranal de 90 a 110 kDa, es el miembro prototipo de la familia de metalopeptidasas M13 mejor caracterizado.²¹ La NEP posee un dominio catalítico que tiene el motivo típico de unión a zinc (Zn), *HexxH*.²² Se ha reportado que el péptido A-beta posee al menos 13 sitios potenciales de corte, estudios *in vitro* indican que 5 son reconocidos por la NEP.²³ Inicialmente, se reportó que la infusión continua de tiorfan (un inhibidor específico de NEP) en el ventrículo cerebral

de ratas elevó los niveles del péptido A-beta en la fracción insoluble de la corteza cerebral, pero no en la del hipocampo, produjo disfunción significativa en la capacidad para discriminar objetos y en la memoria espacial de los roedores,²⁴ mientras que en líneas celulares neuronales cotratadas con una forma soluble de NEP recombinante y el péptido A-beta se observó reducción de los niveles y toxicidad del péptido,²⁵ confirmando que NEP degrada al péptido A-beta. En concordancia, recientemente se observó que la NEP no solo degrada A-beta, sino que también puede cortar fragmentos peptídicos generados tras la degradación del péptido A-beta.²⁶ Además, el tratamiento de astrocitos con fármacos como la simvastatina y atorvastatina (estatinas con actividad positiva contra la EA) incrementa la secreción de NEP y reduce los niveles extracelulares de A-beta.²⁷ En estudios genéticos utilizando ratones envejecidos deficientes del gen de NEP (*Knockout*, KO) y con niveles fisiológicos de la APP se encontró incremento en los niveles del péptido, en la cantidad de placas amiloides y alteraciones cognitivas,²⁸ estos efectos son más pronunciados en ratones transgénicos de EA que son hemisigotos KO para el gen de NEP.²⁹ Mediante análisis proteómico se encontró que los ratones KO de NEP modifican el perfil de expresión de más de 600 genes y que tau, las presenilinas y la APP son moléculas claves en las vías moleculares alteradas.³⁰ En contraste, la sobreexpresión neuronal de NEP reduce los niveles del péptido A-beta y mejora las funciones cognitivas de ratones transgénicos.³¹ Un trabajo reciente demostró que la sobreexpresión de NEP es suficiente para reducir la producción y agregación del péptido A-beta en el cerebro de ratones 5XFAD (modelo de EA familiar), y la manipulación de otros genes como BACE1 no ofrece efectos aditivos.³² Estudios epidemiológicos han reportado niveles reducidos de NEP en casos de EA. Por ejemplo, uno de los primeros estudios encontró que los niveles de ARNm y proteína de NEP en áreas como el hipocampo y el giro temporal (áreas susceptibles a la deposición del péptido A-beta) fueron significativamente inferiores en casos de EA comparados con los controles, mientras que en los órganos periféricos (resistentes a la amiloidosis) no se observaron cambios significativos,³³ estos hallazgos fueron confirmados posteriormente.³⁴ Además, se ha reportado que la actividad de NEP y de otras enzimas se reduce en el suero de pacientes con impedimento cognitivo medio y EA comparados con el grupo control.³⁵ En un modelo de diabetes tipo I en primates se observó aumento en los niveles cerebrales del péptido A-beta y reducción en la expresión de NEP en el hipocampo.³⁶ Un trabajo previo reportó que los niveles de NEP se reducen tanto en casos de EA como en el envejecimiento fisiológico.³⁷

Enzima degradadora de insulina

La enzima degradadora de insulina (EDI), también conocida como insulinasina, es una metalopeptidasa dependiente de Zn que pertenece a la familia M16 de las metaloproteínas. La EDI se distribuye ubicuamente en el organismo, pero es abundante principalmente en músculos, hígado y cerebro.³⁸

Esta enzima fue inicialmente identificada por su capacidad de degradar la insulina, pero actualmente se reconoce un grupo más amplio de sustratos.³⁹ La habilidad de EDI de degradar el péptido A-beta se demostró al incubar homogenados de cerebro humano con péptido A-beta sintético e inhibidores farmacológicos. Además, en dicho estudio se observó reducción de la actividad de EDI en cerebros con EA comparados con controles.⁴⁰ Un estudio reciente encontró que EDI reconoce el sitio Met (35)-Val (36) en la secuencia del péptido A-beta, produciendo fragmentos proagregantes amorfos menos tóxicos que el péptido A-beta o sin toxicidad en células de neuroblastoma.⁴¹ En ratones transgénicos modelos de la EA sometidos a ejercicio se han observado menores niveles del péptido A-beta en el cerebro, comparados con ratones sedentarios, que además presentaron aumento en los niveles de IDE y NEP.⁴² Los homogenados cerebrales, al igual que los cultivos neuronales primarios derivados de ratones KO de EDI, mostraron reducción significativa en la capacidad de degradación del péptido A-beta, así como también aumento en los niveles del péptido A-beta e insulina.⁴³ En un trabajo realizado en ratas con una mutación que confiere pérdida parcial de la función de la EDI, se observó que los cultivos neuronales primarios presentaban reducida capacidad en la degradación del péptido A-beta. Sin embargo, en el cerebro de estas ratas no se observó un incremento significativo del péptido A-beta, probablemente debido a un mecanismo compensatorio.⁴⁴ En contraste, en animales que sobreexpresan el transgén EDI se ha observado reducción de la carga amiloide.⁴⁵ De forma interesante, el gen que codifica para la EDI se encuentra conservado en otras especies como *Drosophila melanogaster*, pez cebra y el nematodo *Caenorhabditis elegans*, en el cual, recientemente se demostró, juega un papel protector contra la toxicidad del péptido A-beta.⁴⁶ En cerebros de pacientes con EA se reportó reducción de la actividad de EDI en comparación con el grupo control,⁴⁰ y la inmunodetección de EDI en el cerebro de casos con EA muestra localización selectiva en las placas amiloides y aumento significativo en cerebros con EA comparado con controles.⁴⁷ Se ha sugerido que los niveles reducidos de EDI en casos de EA podrían estar asociados con el alelo apoE4.⁴⁸ Adicionalmente, se han encontrado polimorfismos genéticos en el gen de EDI que confieren susceptibilidad al desarrollo de la EA.^{49,50}

Enzimas convertidoras de endotelina

Las enzimas convertidoras de endotelina (ECEs), que incluyen la ECE-1 y la ECE-2 y sus respectivas isoformas, son miembros de las EDA y pertenecen al grupo M13 de las metalopeptidasas dependientes de Zn, al igual que NEP. El nombre de las ECE deriva de su habilidad de estas enzimas de cortar proteínas precursoras para formar endotelinas vasoactivas implicadas en la regulación del flujo sanguíneo. Las ECEs son capaces de degradar un amplio número de sustratos fisiológicos como bradicidina, neurotensina, sustancia P y la cadena B oxidada de insulina.⁵¹ Eckman y colaboradores fueron los primeros en determinar que las ECEs poseen actividad catalítica contra el péptido A-beta. El tratamiento con el inhibidor fosforamidón promovió el aumento en la cantidad extracelular de A-beta en células productoras de ECE, mientras que en

una línea celular de ovario de hámster chino (deficiente de actividad de ECEs) se observó que la sobreexpresión de ECE reduce en $\approx 90\%$ los niveles del péptido A-beta.⁵² Recientemente se determinó que las ECEs degradan incluso el péptido A-beta a nivel intracelular en células SH-SY5Y.⁵³ Empleando ratones KO de ECE-1 y ECE-2 se demostró que los niveles cerebrales del péptido A-beta son significativamente superiores comparado con ratones silvestres.⁵⁴ Además, el hecho de que esta enzima se expresa en distintas zonas del cerebro⁵⁵ como las neuronas gabaérgicas del hipocampo y neocorteza,⁵⁶ sugiere un papel importante en la patología de la EA. A nivel epidemiológico se ha reportado reducción de la expresión de ECE-2 en casos de EA,⁵⁷ aunque otro trabajo en el que se estudiaron los niveles de ARNm, proteína y actividad de NEP, EDI y ECEs en casos de EA, se encontró una tendencia al incremento en la expresión de ECE,⁵⁸ lo cual va de acuerdo con una investigación que observó aumentos en la expresión de ECE-2 en el cerebro de individuos con EA, y que la exposición al péptido A-beta promueve la expresión de ECE en células neuronales, sugiriendo un mecanismo de retroalimentación positiva.⁵⁹ Asimismo, en vasos sanguíneos de cerebros postmortem con EA se observó reducción de los niveles de ECE-1, pero aumento de su actividad catalítica.⁶⁰ Por otro lado, se ha determinado que polimorfismos (inserción/delección) del gen de ECE-1 favorecen el desarrollo de la EA.⁶¹ La desregulación en la actividad de las ECEs está asociada a factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, y estas alteraciones están relacionadas con el riesgo de desarrollo de la EA, lo cual va de acuerdo con evidencia que sugiere que los fármacos inhibidores de las ECEs, como el captopril, previenen el deterioro cognitivo en etapas tempranas de la EA.⁶²

Terapia genética con enzimas degradadoras de amiloide

Generalidades de la terapia genética

El término terapia genética se refiere a cualquier procedimiento dirigido a tratar o aliviar una enfermedad mediante una modificación genética de las células del paciente. En este tipo de procedimientos el material transferido a las células del paciente pueden ser genes, segmentos de genes u oligonucleótidos y puede ser transferido directamente a las células dentro del paciente (*in vivo*) o las células del paciente pueden ser aisladas e insertar el material genético en el laboratorio, para posteriormente trasplantarlas al paciente (*ex vivo*). La introducción del material genético suele hacerse usando vectores, que pueden ser de naturaleza viral o no viral, estos últimos son más seguros desde el punto de vista de bioseguridad; sin embargo, menos eficientes en la introducción del material genético.⁶³

Terapia genética con NEP

El desequilibrio entre la producción y degradación del péptido A-beta puede favorecer su acumulación y agregación en el cerebro, conduciendo a la EA. El uso de la terapia genética para

la expresión de la NEP representa una estrategia prometedora para el tratamiento de esta enfermedad.⁶⁴ Por ejemplo, en un estudio se demostró que la inyección unilateral de un vector lentiviral de NEP humana en el cerebro de ratones transgénicos con amiloidosis, redujo en 57% los depósitos de péptido A-beta en la región ipsilateral, comparado con la contralateral (sin inyección), disminuyendo la neurodegeneración en la corteza frontal y el hipocampo de estos animales,⁶⁵ estos resultados fueron replicados posteriormente.⁶⁶ El uso de adenovirus como vectores para la expresión de NEP también ha mostrado reducción de la carga amiloide en ratones transgénicos modelos de la EA.⁶⁷ El virus del herpes simple (VHS) se ha probado en el tratamiento de la EA experimental, debido a su característica infección latente. Hong y colaboradores diseñaron una forma mutante del VHS con defectos de replicación, y lo usaron como vector de expresión de NEP y de un ARN de interferencia específico para APP, mostrando que cuando el cerebro de ratones, que expresan transitoriamente péptido A-beta, fue inoculado con este vector viral se producía inhibición de la acumulación del péptido A-beta.⁶⁸ Por otro lado, la terapia genética celular *ex vivo* con NEP también ha sido explorada. Hemming y colaboradores construyeron una forma soluble de NEP, la insertaron en fibroblastos primarios, los cuales fueron posteriormente implantados en los cerebros de ratones transgénicos de APP que presentaban acumulación avanzada de placas amiloides, observando reducción significativa de la carga amiloide.⁶⁹ Asimismo, el trasplante de células troncales neurales que expresan una forma soluble de NEP ofrece beneficios adicionales como producción de factores neurotróficos, la capacidad de migrar a regiones circundantes del sitio de inoculación y una expresión sostenida del transgén.⁷⁰ Hallazgos similares se han observado con células troncales pluripotentes inducibles que expresan una proteína similar a NEP, conocida como NEP-2.⁷¹ Sin embargo, aunque la inyección intracraneal de estos vectores muestra efectos terapéuticos en modelos animales de EA, es un proceso invasivo con poco interés para su aplicación clínica. En contraste, la expresión periférica es más atractiva, por ejemplo un estudio reportó que la expresión lentiviral de NEP en la superficie de linfocitos redujo los niveles del péptido A-beta soluble y agregante en el cerebro, y mostró mejoras en el aprendizaje y memoria de ratones triple transgénicos de EA.⁷² Estudios con monócitos también mostraron resultados alentadores, estas células tienen la habilidad de atravesar la barrera hematoencefálica y reducir los niveles de péptido A-beta a nivel central.⁷³ Además, la inyección intracardiaca de un vector adenoviral que lleva el gen de NEP redujo la carga amiloide y mejoró las actividades cognitivas de ratones transgénicos modelo de EA.⁷⁴ La expresión adenoviral de NEP en el músculo de ratones triple transgénicos también mostró reducción cerebral de la forma soluble y agregante de A-beta, sin afectar la homeostasis de sustratos fisiológicos.⁷⁵ No obstante, aún existe polémica acerca de la seguridad de los vectores virales debido a la activación potencial de la respuesta inmune, motivando el uso de vectores no virales.⁶⁴ La inyección directa de una forma soluble de NEP en el cerebro de ratones modelo de la EA también ha mostrado resultados alentadores.⁷⁶ Mientras que el uso de convección para la introducción de una forma recombinante de NEP en el cerebro mostró una adecuada distribución y actividad de esta proteína en el estriado, así como reducción significativa de los niveles de péptido A-beta en ratas.⁷⁷ Li y colaboradores desarrollaron un dispositivo que

consiste en una jeringa con un electrodo que, tras la aplicación de un campo eléctrico, permite la inyección de un plásmido con el gen de NEP en el músculo de ratones. Estos roedores mostraron expresión sostenida de NEP en el músculo, suero y cerebro, sin daños significativos en el sitio de inyección,⁷⁸ un diseño alternativo de este dispositivo usando ondas de ultrasonido mostró resultados similares.⁷⁹ Recientemente se ha reportado una alternativa prometedora para la expresión de NEP, usando un ARNm específico para esta proteína. Comparativamente, la transfección del ARNm de NEP demostró ser más eficiente que el transgén en la reducción de los niveles de péptido A-beta *in vitro* e *in vivo*. Esta estrategia ofrece ventajas comparadas con la inserción de un transgén, entre ellas, la expresión de NEP es posible en células posmitóticas como las neuronas, además es más seguro al no requerir integración al genoma del huésped, disminuyendo la probabilidad de mutaciones y no requiere la utilización de vectores virales.⁸⁰

Terapia genética con EDI

Recientemente la EDI ha recibido un gran interés como un blanco terapéutico potencial para el tratamiento tanto de la diabetes como de la EA.⁸¹ El papel de la expresión de EDI en la EA ha sido previamente abordado mediante la generación de líneas de ratones transgénicos. Ratones con expresión del transgén EDI al ser cruzados con ratones transgénicos de APP (modelo de EA), generan crías que expresarán ambos transgenes (EDI+APP). El análisis cerebral de estos roedores doble transgénicos reveló que presentan niveles bajos de placas amiloides comparados con los ratones modelo de la EA.⁴⁵ Por otro lado, la transferencia genética de EDI para el tratamiento de la EA ha sido menos estudiada y los resultados son menos alentadores. En un estudio reciente se promovió la expresión genética de NEP y EDI (formas completa y soluble) para estudiar su efecto en la acumulación de péptido A-beta en un modelo murino de EA. La inyección intracraneal de vectores adenovirales para la expresión de estas EDA, mostró que la NEP (tanto completa como soluble) redujo la acumulación de péptido A-beta en la corteza y el hipocampo; mientras que la EDI no presentó cambios significativos.⁸² En otro estudio, se encontró que la expresión viral de una forma soluble de APP alfa restauraba las funciones cognitivas y reducía los niveles de péptido A-beta en un modelo murino de EA, lo cual fue acompañado por niveles aumentados de IDE, sugiriendo que este transgén promueve la expresión de genes encargados de la depuración de péptido A-beta.⁸³

Terapia genética con ECEs

Las ECEs representan un papel importante en la regulación de los niveles cerebrales de péptido A-beta y, por lo tanto, en la fisiopatología de la EA,⁸⁴ sin embargo, los estudios de terapia genética con estas enzimas son escasos. Previamente se estudió el efecto de la inyección intracraneal de un vector adenoviral que expresa ECE-1 en ratones doble transgénicos (APP+PSN), encontrando expresión abundante de esta proteasa y reducción de los niveles de A-beta y placas amiloides en la corteza y el hipocampo. Además, en dicho estudio los autores reportaron ausencia de efectos adversos debido a la inoculación del vector

viral; sin embargo, debido a que las ECEs poseen un amplio número de sustratos fisiológicos, es necesario evaluar los efectos fisiológicos y cognitivos en estos animales.⁸⁵

Conclusión

La hipótesis de la cascada amiloide sugiere que la acumulación y deposición del péptido A-beta es el evento inicial que promueve las alteraciones celulares y moleculares que conllevan a la EA. Debido a que la regulación de los niveles cerebrales del péptido A-beta es un proceso dinámico, el incremento de la carga amiloide puede ser consecuencia de aumento en su anabolismo o reducción del catabolismo (**figura 1**). Las EDA juegan un papel importante en la patología de la EA esporádica, pues se ha observado que estas enzimas, principalmente NEP, se reducen en áreas vulnerables del cerebro durante el envejecimiento y particularmente en la EA. La terapia genética con las EDA consiste en la introducción de genes que promuevan el catabolismo de A-beta para frenar o retardar el desarrollo de la EA (**figura 1**). En este sentido, los estudios experimentales de terapia genética con NEP han sido abundantes y consistentes, apoyando que es una enzima putativa para la degradación del péptido A-beta *in vivo*. Los vectores para la expresión de NEP han sido diversos, desde virus (lentivirus o adenovirus), pasando por células, hasta dispositivos mecánicos. Además, aunque la inoculación intracraneal de NEP es eficiente en la reducción de las placas amiloides y en la reversión de alteraciones cognitivas en animales modelo de EA, este es un método poco atractivo en la práctica clínica, por lo que se ha planteado la expresión periférica del transgén. Los resultados de expresión periférica han sido alentadores pues logran la reducción del péptido A-beta a nivel central. Por otro lado, los estudios de terapia genética con EDI y ECEs son escasos, los resultados requieren ser reproducidos y confirmados para conocer la utilidad de la expresión de estos transgenes sin afectar la homeostasis de sustratos fisiológicos centrales o periféricos. Otra posibilidad para obtener resultados más pronunciados es la expresión conjunta de más de una EDA, ya que en el envejecimiento se reduce la expresión de varias de estas proteasas. En conjunto, la terapia genética con las EDA ofrece una estrategia atractiva y prometedora para el tratamiento de la EA; sin embargo, aún se requieren más estudios confirmatorios para iniciar ensayos clínicos en humanos.

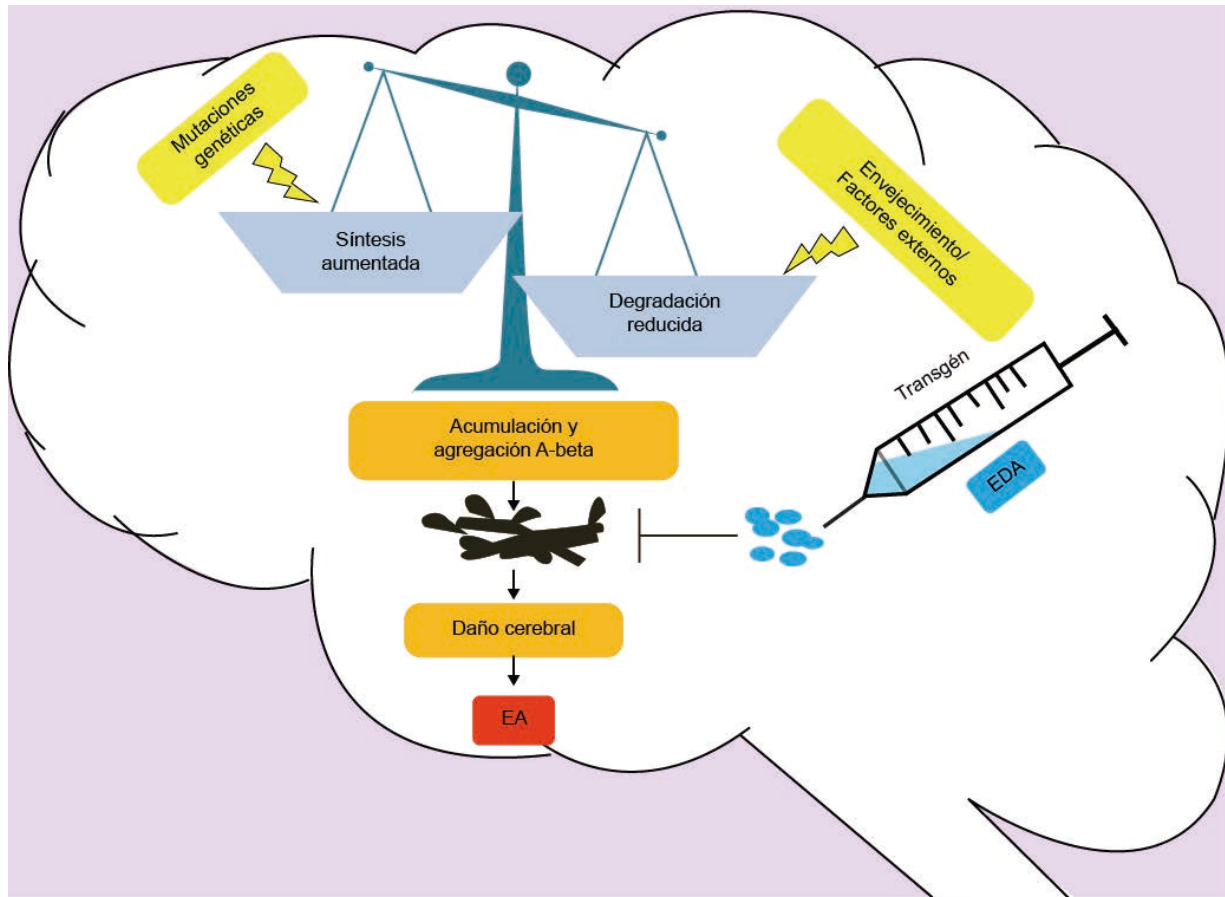
Agradecimientos

A Violetta Mascorro Martínez por sus sugerencias en el diseño de la imagen de terapia genética.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada a Miguel Chin Chan.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno que tuviera relación con este artículo.

Figura 1 Enzimas degradadoras de amiloide en la terapia génica contra la enfermedad de Alzheimer (EA). La EA se caracteriza por acumulación de péptido beta amiloide (A-beta) en el cerebro. El aumento en los niveles de A-beta puede ocurrir por un desequilibrio entre su síntesis y degradación. La inserción de un vector que exprese alguna de las enzimas degradadoras de amiloide (EDA) favorece la degradación del A-beta, evitando las alteraciones moleculares y celulares que promueven el desarrollo de la EA



Referencias

- Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science*. 2006;314(5800):777-81.
- Wortmann M. Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimers Res Ther*. 2012;4(5):40.
- Gutierrez-Robledo LM, Arrieta-Cruz I. Dementia in Mexico: The need for a National Alzheimer's Plan. *Gac Med Mex*. 2015;151(5):667-73.
- Balin BJ, Hudson AP. Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014;14(3):417.
- Raber J, Huang Y, Ashford JW. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging*. 2004;25(5):641-50.
- Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:124.
- Chintamaneni M, Bhaskar M. Biomarkers in Alzheimer's disease: a review. *ISRN Pharmacol*. 2012;2012:984786.
- Ba M, Kong M, Li X, Pin-Ng K, Rosa-Neto P, Gauthier S. Is ApoE varepsilon 4 a good biomarker for amyloid pathology in late onset Alzheimer's disease? *Transl Neurodegener*. 2016;5:20.
- Kumar S, Reddy PH. Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(9):1617-27.
- Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Ther Adv Neurol Disord*. 2013;6(1):19-33.
- Wisniewski T, Drummond E. Developing therapeutic vaccines against Alzheimer's disease. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(3):401-15.
- Alves S, Fol R, Cartier N. Gene Therapy Strategies for Alzheimer's Disease: An Overview. *Hum Gene Ther*. 2016;27(2):100-7.
- Hippius H, Neundorfer G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2003;5(1):101-8.
- Pritchard SM, Dolan PJ, Vitkus A, Johnson GV. The toxicity of tau in Alzheimer disease: turnover, targets and potential therapeutics. *J Cell Mol Med*. 2011;15(8):1621-35.
- Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016;8(6):595-608.
- Schellenberg GD, Montine TJ. The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2012;124(3):305-23.
- Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133(2):155-175.
- Zhang X, Song W. The role of APP and BACE1 trafficking in APP processing and amyloid-beta generation. *Alzheimers Res Ther*. 2013;5(5):46.

19. Baranello RJ, Bharani KL, Pamaraju V, Chopra N, Lahiri DK, Greig NH, et al. Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2015;12(1):32-46.
20. Nalivaeva NN, Belyaev ND, Kerridge C, Turner AJ. Amyloid-clearing proteins and their epigenetic regulation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:235.
21. Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays.* 2001;23(3):261-9.
22. Oefner C, Roques BP, Fournie-Zaluski MC, Dale GE. Structural analysis of neprilysin with various specific and potent inhibitors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004;60(Pt 2):392-6.
23. Carson JA, Turner AJ. Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *J Neurochem.* 2002;81(1):1-8.
24. Mouri A, Zou LB, Iwata N, Saido TC, Wang D, Wang MW, et al. Inhibition of neprilysin by thiorphan (i.c.v.) causes an accumulation of amyloid beta and impairment of learning and memory. *Behav Brain Res.* 2006;168(1):83-91.
25. Oh JH, Choi S, Shin J, Park JS. Protective effect of recombinant soluble neprilysin against beta-amyloid induced neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;477(4):614-9.
26. Mizuta N, Yanagida K, Kodama T, Tomonaga T, Takami M, Oyama H, et al. Identification of Small Peptides in Human Cerebrospinal Fluid upon Amyloid-beta Degradation. *Neurodegener Dis.* 2017;17(2-3):103-109.
27. Yamamoto N, Fuji Y, Kasahara R, Tanida M, Ohora K, Ono Y, et al. Simvastatin and atorvastatin facilitates amyloid beta-protein degradation in extracellular spaces by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of MAPK/Erk1/2 pathways. *Glia.* 2016;64(6):952-62.
28. Madani R, Poirier R, Wolfer DP, Welzl H, Groscurth P, Lipp HP, et al. Lack of neprilysin suffices to generate murine amyloid-like deposits in the brain and behavioral deficit in vivo. *J Neurosci Res.* 2006;84(8):1871-8.
29. Huttenrauch M, Baches S, Gerth J, Bayer TA, Weggen S, Wirths O. Neprilysin deficiency alters the neuropathological and behavioral phenotype in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2015;44(4):1291-302.
30. Nilsson P, Loganathan K, Sekiguchi M, Winblad B, Iwata N, Saido TC, et al. Loss of neprilysin alters protein expression in the brain of Alzheimer's disease model mice. *Proteomics.* 2015;15(19):3349-55.
31. Poirier R, Wolfer DP, Welzl H, Tracy J, Galsworthy MJ, Nitsch RM, et al. Neuronal neprilysin overexpression is associated with attenuation of Abeta-related spatial memory deficit. *Neurobiol Dis.* 2006;24(3):475-83.
32. Devi L, Ohno M. A combination Alzheimer's therapy targeting BACE1 and neprilysin in 5XFAD transgenic mice. *Mol Brain.* 2015;8:19.
33. Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL. Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett.* 2001;297(2):97-100.
34. Wang DS, Lipton RB, Katz MJ, Davies P, Buschke H, Kuslansky G, et al. Decreased neprilysin immunoreactivity in Alzheimer disease, but not in pathological aging. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(5):378-85.
35. Zhuravin IA, Nalivaeva NN, Kozlova DI, Kochkina EG, Fedorova YB, Gavrilova SI. [The activity of blood serum cholinesterases and neprilysin as potential biomarkers of mild-cognitive impairment and Alzheimer's disease]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2015;115(12):110-7.
36. Morales-Corraliza J, Wong H, Mazzella MJ, Che S, Petkova E, et al. Brain-Wide Insulin Resistance, Tau Phosphorylation Changes, and Hippocampal Neprilysin and Amyloid-beta Alterations in a Monkey Model of Type 1 Diabetes. *J Neurosci.* 2016;36(15):4248-58.
37. Russo R, Borghi R, Markesbery W, Tabaton M, Piccini A. Neprilysin decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. *FEBS Lett.* 2005;579(27):6027-30.
38. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev.* 1998;19(5):608-24.
39. Hersh LB. The insulysin (insulin degrading enzyme) enigma. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(21):2432-4.
40. Pérez A, Morelli L, Cresto JC, Castaño EM. Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochem Res.* 2000;25(2):247-55.
41. Hubin E, Cioffi F, Rozenski J, van Nuland NA, Broersen K. Characterization of insulin-degrading enzyme-mediated cleavage of Abeta in distinct aggregation states. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1860(6):1281-90.
42. Moore KM, Girens RE, Larson SK, Jones MR, Restivo JL, Holtzman DM, et al. A spectrum of exercise training reduces soluble A-beta in a dose-dependent manner in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2016;85:218-24.
43. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):4162-7.
44. Farris W, Mansourian S, Leissring MA, Eckman EA, Bertram L, Eckman CB, et al. Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am J Pathol.* 2004;164(4):1425-34.
45. Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, et al. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron.* 2003;40(6):1087-93.
46. Haque R, Nazir A. Identification and functional characterization of a putative IDE, C28F5.4 (celIDE-1), in *Caenorhabditis elegans*: Implications for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1860(11 Pt A):2454-62.
47. Bernstein HG, Ansorge S, Riederer P, Reiser M, Frölich L, Bogerts B. Insulin-degrading enzyme in the Alzheimer's disease brain: prominent localization in neurons and senile plaques. *Neurosci Lett.* 1999;263(2-3):161-4.
48. Cook DG, Leverenz JB, McMillan PJ, Kulstad JJ, Ericksen S, Roth RA, et al. Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am J Pathol.* 2003;162(1):313-9.
49. Gutierrez-Hermosillo H, Díaz de León-González E, Palacios-Corona R, Cedillo-Rodríguez JA, Camacho-Luis A, Reyes-Romero MA, et al. C allele of the rs2209972 single nucleotide polymorphism of the insulin degrading enzyme gene and Alzheimer's disease in type 2 diabetes, a case control study. *Med Clin (Barc).* 2015;144(4):151-5.
50. Wang S, He F, Wang Y. Association between polymorphisms of the insulin-degrading enzyme gene and late-onset Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2015;28(2):94-8.
51. Johnson GD, Stevenson T, Ahn K. Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin. *J Biol Chem.* 1999;274(7):4053-8.
52. Eckman EA, Reed DK, Eckman CB. Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 2001;276(27):24540-8.
53. Pacheco-Quinto J, Eckman EA. Endothelin-converting enzymes degrade intracellular beta-amyloid produced

- within the endosomal/lysosomal pathway and autophagosomes. *J Biol Chem.* 2013;288(8):5606-15.
54. Eckman EA, Watson M, Marlow L, Sambamurti K, Eckman CB. Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 2003;278(4):2081-4.
 55. Naidoo V, Naidoo S, Mahabeer R, Raidoo DM. Cellular distribution of the endothelin system in the human brain. *J Chem Neuroanat.* 2004;27(2):87-98.
 56. Pacheco-Quinto J, Eckman CB, Eckman EA. Major amyloid-beta-degrading enzymes, endothelin-converting enzyme-2 and neprilysin, are expressed by distinct populations of GABAergic interneurons in hippocampus and neocortex. *Neurobiol Aging.* 2016;48:83-92.
 57. Weeraratna AT, Kalehua A, Deleon I, Bertak D, Maher G, Wade MS, et al. Alterations in immunological and neurological gene expression patterns in Alzheimer's disease tissues. *Exp Cell Res.* 2007;313(3):450-61.
 58. Wang S, Wang R, Chen L, Bennett DA, Dickson DW, Wang DS. Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *J Neurochem.* 2010;115(1):47-57.
 59. Palmer JC, Shabnam B, Kehoe PG, Love S. Endothelin-converting enzyme-2 is increased in Alzheimer's disease and up-regulated by A-beta. *Am J Pathol.* 2009;175(1):262-70.
 60. Palmer JC, Tayler HM, Love S. Endothelin-converting enzyme-1 activity, endothelin-1 production, and free radical-dependent vasoconstriction in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2013;36(3):577-87.
 61. Hassanin OM, Moustafa M, El Masry TM. Association of insertion-deletion polymorphism of ACE gene and Alzheimer's disease in Egyptian patients. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* 2014;15(4):355-360.
 62. Rygiel K. Can angiotensin-converting enzyme inhibitors impact cognitive decline in early stages of Alzheimer's disease? An overview of research evidence in the elderly patient population. *J Postgrad Med.* 2016;62(4):242-248.
 63. Kresina TF, Branch AD. Molecular Medicine and Gene Therapy: an introduction, in *Molecular Medicine and Gene Therapy* T.F. Kresina, Editor. 2002; Wiley-Liss, Inc.: 1-24.
 64. Li Y, Wang J, Zhang S, Liu Z. Neprilysin gene transfer: A promising therapeutic approach for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2015;93(9):1325-9.
 65. Marr RA, Rockenstein E, Mukherjee A, Kindy MS, Hersh LB, Gage FH, et al. Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J Neurosci.* 2003;23(6):1992-6.
 66. Spencer B, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Adame A, Potkar R, et al. Long-term neprilysin gene transfer is associated with reduced levels of intracellular Abeta and behavioral improvement in APP transgenic mice. *BMC Neurosci.* 2008;9:109.
 67. Iwata N, Mizukami H, Shirotani K, Takaki Y, Muramatsu S, Lu B, et al. Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J Neurosci.* 2004;24(4):991-8.
 68. Hong CS, Goins WF, Goss JR, Burton EA, Glorioso JC. Herpes simplex virus RNAi and neprilysin gene transfer vectors reduce accumulation of Alzheimer's disease-related amyloid-beta peptide in vivo. *Gene Ther.* 2006;13(14):1068-79.
 69. Hemming ML, Patterson M, Reske-Nielsen C, Lin L, Isacson O, Selkoe DJ. Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an A-beta-degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease. *PLoS Med.* 2007;4(8):e262.
 70. Blurton-Jones M, Spencer B, Michael S, Castello NA, Agazaryan AA, Davis JL, et al. Neural stem cells genetically-modified to express neprilysin reduce pathology in Alzheimer transgenic models. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(2):46.
 71. Takamatsu K, Ikeda T, Haruta M, Matsumura K, Ogi Y, Nakagata N, et al. Degradation of amyloid beta by human induced pluripotent stem cell-derived macrophages expressing Neprilysin-2. *Stem Cell Research.* 2014;13(3, Part A):442-453.
 72. Guan H, Liu Y, Daily A, Police S, Kim MH, Oddo S, et al. Peripherally expressed neprilysin reduces brain amyloid burden: a novel approach for treating Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2009;87(6):1462-73.
 73. Lebson L, Nash K, Kamath S, Herber D, Carty N, Lee D, et al. Trafficking CD11b-positive blood cells deliver therapeutic genes to the brain of amyloid-depositing transgenic mice. *J Neurosci.* 2010;30(29):9651-8.
 74. Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, et al. Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci Rep.* 2013;3:1472.
 75. Liu Y, Studzinski C, Beckett T, Guan H, Hersh MA, Murphy MP, et al. Expression of neprilysin in skeletal muscle reduces amyloid burden in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Mol Ther.* 2009;17(8):1381-6.
 76. Park MH, Lee JK, Choi S, Ahn J, Jin HK, Park JS, et al. Recombinant soluble neprilysin reduces amyloid-beta accumulation and improves memory impairment in Alzheimer's disease mice. *Brain Res.* 2013;1529:113-24.
 77. Barua UN, Miners JS, Bienemann AS, Wyatt MJ, Welser K, Tabor AB, et al. Convection-enhanced delivery of neprilysin: a novel amyloid-beta-degrading therapeutic strategy. *J Alzheimers Dis.* 2012;32(1):43-56.
 78. Li Y, Wang J, Liu J, Liu F. A novel system for in vivo neprilysin gene delivery using a syringe electrode. *J Neurosci Methods.* 2010;193(2):226-31.
 79. Li Y, Wang J, Grebori C, Foote M, Liu F. A syringe-focused ultrasound device for simultaneous injection of DNA and gene transfer. *J Gene Med.* 2012;14(1):54-61.
 80. Lin CY, Perche F, Ikegami M, Uchida S, Kataoka K, Itaka K. Messenger RNA-based therapeutics for brain diseases: An animal study for augmenting clearance of beta-amyloid by intracerebral administration of neprilysin mRNA loaded in polyplex nanomicelles. *J Control Release.* 2016;235:268-75.
 81. Pivovarova O, Höhn A, Grune T, Pfeiffer AF, Rudovich N. Insulin-degrading enzyme: new therapeutic target for diabetes and Alzheimer's disease? *Ann Med.* 2016;48(8):614-624.
 82. Carty N, Nash KR, Brownlow M, Cruite D, Wilcock D, Selenica MLB, et al. Intracranial injection of AAV expressing NEP but not IDE reduces amyloid pathology in APP+PS1 transgenic mice. *PLoS One.* 2013;8(3):e59626.
 83. Fol R, Braudeau J, Ludewig S, Abel T, Weyer SW, Roederer JP, et al. Viral gene transfer of APPsalpha rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model. *Acta Neuropathol.* 2016;131(2):247-66.
 84. Pacheco-Quinto J, Herdt A, Eckman CB, Eckman EA. Endothelin-converting enzymes and related metalloproteases in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2013;33(Suppl 1):S101-10.
 85. Carty N, Nash K, Lee D, Mercer M, Gottschall PE, Meyers C, et al. Adeno-associated viral (AAV) serotype 5 vector mediated gene delivery of endothelin-converting enzyme reduces Abeta deposits in APP + PS1 transgenic mice. *Mol Ther.* 2008;16(9):1580-6.

Cómo citar este artículo:

Chin-Chan M, Maldonado-Velázquez MG, Mex-Álvarez R, Garma-Quen PM, Cobos-Puc L. Enzimas degradadoras de amiloide en la enfermedad de Alzheimer: de las moléculas a la terapia genética. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2018;56(4):387-94.