

**ENSAYOS CLÍNICOS DE TERAPIA GÉNICA EN  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. ¿ES LA  
EXPRESIÓN ENDÓGENA DEL FACTOR DE  
CRECIMIENTO NEURONAL UNA TERAPIA  
PROMETEDORA?**

**REVISIÓN SISTEMÁTICA**

**TRABAJO FINAL GRADO**

**GRADO EN MEDICINA**

**AUTORA: Paula Ibáñez Aguilar**

**TUTORA: Ana María Sánchez Pérez**

**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD UNIVERSIDAD JAIME I**

## ÍNDICE

1. RESUMEN
2. EXTENDED SUMMARY
3. INTRODUCCIÓN
  - 3.1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS
    - 3.1.1. DIAGNÓSTICO
    - 3.1.2. ETIOLOGÍA
    - 3.1.3. TRATAMIENTO
    - 3.1.4. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER
  - 3.2. TERAPIA GÉNICA
  - 3.3. APLICACIONES DE LA TERAPIA GÉNICA
4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO
5. OBJETIVO DEL ESTUDIO
6. MATERIAL Y MÉTODOS
  - 6.1. ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA
  - 6.2. MEDIDAS DE RESULTADOS
  - 6.3. EXTRACCIÓN DE DATOS
7. RESULTADOS
  - 7.1. RESUMEN DE LOS HALLAZGOS PRINCIPALES.
  - 7.2. EFECTOS ADVERSOS POST-TRATAMIENTO
  - 7.3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD METODOLÓGICA
8. DISCUSIÓN
9. CONCLUSIONES
10. REFERENCIAS
11. ANEXOS

## **RESUMEN**

### **INTRODUCCIÓN**

La enfermedad de Alzheimer es la causa de demencia más frecuente en todo el mundo. El tratamiento principal utilizado hasta ahora, los inhibidores de la colinesterasa, no ha demostrado grandes mejorías clínicas ni reducción de la progresión de la enfermedad. Surge, por ello, la idea de buscar alternativas. La terapia génica, es una técnica de implantación reciente en la clínica que está avanzando rápidamente dado su enorme potencial terapéutico. En esta revisión nos centramos en la terapia génica para combatir el Alzheimer, cuyo objetivo es elevar los niveles cerebrales del factor de crecimiento neuronal, el NGF, en el núcleo basal de Meynert, área con gran cantidad de neuronas colinérgicas y donde parece que tiene su inicio la degeneración neuronal en esta enfermedad.

### **OBJETIVO**

Evaluar la seguridad de la terapia génica para expresar NGF, así como su potencial terapéutico en la clínica y la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

### **MÉTODOS**

Se realizó la búsqueda en dos bases de datos: PUBMED y Cochrane, no obteniéndose resultados de interés en la segunda. En ambas se utilizaron las palabras clave: *terapia génica*, *enfermedad de Alzheimer*, *NFG*, *neuroprotección*. Los criterios de inclusión fueron el uso de NFG en sujetos con enfermedad de Alzheimer.

Por otro lado, los criterios de exclusión fueron el uso de terapias farmacológicas, pacientes con ausencia de enfermedad de Alzheimer y ensayos preclínicos en animales.

### **RESULTADOS**

Se seleccionaron 5 artículos en los que se utilizó esta terapia en diferentes muestras de sujetos, siendo evaluados mediante el manual Cochrane y siendo los resultados obtenidos similares en todos ellos.

Los efectos secundarios observados son de poca importancia, no limitando los ensayos. La mejoría cognitiva y la respuesta con hipertrofia neuronal se observa de manera relativa en todos los estudios, necesitando una mayor muestra y un mayor seguimiento para poder evidenciar estos resultados correctamente.

### **CONCLUSIONES**

El tratamiento con NGF podría aportar alternativas respecto a los tratamientos tradicionales, debido a la cierta mejoría cognitiva observada y a la seguridad demostrada.

Sin embargo, estos estudios, como recalcan los autores en la mayoría de los artículos, no son concluyentes debido a las pequeñas muestras de pacientes y el escaso tiempo de seguimiento, siendo necesarios estudios a más largo plazo y más participantes que permitan probar la eficacia de estas terapias.

## **PALABRAS CLAVE**

Terapia génica, enfermedad de Alzheimer, NGF (*nerve growth factor*), neuroprotección.

## **ABSTRACT**

### **INTRODUCTION**

Alzheimer's disease is the most frequent cause of dementia worldwide. The main treatment used so far, the cholinesterase inhibitors, has not shown great clinical improvements or reduced progression of the disease. Therefore, the idea of looking for alternatives arises. Gene therapy is a technique of recent implantation in the clinic that is advancing rapidly given its enormous therapeutic potential. In this review, we focus on gene therapy to fight Alzheimer's whose objective is to raise brain levels of neuronal growth factor, NGF, in the basal nucleus of Meynert, an area with many cholinergic neurons and where it seems to have its beginning neuronal degeneration in this disease.

### **OBJECTIVE**

To assess the safety of gene therapy, as well as its effect on the clinical and progression of Alzheimer's disease.

### **METHODS**

The search was performed in two databases: PUBMED and COCHRANE LIBRARY, where no interesting results were obtained in the second one.

In both, the keywords used were: *genic therapy, Alzheimer's disease, NFG, neuroprotection*.

The inclusion criteria were the use of NFG's in subjects with Alzheimer's disease.

On the other hand, the exclusion criteria were the use of pharmacological therapies, patients with absence of Alzheimer's disease and clinical trials in animals

### **RESULTS**

We selected 5 articles in which this therapy was used in different samples of subjects, being evaluated by the CASPe test and the GRADE scale. The results obtained were similar in all of them. The side effects observed are of little importance since they don't limit the trials. The cognitive improvement and the response with neuronal hypertrophy is observed in a

relative way in all the studies, needing a larger sample and a longer follow-up to be able to demonstrate these results correctly.

## **CONCLUSIONS**

The treatment with NGF can offer us alternatives compared to traditional treatments, due to the certain cognitive improvement observed and the demonstrated safety. However, these studies are not conclusive and further studies are needed to allow us to approve these therapies.

## **KEYWORDS**

Genic therapy, Alzheimer's disease, NFG (*nerve growth factor*), neuroprotection.

## **EXTENDED SUMMARY**

### **INTRODUCTION**

Neurodegenerative disease is a generic term that includes several pathologies mainly affecting neurons and glia, basic components of the nervous system. These alterations display a progressive course. Amongst neurodegenerative pathologies, Alzheimer's disease is considered the most frequent cause of dementia in the elderly. Main symptoms include: deficit in cognitive functions, psychiatric disorders and difficulties in carrying out the daily life activities. Its prevalence increases with age.

Up to date, the main anatomo-pathological findings of this disease have been proposed to be; the appearance of senile plaques, consisting of deposits of extraneuronal beta-amyloid protein with the corresponding inflammatory reaction and neurofibrillary tangles, which are deposits of abnormal tau protein in the neuronal cytoplasm. These abnormalities are thought to cause neuronal death.

The diagnosis is made through a broad anamnesis with the patient and a relative. Cognitive tests, such as the MMSE or ADAS-Cog are fundamental for assessment. In addition, we can rule out other pathologies through complementary explorations.

The treatment used today consists of inhibitors of cholinesterase, which increase the bioavailability of acetylcholine by inhibiting its catabolism (this neurotransmitter is decreased in Alzheimer's disease). These inhibitors are used in the mild-moderate stages of the disease, and among them we find donepezilo, rivastigmine and galantamine, improving discreetly and transiently the symptoms. In moderate-severe phases, memantine

(antiglutamatergic) is used, reducing the levels of glutamate in the synaptic cleft, which are elevated in this pathology and are partly responsible for the clinical symptoms.

## **OBJECTIVES**

- To evaluate the possible improvement of patients treated with gene therapy NG relative to their pre-treatment status.
- To evaluate the safety and tolerance of this therapy.

## **METHODS**

The search was performed in two databases: PUBMED and Cochrane, with the keywords: gene therapy, Alzheimer's disease, NFG (nerve growth factor) and neuroprotection.

As search limits, I limited the studies to the last 10 years and only searched for "clinical trials".

With these keywords, in the second database mentioned, no interesting results were obtained.

From the results I was obtaining with these criteria, I was eliminating studies due to different reasons: clinical trials in animals, use of pharmacological therapies, post-mortem studies, absence of Alzheimer's disease. Finally, I selected 5 articles for my study. In all of them, the following characteristics were satisfied: the subjects suffered a probable Alzheimer's disease, with similar ages and that they had been treated during the last 3 months with cholinesterase inhibitors.

## **CONCLUSION**

With the results obtained, we cannot reach an ultimate conclusion, since studies with longer follow-up and larger samples of patients are needed.

What we can say is that with the use of NFG in certain areas of the brain, we have seen a cognitive improvement based on different tests (MMSE, ADAS-Cog), as well as a greater neuronal hypertrophy in areas close to the administration compared to remote areas. In addition, axonal budding of cholinergic neurons occurs in these areas.

It has been proven that this treatment is safe and well tolerated, not producing any serious side effect that causes mortality or morbidity in patients.

With all this, we can conclude that this treatment can offer you interesting alternatives with respect to the traditional treatment, which offers very discreet improvements of the clinic of the patients.

### **3. INTRODUCCIÓN**

El progresivo aumento de la esperanza de vida en los seres humanos ha propiciado también el aumento de los trastornos demenciales neurodegenerativos, al llegar a edades más avanzadas, ya que son patologías que aparecen con la edad, en su mayoría.

La consecuencia de todo esto es un mayor sufrimiento para la persona que padece esta patología, así como de la propia familia al ver el continuo deterioro de un ser querido.

Al ver el gran impacto que suponen estos trastornos en la calidad de vida de las personas, resulta necesario investigar acerca de posibles terapias que pudieran ayudar a frenarlos o, en la medida de lo posible, controlarlos clínicamente.

El envejecimiento de la población es una cuestión de primordial importancia en los países en desarrollo que, según se proyecta a nivel mundial, se pasarán de un 8% en 1950 de adultos mayores de 60 años al 22% en 2050, mientras los menores de 15 años pasarán de un 34% a mediados del siglo XX a un 20% cien años después [1].

Los trastornos mentales que cursan con demencia, y especialmente el más paradigmático, la enfermedad de Alzheimer, que es una patología que actualmente no tiene prevención ni tratamiento eficaz y en la que él o la paciente requiere cuidados continuos, son uno de los mayores problemas del siglo XXI. En el mundo, en 2010, se estimaba que de 758,6 millones de personas mayores de 60 años, más de 35,6 millones de personas padecían demencia (4,7% del total). De ellas, más del 80% eran enfermos de Alzheimer. [2]

#### **3.1 Enfermedades neurodegenerativas**

El envejecimiento, del sistema nervioso, se podría definir como una pérdida progresiva de funciones motoras, sensoriales y cognitivas que son consecuencia de los cambios asociados con la edad.

Este proceso involutivo relacionado con la edad puede ser fisiológico, normal o patológico, cuando, la degeneración del sistema nervioso es la causa de demencias, como la enfermedad de Alzheimer.

Durante el envejecimiento, el cerebro sufre cambios morfológicos y bioquímicos, entre los que podemos destacar: disminución del peso y volumen cerebrales, atrofia cortical y subcortical, por pérdida de neuronas, aumento de autooxidación de lipoproteínas (observaciones postmortem mediante tinción de lipofuscina, visualizándose gránulos resultantes de dicha autooxidación que se acumulan en las membranas celulares de neuronas y glía) y cambios hipertróficos en la glía astrocitaria [3].

Con todo esto, cabe diferenciar el concepto de envejecimiento, que es un proceso fisiológico normal, del concepto de enfermedad degenerativa, que no lo es. Las enfermedades

degenerativas, según la enciclopedia de salud, son aquellas enfermedades del sistema nervioso que causan aumento de muerte celular; reduciéndose el número de neuronas y provocando pérdidas cognitivas y trastornos de conducta.

Hoy en día se conocen más de 100 enfermedades neurodegenerativas [4], siendo muy heterogéneas en cuanto a sus síntomas y hallazgos anatomopatológicos.

Se desconocen las causas que provocan la pérdida de las neuronas en estas enfermedades, pero el principal factor de riesgo para desarrollarlas es el incremento de la edad [4].

En la actualidad hay varios medicamentos que tienen un efecto sintomático en estas enfermedades [5] pero no existe ninguno que haya demostrado ninguna utilidad con relevancia clínica para frenar la progresión del proceso degenerativo.

El desarrollo de tratamientos preventivos o protectores se ha visto limitado por la escasez de conocimientos sobre las causas por las que las neuronas se mueren. Sin embargo, los avances neurobiológicos de los últimos años nos sitúan cada vez más cerca de conocer los mecanismos que subyacen al desarrollo de estas enfermedades y poder así desarrollar estrategias terapéuticas eficaces [4].

- **Diagnóstico**

La forma habitual de diagnosticar estas enfermedades es en función de su presentación clínica, no hay biomarcadores (análisis bioquímicos, pruebas diagnósticas) específicos que se usen de forma rutinaria.

Cada enfermedad neurodegenerativa tiene un conjunto de síntomas característicos. A modo de ejemplo; en el Alzheimer el trastorno grave de la memoria; el temblor en reposo en la enfermedad de Parkinson; o la corea (movimientos involuntarios abruptos e irregulares de duración breve que cambia de una zona muscular a otra) en la enfermedad de Huntington.

Las zonas del sistema nervioso central donde se pierden neuronas en estas enfermedades pueden ser múltiples, como la corteza cerebral, los ganglios basales, el troncoencéfalo, el cerebelo o la médula espinal; de modo que es más útil basarnos en la sintomatología del paciente para clasificar la enfermedad, antes que la propia topografía lesional.

Además, también podemos diferenciar estas enfermedades en función de la proteína que se vea afectada, con el inconveniente de que esta clasificación solo puede realizarse post-mortem, por lo que, a la hora de intentar combatir la clínica del paciente, no nos es de gran ayuda. De este modo, por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer está alterada la proteína Tau, y en la enfermedad de Parkinson la alfa sinucleína. [6]

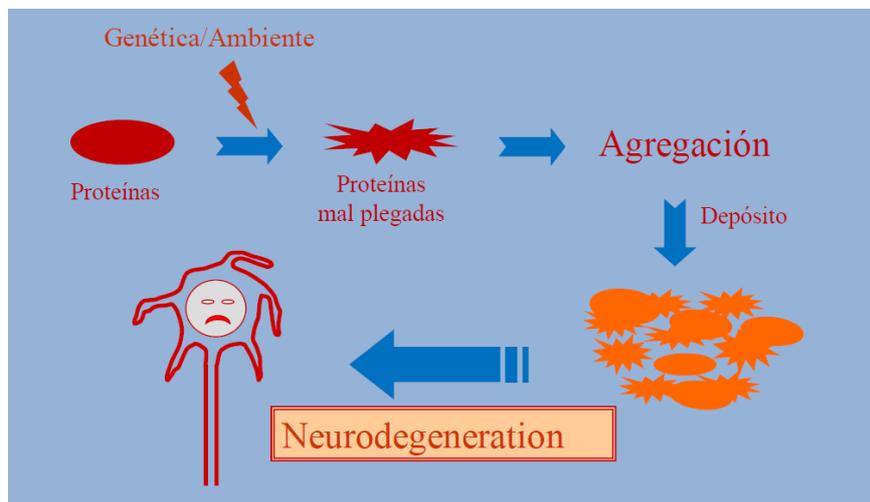
En los últimos años se han desarrollado de manera muy importante la genética y la biología molecular, lo cual ha permitido caracterizar de forma mucho más precisa las enfermedades neurodegenerativas en base a la alteración genética o molecular que las caracteriza. Pero, hasta la fecha, estas alteraciones genéticas y moleculares no tienen una aplicación clínica rutinaria en el diagnóstico diferencial o para diseñar una estrategia de tratamiento. En la actualidad, muchas líneas de investigación se centran en detectar estas alteraciones moleculares y poder actuar sobre ellas.

- **Etiología**

Con contadas excepciones, las causas de la neurodegeneración son desconocidas, habiendo un profundo debate en la influencia de los factores ambientales y genéticos [4].

Algunas, tienen una clara base genética (Huntington), mientras en otras, el número de casos familiares es menor (Alzheimer, Parkinson) [4].

Por otro lado, puede decirse que, las proteínas defectuosamente procesadas, fácilmente se acumulan cuando los mecanismos celulares para su eliminación son ineficaces. Cuando las proteínas específicas de cada circuito celular son procesadas de forma inadecuada se produce el mal funcionamiento de las diferentes clases de neuronas y las consiguientes manifestaciones de la enfermedad [7].



**Figura 1: Trastornos neurodegenerativos asociados a pérdida de función normal proteica**

Por otra parte, se va elucidando la cascada de acontecimientos que provocan la muerte por apoptosis y sus desencadenantes. Estos conocimientos pueden culminar en el diseño de estrategias terapéuticas que impidan o frenen degeneración neuronal. Otras líneas de

investigación intensas se centran en evitar o disolver los cúmulos de proteínas neurotóxicas [4].

- **Tratamiento**

En la actualidad no se dispone de ningún tratamiento que permita prevenir ninguna de estas enfermedades. Los tratamientos actuales son básicamente sintomáticos para paliar los síntomas o aumentar la actividad de las neuronas restantes [4].

Por último, la terapia génica (manipulación de la expresión genética de las células enfermas) es una aproximación terapéutica reciente que modula la expresión génica de las células del organismo. En el caso de las degenerativas el principal objetivo es mejorar la supervivencia neuronal.

También la investigación sobre células madre pretende poder restituir las neuronas perdidas y conseguir que los síntomas desaparezcan. Esto consistiría en trasplantar células que reemplazarían a las neuronas perdidas. El trasplante de células madre resulta, desde el punto de vista teórico, una posibilidad muy atractiva para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, pese a ser una opción muy compleja la posible “regeneración” del sistema nervioso

Hay 2 enfermedades neurodegenerativas que destacan en cuanto a su prevalencia y su gravedad, que son la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, de las cuales ya hemos dado algunas pinceladas genéricas en la introducción. A continuación, nos centramos más específicamente en la enfermedad de Alzheimer.

- **Enfermedad de Alzheimer**

La característica clínica fundamental de esta enfermedad es la demencia (síndrome adquirido de deterioro de las funciones cognitivas de una magnitud suficiente como para afectar la vida diaria de una persona previamente normal y sin aparecer en el contexto de un delirium o alteración de la conciencia).

La enfermedad de Alzheimer tiene una prevalencia estimada del 10-15% en la población mayor de 65 años y aumenta su incidencia con la edad.

Además, si tenemos en cuenta que la esperanza de vida está en aumento en las sociedades occidentales se estima un aumento de enfermedad en las próximas décadas.

En cuanto a su etiología, podemos hablar de los siguientes datos:

-El 95% son formas esporádicas, en las que pueden intervenir polimorfismos de una serie de genes que incrementen la susceptibilidad de padecerlo, siendo el más conocido el del alelo e4 del gen de la apolipoproteína E (APOE): los homocigotos tienen >90% de posibilidades de desarrollar la enfermedad a los 85 años. [6]

-El 40% de los pacientes tiene historia familiar de enfermedad de Alzheimer, siendo el riesgo de padecerla en un individuo con un familiar de primer grado afecto 3 veces superior. [6]

-Estos casos familiares son formas monogénicas, y las 3 mutaciones conocidas son el gen de la proteína precursora amiloide, gen de la presenilina 1 y gen de la presenilina 2. [6]

Cabe destacar, que además de existir numerosos factores de riesgo para padecer esta enfermedad (edad, sexo femenino, bajo nivel educativo, depresión tardía...), también existen factores protectores que hay que tener en cuenta, los cuales son: realización de actividad intelectual y física, dieta baja en grasas saturadas, con vegetales y frutas, sin exceso de calorías y un consumo moderado de alcohol. [6]

Histológicamente, en la enfermedad de Alzheimer se observan de ovillos neurofibrilares y placas seniles en el cerebro. Inicialmente se consideró que los ovillos neurofibrilares eran un tipo de lesión que se asociaba necesariamente a la presencia de placas seniles, apareciendo en los casos de enfermedad de Alzheimer, especialmente entre las formas graves [8] [9] [10].

Posteriormente, se ha demostrado que estos rasgos no son específicos de la enfermedad puesto que aparecen también en el cerebro de ancianos que no habían presentado síntomas clínicos [11]. Por tanto, no resultan patognomónicos de la enfermedad.

El neurotransmisor más estudiado en relación con la enfermedad ha sido la acetilcolina, debido a que el núcleo de origen de la mayoría de las proyecciones acetilcolinérgicas de la corteza, el núcleo basal de Meynert, sufre una marcada pérdida de neuronas en estos pacientes [12]. Además, también se ha descrito una gran disminución de la enzima acetilcolino-transferasa (enzima de síntesis de acetilcolina) en la corteza cerebral. Estos hechos han llevado a desarrollar fármacos que actúan aumentando la neurotransmisión acetilcolinérgica [12].

Actualmente, se sabe que las neuronas y células gliales sintetizan de forma normal APP (proteína precursora amiloidea) y liberan proteína  $\beta$ -amiloide [5]. APP se degrada en varios fragmentos por acción de las enzimas secretasas; alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ , también llamada BACE) y gamma ( $\gamma$ ). Cada una de ellas realiza un corte específico en la proteína, produciendo un fragmento de amiloide que posteriormente es degradado por la maquinaria celular. El fragmento  $A\beta$  es una proteína que aparece tras el corte proteolítico de APP en fragmentos de entre 40, 42 ó 43 aminoácidos que tienden a agregarse entre ellos y formar fibrillas, fibras, y finalmente placas de proteína que caracterizan la EA [13].

En la enfermedad de Alzheimer se propuso que las células liberan en exceso cantidades de proteína  $\beta$ -amiloide (no se ha definido una cantidad exacta a partir de la cual se cruce un umbral y se desarrolle la enfermedad) que tiende a formar depósitos insolubles con propiedades neurotóxicas.

La neurotoxicidad de esta proteína podría potenciar la vulnerabilidad de las neuronas al efecto tóxico de neurotransmisores excitadores, dando lugar a la atrofia y pérdida neuronal característica de los cerebros de estos pacientes [10].

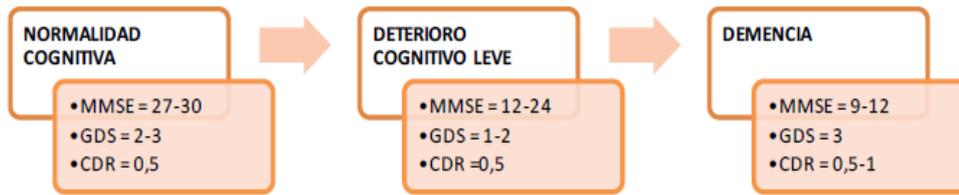
En función de la presentación clínica podemos clasificar la enfermedad en 3 estadios [6] en función de los síntomas que presente el paciente:

-Fase inicial o leve: suele durar 1-3 años. En ésta predomina el trastorno de la memoria. Otras características que podemos encontrar son desorientación temporo-espacial, descuido, lenguaje vacío, cambios en la personalidad, depresión.

-Fase moderada: suele durar 2-10 años. En ésta encontramos afasia, apraxia, indiferencia e intranquilidad psicomotora.

-Fase avanzada o grave: suele durar 8-12 años. En ésta ya encontramos un deterioro cognitivo global muy avanzado.

Esta clasificación clínica, además, se apoya en los resultados de una serie de test cognitivos que se realizan a los pacientes en lo que se sospecha la enfermedad de Alzheimer. Según estas escalas podemos deducir a partir de que puntuación empezamos a considerar la presencia de la enfermedad. [6]



**Figura 2. Rangos de puntuación en diferentes test para valoración de deterioro cognitivo.**

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en una anamnesis amplia con paciente y persona cercana, exploración física general y neurológica, test screening (por ejemplo, MMSE o el test del reloj), valoración neuropsicológica (NSP) ampliada y exploraciones complementarias.

En cuanto al tratamiento contamos con medidas generales (no farmacológicas), manejo déficit cognitivo (memoria, otros), manejo trastornos del comportamiento (agresión, alucinaciones, insomnio, etc.) y educación de la familia y del cuidador. [6].

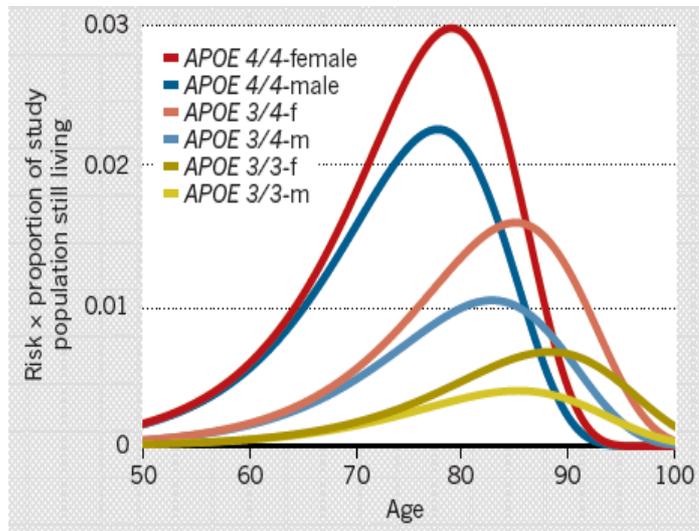
Hasta ahora, el tratamiento farmacológico que se ha utilizado ha sido, por un lado, anticolinesterásicos (donezepilo, rivastagmina, galantamina), en fases leve y moderada de la enfermedad, los cuales mejoran de manera discreta y transitoria la función cognitiva, los síntomas psiquiátricos y la dependencia del cuidador. [6].

Por otro lado, en fases graves, se utiliza la memantina, un fármaco antagonista del receptor NMDA. [6]. El uso de este fármaco se debe a que se ha postulado la posible contribución de la activación de los receptores de glutamato a la muerte celular en la enfermedad de Alzheimer, de modo que la liberación de glutamato a corto plazo se relaciona con procesos como el aprendizaje y la memoria, pero la liberación anormalmente prolongada causa excitotoxicidad y muerte celular.

Por último, y como se ha mencionado en los datos iniciales de la enfermedad, cabe destacar, el posible riesgo genético de herencia de esta enfermedad.

La proteína ApoE, en su variante ApoE4 es el factor de riesgo líder en la enfermedad de Alzheimer, de tal forma que heredando una copia de ésta el riesgo aumenta hasta cuatro veces, y heredando dos copias aumenta hasta doce veces [14]. En particular, las mujeres con dos copias para APOE4 tienen más riesgo de padecer la enfermedad que hombres con

la misma carga genética. No solo el riesgo también el número de copias de APOE4 está asociado a desarrollo de la enfermedad a edades más tempranas (Figura 3) [14].



**Figura 3.** Gráfica que representa el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer según el genotipo de APOE y el género.

### 3.2 Terapia génica

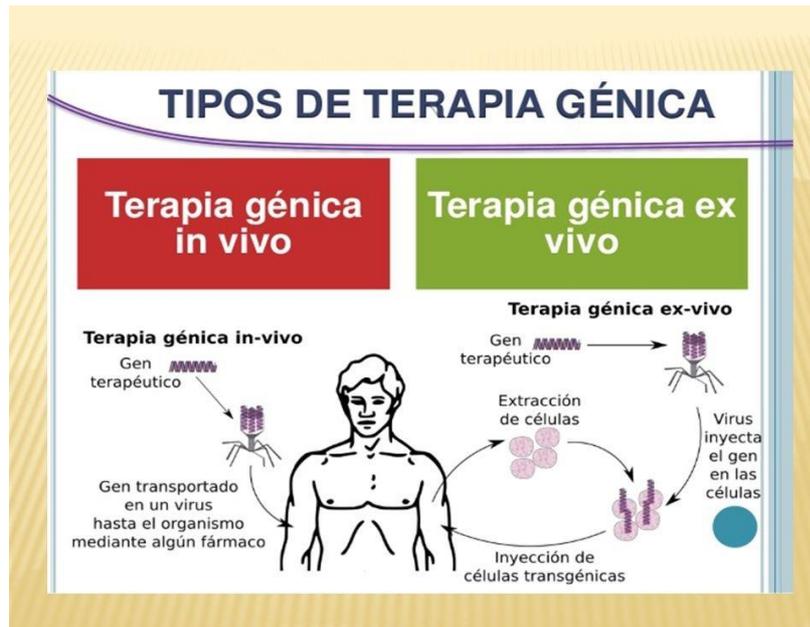
La terapia génica, a grandes rasgos, podría ser definida como el conjunto de técnicas que permiten vehicular secuencias de ADN o de ARN al interior de las células diana, con objeto de modular la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas, revirtiendo así el trastorno biológico que ello produce [15].

Dicho de otra manera, consiste en la modificación de la expresión génica celular mediante la introducción de material genético en el organismo diana de manera que el tratamiento terapéutico es el gen.

Dependiendo del tipo de célula diana, podemos diferenciar dos modalidades de terapia génica: en células germinales y en células somáticas [15].

La legislación actual, basada en motivos éticos y de seguridad, solamente permite protocolos clínicos en terapia génica somática.

Por otro lado, en función de la estrategia de aplicación la terapia génica puede clasificarse in vivo o ex vivo (Figura 4) [15]



**Figura 4. Tipos de terapia génica en función de la estrategia utilizada.**

La terapia génica in vivo, consiste en introducir el material genético directamente en las células del organismo, La gran ventaja que presenta frente a la terapia ex vivo, es su mayor sencillez. El inconveniente, por otro lado, es que el control sobre el proceso de transferencia es menor, y, además, es difícil conseguir un alto grado de especificidad tisular.

En contraposición, la terapia génica ex vivo, que consiste en extraer del paciente las células a tratar y una vez aisladas y crecidas en cultivo se transfieren in vitro. Sus principales ventajas son la mejora de la especificidad de las células diana, el mantener un estrecho control sobre todo el proceso y la mayor eficacia de la transducción. Por otro lado, su mayor inconveniente es la mayor complejidad que conlleva, el coste de los protocolos y la imposibilidad de transducir aquellos tejidos cuyo crecimiento no es viable en cultivo. Además, existe siempre el riesgo de la contaminación en la manipulación de células.

La terapia génica requiere la transferencia eficiente de los genes clonados a células diana, pudiendo agruparse los principales sistemas de transferencia en dos tipos: métodos de transferencia físico o químicos o no virales y vectores virales. [15]

Las técnicas de transmisión mediante vectores virales requieren sustituir los genes que confieren patogenicidad al virus por aquellos genes que se desea introducir en las células diana. La región donde se insertan estos genes se conoce como "cassette", y su tamaño depende del tamaño del virus y de los genes que puedan ser sustituidos.

Hoy en día, los virus constituyen la forma más eficaz de transferir genes terapéuticos al interior de las células diana, en particular para el sistema nervioso central, siendo los vectores más utilizados en terapia génica.

Su principal limitación es la reacción inmunitaria que pueden provocar en el organismo receptor o, en el caso del sistema nervioso el problema principal para el tratamiento es la accesibilidad al mismo. Por tanto, se requieren cirugías de estereotaxia para administrarla.

### **3.3 Aplicaciones de la terapia génica**

La terapia génica fue inicialmente concebida como una forma de tratamiento de enfermedades genéticas causadas únicamente por mutación en un gen (monogénicas) dónde además la farmacoterapia convencional resulta poco eficaz, con una efectividad parcial para paliar las manifestaciones de la enfermedad y pudiendo conllevar graves complicaciones. [15]

Pero recientemente, se está empezando a investigar acerca de otras aplicaciones además de estas enfermedades, como en el caso de esta revisión sistemática, la enfermedad de Alzheimer; que como ya hemos dicho, en el 95% de los casos se produce de forma esporádica, aunque pueden verse implicados polimorfismos de genes que aumentan la susceptibilidad de padecerla.

Adentrándonos en la aplicación de la terapia génica en el sistema nervioso, cabe destacar el papel de las neurotrofinas, que son proteínas que promueven la diferenciación, crecimiento y supervivencia de muchas poblaciones de neuronas periféricas y del SNC durante el desarrollo y la vida adulta [16]. El factor de crecimiento nervioso (NGF) es el primer miembro descubierto de la familia de las neurotrofinas. Éste es esencial para el desarrollo y el mantenimiento fenotípico de las neuronas en el sistema nervioso periférico (SNP) y para la integridad funcional de las neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central [17].

Se ha demostrado que el NGF podría actuar directamente sobre dos características clásicas de la enfermedad de Alzheimer: neurotoxicidad  $\beta$ -amiloide e hiperfosforilación de tau. De hecho, experimentos in vitro e in vivo indicaron NGF como un factor anti-amiloidogénico directo, pudiendo regular tanto la expresión del gen amiloide como el procesamiento de proteínas. Además, se ha demostrado que el NGF contrarresta la hiperfosforilación de tau tanto in vitro como in vivo. [17]

En los distintos artículos revisados, hemos podido sacar, además, las siguientes conclusiones acerca de este factor:

- Ofrece neuroprotección a las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal y reduce los déficits cognitivos.
- No cruza la BHE si se administra periféricamente debido a su tamaño y a su polaridad.
- Se requiere una distribución restrictiva en los lugares con degeneración neuronal, debido a la gran incidencia de efectos secundarios si no se administra de esta manera.

Se realizó una cuantificación de este factor en pacientes con enfermedades de Parkinson, Huntington y Alzheimer, mediante estudios inmunoenzimáticos en suero, evidenciándose la presencia de sustancias inhibitoras de la actividad biológica de este factor. Además, las concentraciones de éste fueron modificadas por el uso de técnicas neurorestaurativas, lo que producía un incremento del factor en aquellos casos en los que se utilizó terapia trófica. [16]

#### **4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

La enfermedad de Alzheimer constituye la forma de demencia más común, siendo incurable y terminal, generando un gran sufrimiento personal y familiar. Aunque en este estudio no se haga una revisión de los tratamientos que se utilizan habitualmente, la bibliografía consultada y la práctica en el día a día nos indican que estos tratamientos no producen grandes mejorías en los pacientes ni consiguen frenar la enfermedad.

Las terapias tradicionales consisten, sobre todo, en el uso de inhibidores de la colinesterasa, como el donezepilo, con el fin de paliar un mínimo los síntomas.

Por lo tanto, lo que este trabajo pretende es realizar una revisión sistemática de los ensayos clínicos con terapia génica utilizadas en la enfermedad de Alzheimer y comprobar si pueden ofrecernos una alternativa a los tratamientos tradicionales.

#### **5. OBJETIVO DEL ESTUDIO**

- Evaluar la seguridad de la terapia génica para expresar NFG en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.
- Evaluar el posible enlentecimiento de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en los pacientes con esta terapia, tomando como referencia la progresión previa a la administración del tratamiento.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología utilizada fue realizada siguiendo las guías PRISMA (ANEXO I).

### 6.1 Estrategia de búsqueda

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica en la base de datos PUBMED y COCHRANE LIBRARY, utilizando como palabras clave “gene therapy”, “Alzheimer disease”, “nerve growth factor”, “neuroprotection”, realizando límite de publicación de los últimos 10 años.

Con estas palabras clave, en la base de datos COCHRANE LIBRARY no se obtuvieron resultados de interés.

Para la selección de artículos en nuestro estudio, se utilizaron los siguientes criterios de inclusión:

- Estudios realizados en población humana.
- Diseño de estudio: ensayos clínicos.
- Edad 50-80 años.
- Probable diagnóstico de Alzheimer según las escalas clínicas de MMSE, ADAS-Cog.
- Tratamiento previo durante 3 meses con inhibidores de la colinesterasa.
- Ausencia de enfermedades/tratamientos psiquiátricos.
- Idioma: español o inglés.
- Límite de publicación: últimos 10 años.

Por otro lado, los criterios de exclusión para no incluir artículos en nuestro estudio fueron:

- Estudios realizados en animales.
- Estudios post-mortem.
- Uso de terapias diferentes a la terapia génica.
- Pacientes con ausencia de enfermedad de Alzheimer.

Se realizó una primera búsqueda en la base de datos PUBMED con las palabras clave “gene therapy” AND “Alzheimer disease”, obteniéndose 2186 resultados. Con el fin de acotar nuestros artículos de manera que solo obtuviésemos ensayos clínicos, que es lo que buscábamos revisar en nuestro estudio, aplicamos el filtro “ensayos clínicos”.

Además, para poder trabajar con los estudios más actualizados, añadimos también el filtro “últimos 10 años”. Al aplicar estos dos, los resultados obtenidos fueron 28.

De estos 28 resultados, aplicando los criterios de exclusión descritos en el párrafo anterior, los cuales se especifican en la figura 4, se desecharon 24, quedándonos de esta manera con 4 artículos en la primera búsqueda.

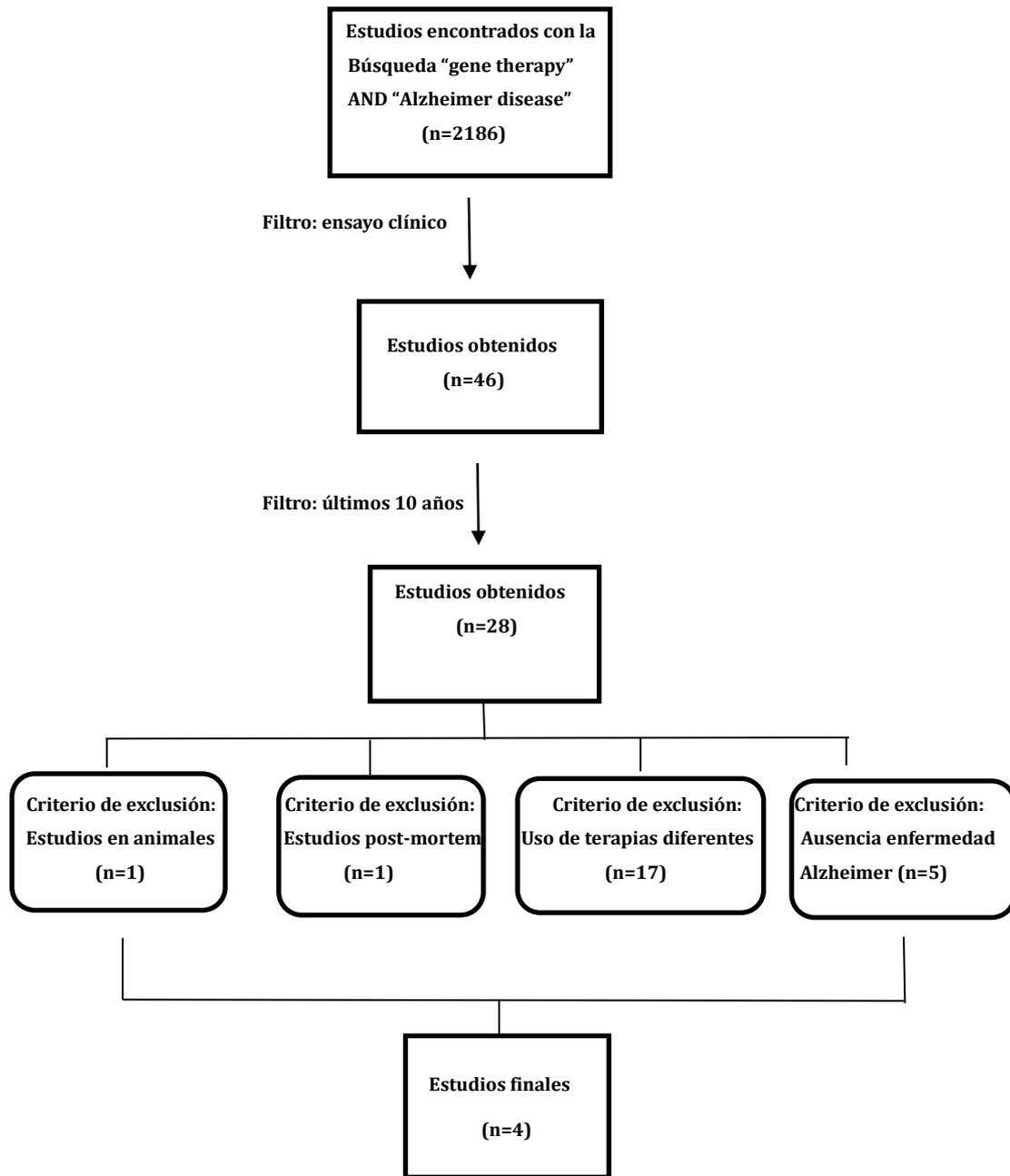
Una segunda búsqueda realizada en la misma base de datos, con las palabras clave “nerve growth factor” AND “Alzheimer disease”, nos proporcionó 1492 resultados. Con todos estos, y con el fin de cribar de la misma manera que en la búsqueda anterior, se volvieron a utilizar los filtros “ensayos clínicos” y “últimos 10 años”, obteniéndose entonces 13 resultados.

Al revisar estos 13 artículos, aplicando los criterios de exclusión mencionados, descarté 9, por motivos que se especifican en la figura 5.

Además, de estos 4 artículos que seleccioné finalmente, 3 de ellos coincidían con la búsqueda anterior, indicando la gran importancia del factor de crecimiento nervioso en la terapia génica del Alzheimer.

Finalmente, después de haber realizado la búsqueda, se seleccionaron 5 artículos para nuestra revisión, los cuales cumplían con los criterios de inclusión de interés.

Cabe destacar, que en esta revisión estamos tratando un tema de reciente investigación, por lo que todos los artículos encontrados y seleccionados en seres humanos se encuentran todavía en fase 1, sin grupos control, no habiendo encontrado ensayos clínicos en fases más avanzadas en seres humanos en las distintas bases de datos donde se realizó la búsqueda.



**Figura 5. Diagrama de flujo de la primera búsqueda realizada.**

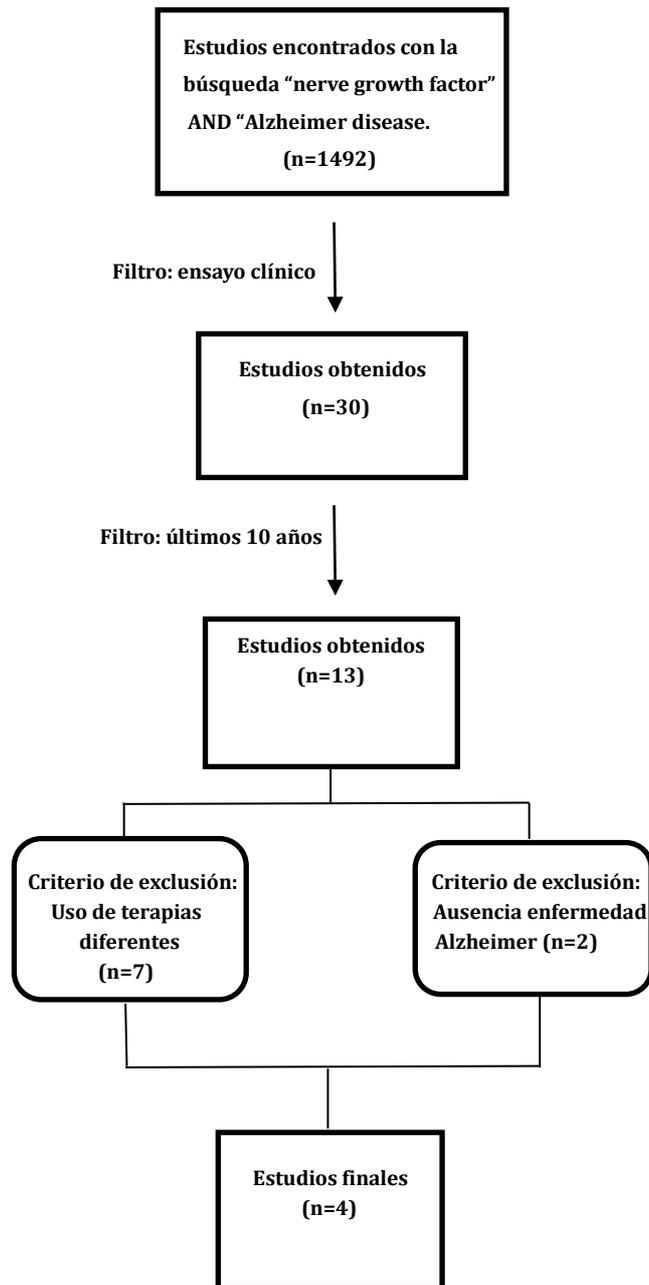


Figura 6. Diagrama de flujo de la segunda búsqueda realizada.

## 6.2 Medidas de resultados

Las escalas utilizadas en los artículos seleccionados para estimar, de alguna manera, la progresión o freno de la enfermedad, así como el deterioro de los pacientes, han sido principalmente el MMSE (*Mini-Mental State Examination*) y la escala ADAS-Cog (*Alzheimer Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale*). Estos tests, cuentan con una serie de ítems que se preguntan al paciente, y sirven para valorar el grado de demencia y deterioro cognitivo. Ambos se pueden realizar en la consulta de manera rápida y sencilla. (ANEXO II)

El primero, el MMSE cuenta con 11 ítems, con una puntuación máxima de 30 puntos, siendo mayor el grado de demencia cuanto menor resultado se obtenga; el segundo consta de 11 ítems también, pudiendo obtener una puntuación máxima de 70 puntos, siendo mayor el grado de demencia cuanto mayor sea la puntuación.

Además, al realizar las pruebas de imagen (RNM en concreto) tanto pre como post tratamiento, se utilizó el índice BV/CSF (*brain volume/cerebrospinal fluid*) para comprobar si se producían cambios al administrar la terapia. Este índice se obtiene del siguiente cociente: total GM volume (*volumen sustancia gris*) + total WM volume (*volumen materia blanca*) / total CSF volumen. La interpretación de éste consiste principalmente en que un mayor volumen de líquido cerebrospinal implica una mayor atrofia cerebral, de modo que a medida que este índice desciende, tendremos un mayor deterioro. La otra prueba de imagen utilizada fue el PET, cuya interpretación fue que a mayor captación de glucosa en los lugares de administración de tratamiento, mayor respuesta a éste. También se han medido los efectos secundarios producidos por la terapia con NGF.

## 6.3 Extracción de datos

Para la recogida y la simplificación de los datos de mayor interés de nuestros artículos, se diseñó una tabla compuesta por los siguientes apartados:

- Autor, revista de publicación y fecha.
- Tipo de estudio y tiempo de seguimiento.
- Número de pacientes que participaron, número de pérdidas durante el estudio.
- Método de administración.
- Medidas y resultados y efectos secundarios.

Autor, revista, fecha	Tiempo de estudio y seguimiento	Número de pacientes, pérdidas.	Método de administración	Medidas y resultados*	Efectos secundarios.
<b>Ferreira et al. Journal of Alzheimer's Disease. 2015.</b>	Ensayo clínico fase 1.  12 meses.	n=6.  Ninguna pérdida.	Implantación estereotáctica NGF encapsulado.	-MMSE: descensos menores en pacientes respondedores respecto a no respondedores.  -ADAS-Cog (pre-post tratamiento): menor aumento en respondedores que en no respondedores.  -BV/CSF: menor disminución del índice en respondedores.	No se mencionan.
<b>Tuszynsky et al. Nature medicine. 2007.</b>	Ensayo clínico fase 1.  22 meses.	n=8.  Dos pérdidas por hemorragias subdurales.	Administración de fibroblastos modificados genéticamente para producir NGF mediante vectores retrovirales	-MMSE: 2 sujetos aumentaron puntuación; 1 sujeto no sufrió cambios; los 3 restantes disminuyeron.  -ADAS-Cog: descenso.  -PET: aumento captación FDG regiones con entrada colinérgica.	No se mencionan.
<b>Tuszynski et al. JAMA Neurology. 2015.</b>	Ensayo clínico fase 1.  10 años.	Primera parte n=8. Segunda parte n=10.	-Administración de fibroblastos modificados para producir NGF mediante <i>murine leukemia virus</i> (ex vivo)  -Administración de AAV que modifican las neuronas una vez inyectados (in vivo)	-Mayor cantidad de NGF a en regiones donde se administró el tratamiento (ELISA)  -Neuronas de los lugares de administración con hipertrofia 7% mayor que en zonas alejadas.	No se mencionan.
<b>Eyjolfsdottir et al. Alzheimer's Research &amp; Therapy. 2016.</b>	Ensayo clínico fase 1b.  6 meses.	n=4.  Ninguna pérdida.	Células de la línea ARPE-19 procedente del epitelio retiniano pigmentario modificadas genéticamente para secretar NGF.	-MMSE: descenso en todos los pacientes.  -ADAS-Cog: aumento en todos los pacientes.  -Biomarcadores (ChAT, AchE): mayor actividad de ambos.	Los más frecuentes: dolor de cabeza, delirio transitorio posoperatorio.  El más grave: hematoma subdural
<b>Rafii et al. Alzheimer's &amp; Dementia. 2014.</b>	Ensayo clínico fase 1.  6 años.	n=10.  Ninguna pérdida.	Administración estereotáctica de AAV2-NGF.	-MMSE: menor disminución a mayores dosis.  -ADAS-Cog: menor aumento a mayores dosis.  -PET: aumento del metabolismo cerebral.	-Los más frecuentes: dolor de cabeza, bradicardia, trastornos del sueño.  -El más grave: higroma.

**Tabla 1. Tabla resumen hallazgos principales artículos seleccionados.** Detalles en el texto.

\*Resultados; En el test MMSE, un aumento o una menor disminución en la puntuación obtenida indica *mejoría*, un descenso indica *empeoramiento*. En el test ADAS-Cog, un menor aumento o descenso indica *mejoría* y un aumento en ADAS-Cog indica *empeoramiento*. Resultados comparados con el estado previo a la administración de la terapia.

## 7. RESULTADOS

Los 5 artículos que a continuación se resumen, cumplen con los criterios de inclusión anteriormente mencionados.

El deterioro cognitivo de los pacientes, se midieron mediante diferentes escalas, como el MMSE y el ADAS-Cog (ANEXO II)

Además, para valorar la eficacia o no del tratamiento se utilizó el índice BV/CSF tras la realización de RNM. Este índice, desglosado, resulta de la división entre la suma de materia gris y materia blanca total, y la cantidad de fluido cerebroespinal total. De modo que con el envejecimiento y la patología vemos disminuido el BV (*volumen cerebral*) y con la atrofia cerebral vemos un aumento del CSF (*fluido cerebroespinal*), disminuyendo el índice total.

En todos ellos, el tipo de terapia génica que se ha utilizado es la administración de NFG (*nerve growth factor*), mediante diferentes técnicas que posteriormente se detallarán, en el núcleo basa de Meynert, que consiste en una región basal del cerebro anterior, situada por encima y paralela al nervio óptico, y limitando medialmente con el ventrículo lateral [19]. Este núcleo es muy rico en acetilcolina, que es el neurotransmisor que se ve disminuido en la enfermedad de Alzheimer.

Este núcleo desempeña una función esencial a través de sus axones dirigidos a toda la corteza, proporcionando a ésta el mayor aporte de acetilcolina. La “hipótesis colinérgica” sugiere que un déficit colinérgico cortical conduce a un deterioro cognitivo en el envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer [19], por tanto, se dedujo la importancia de esta región en la etiología enfermedad, proponiéndola como objetivo en el futuro tratamiento.

### 7.1 Resumen de los hallazgos principales.

**Artículo 1: Ferreira et al. Journal of Alzheimer’s disease. 2015. “Brain Changes in Alzheimer’s Disease Patients with Implanted Encapsulated Cells Releasing Nerve Growth Factor”**

Cabe destacar, que este artículo no cumple el criterio de inclusión “terapia génica”, ya que utilizan la proteína NGF, no el gen. Pese a esto, me pareció un artículo interesante para incluir en el estudio ya que apoyaba la idea de la gran importancia de este factor de crecimiento en el tratamiento de la enfermedad.

Se realizó un ensayo clínico controlado con un total de 6 pacientes.

De estos 6, a 3 se le realiza una única implantación estereotáctica de NGF encapsulado en el núcleo basal de Meynert (región Ch4) y a los otros 3 se les realiza doble implantación de NGF en regiones Ch2 y Ch4, no habiendo diferencias significativas respecto al número de implantes ( $p=0,414$ ). Además de esta muestra de 6 pacientes, se añadió otro grupo de pacientes procedentes de ADNI (Alzheimer's disease neuroimaging initiative) con características similares a los anteriores, como grupo control al cual no se le administró el tratamiento, pero tampoco un placebo.

Cohort	MMSE			BV/CSF index		
	Baseline	Absolute 12-months change	Percentage of change	Baseline	Percentage of change	
NGF patients	1 (R)	23	+4	+17%	15.5	-13%
	2	19	-3	-16%	14.8	-19%
	3	24	-9	-38%	20.7	-16%
	4 (R)	21	-1	-5%	15.7	-21%
	5	23	-9	-39%	31.0	-22%
	6 (R)	23	-2	-9%	15.7	-11%
	Mean (SD)	22.2 (1.83)	-3.33	-15%	18.9 (6.30)	-17%
ADNI-matched ( $n=36$ )	22.4 (1.27)	-2.72	-12%	22.1 (9.77)	-14%	
ADNI-total* ( $n=131$ )	23.4 (1.89)	-2.48	-11%	20.0 (9.13)	-10%	

**Tabla 2. Puntuación MMSE e índice BV/CSF al inicio y a los 12 meses de seguimiento.**

Por tanto, a los 6 pacientes se les administró el NGF encapsulado, siendo clasificados en "respondedores" y "no respondedores" en función de los cambios en el MMSE durante los 12 meses de seguimiento, tomando como corte estándar el valor medio de cambio en el subgrupo ADNI (-2), obteniendo los siguientes resultados:

-Pacientes 1,4 y 6: respondedores. Declive en el MMSE igual/menor a 2 puntos.

-Pacientes 2,3 y 5: no respondedores. Declive mayor a 2 puntos.

Al inicio del estudio (previamente a la administración del tratamiento), se vio una mayor atrofia y degeneración neuronal en los respondedores respecto a los no respondedores, basándonos en el índice BV/CSF. Lo que se puede entender con esto, es que los pacientes con mayor atrofia, y, por tanto, teóricamente peor estado clínico, se observó una mayor mejoría, ya que el rango de mejora que podían experimentar era mayor, que los que partían de situación clínica en mejores condiciones.

Además, en los sujetos respondedores pudimos observar:

-Aumento del metabolismo cerebral de glucosa respecto al estado previo al tratamiento.

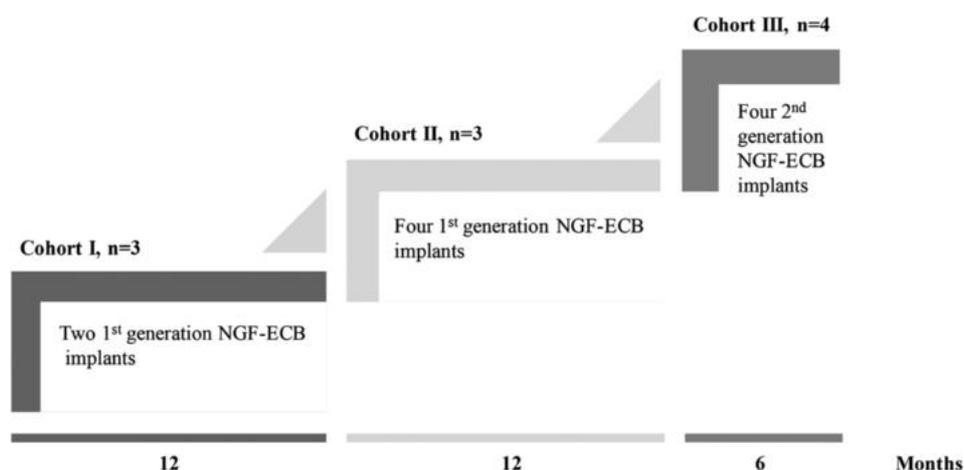
-Posteriormente, mejoría del estado clínico en base a test cognitivos, viéndose una clara mejoría en el MMSE durante el tratamiento con una reducción en la disminución de su puntuación respecto al ritmo de disminución que llevaban previo a la administración del tratamiento.

## Artículo 2: Eyjolfsson et al. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2016.

Se realizó un ensayo clínico controlado con un total de 4 pacientes.

La diferencia de este ensayo con el resto resulta en que, como posible ventaja, utilizaron unos implantes encapsulados de células de la línea ARPE-19 procedente del epitelio retiniano pigmentario, las cuales, modificados genéticamente mediante el NGF humano, secretaban NGF. Estas células se administraban encapsuladas en un dispositivo montado previamente.

Este estudio estuvo formado por 3 cohortes, que se muestran en la figura, pero en este artículo nos centramos únicamente en la cohorte III.



**Figura 7. Representación esquemática del régimen de aumento de dosis durante el estudio.**

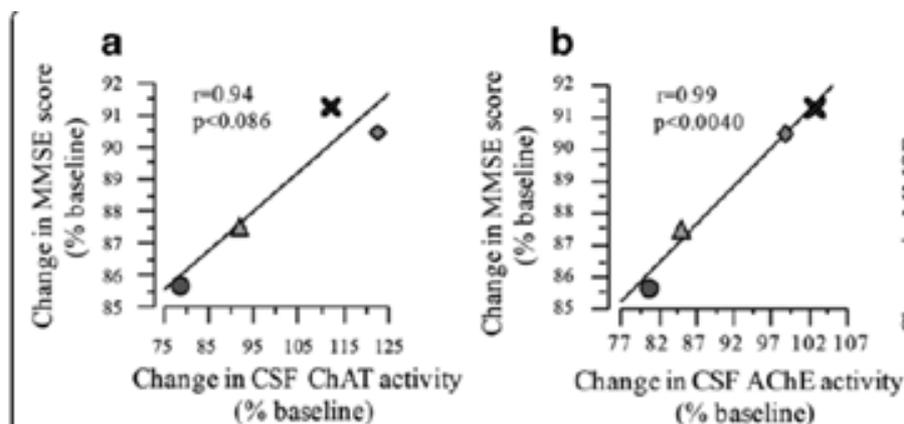
Ninguno de los efectos secundarios encontrados fue importante, a excepción de un caso de hematoma subdural subagudo izquierdo, 3 meses después del procedimiento en uno de los pacientes, el cual fue manejado de manera conservadora y resuelto en breve período de tiempo, sin mayor trascendencia.

La cognición se evaluó mediante las escalas MMSE y ADAS-Cog, con un descenso de 2-3 puntos en el MMSE y un aumento de 3-6 puntos en el ADAS-Cog a lo largo del estudio. A los 20 meses se vio como 3 de los pacientes seguía con la misma tasa de disminución del MMSE y uno había experimentado un mayor deterioro cognitivo en relación con el estado previo al tratamiento, no encontrando grandes mejorías en conjunto.

En cuanto a los biomarcadores estudiados en el LCR, se vio una mayor actividad de colinacetyltransferasa (ChAT), enzima que promueve la formación de acetilcolina, y de Acetilcolinesterasa (AChE) en 2 pacientes, coincidiendo con un menor declive de MMSE en comparación con los otros dos pacientes, lo cual tiene una correlación positiva.

Observando estos datos, no tendría mucho sentido que el MMSE mejorase tanto al aumentar la enzima que promueve la formación de acetilcolina, como al aumentar la enzima que la degrada, lo que podemos pensar a raíz de este dato es que puede que no haya tanta correlación como se piensa entre la cantidad de acetilcolina y la clínica de los pacientes.

Además, el cambio desde el inicio del estudio en la actividad de AchE se correlacionó positivamente con el cambio desde el inicio del estudio en la actividad de ChAT, es decir, los cambios en ambas se producen simultáneamente.



**Figura 8.** Cambio porcentual desde el inicio en las actividades del líquido cefalorraquídeo (CSF) de la colina acetiltransferasa (ChAT) y la acetilcolinesterasa (AChE) en correlación con los cambios en el MMSE.

Como conclusiones en este estudio, vemos que ningún paciente mostró mejoría de la cognición durante los 6 meses que duró el estudio, debido, como argumentan los autores, a la corta duración de seguimiento de los pacientes. Sin embargo, tampoco hubo evidencia de que hubiera un declive cognitivo mayor de lo esperado durante este tiempo del que hubiera habido sin el tratamiento, por lo que no tiene un efecto negativo en los pacientes.

Para próximos estudios se necesita, en opinión de los autores, una duración de al menos 18 meses.

### **Artículo 3: Tuszynski et al. JAMA Neurology. 2015.**

Ensayo clínico fase 1, que consta de dos partes:

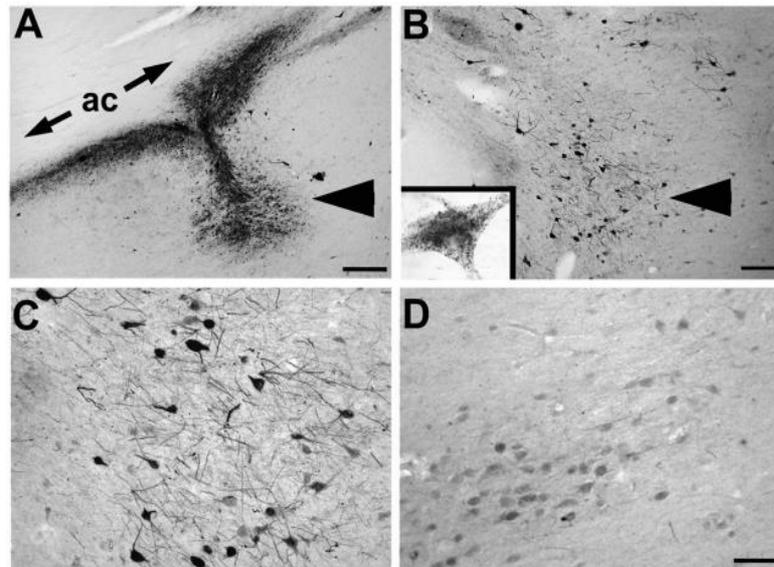
-Primera parte (n=8): mediante técnicas ex vivo, se implantaron células autólogas (fibroblastos modificados genéticamente), que secretaban NGF en el para que actuaran como “minibombas” biológicas secretoras de NGF.

-Segunda parte (n=10): mediante técnicas in vivo, se inyectaron vectores virales adenoasociados (AAV2) en el cerebro anterior, que modificaban genéticamente las células de éste. Este proceso era más simple y menos costoso que el anterior. Este vector se administró siguiendo el orden:

- I. Sujetos 1-3 recibieron una dosis de AAV2 de  $1,2 \times 10^{10}$  partículas de vector.
- II. Sujetos 4-6 recibieron una dosis de AAV2 de  $5,8 \times 10^{10}$  partículas de vector.
- III. Sujetos 7-10 recibieron una dosis de AAV2 de  $1,2 \times 10^{11}$  partículas de vector.

La acumulación neuronal de NGF fue claramente más intensa en las neuronas adyacentes a los sitios de administración de NGF en comparación con las neuronas ubicadas más distalmente.

Los niveles de proteína NGF por ELISA se midieron en un paciente tratado con AAV2-NGF que se sometió a la administración de genes un año antes y detectó 1230 pg de tejido NGF / gm en el núcleo basal de Meynert; una región de control contigua del núcleo basal situada a 5 mm del sitio de administración de NGF en el mismo paciente contenía solo 22 pg de tejido de NGF / gm. Por lo tanto, la administración del gen AAV2-NGF incrementó la proteína NGF en más de 50 veces un año después del suministro del gen en este sujeto.



**Figura 9: Suministro de NGF en el núcleo basal de Meynert (A); captación de NGF en otra localización cerebral (B); mayor aumento de las neuronas que expresan NGF en pacientes que recibieron inoculación del virus (C) en comparación con otro lugar (D) menos intenso, en las neuronas del núcleo basal situadas a 3 mm del sitio de inyección.**

Se visualizaron respuestas tróficas al NFG, mostrándose esto como una brotación axonal colinérgica en sitios de administración del gen NFG en todos los sujetos. Estos axones estaban marcados por un receptor de neurotrofina (p75), que es expresado únicamente por neuronas colinérgicas y sus axones en la región basal del encéfalo. Este marcador se encontró hasta 10 años más tarde en uno de los pacientes que sobrevivió este tiempo después del tratamiento.

Las neuronas cercanas a regiones de liberación de NGF parecían exhibir una mayor hipertrofia en comparación con las más alejadas, con una diferencia del 7% aproximadamente.

En cuanto a la seguridad del estudio, hay que destacar que no detectaron formaciones tumorales o evidencia de toxicidad neuronal.

Se ha demostrado la seguridad de la transferencia de genes del factor de crecimiento durante los períodos de tiempo más largos examinados hasta la fecha: 7 años. Durante este período de tiempo prolongado, sigue habiendo evidencia persistente de respuestas tróficas al NGF. Esto plantea la posibilidad de que el tratamiento con transferencia de genes del factor de crecimiento podría permitir la protección por periodos de tiempo muy extensos sin un nuevo tratamiento.

**Artículo 4: Tuszynski et al. Nature Medicine. 2008. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease.**

Ensayo clínico fase 1 formado por 8 sujetos. Se obtuvieron fibroblastos análogos de biopsias de la piel y se modificaron genéticamente para producir y secretar NGF mediante el uso de vectores retrovirales:

-A los dos primeros sujetos se les administró de manera unilateral en el cerebro derecho.

-A los 6 restantes se les realizaron inyecciones bilaterales. Dos de los sujetos de este grupo sufrieron hemorragias subcorticales tras las inyecciones y quedaron fuera del estudio.

En el seguimiento pudimos observar:

- MMSE±

-Pretratamiento: disminución de  $6,1 \pm 2,7$ /año.

-Post tratamiento inmediato: disminución  $3,0 \pm 1,0$ /año.

Al cabo de 6-18 meses después del tratamiento, los resultados del MMSE fueron:

-2 sujetos aumentaron su puntuación en el test.

-En uno de los sujetos no hubo cambios.

-2 sujetos disminuyeron menos de un punto por año.

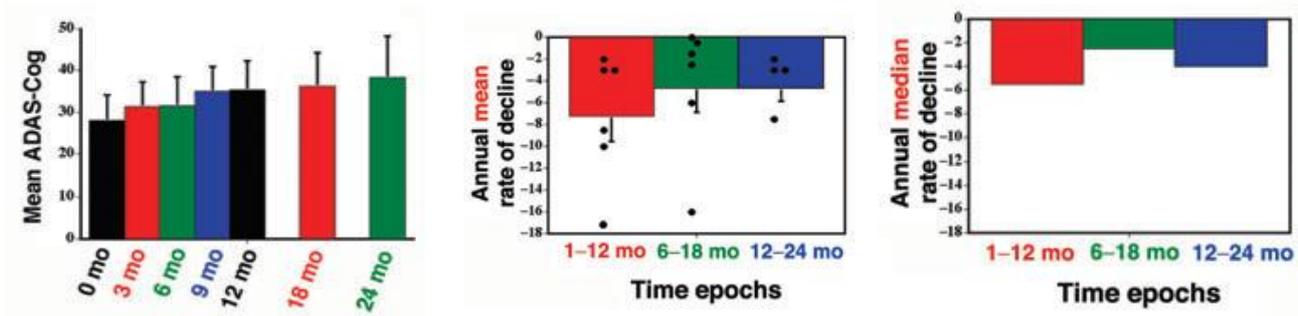
-1 sujeto disminuyó 7 puntos.

Con estos resultados concluimos que, con el tratamiento administrado, la velocidad de disminución de la puntuación en el MMSE se redujo en un 84%, estimándose un deterioro más lento de lo que se estaban produciendo previamente a la administración del tratamiento.

- ADAS-Cog

-Pretratamiento: los datos de tasa de declive no se recogieron, las tasas publicadas consistían en una disminución de 3-10 puntos/año.

-Post tratamiento, se registró una disminución anual a los 22 meses de  $6,2 \pm 1,9$  puntos. Mejoría de la reducción en comparación en los meses 1-12 a los meses 6-18 en un 55%.



**Figura 10. Resultado cognitivo ADAS-Cog. Puntuaciones medias 2 semanas antes y después del tratamiento (A). Cambios promedios anuales en los tiempos 1-12, 6-18 y 12-24 meses después del tratamiento (B). Mediana de tasa de disminución entre los 1-12, 6-18 y 12-24 meses.**

- PET: se mostró un significativo aumento en la captación de FDG (fluorodesoxiglucosa) en el segundo escaneo en comparación con el primero, significando esto una reversión del declive habitual en la enfermedad de Alzheimer. Se observó aumento de captación en la mayoría de las regiones corticales que reciben entrada colinérgica del núcleo basal. Por el contrario, el núcleo estriado que no recibe proyecciones del núcleo basal no mostró cambios de captación de FDG. El aumento de la captación de FDG también fue evidente en cerebelo, una estructura que muestra la plasticidad asociada con la cognición y atención.

Con todos los datos recogidos, observamos 3 potenciales beneficios con este tratamiento:

1. Inducción de respuestas tróficas.
2. Aumento de la captación de glucosa en PET: actuación de proyecciones colinérgicas.
3. Disminución de tasa de progresión de enfermedad en un 36-51%. A los 6-18 meses mejoría o estabilización de la cognición.

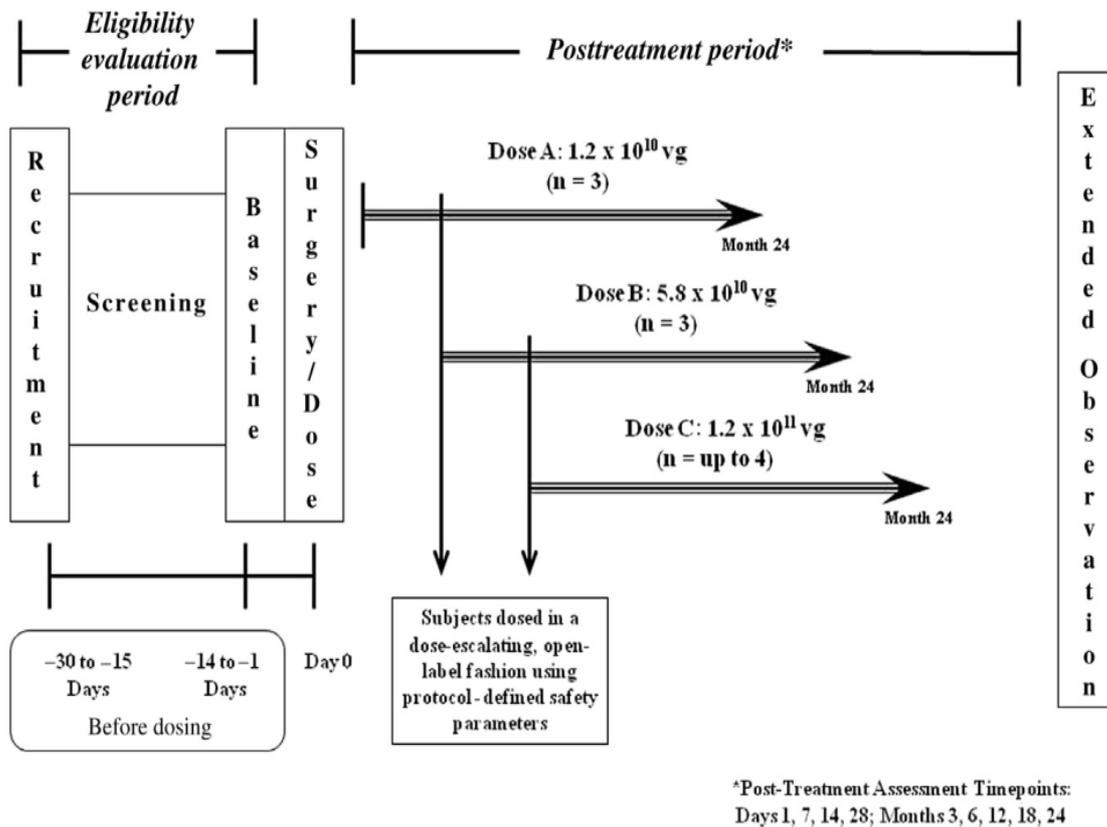
**Artículo 5: Rafii et al. Alzheimer's & Dementia. 2014. "A phase1 study of stereotactic gene delivery of AAV2-NGF for Alzheimer's disease"**

Ensayo clínico fase 1 con muestra formada por 10 sujetos, a los cuales se les administraron 3 inyecciones estereotácticas bilaterales (6 en total) de AAV2-NGF en el cerebro anterior, núcleo de Meynert, con el siguiente orden:

-Cohorte A (n=3): dosis  $1,2 \times 10^{10}$  genomas vectoriales.

-Cohorte B (n=3): dosis  $5,8 \times 10^{10}$  genomas vectoriales.

-Cohorte C (n=4):  $1,2 \times 10^{11}$  genomas vectoriales.

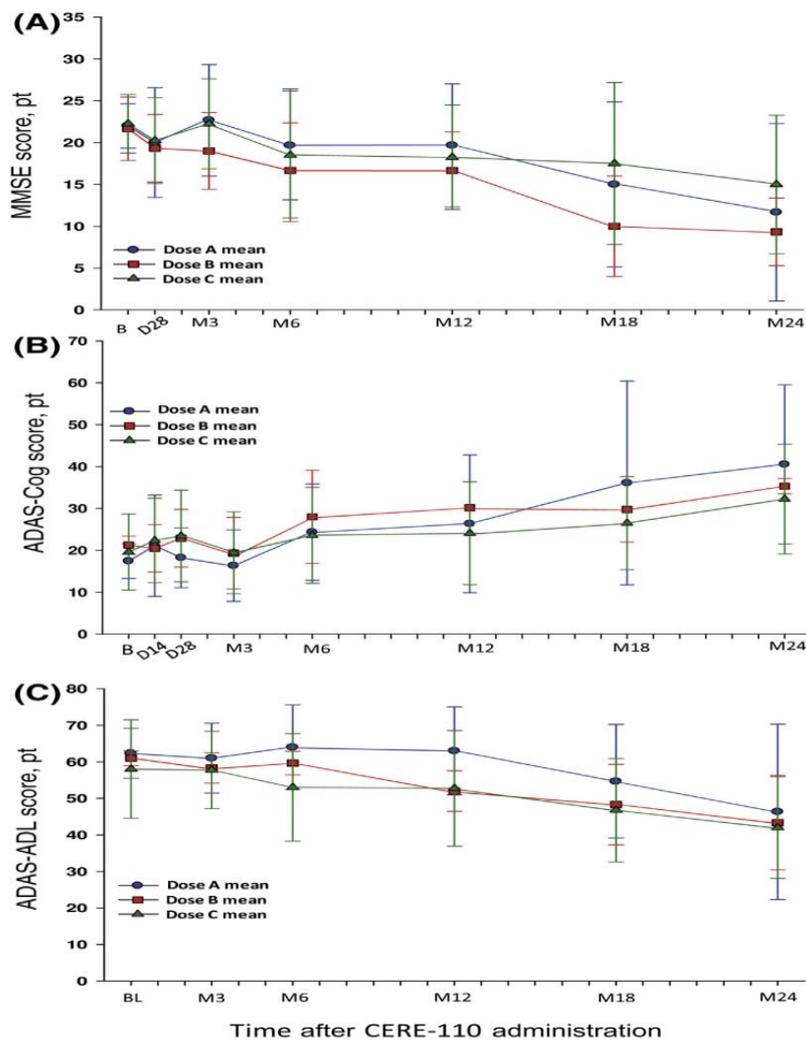


**Figura 11: Diagrama de flujo del estudio.**

En cuanto a la evaluación de diferentes parámetros clínicos para evaluar la eficacia del tratamiento, podemos concluir lo siguiente:

-En el ADAS-Cog, el sujeto con la mayor dosis (Dosis C) experimentó una reducción menor ( $12,7 \pm 4,3$  puntos) que los otros dos sujetos con menores dosis ( $23,1 \pm 9,7$ ;  $21,7 \pm 9,3$  puntos) en un seguimiento de 24 meses.

-Lo mismo sucedió con el MMSE, observándose una reducción de  $-7,3 \pm 2,9$  en los sujetos con dosis C, frente a una disminución de  $-10,3 \pm 5,2$  y  $-12,3 \pm 0,3$  en los grupos con dosis A y B respectivamente.



**Tabla 3. Cambios desde el inicio en el MMSE, ADAS-Cog y ADAC-ADL durante los 24 meses del estudio.**

-Además, se pudo visualizar en el PET, que ningún sujeto experimentó una disminución en el metabolismo cerebral de la glucosa, que es lo que suele suceder con la progresión de la enfermedad de Alzheimer. De hecho, durante el primer año de seguimiento, hubo aumentos leves de metabolismo en la mayoría de las áreas del cerebro.

-Hubo una clara evidencia de expresión durante al menos 4 años de NGF en las neuronas, lo que indujo una significativa hipertrofia de las neuronas próximas a zonas expuestas a AAV2-NGF respecto a neuronas de zonas alejadas.

No se dieron complicaciones quirúrgicas a excepción de la aparición de un hígroma, que consiste en una inflamación de una bolsa serosa, a menudo superficial, el cual se resolvió con éxito. Tampoco hubo reacciones adversas al tratamiento

A pesar de todas estas evidencias observadas, el bajo poder estadístico debido al pequeño tamaño muestral nos impide sacar cualquier conclusión verificada.

## 7.2 Efectos adversos postratamiento

De los 5 estudios revisados, solamente 2 [19], [22] registraron los efectos adversos del tratamiento. En el estudio publicado en *Alzheimer's Research and Therapy* [19] se registraron un total de 16 efectos secundarios, siendo los más frecuentes el dolor de cabeza y el delirio posoperatorio transitorio. Ninguno de ellos fue de importancia, a excepción de uno: un hematoma subdural agudo descubierto incidentalmente en un RNM 3 meses después. El paciente no experimentó signos neurológicos focales, y el hematoma se resolvió de manera conservadora sin producir mayores problemas. Otros efectos secundarios banales que se encontraron fueron fatiga, náuseas, vómitos, hipertensión, nasofaringitis y alteraciones analíticas, resolviéndose todos ellos en menos de 3 meses.

Por otro lado, en el estudio publicado en *Alzheimer & Dementia* [22] en ningún paciente se registró complicaciones quirúrgicas inusuales, a excepción de uno, en el que se produjo un higroma posquirúrgico, el cual se drenó. Se registraron muy pocos efectos adversos al tratamiento, siendo considerados por parte de los investigadores como no o poco relacionados con la administración del tratamiento. La mayoría de estos efectos fueron leves, como dolor de cabeza, bradicardia y trastornos del sueño, habiendo únicamente un caso grave de hipertensión.

## 7.3 Evaluación de la calidad metodológica

Para realizar la evaluación de la calidad metodológica de los estudios seleccionados se utilizó el Manual Cochrane 5.1.0. Este manual establece varios ítems a tener en cuenta para evaluar la calidad y el riesgo de sesgo de los estudios, que son los siguientes: generación de la secuencia aleatorizada (sesgo de selección), ocultación de la asignación (sesgo de selección), cegamiento de los participantes (sesgo de realización), cegamiento del personal (sesgo de realización), cegamiento de los resultados (sesgo de detección) y manejo de los datos incompletos (sesgo de atricción). Cada apartado fue clasificado en riesgo alto, medio o bajo según lo establecido en el manual. (ANEXO III).

## 8. DISCUSIÓN

Hemos llevado a cabo una revisión sistemática de la terapia génica en las enfermedades neurodegenerativas, habiéndonos centrado en la enfermedad de Alzheimer, ya que es la causa de demencia más frecuente en todo el mundo, con una prevalencia del 20% en personas mayores de 80 años.

Seleccionamos 4 estudios [19]- [22] cumpliendo unos criterios de inclusión y exclusión, en los cuales los sujetos tenían un probable diagnóstico de esta enfermedad y habían sido tratados con inhibidores de la colinesterasa. Como hemos mencionado anteriormente, hay un artículo seleccionado [18] que no cumplía el criterio de inclusión de terapia génica, pero resultaba interesante para la revisión.

La terapia génica en esta patología se centra en la administración de NGF, un tipo de neurotrofina (proteínas que favorecen la supervivencia neuronal) ya sea mediante vectores virales (AAV2) o en células, fibroblastos del propio paciente transformados en el cerebro anterior, específicamente en el núcleo de Meynert. El hecho de utilizar esta localización se debe a que esta parte del cerebro contiene células colinérgicas que envían proyecciones a través de la corteza y el hipocampo, las cuales son necesarias para la función cognitiva. [13]

De modo que se localizaba el núcleo basal de Meynert, que contiene una gran red de neuronas colinérgicas, siendo una de las hipótesis más aceptadas de la enfermedad la “hipótesis colinérgica”, encontrando una gran correlación entre el déficit colinérgico (disminución del neurotransmisor acetilcolina) [21] y la pérdida de las capacidades cognitivas de los pacientes, y se administraba el tratamiento determinado (ya sea mediante vectores virales, fibroblastos...) mediante inyección estereotáctica, controlando después por técnica de imagen que había sido administrado en el lugar adecuado.

En los casos en los que se realizaron varios implantes, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con implante unilateral y los pacientes con implantes bilaterales, como ya hemos mencionado anteriormente en estos estudios ( $p=0,414$ ).

En el estudio en el que el NGF se introdujo mediante un vector viral (AAV2) [22], se observó como las neuronas situadas en las zonas de mayor degeneración retienen capacidad de incorporar un vector terapéutico, lo cual representa una ventaja al incorporar estos vectores. En los estudios en los que utilizaron vectores virales como medio para introducir el gen, los resultados fueron algo más positivos que en los que no se utilizaron dichos vectores. Esto puede indicar que el uso de dichos virus produce una mayor expansión de la proteína NFG en un número mayor de células, obteniendo mejorías mayores que en los que introducimos directamente el plásmido en células como vectores.

Muy importante, la administración de este tratamiento no produjo efectos secundarios por los cuales se tuviera que suspender ninguno de los ensayos, siendo todos estos sin importancia y no causando daño en ninguno de los sujetos, a excepción de la aparición de un hematoma subdural [19] el cual se resolvió sin problemas a los pocos días. Esto demuestra la seguridad de este tratamiento y la posibilidad de ser una alternativa a los tratamientos que se vienen utilizando en los últimos años. Estos tratamientos, han sido, mayoritariamente, el uso de inhibidores de la colinesterasa, pero sus efectos son en gran parte paliativos, provocando una ligera y temporal mejoría sintomática en algunos pacientes, pero no en todos. Ningún tratamiento hasta ahora ha conseguido frenar la progresión de la enfermedad, de ahí la gran importancia de estos estudios.

No hemos visto grandes diferencias entre los estudios revisados, observando en algunos pacientes una mejoría de la cognición con la reducción en la disminución de puntuación de los test cognitivos, así como hipertrofia neuronal en zonas próximas a la administración (en algunos estudios realizados post-mortem) y brotación axonal colinérgica, lo cual nos puede indicar posibilidades de mejoría a largo plazo con este tratamiento, pero no habiéndose observado estos datos de manera equitativa en todos los pacientes tratados.

Sin embargo, todavía estamos en fases tempranas de investigación, no habiéndose aprobado ningún tratamiento de terapia génica para esta enfermedad.

En mi opinión, este tratamiento abre una puerta a una posible alternativa a los tratamientos que se han venido utilizando, por lo que puede ser una vía de investigación debido a su seguridad y los resultados ya obtenidos. Es cierto que no se han obtenido resultados de mejoría en todos los pacientes, por lo que puede que en futuras investigaciones se descubra que esta vía no es la adecuada, o que sí que estamos utilizando los métodos adecuados, debido a su seguridad, pero la diana terapéutica no es la correcta, por lo que, a mi entender, también veo fundamental descubrir nuevas dianas terapéuticas de la enfermedad donde poder actuar con certeza de que obtendremos efectos beneficiosos de detención de progresión de la enfermedad de Alzheimer

También veo la necesidad, de conseguir de mayores muestras de sujetos y seguimientos a mayor largo plazo, para poder de verdad obtener resultados fiables, pese a que este punto es complicado, ya que estamos hablando de una enfermedad muy severa e incapacitante, de modo que entramos en el terreno de la ética al dejar a este tipo de pacientes sin su tratamiento de base durante el tiempo del estudio, e introduciéndoles en un ensayo en el que algunos simplemente tomarán placebo.

## 9. CONCLUSIONES

Con todo lo visto, los autores de los artículos han llegado a las siguientes conclusiones:

- El tratamiento con genes que codifican NGF en pacientes con Alzheimer ha sido seguro y bien tolerado, causando escasos y poco importantes efectos secundarios.
- La administración de este tipo de terapia génica provoca respuestas tróficas neuronales con brotación axonal colinérgica en los lugares de inyección.
- Cierta disminución en la progresión de la enfermedad en determinados pacientes, no en todos ellos, demostrado con escalas de valoración cognitiva (MMSE, ADAS-Cog).
- Hipertrofia de neuronas próximas a los lugares de inyección de NGF en comparación con las localizadas en zonas más alejadas, en el seguimiento post-mortem de los estudios realizados mediante vectores virales.
- Difícil seguimiento de la cognición a largo plazo, debido a la corta duración de algunos de los artículos revisados (de unos cuantos meses) durante la vida de los pacientes, realizándose en algunos casos estudios cerebrales post-mortem, pudiendo solo recoger datos anatómicos, no cognitivos. Necesidad de seguimiento durante mayor tiempo para llegar a conclusiones más fiables, así como necesidad de muestras con mayor número de sujetos.

## 10. REFERENCIAS

1. Cardona Arango D, Peláez E. Envejecimiento poblacional en el SXXI: oportunidades, retos y preocupaciones. *Salud Uninorte*. 2012; 335-348.
2. Toledano A, Álvarez M.I. Envejecimiento cerebral normal y patológico: continuum fisiopatológico o dualidad de procesos involutivos. *Anales de la real academia nacional de farmacia*. 2014; 500-539.
3. Escobar A. Envejecimiento cerebral normal. *Revista Mexicana de neurociencia*. 2001; 197-202.
4. Zarranz A, Alfredo R. Enfermedades neurodegenerativas. *MinusVal*. 2004; 17-19.
5. Katsouri L, Lim Y.M, Blondrath K et al. PPAR $\gamma$ -coactivator-1 $\alpha$  gene transfer reduces neuronal loss and amyloid- $\beta$  generation by reducing  $\beta$ -secretase in an Alzheimer's disease model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016; 12292-12297.
6. Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J. *Neurología clínica*. Capítulo 70. 2010.
7. Segovia De Arana J.M, Mora F. Enfermedades neurodegenerativas por proteopatías. *FarmaIndustria*. 2002; 9-20.
8. Pérez Trullen José M<sup>º</sup>. La descripción de los ovillos neurofibrilares en la enfermedad de Alzheimer. *Revista española de patología*. 2007; 60-65.
9. Hyman B, Gomez Isla T. Alzheimer's disease is a laminar, regional and neural system specific disease, not a global brain disease. *Neurobiol Aging* 1994; 353-4
10. Terry R, Hansen L, De Teresa R, Davies P, Tobias H, Katzman R. Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987; 46: 262-8
11. Arantxa Guimerà, Xavier Gironès, Félix F. Cruz-Sánchez. Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer. *Revista española de patología*. 2002. 21-48.
12. Patricio Fuentes G, Andrea Slachevsky Ch. Enfermedad de Alzheimer: actualización en terapia farmacológica. *Revista médica Chile*. 2005; 224-230.
13. Perucho J, Casarejos MJ, Rubio I et al. The effects of parkin suppression on the behaviour, amyloid processing, and cell survival in APP mutant transgenic mice. *Experimental Neurology*. 2010; 54-67.
14. Spinney L. The forgetting gene. *Nature*. 2014; 26-28.
15. Ronchera-OMS C.L, González JM<sup>ª</sup>. Terapia génica. *Sociedad española de farmacia hospitalaria*. 2017; 919-927.
16. Lorigados L. Factor de crecimiento nervioso en la neurodegeneración y el tratamiento neurorrestaurativo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2004; 150-160.
17. Aloe L, Rocco ML, Bianchi P et al. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *Journal of translational medicine*. 2012; 10-239.

18. Ferreira D, Westman E, Eyjolfsson H et al. Brain changes in Alzheimer's disease patients with implanted encapsulated cells releasing nerve growth factor. *Journal of Alzheimer's disease*. 2015; 1059-1072.
19. Eyjolfsson H, Eriksdotter M, Linderöth B et al. Targeted delivery of nerve growth factor to the cholinergic basal forebrain of Alzheimer's disease patients: application of a second-generation encapsulated cell biodelivery device. *Alzheimers Res Ther*. 2016; 8-30.
20. Tuszynski MH, Yang JH, Barba D et al. Nerve growth factor gene therapy: activation of neuronal responses in Alzheimer's disease. *JAMA Neurology*. 2015. 1139-1147.
21. Tuszynski MH, Thal L, Pay M et al. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor therapy for Alzheimer disease. *Nature medicine*. 2008; 551-555.
22. Rafii MS, Baumann TL, Bakay RAE et al. A phase 1 study of stereotactic gene delivery of AAV2-NGF for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2014; 571-581.
23. Lun Liu A, Chang R, Pearce R et al. Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*. 2015; 527-540.

## ANEXOS

### ANEXO I. ÍTEMS PARA LA REVISIÓN SISTEMÁTICA. PRISMA.

Lista de comprobación de los ítems para incluir en la publicación de una revisión sistemática (con o sin metaanálisis). La declaración PRISMA

Sección/tema	Número	Ítem
<i>Título</i> Título	1	Identificar la publicación como revisión sistemática, metaanálisis o ambos
<i>Resumen</i> Resumen estructurado	2	Facilitar un resumen estructurado que incluya, según corresponda: antecedentes; objetivos; fuente de los datos; criterios de elegibilidad de los estudios, participantes e intervenciones; evaluación de los estudios y métodos de síntesis; resultados; limitaciones; conclusiones e implicaciones de los hallazgos principales; número de registro de la revisión sistemática
<i>Introducción</i> Justificación	3	Describir la justificación de la revisión en el contexto de lo que ya se conoce sobre el tema
Objetivos	4	Plantear de forma explícita las preguntas que se desea contestar en relación con los participantes, las intervenciones, las comparaciones, los resultados y el diseño de los estudios (PICOS)*
<i>Métodos</i> Protocolo y registro	5	Indicar si existe un protocolo de revisión al que se pueda acceder (por ej., dirección web) y, si está disponible, la información sobre el registro, incluyendo su número de registro
Criterios de elegibilidad	6	Especificar las características de los estudios (por ej., PICOS, duración del seguimiento) y de las características (por ej., años abarcados, idiomas o estatus de publicación) utilizadas como criterios de elegibilidad y su justificación
Fuentes de información	7	Describir todas las fuentes de información (por ej., bases de datos y períodos de búsqueda, contacto con los autores para identificar estudios adicionales, etc.) en la búsqueda y la fecha de la última búsqueda realizada
Búsqueda	8	Presentar la estrategia completa de búsqueda electrónica en, al menos, una base de datos, incluyendo los límites utilizados, de tal forma que pueda ser reproducible
Selección de los estudios	9	Especificar el proceso de selección de los estudios (por ej., el cribado y la elegibilidad incluidos en la revisión sistemática y, cuando sea pertinente, incluidos en el metaanálisis)
Proceso de extracción de datos	10	Describir los métodos para la extracción de datos de las publicaciones (por ej., formularios pilotado, por duplicado y de forma independiente) y cualquier proceso para obtener y confirmar datos por parte de los investigadores
Lista de datos	11	Listar y definir todas las variables para las que se buscaron datos (por ej., PICOS, fuente de financiación) y cualquier asunción y simplificación que se hayan hecho
Riesgo de sesgo en los estudios individuales	12	Describir los métodos utilizados para evaluar el riesgo de sesgo en los estudios individuales (especificar si se realizó al nivel de los estudios o de los resultados) y cómo esta información se ha utilizado en la síntesis de datos
Medidas de resumen	13	Especificar las principales medidas de resumen (por ej., razón de riesgos o diferencia de medias)
Síntesis de resultados	14	Describir los métodos para manejar los datos y combinar resultados de los estudios, cuando esto es posible, incluyendo medidas de consistencia (por ej., ítem 2) para cada metaanálisis
Riesgo de sesgo entre los estudios	15	Especificar cualquier evaluación del riesgo de sesgo que pueda afectar la evidencia acumulativa (por ej., sesgo de publicación o comunicación selectiva)
Análisis adicionales	16	Describir los métodos adicionales de análisis (por ej., análisis de sensibilidad o de subgrupos, metarregresión), en el caso de que se hiciera, indicar cuáles fueron preespecificados
<i>Resultados</i> Selección de estudios	17	Facilitar el número de estudios cribados, evaluados para su elegibilidad e incluidos en la revisión, y detallar las razones para su exclusión en cada etapa, idealmente mediante un diagrama de flujo
Características de los estudios	18	Para cada estudio presentar las características para las que se extrajeron los datos (por ej., tamaño, PICOS y duración del seguimiento) y proporcionar las citas bibliográficas

**ANEXO II: MMSE y ADAS-Cog.**

## Mini-Mental State Examination (MMSE)

Patient's Name: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_

**Instructions: Ask the questions in the order listed.  
Score one point for each correct response within each question or activity.**

Maximum Score	Patient's Score	Questions
5		"What is the year? Season? Date? Day of the week? Month?"
5		"Where are we now: State? County? Town/city? Hospital? Floor?"
3		The examiner names three unrelated objects clearly and slowly, then asks the patient to name all three of them. The patient's response is used for scoring. The examiner repeats them until patient learns all of them, if possible. Number of trials: _____
5		"I would like you to count backward from 100 by sevens." (93, 86, 79, 72, 65, ...) Stop after five answers. Alternative: "Spell WORLD backwards." (D-L-R-O-W)
3		"Earlier I told you the names of three things. Can you tell me what those were?"
2		Show the patient two simple objects, such as a wristwatch and a pencil, and ask the patient to name them.
1		"Repeat the phrase: 'No ifs, ands, or buts.'"
3		"Take the paper in your right hand, fold it in half, and put it on the floor." (The examiner gives the patient a piece of blank paper.)
1		"Please read this and do what it says." (Written instruction is "Close your eyes.")
1		"Make up and write a sentence about anything." (This sentence must contain a noun and a verb.)
1		"Please copy this picture." (The examiner gives the patient a blank piece of paper and asks him/her to draw the symbol below. All 10 angles must be present and two must intersect.) 
30		<b>TOTAL</b>

S-1

## Alzheimer Disease Assessment Scale— Cognitive Subscale (ADAS-cog) 11-Item

	Score range
<b>Memory and new learning</b>	<b>0 - 35</b>
Word recall (mean number of words not recalled)	0 - 10
Orientation (one point for each incorrect response)	0 - 8
Word recognition (mean number of incorrect responses)	0 - 12
Remembering test instructions	0 - 5
<b>Language</b>	<b>0 - 25</b>
Commands	0 - 5
Spoken language ability	0 - 5
Naming objects/fingers	0 - 5
Word-finding difficulty	0 - 5
Comprehension	0 - 5
<b>Praxis</b>	<b>0 - 10</b>
Constructional praxis	0 - 5
Ideational praxis	0 - 5
<b>Total</b>	<b>0 - 70</b>

 Increasing scores indicate worsening cognitive function.  
 Rosen WG, et al. *Am J Psychiatry*. 1984;141:1356-1364.

**ANEXO III: EVALUACIÓN DE LA CALIDAD**

<b>Ítem</b>	<b>Riesgo</b>	<b>Apoyo</b>
Generación de la secuencia aleatorizada (sesgo de selección)	Riesgo alto	No hay grupo control
Ocultación de la asignación (sesgo de selección)	Riesgo alto	No hay grupo control
Cegamiento de los participantes (sesgo de realización)	Riesgo alto	No hay grupo control
Cegamiento de personal (sesgo de realización)	Riesgo alto	No hay grupo control
Cegamiento de los evaluadores (sesgo de detección)	Riesgo alto	No hay grupo control
Manejo de los datos de resultados incompletos (sesgo de desgaste)	Riesgo alto	Los ensayos son fase I