



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

Alfa-sinucleína como diana terapéutica en la
Enfermedad de Parkinson

Autor: M^a Alejandra Castillo Fernández

Fecha: Junio 2019

Tutor: José Carlos Menéndez Ramos

ALFA SINUCLEÍNA COMO DIANA TERAPÉUTICA EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

1. Resumen

La Enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo progresivo que afecta principalmente al movimiento. Estudios histopatológicos revelan la presencia de agregados proteicos por acumulación de una proteína mal plegada: la alfa-sinucleína. Diversos modelos animales que expresan esta proteína distorsionada reproducen la enfermedad, poniendo en evidencia que estos agregados juegan un papel importante en su desarrollo.

Por ello, se plantea el desarrollo de nuevas terapias que tengan como diana la alfa-sinucleína. Esta estrategia terapéutica supone un avance frente a los tratamientos farmacológicos actuales para la Enfermedad de Parkinson, ya que éstos se limitan a controlar los síntomas motores y no tratan el origen de la enfermedad ni impiden la progresión de la neurodegeneración.

2. Introducción

2.1. La Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es una patología de índole neurodegenerativa y progresiva que propicia la aparición de signos y síntomas de demencia, trastornos motores y que, en definitiva, disminuye la autonomía de los pacientes. Constituye la segunda forma de neurodegeneración más frecuente en nuestro país, por detrás únicamente de la enfermedad de Alzheimer, y en su mayoría debuta en pacientes de edad avanzada. Su etiología no está del todo dilucidada, pero se sabe que existen factores ambientales y genéticos son determinantes para su aparición.

Los mecanismos fisiopatológicos que se han estudiado incluyen la **pérdida** progresiva de **neuronas dopaminérgicas** en los ganglios basales, concretamente en la Sustancia Negra de la *pars compacta* (SNpc).¹ A nivel histopatológico, se han hallado inclusiones neuronales en SN, *locus coeruleus*, hipotálamo y córtex, llamadas **cuerpos de Lewy** (*Lewy F, 1912*) que están constituidos por agregados de una proteína anormalmente plegada e insoluble: la **alfa-sinucleína** (AS). Entonces, ¿cómo explica la degeneración neuronal los síntomas patognomónicos de este trastorno? La corteza motora envía impulsos nerviosos a los ganglios basales, a través de la vía extrapiramidal¹. Los ganglios basales reciben este impulso y lo regulan y matizan, devolviéndolo a la corteza motora. De este modo, la corteza enviará a la médula espinal una orden motora más precisa, obteniendo así un movimiento voluntario más fino y armonioso.

La pérdida de transmisión dopaminérgica en este sistema conlleva un desequilibrio en la regulación de la facilitación/inhibición del movimiento, con un predominio de su inhibición. Esto tiene como consecuencia un *síndrome hipocinético*, siendo la EP el mayor exponente, que se traduce en temblor de reposo, rigidez, bradicinesia y alteración en los reflejos posturales y de la marcha.²

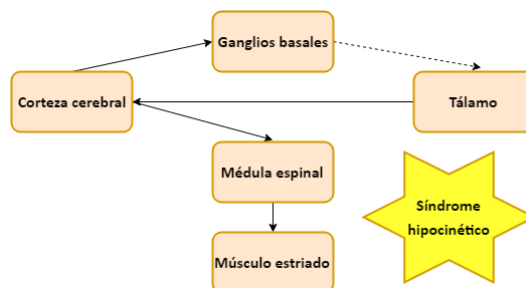


Figura 1. Circuito gangliobasal-tálamo-cortical

2.2. Terapéutica actual

Actualmente existen tratamientos enfocados a paliar los síntomas motores de la EP, como son los medicamentos que intentan compensar la pérdida de neurotransmisión dopaminérgica en los circuitos motores: la L-DOPA o los IMAO. Sin embargo, el arsenal terapéutico carece de terapias neuroprotectoras o neuroregenerativas que atajen el problema de raíz, por lo que la enfermedad progresa indefectiblemente

3. Objetivos

El descubrimiento de la contribución de los agregados de AS a la toxicidad celular y al declive progresivo en la actividad neuronal ha posicionado en el horizonte terapéutico una nueva diana. En el presente trabajo se revisa esta novedosa diana y los compuestos que actúan específicamente sobre AS y cuya aplicación se centre en la EP.

4. Material y métodos

Revisión bibliográfica en diversas bases de datos y portales científicos: PubMed, PubChem, Dialnet, Google Scholar, Dialnet, entre otras. Los filtros utilizados en las búsquedas han sido 'alpha-synuclein' 'Parkinson's disease' 'misfolding' 'alpha-synuclein target' 'alpha-synuclein neuronal toxicity'. El intervalo de tiempo acota desde 2019 hasta el 2000, si bien algunas referencias son más antiguas ya que sirven de apoyo a las más nuevas.

5. Resultados

5.1. Implicación de la alfa sinucleína (AS) en la EP. Sinucleinopatías.

La acumulación intracelular de depósitos de AS mal plegada se observa en distintas enfermedades neurodegenerativas, agrupadas bajo el nombre de sinucleinopatías, entre ellas la EP, la Demencia de Cuerpos de Lewy (DCL) y la Atrofia Multisistémica (AM). Todas ellas se caracterizan por ser formas de demencia degenerativa, aunque el espectro clínico de cada una es amplio y variado.

La causa de las sinucleinopatías aún hoy en día está por esclarecer. Se conocen factores de riesgo genéticos (mutaciones, multiplicidades en el número de copias del gen de la AS, etc) y factores ambientales que puedan acrecentar la susceptibilidad de ciertos individuos.

5.1.1. Alfa-sinucleína nativa

La AS se engloba dentro de una familia de proteínas que se expresan en diversos tejidos, pero fundamentalmente en el sistema nervioso, las sinucleínas: alfa, beta y gamma. Estas proteínas están minuciosamente caracterizadas, así como los genes que las codifican, fruto de las prolíferas investigaciones de las últimas décadas.

AS es una proteína soluble de 140 aminoácidos, con un peso molecular de 14kDa. Se expresa de forma ubicua, aunque predominantemente en el sistema nervioso. Se encuentra mayoritariamente en el citosol y en las membranas del retículo endoplásmico asociado a mitocondrias.³

```

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH
GVATVAEKTQ EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL
GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA
    
```

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de AS

Existen 4 isoformas funcionales de AS descritas, por splicing alternativo (**Figura 3**), denominadas SNCA 140, SNCA 126, SNCA 112 y SNCA 98. La primera corresponde al transcrito de los cinco exones codificantes. Los otros tres son de menos peso molecular por delección de exones que sufren en el proceso de transcripción. Todas ellas presentan una estructura primaria con tres dominios. El primero consta del extremo amino terminal, en el que abundan residuos de lisina, lo que le confiere densidad de carga positiva a pH fisiológico y la repetición de la secuencia consenso **KTKEGV** (esencial para unión a lípidos). Éste es un dominio altamente conservado filogenéticamente entre el ser humano y sus parientes evolutivos más cercanos, en cuanto a número y posición de las secuencias consenso. Esta región da lugar a una alfa-hélice con capacidad de interactuar con fosfolípidos. Le sigue el dominio central NAC (región central amiloidogénica) que es altamente hidrófobo. Por último, el extremo carboxilo terminal compuesto principalmente por residuos de prolina, glutamato y aspartato⁴.

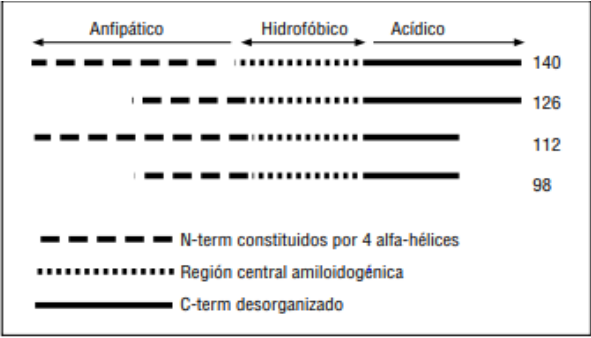


Figura 3. Isoformas funcionales de AS

A partir de la purificación de neuronas humanas se vio que la AS existe en un equilibrio dinámico, cuya modulación aún no se ha elucidado, entre las formas monomérica y tetramérica (**Figura 4**) y adopta una conformación de hélice alfa. Los tetrameros se forman gracias a interacciones por puentes de hidrógeno entre residuos de tirosina de las hélices.⁴



Figura 4. Formas monomérica y tetramérica de AS funcional.

En el sistema nervioso se le atribuye la función de facilitar la formación del complejo SNARE en terminales presinápticas. Por tanto, estaría implicada en procesos de tráfico de vesículas sinápticas. Se ha visto también relacionada con la polimerización de tubulina, dado que el

dominio NAC interacciona con ésta. Estudios en ratones knock-out para alfa-sinucleína (-/-) ponen de manifiesto una transmisión neuronal disminuida y la senescencia prematura de los ratones⁵.

5.1.2. Gen de la alfa-sinucleína: SNCA.

Es un gen compuesto por siete exones de los cuales cinco son codificantes. Su posición molecular es la siguiente: posición 22.1 del brazo largo del cromosoma 4 (4q22.1)⁶.

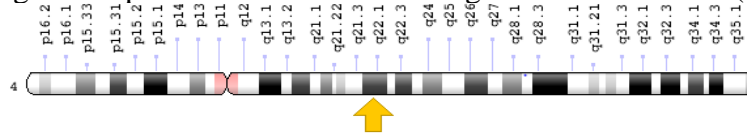


Figura 5. Situación del gen snca en el cromosoma 4

5.1.3. Alfa-sinucleína mutada.

Fruto de la secuenciación genómica de pacientes con EP se han identificado tres mutaciones puntuales de cambio de sentido (missense) en el gen SNCA (Figura 6).

- Polymeropoulos et al., identificaron la primera mutación relacionada con EP autosómica dominante de desarrollo temprano (*early onset PD*)⁷. Se traduce en el cambio de aminoácido alanina por una treonina en el residuo 53 (Ala53Thr).
- La siguiente mutación identificada fue Ala30Pro.⁸
- La más reciente identificación se trata de la mutación Glu46Lys en una familia española con parkinsonismo autosómico dominante⁹.

Todas las mutaciones afectan al dominio N-terminal y alteran en distinto grado las propiedades de AS, así como su capacidad de agregación y desarrollo de procesos neurotóxicos. Todas ellas se traducen en formas de EP prematuras y se transmiten de forma autosómica dominante.

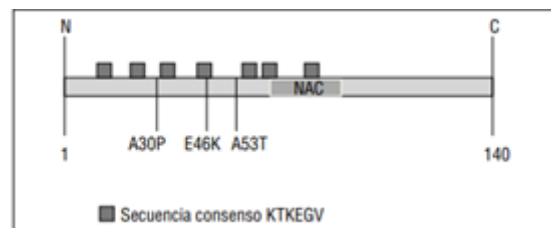


Figura 6. Posicionamiento de las mutaciones descritas en AS

5.1.4. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) y duplicaciones y triplicaciones génicas.

Se han llevado a cabo metaanálisis en los últimos años para validar la relación entre polimorfismos de un único nucleótido en el gen SNCA con la EP y otras sinucleinopatías. Prácticamente a ninguna de las descritas puede atribuírsele un cambio de aminoácido o cambio en el marco de lectura. Ejemplos: rs356186 y el microsatélite Rep-1¹⁰. Este último se ha asociado a una evolución más rápida en el deterioro cognitivo y motor de EP esporádica.

Se han observado numerosos casos de EP en los que el problema radica en el número de copias del gen SNCA (duplicación y triplicación), sin mutación alguna, dando lugar a la sobreexpresión de AS nativa y entrecruzamientos desiguales entre cromátidas¹¹.

5.1.5. Mecanismos de neurotoxicidad.

Como se ha mencionado en los apartados anteriores, cuando la conformación de la AS se ve alterada (protofibrilla) puede autoagregarse y formar oligómeros, que constituyen finalmente los cuerpos de inclusión que conocemos como Cuerpos de Lewy (CL). La agregación tiene lugar mediante enlaces covalentes y fuerzas de Van der Waals. El dominio hidrófobo contribuye a la formación de agregados.



Las formas neuropatológicas de AS se unen a los fosfolípidos de membrana de estructuras celulares, en detrimento de sus funciones:

- **Deficiencia en los procesos de degradación peptídica.** La degradación normal de las sinucleínas se lleva a cabo eminentemente mediante el Sistema Ubiquitina-Proteosoma (UPS) y por degradación lisosomal. Sin embargo, las especies tóxicas de AS no son translocadas al interior de los lisosomas, por su férrea unión al receptor LAMP2A, por lo que se reduce su degradación. Esto tiene como resultado un aumento de la concentración de AS alterada en el citosol, promoviendo la formación de cuerpos de inclusión. Además, con la edad la función lisosomal se ve afectada, por lo que se respalda que la senectud sea el marco temporal de desarrollo más frecuente de la EP.¹²
- **Alteración mitocondrial.** El dramático incremento de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y Nitrógeno (RNS) origina daño celular y la peroxidación y nitrosilación de residuos de tirosina de la alfa-sinucleína (Tyr₃₉, Tyr₁₂₅, Tyr₁₃₃, Tyr₁₃₆), lo cual favorece la formación de enlaces entre las protofibrillas¹³.
- **Unión a vesículas sinápticas de dopamina.** Ello genera poros a través de los cuales se escapa el neurotransmisor hacia el citosol¹⁴.
- La alta concentración de **especies oxidantes y dopamina en el citosol** neuronal desencadena la oxidación del anillo catecol a la forma quinona^{15,16}. De este modo se generan puntos electrófilos con los que proteínas y péptidos celulares, como el glutatión, forman aductos.

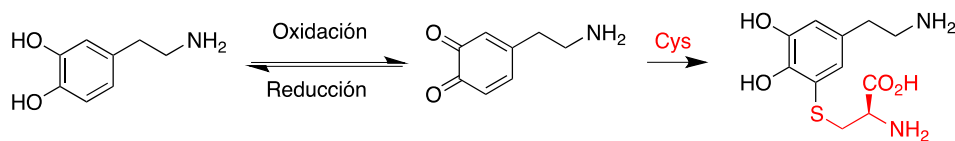


Figura 7. Proceso de oxidación de DA a dopaquinona y alquilación con cisteína.

- **Unión irreversible a la tubulina.** Impide la polimerización de tubulina, interrumpiendo el tráfico intracelular. Como se ha mencionado previamente, la AS funcional está implicada en el proceso de fusión de las vesículas presinápticas con la membrana celular¹⁷. Sin embargo, los oligómeros dificultan la movilización de estas vesículas hacia la terminal presináptica e impiden la formación del complejo SNARE.
- **Elevación de calcio citosólico.** Su interacción con canales de calcio del Retículo Endoplásmico eleva la concentración de calcio citosólico a niveles tóxicos. Las terminales dopaminérgicas de la porción dorsolateral del estriado presentan propiedades

electrofisiológicas especiales que las hace intrínsecamente vulnerables a cambios en los niveles de calcio.¹⁵

- Propagación intercelular de AS. La unión a estructuras en las terminales sinápticas desencadena su liberación al espacio sináptico, lo cual configura una forma de transmisión célula-célula. Las formas oligoméricas y fibrilares de AS son endocitadas por neuronas vecinas y la astrogliá. Esto último contribuye al desarrollo de un proceso inflamatorio que se propaga¹⁸.
- Interrupción síntesis de DA. Inhibe a la Tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la biosíntesis de DA. Además, interfiere en el proceso de recaptación de DA al citosol desde la terminal sináptica. Esto contribuye a la pérdida del neurotransmisor.^{15,19}

La pérdida del equilibrio antioxidativo/oxidativo, el aumento del nivel de calcio intracelular y la afectación del citoesqueleto tienen como consecuencia la apoptosis de las neuronas dopaminérgicas. Las terminales dopaminérgicas son intrínsecamente vulnerables, al parecer como consecuencia de la presencia de un tipo específico de canales de calcio dependientes de voltaje de la familia L y de la formación de dopaquinona¹⁵.

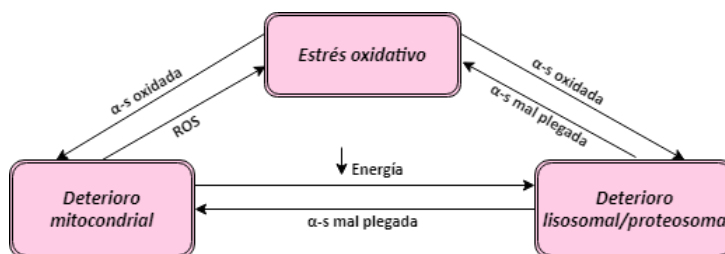


Figura 8. Retroalimentación AS-deterioro de funciones celulares

Con todo, la senectud trae asociados de por sí funciones mitocondrial y autofágica defectuosas y aumento de estrés oxidativo.

5.2. Terapias enfocadas a AS.

Los compuestos activos frente a AS actúan a distintos niveles para disminuir su neurotoxicidad: alterando su expresión, aumentando su degradación, impidiendo su propagación o impidiendo la agregación de monómeros.

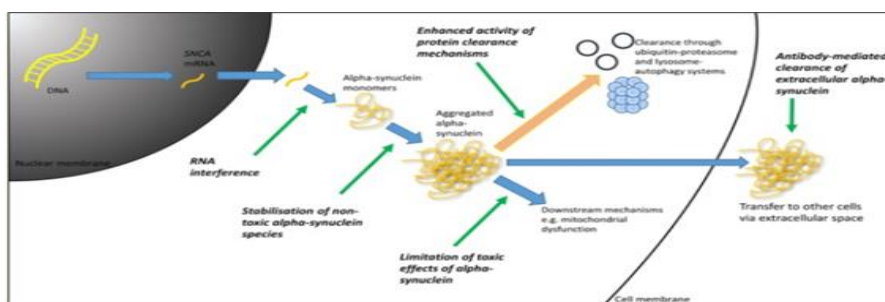


Figura 9. Puntos de actuación frente a AS

5.2.1. Terapia inmunológica.

Este enfoque terapéutico pretende aumentar la 'limpieza' de AS y evitar su propagación mediante el sistema inmunológico. También trata del marcaje de AS mediante inmunoglobulinas para dirigir específicamente la terapia

5.2.1.1. Inmunización activa frente a alfa-sinucleína con VLP (Virus-like Particle)²⁰

El concepto de inmunización activa es aplicable a la AS ya que, como se ha expuesto anteriormente, esta proteína se encuentra en gran proporción en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con PD. En teoría, la inducción de una respuesta humoral específica frente a AS neutralizaría dicha propagación (asimilable a una diseminación infecciosa). La vacunación sería por tanto una potencial estrategia para ralentizar/frenar la progresión de la neurodegeneración.

Se están desarrollando ya vacunas frente a enfermedades con un componente proteico y propagativo. Es el caso de NCT02565511, la vacuna VLP de Novartis frente a las placas beta-amiloide en la Enfermedad de Alzheimer, que se encuentra en Ensayo Clínico Fase III.

En lo que atañe a esta revisión se está desarrollando el ensayo preclínico de vacunas VLP en modelo murino transgénico (SNCA-OVX), que sobreexpresa AS humana. A estos especímenes transgénicos se les ha administrado la vacuna VLP, con la que se ha conseguido altos títulos de anticuerpos con alta afinidad por las formas oligoméricas y agregadas de AS y con baja afinidad por la forma soluble. Esto es muy interesante ya que los anticuerpos sólo se dirigen a las formas patogénicas, sin interferir con la AS funcional.

Por el momento el modelo murino no presenta mejoría de síntomas motores ni cognitivos tras la inmunización activa. Aún no se conocen resultados en otros modelos animales.

5.2.1.2. Terapia GAIM.²¹

GAIM (*General Amyloid Interaction Motif*) es una terapia dirigida a agregados proteicos mal plegados con la forma canónica amiloide, como es el caso de los CL o la proteína Tau. De este modo, este tipo de terapia se concibe como universal frente a enfermedades en las que estos agregados sean relevantes: Sinucleinopatías, enfermedad de Alzheimer. GAIM hace referencia a una proteína de la cápsida (g3p) del bacteriófago filamentoso M13 que reconoce y se une de forma específica a la región NAC de AS. Esta unión resulta en la desestabilización de los agregados neurotóxicos.

Los ensayos llevados a cabo para caracterizar la actividad del fago M13 se realizaron inicialmente sobre péptido β -amiloide, que comparte secuencias homólogas con la región NAC de AS. En última instancia se llevaron a cabo sobre proteína Tau, AS y priones con el mismo éxito, declarando así que la interacción M13-proteína es dependiente únicamente de la conformación amiloidea. Para caracterizar la interacción se llevaron a cabo los siguientes ensayos de actividad y binding:

- **Resonancia de plasmón superficial:** permite cuantificar la afinidad de adsorción entre fagos M13 purificados y el péptido β -amiloide. Se calculó una Kd de 3,6 nM.
- **Ensayo de retención de filtro:** Cuantifica la pérdida de formas amiloides mediada por el fago M13. El ensayo utiliza tioflavina T (ThT) como marcador fluorescente de los péptidos β -amiloides. Este compuesto se une fuertemente a las hélices beta de los agregados, pero débilmente a las formas monoméricas, lo cual confiere especificidad de señal. Se incuban los fagos y los péptidos β -amiloide conjugados con ThT y se encuentra que, a partir de las 48 horas de incubación, la señal fluorescente disminuye. Esto refleja que en presencia de los fagos M13 ocurren cambios estructurales en los agregados proteicos. Para cuantificar el

descenso de péptido β -amiloide se lleva a cabo el ensayo de retención de filtro en acetato de celulosa. Dado el diámetro de poro de este filtro (0,2 micras) sólo quedan retenidas las formas agregadas. Finalmente, las fibras amiloides retenidas son sometidas a un ELISA indirecto: se incuban con anticuerpos monoclonales humanos anti-región N-terminal de los péptidos. Este inmunocomplejo es incubado a su vez con anticuerpos anti-Ac humanos conjugados con una sustancia fluorescente. Así, la concentración de péptido β -amiloide será directamente proporcional a la emisión de fluorescencia. Se observa que esta emisión va disminuyendo conforme aumenta el tiempo de incubación M13-péptido β -amiloide.

Para dilucidar a qué estructura de M13 se debía la interacción se llevaron a cabo ensayos en distintas condiciones y se vio que a la temperatura de desnaturalización y en presencia de proteasas específicas de g3p la afinidad de unión descendía significativamente respecto a la afinidad con M13 en su totalidad. Al purificar g3p y repetir los ensayos de binding se describió, igualmente, una menor afinidad por el péptido β -amiloide. De ahí se infirió que la interacción debía ser multivalente por lo que se desarrolló, finalmente, el prototipo de GAIM: dos moléculas de g3p conjugadas con la fracción cristalizable de una inmunoglobulina humana.

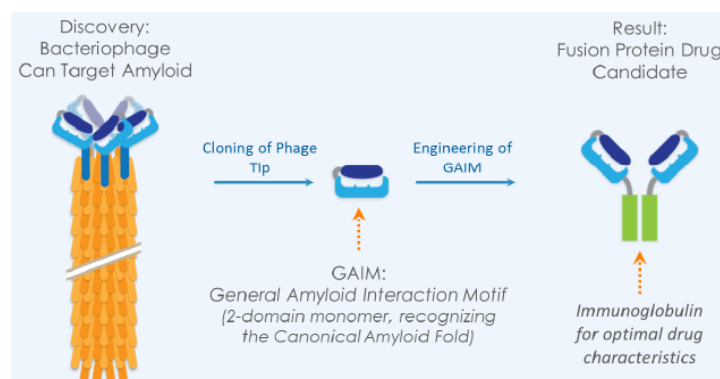


Figura 10. Desarrollo de GAIM

Una vez obtenido el GAIM y comprobada su eficacia *in vitro* de remodelar los agregados amiloides, se incubó con monómeros mal plegados y en condiciones que favorecen la agregación: se observó una menor formación de agregados proteicos, indicando que estos GAIM también interrumpen la formación de los agregados neurotóxicos.

5.2.2. Terapias que disminuyen la expresión de alfa-sinucleína.

5.2.2.1. Oligonucleótidos inhibitorios conjugados con Inhibidores de la Recaptación de Monoaminas (IRM)²².

La terapia con oligonucleótidos pretende el silenciamiento parcial (*knock-down*) del gen *snca*, dada la sobreexpresión descrita para casos de EP. Los fragmentos de oligonucleótidos ensayados en este estudio son los siguientes:

- **Oligonucleótido antisentido (ASO):** es una cadena complementaria a un fragmento de RNA mensajero (RNAm) que impide su traducción en el ribosoma, reduciendo así la expresión de la proteína AS.
- **RNA pequeño de interferencia (*Small interfering RNA sequences, siRNA*):** es un tipo de RNA interferente cuya secuencia nucleotídica es altamente específica para la secuencia de RNAm diana.

El diseño de los oligonucleótidos se hace a partir de la región del gen *SNCA* con mayor diferencia con las bases de los genes *SNCB* y *SNCG*. De este modo, se minimizan posibles silenciamientos colaterales entre secuencias muy parecidas.

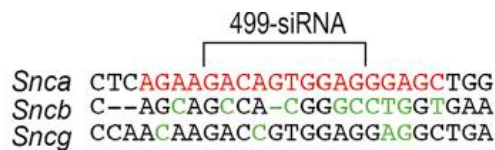
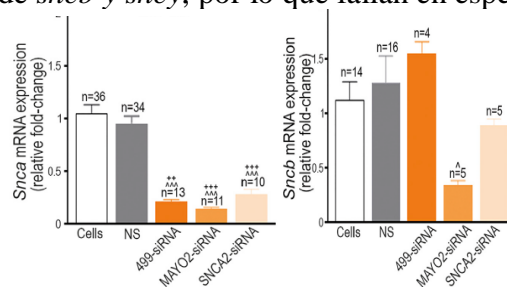


Figura 11. Región nucleotídica a partir de la cual se diseña el siRNA

A. Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* se realizaron en células de neuroblastoma humano (M17) para estudiar el potencial *knock-down* de los oligonucleótidos sobre *SNCA* murino: unas transfectadas con los oligonucleótidos específicos y las células control negativo, transfectadas con siRNA *non-sense* (NS).

La cuantificación de RNAm se realiza mediante qRT-PCR (*Quantitive Retro-transcriptase PCR*), que consiste en la conversión del RNAm aislado de las células M17 en secuencia de DNA mediante transcriptasa inversa. Con el primer correspondiente a la secuencia diana se amplifican sólo los fragmentos de interés, mediante qPCR. Como se observa en el diagrama de barras todos los oligonucleótidos ensayados disminuyen significativamente la cantidad de RNAm *SNCA* celular. Sin embargo, los oligonucleótidos MAYO2-siRNA y SNCA2-siRNA se hibridan también con RNAm de *snbc* y *sncy*, por lo que fallan en especificidad. (**Figuras 12 y 13**)



Figuras 12 y 13

Se repite este ensayo, pero esta vez en células M17 que sobreexpresan AS nativa humana y se obtienen los mismos resultados. Por tanto, 499-siRNA se propone como el candidato más eficaz y específico para ensayo en animales.

Además del siRNA, se seleccionó un oligonucleótido antisentido (1233-ASO) por exhibir resultados igual de prometedores que 499-siRNA, bajo los mismos ensayos celulares.

B. Ensayo *in vivo*: conjugación con IRM y administración intranasal

El ensayo en modelo murino se realiza con oligonucleótidos conjugados con indatralina y mediante administración intranasal con el objetivo de obtener una distribución selectiva hacia neuronas monoaminérgicas.

La indatralina es un inhibidor no selectivo de la recaptación de monoaminas. La idea es que su unión específica a los principales transportadores de monoaminas (SERT, DAT y NET) conduce a la molécula conjugada a las terminales sinápticas monoaminérgicas de forma selectiva. Para examinar la distribución cerebral del compuesto terapéutico, se marca mediante fluorescencia: se detecta dentro de neuronas TPH2+ (con *Triptófano hidroxilasa*, enzima implicada en la

síntesis de serotonina; terminales serotoninérgicas) del rafe y en neuronas TH+ (*Tirosina hidroxilasa*; terminales dopaminérgicas y noradrenérgicas) en la SN de la *pars compacta* y en el área tegmental-ventral.

Además, se hace el estudio de fluorescencia control, en paralelo, con los oligonucleótidos sin conjugar. Éste revela la distribución en otras regiones cerebrales y una menor concentración en las terminales diana.

Esto confirma la selectividad que ofrece la indatralina a la **distribución** de la terapia.

Para evaluar la **eficacia** y **seguridad** de la terapia, se administran 30 µg diarios durante 4 días, vía intranasal, a ratas que sobreexpresan AS humana. Las técnicas analíticas, a partir del tejido cerebral, desvelan:

- Disminución significativa de RNAm en SN de la *pars compacta*, área tegmental-ventral y *locus coeruleus* por hibridación *in situ*, en comparación con tejido control no tratado.
- Los niveles de RNAm en las áreas cortical y subcortical permanecen constantes
- No se modifican los niveles de beta-sinucleína ni gamma-sinucleína.
- No se modifica la expresión de DAT, SERT o NET.
- No hay pérdida de neuronas TH+ por administración intranasal.
- Usando experimentos de microdiálisis en ratones vivos -muestreo de neurotransmisores en el espacio extracelular- se observa que el silenciamiento de AS conduce a una mayor transmisión dopa y serotoninérgica en vías del cerebro anterior.

Estos estudios muestran que, a nivel preclínico, esta estrategia terapéutica reduce selectivamente la expresión de AS y mejora la transmisión dopaminérgica en las áreas cerebrales mencionadas, que son las esencialmente afectadas en la EP.

5.2.3 Pequeñas moléculas obtenidas por cribado de alto rendimiento.

5.2.3.1 Aegelina: producto natural de *Aegle marmelos*.²³

Aegle marmelos es un árbol de la familia de las Rutáceas cuyos órganos han sido ampliamente utilizados en fitoterapia para el tratamiento de diarreas y disenterías, inflamación y fiebre en el Sur y Sudeste Asiático.

La aegelina (N-(2-Hidroxi-2-(4-metoxifenil)etil)cinamamida) (**Figura 14**) un alcaloide obtenido de las hojas *A. marmelos*, ha sido identificada como potencial antiapoptótico en células de *Saccharomyces cerevisiae* que llevan integradas en su cromosoma una copia de los genes Bax y AS humanas. (Asma Derf et al.) Bax es un elemento importante en la regulación del ciclo celular, ya que induce la apoptosis. Sin embargo, en muchos procesos la apoptosis está sobreestimulada, lo cual se traduce en síndromes degenerativos.

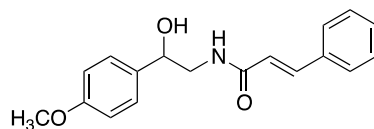


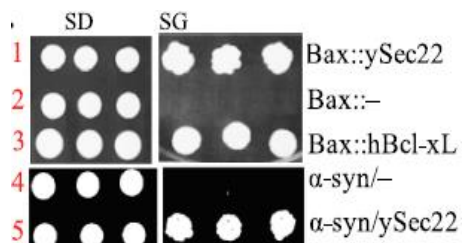
Figura 14.

El inicio de esta línea de investigación se remonta a la identificación de *yeastSec22p*, una proteína SNARE expresada en *S. cerevisiae* con las siguientes características:

- Anula los efectos neurotóxicos de AS y proapoptóticos de Bax, humanas, expresadas mediante técnicas de recombinación genética en las levaduras.
- Las proteínas SNARE son secuencias biológicas altamente conservadas evolutivamente. Por tanto, es de suponer que moléculas homólogas a *yeastSec22* sean activas en humanos.

El estudio se realizó en colonias de *S. cerevisiae* que llevan integradas en su cromosoma una copia de los genes Bax y AS humanas, respectivamente: BC300::Bax y BC::AS. La expresión de estos genes está controlada por el promotor de Galactosa-1 (GAL-1), inducible por galactosa y reprimible por glucosa. Así pues, el medio de cultivo en glucosa constituye el grupo control. Se observó lo siguiente:

- De las colonias BC300::Bax, unas fueron resembradas sin sufrir ninguna modificación genética adicional (BC300::Bax); a otras se les introdujo una copia del gen *ySec22* mediante un plásmido de recombinación y se las denominó Bax::ySec22; otras fueron modificadas con una copia del oncogen humano hBcl-xL (Bax::hBcl-xL), también bajo la regulación del promotor GAL-1. Estas especies fueron resembradas en medios de cultivo agar-glucosa (SD) y agar-galactosa (SG) y se obtuvo como resultado que:
 - Las colonias BC300::Bax no crecen en el medio de galactosa ya que expresan la proteína proapoptótica y sí lo hacen en el medio de glucosa.
 - Las colonias Bax::ySec22 crecen tanto en el medio control de glucosa como en el medio de galactosa. Se concluye que la expresión de *ySec22* anula los efectos apoptóticos derivados de Bax.
 - Las colonias Bax::hBcl-xL crecen en el medio control y en el de galactosa tal y como se esperaba, ya que la proteína hBcl promueve la supervivencia celular.
- Las colonias BC::aAS incluyen dos copias del gen de AS humana cuya expresión se regula mediante el promotor GAL-1. Se procedió de igual manera, con un control de cepas sin transformación adicional y con un linaje al que se le introdujo un plásmido de recombinación que codifica el gen *ySec22* (cepa *alfa-sin::ySec22*)
 - Las BC::AS crecen en el medio agar-glucosa (control) y no lo hacen en el medio agar-galactosa debido a la sobreexpresión fenotípica de AS.
 - La resiembra de las colonias de la cepa *alfa-sin::ySec22* crecen en ambos medios de cultivo.



De estas observaciones se concluye, por tanto, que la proteína *ySec22* anula los efectos proapoptóticos de Bax y tóxicos de AS.

Con ello, se puso en marcha el screening de una quimioteca de 394 productos fitoquímicos con las cepas de levadura BC300::Bax y BC::AS. Ello condujo al hallazgo de las siguientes propiedades prometedoras de la *aegolina*: disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno, disminuyendo por tanto el daño mitocondrial y la fragmentación de material genético; anula los efectos apoptóticos de Bax, recuperando la proliferación celular normal.

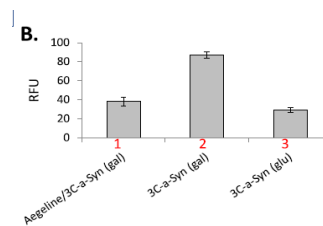
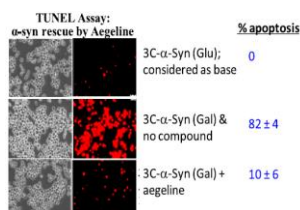


Figura 15. Porcentaje de apoptosis en presencia de 3 copias SNCA **Figura 16.** Porcentaje de ROS producidas en presencia de 3 copias SNCA

A la luz de los resultados, se prosiguió con estudios de *docking* entre la aegelina y las fibras de AS para dilucidar la interacción entre ellas. Se observó el acoplamiento de la aegelina al sitio peptídico compuesto por los restos aminoacídicos mutados en la EP familiar. El anillo aromático de la aegelina se apila con el del imidazol de la His₅₀ y se establece un enlace de hidrógeno entre el enlace amida (HBD) y el resto de Val₄₈ (HBA). Esta interacción sería la responsable de imposibilitar la interacción entre monómeros de AS.

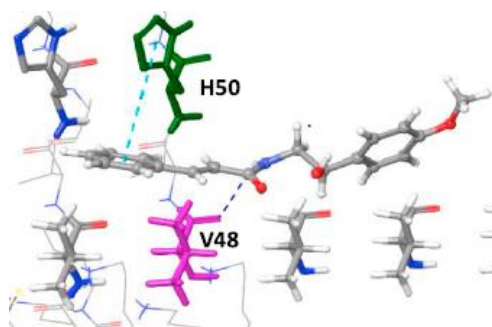


Figura 17. Unión entre aegelina y AS

5.2.3.2 SynuClean-D (SC-D).²⁴

Esta molécula se ha identificado mediante cribado de alto rendimiento. Se trata del [2-hidroxi-5-nitro-6-(3-nitrofenil)-4-(trifluorometil)nicotinonitrilo] (**Figura 18**). Ha demostrado interesantes propiedades antiAS, tanto *in vivo* como *in vitro*: interrumpe la agregación de AS, mejora la motilidad y ofrece protección neuronal frente a la progresión.

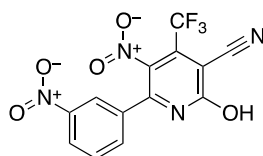


Figura 18. SynuClean-D

Los ensayos *in vitro* se han realizado en líneas neuronales transfectadas con AS amiloidogénica, entre ellas líneas con las mutaciones H50Q y A30P de EP familiar. Para monitorizar el contenido amiloide celular se usó la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y como agente de tinción específico la tioflavina T fluorescente (ThT), cuya fluorescencia se potencia al interaccionar con las fibras amiloides. En presencia de aegelina se observó una reducción de entre el 45% y el 65% de emisión fluorescente, indicando la desagregación de AS. Esta reducción aumenta conforme lo hace la aegelina (**Figura 19**), quedando patente la relación dosis-dependiente de la inhibición de la agregación preexistente.

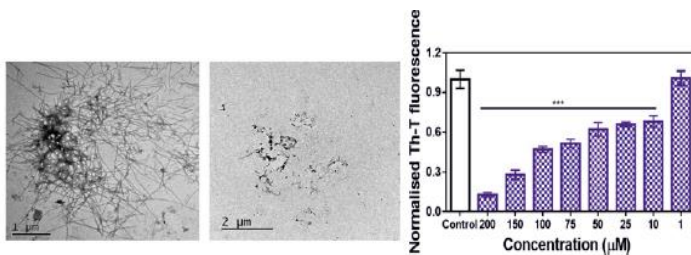


Figura 19. Fluorescencia en presencia de concentraciones decrecientes de aegelina

Figura 20. TEM antes y después de aegelina

Además de disipar los agregados, se ha observado en líneas de neuroblastoma y neuroglioma transfectadas con AS amiloidogénica el poder protector de SC-D frente a la formación *de novo* de los agregados (**Figura 20**).

El modelo animal escogido para los ensayos *in vivo* fue *Caenorhabditis elegans*, un nematodo ampliamente usado como modelo en la investigación de enfermedades neurológicas. Se cultivaron formas larvales en estadio 4 de desarrollo, genéticamente modificadas con una mutación puntual para expresar AS humana fusionada a proteína amarilla fluorescente (como testigo de monitorización). Su forma adulta presenta agregados proteináceos fluorescentes y dificultad e incoordinación motora para su nivel de desarrollo. El consiguiente cultivo de estos nematodos con SC-D resultó en la disminución de agregados, incluso su total desaparición, y en la recuperación de una función motora normal para su estado de desarrollo, en comparación con los nematodos no tratados con SC-D. La función motora se valora en función de la frecuencia de curvatura del cuerpo del nematodo, que se ve disminuida en el modelo de EP.

C. elegans presenta ocho neuronas dopaminérgicas por lo que se estudió el potencial neuroprotector de SC-D. En efecto, la molécula exhibió esta cualidad al ensayarse en cultivos de *C. elegans* con el gen de AS humana. Los nematodos cultivados en presencia de SC-D presentan más de seis neuronas dopaminérgicas libres de agregados. (**Figura 21**)

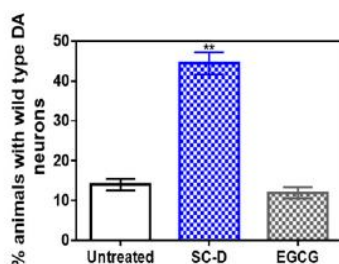


Figura 21. Porcentaje de nematodos con agregados neuronales de AS en población sin tratar, con aegelina y control

SC-D se une y es activa frente a las formas oligoméricas de AS (estequiometría 7:1, proteína:SC-D) por lo que no interfiere con la AS soluble y fisiológica. (**Figura 22**)

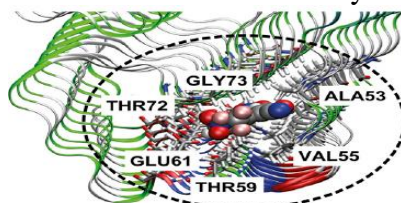


Figura 22. Unión de SynuClean-D a AS

5.2.3.3 NPT 200-11.²⁵

Neuropore Therapies es un laboratorio farmacéutico cuyo trabajo se centra en el descubrimiento de fármacos para enfermedades neurodegenerativas. El diseño de fármacos en esta empresa gira en torno a agregados proteicos mal plegados, como es el caso de la AS.

NPT 200-11 es un péptidomimético cíclico cuyo diseño racional se basa en la región Lys96-Leu102 del dominio carboxi terminal de AS. Estos residuos son críticos ya que inician el proceso de dimerización por unión a los residuos 80-90 del dominio NAC de otro monómero de AS próximo. Los estudios de *docking* (**Figura 23**) y simulaciones de dinámica molecular manifiestan la interposición de la molécula entre monómeros de AS, impidiendo su unión y, por tanto, la formación de depósitos neuronales.

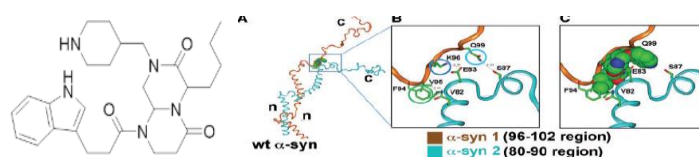


Figura 23. Unión de NPT 200-11 a dos monómeros de AS

Los estudios *in vivo* se llevan a cabo en ratas transgénicas que expresan AS humana ligada al cromóforo fluorescente *Green Fluorescent Protein* (GFP) bajo el promotor Thy-1 murino (línea transgénica 61). Estos ratones desarrollan los síntomas motores y cognitivos y los signos histopatológicos propios de las sinucleinopatías, constituyendo un modelo de EP. Dado que el gen de AS está ligado al de GFP se puede visualizar su expresión en el SNC mediante fluorescencia. Gracias a esto, se realiza un estudio longitudinal no invasivo con técnicas de imagen, midiendo la acumulación de AS marcada en células de la retina de los ratones, como células de monitorización extrapolables a otras regiones del sistema nervioso.

La administración diaria de 5 mg/kg de NPT 200 11 (vía intraperitoneal durante 3 meses) conlleva a un descenso estadísticamente significativo y dependiente del tiempo de exposición de la emisión de fluorescencia, frente al grupo control (**Figura 24**). Estos resultados evidencian la menor acumulación de AS bajo la influencia del peptidomimético.

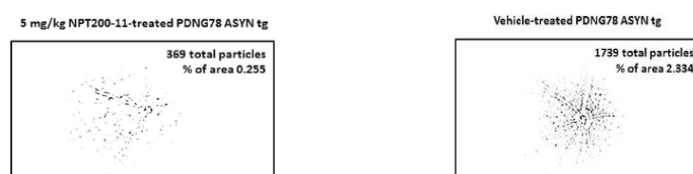


Figura 24. Fluorescencia en presencia de NPT20011 y en grupo control (sólo vehículo)

Se realizaron además pruebas histoquímicas que pusieron de manifiesto la neurodegeneración y neuroinflamación en presencia y ausencia de NPT 200 11 en estos ratones: inmunohistoquímica de *Tirosina Hidroxilasa* (TH), *Proteína Ácida Fibrilar Glial* (PGFA), *DAT* (como biomarcador de la evolución de la enfermedad), entre otros.

La cuantificación de TH en tejido de la SN de la *pars compacta* y estriado denota la integridad de la vía nigroestriatal. Se observa un descenso significativo de TH en la línea transgénica 61 control conforme pasa el tiempo, mientras que en la tratada con NPT 200 11 los niveles de la enzima se mantienen en el estriado.

La inmunohistoquímica de la proteína PGFA sirve para evaluar la astrogliosis en las regiones hipocámpales y del neocórtex. Se observa que NPT 200 11 disminuye significativamente la neuroinflamación a partir de 1 mg/kg.

Las evaluaciones motoras, en comparación con ratas no transgénicas de la misma edad, fueron satisfactorias: la prueba de marcha y equilibrio demuestra una mejora en las capacidades motoras tras el tratamiento.

Los resultados satisfactorios se han trasladado también a la administración oral, obteniéndose buena biodisponibilidad en plasma y en el SNC.

Estos resultados en modelo murino han posibilitado el comienzo de la Fase I de Ensayo Clínico de NPT 200 11 para EP en el año 2016.

5.2.3.4. Irisflorentin.²⁶

El irisflorentin es un isoflavonoide aislado del rizoma de *Belamcanda chinensis*, planta iridácea originaria del continente asiático. La droga, muy valorada en la medicina tradicional china, ha sido empleada para el tratamiento de diversas patologías metabólicas y parasitosis.

Un equipo de investigación de la China Medical University ha evaluado la actividad del irisflorentin frente a la degeneración dopaminérgica y la acumulación de AS en *Caenorhabditis elegans*, como modelo de EP.

Se modifican genéticamente larvas del nematodo para que expresen AS humana conjugada con GFP, para así obtener trazabilidad de su expresión en el sistema nervioso, así como cuantificar sus niveles antes y después del tratamiento con irisflorentin, a través de microscopios de emisión de fluorescencia. Se advierte cómo la intensidad de la fluorescencia disminuye conforme aumenta la dosis de irisflorentin, demostrando sus efectos positivos sobre la acumulación de AS (**Figura 25**).

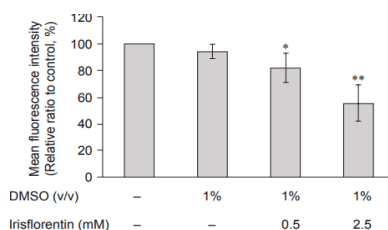


Figura 25. Fluorescencia en concentraciones crecientes de Irisflorentin

Para vislumbrar posibles mecanismos neuroprotectores de la isoflavona se induce en larvas del nematodo la neurodegeneración específica de terminales dopaminérgicas mediante la inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Esta sustancia accede al soma de estas neuronas a través de DAT, desencadenando procesos proapoptóticos.

Se observa que la administración de irisflorentin disminuye la expresión del inductor de apoptosis en el nematodo, *egl-1*. La reversión en la degeneración neuronal se estima gracias al marcador de fluorescencia GFP que se expresan en las terminales dopaminérgicas: la emisión de fluorescencia aumenta conforme lo hace la dosis, revelando la recuperación neuronal.

La recuperación de la transmisión dopaminérgica tiene como consecuencia una mejora en el desarrollo sensorial y motor del nematodo (**Figura 26**). Como se ha visto ya en el punto [6.1.3.1. Aegelina](#), la función motora en el nematodo se valora mediante la frecuencia de curvatura, la cual disminuye en la cepa modelo de EP. Tras la administración de irisflorentin esta frecuencia vuelve al estado previo a la inducción neurotóxica.

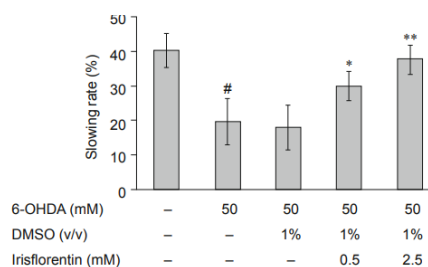
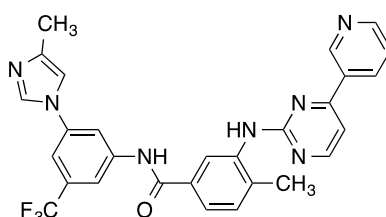


Figura 26. Porcentaje de curvatura en presencia de 6-OHDA y de concentraciones crecientes de Irisflorentin

5.2.4. Fármacos con potencial para reposicionamiento terapéutico

5.2.4.1. Nilotinib.²⁷



El nilotinib es un inhibidor de tirosina-kinasas, registrado como Tasisign por la compañía farmacéutica Novartis y aprobado para su uso en el tratamiento de leucemia mieloide crónica en pacientes con cromosoma Philadelphia. Investigadores del Centro Médico Universitario de Georgetown han llevado a cabo ensayos que han revelado el potencial de esta molécula frente a sinucleinopatías. La idea arranca de las siguientes observaciones:

- En procesos neurodegenerativos se ha detectado mayor fosforilación proteica vía Tirosina-kinasa Abl (TK-Abl)
- TK-Abl está sobreexpresada en neuronas nigroestriatales de pacientes con EP.
- La sobreactivación de TK-Abl está directamente relacionada con una mayor acumulación de AS y una mayor activación apoptótica vía caspasa-3. A su vez, la sobreexpresión de AS conlleva a una mayor activación mediante fosforilación de TK-Abl.
- Ratones *knock-out* para TK-Abl a los que se les administra la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (la cual induce destrucción de neuronas dopaminérgicas en la región nigroestriatal) presentan mayor supervivencia que los controles con TK-Abl.

Los ensayos *in vivo* se realizaron en ratones modificados genéticamente mediante el uso de un vector viral para transferir los genes *tk-Abl*, SNCA (mutación A53T) ó *lacZ* a modo de control. Se obtienen así dos poblaciones de ratones que expresan las proteínas TK-Abl, AS mutada y TK-Abl, galactosidasa, respectivamente. Tras la infección y comprobación de la expresión de las proteínas mediante anticuerpos monoclonales, se procedió a la administración del nilotonib, diariamente y durante periodos de tres o seis semanas, a la mitad de los ratones de cada población. Los restantes fueron tratados como controles con DMSO. Los consiguientes análisis se realizaron en el tejido cerebral extirpado y homogenizado y revelaron que:

- **Nilotinib disminuye los niveles cerebrales de AS.** Los homogeneizados cerebrales de los ratones transgénicos portadores del gen SNCA (mutación A53T) exhibían altísimos niveles de AS humana (885 ng/ml, cuantificado mediante ELISA) en comparación con los ratones portadores del gen *lacZ* (grupo control). La administración diaria de nilotinib (10 mg/kg) derivó en una disminución estadísticamente significativa de estos niveles en el grupo

portador de AS humana. El grupo control, al que se le administró diariamente la dosis equivalente de DMSO, presentó niveles más altos que los de partida.

- **Nilotinib disminuye la activación apoptótica vía caspasa-3.** Siguiendo el mismo protocolo, la administración del nilotinib revertía un 200% la activación de caspasa-3, en comparación con el grupo no tratado.
- **Nilotinib interfiere en los mecanismos de autofagia.** Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, la acumulación de AS altera los procesos de reciclado celular. Al ser una alteración crítica en el devenir celular, se evaluaron varios marcadores de autofagia bajo la influencia del nilotinib.
 - Light Chain-3 (LC3) es una proteína citosólica que durante el proceso de autofagia se conjuga con fosfatidietanolamina presente en la membrana del autofagosoma. Esta forma conjugada se denomina LC3-II y, una vez se fusiona el autofagosoma con el lisosoma, es hidrolizada junto con el resto de los componentes celulares capturados. En tanto que el proceso de autofagia funcione los niveles de LC3-II deben disminuir proporcionalmente. En efecto, tras el tratamiento con nilotinib se observó un descenso progresivo de LC3-II.
 - Beclin-1 es una proteína que promueve la autofagia fisiológica. Los niveles de ésta aumentan con la administración de nilotinib.

Imágenes por tomografía computarizada (**Figura 27**) revelan el acúmulo de agregados citosólicos en el modelo murino de EP. En el grupo tratado con nilotinib estos agregados se reducen drásticamente, sugiriendo que parte de ellos fueran autofagosomas acumulados que recuperan su actividad normal. Esta observación permite aseverar que el nilotinib restablece el proceso fisiológico de la autofagia en el modelo murino de EP.

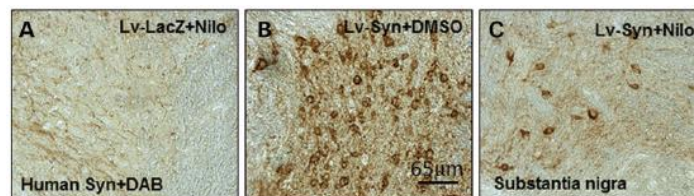


Figura 27. Evaluación de presencia de agregados en A)control LacZ, B)control sin tratar, C)grupo A53T tratado con Nilotinib

- **Nilotinib es neuroprotector y revierte la pérdida de dopamina.** Imágenes mediante inmunohistoquímica ((IHC) permiten determinar la presencia y nivel específico de AS en tejido nervioso del modelo murino. El tratamiento con nilotinib supuso un descenso del 84% de AS en la región nigroestriada de los ratones transgénicos (A53T). Además, atenúa la pérdida de terminales dopaminérgicas en un 64%. Se evaluaron los niveles de dopamina y de ácido homovalínico (metabolito del neurotransmisor) de los extractos cerebrales, mediante ELISA. La administración de nilotinib supuso una recuperación espectacular de dopamina y ácido homovanílico, revelando la recuperación en la formación y metabolismo del neurotransmisor.
- **Nilotinib recupera la función motora a niveles de ratones control.** La administración de la molécula a los ratones con A53T resultó en la casi completa recuperación de las funciones motoras (un 84% de las exhibidas por los ratones control *lacZ*).

Los prometedores resultados de experimentación animal han dado paso a un ensayo clínico que ha arrojado, hasta el momento, efectos positivos en los pacientes: disminución de las formas

oligoméricas de AS y mayor concentración de dopamina en las áreas cerebrales afectadas en la EP.

6. Conclusiones.

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa que cursa con síntomas motores que incapacitan en menor o mayor medida a los pacientes. Su origen no ha sido aún esclarecido, pero la formación de agregados de alfa-sinucleína juega un importante papel neurotóxico. Estas inclusiones desencadenan un estado de neuroinflamación que retroalimenta positivamente la generación de más agregados, por lo que el proceso progresa indefectiblemente. Por tanto, el desarrollo de terapias que ofrezcan protección neuronal y que reviertan el daño ocasionado constituye un importante avance en pos de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Los resultados de estas novedosas terapias en modelos *in vivo* son, en su mayoría, muy prometedoras. Revelan una alternativa terapéutica importante en la prevención y recuperación de funciones motoras en la EP y otras sinucleinopatías.

7. Bibliografía.

- 1- Ehringer H, Hornykiewicz O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr.* 1960; 38:1236-1239.
- 2- Opara J, Malecki A. Motor assessment in Parkinson's Disease. *Ann Agric Environ Med.* 2017; 24(3):4111-4115.
- 3- Guardia-Laguarta C, et al. α -Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *J Neurosci.* 2014; 34(1):249-259.
- 4- Elcoroaristizabal X, et al. Papel de la genética en la etiología de las sinucleinopatías. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2011; 46(1):3-11.
- 5- Burre J, et al. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*. *Science.* 2010; 29(5999):1663-1667.
- 6- U.S. National Library of Medicine. Genetics Home Reference: SNCA gene [Internet]. [Consultado 15 Mar 2019]. Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SNCA>
- 7- Lucking CB, Durr A, Bonifati V, et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parquin gene. *N Engl J Med.* 2000; 342:1560-1567.
- 8- Kruger R, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding Alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 1998; 18(2):106-108.
- 9- Zarranz JJ, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* 2004; 55(2):164-173.
- 10- Han W, et al. Alpha-synuclein (SNCA) polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2015; 168B(2):123-134.
- 11- Romo-Gutierrez D, et al. Factores genéticos de la demencia en la enfermedad de Parkinson. *Gac Med Mex.* 2015; 151:110-118.
- 12- Mak SK, et al. Lysosomal degradation of alpha-synuclein *in vivo*. *J Biol Chem.* 2010; 285(18):13621-13629.
- 13- Xiang W, et al. Oxidative stress-induced posttranslational modifications of alpha synuclein: specific modification of alpha-synuclein by 4-hydroxy-2-nonenal increases dopaminergic toxicity. *Mol Cell Neurosci.* 2013; 54:71-83
- 14- Gomez-Chavarin M, et al. Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurocién.* 2012; 17(1)25-33.
- 15- Perez R.G, Hastings T.G. Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J Neurochem.* 2004; 89:1318-1324.
- 16- Tehranian R, et al. Alpha-synuclein inhibits aromatic amino acid decarboxylase activity in dopaminergic cells. *J Neurochem.* 2006; 99(4):1033-1320.
- 17- Zhou RM, et al. Molecular interaction of alpha-synuclein with tubulin influences on polymerization of microtubule *in vitro* and structure of microtubule in cells. *Mol Biol Rep.* 2010; 37(7):3183-3192.
- 18- Konno M, Hasegawa T, et al. Suppression of dynamin GTPase decreases alpha-synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. *Mol Neurodegener.* 2012; 7:38.
- 19- Nemani VM, et al. Increased expression of alpha synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic reclustering after endocytosis. *Neuron.* 2010; 65(1):66-79.
- 20- Mandle M, et al. Next-generation active immunization approach for synucleinopathies - implications for Parkinson's Disease clinical trials. *Acta Neuropathol.* 2014; 127(6):861-879.

- 21- Krishnan R, et al. A bacteriophage capsid protein provides a general amyloid interaction motif (GAIM) that binds and remodels misfolded protein assemblies. *J Mol Biol.* 2014; 426(13):2500-2519.
- 22- Alarcón-Arís D, et al. Selective α -Synuclein Knockdown in Monoamine Neurons by Intranasal Oligonucleotide Delivery: Potential Therapy for Parkinson's Disease. *Molecular Therapy.* 2018; 26(2):550-567
- 23- Derf A, et al. Aegeline, a natural product from plant *Aegle marmelos*, mimics the yeast SNARE protein Sec22p in suppressing α -synuclein and Bax toxicity in yeast. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019; 29(3):454-460.
- 24- Pujols J, et al. Small molecule inhibits α -synuclein aggregation, disrupts amyloid fibrils, and prevents degeneration of dopaminergic neurons. *PNAS.* 2018; 115(41):10481-10486.
- 25- Price DL, et al. The small molecule α -synuclein misfolding inhibitor, NPT200-11, produces multiple benefits in an animal model of Parkinson's disease. *Sci Rep.* 2018; 8:161-165.
- 26- Chen YM, et al. Irisfloreantin improves α -synuclein accumulation and attenuates 6-OHDA-induced dopaminergic neuron degeneration, implication for Parkinson's disease therapy. *BioMed.* 2015; 5(4):24-32.
- 27- Hebron ML, et al. Nilotinib reverses loss of dopamine neurons and improves motor behavior via autophagic degradation of α -synuclein in Parkinson's disease models. *Hum Mol Gen.* 2013; 22(16):3315-3328.