

**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**TRABAJO DE FIN DE GRADO:
ALFA-SINUCLÉINA COMO DIANA EN EL DISEÑO DE
FÁRMACOS**

Autor: ANA DEL POZO MÍNGUEZ

Tutor: JOSÉ CARLOS MENÉNDEZ RAMOS

Convocatoria: Julio 2019

ÍNDICE:

1. Resumen.....	Página 3
2. Abstract.....	Página 3
3. Introducción.....	Página 3
4. Objetivos.....	Página 6
5. Material y métodos.....	Página 6
6 .Resultados y Discusión.....	Página 6
6.1. Alfa-sinucleína. Características y funciones.....	Página 7
6.2. Agregación de alfa-sinucleína.....	Página 8
6.3. Características de la alteración de la membrana lipídica.....	Página 10
6.4. Propagación según la hipótesis priónica.....	Página 10
6.5. Alfa-sinucleína como diana terapéutica.....	Página 13
6.5.1. Inhibe la interacción con la membrana lipídica.....	Página 13
6.5.2. FABP3, fatty acid binding protein.....	Página 14
6.5.3. Inhibidor de la glucosilceramida sintasa.....	Página 15
6.5.4. Aumento de la degradación de alfa-sinucleína.....	Página 16
6.5.4.1. Isorhynchophyllina.....	Página 17
6.5.4.2 Paeoniflorin.....	Página 18
7. Conclusión.....	Página 19
8. Bibliografía.....	Página 20

1. Resumen.

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo, caracterizado por el declive de las neuronas dopaminérgicas de la *Sustancia Nigra pars Compacta* (SNpC) y de la presencia de cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas. Estos cuerpos de Lewy están compuestos principalmente por agregados de alfa-sinucleína.

La proteína alfa-sinucleína se encuentra en forma de monómero soluble. Sin embargo, debido a múltiples factores (ambientales, genéticos) se producen cambios conformacionales, que desembocan en la formación de oligómeros de alfa-sinucleína, los cuales son insolubles y producen la alteración de la funcionalidad de las células neuronales.

En el siguiente trabajo se realiza una revisión bibliográfica de algunas moléculas representativas que han surgido en los últimos años y que tienen como diana la proteína alfa-sinucleína o alguna de sus conformaciones transitorias. De este modo, ralentizan o inhiben la agregación de alfa-sinucleína y tienen un gran potencial terapéutico para el tratamiento del Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas.

2. Abstract.

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder that is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the *Sustantia Nigra pars compacta* (SNpc) and widespread aggregation of the alpha-synuclein protein in the form of Lewy bodies and Lewy neurites.

Alpha-synuclein is usually found as a soluble monomer. However, environmental and genetic factors, among others, can turn this protein into insoluble oligomers, triggering its toxicity. These new structures will perturb biological membranes and disrupt cellular function.

In this work, a literature review of compounds targeted against alpha-synuclein or any structure involved in the process of alpha-synuclein aggregation has been carried out. The ultimate aim of developing these compounds is to generate new therapeutic strategies for the treatment of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases associated to protein misfolding.

3. Introducción.

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan al Sistema Nervioso Central (SNC) y se caracterizan por una pérdida neuronal progresiva en áreas concretas cerebrales. Entre las más de 100 entidades descritas como enfermedades neurodegenerativas, las más frecuentes son Enfermedad de Alzheimer (EA), Enfermedad de Parkinson (EP), Esclerosis Múltiple (EM) y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).[1] Todas ellas tienen ciertas características

en común: origen multifactorial, causa desconocida, ausencia de un test diagnóstico, inespecificidad de los síntomas iniciales con múltiples formas de presentación, impacto emocional del diagnóstico para el paciente y su familia, pérdida de autonomía y afectación de la calidad de vida.[2]

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente. Su incidencia aumenta rápidamente con la edad, afectando al 1% de la población mayor de 60 años y al 4% de los mayores de 80 años. La mayoría de los estudios demuestran una discreta preponderancia en hombres o ninguna diferencia en la prevalencia entre sexos.[3]

Además, se incluye dentro del grupo de sinucleinopatías, por la formación de cuerpos de Lewy (LB). Está caracterizada por la pérdida selectiva de células neuronales dopaminérgicas localizadas en la *Sustancia Nigra pars compacta* (SNpc) y la presencia de inclusiones protéicas de cuerpos de Lewy en las neuronas y neuritas afectadas. El componente principal de los cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy es la proteína alfa-sinucleína. Recientes estudios sugieren que el plegamiento incorrecto de esta proteína produce su agregación y expansión a ciertas zonas, induciendo inflamación y la disfunción patogénica de la enfermedad del Parkinson.[4]

La enfermedad de Parkinson inicialmente se manifiesta con alteraciones motoras (temblor, bradicinesia/acinesia, rigidez, inestabilidad postural, alteraciones de la marcha) asociadas al mal funcionamiento del sistema dopaminérgico, pero a medida que avanza, afecta a otros sistemas de neurotransmisores y sus síntomas van mucho más allá de las alteraciones motoras, alterando las capacidades cognitivas del individuo.[5]

Las terapias farmacológicas actuales son capaces de disminuir la sintomatología de la enfermedad durante los primeros años tras su aparición, pero se muestran ineficaces en detener su avance o en prevenir su aparición. La complejidad se encuentra en la diversidad de agentes implicados, a la participación de ellos en numerosos procesos neuronales no relacionados con la patología (y que no deberían modificarse con el tratamiento) y la complejidad de cada uno de los neurotransmisores involucrados con multitud de receptores con propiedades distintas.[5]

Los principales tratamientos farmacológicos se dividen en las familias siguientes:

A) Fármacos dopaminérgicos:

- Levodopa o L-dopa es un precursor de la dopamina, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y es transformado en dopamina por la acción de la dopa descarboxilasa. Es el fármaco más eficaz en el tratamiento de la EP. Sin embargo la eficacia de la levodopa declina con el tiempo y deja de ser útil en un porcentaje elevado de pacientes aproximadamente a los 10 años. Su administración prolongada provoca la aparición de otras alteraciones motoras (fluctuaciones motoras y discinesias) que pueden llegar a ser tan incapacitantes como la propia enfermedad. Por ello, los especialistas retrasan al máximo el inicio de su administración y mantienen la dosis en los niveles más bajos posibles, extendiendo así su eficacia en el tiempo.[5]

- Agonistas dopaminérgicos: son fármacos que actúan directamente sobre los receptores de dopamina, provocando su activación. Sus principales ventajas son: a) pueden actuar exclusivamente sobre un tipo de receptores de dopamina, es decir, tienen una función mucho más selectiva; b) su velocidad de degradación es menor, por lo que mantiene la concentración estable durante períodos de tiempo más prolongados; c) se pueden aplicar en forma de parches transdérmicos; d) la propia molécula administrada tiene acción farmacológica, sin que sea necesaria su conversión en el organismo. Estas moléculas se han mostrado eficaces en el tratamiento de la EP inicial y moderada. Entre ellos se encuentran: pramiprexol, ropinirol, rotigotina, apomorfina.[5]
 - Inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT): la dopamina es transformada por la COMT a 3-O-metildopa, metabolito sin una función determinada pero que provoca una disminución en la disponibilidad de dopamina. Además su acción se produce antes que la levodopa haya atravesado la barrera hematoencefálica, abortando los posibles efectos terapéuticos antes incluso de que hayan alcanzado su lugar de acción. La tolcapona y entacapona son dos moléculas que aumentan el tiempo que la levodopa está a disposición de las neuronas que van a transformarla en dopamina. Su administración estaría indicada en estadios iniciales de EP, para retrasar la aparición de trastornos motores asociados.[5]
 - Inhibidores de la MAO: es una enzima que cataliza las distintas aminas, como la serotonina (de ahí su eficacia en el tratamiento de la depresión) y catecolaminas como la dopamina o la noradrenalina. Se usan los inhibidores de la MAO B, por ejemplo la rasagilina, que actúa sobre la dopamina pero no sobre la serotonina ni noradrenalina. El objetivo de su uso es la inhibir la degradación de dopamina en el cerebro y así aumentar su disponibilidad. Además tiene un efecto neuroprotector al reducir el estrés oxidativo asociado a la formación de exceso de radicales libres, capaces de producir mecanismos patogénicos en la enfermedad, durante la actuación de la MAO.[5]
- B) Fármacos anticolinérgicos: el tratamiento con antagonistas colinérgicos se ha mostrado efectivo para combatir el temblor sin la presencia de discinesias asociadas a los tratamientos dopaminérgicos. Sin embargo, dado que se trata un sistema de modulación global de la actividad cerebral, el tratamiento con estos agentes farmacológicos promueve una gran variedad de efectos secundarios: confusión, alucinaciones, alteraciones de la memoria, somnolencia, agitación, visión borrosa, etc. Se ha descrito que la interrupción brusca del tratamiento puede acelerar el desarrollo de la enfermedad. Por todo ello se desaconseja su utilización, excepto en el caso de temblores resistentes a otras alternativas terapéuticas.[5]
- C) Amantadina: es otro fármaco clásico en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Presenta diversas acciones farmacológicas: aumenta la liberación de dopamina, bloquea la actividad mediada por los receptores NMDA (subtipo de receptores glutamatérgicos implicados en procesos de toxicidad) lo que le conferiría propiedades neuroprotectoras y presenta también una acción anticolinérgica. Sus efectos terapéuticos más evidentes se

dan en los estados iniciales de la enfermedad, con una reducción del temblor sin aparición de discinesias.[5]

4. Objetivos.

Sin embargo, estos tratamientos farmacológicos únicamente actúan a nivel sintomático, por lo cual continúa la búsqueda de diferentes dianas para desarrollar nuevos fármacos. Este trabajo se centra en la proteína alfa-sinucleína y las diferentes terapias que han ido surgiendo en los últimos años.[6]

La dificultad de la proteína alfa-sinucleína como diana terapéutica es la diversidad de conformaciones en las que se encuentra presente. Por ello, el presente trabajo muestra una revisión bibliográfica sobre los principales compuestos que actúan directamente o indirectamente sobre la proteína alfa-sinucleína, influyendo así en su proceso de agregación.

5. Material y metodología.

Se han utilizado diferentes bases de datos científicas como Pubmed, National Center for Biotechnology (NCBI), Science Direct, UpToDate y Botplus.

Las palabras clave utilizadas en la búsqueda han sido "Alpha-synuclein", "Parkinson's Disease", "Alpha-synuclein aggregation", "Protein aggregation", "Neurodegenerative diseases", "Treatments for Parkinson's Disease".

6. Resultados y discusión.

6.1 Alfa-sinucleína. Características y funciones.

Los cuerpos de Lewy son agregados intraneuronales anormales de proteínas. Estos aparecen como masas esféricas que desplazan al resto de componentes celulares. Se han descrito dos variedades: la forma clásica, que es una inclusión eosinofílica con un centro denso del que irradian fibrillas y cuyo componente principal es la alfa-sinucleína (además en los cuerpos de Lewy se identifican otras proteínas como ubiquitina, parkina y neurofilamentos), y la forma cortical.[7]

Alfa-sinucleína está formada por 140 amino ácidos y es altamente soluble en el citoplasma neuronal. Predomina en la terminal presináptica del sistema nervioso central donde se la asocia con las vesículas presinápticas. Sin embargo, la función exacta de alfa-sinucleína en su estado normal no se conoce del todo. Ciertos estudios sugieren su papel principal en la plasticidad sináptica, en la regulación de la neurotransmisión de dopamina.[6] Otros estudios sugieren que alfa-sinucleína puede interactuar con ciertos componentes del complejo SNARE y promueve la dilatación del poro exocítico para la protección de las terminaciones nerviosas frente a daños.[8]

Debido a la agregación, estas funciones se pierden y aumenta la actividad patológica. Además el aumento de la toxicidad depende también de otros factores:

- Agregados formados de proteínas mal plegadas, median la permeabilización del plasma a través de membranas o compartimentos membranosos.
- Alteración de la membrana por la dinámica de la proteína y su distribución.
- La formación de nuevas moléculas patogénicas.
- La captura de muchas moléculas como chaperonas y otras proteínas dentro del agregado.
- La capacidad de los agregados de alfa-sinucleína mal plegada a reclutar la forma soluble de la proteína y así amplificarse.

Alfa-sinucleína forma parte de una familia de tres proteínas sinápticas: alfa-sinucleína, beta-sinucleína y gamma-sinucleína. Estas dos últimas tienen más secuencia homóloga y alfa-sinucleína difiere en más aspectos, esto puede explicarse por qué la alfa-sinucleína es el único miembro de la familia capaz de formar estructuras fibrilares *in vitro*. [6]

La alfa-sinucleína tiene tres regiones diferenciadas. El extremo amino terminal, que está cargado positivamente, el segmento hidrófobo central, entre los residuos 61 a 90

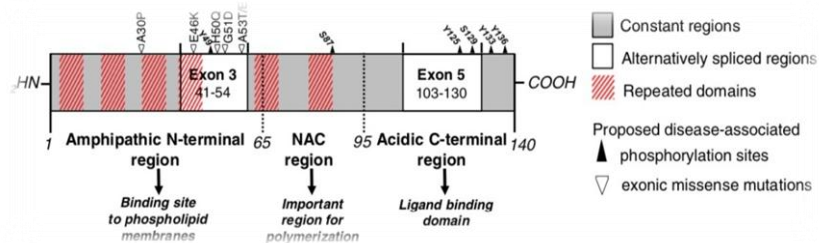


Figura 1. Estructura de alfa-sinucleína. [6]

(conocido como el componente no-amiloideo o NAC), y el extremo carboxilo que está cargado negativamente.

La alfa-sinucleína presenta cuatro residuos de tirosina, uno (Y39) cerca del extremo amino y tres (Y125, Y133 e Y136) cerca del extremo carboxilo. Estos residuos de tirosina tienen un importante papel en el plegamiento de proteína.

La alfa-sinucleína fisiológica no se encuentra en forma monomérica sino oligomérica, formando tetrámeros, y en ellos cada cadena adopta una conformación helicoidal. Estos tetrámeros se forman por uniones ditirosínicas entre las cadenas, y con esta disposición espacial se encuentra la proteína en las neuronas, principalmente en los terminales presinápticos aunque también en el líquido cefalorraquídeo, en el espacio extracelular neuronal y sangre. [7]

6.2 Agregación de alfa-sinucleína.

En algunos casos de enfermedad de Parkinson, tres mutaciones de la proteína (A30P, E46K, A53T) así como las multiplicaciones del gen SNCA que codifica la alfa-sinucleína se relacionan con mayor formación de protofibrillas y con la enfermedad del parkinson

familiar autosómica dominante, debido al aumento del porcentaje de agregación de la alfa-sinucleína en los cuerpos de Lewy.[7] Esta agregación puede ser:

-En la agregación covalente se forman uniones cruzadas, principalmente entre los residuos de tirosina (Y) de las moléculas. El estrés oxidativo juega un papel fundamental en la formación covalente de enlaces cruzados, así como metales como el hierro que aceleran la formación de fibrillas amiloides.

El estrés oxidativo de tipo peroxidativo (por exceso de peróxido de hidrógeno) ocurre en el interior de la mitocondria neuronal, en la cadena de citocromo, y se debe a exceso de formación de ión superóxido, que se convierte en H_2O_2 por medio de la superóxido dismutasa (SOD). Los cambios conformacionales dependen de las tirosinas de la molécula. La Y39 es esencial para la formación de fibrillas, pero no se requiere para la posterior formación de agregado covalente. En este caso parece que la agregación final en forma de cuerpo de Lewy depende más de los residuos cerca del extremo carboxilo (Y125, Y133, Y139). Además se sospecha que el H_2O_2 , puede escapar hacia el citosol neuronal gracias a poros creados por la acción de los agregados de alfa-sinucleína, agravando el proceso oxidativo.[7]

Otro tipo de estrés oxidativo es el nitrosativo. La nitrosilación de proteínas en residuos de tirosina, dando lugar a proteínas 3-nitrosotirosinadas, es una modificación oxidativa de proteínas secundaria al exceso de actividad de óxido nítrico. Hay una mayor nitrosilación de residuos de tirosina en posiciones 125 y 136 (Y125/136) respecto a los niveles de residuos nitrados en tirosina en posición 39 (Y39) en enfermos de Parkinson en una etapa temprana. Además los residuos de alfa-sinucleína pueden nitrarse de modo diferencial dando lugar a diversos efectos. Por ejemplo, la nitrosilación localizada en Y39 ocasiona una unión reducida de alfa-sinucleína a vesículas y un descenso en la tasa de degradación de la proteína. Sin embargo, la nitrosilación excesiva de residuos de tirosina 125/136 aumenta la agregación de la alfa-sinucleína, de modo que nos sugiere que el cambio nitrosativo detectado en el suero de los enfermos podría jugar un papel patogénico en la agregación parkinsoniana.[7]

-En la agregación no covalente se observan fibrillas de alfa-sinucleína. Estas fibrillas son insolubles y presentan una estructura beta-helicoidal. Estudios *in vitro* indican que diversos factores, como la concentración de proteína y un pH más ácido, favorecen la formación de las fibrillas y que el proceso se basa en la nucleación, incluso alrededor de una sola molécula de alfa-sinucleína. El segmento hidrofóbico de la molécula es fundamental para la formación de agregados. Además, la dopamina y sus metabolitos favorecen la agregación de alfa-sinucleína, por lo que explica la especial vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad del Parkinson. Otro factor proagregante importante es la concentración citosólica de la alfa-sinucleína, pues un aumento de la proteína favorece la agregación. También se ha visto que el exceso de alfa-sinucleína altera la normal funcionalidad mitocondrial, afectando a los complejos mitocondriales I y IV. De hecho, se detecta alfa-sinucleína en las mitocondrias, cuyas membranas son muy ricas en cardiolipinas capaces de fijar alfa-sinucleína. La

alteración mitocondrial genera un “círculo vicioso” pues origina la excesiva formación de especies reactivas de oxígeno, cuyo efecto oxidativo favorecería la agregación covalente de alfa-sinucleína y a la vez un mayor daño mitocondrial.[7]

La agregación también se puede relacionar con un defecto de la degradación de alfa-sinucleína, es decir, un defecto de la autofagia mediada por chaperonas.

La agregación *per se* ejerce un efecto de desestabilización neuronal, cuya repercusión en el daño y muerte neuronal no se conoce del todo. Estos agregados proteícos de alfa-sinucleína alteran el citoesqueleto neuronal, disminuyendo la polimerización de la tubulina. Además el segmento NAC de la molécula interacciona directamente con la tubulina, alterando su capacidad polimerizante. También generan una excesiva fosforilación de la proteína tau del citoesqueleto. Este hecho se exagera si además existen defectos de la enzima LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2), lo que da lugar a mayor desestabilización de la red microtubular, formación de neuritas tipo Lewy y retracción neurítica. La enzima LRRK2 participa en la remodelación del citoesqueleto, a través de un dominio GTPasa, y es codificada por el gen PARK8, cuyas variantes se asocian a un mayor riesgo de sufrir la enfermedad del Parkinson.[9]

Otras modificaciones estructurales de la alfa-sinucleína que pueden facilitar su agregación son la fosforilación. La proteína en los cuerpos de Lewy se encuentra fosforilada en el residuo de serina 129 y ello facilita la agregación proteíca. Aunque la alfa-sinucleína circulante suele estar normalmente fosforilada, si este hecho ocurre en el residuo de serina-129 se facilita su agregación.

6.3 Características de la alteración de la membrana lipídica.

El principal agente patogénico en la enfermedad del Parkinson es la formación de oligómeros a partir de la agregación de alfa-sinucleína y su interacción perturbadora con las membranas biológicas. El grupo de investigación integrado por Giuliana Fusco *et al.* han estudiado dos tipos diferentes de oligómero estable de alfa-sinucleína, denominados tipo A (no tóxico) y B (tóxico). Las dos formas oligoméricas de alfa-sinucleína tienen un tamaño y morfología similares, pero la capacidad para interrumpir en la bicapa lipídica son muy diferentes. Cuando son incubados *in vitro* con pequeñas vesículas monocapa formadas por lípidos, el oligómero tipo A induce una liberación mínima de calcio encapsulado en vesículas, en comparación con la liberación inducida por los oligómeros tipo B, la cual es 10 veces mayor. Esto indica que la alteración de los ácidos grasos de la bicapa lipídica es mayor y produce una pérdida mayor de la integridad de la membrana en presencia de oligómero tipo B .[10]

Además, estos autores vieron que los oligómeros de alfa-sinucleína tipo B generan toxicidad celular, de modo que producen un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y reducen la actividad mitocondrial fisiológica en las células neuronales.[10]

Por último, estudiaron las propiedades estructurales de ambos tipos de oligómeros de alfa-sinucleína, con los siguientes resultados:

Tipo A	Tipo B
<ul style="list-style-type: none"> -Estructura secundaria no definida en regiones rígidas. -Gran número de residuos móviles (45). -Región Carboxilo terminal flexible (43). -Región N-terminal no móvil. -Conformación no estructurada. -Gran cantidad de saturaciones en N-terminal de los residuos de proteína (fuertes asociaciones de esta región con el núcleo de los oligómeros). 	<ul style="list-style-type: none"> -Lámina beta en regiones rígidas. -Gran número de residuos móviles (67). -Región Carboxilo terminal flexible (40). -Región Amino-terminal altamente dinámica y más accesible. -No hay saturaciones en los residuos amino y carboxilo terminal, aporta un comportamiento lipofílico que permite establecer enlaces en la membrana lipídica.

Figura 2. Tabla comparativa de los dos tipos de oligómeros de alfa-sinucleína.[10]

En la caracterización del nivel de penetración en la membrana de los dos tipos de oligómeros de alfa-sinucleína se demostró, que en ambos casos había fuertes interacciones con la superficie de la membrana. Sin embargo, únicamente el oligómero tipo B de alfa-sinucleína es capaz de insertarse en el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica. De modo que la región amino terminal de los oligómeros tóxicos está implicada en promover las fuertes interacciones con la membrana.[5] Por tanto, se ha demostrado que elementos estructurales específicos de la alfa-sinucleína producen la toxicidad celular a través de la alteración de la membrana. En neuronas y astrocitos esto conlleva a un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que conduce a una pérdida de viabilidad celular.[10]

En resumen, los elementos estructurales identificados son: una región lipofílica que promueve fuertes interacciones de la proteína con la superficie de la membrana y una estructura lámina-beta capaz de insertarse en la bicapa lipídica y alterar la integridad de la membrana.[10]

6.4 Propagación según la hipótesis priónica.

Las inclusiones intracelulares de proteínas son marcadores de numerosas enfermedades neurodegenerativas en el ser humano. Los constituyentes protéicos de estos depósitos y las regiones afectadas del cerebro difieren de una enfermedad neurodegenerativa a otra. Hasta hace poco, el círculo vicioso consistía en expandirse, esparcir los agregados y la acumulación de agregados de proteínas mal plegadas a lo largo del tiempo en el Sistema Nervioso Central. Esta teoría se pensaba que estaba restringida únicamente a la proteína priónica (PrP).[11]

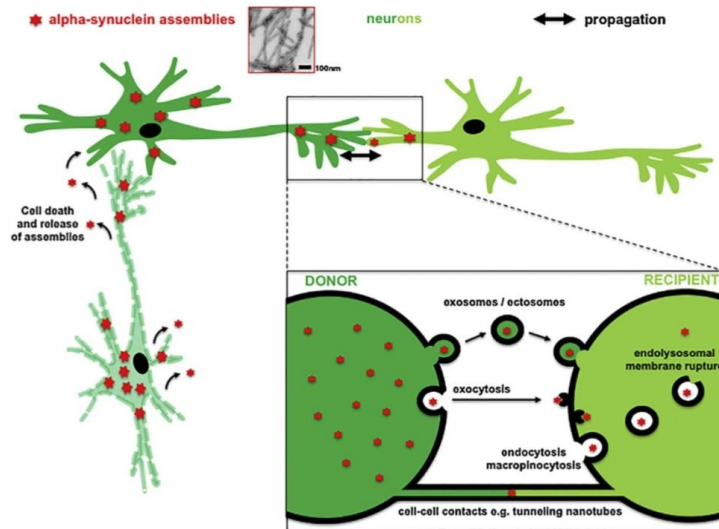


Figura 3. Hipótesis priónica para la expansión de alfa-sinucleína.

Sin embargo, estudios recientes sugieren que otras asociaciones de proteínas se expanden y amplifican en el Sistema Nervioso Central produciendo diferentes enfermedades siguiendo ese modelo. Heiko Braak y sus colaboradores [12] basados en casos de autopsias notaron la

asociación entre patología y el inicio de agregados de

proteínas en zonas concretas del cerebro para cada enfermedad y un progreso predecible topográficamente seguido por las conexiones anatómicas. Estas observaciones permitieron establecer una escala de la progresión de la enfermedad y la hipótesis que los patógenos neurotrópicos se expanden a través de caminos definidos interconectando las regiones del Sistema Nervioso Central. Una prueba adicional a favor de este tipo de transmisión fue la observación de los Cuerpos de Lewy característicos de la Enfermedad del Parkinson, que inducen la aparición de lesiones de las sinucleinopatías en el Sistema Nervioso Central. Estas lesiones, inicialmente se encontraban en la zona de la inyección, a medida que pasaba el tiempo se propagaba a regiones vecinas o axones conectados, sugiriendo directamente que la expansión y amplificación es a través del transporte neuronal.

Uno de los pocos estudios realizado *in vivo* por el equipo de Elodie Angot se ha basado en la hipótesis priónica y ha demostrado el transporte de alfa-sinucleína humana en un modelo animal, teniendo analogía con el mecanismo sugerido para la enfermedad de Parkinson.[13]

Según la hipótesis priónica, alfa-sinucleína se transfiere de una célula donadora hasta una neurona receptora, promoviendo la agregación de alfa-sinucleína endógena procedente de la célula receptora, suponiendo un traspaso de alfa-sinucleína. [13]

Elodie Angot et al. han utilizado un vector viral AAV2/6 capaz de insertar alfa-sinucleína humana y expresarlo en la Sustancia Nigra pars compacta usando como modelo animal ratas. Estas fueron sometidas a la inyección de AAV2/6-hu alfa-sinucleína en la SNpc y pasadas 3 o 6 semanas, se les realizó un injerto embrional de mesencéfalo ventral de rata en el cuerpo estriado. [13]

Pasadas 3 semanas desde la inyección AAV2/6 con alfa-sinucleína humana, las ratas presentaban estados presintomáticos con un desarrollo motor normal y pérdida limitada de neuronas de SNpc. En la sexta semana las ratas mostraban una degeneración del 50% de las neuronas de la SNpc y sintomatología característica. Finalmente, las ratas que llegaron a la semana 8 (unicamente aquellas que se le había

realizado el injerto) presentaban déficits motores y una pérdida de neuronas dopaminérgicas del 70%. [13]

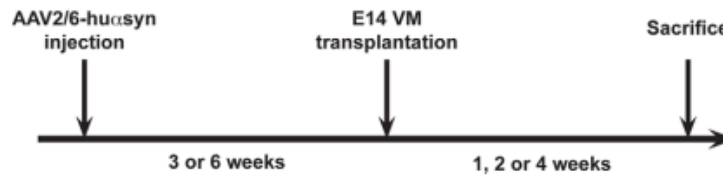


Figura 4. Desarrollo del estudio de la propagación de alfa-sinucleína.

Después las ratas fueron sacrificadas y se realizó un exhaustivo estudio inmunohistoquímico y escaneo para visualizar la presencia de alfa-sinucleína humana en la región neuronal trasplantada. A través de inmunoreactividad se visualizó las diferentes zonas y así se determinó la presencia o no de alfa-sinucleína humana y TH. De esta manera se demuestra el traspaso de alfa-sinucleína humana desde los cuerpos celulares de la Sustancia Nigra hasta las terminaciones axónicas en el cuerpo estriado. [13]

El estudio se compuso de 26 ratas a las que se les sometió a inmunoreactividad para alfa-sinucleína humana y la inmunoreactividad TH positivo en las neuronas trasplantadas. Usando epifluorescencia microscópica, se observaron cientos de neuronas injertadas TH inmunorreactivas, en las que aparecía un pequeña señal para alfa-sinucleína humana parecía estar localizada. Después se cuantificó la frecuencia de neuronas injertadas que presentaban inmunoreactividad positiva para TH y alfa-sinucleína humana. Se vio que la proporción de células injertadas mostraban una absorción de alfa-sinucleína humana que dependía significativamente del tiempo que había pasado desde el trasplante.[13]

Como era de esperar, no se detectaron señales de alfa-sinucleína humana sin test TH positivo en las neuronas trasplantadas inyectadas en la región izquierda del cuerpo estriado, debido al hecho que la inyección de AAV2/2 de alfa-sinucleína humana fue en el lado derecho nigroestriado.[13]

Después se estudió bajo microscopio confocal al menos 20 neuronas TH inmunorreactivas seleccionadas al azar por rata. En algunos casos, la señal para alfa-sinucleína humana se localizaba dentro de las células injertada, en otros casos la señal se localizaba adyacente y también algunos casos la señal se encontraba totalmente fuera de la neurona. [13]

Estos resultados indican que el tiempo transcurrido desde el trasplante y el desarrollo de sinucleinopatía, la cual se convierte en mas severa en el tiempo después de la inyección con AAV2/6 alfa-sinucleína humana, ambos factores influyen en la probabilidad del traspase de alfa-sinucleína humana. [13]

6.5 Alfa-sinucleína como diana terapéutica.

Hoy en día el tratamiento de la enfermedad del Parkinson actúa principalmente a nivel sintomatológico para contrarrestar el desequilibrio en los niveles del neurotransmisor de dopamina. Nuevas terapias están surgiendo, teniendo como diana diferentes momentos del proceso de agregación de la proteína alfa-sinucleína. A continuación se exponen las diferentes moléculas que han surgido en los últimos años:

6.5.1 Inhibe la interacción con la membrana lipídica.

El equipo de investigación de Michele Perni estudió una molécula capaz de alterar la unión de alfa-sinucleína a la membrana lipídica y de esta manera inhibir su agregación. Ellos se centraron en la escualamina, un aminosterol antimicrobiano procedente del tiburón, *Squalus acanthias*. [14]

La escualamina presenta varias cargas positivas que muestran una alta afinidad por los fosfolípidos aniónicos, lo que conduce a una reducción de la carga negativa de la superficie de membrana donde se adhiere la alfa-sinucleína. Teniendo en cuenta esta hipótesis, se vio que la escualamina inhibe la agregación de alfa-sinucleína inducida por los lípidos de manera competitiva, ya que se unen a la superficie de las vesículas. Además demostraron la interacción entre la escualamina y las fibrillas de alfa-sinucleína y que la escualamina no interactúa directamente con los monómeros de alfa-sinucleína, a no ser que se encuentre en altas concentraciones y en ausencia de lípidos. [14]

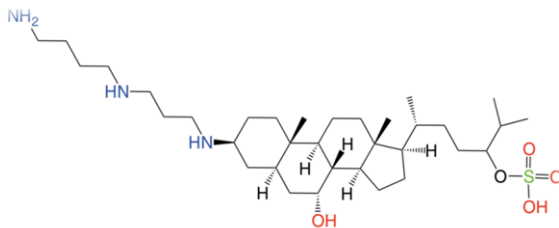


Figura 4. La escualamina.

Por otro lado, se vio que la escualamina disminuía la toxicidad de los oligómeros de alfa-sinucleína, ya que la presencia de ROS y el daño mitocondrial era menor en presencia de esta molécula. El grado de unión de los oligómeros tóxicos de alfa-sinucleína a las células neuronales también disminuía con el aumento de la concentración de escualamina. Por ello, se sugiere el modelo de unión competitivo, donde los oligómeros tóxicos de alfa-sinucleína y la escualamina compiten por los sitios de unión de la superficie de las células neuronales. [14]

Incluso para aportar más pruebas del efecto protector de la escualamina, se observó tanto *in vitro* como *in vivo*, usando un modelo de Parkinson generado en el nematodo *C. elegans*. Cuando las crías fueron expuestas a la escualamina desde una etapa temprana de su desarrollo, mostraron una completa recuperación de la disfunción motora inducida por la alfa-sinucleína y una reducción de las inclusiones proteicas formadas en la enfermedad del Parkinson.

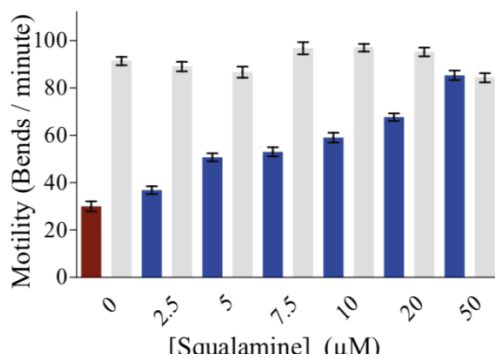


Figura 5. Mejora de la motilidad en el modelo animal bajo los efectos de la escualamina.

Concluyendo, los resultados obtenidos sugieren que la escualamina inhibe el paso inicial en los lípidos inducido por la agregación de alfa-sinucleína a través de una unión competitiva a la superficie de los lípidos que forman las vesículas y también disminuye drásticamente la toxicidad de los oligómeros de alfa-sinucleína *in vivo*. Por tanto, la escualamina compete efectivamente con alfa-sinucleína por la unión a los lípidos de membrana y tiene un potencial como agente terapéutico para la enfermedad del Parkinson y otras sinucleinopatías. [14]

6.5.2 FABP3, fatty-acid binding protein.

El equipo de Norifumi Shioda *et al.* ha estudiado la implicación de FABP3 cuando se induce la toxicidad neuronal producida por MPTP y la acumulación de alfa-sinucleína. La neurotoxina MPTP es conocida por su capacidad para originar estrés oxidativo, alterando el funcionamiento mitocondrial, reducción del potencial de membrana, daño en la cadena de transporte electrónico mitocondrial y a nivel de citocromo C, todo lo cual desencadena neurodegeneración dopaminérgica y disfunción motora. [15,16]

Para ello, emplearon ratones knock out de FABP3 y ratones no modificados como control. Los ratones modificados presentaron una mayor resistencia a la MPTP. Esta mejoría está altamente correlacionada con una reducción de la oligomerización de alfa-sinucleína en la *Sustancia Nigra pars Compacta* (SNpC). Además, confirmaron que la oligomerización de alfa-sinucleína estaba regulada por FABP3, ya que, ésta es la encargada de la incorporación del ácido araquidónico, debido a la necesidad de una proteína carrier que mueva una molécula lipófila en un medio acuoso como es el citoplasma.[15] Altos niveles de ácido araquidónico están correlacionados con el riesgo de desarrollar la Enfermedad del Parkinson, ya que estudios post-mortem en cerebros muestran elevadas concentraciones de FABP3 y ácido

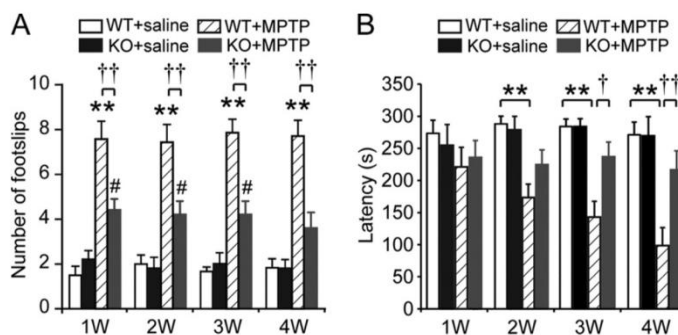


Figura 6. Test de rotarod.

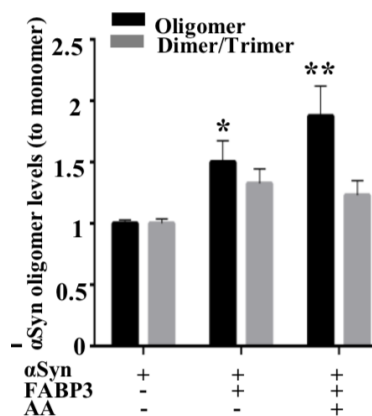


Figura 7. Influencia de FABP3 y el ácido araquidónico

araquidónico.

De manera adicional, el equipo de investigación de An Cheng demostró la hipótesis anterior, la cual sostiene que la oligomerización de alfa-sinucleína está

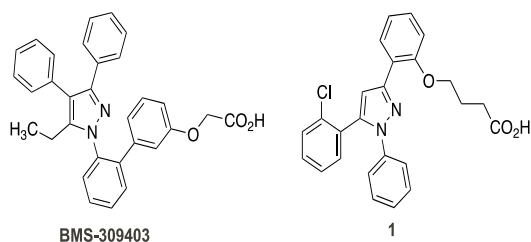
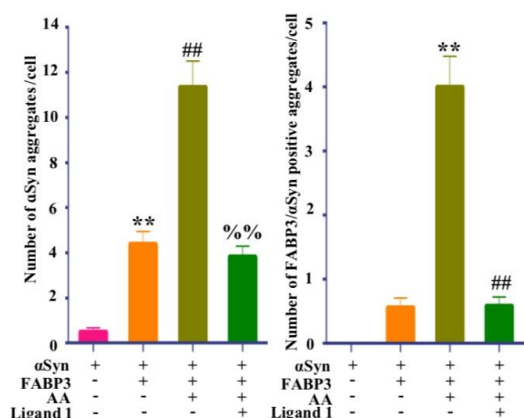


Figura 8. Prototipo BMS y ligando 1.

altamente promovida por lo presencia de FABP3 en la células neuronales cuando son tratadas con ácido araquidónico. Por ello, han desarrollado ligandos para FABP3. Estos se unen al dominio de unión del ácido graso de FABP3.[17]

Inicialmente usaron como prototipo BMS309403 un ligando de FABP4. Sin embargo este no tiene afinidad para FABP3. Por consiguiente, se han modificado ciertos sustituyentes y se ha estudiado su afinidad por FABP3. La afinidad más parecida a la del ácido araquidónico es la presentada por el ligando 1.[17]

Concluyendo, se demostrado que la presencia de ácido araquidónico desencadena la



oligomerización de alfa-sinucleína en las células neuronales de manera dependiente de FABP3. Además, se ha desarrollado un ligando de FABP3 (compuesto 1), que bloquea totalmente la oligomerización de alfa-sinucleína inducida por FABP3 y ácido araquidónico. Por ello, el ligando de FABP3 es un buen candidato como terapia para el tratamiento de sinucleinopatías, incluyendo la enfermedad del Parkinson.[17]

Figura 9. Influencia del ligando 1 sobre la FABP3.

6.5.3 Inhibición de la glucosilceramida sintasa.

En la enfermedad de Gaucher es característica una mutación en el gen codificante para la glucocerebrosidasa (GBA). Además esta mutación es uno de los factores genéticos que implica un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson.[18] Pacientes que tienen mutado el gen GBA, presentan una mayor prevalencia y severidad de bradicinesia, complicaciones motoras y deterioro cognitivo. El mecanismo preciso por el cual la mutación en GBA aumenta el riesgo de desarrollar sinucleinopatías y acelerar la progresión de la enfermedad permanece desconocido. Sin embargo, la principal teoría sostiene que la pérdida de la funcionalidad de GBA causa un glicosfingolípido anómalo en el entorno, produciendo una alteración del metabolismo proteico (proteínopatía) y una disfunción neuronal. Además la disminución de actividad glucocerebrosidasa induce un aumento de agregados de alfa-sinucleína, ubiquitina y proteína tau en el Sistema Nervioso Central, lo que se traduce, en una alteración del comportamiento.[19]

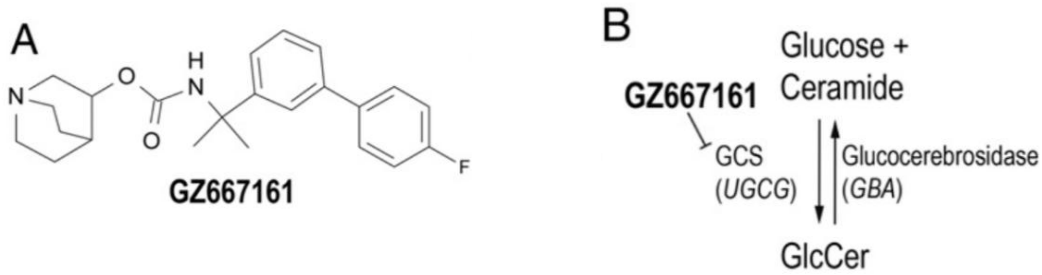


Figura 10A. GZ667161 inhibidor de la enzima glucosilceramida sintasa (GCS)
Figura10B. Inhibición de la transformación a glucosilceramida.

El equipo de S.Pablo Sardi ha estudiado una molécula (GZ667161) que inhibe la enzima glucosilceramida sintasa (GCS) y por tanto, provoca una disminución de los niveles de glucosilceramida y siguiendo la hipótesis anterior, ralentiza la agregación de proteínas

Esta molécula se administra vía oral y es capaz de llegar al cerebro y antagonizar GCS. Se han utilizado ratones con GBA mutada (presentaban muchas de las características bioquímicas aberrantes) y ratones control. Se observó que no hubo ningún cambio respecto a la concentración de alfa-sinucleína soluble. Sin embargo, los niveles de alfa-sinucleína insoluble habían disminuido significativamente. También, la alteración en la composición de la membrana lipídica puede cambiar la cinética de agregación de alfa-sinucleína con la membrana. Incluso, pacientes enfermos de Parkinson pero sin GBA mutado mostraron niveles más bajos de actividad de la glucocerebrosidasa, sugiriendo el papel de esta enzima lisosomal a pesar de la falta de acumulación lipídica.[20]

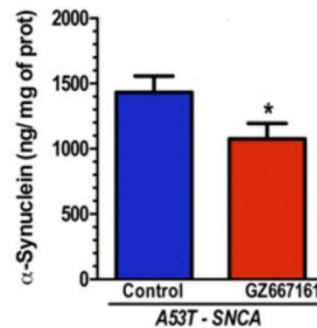


Figura 11. Efecto de GZ667161 sobre la agregación de alfa-sinucleína respecto al modelo de referencia.

Por consiguiente, la molécula GZ667161 es capaz de mejorar la capacidad motora, la homeostásis de alfa-sinucleína y ralentizar los efectos patológicos en los modelos de ratones que padecen sinucleinopatía. Además, en esta terapia se puede incluir a pacientes con baja actividad glucocerebrosidasa.[20]

6.5.4. Aumento de la degradación de alfa-sinucleína.

Actualmente se conoce más sobre la importancia del papel de la autofagia deficiente en la Enfermedad del Parkinson. Estudios genéticos han identificado las mutaciones en los genes codificantes para los componentes de la vía autofagia- lisosomal (ALP).[21] La autofagia es uno de los principales sistemas que interviene en la degradación proteolítica de alfa-sinucleína. Por ello, los avances farmacológicos respecto a esta diana, supone otra estrategia para el desarrollo de un tratamiento que combata la agregación de alfa-sinucleína en la Enfermedad del Parkinson.[22]

Recientemente se han desarrollado agentes que tiene como diana sistema autofagia lisosomal (ALP), factor de transcripción EB (TFEB), lisosomas, GCasa y autofagia

mediada por chaperonas. De esta manera, son métodos más específicos y el riesgo de producir reacciones adversas es menor.[23]

Mak *et al.* han demostrado que cuando la expresión de alfa-sinucleína neuronal esta aumentada por una lesión tóxica o una sobreexpresión transgénica ,también hay una elevación de lisosoma asociado a la proteína 2A de membrana (LAMP-2A).[24]De hecho, dos medicamentos de origen vegetal tienen potencial como candidatos para mejorar la autofagia.

6.5.4.1 Isorincofilina.

Se trata de un alcaloide oxindólico tetracíclico procedente de la planta medicinal *Uncuria rhynchophylla*, antiguamente utilizada en la medicina china para tratar enfermedades neurológicas. Además, es uno de los componentes de un medicamento neurotrófico denominado Yokukansan.

Esta molécula confiere un efecto protector frente al daño neuronal inducido por isquemia ya que actúa a varios niveles: suprime 5-HT_{2A}, inhibe la toxicidad de Listeriolisin O, se libera endotelina-1 en células endoteliales, previene el efecto ejercido por angiotensina II y suprime la inflamación en células microglia promovida por lipopolisacárido. Gracias a este estudio, se ha demostrado una nueva actividad como un potente agente inductor de la autofagia en células neuronales. De esta manera, se promueve la degradación de especies patológicas de alfa-sinucleína de las células N2a, las cuales son independientes de mTOR pero requieren la intervención de Beclin-1.[25]

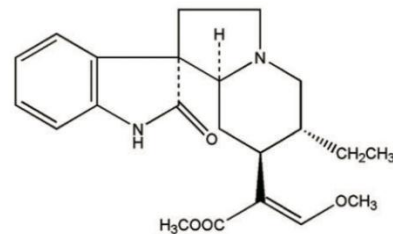


Figura 12. Estructura de Isorincofilina.

Para observar el efecto inductor de autofagia neuronal, se estableció sobre la línea celular de neuroblastoma N2a, la cual expresa constantemente GFP-LC3 (marcador proteico de autofagia). Se vio que la molécula de Isorincofilina tenía una potente actividad para inducir la autofagia. Además, para confirmar que la mejoría en la autofagia es inducida por la molécula en estudio y no por el bloqueo de la maduración de autofagosomas, se introdujo un lisosoma inhibidor cloroquina. Ambas moléculas en el cultivo produjeron unos niveles de LC3-II y GFP-LCR mucho mayores, que cuando se cultivaban individualmente. También, se contrastaron con la molécula 3-metilamfetamina, la cual se comporta como un inhibidor de la autofagia y la señal producida por GFP-LC3 fue prácticamente suprimida.[25]Además, se utilizó *Drosophila* como modelo animal para estudiar el efecto

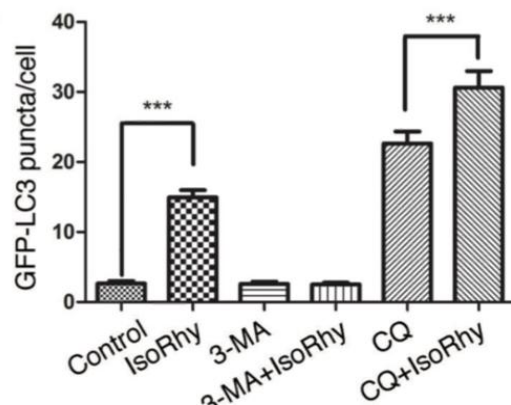


Figura 13. Influencia de la isorincofilina en los niveles de GFP-LC3

de la isorincofilina. Sin embargo, falta realizar estudios sobre modelos de animales mamíferos y así ver su efecto neuroprotector.

6.5.4.2 Paeoniflorina.

Paeoniflorina (PF) es un monoterpeno glicósido y el principal principio activo utilizado en la medicina tradicional china, conocido como Radix. Recientemente se ha demostrado su efecto neuroprotector, ya que interviene en la regulación de la autofagia y en la degradación vía ubiquitina-proteosoma. También se ha visto una disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en presencia de esta molécula. Sin embargo, los detalles de su actuación aún no son del todo claros.

Para ello, han estudiado el efecto de paeoniflorina después de haber sometido el daño celular producido por MPP⁺ y se han fijado en los siguientes parámetros: actividad del proteosoma, actividad de la catalasa y actividad de la superóxido dismutasa. Además se compara con el tratamiento inmunosupresor de Rapamicina, inhibidor de la activación de las células T.[26]

En condiciones normales, PF no tiene influencia sobre la autofagia y la vía ubiquitina-proteosoma; pero rapamicina induce la autofagia e inhibe la vía ubiquitina-proteosoma. Cuando se usa MPP⁺, éste activa la autofagia pero sin afectar a la degradación de los oligómeros de alfa-sinucleína. Sin embargo, se ha demostrado que MPP⁺ junto con PF hay una regulación de ambos procesos, la autofagia como la degradación de alfa-sinucleína y reduce el daño celular. Por tanto, la PF es capaz de mejorar la función de ALP y UPS para facilitar la degradación de alfa-sinucleína, pero no afecta a la función de p53.[26]

Se ha demostrado que PF reduce la actividad de la catalasa y la superóxido dismutasa, aumentando la viabilidad celular. Además, PF disminuye el daño producido por MPP⁺. Por ello, se trata de una molécula con buen potencial terapéutico para las enfermedades neurodegenerativas.[26]

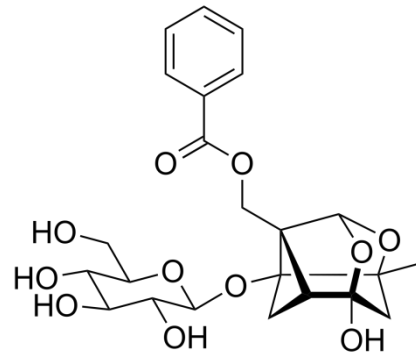


Figura 14. Estructura de Paeoniflorina.

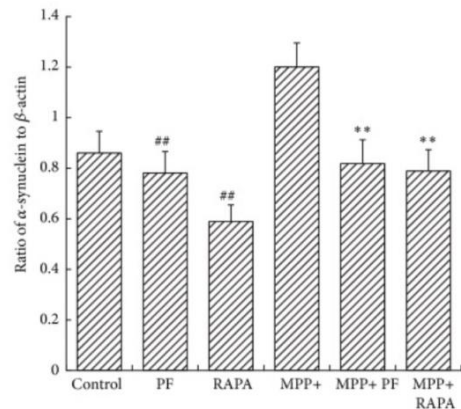


Figura 15. Agregación de alfa-sinucleína en presencia de paeoniflorina.

7. Conclusión.

Actualmente el tratamiento farmacológico de la enfermedad de Parkinson actúa a nivel sintomatológico, únicamente. De ahí, la necesidad de buscar nuevas dianas, como la proteína alfa-sinucleína, para desarrollar tratamientos que mejoren la calidad de vida del paciente.

En los últimos años han ido apareciendo nuevas moléculas cuyo objetivo es inhibir o ralentizar la agregación de alfa-sinucleína y de esta manera frenar el desarrollo de la enfermedad de Parkinson y la sintomatología que conlleva.

A través de esta revisión bibliográfica, se han expuesto unas moléculas capaces de intervenir en la agregación de alfa-sinucleína, y de esta manera frenar la formación de cuerpos de Lewy. Sin embargo, los ensayos han sido realizados en modelo animal. Por ello, la necesidad de hacerlos estudios en seres humanos y demostrar las ventajas que supondrían frente al desarrollo de la enfermedad de Parkinson.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- [1] Erbach G. Neurodegenerative diseases in the workplace. Library of the European Parliament. 2013
- [2] Vallespín GT. Enfermedades neurodegenerativas. AMF 2015;11(7):374-383
- [3] Benito-Leon J. [Epidemiology of Parkinson's disease in Spain and its contextualisation in the world]. Rev Neurol 2018;66:125–34.
- [4] Xu L, Pu J. Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application. Parkinson's Disease 2016;2016:1–10.
- [5] Cudeiro Mazaira FJ. Reeducción funcional en la enfermedad de parkinson: una introducción a las terapias de apoyo. Barcelona: Elsevier; 2015.
- [6] Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Mechanisms of Parkinson's Disease Linked to Pathological α -Synuclein: New Targets for Drug Discovery. Neuron 2006;52:33–8.
- [7] Espejo EF. Agregación de alfa-sinucleína . FISILOG A. Bolet n informativo de la SECF. 2018
- [8] Martinelli A, Lopes F, John E, Carlini C, Ligabue-Braun R. Modulation of Disordered Proteins with a Focus on Neurodegenerative Diseases and Other Pathologies. IJMS 2019;20:1322.
- [9] Hoang QQ. Pathway for Parkinson's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences 2014;111:2402–3.
- [10] Fusco G, Chen SW, Williamson PTF, Cascella R, Perni M, Jarvis JA, et al. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by a-synuclein oligomers 2017:5.
- [11] Melki R. Alpha-synuclein and the prion hypothesis in Parkinson's disease. Revue Neurologique 2018;174:644–52.

- [12] Braak H, Rb U, Gai WP, Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of Neural Transmission* 2003;110:517–36.
- [13] Angot E, Steiner JA, Lema Tomé CM, Ekström P, Mattsson B, Björklund A, et al. Alpha-Synuclein Cell-to-Cell Transfer and Seeding in Grafted Dopaminergic Neurons In Vivo. *PLoS ONE* 2012;7:e39465.
- [14] Perni M, Galvagnion C, Maltsev A, Meisl G, Müller MBD, Challa PK, et al. A natural product inhibits the initiation of α -synuclein aggregation and suppresses its toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114:E1009–17.
- [15] Shioda N, Yabuki Y, Kobayashi Y, Onozato M, Owada Y, Fukunaga K. FABP3 Protein Promotes α -Synuclein Oligomerization Associated with 1-Methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Neurotoxicity. *J Biol Chem* 2014;289:18957–65.
- [16] Sepe FN, Chiasserini D, Parnetti L. Role of FABP3 as biomarker in Alzheimer's disease and synucleinopathies. *Future Neurology* 2018;13:199–207.
- [17] Cheng A, Shinoda Y, Yamamoto T, Miyachi H, Fukunaga K. Development of FABP3 ligands that inhibit arachidonic acid-induced α -synuclein oligomerization. *Brain Research* 2019;1707:190–7.
- [18] Pastores GM, Hughes DA. Gaucher Disease. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews*®, Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.
- [19] Schapira AHV, Gegg ME. Glucocerebrosidase in the pathogenesis and treatment of Parkinson disease: Fig. 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:3214–5.
- [20] Sardi SP, Viel C, Clarke J, Treleaven CM, Richards AM, Park H, et al. Glucosylceramide synthase inhibition alleviates aberrations in synucleinopathy models. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114:2699–704.
- [21] Kingwell K. Zeroing in on neurodegenerative α -synuclein. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16:371–3.
- [22] Chan DKY, Xu YH, Chan LKM, Braidy N, Mellick GD. Mini-review on initiatives to interfere with the propagation and clearance of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener* 2017;6:33.
- [23] Moors TE, Hoozemans JJM, Ingrassia A, Beccari T, Parnetti L, Chartier-Harlin M-C, et al. Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in Parkinson's disease. *Mol Neurodegeneration* 2017;12:11.
- [24] Mak SK, McCormack AL, Manning-Boğ AB, Cuervo AM, Di Monte DA. Lysosomal Degradation of α -Synuclein *in Vivo*. *J Biol Chem* 2010;285:13621–9.
- [25] Lu J-H, Tan J-Q, Durairajan SSK, Liu L-F, Zhang Z-H, Ma L, et al. Isorhynchophylline, a natural alkaloid, promotes the degradation of alpha-synuclein in neuronal cells via inducing autophagy. *Autophagy* 2012;8:98–108..
- [26] Cai Z, Zhang X, Zhang Y, Li X, Xu J, Li X. The Impact of Paeoniflorin on α -Synuclein Degradation Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015;2015:1–8.