



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
ALFA SINUCLEÍNA COMO DIANA DE  
NUEVOS FÁRMACOS**

Autor: Laleshka Daniela Faiffer Pariona

Tutor: José Carlos Menéndez Ramos

Convocatoria: Junio 2018

# ÍNDICE

1. Resumen/Abstract.....	Pg 3
2. Introducción y antecedentes.....	Pg 3
2.1 Enfermedad de Parkinson	
2.2 Protocolo farmacológico	
3. Objetivos.....	Pg 6
4. Metodología.....	Pg 6
5. Resultados y discusión.....	Pg 6
5.1 Estructura de la $\alpha$ -sinucleína	
5.2 Función de la $\alpha$ -sinucleína	
5.3 Cuerpos de Lewy	
5.4 Influencia del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en la formación de cuerpos de Lewy	
5.5 Degradación de la $\alpha$ -sinucleína	
5.6 Inhibidores de $\alpha$ -sinucleína con interés terapéutico en la Enfermedad Parkinson	
5.6.1 Inhibidores de origen natural	
5.6.2 Inhibidores de origen sintético	
5.6.3 Inhibidores cuya principal indicación no es antiparkinsoniana	
5.6.4 Inhibidores en ensayo clínico	
6. Conclusión.....	Pg 18
7. Bibliografía.....	Pg 18

## 1. RESUMEN/ABSTRACT

### Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *substancia nigra pars compacta*. Hoy en día su tratamiento se dirige solo a mejorar los síntomas derivados de la enfermedad, ya que no tiene cura. Un incremento de los niveles de  $\alpha$ -sinucleína se ha relacionado con la enfermedad, ya que es el principal componente de los cuerpos de Lewy, sustancia que presentan todos los pacientes afectados. Por tanto la  $\alpha$ -sinucleína se considera una potencial diana frente a esta enfermedad.

### Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons from the *substantia nigra pars compacta*. Currently available treatments are only symptomatic and the disease has no cure. An increase in  $\alpha$ -synuclein levels has been associated with this disease because  $\alpha$ -synuclein is the main component of Lewy bodies, a substance found in all patient. Thus  $\alpha$ -synuclein is considered a potential target against this disease.

## 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 2.1 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson fue descrita por primera vez en el año 1817 por el médico James Parkinson, en su “Ensayo sobre la parálisis agitante”, donde sistematizaba las descripciones clínicas de una serie de pacientes. Todos estos síntomas comenzaban a desarrollarse entre los 50 y los 60 años de edad. (1)

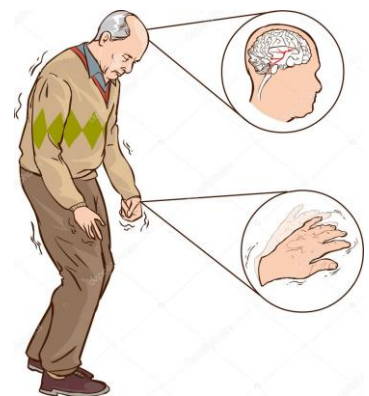


Fig.1. Paciente con EP

Esta patología neurodegenerativa es la más frecuentes después de la enfermedad de Alzheimer, se caracteriza por ser un trastorno crónico y progresivo que presenta síntomas clínicos como temblor, rigidez, bradicinesia y alteración de la marcha y la postura. La enfermedad de Parkinson cursa con una importante pérdida de neuronas productoras de dopamina de la *substancia nigra pars compacta* (SNpc), la cual se asocia a los trastornos del movimiento previamente descritos. (2)

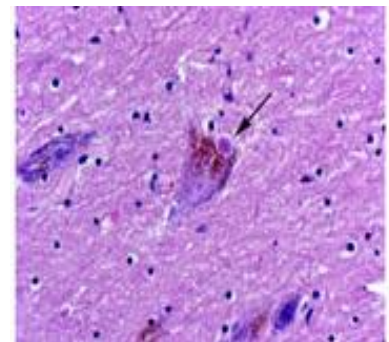


Fig. 2. Cuerpos de Lewy

Esta enfermedad, al igual que otros trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y

las encefalopatías espongiiformes se caracteriza por la acumulación de agregados proteicos intracelulares, que en este caso se denominan cuerpos de Lewy.

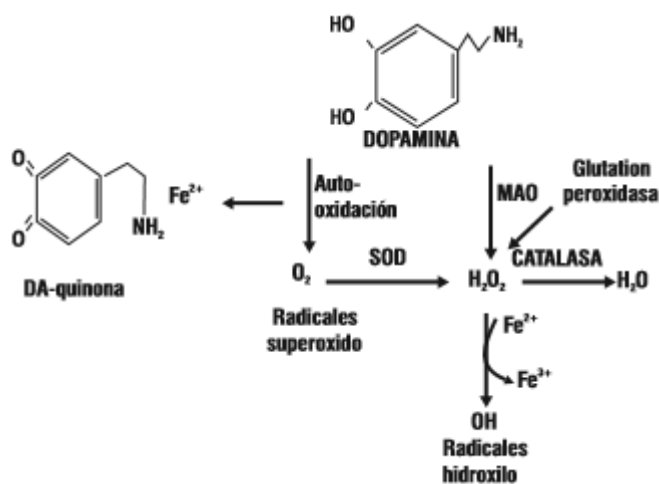
Los cuerpos de Lewy son inclusiones eosinófilas que se pueden hallar entre las células de la sustancia nigra de pacientes con EP. Se habían considerado inicialmente como marcadores de la enfermedad, pero esta posibilidad se descartó al encontrarlos en otras áreas cerebrales. Un componente muy importante de los cuerpos de Lewy son los filamentos de  $\alpha$ -sinucleína, proteína cuyas funciones aún no se conocen bien. (3)

El desarrollo de la forma idiopática de la EP se ha asociado a una exposición medioambiental (toxinas como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina, pesticidas, herbicidas, metales como manganeso y hierro), aunque también hay formas familiares o hereditarias; en estos casos la enfermedad se asocia a mutaciones en los genes que codifican para proteínas como la  $\alpha$ -sinucleína y la parkina. (4)

Se han hallado tres genes relacionados con la formación de los cuerpos de Lewy y el desarrollo de la EP: PARK1, PARK2 y PARK 5. Estos genes codifican respectivamente para,  $\alpha$ -sinucleína, parkina e hidrolasa C-terminal de ubiquitina L1.

En el gen PARK 1 O SNCA se determinaron mutaciones que producían EP autosómica dominante que se manifiesta alrededor de los 46 años de edad. En condiciones normales la  $\alpha$ -sinucleína se encuentra en su forma nativa no plegada, pero al aumentar su concentración se favorece la formación de oligómeros en forma de placas  $\beta$  denominados protofibrillas que al sedimentar forman fibras amiloides dentro de los cuerpos de Lewy, las cuales generan citotoxicidad. (5)

Se ha visto que la alteración de la  $\alpha$ -sinucleína favorece la acumulación de dopamina en los sitios en los que se sintetiza y acumula, como el citoplasma y terminales nigroestriales. En condiciones normales de pH normal, las neuronas dopaminérgicas están expuestas a estrés oxidativo debido al propio metabolismo de la dopamina. En efecto, esta molécula produce metabolitos que actúan como



**Fig.3. Generación de estrés oxidativo por el metabolismo de la dopamina, y su participación en el proceso neurodegenerativo**

neurotoxinas endógenas como por ejemplo: dopamina-quinona, radicales superóxido y peróxido de hidrógeno. Por otro lado, la dopamina se puede desaminar gracias a la acción de la MAO (monoamino oxidasa) produciendo 3,4-hidroxifenilacético y peróxido de hidrógeno. En cualquiera de los casos el peróxido de hidrógeno se considera relativamente inocuo, pero en una reacción catalizada por  $\text{Fe}^{2+}$  se producen radicales hidroxilo altamente citotóxicos a través de la reacción de Fenton, lo cual se favorece porque en la *substancia nigra* la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  es más alta que en otras regiones del cerebro.

La mutación de la  $\alpha$ -sinucleína además de favorecer la acumulación de metabolitos citotóxicos, favorece la formación de poros en las vesículas sinápticas, lo que aumenta la salida de dopamina libre en el citoplasma. (6)

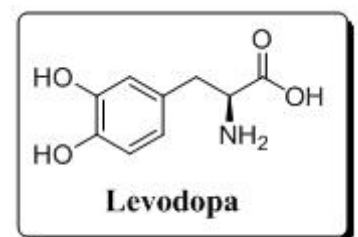
## 2.2 Protocolo farmacológico

No hay un tratamiento curativo de la enfermedad ni de su curso. Los tratamientos actuales tratan de restaurar la función dopaminérgica perdida.

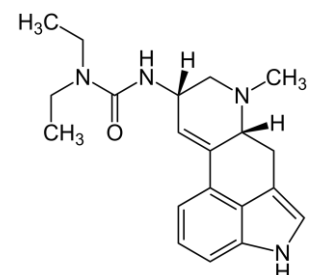
La **levodopa** es uno de los fármacos más empleados y más eficaces para controlar los síntomas. Sin embargo, su uso crónico induce fluctuaciones motoras y discinesias, por lo que muchas veces se sugiere iniciar este tratamiento cuando haya una incapacidad funcional.

Los **agonistas dopaminérgicos** estimulan directamente los receptores dopaminérgicos D1 o D2 y presentan menor incidencia de discinesias que levodopa. Se clasifican a su vez en derivados **ergóticos** (pergolida, bromocriptina, lisurida y cabergolina) y **no ergóticos** (ropinirol, pramipexol, apomorfina y rotigotina). Ambos tipos de agonistas reducen las fluctuaciones motoras, aunque presentan ciertos efectos secundarios como náuseas, vómitos, hipotensión ortostática, somnolencia y alucinaciones y, en el caso de los ergóticos fibrosis de válvulas cardíacas (uso no recomendado).

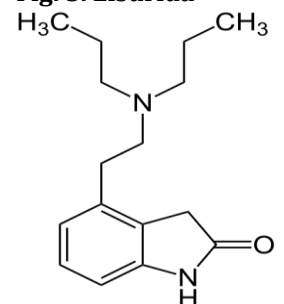
También se emplean **inhibidores de la MAO** como la selegilina y rasagilina con acción discreta. También se usan **inhibidores de la COMT** como la entacapona y tolcapona.



**Fig.4. Levodopa**



**Fig. 5. Lisurida**



**Fig. 6. Ropinirol**

El grupo de los **anticolinérgicos** es poco utilizado por su escasa efectividad y sus numerosos efectos secundarios, por otro lado la **amantadina** también tiene una acción leve. La **duodopa** se administra por vía intraduodenal en pacientes con EP avanzada. (7)

Para algunos pacientes se añaden fármacos **betabloqueantes** como el propranolol (nunca de primera elección) para el temblor en reposo. (8)

### 3. OBJETIVOS

En la mayoría de los casos no se puede predecir ni prevenir la EP. Actualmente lo que se trata de hacer es desarrollar fármacos que eviten la progresión de la enfermedad o recuperen la actividad dopaminérgica perdida. Por ello, en este trabajo el objetivo es analizar en concreto la  $\alpha$ -sinucleína como potencial diana de esta enfermedad. Se analizará su estructura, posible función; además se estudiarán los posibles fármacos candidatos frente a esta diana en la actualidad. Algunos candidatos aún permanecen en etapas de desarrollo clínico, mientras que otros “prometedores” han sido descartados.

### 4. METODOLOGÍA

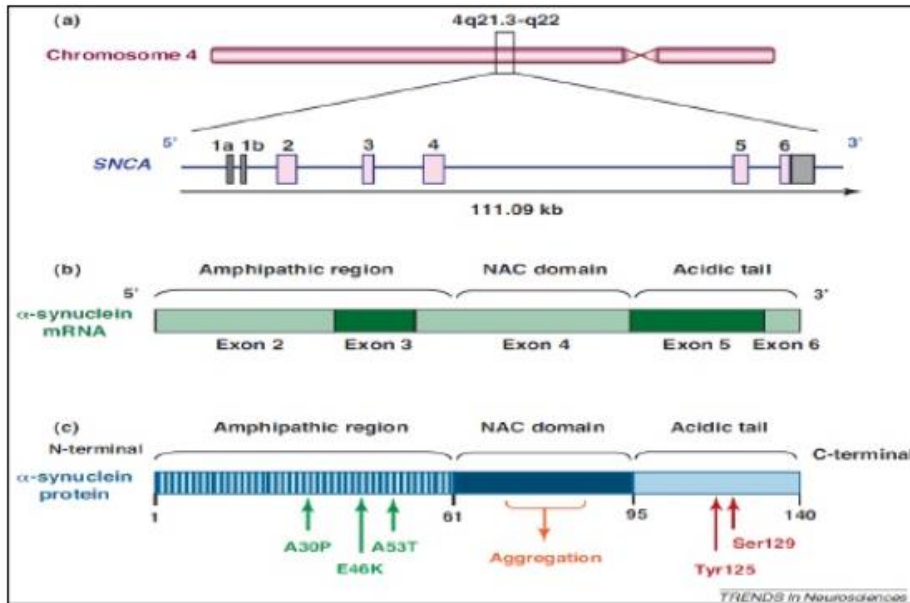
El trabajo es una revisión bibliográfica. Se ha consultado bases de datos científicas como Pubmed, SciFinder, Scielo.

Para encontrar de manera más sencilla resultados relacionados con el tema del trabajo se introdujeron palabras clave como: “parkinson’s disease”, “enfermedad de parkison”, “alpha synuclein + parkinson”, “new targets + alpha synuclein”, “new drugs + parkinson + alpha synuclein”.

### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 Estructura de la $\alpha$ -sinucleína

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína de localización presináptica, formada por 140 aminoácidos y codificada por el gen PARK 1 o SNCA que consta de 6 exones y se localiza en el cromosoma 4. Pertence al grupo de las proteínas denominadas “intrínsecamente desordenadas”. La proteína tiene 3 regiones bien diferenciadas: el extremo amino terminal que está cargado positivamente, el fragmento hidrofóbico central y el extremo carboxílico, que está cargado negativamente. (9)



En la EP encontramos tres mutaciones de la  $\alpha$ -sinucleína (A30P, E46K, A53T). Por otra parte, multiplicaciones del gen Park 1 o SNCA se relacionan con una mayor formación de protofibrillas y con EP familiar autosómica dominante.

Se descubrió que es una proteína de unión a lípidos. Se vio además que posee cuatro residuos de tirosina, uno (Y39) cerca del extremo amino y otros

tres (Y125, Y133, Y136) cerca del extremo carboxílico. En 2011 se dio un paso más al descubrir que la  $\alpha$ -sinucleína fisiológica no se encuentra en forma monomérica sino oligomérica, formando tetrámeros, y que en cada uno de ellos cada cadena tiene una conformación alfa-helicoidal. (10)



**Fig. 8. (Izquierda) estructura plegada del monómero, colapsado sobre segmento NAC, con los residuos de tirosina en color. (Derecha) Tetrámero con cuatro moléculas de  $\alpha$ -sinucleína unidas entre sí por residuos de tirosina.**

Los tetrámeros se forman por uniones ditirosínicas entre las cadenas y con esa disposición espacial se localiza la proteína en las neuronas, pero también se ha hallado en el LCR, espacio extracelular neuronal, así como en la sangre. La proteína en sangre se encuentra unida en un 99% unida a la membrana de los glóbulos rojos y el resto en plasma. El hecho de encontrar a la proteína en

localizaciones diferentes de las neuronas lleva a pensar que se puede segregar por medios extraneuronales lo que podría servir para monitorizar la progresión de la neurodegeneración en la EP. (11)

## 5.2 Función de la $\alpha$ -sinucleína

Actualmente la función de la  $\alpha$ -sinucleína es desconocida, pero existen varias hipótesis para explicar su papel, una de las cuales es que está relacionada con su capacidad de interactuar con los fosfolípidos de membrana, en concreto, con las membranas de las vesículas. Este mecanismo puede explicar su participación en la neurotransmisión, tráfico de vesículas y función mitocondrial. (12)

Respecto a su función relacionada con las vesículas, se cree que participa en la regulación del reciclaje de las vesículas en terminales presinápticas. En un experimento con ratones que presentaban sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína se observó una inhibición de la exocitosis de las vesículas de localización presinápticas, así como una alteración en el reciclaje de las mismas. (13)

Se ha visto también que la  $\alpha$ -sinucleína inhibe el complejo I mitocondrial lo que produce una disminución de la respiración celular, ya que al inhibirse el complejo se produce una apertura del poro mitocondrial, lo que produce la liberación del citocromo C, y provoca la muerte celular apoptótica. Sumado a lo anterior, se produce una disminución de la producción de ATP en las neuronas. Por otra parte se ha visto que esto conlleva una mayor producción de ROS. (14)

La sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína mostró una alteración en la actividad de la enzima TH (tirosina hidroxilasa). Esta enzima cataliza la reacción que tiene como producto la L-dopa a partir de la tirosina, siendo éste una etapa crítica del proceso de síntesis de dopamina. Se vio que el incremento de la  $\alpha$ -sinucleína producía una disminución de la actividad enzimática de la TH, y como consecuencia una disminución de L-dopa y dopamina que contribuye a un deterioro de la sintomatología del paciente. Estas observaciones confirman el papel de la  $\alpha$ -sinucleína en la regulación de la biosíntesis de dopamina. (15)

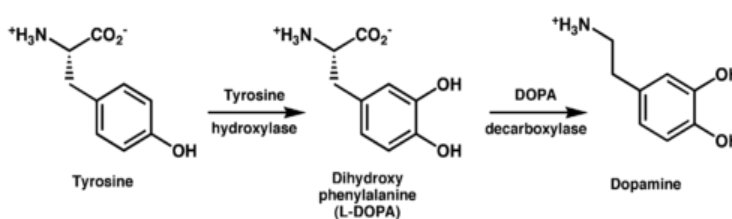


Fig. 9. Ruta de síntesis de dopamina a partir de tirosina

En un estudio *in vivo* de sobreexpresión de PLD2 (fosfolipasa D2) en la *sustancia nigra* de ratas se comprobó la existencia de una relación de PLD2 y  $\alpha$ -sinucleína. Se comprobó que en presencia de la  $\alpha$ -sinucleína la expresión de PLD2 se veía reducida y la neurogeneración suprimida. Sin embargo si



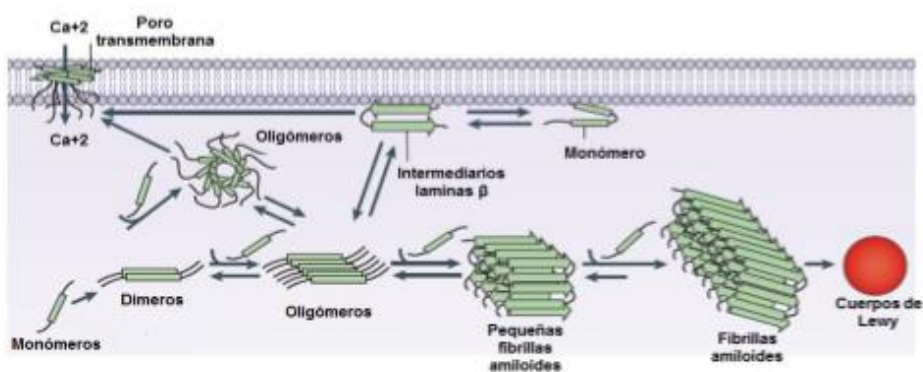
la PLD2 no se encuentra alterada, pero si lo está la  $\alpha$ -sinucleína, lo que se produce es una disminución de la función normal de la primera. La función de PLD2 es catalizar la hidrólisis de la fosfatidilcolina a ácido fosfatídico y diacilglicerol, los cuales son moduladores intracelulares de la neurotransmisión. (16)

### 5.3 Cuerpos de Lewy

Son agregados intraneuronales anormales de proteínas de forma esférica que desplazan al resto de los componentes celulares. Se pueden presentar de dos maneras: de manera clásica o subcortical, la cual es una inclusión eosinofílica con centro denso del que irradian fibrillas y cuyo principal componente es la  $\alpha$ -sinucleína. La otra presentación es la cortical o difusa, la cual es más densa y carece de halo fibrilar, aunque su composición proteica es la misma. (17) (18)

La formación de los cuerpos de Lewy se produce principalmente por la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína y las etapas de formación de los agregados proteicos son: (19)

- ✓ Aparición de monómeros de  $\alpha$ -sinucleína en disposición beta-helicoidal o protofibrillas
- ✓ Formación de oligómeros de las protofibrillas
- ✓ Formación de fibrillas amiloides
- ✓ Agregación de las fibrillas en forma de cuerpo de Lewy



**Fig. 10. Mecanismo de formación de cuerpos de Lewy a partir de monómeros de  $\alpha$ -sinucleína**

La agregación de la  $\alpha$ -sinucleína puede ser de dos tipos: covalente y no covalente. La agregación covalente cursa con uniones cruzadas principalmente entre los residuos de tirosina de las moléculas, se sabe que el estrés oxidativo influye en este tipo de enlace, así como el hierro que acelera la formación de fibrillas amiloides. En la agregación no covalente se pueden ver fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína como bastones de 5-10 nm de diámetro que son insolubles y presentan una estructura  $\beta$ -helicoidal. Se ha visto que un pH más ácido, así como una concentración elevada de proteína,

favorecen la formación de fibrillas mediante un proceso de nucleación, incluso alrededor de una sola molécula de  $\alpha$ -sinucleína. (11)

#### 5.4 Influencia del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en la formación de cuerpos de Lewy

Se ha visto en experimentos *in vivo* e *in vitro* que el incremento del estrés oxidativo puede favorecer la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína. Este estrés oxidativo puede causar modificaciones en la membrana nuclear, lo que causaría la translocación de esta proteína al núcleo, lugar en el que puede formar

complejos con histonas para formar fibras amiloides. Por otro lado este estrés puede favorecer la incorporación, acumulación y oligomerización de  $\alpha$ -sinucleína extracelular en oligodendrocitos lo que incrementaría la toxicidad sobre las neuronas dopaminérgicas. (20)

Sumado a esto, el incremento de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína produce un aumento del estrés oxidativo. Los agregados incrementan el estrés oxidativo mitocondrial en neuronas dopaminérgicas lo que reduce la actividad del complejo I mitocondrial, aumentando así la producción del ROS lo que deriva en muerte celular. Esto crea un estado de muerte celular progresiva, lo que es claramente evidente en la EP. (21)

#### 5.5 Degradación de la $\alpha$ -sinucleína:

En una neurona normal la  $\alpha$ -sinucleína se degrada principalmente por el sistema ubiquinona-proteasoma y por autofagia, solo parte de ella se libera por exocitosis. Cuando la EP se ha instaurado estas vías principales tienen la función reducida, por lo que se incrementa la salida de la proteína de las neuronas por exocitosis. De esta manera la  $\alpha$ -sinucleína se propaga más fácilmente provocando neurodegeneración.

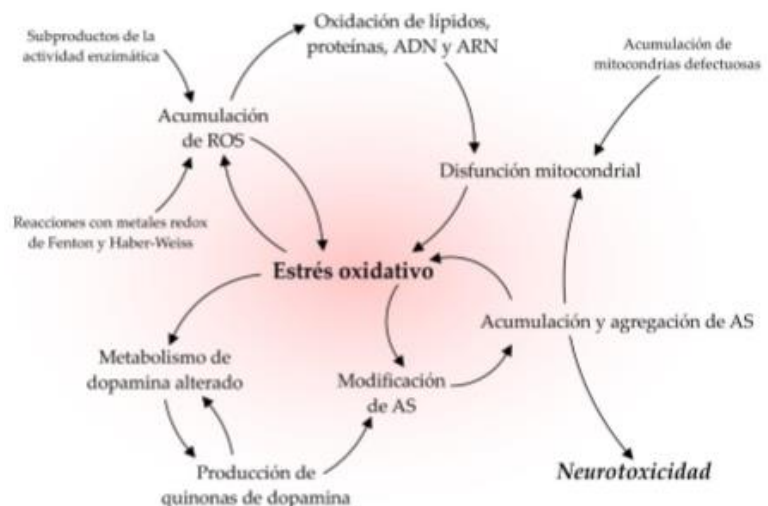
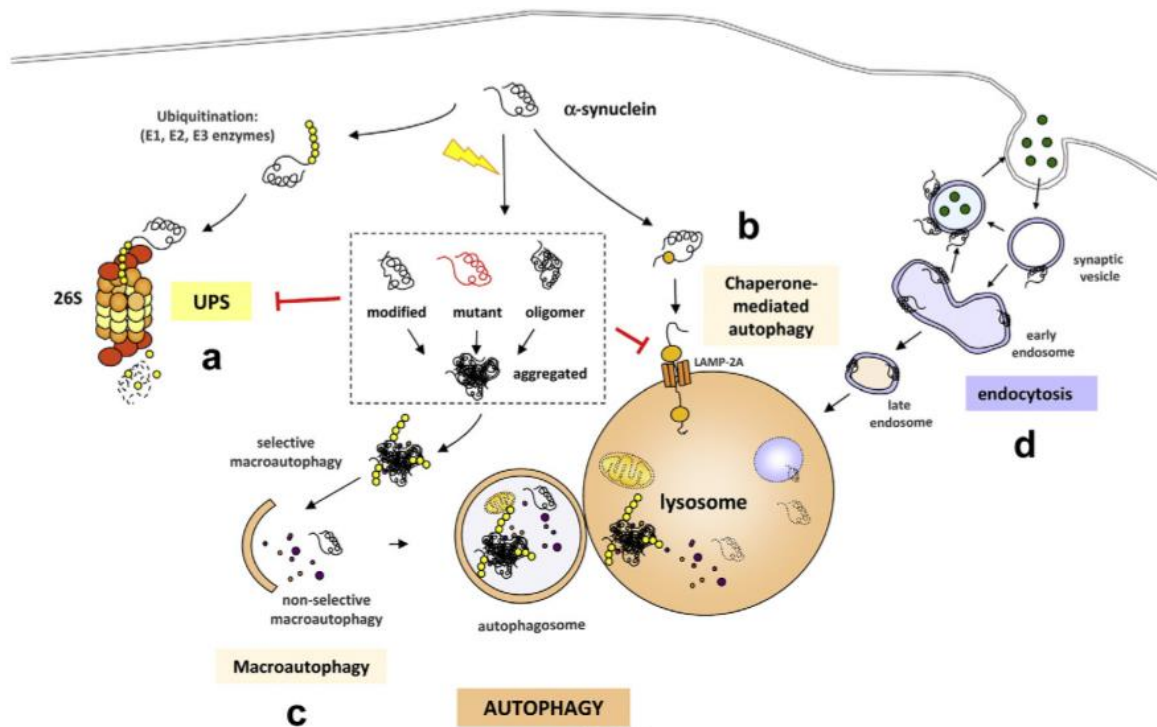


Fig. 11. Papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.



**Fig. 12. Rutas de degradación de  $\alpha$ -sinucleína. (a) Degradación por UPS. (b) Degradación mediada por chaperona. (c) Degradación por Macroautofagia. (d) Eliminación mediante endocitosis.**

### 5.5.1 Degradación por el sistema proteosoma-ubiquitina (UPS):

La mayoría de las proteínas intracelulares son degradadas por este sistema que reconoce proteínas que están dañadas o mal plegadas. Estas proteínas alteradas como la  $\alpha$ -sinucleína son reconocidas y ligadas covalentemente a la ubiquitina, después son reconocidas por el proteosoma, el cual degrada las proteínas ubiquitinadas.

Este sistema ha demostrado estar afectado por disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, lo que contribuye a una sobrecarga de  $\alpha$ -sinucleína, favoreciendo el proceso de neurodegeneración de la EP. (22)

### 5.5.2 Degradación por autofagia mediada por chaperona (AMC):

Es una vía catabólica que media la degradación selectiva en los lisosomas. Los sustratos de este proceso, incluyendo la  $\alpha$ -sinucleína se caracterizan por tener un pentapéptido señal cuya secuencia es KFERQ. Cuando el complejo de chaperonas Hsc70 detecta a la  $\alpha$ -sinucleína se une a ella formando un complejo, el cual es reconocido por un receptor de la membrana de los lisosomas (LAMP-2A).

Tras unirse ambas proteínas se forma un poro de translocación que media la internalización del sustrato, y después la  $\alpha$ -sinucleína es degradada por hidrolasas lisosomales. (23) (24)

Este mecanismo hace pensar que la vía de la AMC es una diana potencial para regular los niveles de la  $\alpha$ -sinucleína, y que el aumento de su función en la EP podría retrasar la neurodegeneración.

### 5.5.3 Degradación por macroautofagia (MA)

Al igual que el anterior es un proceso catabólico que se caracteriza por la formación de vacuolas intracelulares de doble membrana que atrapan porciones de citoplasma para degradar. La expansión de la membrana, reconocimiento de sustratos y cierre de autofagosoma es regulado por el reclutamiento y la lipidación de Atg8 o su homólogo en mamíferos LC3. Se cree que un sustrato dependiente del reconocimiento de LC3 es la proteína secuestrosoma p62/SQSTM1, la cual reconoce proteínas mal plegadas poli-ubiquitinadas que son reclutadas y degradadas por MA de forma dependiente de p62. La proteína p62 se ha encontrado en los cuerpos de Lewy que contienen  $\alpha$ -sinucleína, por lo que puede deducirse que en la EP hay un déficit de este proceso. En algunos estudios se ha comprobado que tras las aparición de formas patológicas de los cuerpos de Lewy la MA se ve inhibida, por lo que se disminuye las rutas de degradación de la proteína. (25)

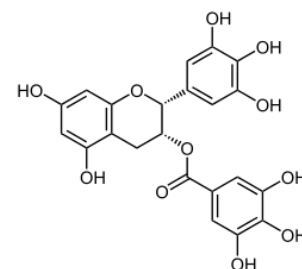
### 5.6 Inhibidores de $\alpha$ -sinucleína con interés terapéutico en la Enfermedad Parkinson

Las evidencias planteadas anteriormente sugieren que el control de la concentración de  $\alpha$ -sinucleína, a través de la inhibición de su expresión o mediante el aumento de su degradación, podría ser una potencial estrategia terapéutica neuroprotectora que podría tener un importante impacto en la modificación de la progresión de la enfermedad y eventualmente en su desarrollo sintomático.

Además, en los últimos años se ha avanzado en inmunoterapia con el objetivo que crear anticuerpos que favorezcan la eliminación de  $\alpha$ -sinucleína extracelular.

#### 5.6.1 Inhibidores de origen natural

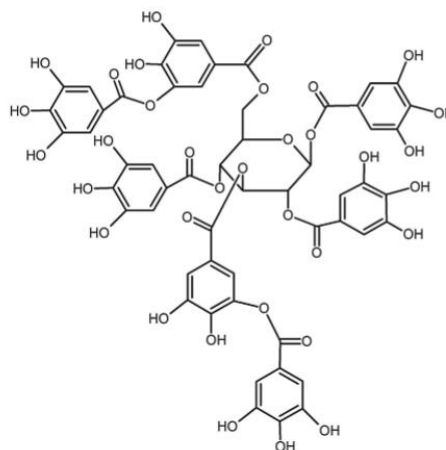
**a) Epigallocatequina galato (EGCG):** se trata de un polifenol del té verde. Este compuesto se une a cadenas polipeptídicas plegadas e inhibe la formación de la lámina  $\beta$ , ya que inmoviliza la región C-terminal y reduce el grado de unión de los oligómeros. Además presenta actividad quelante frente al hierro, evitando la formación de radicales citotóxicos. También ha demostrado disminuir los agregados al transformarlos en



**Fig.13. Molécula de EGCG**

agregados proteicos benignos. (26)

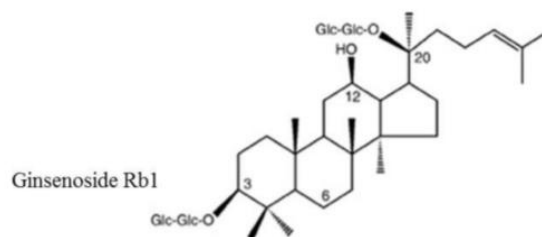
**b) RTmc:** tanino aislado de *Rhus typhina* que presenta interacción con la  $\alpha$ -sinucleína siendo capaz de formar complejos que evitan la formación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína. Sin embargo, se ha demostrado que RTmc tiene una interacción mayor con la albúmina sérica. RTmc interacciona con la  $\alpha$ -sinucleína a través de los restos de tirosina del C-terminal (Y-125, 133 y 136), hecho que se refuerza por la presencia de restos de prolina que refuerzan la unión del complejo formado.



**Fig.14. Molécula de RTmc**

Estos resultados hacen pensar que RTmc es un compuesto preventivo potente de la EP, pero la gran interacción con la albúmina sérica hace que su biodisponibilidad se vea reducida. (27)

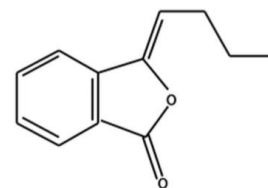
**c) Ginsenosido Rb1:** es una saponina triterpénica que podemos encontrar en el *Ginseng*. Se hizo un estudio junto a ginsenosido Rg1 y Rg3 en el cual se incubaron muestras a 37°C durante 5 días con estos compuestos y una concentración constante de  $\alpha$ -sinucleína (25 $\mu$ M). De



**Fig.15. Molécula de ginsenosido Rb1**

los 3 compuestos estudiados, solo Gn Rb1 presentó una inhibición significativa, siendo la inhibición de la agregación de un 80%. Este compuesto demostró, además, disminuir la cantidad de agregados de la proteína. (28)

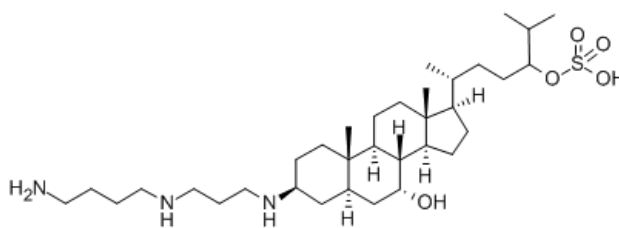
**d) N-butilidenftalida:** se ha estudiado el efecto en neuronas dopaminérgicas de *C. elegans*. Es un compuesto que se puede aislar de *Angelica sinensis* a través de cloroformo. Se observó un incremento de la actividad del proteosoma, lo que supuso una reducción de la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína,



**Fig. 16. Molécula de N-butilidenftalida**

como también de la neurodegeneración dopaminérgica. Se cree que este compuesto actúa sobre RPN-6, una subunidad del 19s del proteosoma, cuya expresión se vio incrementada en presencia del compuesto y como resultado se incrementó la actividad del proteosoma permitiendo así una mayor degradación de  $\alpha$ -sinucleína. (29)

**e) Escualamina:** aislado del tejido de *Squalus acanthias*, es capaz de disminuir la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína y su toxicidad *in vivo* e *in*



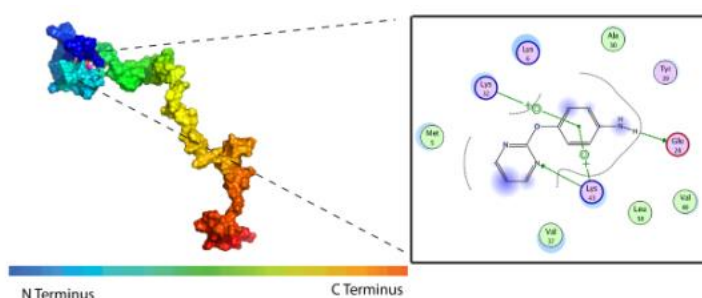
**Fig. 17. Molécula de escualamina**

*vitro*. Su mecanismo se basa en desplazar a la proteína de su localización fisiológicamente activa en las membranas de las vesículas sinápticas. Además, actúa sobre los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína del espacio extracelular evitando su unión a las membranas neuronales, por tanto su entrada en otras neuronas. (30)

### 5.6.2 Inhibidores de origen sintético

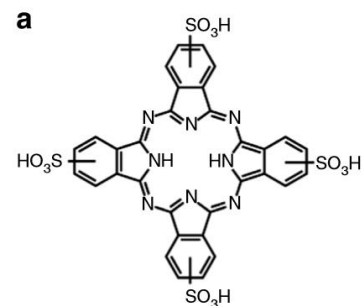
Las moléculas pequeñas capaces de evitar la agregación de  $\alpha$ -sinucleína, evitando así la formación de los cuerpos de Lewy, y capaces de atravesar la barrera hematoencefálica son candidatos potenciales a fármacos.

a) **ELN484228**: es una molécula que se seleccionó entre varias posibles candidatas de estructura relacionada. A pesar de no inducir la inhibición de la formación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína *in vitro*, se observó que sí



era efectiva cuando se estudió frente a dos **Fig. 18. Interacción entre ELN484248 y  $\alpha$ -sinucleína** cultivos celulares que presentaban sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína. Sin embargo, en aquellos cultivos con una expresión normal no se producía inhibición. Además se observó una disminución de la neurotoxicidad en presencia de ELN484228. (31)

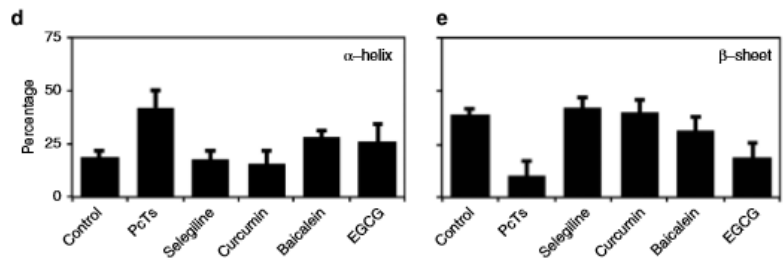
b) **Tetrasulfonato de ftalocianina (PcTS)**: se une al sitio de unión de las vesículas estabilizando la conformación helicoidal de  $\alpha$ -sinucleína evitando el mal plegamiento, la agregación patogénica y la formación de la lámina  $\beta$ . Por un lado la región N-terminal de  $\alpha$ -sinucleína se puede unir a vesículas cargadas negativamente y plegarse en forma de hélice  $\alpha$ , al mismo tiempo se puede agregar y formar fibrillas al contactar con vesículas fosfolipídicas en la región NAC.



**Fig. 19. Molécula de PcTS**

Se ha revelado que la forma del interferir con la agregación de  $\alpha$ -sinucleína es mediante la unión de PcTS a los restos Y39 (Tyr) y F94 (Phe), interacción que libera parcialmente el dominio NAC de la superficie de la membrana de la vesícula evitando el mal plegamiento. (32)

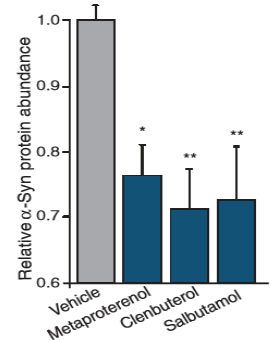
En otros estudios se ha visto que la interacción es de tipo aromática y se ha señalado al resto Y39 como el principal implicado en la inhibición de la fibrilación de  $\alpha$ -sinucleína. (33)



**Fig. 20. Porcentaje de expresión de hélice  $\alpha$  (izq.) y lámina  $\beta$  (der.) frente a diferentes compuestos.**

### 5.6.3 Inhibidores cuya principal indicación no es antiparkinsoniana

**a) Salbutamol, metaprotenerol y clenbuterol:** se ha descrito que el receptor adrenérgico  $\beta_2$  es un regulador del gen de la  $\alpha$ -sinucleína y que sus ligandos son capaces de modular la transcripción de SNCA a través de la acetilación de H3K27. Se ha comprobado que los agonistas de este receptor reducen los niveles de acetilación de H3K27 en la región del promotor, así como en dos secuencias intrónicas de SNCA lo que se traduce en una menor abundancia de  $\alpha$ -sinucleína. (34)

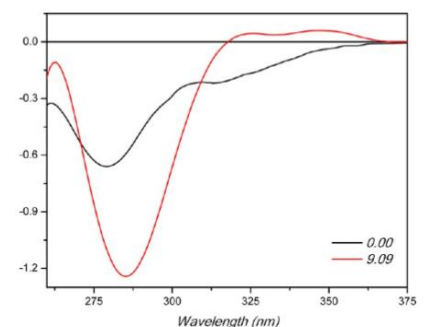


**Fig. 21. Abundancia de  $\alpha$ -syn frente a agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos**

No.	Name	Class	Structure	FDA approved	Indication	Blood-brain penetrant
1.	Metaproterenol	$\beta_2$ -Adrenoreceptor Agonist		Yes	Asthma	No
2.	Clenbuterol	$\beta_2$ -Adrenoreceptor Agonist		No	Asthma	Yes
3.	Salbutamol	$\beta_2$ -Adrenoreceptor Agonist		Yes	Asthma	Yes

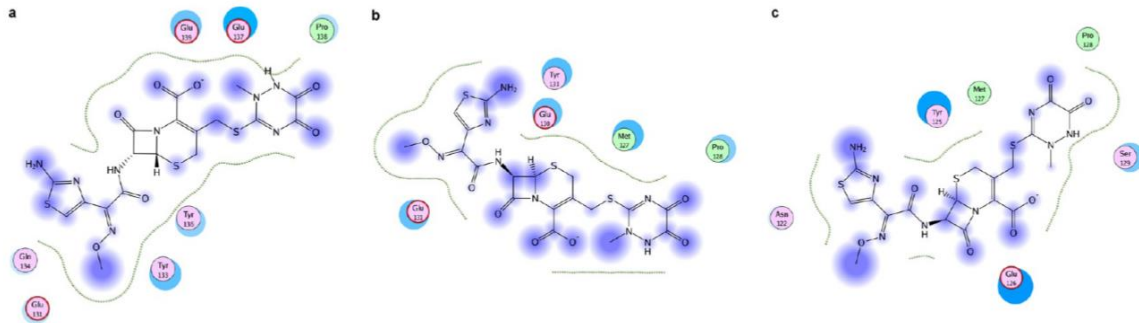
**Fig. 22. Agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos que presentan actividad frente a  $\alpha$ -sinucleína**

**b) Ceftriaxona:** por espectroscopía UV se comprobó la disminución de intensidad de señal de  $\alpha$ -sinucleína gracias a la afinidad de  $\alpha$ -sinucleína por este antibiótico. Se ha sugerido que ceftriaxona impide la agregación de  $\alpha$ -sinucleína actuando sobre la formación de protofibrillas. Se ha visto que las tirosinas (Y125, 133, 136) del C-terminal juegan un papel crucial en la fibrilación, ya que ésta disminuye al sustituirlas por restos de alanina. La región central hidrofóbica NAC también desempeña un papel importante. Las



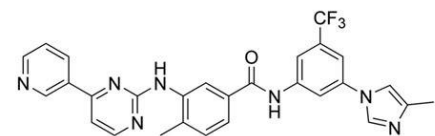
**Fig. 23. Señales UV de  $\alpha$ -sinucleína con ceftriaxona (negro) y sin ceftriaxona (rojo)**

interacción entre ceftriaxona y  $\alpha$ -sinucleína se puede realizar en 3 posibles conformaciones, en todas las cuales se observa al menos algún resto tirosínico implicado en la fibrilación interactuando con el antibiótico. (35)



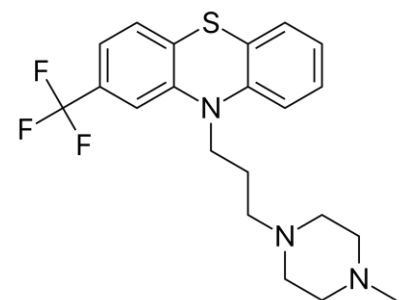
**Fig. 24. Diferentes conformaciones en las que interacciona la ceftriaxona con  $\alpha$ -sinucleína**

**c) Nilotinib:** induce la autofagia al inhibir a la tirosina quinasa Abl, por lo que promueve una mayor eliminación de  $\alpha$ -sinucleína, incrementa los niveles de dopamina y mejora las funciones cognitivas y motoras. En ensayo preclínicos se comprobó que era capaz de penetrar la BHE e inhibir a TK Abl, lo que producía una disminución del estrés oxidativo y protege las neuronas dopaminérgicas. Los estudios se hicieron con dosis de 150mg y 300mg, observándose tras dos meses de tratamiento una disminución de la cantidad de  $\alpha$ -sinucleína. Esto hace pensar que el Nilotinib puede estabilizar los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en la EP. Sin embargo, tras seis meses con la misma dosis apenas se observaron cambios. (36)



**Fig. 25. Molécula de Nilotinib**

**d) Trifluoperazina:** un nuevo modelo de estudio permitió demostrar el efecto beneficioso del fármaco gracias a un actividad inductora de la autofagia, actividad que redujo selectivamente la presencia  $\alpha$ -sinucleína, así como permitió rescatar neuronas dopaminérgicas. (37)



**Fig. 26. Molécula de Trifluoperazina**



#### 5.6.4 Inhibidores en ensayo clínico:

En los últimos años la hipótesis de que las formas tóxicas  $\alpha$ -sinucleína se propaga de neurona en neurona en forma de prion ha tomado fuerza. (38)

Una de las estrategias se ha basado en el desarrollo de anticuerpos capaces de capturar las formas tóxicas de  $\alpha$ -sinucleína antes o cuando están siendo liberadas.

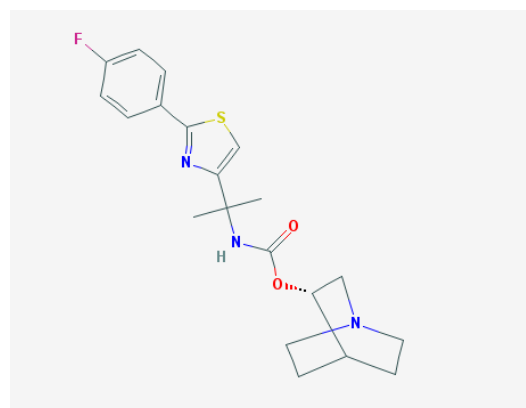
**RO7046015** es un Ac específico de  $\alpha$ -sinucleína que se encuentra en fase II. En ensayos preclínicos demostró reducir la neurodegeneración y la liberación de  $\alpha$ -sinucleína en un modelo de ratón con EP, en fase I mostró una buena tolerancia en pacientes con EP. Otro Ac en fase II es **BIIB054**, los resultados promotores de la fase I han permitido avanzar en la investigación.

Otra de posibilidad es el desarrollo de vacunas que estimulen al SI a producir Ac frente a  $\alpha$ -sinucleína. **PD01A** y **PD03A** son dos vacunas en fase I. En 2016 PD01A mostró que 12 de 22 (55%) pacientes tratados generaron Ac específicos frente a  $\alpha$ -sinucleína.

**Qbeta** es una vacuna basada en un virus bacteriófago ARN conjugado con péptidos de  $\alpha$ -sinucleína humana. Los anticuerpos generados tenían como diana a la región C-terminal de la proteína. Se observó además que Qbeta presentaba mayor afinidad por la forma oligomérica de la proteína que por la monomérica, así como elevada afinidad por los cuerpos de Lewy, siendo capaz de neutralizarlos. (39)

Dentro de este grupo también encontramos fármacos de origen sintético. **NPT200-11** es una molécula que actúa bloqueando el mal plegamiento de la  $\alpha$ -sinucleína, se encuentra en fase I.

**Venglustat (SAR402671)** es una molécula pequeña oral en fase II activa por vía oral, capaz de penetrar a través de la BHE e inhibir la actividad glucosilceramida sintasa impidiendo la formación de glucosilceramida, un glucoesfingolípido que se cree que se une a la  $\alpha$ -sinucleína y promueve su agregación. En un modelo de un ratón con EP se vio que la inhibición de la actividad glucosilceramida sintasa redujo la acumulación de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína. (40)



**Fig. 27. Molécula de Venglustat o SAR402671**

## 6. CONCLUSIÓN:

La enfermedad de Parkinson se asocia la sobreexpresión o incremento de  $\alpha$ -sinucleína como una de los principales causas de la enfermedad, por lo que una buena estrategia es la que trata de disminuir sus niveles para evitar la formación de los cuerpos de Lewy. Se han estudiado diferentes métodos de abordar este problema, desde evitar la formación de agregados hasta restablecer el funcionamiento normal de los sistemas celulares de degradación de la  $\alpha$ -sinucleína. Algunas de las moléculas potencialmente útiles tienen origen natural, aunque no se tiene claro el mecanismo por el que actúan. Otras moléculas presentan gran afinidad por la región NAC o por la región C-terminal de la proteína, regiones implicadas en el mal plegamiento proteico que origina la formación de los cuerpos de Lewy.

Gracias a estudios epidemiológicos se determinó que fármacos con diferentes indicaciones disminuyen la incidencia de esta enfermedad. Además, también se puede considerar prometedor el desarrollo de anticuerpos y vacunas capaces de estimular al sistema inmunitario en presencia de  $\alpha$ -sinucleína.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Rosa González ME, Vallejo Hernández R, Gómez González del Tánago P, López Llerena A, Plaza Oliver D, Campanario León A, et al. Panadero Carlavilla, FJ. (2016) Panorama Actual del Medicamento 40: 264-281.
2. Gómez Chavarín M, Roldán Roldán G, Morales Espinosa R, Pérez Soto G, Torner Aguilar C. (2012) Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson. Arch Neurocienc; 17: 25-33.
3. Mhyre TR, Boyd JT, Hamill RW, Maguire-Zeiss KA. (2012) Parkinson's Disease. Subcell Biochem 65: 389-455.
4. Hurtado F, Cárdenas MAN, Cárdenas F, León LA. (2016). Etiología, Tratamientos y Factores Preventivos Universitas Psychologica 15: <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.upsy15-5.epet>.
5. Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, Takahashi H. (2012) The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders. Mol Neurobiol 47: 495-508.
6. Bisaglia M, Filograna R, Beltramini M, Bubacco L. (2013) Are dopamine derivatives implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease? . Ageing Res Rev 13: 107-114.
7. Luquin Piudo MR, Alonso-Navarro H, Burguera Hernández JA, Jiménez-Jiménez FJ. (2015) Protocolo diagnóstico y terapéutico de los síndromes parkinsonianos. Medicina 11: 4487-4489.
8. Costa Ribas C, Castiñeira Pérez C. (2014) <https://www.fisterra.com/guias-clinicas/enfermedad-parkinson/>
9. Lladó A, Gaig C, Molinuevo JL. (2006) Genética de las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes. Medicina Clínica. 126: 662-670.
10. Delgado LM. Caracterización del efecto de latrepirdina en modelos de sobreexpresión de

- alfa-sinucleína. Tesis doctoral. Santiago de Chile: Universidad Andrés Bello, Departamento de Biotecnología; 2017.
11. Fernández Espejo E. (2013) Agregación de alfa-sinucleína y degeneración parkinsoniana. *Fisiología* 16: 17-19.
  12. Urrea L. Funciones de la proteína priónica celular, alfa-sinucleína y reelina en enfermedades neurodegenerativas. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología; 2018.
  13. Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, et al. (2011) Increased Expression of Alpha-Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering After Endocytosis. *Neuron*; 65: 66-79.
  14. Reeve A, Ludtmann M, Angelova P, Simcox E, Horrocks M, Klenerman D, et al. (2015) Aggregated alpha-synuclein and complex I deficiency: exploration of their relationship in differentiated neurons. *Cell Death Dis* 6: e1820.
  15. Tabrez S, Jabir NR, Shakil S, Greig NH, Alam Q, Abuzenadah AM, et al. (2012) A Synopsis on the Role of Tyrosine Hydroxylase in Parkinson's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 11: 395-409.
  16. Gorbatyuk OS, Li S, Nguyen FN, Manfredsson FP, Kondrikova G, Sullivan LF, et al. (2010) Alpha-Synuclein Expression in Rat Substantia Nigra Suppresses Phospholipase D2 Toxicity and Nigral Neurodegeneration. *Mol Ther*; 18: 1758-1768.
  17. Fauerbach JA. Caracterización de las etapas tempranas de la agregación de alfa-sinucleína in vitro mediante sondas fluorescentes ES IPT y microscopia de fuerza atómica. Tesis doctoral. Buenos Aires: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Orgánica; 2013.
  18. Rodríguez Leyva I. Guías prácticas del manejo de las demencias (2015) *Rev Mex Neuroci* 16 (suplemento 1): S1-S129
  19. Shults CW. (2006) Lewy bodies. *P Natl Acad Sci USA* 103: 1661-1668.
  20. Miotto MC. Cobre, daño oxidativo y agregación amiloide: Un enfoque estructural sobre la proteína alfa-sinucleína, implicada en la enfermedad de Parkinson. Tesis doctoral. Universidad de Rosario, Argentina: Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Departamento de Ciencias Químicas, 2017.
  22. Martínez-Vicente M, Vila M (2013) Alpha-synuclein and protein degradation pathways in Parkinson's disease: A pathological feed-back loop. *Exp Neurol* 247: 308-313.
  23. Alarcón A, Santamaría del Ángel A, Königsberg M. (2010) Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial. *Revista de Educación Bioquímica* 29: 92-100.
  24. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. (2004) Impaired Degradation of Mutant alpha-Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science* 305: 1292-1295.
  25. Tanji K, Mori F, Wakabayashi K. The role of Atg8 homologue in lewy body disease. En: Hayat MA (editor). *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, vol. 2. Elsevier, 2014.
  26. Aroca RM, Vidal P. Moléculas de origen natural con capacidad antiagregante de alfa-sinucleína in vitro. Tesis de pregrado. Santiago de Chile : Universidad Nacional Andrés Bello, Facultad de Medicina; 2015.
  27. Sekowski S, Ionov M, Abdulladjanova N, Makhmudov R, Mavlyanov S, Milowska K, et al. (2017) Interaction of alpha-synuclein with *Rhus typhina* tannin - Implication for Parkinson's disease. *Colloid Surface B*. Abril; 155: 159-165.
  28. Ardah MT, Paleologou KE, Lv G, Menon SS, Khair S, Lu J, et al. (2015) Ginsenoside Rb1

- inhibits fibrillation and toxicity of alpha-synuclein and disaggregates preformed fibrils. *Neurobiol Dis.* 74: 89-101.
29. Fu R, Harn HJ, Liu SP, Chen CS, Chang W, Chen YM, et al (2014) n-Butylidenephthalide protects against dopaminergic neuron degeneration and alpha-synuclein accumulation in *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease. *PLOS ONE* 9: e85305.
  30. Pineda A, Burré J. (2017) Modulating membrane binding of alpha-synuclein as a therapeutic strategy. *P Natl Acad Sci USA.* 114: 1223-1225.
  31. Tóth G, Gardai SJ, Zago W, Bertoncini CW, Cremades N, Roy SL, et al. Targeting the intrinsically disordered structural ensemble of alpha-synuclein by small molecules as a potential therapeutic strategy for Parkinson's disease. *PLOS ONE.* 2014 9: e99274
  32. Lamberto GR, Binolfi A, Orcellet ML, Bertoncini CW, Zweckstetter M, Griesinger C, et al. (2009) Structural and mechanistic basis behind the inhibitory interaction of PcTS on alpha-synuclein amyloid fibril formation. *P Natl Acad Sci USA.* 106: 21057-21062
  33. Fonseca-Ornelas L, Eisbach SE, Paulat M, Giller K, Fernández CO, Outeiro TF, et al. (2014) Small molecule-mediated stabilization of vesicle-associated helical alpha-synuclein inhibits pathogenic misfolding and aggregation. *Nature Commun.* 5: 5857.
  34. Mittal S, Bjornevik K, Im DS, Flierl A, Dong X, Locascio JJ, et al. (2017)  $\beta$ 2-adrenoreceptor is a regulator of the alpha-synuclein gene driving risk of Parkinson's disease. *Science.* Septiembre; 357: 891-898.
  35. Ruzza P, Siligardi G, Hussain R, Marchiani A, Islami M, Bubacco L, et al. (2013) Ceftriaxone blocks the polymerization of alpha-synuclein and exerts neuroprotective effects in vitro. *ACS Chem Neurosci* 5: 30-38.
  36. Pagan F, Hebron M, Valadez EH, Torres-Yaghi Y, Huang X, Mills RR, et al. (2016) Nilotinib effects in Parkinson's disease and dementia. *J Parkinson Dis.* Julio; 6: 503-517.
  37. Höllerhage M, Goebel J, de Andrade A, Hildebrandt T, Dolga A, Culmsee C, et al. (2014) Trifluoperazine rescues human dopaminergic cells from wild-type  $\alpha$ -synuclein-induced toxicity. *Neurobiol Aging.* Julio; 35(7): 1700-1711.
  38. Bernis ME, Babila JT, Breid S, Wüsten KA, Wüllner U, Tamgüney G. (2015) Prion-like propagation of human brain-derived alpha-synuclein in transgenic mice expressing human wild-type alpha-synuclein. *Acta Neuropathol.*; 3: 75
  39. Doucet M, El-Turabi A, Zabel F, Hunn BHM, Bengoa-Vergniory N, Cioroch M, et al. (2017) Preclinical development of a vaccine against oligomeric alpha-synuclein based on virus-like particles. *PLOS ONE* 12: e0181844.
  40. Kingwell K (2017) Zeroing in on neurogenerative alpha-synuclein. *Nature Rev Drug Discov* 16: 371-373.