



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
**" α -SINUCLÉINA COMO DIANA PARA
EL DISEÑO DE FÁRMACOS"**

Química Farmacéutica

Autor: Raquel García Sanz

Tutor: José Carlos Menéndez Ramos

Convocatoria: Junio 2018

ÍNDICE

1) Resumen.....	2
2) Objetivo.....	3
3) Metodología.....	3
4) Resultados y discusión	
4.1 Estructura de la α -sinucleína.....	3
4.2 Funciones fisiológicas.....	4
4.3 Conformaciones.....	4
4.4 Cuerpos de Lewy.....	5
4.5 Sinucleinopatías.....	7
4.6 Conexión entre las enfermedades de Parkinson y Alzheimer.....	9
4.7 Mecanismos de toxicidad.....	10
4.8 Terapéutica y objetivos terapéuticos.....	13
4.9 Fármacos dirigidos.....	16
5) Conclusiones.....	18
6) Bibliografía.....	19

1. Resumen

La α -sinucleína es una proteína con una estructura claramente definida, gracias a la cual puede presentar diversas funciones fisiológicas. La capacidad que posee para adoptar distintas conformaciones la convierte en potencialmente tóxica y por tanto le aporta la posibilidad de desencadenar una serie de patologías, las cuales son conocidas en la actualidad como sinucleinopatías. En ellas las proteínas aparecen agregadas o “mal plegadas”, teniendo consecuencias muy perjudiciales sobre la salud. Las sinucleinopatías no son las únicas alteraciones proteicas consideradas como patológicas en la actualidad, son varias las proteínas en estudio las cuales dejan vislumbrar una posible conexión y solapamiento entre sus mecanismos y consecuencias, desencadenando enfermedades tan notables como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer.

Los mecanismos de toxicidad que desarrollan, las conformaciones que adoptan y los posibles objetivos terapéuticos que se deben perseguir para prevenir las proteinopatías se encuentran en investigación activa y no hay una línea cerrada de trabajo, se plantea abierto un amplio abanico de posibilidades del cual se deberán esclarecer todas las incógnitas para lograr el desarrollo definitivo de fármacos eficaces que frenen las patologías.

2. Objetivos

Conocer con detalles la estructura, función, mecanismos y aplicaciones de la proteína alfa-sinucleína, a la vez que obtener información sobre los continuos avances y descubrimientos que se están efectuando en el campo de la investigación para lograr conocer una posible solución terapéutica que frene el grave problema de toxicidad que supone el plegamiento de esta proteína.

Con todo ello se va a tratar de dar una visión clara y ordenada de los distintos enfoques que se pueden dar de su mecanismo de toxicidad y la aplicación de estos conocimientos al descubrimiento de fármacos.

3. Metodología

Para llevar a cabo este trabajo de investigación bibliográfica se han utilizado buscadores tales como PubMed, Google Académico, Scifinder o Web of Science. También se han empleado para la elaboración del trabajo una serie de artículos científicos de fiabilidad confirmada.

Palabras clave: α -sinucleína, sinucleinopatías, proteinopatías, enfermedad de Parkinson, toxicidad, terapéutica, mecanismos.

4. Resultados y Discusión

4.1 La alfa-sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos, con tres regiones claramente diferenciadas. Presenta un extremo carboxilo terminal (aa 96-140), el cual está cargado negativamente; un extremo amino terminal (aa 1-60), cargado positivamente, y entre ambos, se encuentra el segmento hidrofóbico central, concretamente entre los residuos 61 y 95, al cual también se le conoce con el nombre de componente no-amiloideo o NAC y es el segmento fundamental de la molécula que participa en la formación de los futuros agregados tóxicos.

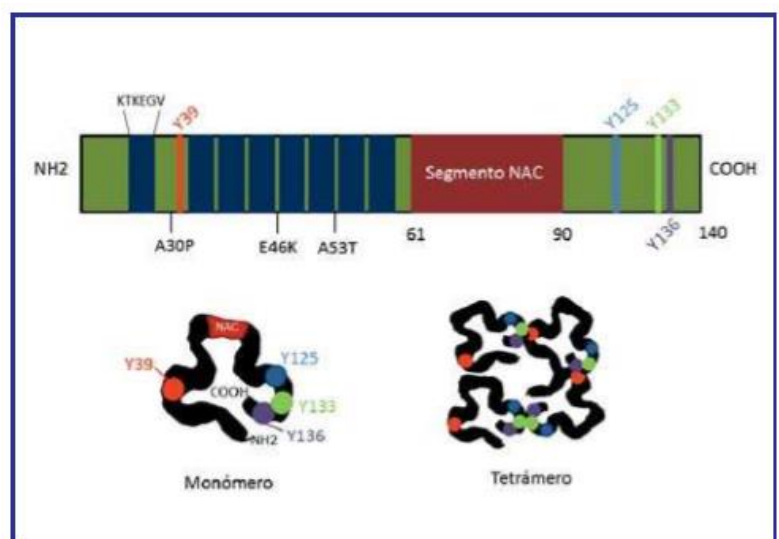


Imagen 1: Estructura de la proteína α -sinucleína

Los cambios **estructurales** observados en la alfa-sinucleína dependen de las tirosinas (Y) que posee la molécula. La sinucleína presenta cuatro residuos de tirosina: Y39, el cual está próximo al extremo amino y parece ser el residuo esencial en la formación de las fibrillas de proteína, pero no participa en la formación de los agregados covalentes; Y125, Y133 e Y136, cercanos al extremo carboxilo y responsables de la agregación final en forma de cuerpos de Lewy.

En el extremo amino se encuentra la secuencia de repetición KTKEGV, lo que indica que es una proteína de unión a lípidos, debido a esta secuencia “de fijación lipídica”.

La alfa-sinucleína se localiza principalmente en los terminales presinápticos de las neuronas, aunque también se puede encontrar en diversos fluidos, tales como: líquido cefalorraquídeo, sangre o espacio extracelular neuronal. Esto demostraría la capacidad que tiene la proteína de transportarse de neurona a neurona y el hecho de que pueda ser segregada por las neuronas al medio extracelular. Este fenómeno la relaciona con la progresión de enfermedades neurodegenerativas, como la de Parkinson.¹

4.2 Las funciones fisiológicas de la α -sinucleína como proteína implican su participación en el almacenamiento, compartimentación y reciclaje de neurotransmisores (en concreto de la dopamina); también interviene en la regulación de determinadas enzimas y en el aumento del número de moléculas transportadoras de dopamina. Se ha propuesto el reciclaje de las vesículas sinápticas, a través de fosfolipasa D2, como la principal función de la α -sinucleína; la capacidad de reciclado de vesículas sinápticas en las terminales nerviosas es una característica propia de la sinapsis del sistema nervioso, ya que por su reducido número deben reutilizarse durante el periodo de inicio de la actividad neuronal.

Estudios recientes demuestran también que la α -sinucleína se comporta como chaperona molecular, ya que media el plegamiento y desplegamiento de proteínas sinápticas llamadas SNARE (receptores de proteína de fijación soluble de NSF), las cuales son fundamentales para la liberación de neurotransmisores, el reciclado de las vesículas anteriormente mencionado y la integridad de la sinapsis. Se vincula también con funciones antioxidantes de fosfolípidos de membrana, que se perderían en caso de acumularse la α -sinucleína en forma fibrilar, alterando a su vez la degradación de otras proteínas por el sistema proteosomal.²

4.3 Como proteína puede presentar diversas **conformaciones**, las cuales han sido clasificadas en nativas y potencialmente tóxicas. Las *conformaciones nativas* son los monómeros y tetrámeros; en un primer momento se pensó que la α -sinucleína nativa se encontraba en forma de monómero, pero estudios más recientes han revelado que en realidad se presenta en forma oligomérica, la cual ayuda a proteger a su componente β no-amiloide, es decir, la región

NAC. Las mutaciones de α -sinucleína que incluyen A53T y E46K provocan una desestructuración de la forma tetramérica y aumentan el porcentaje de conformación monomérica. No se puede afirmar con seguridad que una determinada conformación sea la responsable de desencadenar la toxicidad, ni siquiera entre las conformaciones nativas, y por tanto esta dependerá de la localización celular de la proteína y de sus interacciones con la membrana.

En cuanto a las *conformaciones tóxicas*, se suele admitir que son los oligómeros (conformaciones solubles) y fibrillas (conformaciones insolubles en forma de lámina β , altamente ordenadas). Son varios los factores que potencian la aparición de esta estructura de oligómero: ácidos grasos poliinsaturados (mientras que los saturados disminuyen la proporción), ambientes levemente ácidos (endosomas y lisosomas), una baja cantidad de lípidos cargados negativamente y vesículas lipídicas. Posteriormente son estos mismos oligómeros los que sufrirán cambios conformacionales y se convertirán en oligómeros más estables y compactos, paso previo antes de adoptar la conformación de fibrillas y causar así un mayor estrés oxidativo. Determinar cuál de las dos conformaciones tóxicas resulta más dañina en cuanto a pérdida de células dopaminérgicas, deterioro sináptico y causante de daño motor en la enfermedad, resulta imposible en la actualidad, por lo que continuar con estudios que determinen más a fondo el papel de las diferentes conformaciones de α -sinucleína será esencial para la comprensión total de la toxicidad de la proteína y progresión de las enfermedades.

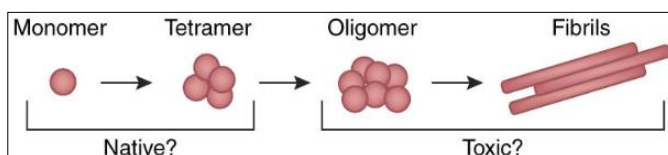


Imagen 2: conformaciones de la α -sinucleína

Algunos de los estudios más recientes han permitido la identificación de diferentes cepas de α -sinucleína, las cuales presentan distintas conformaciones y por lo tanto, propiedades diferentes en cuanto a la estructura y toxicidad. Estas *cepas diferenciales* pueden surgir de manera natural o como resultado de preparaciones experimentales para la formación de estructuras de α -sinucleína de mayor nivel, como pueden ser las fibrillas y/o oligómeros. Las diferencias encontradas entre cepas de α -sinucleína están presentes entre las diferentes especies, también entre las diferentes sinucleinopatías y contribuyen a la variabilidad del paciente, en factores como la tasa de progresión de la patología o el comienzo de la misma.¹

4.4 La sinucleína es a su vez el componente principal de los **cuerpos de Lewy (LB)**, en forma de filamentos que tienen una longitud comprendida entre 200 y 600 nm de largo y de 5 a 10 nm de diámetro. Los cuerpos de Lewy son inclusiones eosinófilas que se encuentran entre las células de la sustancia negra de neuronas dopaminérgicas; en un primer momento se consideraron marcadores patológicos de la enfermedad del Parkinson, pero más adelante se observó su presencia también en otras enfermedades neurodegenerativas, como son la enfermedad de Alzheimer y la demencia con cuerpos de Lewy (DCL), de las que se hablará más adelante. Además de sinucleína, los cuerpos de Lewy están formados por otras proteínas como son la ubiquitina y la parkina, las proteínas de choque térmico, las subunidades del proteosoma y neurofilamentos. Se debe tener en cuenta que los cuerpos de Lewy pueden representar a su vez una respuesta defensiva del organismo, la cual tenga por objetivo el evitar la citotoxicidad inherente de las proteínas que en ellos se acumulan.³

En condiciones normales, de no patología, la α -sinucleína se encuentra en su conformación nativa no plegada, pero a medida que se incrementa su concentración se favorece la formación de estructuras más compactas, como son los oligómeros, en forma de placas β , llamadas protofibrillas; estas fibras al sedimentar forman fibras amiloides dentro de los cuerpos de Lewy. La formación de cuerpos de Lewy depende del balance entre la tendencia de la α -sinucleína de agregarse en forma espontánea y la capacidad de sistemas tales como las chaperonas y la vía ubiquitina-proteosoma, de eliminar la proteína antes de que llegue a su concentración crítica.⁴

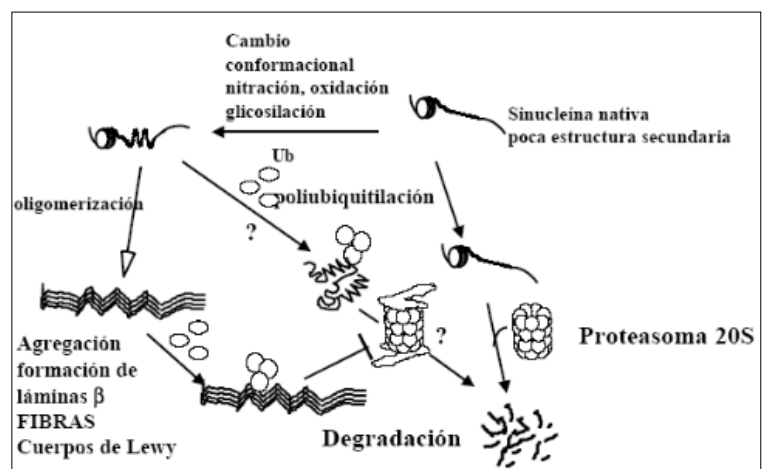


Imagen 3: mecanismo de formación de los cuerpos de Lewy

Las etapas que sigue la α -sinucleína para la formación de los cuerpos de Lewy son las siguientes:

1. Aparición de monómeros de α -syn en disposición β -helicoidal o protofibrillas
2. Formación de oligómeros de protofibrillas
3. Formación de fibrillas amiloides
4. Agregación de las fibrillas en forma de LB⁵

Son tres los genes que están implicado en la formación de los cuerpos de Lewy y que a su vez se asocian con el desarrollo de la enfermedad del Parkinson: PARK1, PARK2 y PARK5. Estos genes se encargan de codificar la α -sinucleína, entre otras proteínas, y en la actualidad aún se desconoce cómo se asocian estos genes al estrés oxidativo y cómo sus mutaciones influyen con exactitud en el desarrollo de los cuerpos de Lewy. En este sentido hay investigaciones que muestran que las mutaciones Ala53Thr y Ala30Pro en el gen PARK1 aumentan la tendencia de la α -sinucleína para formar protofibrillas dentro de los cuerpos de Lewy, de manera que generan citotoxicidad haciendo que los cuerpos de Lewy se conviertan en estructuras dañinas para las neuronas. El aumento en la concentración de α -sinucleína incrementa la capacidad de formar fibrillas, lo que provoca un colapso de las proteínas, las cuales van a ver alteradas sus funciones y favorecida su toxicidad; estas fibrillas de sinucleína alteran la integridad de la membrana de las vesículas sinápticas formando poros, hecho que se ve favorecido por las mutaciones del gen PARK1 ya mencionadas y por el estrés oxidativo, y será a través de esos poros preformados por los que se produzca la salida de la dopamina al citoplasma, con la consiguiente toxicidad característica de la enfermedad de Parkinson.³

4.5 La etiología de estas enfermedades no es todavía conocida con exactitud. La acumulación de α -sinucleína mal plegada ocupa la hipótesis central en el desarrollo de la patogénesis del Parkinson, y también en cierta medida, de otras **sinucleinopatías** relacionadas como son la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y la atrofia multisistémica (MSA). Estas tres enfermedades degenerativas se engloban con el nombre de sinucleinopatías y se desencadenan tras el depósito anormal de la proteína α -sinucleína en el citoplasma de neuronas o de células gliales. Se procede a dar una visión resumida de las tres patologías:

- * *Demencia por Cuerpos de Lewy (DCL)*: enfermedad neurodegenerativa que supone el 10-25% de todas las demencias de la población general y es la segunda causa de demencia degenerativa, en el anciano, tras la enfermedad del Alzheimer. Se caracteriza clínicamente por deterioro cognitivo, rasgos de demencia frontal, fluctuaciones, parkinsonismo y alucinaciones visuales. Su confirmación diagnóstica se realiza por anatomía patológica postmortem, con la presencia de abundantes cuerpos de Lewy en las neuronas de la corteza fundamentalmente y otras zonas cerebrales. La causa que desencadena esta enfermedad es desconocida, hay hipótesis que señalan a factores ambientales y genéticos. El tratamiento es complicado y en la actualidad sólo hay posibilidad de un tratamiento sintomático.⁶

- * *Atrofia Multisistémica (MSA)*: trastorno neurodegenerativo esporádico de etiología no precisada, caracterizado por parkinsonismo, trastornos cerebelosos, disfunción autonómica y piramidalismo; los hallazgos patológicos comprenden pérdida celular y presencia de inclusiones intracitoplasmáticas oligodendrogiales y neuronales, ubiquitina, tau y α -sinucleína positivas. La prevalencia es mucho menor (4/100000) y afecta tanto a hombres como mujeres, teniendo su comienzo en la sexta década de vida como promedio.⁷
- * *Enfermedad de Parkinson (EP)*: enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta al 1% de la población mayor de 60 años y en la que la edad es un factor de riesgo importante; es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, después de la de Alzheimer. En ella se ve especialmente afectado el sistema nigroestriatal dopaminérgico, con la consiguiente pérdida de control del sistema motor (temblor en reposo, lentitud para iniciar movimientos y rigidez muscular); a medida que la enfermedad progresa se encuentran limitaciones en todos los aspectos físicos del paciente. La degeneración se sufre fundamentalmente en la sustancia negra, siendo a su vez característica la presencia de cuerpos de Lewy en los núcleos del encéfalo; todo esto se traduce en una importante disminución del contenido de dopamina en el núcleo del estriado, siendo esta pérdida la principal responsable de la aparición de los primeros síntomas motores de la enfermedad y también de algunos no motores.^{8,9} Su origen es desconocido, exceptuando algunos casos en los que se tienen indicios de que han sido inducidos por traumatismo, drogodependencias y medicamentos, y también ciertos factores genéticos. Es una patología crónica, que en la actualidad no tiene curación, a pesar de que sí hay un tratamiento farmacológico implantado; por tanto, el objetivo del tratamiento hasta el momento es reducir la velocidad de progresión de la enfermedad y poder controlar así, de una mejor manera, los síntomas y efectos secundarios derivados de los fármacos que se usan para combatirla.⁴

Hoy en día, la fisiopatología de estas tres enfermedades no se comprende en su totalidad; mientras que en la enfermedad de Parkinson y en la demencia por cuerpos de Lewy los depósitos de α -sinucleína constituyen el principal componente de los cuerpos de Lewy y de las neuritas distróficas (aquellas que se encuentran en expansión), y en menor proporción en las células gliales, en la atrofia multisistémica la α -sinucleína se aglomera en inclusiones citoplasmáticas de células oligodendrogiales y en las neuronas, y también en las neuritas

distróficas del tronco del encéfalo. Es decir, que en la EP y DCL la α -sinucleína tiene predominantemente un depósito neuronal, mientras que en la AMS lo es glial.¹⁰

Estas patologías son fácilmente reconocibles y clasificables por sus trastornos motores de tipo extrapiramidal pero, no solamente es esta la sintomatología que los afecta, muchos de los pacientes presentan también síntomas no motores, los cuales han ido ganando terreno como parte fundamental de su cuadro clínico, por su notable importancia y que para perjuicio de los pacientes no son tan claros y sencillos de diagnosticar, incluyendo a su vez alteraciones neuropsiquiátricas y neuropsicológicas. Estas alteraciones neuropsicológicas varían en cada una de las sinucleinopatías y en ocasiones son estos síntomas lo que ponen de manifiesto la enfermedad años antes de que comiencen a manifestarse los trastornos motores. A su vez sufren entre sí un solapamiento, por lo que resulta importante definir cuáles son los aspectos clínicos motores y cognitivos de estas enfermedades.

Respecto a la alteración neuropsicológica más característica, el trastorno visuoespacial, se ha visto que es similar en procesos de EP con demencia y DCL. Las fluctuaciones en la atención se encuentran tanto en la DCL como en la EP con demencia, pero no en la EP sin demencia. Un estudio global asegura que el mayor deterioro cognitivo es sufrido en pacientes con DCL. La memoria semántica se ve afectada de una forma muy similar en las tres sinucleinopatías, mientras que la memoria episódica no se ve especialmente afectada en ninguna de ellas. El lenguaje afecta de manera bastante habitual en la DCL y EP, y dentro de la AMS en la periférica, sin estar presente en la central. Las funciones ejecutivas y resolutivas son otras de las características que se ven afectadas en estos trastornos y se encuentran con especial predominio en la DCL y EP, siendo menos notables en la AMS periférica.

4.6 Se puede también establecer una posible conexión entre las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, ya que ambas están regidas por una acumulación anormal de proteína: α -sinucleína y tau, respectivamente, sugiriendo una posible coexistencia entre ambas proteinopatías. Tau y α -sinucleína son proteínas parcialmente desplegadas que pueden formar oligómeros tóxicos y agregados intracelulares anormales en condiciones patológicas y las mutaciones en cualquiera de ellos son responsables de neurodegeneración; además, pueden promover mutuamente su fibrilación y solubilidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto sugiere que las interacciones entre tau y α -sinucleína forman un bucle *feed-forward* perjudicial, esencial para el desarrollo y la propagación de la neurodegeneración por mutación de estas proteínas. Se produce por tanto una considerable comorbilidad entre EP y AD, de forma que

los pacientes con EP tienen un mayor riesgo de desarrollar demencia y en más de la mitad de los pacientes con AD se encuentran cuerpos de Lewy en la autopsia.

La principal diferencia entre ambas proteínas se basa en que mientras que α -sinucleína es propensa a autoagregarse, la proteína tau no puede hacerlo por sí misma y requiere la presencia de un agente inductor, lo que plantea la posibilidad de que sea la α -sinucleína la potencial iniciadora a través de su región hidrofóbica NAC. El efecto de tau sobre α -sinucleína es acelerar su polimerización, de manera que potencia su toxicidad y secreción, a la vez que cambia su patrón de agregación mediante la formación de inclusiones más pequeñas.¹¹

La superposición y numerosas similitudes entre sinucleinopatías y tauopatías sugieren que las estrategias terapéuticas que se dirigen a procesos comunes de agregación tau y α -sinucleína podrían beneficiar a los pacientes en un espectro de trastornos neurodegenerativos, y pueden ser particularmente relevantes para el tratamiento de síntomas secundarios tales como deterioro cognitivo en la EP o parkinsonismo secundario en demencia.¹²

4.7 A largo plazo, todas las proteínas relativas a enfermedades neurodegenerativas producen disfunción sináptica y muerte de células neuronales, lo que se conoce como **“mecanismos de toxicidad de proteínas mal plegadas”**. Los mecanismos precisos que desencadenan la toxicidad aún no están esclarecidos, pero lo que sí se puede asegurar es que difieren dependiendo de la proteína involucrada en el proceso. Estos mecanismos de toxicidad pueden ser del tipo ganancia de toxicidad o por el contrario, efecto negativo por pérdida de función. Concretando un poco más, se pueden encontrar varios tipos de efectos, como el hecho de que los agregados de mayor volumen puedan secuestrar a otras proteínas citosólicas y generar la toxicidad como consecuencia; también tienen capacidad para alterar la proteostasis; además de la disfunción sináptica, otros cambios celulares debido a enfermedades neurodegenerativas pueden ser: anomalías en la señalización de calcio, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y neuroinflamación; todos ellos signos de estrés celular. Las consecuencias destructivas de la neuroinflamación provocada por las proteínas mal plegadas probablemente se exacerben por el envejecimiento del sistema inmune.¹³

A la hora de formar los agregados, la α -sinucleína se puede unir mediante **enlaces covalentes o no covalentes**. En los casos en los que forman *enlace no covalentes* hay una serie de factores proagregantes, como lo son la presencia de dopamina y sus metabolitos y la concentración citosólica de α -sinucleína. Modificaciones estructurales de la α -sinucleína, como son la fosforilación y la ubiquitinación, pueden también facilitar su agregación; la

sinucleína circulante se encuentra fosforilada *per se*, pero es la fosforilación en el residuo Ser-129 lo que promueve la agregación. La ubiquitinación, por su parte, interfiere en la degradación normal de las proteínas por los proteosomas neuronales.

En el mecanismo alternativo, *agregación covalente oxidativa* de α -sinucleína, el estrés oxidativo puede modificar la estructura de la proteína facilitando su agregación. Por ejemplo el estrés de tipo peroxidativo, que ocurre en el interior de la mitocondria neural y en la cadena de citocromos, se debe al exceso de formación de ión superóxido, que se convierte en H_2O_2 por acción de la superóxido dismutasa (SOD). Otro tipo de estrés oxidativo que altera la conformación de la α -sinucleína es el nitrosativo; se sabe que los residuos de α -sinucleína se pueden nitrosar de modo diferencial, dando lugar a diversos efectos; así se puede encontrar que la nitrosación excesiva de residuos de tirosina 125 y 136 aumenten la agregación de α -sinucleína, mientras que la nitrosación localizada en el residuo de tirosina Y39 reduce la unión de la proteína a vesículas, provocando un descenso en la tasa de degradación de la misma. La alteración mitocondrial en sí daría lugar a un círculo vicioso, de manera que se produciría una excesiva generación de especies reactivas de oxígeno, las cuales ejercen un efecto oxidativo que favorece la agregación covalente de α -sinucleína y esto induce a su vez un mayor daño mitocondrial.¹

Volviendo al mecanismo de toxicidad global de la α -sinucleína, se podría decir que establece un **ciclo destructivo** en el que diferentes agentes provocan la cascada de eventos que involucran el inadecuado plegamiento y la pérdida de funciones normales de la proteína. Estos cambios producen un aumento de las especies reactivas de oxígeno (con sus correspondientes efectos dañinos), promueven la acumulación de protofibrillas y la saturación del proteosoma. La alteración de la estructura y función de la α -sinucleína y los cambios en la homeostasis de la dopamina, además de las mutaciones o el polimorfismo de otras proteínas que participan en la biogénesis de vesículas, o en el reciclado y el efecto del envejecimiento de las neuronas de la sustancia negra, el cual disminuye las funciones del proteosoma con la consecuente atrofia neuronal, favorecen y exacerbaban este círculo vicioso destructivo.²

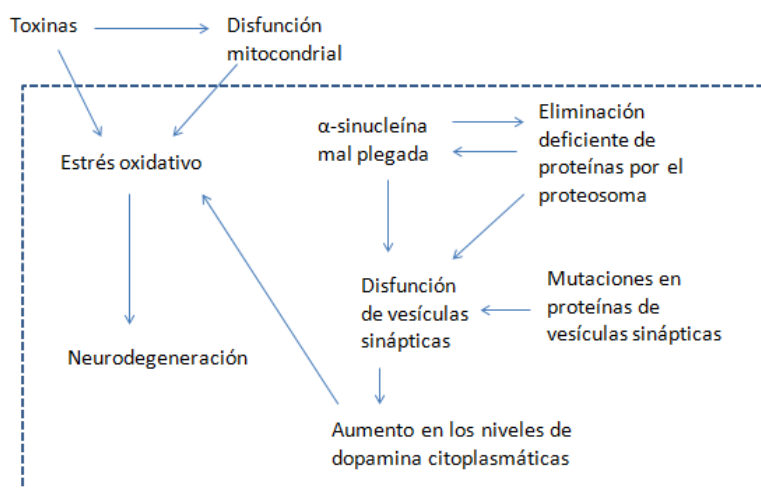


Imagen 4, basada en el esquema de la referencia 3: procesos que incrementan la concentración citoplásmica de la dopamina en la degeneración de la sustancia negra en EP.

La toxicidad de la α -sinucleína está interconectada con su función fisiológica, y tanto la función fisiológica, como la patológica están involucradas con los transmisores neuronales sinápticos. Además, la toxicidad neuronal de la α -sinucleína involucra muchas vías y funciones celulares; esto lleva a pensar que los *oligómeros intermedios* de sinucleína son las *especies tóxicas por excelencia* y la causa del proceso degenerativo, y no las fibrillas maduras. Dicha toxicidad se debe a la capacidad de mutación A30P (relacionada con la enfermedad de Parkinson), la cual provoca una aceleración en la oligomerización inicial de α -sinucleína y retrasa la formación de fibrillas maduras; además en algunos modelos animales se observaron inclusiones de α -syn sin fibrillas, y en otros, inclusiones de α -syn con fibrillas pero sin producir neurodegeneración. También se observó una mayor pérdida de neuronas dopaminérgicas en animales de experimentación que presentaban mutaciones formadoras de oligómeros, que aquellos que presentaban mutaciones formadoras de fibrillas. Los resultados de estos estudios ponen de manifiesto la falta de relación entre la acumulación de fibrillas de α -sinucleína y la neurotoxicidad, por lo que es probable que sean los oligómeros solubles los responsables del proceso.⁵

Existen además varios factores patológicos que contribuyen a la toxicidad; en primer lugar están la disfunción del sistema autofágico y del sistema ubiquitina-proteosoma, ya que son estos mecanismos los encargados de eliminar la α -sinucleína tóxica; en segundo lugar, como ya se ha nombrado, tanto la nitrosación, como la oxidación, disminuyen la tendencia de la α -sinucleína a establecer conformaciones estables, lo que contribuye a la propagación, por ejemplo, de la enfermedad de Parkinson. Además, el truncamiento de α -sinucleína, fundamentalmente en el dominio C-terminal, se asocia con una mayor propensión a formar fibrillas.

Resulta de especial relevancia el *mecanismo priónico*, el cual favorece la diseminación de la proteína y se ve fomentado por la inflamación crónica. La diseminación de la α -sinucleína sugiere que la toxicidad afecte tanto al sistema nervioso como a otros sistemas en todo el cuerpo humano, lo que lleva a considerar la relación entre la proteína en cuestión y los síntomas no motores de la patología de la enfermedad de Parkinson.

Normalmente, pequeñas cantidades de agregados son eliminados por las vías de degradación de proteínas, sin embargo, cuando estos agregados se acumulan por encima de un determinado umbral, adquieren la capacidad de propagarse por sí mismos, contribuyendo de este modo a la progresión de la patología de Parkinson. Este mecanismo se conoce como la “hipótesis tipo prión” y son varios los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* los que apoyan que

la α -sinucleína puede propagarse de una célula a otra y de una región a otra, lo cual promueve dramáticamente la patogénesis, ya que un experimento confirmó que la α -sinucleína transferida intracelularmente podría propagar sus patologías interactuando con la α -sinucleína citoplasmática.²

Queda aún por determinar si el mal plegamiento de α -sinucleína ocurre aleatoriamente, dónde y cuándo se produce y de qué manera se inicia la autopropagación.

4.8 Se pasará a abordar ahora la última parte del trabajo, la α -sinucleína como objetivo terapéutico en la enfermedad de Parkinson.

Hasta la fecha, el diagnóstico definitivo de la enfermedad de Parkinson se basa en el reconocimiento de características clínicas encontradas en el examen de autopsia en estudios post mortem; se define como una urgencia de primera necesidad el desarrollo de un diagnóstico temprano, ya que las exploraciones PET-CT (tomografía computarizada de emisión de positrones) o scáneres funcionales MRI (imágenes de resonancia magnética) no son lo suficientemente específicas para la enfermedad.

La α -sinucleína está ampliamente distribuida, no solamente en el sistema nervioso central, sino también en el sistema periférico, glándula submandibular, piel y glándula salival, por lo que es una buena candidata como *biomarcador de diagnóstico*, especialmente en la etapa temprana de la enfermedad. Sin embargo, son aún varios los problemas metodológicos que deben resolverse: en primer lugar, aún no se ha identificado el sitio óptimo de depósitos de α -sinucleína en la piel, la evidencia actual sugiere que podría ocurrir en el tejido subcutáneo en la región cervical; y en segundo lugar, tampoco está clara la cantidad de biopsias necesarias para obtener un resultado convincente. Son por tanto necesarios más estudios para determinar la sensibilidad y especificidad de la α -sinucleína como biomarcador de diagnóstico patológico. A su vez, si se encontrara una manera de identificar la estrecha relación entre las sinucleínas y la patología del Parkinson se realizarían grandes progresos en el diagnóstico precoz y diferencial de la enfermedad.²

Son varias las vías seguidas para controlar la toxicidad producida por la α -sinucleína, teniendo siempre presente que, el equilibrio correcto de las proteínas tiene un papel central en la homeostasis celular del sistema nervioso. A continuación se presentan los **objetivos terapéuticos** para el control de la α -sinucleína en la neurodegeneración; en los casos en los que se desconoce la patogeneicidad relativa de varias especies de proteínas mal plegadas, la estrategia terapéutica ideal sería actuar en los primeros pasos de la ruta de síntesis proteica, de

esa manera se conseguiría una mayor especificidad terapéutica y se eliminarían las ganancias o pérdidas tóxicas de la función causadas por las formas plegadas incorrectamente o agregadas de la proteína, al tiempo que se evitaría la propagación anormal del plegamiento y la agregación.¹³

- I. Reducir la síntesis de α -sinucleína: son varios los estudios que han tenido como objetivo disminuir su síntesis mediante el uso de siRNA (*small interfering RNA*) que se dirige al ARNm de la proteína. En ratones, la infusión directa de siRNA disminuye los niveles de α -sinucleína cortical e hipocampal durante una semana tras la infusión y, tras la inyección de exosomas que contienen siRNA, se disminuye la agregación de proteínas en el SNC.¹⁴
- II. Incremento de la degradación de α -sinucleína: este mecanismo consiste en aumentar la degradación lisosómica y/o autofágica. De hecho, la degradación de α -sinucleína está regulada por ubiquitín ligasas SIAH169 y NEDD4, por la fosforilación de S129 llevada a cabo por polo-quinasa 2 (PLK2) y por la activación de catepsinas de cisteína lisosómica. La inmunización pasiva de ratones que sobreexpresan α -sinucleína mediante el uso de anticuerpos contra α -sinucleína también promueve su aclaramiento lisosómico o lo dirige a la microglía, lo que rescata la neurodegeneración inducida por α -sinucleína y los déficits conductuales.
Otro objetivo importante que ha surgido para la degradación de la sinucleína es la β -Glucocerebrosidasa (GCasa), ya que el aumento de los niveles de esta enzima potencian la degradación de la α -sinucleína en las neuronas humanas, además de reducir la agregación y la neurodegeneración dopaminérgicas en varios modelos de roedores con toxicidad por α -sinucleína. Recientemente se han encontrado dos moduladores de GCasa no inhibidores (NCGC00188758 y NCGC607), que aumentan la actividad de la GCasa y disminuyen también la acumulación y toxicidad de α -sinucleína en neuronas humanas.
Finalmente, la expresión aumentada de otras proteínas lisosómicas, incluyen LIMP2 y ATP13A2, también promueve la degradación de α -sinucleína en varios modelos, que presentan objetivos adicionales para la aceleración de la degradación de α -sinucleína.^{14, 15}
- III. Reducir la agregación de α -sinucleína: dado que los oligómeros y fibrillas de sinucleína están implicados en la toxicidad, se han iniciado varias estrategias para mitigar su formación.

El tetrasulfonato de ftalocianina de porfirina se une y estabiliza la α -sinucleína asociada a la vesícula, lo que retrasa su mal plegamiento y agregación.¹⁴

También la inmunización pasiva usando un anticuerpo selectivo de protofibrillas disminuye las protofibrillas de α -sinucleína solubles que se encuentran unidas a la membrana de la médula espinal, reduciendo así la disfunción motora (experimento realizado en ratones que expresan la A30P de α -sinucleína asociada a PD184).¹⁴

Además, si la α -sinucleína nativa existente predominante presenta una conformación tetramérica, los compuestos que estabilizan la sinucleína en esta conformación podrían ser eficaces para combatir esta toxicidad.

Por último, son varios los ensayos clínicos que en la actualidad usan moléculas pequeñas para inhibir la agregación de α -sinucleína, como pueden ser: fenilbutirato de glicerol, nilotinib...¹⁶

- IV. Bloqueo de la propagación de α -sinucleína, responsable de la expansión de su toxicidad. Para combatirla se han llevado a cabo estudios de inmunización pasiva para bloquear dicha diseminación; los anticuerpos contra la α -sinucleína truncada en el residuo C-terminal disminuyen su propagación *in vitro* y recuperan la actividad motora deteriorada y la memoria en un modelo de ratón; y los anticuerpos monoclonales de α -sinucleína evitan la propagación y captación de la misma, a la vez que reducen la pérdida de neuronas dopaminérgicas y los déficits motores en ratones inyectados con α -sinucleína.¹⁴
- V. Inmunización activa: múltiples estudios han usado la inmunización activa para atacar a la proteína. En el primero, se vacunaron ratones transgénicos utilizando α -sinucleína humana, lo cual consiguió eliminar agregados de esta proteína, fundamentalmente a través de hidrólisis lisosómica. Estudios posteriores han tratado diferentes ratones transgénicos con varias formas de antígeno de α -sinucleína humana obteniendo como resultado reducciones similares en agregados, funciones motoras mejoradas y una notable reducción en la pérdida memoria y degeneración dopaminérgica.
Ensayos clínicos actuales implican inmunización activa con las vacunas PD01A y PD03A.¹⁴
- VI. Chaperonas dirigidas: las chaperonas son proteínas que están involucradas en todos los aspectos de la proteostasis, ofreciendo así puntos de entrada terapéutica a cada paso en el procesamiento de proteínas patógenas. Hay más de 200 chaperonas diferentes y la expresión específica de cada tipo celular de estas proteínas puede ayudar a explicar por qué algunas proteínas mal plegadas son tóxicas en un tipo de

célula y en otras no, a la vez que presenta oportunidades para desarrollar fármacos dirigidos a chaperonas específicas de células neuronales o gliales; ciertas mutaciones ya han sido relacionadas con enfermedades específicas y el efecto neuroprotector también ha sido demostrado en un cierto número de chaperonas. Sin embargo, el conocimiento limitado que aún se tiene acerca de sus diversos mecanismos de acción y el gran número de chaperonas existentes representa un desafío para el descubrimiento de nuevos fármacos.¹³

- VII. Reequilibrar la red proteostática: la capacidad de la maquinaria proteostática de la célula para contrarrestar los factores proteotóxicos se deteriora con la edad y se ve comprometida por mutaciones y otras causas que conducen a la acumulación de proteínas mal plegadas; por lo tanto, otro enfoque potencial para el desarrollo de terapias implicaría el reequilibrio a gran escala de la red proteostática. Para ello se están desarrollando estrategias basadas en los inhibidores de mTOR y del factor de choque térmico 1 (HSF1).¹³

4.9 Resulta interesante el **desarrollo** de una serie de **fármacos dirigidos**, que serán los futuros candidatos para la resolución del problema de toxicidad.

Los ensayos clínicos previos para el control de la enfermedad de Parkinson se han centrado principalmente en mejorar las vías celulares generales para retrasar la progresión de la enfermedad, como la corrección de la disfunción mitocondrial y el daño oxidativo con la coenzima Q10. Sin embargo, estos estudios no han tenido un éxito apreciable en ralentizar la progresión de la enfermedad, posiblemente debido a la ausencia de vías moleculares terapéuticas definidas, a la heterogeneidad dentro de las poblaciones de pacientes y a la falta de biomarcadores relevantes, que sirvan para realizar lecturas claras y tempranas de la eficacia del fármaco y del tratamiento impuesto.¹⁴

A su vez, el conocimiento de la toxicidad de la α -sinucleína en relación con factores como las diferentes cepas, propagación e interacción con otras proteínas ($\alpha\beta$ y tau) también puede influir en el desarrollo de futuros fármacos y el diseño de ensayos clínicos. De igual manera, una mayor estratificación de las poblaciones de pacientes, mediante biomarcadores bien caracterizados, cribado genético y diagnósticos clínicos consistentes antes de la inclusión en el ensayo también serán importantes para producir una población de pacientes más homogénea, compensando así uno de los factores que dificultan el desarrollo de una terapia adecuada que ponga fin a estas patologías.¹⁴

Uno de los objetivos moleculares bien definidos que se conoce es la activación de GCasa, cuya función, ya comentada, es la degradación de α -sinucleína tanto *in vitro* como *in vivo*. Al tratarse de una enzima con sustratos bien caracterizados, los fármacos dirigidos a ella pueden examinarse tempranamente durante el ensayo clínico para determinar su eficacia mediante la medida de los niveles de actividad de la enzima en plasma y líquido cerebroespinal, así como los niveles de α -sinucleína presente en estos fluidos a modo de lectura de la tasa de degradación y biomarcadores potenciales de la progresión de la enfermedad.¹⁴

Finalmente, el papel de la neuroinflamación en la toxicidad de la α -sinucleína está recibiendo una especial atención y son muchos los estudios que examinan en la actualidad el efecto de la manipulación del sistema inmune para reducir la toxicidad de la proteína plegada erróneamente. El tratamiento con candesartán cilexetil, un fármaco contra la hipertensión, inhibió la expresión de TLR2 (toll-like receptor 2) y redujo con ello la respuesta proinflamatoria. Además, el tratamiento con fármacos potencialmente antiinflamatorios, incluyendo hipoesóxido (modulador de NF-kB) o lenalidomida (inhibidor de la señalización de NF-kB), redujo los defectos de la conducta motora y la microgliosis. También un tratamiento inmunosupresor basado en el uso de FK506 o AZD1480 (inhibidores de la vía JAK-STAT) consiguió reducir la neurodegeneración dopaminérgica. Por lo tanto, la inmunomodulación podría ser un importante regulador de la toxicidad de α -sinucleína y un objetivo terapéutico potencial, en combinación con la dirección directa de α -sinucleína.¹³

Nos encontramos también con un debate abierto, ya que en la actualidad aún no se sabe con seguridad si las sustancias que se unen a la α -sinucleína son neuroprotectoras o neurotóxicas. Los fármacos que se unen y forman una estructura en bucle entre los extremos N y C tienden a ser neuroprotectores, y aquellos otros que dan lugar a una estructura más compacta suelen ser neurotóxicos.¹⁷

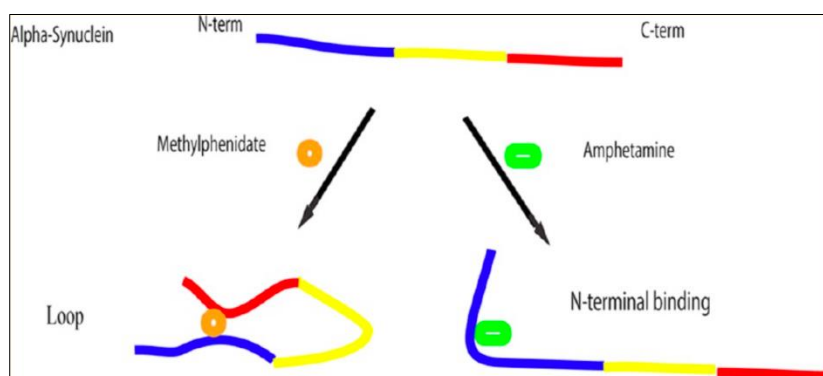


Imagen 5: ejemplo de plegamiento y de fármaco neuroprotector y neurotóxico

El extremo N-terminal y la región NAC se vuelven principalmente α -helicoidales sobre las membranas de unión, lo que sugiere que en la forma mayoritariamente desordenada de α -sinucleína exista una interacción significativa entre las regiones N y C terminales, la cual previene la agregación; por lo tanto, no resulta sorprendente que fármacos capaces de unirse a los extremos N y C, potenciando esa interacción e inhibiendo así el mal plegamiento, son neuroprotectores, como por ejemplo metformina (prescrita para diabetes), metilfenidato, cafeína, nicotina y curcumina. Son varios los mecanismos neuroprotectores de la *curcumina*: efecto inhibitorio sobre la agregación de α -sinucleína a través de la inhibición de la generación de estrés oxidativo, reposición de los niveles de GSH y prevención de la respuesta inflamatoria asociada a la glía.¹⁸ El agente antimicrobiano *escualamina* también ejerce un importante papel inhibitorio sobre la agregación inicial de α -sinucleína *in vitro* y la toxicidad *in vivo* de las formas oligoméricas, mediante el desplazamiento de la proteína de las membranas de fosfolípidos de vesículas y neuronas; su carga neta positiva neutraliza la carga negativa de los fosfolípidos aniónicos, lo que provoca el desplazamiento de proteínas que están asociadas con la cara interna de la membrana citoplasmática a través de interacciones electrostáticas.¹⁹ Otros estudios han demostrado que la *tolcapona* y la *entacapona* también son inhibidores potenciales de α -sinucleína, de la oligomerización y de la fibrillogénesis; pertenecen a la clase de fármacos multifuncionales ya que pueden inhibir la COMT, actuar como antioxidantes e inhibir la agregación proteica. Se pueden visualizar modificaciones químicas que mejoren el perfil farmacocinético de estas moléculas, evitando su hepatotoxicidad, modelando su metabolismo periférico y aumentando su entrada a través de la barrera hematoencefálica.²⁰

Por el contrario, los fármacos que se unen sólo al extremo N, como las anfetaminas, pueden evitar la interacción entre ambos extremos y por consiguiente resultar neurotóxicos, ya que favorecen una conformación más compacta de la α -sinucleína; los herbicidas, paraquat y rotenona, mediante su fuerte unión a la sinucleína desencadenan también este efecto.

5. Conclusiones

La α -sinucleína es una proteína compuesta por 140 aa y tres regiones diferenciadas. Son varios los posibles mecanismos tóxicos mediante los que ejerce su efecto perjudicial y por los que se ve envuelta en el desarrollo de diversas patologías, las cuales reciben el nombre de sinucleinopatías. Existe una investigación activa destinada al descubrimiento de dichos mecanismos, por los cuales las proteínas se pliegan, agregan y causan toxicidad celular; además de las diferentes conformaciones que puede adoptar y de la formación de los cuerpos

de Lewy como base para la formación de los agregados tóxicos. A su vez, avanza también la terapéutica existiendo ya una línea establecida de objetivos terapéuticos, basados en los distintos niveles del ciclo patológico de la proteína, y una serie de fármacos los cuales son considerados como potenciales candidatos a solucionar el problema de toxicidad.

Todos estos avances e investigaciones aún están en curso y son muchas las cuestiones que quedan por vislumbrar, por lo que un seguimiento científico y una mayor profundización y especialización sobre el tema resultan esenciales.

6. Bibliografía

¹ Fernández Espejo E. (2013) *Agregación de alfa sinucleína y degeneración parkinsoniana*. Fisiología, 17-19.

² Lingjia X, Jiali P. (2016) *Alpha-synuclein in Parkinson's disease: from pathogenetic dysfunction to potential clinical application*. Hindawi Publishing Corporation. Parkinson's Disease. Volume 2016, Article ID 1720621.

³ Gómez-Chavarín M, Roldan-Roldan G, Morales-Espinosa R, Pérez-Soto G, Torner-Aguilar C. (2012) *Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson*. Arch Neurociencia (Mex). 17(1): 25-3.

⁴ Demey I, Allegri R. (2008) *Demencia en la Enfermedad de Parkinson y demencia por Cuerpos de Lewy*. Revista Neurológica Argentina. 33: 3-21

⁵ Soria Martín A (2016) *Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. Causas y mecanismos fisiopatológicos*. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Alcalá.

⁶ Rodríguez Regal A, Cebrián E, Bellas Lamas P. (2012) *Demencia por cuerpos de Lewy*. Revista de Neurología. 54, N° Extra 4, 67-74.

⁷ Soto Lavastida A, Lara Fernández G, Michel Esteban E, Llibre Guerra JC (2011) *Multisystem atrophy and diagnostic criteria updating: A clinical case presentation*. Revista Cubana de Medicina. 50(3): 322-332.

⁸ (2016) *Enfermedad de Parkinson*. BOT Plus – Portalfarma.

⁹ Rommy von Bernhardt M. (2005) *Mecanismos de Neurotoxicidad en la Enfermedad de Parkinson*. Publicacionesmedicina.uc.cl

¹⁰ Martínez Rivera M, Menéndez González M, López-Muñiz A. (2011) *Alteraciones neuropsicológicas en las α -sinucleinopatías*. Archivos de Medicina. 7(1):1.

-
- ¹¹ Moussaud S, Jones DR, Moussaud-Lamodière E, Delenclos M, Ross O, McLean P. (2014) *Alpha-synuclein and tau: teammates in neurodegeneration?*. Molecular Neurodegeneration, Review. 9: 43.
- ¹² Suh Y-H, Checler F. (2002) *Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and a-Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease*. Pharmacological Reviews. 54(3): 469-525.
- ¹³ Sweeney P, Park H, Baumann M, Dunlop J, Frydman J, Kopito R et al. (2017) *Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies*. Transl Neurodegener. 6(6).
- ¹⁴ Wong YC, Krainc D. (2017) *α -Synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies*. Nature Medicine. 23(2): 1-13.
- ¹⁵ Kam Yin Chan D, Hua Xu Y, Kar Man Chan L, Braidy N and Mellick GD. (2017) *Mini-review on initiatives to interfere with the propagation and clearance of alpha-synuclein in Parkinson's disease*. Transl Neurodegener. 6(33).
- ¹⁶ Tóth G, Gardai SJ, Zago W, Bertoncini CW, Cremades N, Roy SL et al. (2014) *Targeting the Intrinsically Disordered Structural Ensemble of α -Synuclein by Small Molecules as a Potential Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease*. PLOS ONE 9(5).
- ¹⁷ Kakish J, Lee D and Lee JS. (2015) *Drugs that bind to α -synuclein: neuroprotective or neurotoxic*. ACS Chem Neurosci. 6(12).
- ¹⁸ Sharma N, Bimla N. (2017) *Curcumin affords neuroprotection and inhibits α -synuclein aggregation in lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease model*. Inflammopharmacology. 26(2): 349-360.
- ¹⁹ Pineda A, Burré J. (2017) *Modulating membrane binding of α -synuclein as a therapeutic strategy*. PNAS. 114(6): 1223-1225.
- ²⁰ Di Giovanni S, Eleuteri S, Paleologou K, Yin G, Zweckstetter M, Carrupt P-A, Lashuel H. (2010) *Entacapone and tolcapone, two catechol O-methyltransferase inhibitors, block fibril formation of α -synuclein and β -amyloid and protect against amyloid-induced toxicity*. J Biol Chem. 285(20): 14941-14954.
- ²¹ Brundin P, Dave KD, Kordower JH. (2017) *Therapeutic approaches to target alpha-synuclein pathology*. Exp Neurol. 298 (Pt B): 225-235.
- ²² Lee V and Trojanowski JQ. (2006) *Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological α -synuclein: new targets for drug discovery*. Neuron. 52(1): 33-38.