



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

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

Autor: Paloma Álvarez García

Tutor: José Carlos Menéndez Ramos

Convocatoria: Junio 2018

ÍNDICE

1.	Resumen	3
2.	Abstract	3
3.	Introducción y antecedentes	3
3.1.	Enfermedad de Parkinson.....	4
3.2.	Tratamiento actual de la enfermedad de Parkinson	4
4.	Objetivos	6
5.	Metodología	6
6.	Resultados y discusión	7
6.1.	Alfa-sinucleína. Características estructurales y funcionales	7
6.2.	Alfa-sinucleína y enfermedad de Parkinson.....	8
6.3.	Alfa-sinucleína como diana terapéutica	10
6.3.1.	Escualamina	12
6.3.2.	Ceftriaxona	12
6.3.3.	Inhibidor de PREP: KYP-2047	13
6.3.4.	Salbutamol.....	13
6.3.5.	Tolcapona y entacapona	13
6.3.6.	Nortriptilina.....	14
6.3.7.	Ginsenósido Rb1	14
6.3.8.	Irisflorentin.....	15
6.3.9.	N-Butilidnftalida.....	15
6.3.10.	Onjisaponina B	15
6.3.11.	Manosilglicerato	16
6.3.12.	ELN484228	16
6.3.13.	PRX002	17
6.3.14.	Acetilcorinolina	17
6.3.15.	Glutamina y Hsp70.....	17
6.3.16.	Terapias en fase de ensayo clínico	18
6.3.17.	Otros	18
7.	Conclusiones	19
8.	Bibliografía.....	19

1. Resumen

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo cuyo tratamiento actual se basa en una terapia sintomática para mejorar la calidad de vida del paciente, sin ser posible frenar o revertir su desarrollo.

La agregación y acumulación de la alfa-sinucleína representa la marca distintiva de un grupo de trastornos neurodegenerativos, denominados sinucleinopatías, donde se incluye la enfermedad de Parkinson.

En el presente trabajo se realiza una revisión bibliográfica de los numerosos compuestos dirigidos contra la alfa-sinucleína que se están investigando actualmente, aplicando distintas estrategias con el objetivo común de desarrollar un compuesto con elevado potencial terapéutico para el tratamiento del Parkinson y enfermedades relacionadas.

2. Abstract

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder whose current treatment is based on a symptomatic therapy to increase the patient's quality of life, but no disease-modifying treatments are available.

The aggregation and accumulation of alpha-synuclein represents the hallmark of a group of neurodegenerative disorders, named synucleinopathies, where Parkinson disease is included.

The present work accomplishes a bibliographic review of the numerous compounds targeted against alpha-synuclein that are being investigated at the moment, applying several strategies with the common goal to develop a compound with a high degree of therapeutic potential for the treatment of Parkinson's and similar diseases.

3. Introducción y antecedentes

Las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (EP), la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer (EA), son un grupo de trastornos del sistema nervioso relacionados con el incorrecto plegamiento de proteínas, que afectan aproximadamente a 30 millones de personas en el mundo¹. Estas enfermedades comparten el fenómeno común de que las neuronas se pierden progresivamente a medida que se desarrolla la enfermedad, sin que actualmente se entiendan los mecanismos fundamentales de la muerte neuronal². Existen diversos factores implicados en la neurodegeneración, destacando el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y los factores asociados a la edad¹. La etiología de estas enfermedades no se comprende completamente, pero parece implicar una compleja combinación de factores ambientales y genéticos³.

3.1. Enfermedad de Parkinson

La EP es la segunda patología neurodegenerativa más común tras la EA y se estima que afecta aproximadamente al 1% de la población mayor de 65 años de los que el 5% son mayores de 85 años⁴. Esta enfermedad de larga duración y progresiva se caracteriza clínicamente por temblor en reposo, bradicinesia, aumento del tono muscular y déficit motor, y en estadios más avanzados por demencia, fragilidad y pérdida de independencia^{1,4}.

Se produce una disminución de dopamina en el cuerpo estriado resultante de una pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la *Substantia Nigra Pars Compacta* (SNPC). Sin embargo, no todas las células de dopamina se ven afectadas, ni todas las neuronas afectadas son dopaminérgicas. Además, se caracteriza por la presencia de ensamblados filamentosos de proteínas en neuronas afectadas, que son los cuerpos de Lewy (CLs) y las neuritas de Lewy (NLs)². Como componente principal de los CLs y las NLs tenemos la proteína alfa-sinucleína, que es el producto del primer gen identificado como asociado con la EP: SNCA. Las mutaciones en el gen SNCA causan formas autosómicas dominantes de la EP y son la base del riesgo de desarrollar una EP esporádica. El mal plegamiento de la alfa-sinucleína hace que se agregue y se disemine en ciertos lugares, donde la inflamación inducida está íntimamente involucrada en la disfunción patogénica subyacente a la EP⁵.

El diagnóstico clínico se basa en la identificación de las características relacionadas con la deficiencia de dopamina, ya que no existe un marcador biológico que permita un diagnóstico definitivo.

En contraste con los síntomas dopaminérgicos, para los que se dispone de tratamiento, los síntomas no motores a menudo son poco reconocidos y tratados de manera inadecuada, dominan en el cuadro clínico de la EP avanzada y contribuyen a una discapacidad grave y deterioro de la calidad de vida. Ahora la atención se centra en el reconocimiento y cuantificación de los síntomas no motores, que formarán la base de tratamientos mejorados. Algunos de estos síntomas, como depresión, estreñimiento, dolor, problemas genitourinarios y trastornos del sueño, se pueden mejorar con los tratamientos disponibles, mientras que otros necesitan la introducción de nuevos fármacos no dopaminérgicos⁶.

3.2. Tratamiento actual de la enfermedad de Parkinson

La variedad de tratamientos disponibles para la EP es más amplia que para cualquier otra enfermedad degenerativa del sistema nervioso central. Pese a ello, la EP sigue siendo incurable, ya que no hay un tratamiento efectivo y solamente existen opciones de tratamiento paliativo muy limitadas. El tratamiento se puede dividir en terapia farmacológica, no farmacológica y

quirúrgica. Se deben de considerar cuidadosamente una serie de factores que incluyen: los síntomas y signos del paciente, la edad, el estadio de la enfermedad, el grado de discapacidad funcional y el nivel de actividad física.

El tratamiento no farmacológico de la EP incluye educación, medidas de soporte, grupos de apoyo, ejercicio y nutrición⁷.

Los tratamientos farmacológicos actuales se limitan en gran medida a las estrategias de reemplazo de dopamina y se asocian con una disminución progresiva de la eficacia y una variedad de efectos secundarios cognitivos y motores⁸. Los principales fármacos son:

- Levodopa

Es el fármaco más eficaz y de primera elección para el tratamiento sintomático de la EP. Es particularmente efectivo para tratar los síntomas bradicinéticos y debe ser introducido cuando estos se vuelven problemáticos o no son controlados por otros antiparkinsonianos. El temblor y la rigidez también pueden responder a la terapia con levodopa, pero la inestabilidad postural es menos probable que lo haga. Se suele administrar con inhibidores de la dopa descarboxilasa para mejorar su biodisponibilidad⁷.

El tratamiento a largo plazo se asocia con una serie de efectos adversos que incluyen fluctuaciones motoras, discinesias y complicaciones neuropsiquiátricas. Con la progresión de la enfermedad, los pacientes desarrollan nuevas características que no responden a la terapia con levodopa, como episodios de congelación, disfunción autonómica, caídas y demencia⁸.

- Agonistas dopaminérgicos

Son un grupo de fármacos que estimulan directamente los receptores de dopamina. Los fármacos actualmente aprobados incluyen bromocriptina y carbegolina dentro del grupo de los ergóticos y, pramipexol, ropinirol, rotigotina y apomorfina dentro del grupo de los no ergóticos.

Pueden emplearse en forma de monoterapia en la EP temprana o en combinación con otros antiparkinsonianos en la enfermedad más avanzada⁷.

- Inhibidores de la Monoaminoxidasa B (IMAO-B)

Incluye selegilina, rasagilina y safinamida. Dan lugar a un incremento de los niveles de dopamina en el núcleo nigro-estriado, contrarrestando la destrucción neurológica de neuronas dopaminérgicas. Dado que los agonistas dopaminérgicos pueden asociarse con menos fluctuaciones motoras que la levodopa, y la evidencia de que hay una mayor incidencia de discinesia relacionada con la levodopa en la EP de inicio temprano, es razonable comenzar el tratamiento con un agonista dopaminérgico en los pacientes más jóvenes (edad < 65 años)⁷.

- Agentes anticolinérgicos

Los fármacos anticolinérgicos de acción central como el trihexifenidilo y la benzotropina se han usado durante muchos años y continúan teniendo una función útil ya que disminuyen la actividad colinérgica anormalmente exaltada en las neuronas de la vía nigro-estriada. Otros como biperideno, orfenadrina y prociclidina producen efectos similares y se usan con mayor frecuencia en Europa que en Estados Unidos⁷.

Son más útiles como monoterapia en pacientes menores de 70 años con temblor que no tienen bradicinesia significativa o trastornos de la marcha y en pacientes con enfermedad más avanzada que tienen temblor persistente⁷.

- Amantadina

Es un fármaco antiviral que incrementa la liberación de dopamina y noradrenalina en la sustancia nigro-estriada e impide su recaptación. Es útil en pacientes jóvenes con EP temprana⁷.

- Inhibidores de la Catecol-O-Metiltransferasa (COMT)

Tolcapona (inhibidor central) y entacapona (inhibidor periférico) son fármacos ineficaces cuando se administran solos, sin embargo, en la administración junto con levodopa pueden prolongar y potenciar el efecto terapéutico de esta, debido a que la inhibición de la COMT reduce la metilación de levodopa y dopamina, aumentando su vida media plasmática. Se usan principalmente para tratar a pacientes con fluctuaciones motoras⁷.

4. Objetivos

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica de las características de la alfa-sinucleína, su implicación en las enfermedades neurodegenerativas, centrándose más en la EP, y una breve descripción de los compuestos que tengan como diana esta proteína y cuya aplicación terapéutica pueda ser la EP.

5. Metodología

Búsqueda bibliográfica en distintas bases de datos científicas como Pubmed, Dialnet, Botplus y Science Direct, entre otras.

Para ello se han utilizado palabras clave en inglés como “Alpha-Synuclein”, “Parkinson disease”, “Alpha-Synuclein aggregation”, “Alpha-Synuclein toxicity” y “Alpha-Synuclein as a Therapeutic Target”, acotando la búsqueda a un rango de antigüedad aproximadamente de 10 años y seleccionando principalmente archivos de acceso gratuito o disponibles en la biblioteca electrónica de la Universidad Complutense.

6. Resultados y discusión

6.1. Alfa-sinucleína. Características estructurales y funcionales

La alfa-sinucleína es miembro de una familia de tres proteínas sinápticas que incluyen alfa-sinucleína, beta-sinucleína y gamma-sinucleína⁴. Es una proteína pequeña y soluble, codificada por el gen SNCA localizado en el brazo largo del cromosoma 4, en la que se encuentran 140 aminoácidos, con un peso molecular de 14.460 Da y un punto isoelectrico teórico de 4,67¹.

Se distinguen tres regiones en la secuencia de aminoácidos (Figura 1): primero, el extremo amino terminal o dominio N-terminal, que está cargado positivamente y comprende los aminoácidos del 1 al 65; después, el segmento central o componente no-amiloideo (NAC), que es exclusivo de la alfa-sinucleína, es hidrofóbico y comprende los aminoácidos del 66 al 95; y por último, el extremo carboxilo terminal o dominio C-terminal, que está cargado negativamente y comprende los aminoácidos del 96 al 140¹.

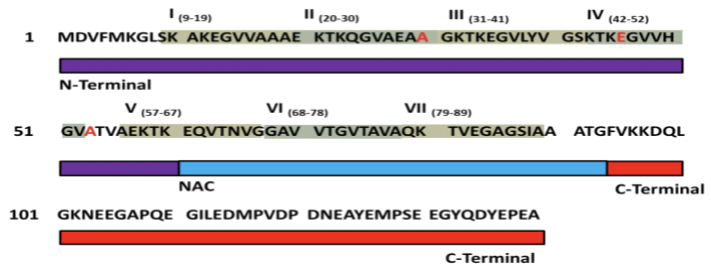


Figura 1: Regiones de la secuencia de aminoácidos de la alfa-sinucleína¹.

La alfa-sinucleína es una proteína neuronal que se expresa abundantemente en el cerebro, predominando en las terminaciones nerviosas presinápticas⁹. En su forma nativa está desplegada y existe en diversas conformaciones en un equilibrio dinámico⁵.

La región N-terminal consiste en 7 repeticiones imperfectas, cada una de 11 aminoácidos de longitud, que presentan la secuencia consenso KTKEGV. Se une a las membranas lipídicas a través de sus repeticiones N-terminales, adoptando estructuras ricas en alfa-hélice⁹. El dominio NAC tiene 12 residuos de aminoácidos que son responsables de las propiedades de agregación a través de la inhibición de la degradación y promoción de la fibrilación⁵.

Sin embargo, la estructura fisiológica normal y la función de la alfa-sinucleína aún no están bien definidas. Estudios recientes demostraron que la función fisiológica implica funciones en la compartimentación, almacenamiento y reciclaje de los neurotransmisores. Por otra parte, la alfa-sinucleína se asocia con la regulación fisiológica de ciertas enzimas y se cree que aumenta el número de moléculas transportadoras de dopamina⁵.

La proteína se ensambla fácilmente en filamentos que comparten muchas de las características morfológicas y estructurales de los filamentos presentes en el cerebro humano. El ensamblaje se produce a través de secuencias localizadas en los aminoácidos N-terminales. La

región C-terminal, por el contrario, inhibe el ensamblaje e interacciona con la región hidrofóbica central facilitando la formación de filamentos⁹.

La alfa-sinucleína se degrada por el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y por la vía de la autofagia lisosomal. Existe evidencia *in vivo* de que la alfa-sinucleína soluble se degrada principalmente por el UPS, mientras que las conformaciones más complejas se degradan por la vía de la autofagia lisosomal. El mecanismo exacto de la liberación no se ha demostrado completamente, parece que podría ser liberada por los exosomas de una manera dependiente del calcio y degradarse aún más después de la inhibición lisosómica.

Al mismo tiempo, otros estudios han demostrado que las conformaciones insolubles de la alfa-sinucleína no parecen tener efectos neurotóxicos significativos. Por el contrario, varios oligómeros de la alfa-sinucleína son perjudiciales, y las vesículas extracelulares (VE), que son mediadores de la información celular, podrían mediar en la propagación de la alfa-sinucleína tóxica entre las neuronas⁵.

6.2. Alfa-sinucleína y enfermedad de Parkinson

Los hallazgos por los que se vinculó a la alfa-sinucleína con la EP fueron los siguientes: primero, el descubrimiento de que las mutaciones puntuales en el SNCA son patógenas para las formas familiares de la EP, y segundo, la demostración de que la alfa-sinucleína es el componente principal de los CLs y las NLs en la EP idiopática o esporádica⁴.

Existe una fuerte evidencia que implica una mayor expresión de alfa-sinucleína y formas patológicamente alteradas de esta proteína en la patogénesis de la EP tanto familiar como esporádica. Por ello, los mecanismos genéticos están implicados en mecanismos de EP al aumentar la expresión, agregación y acumulación de alfa-sinucleína en el SNC, pero también pueden desempeñar un papel crucial los factores ambientales en la patogénesis de las sinucleinopatías, porque pueden acelerar el proceso y desbordar la capacidad de los sistemas normales de control de calidad (chaperonas moleculares, UPS, fagosomas/lisosomas) para prevenir o revertir el mal plegamiento de proteínas. Los estudios epidemiológicos sugieren una asociación de la EP con toxinas ambientales como los pesticidas⁴.

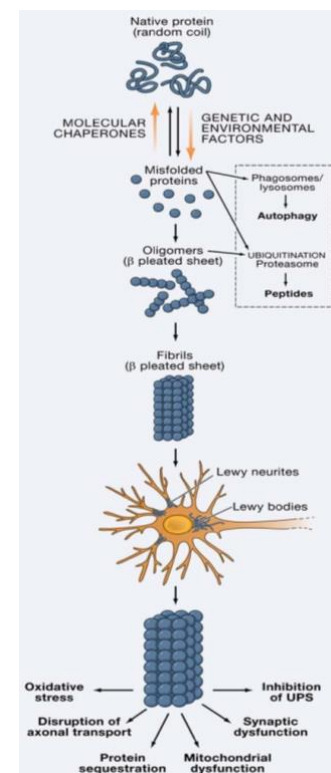


Figura 2. El plegamiento y la agregación de la alfa-sinucleína⁴.

Todavía no se comprende completamente cómo las anomalías de la alfa-sinucleína conducen a la neurodegeneración, pero se han propuesto varias posibilidades resumidas esquemáticamente en la figura 2. La alfa-sinucleína en su conformación nativa, altamente soluble, se pliega incorrectamente formando oligómeros patológicos y agregados que se fibrilizan y depositan, posteriormente, en los CLs y las NLs de las neuronas afectadas en la EP. Algunas de las consecuencias pueden ser el estrés oxidativo, la interrupción del transporte axonal, el secuestro de proteínas, la disfunción mitocondrial, la disfunción sináptica y la inhibición del UPS⁴. Por lo tanto, la formación de agregados incapacita a la alfa-sinucleína para realizar sus funciones normales. Además, estos efectos podrían amplificarse si otras proteínas sintéticas que interactúan con la alfa-sinucleína también se acumulan en los CLs y las NLs.

En numerosos estudios se ha propuesto que la alfa-sinucleína tiene capacidad de autopropagación. Normalmente, pequeñas cantidades de agregados son eliminados por las vías de degradación de proteínas, pero si con el tiempo los agregados se acumulan por encima de un cierto umbral, podrían autopropagarse, lo que contribuiría a la progresión de la EP. El dominio NAC desempeña un papel central en la autopropagación de la alfa-sinucleína. Por lo tanto, la propagación de la alfa-sinucleína es clave para la disfunción patogénica en la EP⁵.

Todas las mutaciones clínicas conocidas asociadas con la EP familiar están presentes en la región N-terminal, resaltando la importancia de este dominio en la disfunción patológica de la alfa-sinucleína. Las mutaciones en Glu46Lys, His50Gln y Ala53Glu pueden promover la formación de agregados insolubles y producir oligómeros. Sin embargo, no se ha aclarado completamente cómo estas mutaciones aceleran la agregación, es probable que se deba a la desestabilización de la conformación N-terminal nativa⁵.

Se han identificado tres mutaciones sin sentido en el gen SNCA en formas familiares de la EP, sin embargo, aunque es extremadamente rara, pueden proporcionar información sobre los mecanismos patogénicos que conducen a la formación de los CLs y las NLs⁴. Las mutaciones E46K y A53T en la alfa-sinucleína aceleran la velocidad del ensamblaje del filamento y la mutación A30P aumenta la velocidad total de agregación de la alfa-sinucleína, pero ralentiza la velocidad de formación de filamentos⁹. Varias características clínicas pueden distinguir a los pacientes con la mutación A53T de aquellos con EP idiopática, que incluyen un inicio más temprano, una progresión más rápida de la enfermedad, una menor prevalencia de temblor y características como la demencia y la mioclonía al principio de la enfermedad. Por el contrario, los pacientes con la mutación A30P se parecen clínicamente a la EP idiopática. El examen *post-mortem* de cerebros A53T reveló una degeneración de la sustancia negra y una abundancia de

alfa-sinucleína en los CLs. Los miembros de la familia E46K afectados presentan las características clínicas de la demencia y las alucinaciones visuales, además del parkinsonismo, y los CLs están presentes tanto en las neuronas de la SNPC como en la corteza. Por lo tanto, esto parece ser una forma familiar de un trastorno neurodegenerativo esporádico conocido como demencia con cuerpos de Lewy (DLB). Sin embargo, el DLB es difícil de distinguir de la EP con demencia (PDD), ya que la carga de CLs y NLs es similar en ambos, pero en PDD la demencia ocurre después del inicio del parkinsonismo, mientras que en DLB precede la demencia⁴.

Además, existen otros muchos factores y eventos que influyen en la fibrilación de la alfa-sinucleína *in vitro*, y estos podrían estar implicados en la formación de inclusiones de alfa-sinucleína en la EP esporádica. Algunos factores que aceleran la formación de fibrillas son la modificación postraduccional de la alfa-sinucleína (como truncamiento y fosforilación C-terminal), la incubación con metales (como aluminio, cobre y hierro) y la agresión oxidativa/nitrativa (como el tratamiento del peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito), aunque la oxidación no siempre conduce a un aumento en la formación de fibrillas. Algunos estudios han demostrado que la dopamina inhibe la fibrilación y esto depende de la autooxidación de dopamina, por lo tanto, la autooxidación de la dopamina puede prevenir la fibrilación de la alfa-sinucleína y la disminución de los niveles de dopamina en las neuronas de la SNPC podría promover la agregación de la alfa-sinucleína en la EP⁴.

La fosforilación de la alfa-sinucleína es esencial y suficiente en el proceso de degradación en enfermedades neurodegenerativas. La alfa-sinucleína extraída de CLs se fosforila en S129, y algunos datos indican que esta fosforilación aumenta la degradación mediada por la autofagia de la alfa-sinucleína, lo que sugiere que la fosforilación podría ser un mecanismo neuroprotector para acelerar la eliminación de proteína agregada⁵.

6.3. Alfa-sinucleína como diana terapéutica

Las estrategias terapéuticas actuales para tratar la EP ofrecen principalmente un alivio sintomático transitorio y apuntan a la reposición de los niveles de dopamina para contrarrestar la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Por lo tanto, se necesita desesperadamente la identificación y el desarrollo de moléculas para tratar de ralentizar la progresión de la EP¹¹.

Los ensayos clínicos previos 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, pero no han tenido éxito. En consecuencia, futuros estudios clínicos con objetivos terapéuticos bien definidos serán cruciales para mejorar los resultados de los ensayos clínicos, tanto en EP como en otras sinucleinopatías.

Diversos estudios se han dirigido directamente a la alfa-sinucleína en diferentes etapas como una posible intervención terapéutica para la EP (Figura 3). Se han utilizado varias rutas para disminuir la toxicidad de la alfa-sinucleína, principalmente en modelos de ratón. Estos incluyen¹²:

- Reducir la síntesis de la alfa-sinucleína mediante el uso de siRNA dirigidos al ARNm de la alfa-sinucleína.
- Aumentar la degradación de la alfa-sinucleína.
- Reducir la agregación de la alfa-sinucleína.
- Bloqueo de la propagación de la alfa-sinucleína.
- Inmunización activa.

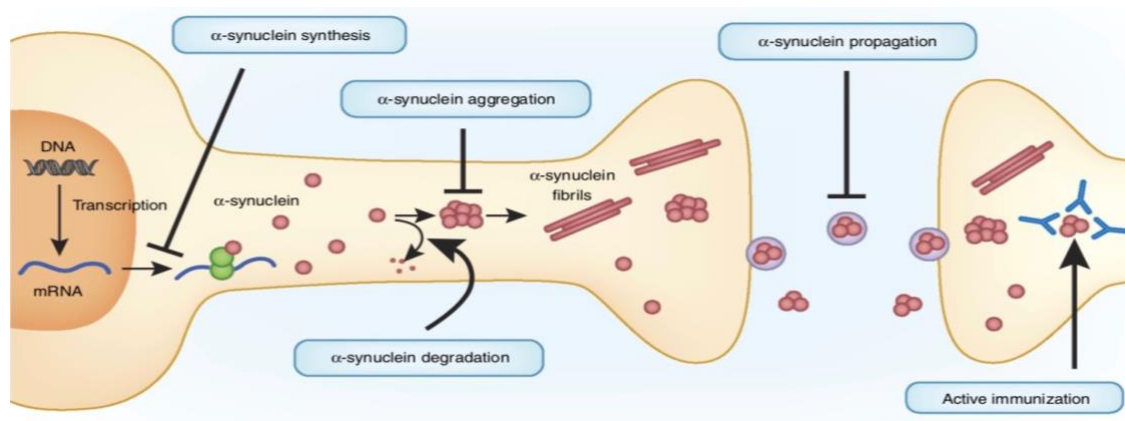


Figura 3: La toxicidad de la alfa-sinucleína como objetivo terapéutico¹².

Además, existen otros enfoques terapéuticos actualmente en ensayos clínicos que se dirigen a los factores que contribuyen a la toxicidad de la alfa-sinucleína, como la vulnerabilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la EP en presencia del antagonista de canales de calcio isradipina¹².

Un enfoque alternativo sería aprovechar otros mecanismos celulares normales que contrarrestan la acumulación de proteínas intracelulares mal plegadas o alteradas de forma constitutiva, incluidas las vías proteolíticas normales, el UPS y el sistema autofágico⁴.

Finalmente, la fosforilación anormal puede ser un objetivo para el descubrimiento de terapias modificadoras de la EP, ya que esta modificación postraduccional puede contribuir a la estabilización de los agregados de alfa-sinucleína⁴.

A continuación, se van a describir distintos compuestos dirigidos directamente contra la alfa-sinucleína:

6.3.1. Escualamina

La escualamina (Figura 4) es un aminosterol antimicrobiano de amplio espectro descubierto originalmente en 1993 en el tiburón cazón, *Squalus acanthias*. Tiene actividad antitumoral y antiviral conocida¹³. Posee una carga neta positiva, que muestra gran afinidad por los fosfolípidos aniónicos, provocando el desplazamiento de las proteínas asociadas a la cara interna de la membrana citoplásmica a través de interacciones electrostáticas¹⁴.

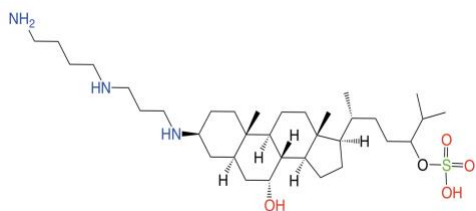


Figura 4. Estructura de la escualamina¹³.

Estudios han demostrado que, *in vitro* y en cultivos celulares, la escualamina inhibe la etapa inicial de la agregación de la alfa-sinucleína a través de la unión competitiva en la superficie de las vesículas lipídicas, es decir, desplazando a la proteína de las membranas lipídicas. Asimismo, reduce drásticamente la toxicidad de formas oligoméricas de alfa-sinucleína *in vivo*. Es posible que otros mecanismos de acción secundarios, tales como las interacciones directas con fibrillas, puedan estar presentes y funcionar en asociación con el principal mecanismo de acción descrito¹³.

Por lo tanto, la escualamina podría tener el potencial de actuar como agente terapéutico para la EP y otras afecciones asociadas con la agregación patogénica de la alfa-sinucleína¹³.

6.3.2. Ceftriaxona

La ceftriaxona (Figura 5) es un antibiótico beta-lactámico del grupo de las cefalosporinas que se ha utilizado durante décadas como antimicrobiano¹⁵.

Se investigó la capacidad de la ceftriaxona para interactuar con la alfa-sinucleína e interferir en el proceso de agregación de esta. También se estudió el efecto protector de la ceftriaxona sobre las células PC12 (células catecolaminérgicas utilizadas como un modelo informativo *in vitro* de la EP y para probar

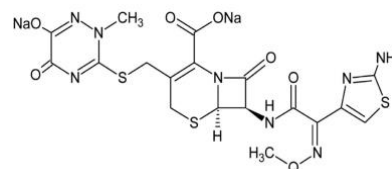


Figura 5. Estructura de la Ceftriaxona¹⁵.

fármacos neuroprotectores) expuestas al compuesto neurotóxico 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA)¹⁵. Tomados en conjunto estos estudios y sus resultados, sugieren una posible interacción molecular directa entre la ceftriaxona y la alfa-sinucleína. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que la ceftriaxona interactúa con la alfa-sinucleína no está bien definido¹⁵.

Resumiendo, la ceftriaxona se une con buena afinidad a la alfa-sinucleína, bloqueando su polimerización *in vitro*, y protege parcialmente a las células PC12 contra el daño inducido por 6-OHDA, es decir, ejerce una acción neuroprotectora en un modelo *in vitro* de la EP. El tratamiento

con ceftriaxona u otras moléculas con propiedades funcionales similares puede ser un enfoque novedoso y altamente efectivo para el tratamiento de la EP¹⁵.

6.3.3. Inhibidor de PREP: KYP-2047

Se ha demostrado que un inhibidor de la prolil oligopeptidasa (PREP), llamado KYP-2047, reduce la agregación de la alfa-sinucleína en modelos celulares y animales de la EP. En este estudio se han justificado las siguientes afirmaciones¹⁶: primero, la incubación con KYP-2047 redujo la cantidad de oligómeros de alfa-sinucleína insolubles en laurilsulfato sódico (SLS) en las células que sobreexpresan alfa-sinucleína y aumentó la supervivencia celular en el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH); segundo, un tratamiento a corto plazo con KYP-2047 redujo la alfa-sinucleína soluble *in vivo*; por último, los inhibidores de PREP fueron capaces de romper la interacción espacial entre PREP y alfa-sinucleína en tres líneas celulares que sobreexpresan alfa-sinucleína e *in vivo*¹⁶.

Se plantea que esto conduzca a un bloqueo del proceso de agregación de la alfa-sinucleína o a un aumento de su eliminación para encontrar nuevas formas de desarrollar un tratamiento farmacológico para la EP¹⁶.

6.3.4. Salbutamol

El salbutamol es un fármaco agonista relativamente selectivo de los receptores adrenérgicos β_2 que se utiliza como antiasmático y broncodilatador.

En una investigación epidemiológica se ha visto que el receptor β_2 -adrenérgico es un regulador del gen SNCA de la alfa-sinucleína. Durante 11 años de seguimiento en noruegos, el salbutamol se asoció con un riesgo reducido de desarrollar EP, mientras que un antagonista β_2 se correlacionó con mayor riesgo. Por lo tanto, el receptor β_2 -adrenérgico está relacionado con la transcripción de la alfa-sinucleína, constituyendo un objetivo potencial para las terapias¹⁷.

6.3.5. Tolcapona y entacapona

En un estudio se seleccionaron las moléculas de la figura 6 para investigar su efecto sobre la oligomerización y fibrilación de la alfa-sinucleína mediante fluorescencia de ThT, TEM y análisis SDS-PAGE¹¹.

Se demostró que todos los compuestos que contienen en su estructura el grupo catecol inhiben la fibrilación de la alfa-sinucleína *in vitro* y muestran efectos protectores contra la toxicidad inducida en células PC12. Aunque el mecanismo por el cual los compuestos que contienen el grupo catecol bloquean la fibrilación de la proteína sigue siendo controvertido¹¹.

Los dos inhibidores de la COMT, entacapona (E) y tolcapona (T) aprobados como complementos en la terapia de la EP, pertenecen a la clase de fármacos multifuncionales, porque pueden inhibir la COMT, actuar como antioxidantes y como inhibidores efectivos de agregación de proteínas. La estructura de estos fármacos podría guiar al desarrollo de inhibidores más potentes de la formación y toxicidad de la alfa-sinucleína¹¹.

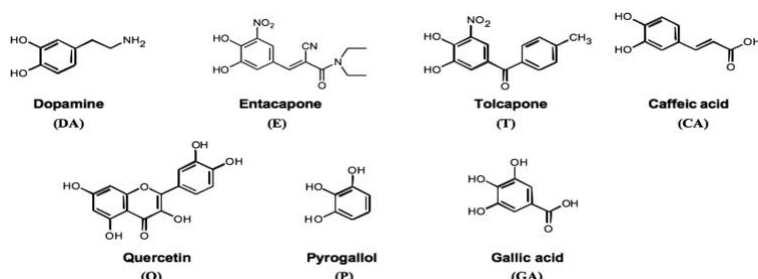


Figura 6: Estructura química de los compuestos examinados como inhibidores de la fibrilación de la alfa-sinucleína humana¹¹.

6.3.6. Nortriptilina

La nortriptilina (NOR) es un antidepresivo tricíclico derivado del dibenzociclohepteno que actúa bloqueando la recaptación de noradrenalina y de serotonina por la membrana neuronal.

Se estudiaron los ensayos de agregación y cinética *in vitro* de este antidepresivo y los resultados notificaron que NOR inhibe la agregación de la alfa-sinucleína al unirse directamente a la forma monomérica soluble, y al mejorar la reconfiguración del monómero, inhibe la formación de conformaciones tóxicas de la proteína. Además, se demostró que NOR inhibe la acumulación, agregación y neurotoxicidad de la alfa-sinucleína en modelos celulares y animales múltiples. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que NOR puede ralentizar la progresión de la patología de la alfa-sinucleína¹⁸.

6.3.7. Ginsenosido Rb1

El ginseng es una planta medicinal que se ha utilizado en el este de Asia durante más de dos mil años para tratar diversas afecciones. Se ha demostrado que el ginseng y los ginsenosidos tienen un efecto neuroprotector en la EP.

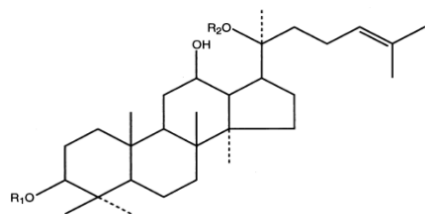


Figura 7. Estructura química de Rb1¹⁹.

Se estudió el potencial de los ginsenosidos más frecuentemente utilizados (Rg1, Rg3 y Rb1) como agentes anti-amiloidogénicos¹⁹. Se demostró que Rb1 es un potente inhibidor de la fibrilación y la toxicidad de la alfa-sinucleína, ya que desagrega sus fibrillas preformadas e inhibe su agregación.

El próximo paso sería evaluar su efecto en modelos animales de EP, ya que Rb1 podría representar el punto de partida para el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la EP¹⁹.

6.3.8. Irisflorentin

El irisflorentin, derivado de las raíces de *Belamcanda chinensis*, se ha utilizado para el tratamiento de trastornos inflamatorios en la medicina tradicional china²⁰.

Se ha estudiado su potencial en modelos de *Caenorhabditis elegans*, revelando los resultados que el irisflorentin previene la acumulación de la alfa-sinucleína. Asimismo, este compuesto mejora la degeneración neuronal dopaminérgica, el comportamiento sensorial y la duración de la vida. El papel neuroprotector en la degeneración de neuronas está posiblemente relacionado con su actividad antioxidante y antiapoptótica²⁰.

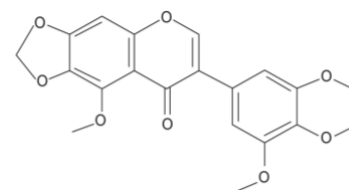


Figura 8. Estructura química del irisflorentin²⁰.

En otras investigaciones, se descubrió que el irisflorentin suprime las respuestas inflamatorias inducidas por LPS, disminuye notablemente los niveles de la NO sintasa así como la producción de NO, y regula negativamente los niveles de expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Por lo tanto, este compuesto puede también ser capaz de mejorar la inflamación en el cerebro de pacientes con EP y disminuir el daño de las neuronas dopaminérgicas²⁰.

Aunque se deben estudiar con más detalle los mecanismos, estos hallazgos indican su potencial como fármaco candidato para el tratamiento de la EP²⁰.

6.3.9. N-Butilidenftalida

Se han investigado estrategias para evaluar la eficacia terapéutica de fitocompuestos en modelos de EP de *Caenorhabditis elegans*. Los resultados mostraron que la n-butilidenftalida (figura 9) reduce la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, atenúa la acumulación de la alfa-sinucleína, detiene la pérdida de lípidos y restablece el comportamiento sensorial de los alimentos y el nivel de dopamina. Además, prolonga la vida de los animales tratados con 6-OHDA. Estas acciones posiblemente estén asociadas con su actividad antioxidante²¹.

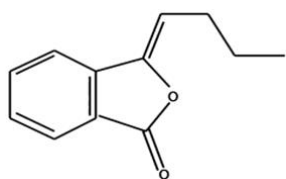


Figura 9. Estructura de n-butilidenftalida²¹.

Se requieren ensayos clínicos adicionales para evaluar la idoneidad de n-butilidenftalida para el control de la EP²¹.

6.3.10. Onjisaponina B

Se estudió a los inductores de la autofagia de las hierbas medicinales chinas como agentes neuroprotectores que mejoran la eliminación de la alfa-sinucleína en las células PC12. Se demostró que la onjisaponina B, aislada de *Radix polygalae*, es un compuesto potente para la

inducción de la autofagia, y que esta inducción depende de la vía de señalización Atg7 y AMPK-mTOR. Además, la onjisaponina B puede desempeñar un papel protector en enfermedades neurodegenerativas acelerando la eliminación de proteínas mutantes sobreexpresadas como A53T alfa-sinucleína, así como reduciendo la oligomerización de la alfa-sinucleína. Aunque todavía no se ha justificado la asociación entre la actividad autofágica y el mecanismo neuroprotector de este compuesto²².

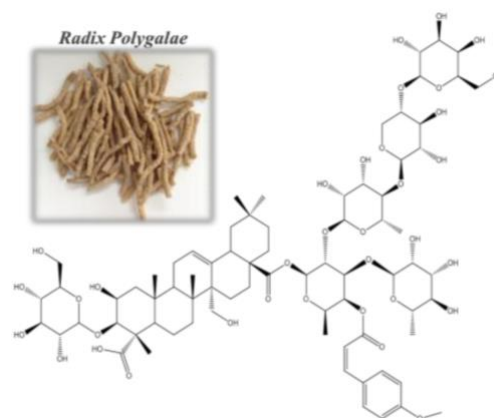


Figura 10. Estructura química de la onjisaponina B y *Radix polygalae*²².

6.3.11. Manosilglicerato

En un estudio, se evaluó la eficacia del manosilglicerato (MG) como agente antiagregante de la alfa-sinucleína manipulando una cepa de levadura. Se demostró que este compuesto disminuía significativamente la agregación de la proteína. MG no afectó a la expresión de las chaperonas moleculares Hsp104, Hsp70 y Hsp40, que generalmente se activan como parte del mecanismo de defensa celular contra la agregación de proteínas. Además, la reducción en los niveles de ROS, inducida por la síntesis de MG, apoya adicionalmente la conclusión de que este compuesto inhibe la formación de las inclusiones de la alfa-sinucleína²³.

Por lo tanto, MG es un buen candidato para inspirar el desarrollo de nuevos medicamentos para las enfermedades relacionadas con el plegamiento de proteínas²³.

6.3.12. ELN484228

Se investigaron pequeñas moléculas similares a los compuestos capaces de unirse a la alfa-sinucleína y se analizaron los efectos resultantes mediante ensayos bioquímicos y celulares relevantes para la EP¹⁰.

Se identificó un compuesto denominado ELN484228, que se dirige a la alfa-sinucleína y es biológicamente activo. ELN484228 es una molécula pequeña que contiene un grupo bencenosulfonamida, que es un resto funcional que se encuentra en gran cantidad de fármacos aprobados como los antibióticos sulfanilamida, sulfapiridina y sulfadiazina. El tratamiento con este compuesto de las células que sobreexpresan la alfa-sinucleína da

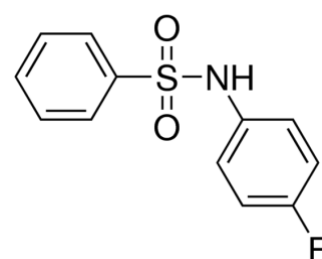


Figura 11. Estructura química del ELN484228²⁴.

como resultado una mejora significativa de las alteraciones celulares inducidas por la proteína, que incluyen la dinámica vesicular alterada, la neurotoxicidad y la retracción de las neuritas¹⁰.

Estos hallazgos manifiestan el valor potencial de esta molécula como una herramienta de investigación para la EP¹⁰.

6.3.13. PRX002

Un estudio demuestra que la alfa-sinucleína sérica puede modularse, de manera segura y de forma dependiente de la dosis, después de infusiones intravenosas únicas de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína denominado PRX002. Las dosis intravenosas del anticuerpo fueron seguras y bien toleradas y demostraron perfiles farmacocinéticos esperados en todos los niveles de dosis evaluados. Los estudios clínicos en curso y futuros tendrán como objetivo determinar la seguridad y la eficacia de dosis múltiples de PRX002 en pacientes con EP²⁵.

6.3.14. Acetilcorinolina

La acetilcorinolina (Figura 12) es el principal componente alcaloide derivado de *Corydalis bungeana*, una hierba medicinal tradicional china, y se ha demostrado que tiene propiedades antiinflamatorias²⁶.

Se evaluó su potencial en los modelos de *Caenorhabditis elegans* con EP. Los datos experimentales mostraron que la acetilcorinolina reduce significativamente la degeneración neuronal dopaminérgica inducida por 6-OHDA, previene la agregación de la alfa-sinucleína, recupera el contenido de lípidos y restablece los niveles de dopamina²⁶.

En el futuro, se plantea investigar el mecanismo preciso por el cual la acetilcorinolina mantiene la actividad de las neuronas dopaminérgicas en modelos de EP²⁶.

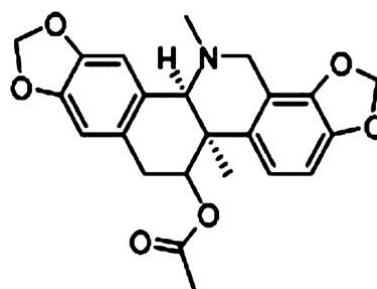


Figura 12. Estructura de la acetilcorinolina²⁶.

6.3.15. Glutamina y Hsp70

Se ha demostrado que la glutamina potencia la expresión de la proteína Hsp70 en el feocromocitoma con la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa y los métodos de transferencia Western. Los resultados demostraron que el tratamiento con glutamina mayor o igual a 10mM aumentó significativamente los niveles de mRNA y proteína Hsp70 ($P < 0.05$). Además, este tratamiento con glutamina regula positivamente la degradación de la alfa-sinucleína en células PC12, reduciendo su toxicidad en la EP²⁷. La glutamina puede ser prometedora para prevenir la agregación de la alfa-sinucleína en la EP.

6.3.16. Terapias en fase de ensayo clínico

El laboratorio Roche tiene a su anticuerpo RO7046015 en un ensayo de fase II dirigido contra la alfa-sinucleína. La estrategia pretende capturar las formas tóxicas de la proteína antes o a medida que se propagan. En estudios preclínicos, el anticuerpo redujo la neurodegeneración y la extensión de la alfa-sinucleína en un modelo de ratón transgénico. Los datos de la fase I mostraron que RO7046015 fue bien tolerado en pacientes con EP²⁸.

El laboratorio Biogen está estudiando su anticuerpo BIIB054 y Affiris está desarrollando dos vacunas llamadas PD01A y PD03A, que estimulan al sistema inmune a crear sus propios anticuerpos que se unen preferentemente a las fibrillas de alfa-sinucleína. Ambos se encuentran actualmente en fase de ensayo I²⁸.

En colaboración con UCB, Neuropore Therapies ha completado con éxito ensayos de seguridad de su molécula NPT200-11, un estabilizador de alfa-sinucleína, en voluntarios sanos. En modelos de ratón transgénicos, el compuesto disminuyó la neurodegeneración²⁸.

Sanofi Genzyme tiene en fase de ensayo II a una molécula inhibidora de la glucosilceramida sintasa (GBA), denominada SAR402671, que actúa reduciendo la producción de glucosilceramida y evitando la agregación de la alfa-sinucleína²⁸.

6.3.17. Otros

En un estudio se investigaron los efectos de 79 compuestos que pertenecen a 12 clases químicas distintas en el ensamblaje de la alfa-sinucleína en filamentos *in vitro*. Las siguientes clases de compuestos inhibieron el ensamblaje del filamento con valores IC₅₀ en el rango micromolar bajo: polifenoles, fenotiazinas, macrólidos polienos, porfirinas, rifamicinas, rojo Congo y sus derivados y terpenoides⁹.

De los compuestos que se analizaron, 26 inhibieron el ensamblaje de la alfa-sinucleína, 29 inhibieron el ensamblaje A β y 19 inhibieron la formación del filamento tau. El análisis bioquímico reveló la formación de alfa-sinucleína oligomérica soluble en presencia de compuestos inhibidores, lo que sugiere que este puede ser el mecanismo por el que se inhibe la formación de filamentos⁹.

Estos hallazgos sugieren que los oligómeros solubles formados en presencia de compuestos inhibidores pueden no ser tóxicos para las células nerviosas, y que estos compuestos pueden, por lo tanto, tener un potencial terapéutico para las sinucleinopatías⁹.

7. Conclusiones

Los avances en la investigación de fármacos dirigidos a remitir o frenar el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el mal plegamiento de proteínas están siendo complicados.

Durante los últimos años, los estudios revisados sugieren que los agentes terapéuticos dirigidos directamente contra la alfa-sinucleína, mediante distintas estrategias, podrían tener potenciales efectos modificadores de la enfermedad.

La falta de tratamientos terapéuticos curativos para la EP es hoy en día una realidad muy cercana. El descubrimiento de fármacos para la EP, sin duda, revolucionaría el tratamiento por segunda vez desde la introducción de la levodopa para la terapia sintomática, ofreciendo así perspectivas de recuperación y prevención de la EP y las sinucleinopatías relacionadas.

8. Bibliografía

1. Martínez, J. H. (2016). *Rol de alfa-sinucleína en la función y dinámica mitocondrial en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson*. Tesis doctoral. Buenos Aires.
2. Cookson, M. R. (2009). α -Synuclein and neuronal cell death. *Mol. Neurodegener*, 4, 9.
3. Moussaud, S., Jones, D. R., Moussaud-Lamodière, E. L., Delenclos, M., Ross, O. A., & McLean, P. J. (2014). Alpha-synuclein and tau: teammates in neurodegeneration?. *Mol. Neurodegener*, 9, 43.
4. Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2006). Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological α -synuclein: new targets for drug discovery. *Neuron*, 52, 33-38
5. Xu, L., & Pu, J. (2016). Alpha-synuclein in Parkinson's disease: from pathogenetic dysfunction to potential clinical application. *Parkinson's Disease*, 2016.
6. Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., & Schapira, A. H. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *The Lancet Neurology*, 5, 235-245.
7. Tarsy, D. (2017). Pharmacologic treatment of Parkinson disease. *Uptodate*. Recuperado el 26 de marzo de 2018 de <https://www.uptodate.com/contents/pharmacologic-treatment-of-parkinson-disease>
8. Olanow, C. W., & Koller, W. C. (1998). An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease Treatment guidelines. *Neurology*, 50, S1-S1.
9. Masuda, M., Suzuki, N., Taniguchi, S., Oikawa, T., Nonaka, T., *et al.* (2006). Small molecule inhibitors of α -synuclein filament assembly. *Biochemistry*, 45, 6085-6094.
10. Tóth, G., Gardai, S. J., Zago, W., Bertoncini, C. W., Cremades, N., *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, e87133.
11. Di Giovanni, S., Eleuteri, S., Paleologou, K. E., Yin, G., Zweckstetter, M., & Lashuel, H. A. (2010). Entacapone and tolcapone, two catechol O-methyltransferase inhibitors, block fibril formation of α -synuclein and β -amyloid and protect against amyloid-induced toxicity. *JBC*, 285, 14941-14954.
12. Wong, Y. C., & Krainc, D. (2017). α -Synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, 23, 1.

13. Perni, M., Galvagnion, C., Maltsev, A., Meisl, G., Müller, M. B., *et al.* (2017). A natural product inhibits the initiation of α -synuclein aggregation and suppresses its toxicity. *PNAS*, *114*, E1009-E1017.
14. Pineda, A., & Burré, J. (2017). Modulating membrane binding of α -synuclein as a therapeutic strategy. *PNAS*, *114*, 1223-1225.
15. Ruzza, P., Siligardi, G., Hussain, R., Marchiani, A., Islami, M., *et al.* (2013). Ceftriaxone blocks the polymerization of α -synuclein and exerts neuroprotective effects in vitro. *ACS Chem Neurosci*, *5*, 30-38.
16. Myöhänen, T. T., Hannula, M. J., Van Elzen, R., Gérard, M., Van Der Veken, P., *et al.* (2012). A prolyl oligopeptidase inhibitor, KYP-2047, reduces α -synuclein protein levels and aggregates in cellular and animal models of Parkinson's disease. *BJP*, *166*, 1097-1113.
17. Mittal, S., Bjørnevik, K., Im, D. S., Flierl, A., Dong, X., *et al.* (2017). β 2-Adrenoreceptor is a regulator of the α -synuclein gene driving risk of Parkinson's disease. *Science*, *357*, 891-898.
18. Collier, T. J., Srivastava, K. R., Justman, C., Grammatopoulos, T., Hutter-Paier, B., *et al.* (2017). Nortriptyline inhibits aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein by enhancing reconfiguration of the monomeric form. *Neurobiol. Dis.*, *106*, 191-204.
19. Ardah, M. T., Paleologou, K. E., Lv, G., Menon, S. A., Khair, S. B. A., *et al.* (2015). Ginsenoside Rb1 inhibits fibrillation and toxicity of alpha-synuclein and disaggregates preformed fibrils. *Neurobiol. Dis.*, *74*, 89-101.
20. Chen, Y. M., Liu, S. P., Lin, H. L., Chan, M. C., Chen, Y. C., *et al.* (2015). Irisfloreantin improves α -synuclein accumulation and attenuates 6-OHDA-induced dopaminergic neuron degeneration, implication for Parkinson's disease therapy. *BioMedicine*, *5*.
21. Fu, R. H., Harn, H. J., Liu, S. P., Chen, C. S., Chang, W. L., *et al.* (2014). n-Butylidenephthalide protects against dopaminergic neuron degeneration and α -synuclein accumulation in *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease. *PLoS One*, *9*, e85305.
22. Wu, A. G., Wong, V. K. W., Xu, S. W., Chan, W. K., Ng, C. I., Liu, L., & Law, B. Y. K. (2013). Onjisaponin B derived from *Radix Polygalae* enhances autophagy and accelerates the degradation of mutant α -synuclein and huntingtin in PC-12 cells. *IJMS*, *14*, 22618-22641.
23. Faria, C., Jorge, C. D., Borges, N., Tenreiro, S., Outeiro, T. F., & Santos, H. (2013). Inhibition of formation of α -synuclein inclusions by mannosylglycerate in a yeast model of Parkinson's disease. *BBA-General Subjects*, *1830*, 4065-4072.
24. Sigma-Aldrich. α -Synuclein blocker, ELN484228. Recuperado el 11 de mayo en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/530583?lang=es®ion=ES>
25. Schenk, D. B., Koller, M., Ness, D. K., Griffith, S. G., Grundman, M., *et al.* (2017). First-in-human assessment of PRX002, an anti- α -synuclein monoclonal antibody, in healthy volunteers. *Mov Disord*, *32*, 211-218.
26. Fu, R. H., Wang, Y. C., Chen, C. S., Tsai, R. T., Liu, S. P., *et al.* (2014). Acetylcorynoline attenuates dopaminergic neuron degeneration and α -synuclein aggregation in animal models of Parkinson's disease. *Neuropharmacol.*, *82*, 108-120.
27. Wang, H., Tang, C., Jiang, Z., Zhou, X., Chen, J., *et al.* (2017). Glutamine promotes Hsp70 and inhibits α -Synuclein accumulation in pheochromocytoma PC12 cells. *Exp Ther Med*, *14*, 1253-1259
28. Kingwell, K. (2017). Zeroing in on neurodegenerative α -synuclein. *Nature. Drug discovery*, *16*, 371-373.