



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Alfa-sinucleína: una proteína candidata a mediar en el mecanismo molecular del Parkinson. Aspectos moleculares e implicaciones terapéuticas

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2020

Autor: Marina López-Viota Zaragoza

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutor/es: Luis Miguel Gutiérrez Pérez

ÍNDICE

1. Resumen	2
2. Abreviaturas	2
3. Introducción	3
3.1. El Mal de Parkinson	3
3.2. Etiopatogenia.....	4
3.3. Tratamiento.....	5
3.4. Importancia de la Enfermedad de Parkinson	7
4. Objetivos.....	7
5. Material y métodos	8
5.1. Diseño.....	8
5.2. Estrategia de búsqueda	8
5.3. Criterios de inclusión y exclusión	9
5.4. Extracción de los datos	9
6. Resultados.....	12
6.1. La a-sinucleína y su estructura	12
6.2. Papel fisiológico de la proteína	14
6.3. Papel patológico de la proteína en la Enfermedad de Parkinson.....	16
6.4. La relación entre la a-sinucleína y la Enfermedad de Parkinson	18
6.5. Mecanismos de neurotoxicidad de la a-sinucleína.....	21
6.6. Mecanismos de propagación y transmisión celular.....	24
6.7. Implicaciones diagnósticas de la a-sinucleína	27
6.8. Implicaciones terapéuticas de la a-sinucleína.....	29
7. Discusión	33
8. Conclusiones	34
9. Bibliografía.....	34

1 | Resumen

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo crónico caracterizado por la aparición de síntomas motores y neurológicos, y por la presencia de agregados proteicos que se acumulan formando los llamados cuerpos de Lewy, cuyo principal componente es la α -sinucleína (AS). No se conoce la causa etiológica de la enfermedad, aunque hay documentados numerosos factores naturales, genéticos y ambientales que se relacionan con esta patología. El tratamiento, hasta ahora paliativo, está siendo reevaluado teniendo en cuenta las implicaciones de la proteína AS en la EP. Esta proteína podría ser la pieza clave para entender y combatir la Enfermedad de Parkinson y los mecanismos por los que actúa. El objetivo, pues, de este trabajo es revisar y reunir la información más novedosa y relevante acerca de los aspectos moleculares, fisiopatológicos y terapéuticos de esta proteína, con el fin de obtener una visión general de su papel e implicación en la patología parkinsoniana. Para ello, se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos Medline y Scopus. También, se incluyeron algunos artículos del número especial dedicado a la AS de la revista *Journal of Neurochemistry*. Los documentos que se seleccionaron describían la EP como una enfermedad compleja en la que participan múltiples vías y mecanismos tóxicos, situando a la AS en el centro de la patogénesis de la enfermedad. Esta visión de la AS ha fomentado su estudio y la investigación de sus posibles aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Hasta ahora, se han obtenido resultados positivos y esperanzadores que apuntan a un futuro tratamiento curativo de la EP.

2 | Abreviaturas

ALP, vía autofágica-lisosomal; AS, alfa-sinucleína; BS, beta-sinucleína; EP, Enfermedad de Parkinson; GS, gamma-sinucleína; LB, cuerpos de Lewy; LCR, líquido cefalorraquídeo; NAC, componente beta no amiloide; PTMs, modificaciones postraduccionales; RE, retículo endoplásmico; ROS, especies reactivas de oxígeno; Ser129-p, serina 129 fosforilada; SNC, sistema nervioso central; SNpc, sustancia negra pars compacta; TNTs, nanotubos conectores; UPR, respuesta frente a proteínas mal plegadas; UPS, sistema ubiquitina-proteosoma.

3 | Introducción

Han pasado más de 200 años desde que James Parkinson describiera por primera vez en su “*An essay on the shaking palsy*” (1817) la enfermedad a la que daría nombre más tarde ^(1,2). En 1912, Friedrich Lewy descubrió las características inclusiones que hoy se consideran la marca histológica de la enfermedad de Parkinson: los cuerpos de Lewy. Igual que J. Parkinson y F. Lewy, muchos investigadores han colaborado y contribuido con su aportación a la comprensión de esta enfermedad. Tras años de investigación, siguen surgiendo nuevas teorías y acercamientos clínicos acerca de esta enfermedad cada vez menos desconocida.

3.1. El Mal de Parkinson.

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo crónico y progresivo asociado a la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta (SNpc) ^(3,4). La SNpc está interconectada con el resto de los ganglios basales, que son los responsables de regular el movimiento voluntario y la postura. Como consecuencia de la degeneración en la SNpc, la transmisión dopaminérgica al cuerpo estriado se ve alterada y disminuida. Este déficit dopaminérgico origina una desregulación de los ganglios basales, desencadenando la aparición de síntomas motores ⁽⁴⁾.

Los principales síntomas motores son la bradicinesia (o lentitud de movimiento), la rigidez muscular, el temblor en reposo y la inestabilidad postural ^(1,4). Esta sintomatología sólo se hace evidente cuando la pérdida de neuronas nigroestriatales alcanza valores entre el 50-70% ⁽⁵⁾. Estos síntomas motores suelen acompañarse de otros síntomas no motores, que pueden preceder a éstos en varios años, como son alteraciones del sueño, hiposmia, trastornos neuropsiquiátricos y afectivos (depresión, ansiedad), disfunción cognitiva (alteración de la memoria, lentitud de pensamiento) y alteraciones autonómicas (estreñimiento, hipotensión ortostática) ^(1,4). Esta sintomatología multisistémica evidencia alteraciones en los sistemas colinérgico, noradrenérgico y serotoninérgico, probando que la enfermedad no afecta exclusivamente al sistema dopaminérgico.

La mayoría de los casos son de origen idiopático y esporádico ⁽⁶⁾, siendo la edad media de aparición de la enfermedad los 60 años ^(1,3,7). Aunque también se han dado casos de EP más precoces en personas de 20-40 años, la incidencia es menos frecuente y suelen estar asociados a mutaciones autosómicas ⁽¹⁾.

El diagnóstico es fundamentalmente clínico, basándose en la evaluación de la historia clínica y la exploración neurológica del paciente ⁽¹⁾. La confirmación del diagnóstico se realiza de forma post mortem mediante la visualización de la despigmentación de la SNpc y la presencia de inclusiones o cuerpos de Lewy en las neuronas y en las células gliales del sistema nervioso central (SNC) ^(3,8,9).

3.2. Etiopatogenia.

La causa primera de la EP es todavía desconocida, de ahí que la mayoría de los casos se registren como idiopáticos. A pesar de esto, se conocen diversos factores que se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar la EP. Estos factores se pueden dividir en tres categorías ⁽¹⁾:

- a. Factores naturales. El principal factor de riesgo de la EP es la edad ^(3,10). Con la edad se produce una pérdida neuronal natural y asintomática apreciable a partir de los 40 años. Esta pérdida combinada con la generación de radicales oxidativos, producto del metabolismo de las neuronas dopaminérgicas y de otros procesos, contribuye al desarrollo y avance de la enfermedad ^(3,4).
- b. Factores genéticos. Actualmente, se conocen 23 loci genéticos denominados PARK, y 19 genes implicados en la EP ⁽²⁾. Existen numerosas mutaciones asociadas a la EP en genes como SNCA, LRRK2, MAPT ⁽⁷⁾ ... De estos genes, el más relevante es el SNCA, que codifica para la proteína α -sinucleína (AS). Se han descrito mutaciones puntuales, duplicaciones y triplicaciones de este gen, todas ellas estrechamente relacionadas con la EP ^(11,12).
- c. Factores ambientales. Se conocen diversos compuestos químicos y factores exógenos que contribuyen al desarrollo de la EP. Es bien conocida la relación entre la vida rural y una mayor incidencia de la EP ⁽⁷⁾. La razón de esto se debe probablemente a una mayor exposición a

herbicidas y pesticidas, como el paraquat y la rotenona, compuestos que han demostrado una relación directa con la EP al producir disfunción mitocondrial por medio de la inhibición del complejo I ⁽¹²⁾. Otros compuestos como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), también inhibidores del complejo I mitocondrial, originan síndromes parkinsonianos; tanto la 6-OHDA como el MPTP se emplean en la creación de modelos animales de conducta parkinsoniana ⁽⁶⁾. Los metales pesados, como aluminio, cobre, plomo y manganeso, tienen también un papel en el desarrollo de la EP ^(12,13). Por otra parte, se ha relacionado el consumo de tabaco, café, alcohol y AINEs con un menor riesgo, aunque ninguno de ellos ha sido probado científicamente ⁽⁷⁾.

A pesar de no conocerse la etiología exacta de la EP, muchos consideran que el desencadenante de la enfermedad podría ser la interacción entre los factores naturales, genéticos y ambientales ^(1,7). Asimismo, la mayoría de los factores mencionados son capaces de interactuar con la α -sinucleína e inducir su mal plegamiento y agregación, lo que obliga a plantearse la contribución de esta proteína a la patología.

3.3. Tratamiento.

El tratamiento disponible actualmente es exclusivamente sintomático y no modifica el curso evolutivo de la enfermedad ^(1,3). Las distintas estrategias terapéuticas abarcan terapias farmacológicas, no farmacológicas y quirúrgicas.

El acercamiento farmacológico se basa en corregir la transmisión dopaminérgica, aumentando los niveles de dopamina en el SNC, o en disminuir la hiperactivación colinérgica que se produce como consecuencia de la deficiencia dopaminérgica. Para ello, se dispone de varios fármacos que pueden administrarse en monoterapia o en combinación para obtener un mayor beneficio ⁽¹⁾:

- a. Levodopa (L-dopa). Este precursor de la dopamina es el tratamiento estándar más eficaz frente a la EP. Actúa transformándose en dopamina por acción de la Dopa descarboxilasa. Suele administrarse junto a un inhibidor de la Dopa descarboxilasa periférica, como la carbidopa o la

benserazida, para evitar su biotransformación fuera del SNC y aumentar así su eficacia. Aunque es bastante eficaz en las primeras etapas de la enfermedad, tiende a perder su efectividad a partir de los 2-3 años de tratamiento. Además, se relaciona con la aparición de complicaciones motoras, como discinesias y fluctuaciones on/off, náuseas y vómitos, y síntomas mentales, como confusión y alteración de la memoria.

- b. Agonistas directos de los receptores dopaminérgicos. A este grupo pertenecen el pramipexol, el ropinirol, la rotigotina y la apomorfina. Actúan sobre los receptores dopaminérgicos D1, D2 y D3 potenciando la transmisión dopaminérgica. Como efectos adversos propios de este grupo destacan la somnolencia, discinesias, conductas compulsivas, confusión mental, náuseas y vómitos.
- c. Inhibidores de la monoaminoxidasa B (MAO-B) y de la catecol-O-metiltransferasa (COMT). Ambos grupos terapéuticos actúan disminuyendo la degradación metabólica de la L-dopa, inhibiendo sus enzimas correspondientes. De este modo, consiguen aumentar la biodisponibilidad de la L-dopa y prolongar su acción. Entre los inhibidores de la MAO-B se encuentran la selegilina y la rasagilina, y entre los inhibidores de la COMT destacan la entacapona y la tolcapona. Una buena estrategia terapéutica es la administración triple de L-dopa junto a un inhibidor de la DOPA descarboxilasa periférica y un inhibidor de la MAO-B o de la COMT.
- d. Anticolinérgicos. Se emplean para contrarrestar los efectos de la hiperactividad colinérgica. Su eficacia es limitada y presentan efectos secundarios importantes, como estreñimiento y confusión, por lo que su uso está limitado. Los más usados son el trihexifenidilo y el biperideno.
- e. Amantadina. Se trata de un fármaco antiviral que aumenta la liberación de dopamina y disminuye las discinesias. Sus beneficios parecen estar relacionados con su efecto antiglutamatérgico. Su eficacia es limitada y presenta abundantes efectos secundarios, como edemas, *livedo reticularis*, estreñimiento, confusión y delirio.

Para el tratamiento de los síntomas no motores se emplean fármacos adyuvantes: antieméticos como la domperidona y el ondansetrón, antipsicóticos

como la clozapina y la quetiapina, y antidepresivos como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) ⁽¹⁾.

Otro posible abordaje es la estimulación cerebral profunda, un procedimiento quirúrgico reversible no curativo que consigue modular las señales que causan los síntomas motores mediante la estimulación eléctrica, reduciendo las fluctuaciones y las discinesias motoras ⁽³⁾.

Cabe destacar la importancia de los tratamientos no farmacológicos, como la fisioterapia, la terapia ocupacional, la psicología y la reeducación. Estas disciplinas complementan los beneficios de la terapia farmacológica, mejorando la calidad de vida de los pacientes.

3.4. Importancia de la Enfermedad del Parkinson.

Con los años, las enfermedades neurodegenerativas han ido ganando importancia debido al envejecimiento progresivo de la población. La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente después de la enfermedad de Alzheimer. Se estima que afecta a 150.000 personas en España y a más de 7 millones de personas en todo el mundo. La incidencia aumenta con la edad, siendo del 1-2% en mayores de 65 años y del 4-5% en personas de más de 85 años ⁽³⁾.

El tratamiento actual, exclusivamente sintomático, ha ayudado a ralentizar en lo posible el avance de la enfermedad y ha conseguido aumentar la esperanza de vida de los pacientes. Sin embargo, estos tratamientos pierden su eficacia con el tiempo dificultando el manejo de la enfermedad a largo plazo. A día de hoy, la enfermedad de Parkinson no tiene cura.

En definitiva, la alta incidencia y prevalencia combinadas con el gran impacto socioeconómico y la ausencia de un tratamiento curativo convierten al Parkinson en un problema crítico de la salud pública en nuestra sociedad envejecida.

4 | Objetivos

Dadas las razones mencionadas en el apartado anterior, que defienden la importancia y la relevancia de la EP como problema de salud global, se decidió

llevar a cabo este trabajo recopilatorio. El propósito de este trabajo de fin de grado es conocer y revisar la literatura científica más novedosa y actual acerca de la AS como posible proteína implicada en la patogénesis de la EP. El trabajo se centra en la descripción de los aspectos moleculares y estructurales de la proteína, su participación en la EP y sus mecanismos de toxicidad, así como también en los posibles acercamientos terapéuticos.

5 | Material y métodos

5.1. Diseño.

La búsqueda se diseñó de forma que permitiera la obtención de artículos de revisión que trataran los temas centrales del trabajo destacados en el apartado número 4 (objetivos). Se eligió como tipo de documento la revisión sistemática por su alto grado de evidencia científica. Para realizar la búsqueda, se designaron como palabras clave: *parkinson disease*, *alpha-synuclein* y *molecular mechanism*.

Las bases de datos seleccionadas fueron Medline y Scopus, por ser dos de las bases de datos bibliográficas más consultadas en ciencias de la salud. También, se consultó el número especial sobre la AS de la revista *Journal of Neurochemistry* (vol. 150, núm. 5), que reúne temas diversos en relación a la AS y la EP tratados durante la conferencia que cada 2 años reúne a los mayores expertos de este campo.

5.2. Estrategia de búsqueda.

En primer lugar, se realizó una búsqueda acerca de la EP y sus características con el fin de obtener una imagen general de la enfermedad, su epidemiología y causas, su sintomatología y el tratamiento disponible. Para ello, se consultó el libro de neurología Zarranz (2018). La información del libro se completó con el artículo "*Advances in Parkinson's Disease: 200 years later*" (2018), que recopila los avances y descubrimientos más importantes en la EP y su tratamiento desde que J. Parkinson lo descubriera por primera vez.

Seguidamente, se llevó a cabo una búsqueda más específica en Scopus y Medline (vía Pubmed) de revisiones que relacionaran la AS y su mecanismo molecular con la EP. Para ello, se diseñaron ecuaciones de búsqueda ampliadas que combinaban descriptores MeSH (*parkinson disease, alpha-synuclein*), palabras clave (*parkinson disease, alpha-synuclein, molecular mechanism*) y variaciones de las palabras clave (*parkinson's disease, a-synuclein, α -synuclein*). Todos estos términos se relacionaron mediante operadores booleanos con la finalidad de aumentar la sensibilidad y especificidad de la búsqueda y obtener una recuperación documental más completa.

En las ecuaciones mencionadas, no se filtró por rango de publicación para no omitir ningún artículo de interés, a sabiendas de que cierto porcentaje de los documentos recuperados generarían “ruido” en la búsqueda y no serían relevantes para el trabajo; con todo, se dio preferencia a los artículos más recientes. Por la misma razón, tampoco se limitó por rango de edad, sexo o especie. La selección fina de los artículos se efectuó por medio de la lectura de sus resúmenes y de la evaluación de su adecuación a los criterios de inclusión escogidos.

5.3. Criterios de inclusión y exclusión.

En el trabajo se incluyeron documentos de tipo revisión sistemática y de libre acceso (Open Access), cuyo tema principal fuera la AS en la EP y que estuvieran redactados en español o en inglés.

Por otra parte, se excluyeron todos aquellos artículos irrelevantes o que se desviaran del tema central del trabajo y aquellos que no cumplieren alguno de los criterios de inclusión anteriormente nombrados.

5.4. Extracción de los datos.

Tras aplicar las ecuaciones de búsqueda en las bases de datos, se obtuvieron 90 resultados, todos ellos artículos de revisión, de los que se seleccionaron 31 artículos por medio de la lectura de los resúmenes. La mayoría de las revisiones provienen de Scopus y de la revista *Journal of Neurochemistry*, debido a que

esas fuentes de información aportaron un mayor número de artículos de interés en comparación con Medline.

En total, se utilizaron 25 trabajos para la redacción de esta memoria, incluyendo el libro de neurología. Todos los documentos aparecen recogidos en la siguiente tabla:

Título	Año de publicación	Resumen
Neurología (J.J. Zarranz)	2018	Libro de consulta de patología clínica neurológica
Advances in Parkinson's Disease: 200 years later	2018	Revisión de los mayores avances en la comprensión y en la terapia de la EP desde su descubrimiento
(*) Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation	2019	Revisión de los descubrimientos y aportaciones de los modelos celulares a la comprensión de la toxicidad mediada por la AS
Exosome determinants of physiological aging and age-related neurodegenerative diseases	2019	Revisión de los exosomas como vehículos de transporte de agregados proteicos
Molecular mechanisms of membrane-associated amyloid aggregation: Computational perspective and challenges	2018	Revisión de los mecanismos moleculares de interacción de las proteínas amiloides con las membranas lipídicas
Targeting prion-like protein spreading in neurodegenerative diseases	2018	Revisión de los mecanismos moleculares de las enfermedades neurodegenerativas por proteínas "prion-like" y posibles estrategias terapéuticas
The spread of prion-like proteins by lysosomes and tunneling nanotubes: Implications for neurodegenerative diseases	2017	Revisión del rol de los lisosomas y de los nanotubos en la propagación de agregados "prion-like"
Looking at the recent advances in understanding α -synuclein and its aggregation through the proteoform prism	2017	Revisión de los aspectos estructurales, funcionales y disfuncionales de la AS desde el punto de vista proteiforme
Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments	2017	Revisión de las vías de señalización involucradas en la EP y de la contribución de los factores genéticos y ambientales al desarrollo y progresión de la enfermedad
Versatile structures of α -synuclein	2016	Revisión de los diferentes estados conformacionales de la AS bajo condiciones fisiológicas y patológicas
Oxidative stress and Parkinson's disease	2015	Revisión de los mecanismos oxidativos y de los eventos moleculares y bioquímicos en la EP

Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein	2015	Revisión de la evidencia sobre las propiedades de los oligómeros y de sus potenciales mecanismos de disrupción celular
Exosomes: Vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders	2013	Revisión de la biología de los exosomas y su papel en el transporte intercelular de proteínas
Limelight on alpha-synuclein: Pathological and mechanistic implications in neurodegeneration	2013	Revisión de los mecanismos celulares y moleculares implicados en las sinucleinopatías
α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease	2012	Revisión de los diferentes estados de agregación de la AS, sus mecanismos de agregación y la influencia de los factores genéticos y ambientales
A deadly spread: Cellular mechanisms of α -synuclein transfer	2011	Revisión de los posibles mecanismos de propagación de la AS
NADPH oxidases in Parkinson's disease: a systematic review	2017	Revisión del papel de las oxidasas NADPH neuronales en la neuroinflamación, la acumulación de AS y la disfunción mitocondrial
(*) The physiological role of α -synuclein and its relationship to Parkinson's Disease	2019	Revisión de las funciones fisiológicas de la AS
(*) Effects of alpha-synuclein post-translational modifications on metal binding	2019	Revisión de las interacciones de la AS con metales fisiológicamente relevantes haciendo hincapié en el efecto producido por las modificaciones postraduccionales
(*) α -synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities	2019	Revisión de las distintas conformaciones de la AS y su contribución citotóxica a la patología
(*) In vitro models of synucleinopathies: informing on molecular mechanisms and protective strategies	2019	Revisión de los hallazgos descubiertos en modelos celulares y posibles aproximaciones terapéuticas
(*) How is alpha-synuclein cleared from the cell?	2019	Revisión de los mecanismos de eliminación celular de la AS y posibles intervenciones terapéuticas
(*) Alpha-synuclein at the nexus of genes and environment: the impact of environmental enrichment and stress on brain health and disease	2019	Revisión de los factores ambientales estimulantes y estresantes que afectan al cerebro en el contexto de la EP
(*) Antibodies against alpha-synuclein: tools and therapies	2019	Revisión de los anticuerpos específicos frente a la AS y su utilidad en diversas sinucleinopatías
(*) Parkinson's disease biomarkers based on α -synuclein	2019	Revisión del progreso en el desarrollo de biomarcadores para una detección temprana de la EP

Tabla 1. Tabla resumen de los documentos incluidos en esta memoria de trabajo de fin de grado. Los artículos marcados con un asterisco (*) provienen del número especial de la revista *Journal of Neurochemistry*. Los trabajos restantes se obtuvieron de Scopus o de Medline.

6 | Resultados

6.1. La a-sinucleína y su estructura.

La a-sinucleína (AS) es una proteína soluble de pequeño tamaño (14.5 kDa) que se localiza abundantemente en las terminaciones presinápticas de los animales vertebrados ^(7,11,12,14), llegando a representar el 1% del total de las proteínas en el cerebro humano ^(13,14). Pertenece a la familia de las sinucleínas, un grupo de proteínas altamente conservadas compuesto por la α -sinucleína, la β -sinucleína y la γ -sinucleína ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. La a-sinucleína está codificada por el gen SNCA, localizado en la posición 21 del brazo largo del cromosoma 4 (4q21) ⁽¹⁶⁾. Su mayor característica es la ausencia de una estructura secundaria bien definida y su gran diversidad conformacional ^(11,12). Su secuencia primaria está compuesta por 140 aminoácidos distribuidos en 3 regiones funcionales bien diferenciadas ^(11,16):

- a. Región N-terminal. Está formada por los residuos 1-60. Los primeros 25 aminoácidos están implicados en el reconocimiento y anclaje de membranas ⁽¹¹⁾. Esta región contiene varias copias imperfectas de un tándem con la secuencia KTKEGV capaces de formar hélices anfipáticas en presencia de lípidos ^(13,14); estas hélices alfa comparten cierta homología con los dominios de unión lipídica de las apolipoproteínas A2, por lo que se hipotetiza que estas repeticiones aportan a la AS la capacidad y la afinidad de unirse a las membranas lipídicas ^(11,16). En esta región se localizan varias de las mutaciones asociadas a la EP familiar, como A53T, E46K y A30P ^(7,11,15).
- b. Región central. También conocida como componente beta no amiloide (NAC), se encuentra delimitada por los residuos 61-95. Esta región es la más hidrófoba y es objeto de diversas modificaciones postraduccionales

- (PTMs). Destaca por ser altamente propensa a formar estructuras beta y por ser la responsable de las propiedades amiloides de la proteína ^(11,16).
- c. Región C-terminal. Abarca los residuos 96-140 y es rica en prolina. Sus numerosos residuos de glutamato y aspartato la dotan de una fuerte carga negativa, rasgo distintivo de las proteínas intrínsecamente desordenadas que permite mantener su solubilidad ⁽¹¹⁾. Este dominio es capaz de interactuar con proteínas, moléculas de pequeño tamaño e iones metálicos ^(13,16,17), además de con las regiones amino-terminal y central ^(13,16).

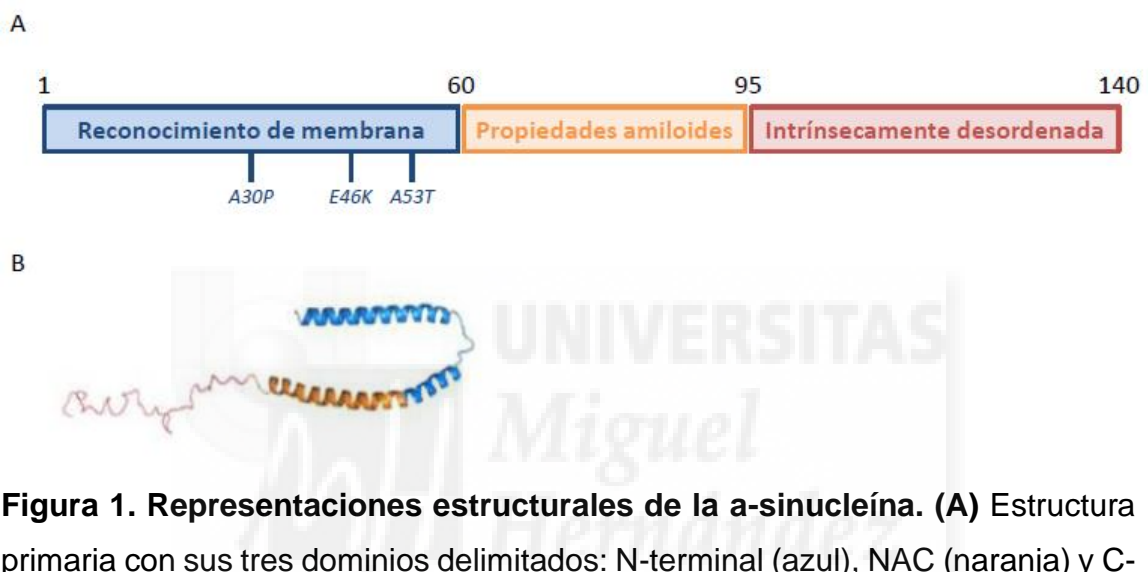


Figura 1. Representaciones estructurales de la α -sinucleína. (A) Estructura primaria con sus tres dominios delimitados: N-terminal (azul), NAC (naranja) y C-terminal (rojo). En la región amino-terminal está marcada la localización exacta de las principales mutaciones familiares de la región N-terminal. **(B)** Estructura adquirida por los monómeros de α -sinucleína al unirse a una micela. Destacan las dos hélices alfa de las regiones central y amino-terminal, y la cadena C-terminal sin una estructura definida. Los colores de **(B)** concuerdan con los de **(A)**. Figura adaptada del artículo “*Versatile Structures of α -Synuclein*” ⁽¹¹⁾.

La AS fue descrita por primera vez por Maroteaux en 1988 tras localizarla en las terminaciones presinápticas de la especie *Torpedo Californica* ⁽¹⁶⁾. Más tarde, adquiriría una mayor importancia al ser identificada en las placas amiloides de pacientes con la enfermedad de Alzheimer ^(11,16). No obstante, su papel estrella se halla en las denominadas sinucleinopatías, un grupo de trastornos que incluye, además de la EP, la demencia con cuerpos de Lewy, la atrofia multisistémica, la demencia fronto-temporal y el fallo autonómico puro ⁽¹⁶⁾. Estas

enfermedades tienen en común la presencia de depósitos anormales de AS en el citoplasma de las neuronas o de las células gliales ⁽⁸⁾.

6.2. Papel fisiológico de la proteína.

La AS se encuentra mayoritariamente en el citosol de las células nerviosas, aunque también puede encontrarse unida a membranas sinápticas y en estados de agregación amiloide ^(11,12,18). La forma predominante de la AS es la monomérica ^(15,18); no obstante, su gran plasticidad conformacional le permite adoptar diversas formas, dando lugar a especies oligoméricas y fibrilares ^(11,12). Estos tres tipos conformacionales se caracterizan por un alto grado de polimorfismo estructural ⁽¹⁹⁾, de forma que pequeños cambios en el ambiente celular pueden introducir variaciones morfológicas y originar diferentes variedades de monómeros, oligómeros y fibrillas con características dispares en cuanto a toxicidad y capacidad de propagación y agregación ^(11,15). Estas especies existen en un equilibrio dinámico ^(19,20) y se mantienen estables gracias a las interacciones electrostáticas entre los residuos 30-100 de las regiones N-terminal y NAC, y los residuos 120-140 de la región C-terminal ^(12,18). Además de las nombradas, se conoce una cuarta especie, la tetrámera, cuya presencia en la célula es algo controvertida, debido a los resultados opuestos entre estudios que defienden su existencia y otros que la niegan ^(5,11,18).

Otro aspecto destacable de la AS es su multifuncionalidad. La AS está involucrada en el tráfico y liberación de las vesículas sinápticas ^(6,15). Participa de forma activa en la fusión de las vesículas con las membranas presinápticas ^(18,19) interaccionando directamente con la sinaptobrevina-2/VAMP2, un componente clave del complejo SNARE localizado en las propias vesículas sinápticas ^(11,14). Además de regular la liberación de neurotransmisores como la dopamina ^(7,15), interviene en la regulación del metabolismo lipídico ⁽¹⁹⁾ y de la respuesta apoptótica ⁽¹⁵⁾. Asimismo, la AS se ha relacionado con otros procesos celulares como la activación microglial, la regulación del tamaño de las vesículas sinápticas, el remodelado de las membranas y de la morfología mitocondrial, y la iniciación de las respuestas inmunes innata y adaptativa ⁽¹⁵⁾.

En estudios recientes realizados en ratones *knockout*, se ha comprobado que las sinucleínas pueden no ser esenciales para el funcionamiento básico de la transmisión sináptica, sino que más bien contribuyen al mantenimiento de la plasticidad neuronal y de las funciones sinápticas a largo plazo ^(6,7,14).

La singular diversidad conformacional de la AS podría estar justificada por el inmenso número de funciones que ha de desempeñar ⁽¹⁵⁾. De ser así, la elevada sensibilidad de su estructura a los cambios y condiciones ambientales sería considerada como una necesidad, que le permitiría cambiar de forma para poder así realizar todas las funciones descritas.

El origen de estas particularidades, tanto estructurales como funcionales, podría explicarse por medio del concepto del prisma proteiforme (ilustrado en la figura 2). Según este modelo, a partir del gen SNCA, se obtendría un amplio espectro de proteoformas con diferentes aspectos químicos y morfológicos capaces de ejecutar funciones diversas ⁽¹⁵⁾.

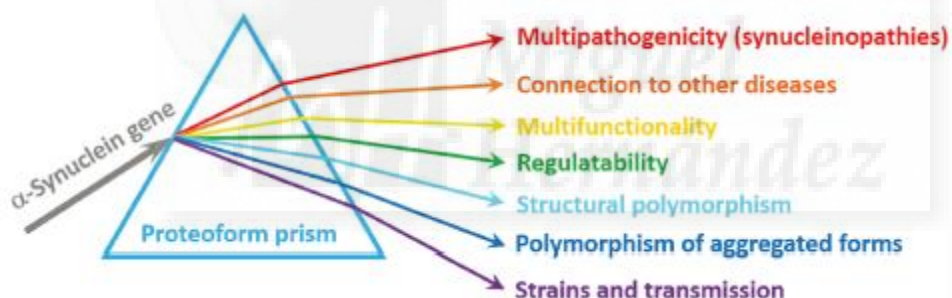


Figura 2. Representación esquemática del concepto proteiforme. Según este modelo, la “luz incidente” del gen SNCA se “difractaría” al pasar a través del prisma, dando lugar a diferentes formas proteicas con diversas características. El prisma simboliza aquellos mecanismos ambientales y genéticos capaces de introducir modificaciones y generar proteoformas. La analogía del prisma explicaría las múltiples funciones, polimorfismos estructurales y patologías que derivan de una proteína codificada por un único gen. Figura adaptada del artículo “*Looking at the recent advances in understanding α -synuclein and its aggregation through the proteoform prism*” ⁽¹⁵⁾.

6.3. Papel patológico de la proteína en la Enfermedad de Parkinson.

Bajo circunstancias patológicas, la AS forma agregados a partir de la asociación de intermediarios oligoméricos solubles que maduran hasta formar fibrillas amiloides ^(8,11,20). Este proceso de fibrilación consta de dos fases: nucleación y elongación ⁽²¹⁾. Se dice que la agregación de la AS es un proceso dependiente de nucleación porque requiere de la presencia de un oligómero con abundantes láminas beta o de un fragmento de fibrilla amiloide que actúe como “semilla” (*seed*, en inglés), uniéndose a los monómeros de AS y modificando su conformación a una de lámina beta, para luego elongarse y generar las fibrillas ^(16,18,20,21).

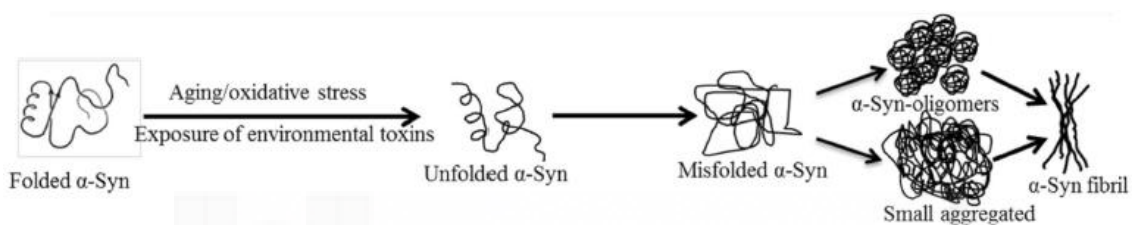


Figura 3. Representación esquemática del proceso de fibrilación. La edad, el estrés oxidativo o las toxinas ambientales son factores que propician el mal plegamiento de la AS, que termina depositándose en forma de oligómeros, pequeños agregados y fibrillas. Estas formas juegan un papel importante en la pérdida neuronal en la EP. Figura adaptada del artículo “*Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson’s disease: Targets for potential treatments*” ⁽³⁾.

La evidencia actual sostiene que las formas oligoméricas ricas en estructuras beta son las responsables de los efectos tóxicos de la AS ^(5,18,20). De acuerdo a la hipótesis de los oligómeros tóxicos, éstos serían los culpables de producir la mayor parte de los efectos neurotóxicos ⁽²¹⁾. Sin embargo, no todos los oligómeros son tóxicos ⁽¹⁸⁾. Las especies oligoméricas se clasifican en *on* y *off-pathway* dependiendo de si participan o no en el proceso de fibrilación ⁽²¹⁾. Los oligómeros *on-pathway* poseen abundantes láminas beta en su estructura y son generalmente tóxicos, mientras que los *off-pathway* poseen una estructura secundaria desordenada y no suelen presentar toxicidad ⁽²¹⁾. Los oligómeros *on-pathway* actúan como precursores en la formación de fibrillas, mientras que los oligómeros *off-pathway* tienden a formar complejos amorfos no fibrilares ⁽¹⁹⁾.

Estos complejos formados a partir de oligómeros *off-pathway* no son tóxicos ni poseen la capacidad de propagarse, por lo que, en algunos trabajos, se considera que participan en la inhibición de la fibrilación de la AS ⁽¹⁹⁾.

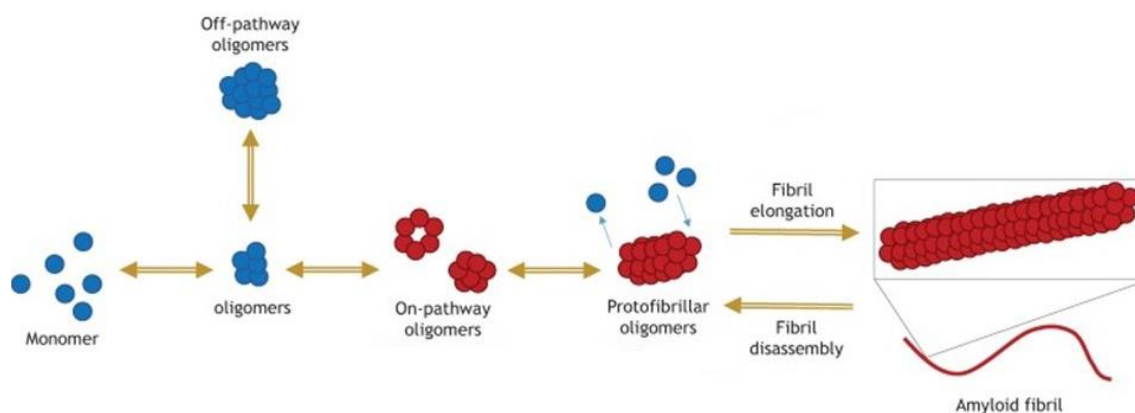


Figura 4. Representación de las distintas especies oligoméricas de la AS y su implicación en el proceso de fibrilación. Se diferencia entre oligómeros *on-pathway* y *off-pathway* dependiendo de si participan o no en la formación de fibrillas amiloides. También, se diferencian en cuanto a su toxicidad. Los oligómeros *on-pathway* destacan por ser altamente tóxicos, mientras que los *off-pathway* son especies no tóxicas o con muy baja toxicidad. Figura adaptada del artículo “*Seeking a Mechanism for the Toxicity of Oligomeric α -Synuclein*” ⁽¹⁸⁾.

En comparación con los oligómeros, las fibrillas son definitivamente menos tóxicas ^(16,17,21). A pesar de su relativamente baja toxicidad, las fibrillas amiloides contribuyen en gran medida a la enfermedad debido a su exclusiva capacidad de propagación ⁽¹⁹⁾. Las fibrillas de AS, a diferencia de los oligómeros, pueden propagarse célula a célula de forma similar a los priones ^(5,8). Además, son capaces de inducir el mal plegamiento de la AS monomérica en las células receptoras, extendiendo así la patología ⁽²¹⁾.

En resumen, tanto las especies oligoméricas como las fibrilares son tóxicas. No obstante, las formas oligoméricas se asocian con un mayor grado de toxicidad. Las fibrillas, por su parte, tienen la capacidad de propagar la enfermedad a otras células; esta habilidad es exclusiva y propia de las especies fibrilares.

6.4. La relación entre la a-sinucleína y la Enfermedad de Parkinson.

La alta sensibilidad de la AS a los cambios ambientales se puede considerar un arma de doble filo. Por un lado, le permite a la proteína adoptar diferentes estructuras y ejercer una gran batería de funciones diversas. Pero, por otro lado, la hace más susceptible a las modificaciones estructurales aberrantes que pueden inducir su mal plegamiento. La acumulación de proteínas mal plegadas produce la desregulación de los procesos celulares, favoreciendo el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la EP. En la EP, las proteínas mal plegadas se depositan formando agregados en los somas neuronales y en las neuritas denominados cuerpos de Lewy (LB) y neuritas de Lewy, respectivamente ^(8,16). El principal componente de estas inclusiones patológicas es la AS en forma de fibrillas ^(11,19). También, se han identificado otras proteínas mal plegadas como la tau fosforilada y la proteína beta amiloide ⁽³⁾, ambas involucradas en la enfermedad de Alzheimer ⁽²⁰⁾. El mal plegamiento y la agregación de la AS está modulada por mutaciones genéticas, factores ambientales, PTMs e interacciones con las membranas celulares y con otras proteínas ⁽¹²⁾.

6.4.1. Mutaciones genéticas.

De entre todos los genes relacionados con la EP (SNCA, Parkin, DJ-1, LRRK2, PINK-1...) ⁽³⁾, es preciso destacar el gen SNCA por su notable importancia. Las mutaciones y duplicaciones del gen SNCA, que codifica para la AS, son causas establecidas de la EP ⁽⁸⁾. Las mutaciones puntuales se consideran poco comunes, pero altamente penetrantes ^(14,16). Las más estudiadas son las sustituciones A30P, E46K y A53T ⁽¹⁶⁾. Todas ellas confieren un efecto citotóxico a la proteína y dan lugar a una EP familiar de aparición temprana y de herencia autosómica dominante ^(11,12). La A30P promueve la formación de oligómeros de AS ^(12,21), mientras que la A53T y la E46K aumentan la tendencia de las regiones central y C-terminal a formar estructuras beta ⁽¹⁸⁾, promoviendo ambas la fibrilación de la proteína ^(12,21). Las duplicaciones del gen SNCA son más frecuentes que las mutaciones puntuales. Destacan las duplicaciones y triplicaciones del gen, siendo éstas últimas las de mayor severidad ⁽¹⁶⁾.

6.4.2. Modificaciones postraduccionales.

Las PTMs son capaces de modular la función y el comportamiento de la AS en la célula ⁽¹⁶⁾, introduciendo cambios en su estructura secundaria ⁽¹²⁾ y favoreciendo la formación de oligómeros y agregados ^(13,19). La AS es objeto de numerosas PTMs, como fosforilación, oxidación, ubiquitinación, sumoilación, nitrosilación, truncamiento, nitración, glicosilación, acetilación de la región N-terminal... ^(12,13,15). De entre todas, las que poseen una relación más estrecha con la EP son la fosforilación, la ubiquitinación y el truncamiento ^(15,16).

- a. Fosforilación. La gran mayoría de la AS aislada de tejidos cerebrales de individuos enfermos está fosforilada, en contraste con la AS de individuos sanos en los que sólo una pequeña porción lo está ⁽¹³⁾. Los sitios de fosforilación más relevantes son los residuos Ser129 y Ser87, aunque también destacan algunas tirosinas (Y125, Y133, Y136) ^(15,16,19). Se estima que el 90% de la AS en los LB está fosforilada en la Ser129 (Ser129-p) ^(12,16,20,22), llegando a considerarse un marcador significativo de la EP y de otras sinucleinopatías ^(16,19). Actualmente, el rol de la Ser129-p no se conoce con exactitud, aunque se piensa que podría regular varios aspectos de la proteína como su estructura, unión a membranas, agregación y neurotoxicidad ^(13,19). A pesar de los numerosos estudios, todavía no se ha llegado a un acuerdo respecto al papel de la Ser129-p como facilitadora o inhibidora de la agregación ^(12,16,21,22). En cuanto a la Ser87 fosforilada, parece aumentar la flexibilidad conformacional de la AS y bloquear la fibrilación *in vitro* ^(12,13,19).
- b. Ubiquitinación. Se ha visto que los LB presentan abundantes estructuras ubiquitinadas en su interior ^(12,16). Esta modificación se produce después de la agregación ⁽¹²⁾, a modo de señalización de aquellas proteínas destinadas a ser degradadas ^(12,22). Las proteínas marcadas son procesadas por el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) que es, junto a la vía autofágica-lisosomal (ALP), una de las principales rutas de degradación encargadas de eliminar proteínas mal plegadas y agregados proteicos ⁽¹⁶⁾. El efecto de la monoubiquitinación en la agregación de la AS depende del sitio de la modificación, pudiendo promocionar la formación de agregados tóxicos o reducir la velocidad de agregación,

según el caso ^(12,21). Los sitios de ubiquitinación más comunes son las lisinas K12, K21 y K23 ⁽¹⁵⁾.

- c. Truncamiento. Aproximadamente, el 15% de la AS localizada en los LB está truncada, es decir, acortada ⁽¹⁶⁾. Varios estudios han demostrado que las especies truncadas promueven la fibrilación y la agregación proteica ⁽¹⁶⁾. Aunque esta modificación ocurre durante la traducción y, por lo tanto, no puede considerarse estrictamente una PTM, se decidió incluirla en este grupo por su elevada importancia en la patogénesis de la EP. Las truncaciones más comunes son las que afectan al dominio C-terminal, concretamente a los residuos 115-135, que dan como resultado fragmentos de AS acortados con tendencia a formar fibrillas ⁽¹²⁾.

6.4.3. Interacciones con proteínas.

Tanto las mutaciones puntuales como las PTMs afectan a las interacciones de la AS con otras proteínas y pequeñas moléculas ^(12,13). La AS es una proteína que se une de forma promiscua a diversos ligandos, incluyendo chaperonas, proteínas sinaptosomales, enzimas mitocondriales, kinasas, histonas, tubulina, Dopa descarboxilasa y proteínas relacionadas con la EP y otras enfermedades neurodegenerativas como la parkina, la proteína tau o la DJ-1 ^(12,15). Muchas de estas proteínas se han identificado en los LB ⁽¹²⁾. En total, la AS se une y regula la actividad de más de 100 proteínas diferentes, demostrando su considerable aportación a la señalización celular ^(12,15). La AS también es capaz de interactuar con pesticidas, herbicidas y metales ⁽¹⁵⁾. Los iones metálicos juegan un importante papel en la agregación y etiología de la EP. Las interacciones aberrantes de la AS con determinados iones metálicos como Al(III), Cu(II), Fe(III), Ca(II) y Cd(II) pueden desencadenar la formación de oligómeros y fibrillas, posiblemente al inducir y estabilizar electrostáticamente un estado parcialmente plegado más propenso a la agregación que el estado monomérico ^(12,13,19). Además, los iones metálicos libres estimulan la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), fomentando el estado oxidativo de la EP ^(13,19). Una cuestión ampliamente discutida, pero no demostrada, es el de la traslocación de la AS al núcleo, donde se teoriza que podría interactuar directamente con el ADN y regular la transcripción o promover la formación de ROS *in situ* y dañar al ADN ⁽¹⁶⁾.

6.5. Mecanismos de neurotoxicidad de la α -sinucleína.

A pesar de que los mecanismos moleculares responsables de la citotoxicidad en la EP no se conocen con exactitud ⁽⁸⁾, se han propuesto varios procesos celulares que podrían explicar la degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc. Éstos son la alteración de las vías de degradación proteica, la disfunción mitocondrial, el estrés en el retículo endoplásmico (RE), la excitotoxicidad y la neuroinflamación crónica ^(3,6,19). Todos estos mecanismos parecen estar involucrados en la aparición y progresión de la EP.

6.5.1. Defectos en las vías de degradación proteica y estrés en el RE.

Ante la acumulación intracelular de proteínas mal plegadas, la célula activa las vías de degradación proteica. Los principales encargados de eliminar proteínas dañadas o mal plegadas son el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) y la vía autofágica-lisosomal (ALP) ^(3,12,18,22). La UPS degrada oligómeros de pequeño tamaño, mientras que los grandes agregados proteicos son procesados por la ALP ^(3,21). En la EP, se detectan serios defectos en estos dos sistemas, probablemente debidos a su sobresaturación ⁽²⁰⁾. Cuando los sistemas de degradación fallan y la AS continúa acumulándose en la célula, el RE inicia la “respuesta frente a proteínas mal plegadas” (UPR) ⁽¹⁸⁾. Esta respuesta regula la expresión de las chaperonas moleculares, que ayudan a neutralizar las proteínas tóxicas ^(12,16). Sin embargo, la activación prolongada de la UPR genera estrés en el RE, favoreciendo la formación de ROS y activando vías de respuesta apoptótica, que terminan degradando y matando a la célula ^(16,18).

6.5.2. Disfunción mitocondrial.

La acumulación de AS, además de afectar a los sistemas de degradación proteica, también altera la función mitocondrial. La AS es capaz de introducirse dentro de las mitocondrias y alterar el proceso de fosforilación oxidativa, que es el principal mecanismo que suministra energía a las neuronas ⁽⁶⁾. Esto provoca un fallo energético que conduce a la muerte celular ⁽¹⁶⁾. Al mismo tiempo, la AS inhibe el complejo I mitocondrial, disminuyendo su actividad y promoviendo la formación de ROS que, a su vez, inhiben el complejo I y generan daño oxidativo ^(4,16). Este círculo vicioso se observa también tras la exposición a ciertos tóxicos

ambientales, como el MPTP y la rotenona, que producen los mismos efectos al inhibir el complejo I mitocondrial ⁽⁴⁾. Del mismo modo, existen varios genes que codifican a proteínas cuyas funciones están estrechamente relacionadas con el correcto funcionamiento mitocondrial. Estos genes son parkina, DJ-1 y PINK1, cuyas mutaciones alteran la actividad del complejo I ⁽²¹⁾.

6.5.3. Alteraciones del citoesqueleto.

Las altas concentraciones de AS pueden reducir la estabilidad y el tráfico mediado por los microtúbulos ^(16,21). Los microtúbulos son cruciales para el tráfico mitocondrial, la generación de energía, el mantenimiento de la homeostasis del calcio y la degradación mitocondrial. Los oligómeros afectan a la integridad del citoesqueleto estabilizando los filamentos de actina, reduciendo la polimerización de tubulina y alterando la motilidad de las kinesinas ^(18,21).

6.5.4. Excitotoxicidad.

La alteración de la transmisión glutamatérgica y de la homeostasis del Ca²⁺ son consecuencias de la degeneración neuronal dopaminérgica. La dopamina actúa como inhibidor del núcleo subtalámico, manteniéndolo en un estado de excitación basal. En la EP, debido al déficit de neuronas dopaminérgicas, el núcleo subtalámico se sobreactiva, produciendo glutamato en exceso ⁽³⁾. Este neurotransmisor se une a los receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), abriendo los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje y favoreciendo la entrada de Ca²⁺ en las células ⁽³⁾. Este influjo celular de Ca²⁺ desregula diversos procesos celulares dependientes del Ca²⁺. También, fomenta la oligomerización y agregación de la AS por interacción directa entre el Ca²⁺ y la región C-terminal, lo que interfiere con las interacciones con otras proteínas ⁽¹⁶⁾. Asimismo, el exceso de Ca²⁺ fomenta la producción de ROS y de especies de óxido nítrico (NOS), que reaccionan entre sí dando lugar a productos tóxicos capaces de inducir daño a nivel del proteosoma, el RE y la mitocondria ^(3,16). Además, se ha comprobado que las especies reactivas de nitrógeno, que resultan de esta reacción, alteran la conformación normal de la AS ⁽¹⁶⁾. Los oligómeros de AS contribuyen a la elevación del Ca²⁺ intracelular con su capacidad para formar

poros en las membranas ^(3,11). Mediante la creación de estos canales iónicos, los oligómeros comprometen la integridad de las membranas y las permeabilizan al calcio y a otros cationes, facilitando su paso al interior celular ^(12,18).

6.5.5. Neuroinflamación crónica.

La pérdida neuronal en la EP se asocia comúnmente con la neuroinflamación crónica. La neuroinflamación está controlada principalmente por la microglía y, en menor medida, por los astrocitos y los oligodendrocitos ⁽⁴⁾. Se ha observado una mayor activación microglial en la SNpc y en el bulbo olfatorio de pacientes con EP ⁽⁴⁾. Esta activación microglial está mediada por los receptores tipo Toll (TLR). Los oligómeros *on-pathway* y las proteínas relacionadas con la EP (AS, parkina, dardarina, DJ-1) tienen la capacidad de activar la microglía y su respuesta proinflamatoria, al actuar como agonistas del receptor TLR2 ^(4,18). La neuroinflamación se acompaña de una mayor liberación de ROS, que causa neurotoxicidad y daño oxidativo ⁽⁴⁾. Contrariamente, la AS monomérica es capaz de interactuar de forma directa con los TLR4 y mediar la eliminación microglial de la AS dañada, sugiriendo un posible papel neuroprotector ^(18,21).

6.5.6. Desregulación de la homeostasis del hierro.

En la EP se produce la deposición de hierro en la SNpc ⁽⁴⁾. La homeostasis del hierro está regulada por la angiotensina en las neuronas dopaminérgicas y en la microglía. La angiotensina es un importante inductor de la inflamación y del estrés oxidativo, que activa el complejo de oxidasas NADPH, un conjunto enzimático productor de ROS ⁽⁴⁾. La AS puede interactuar directamente con los iones de hierro, alterar su homeostasis y catalizar la formación de ROS, generando daño oxidativo en las células ^(13,18). Esto mismo ocurre cuando la AS se une a iones de cobre u otros metales ^(12,18).

6.5.7. Sinergia.

Los efectos tóxicos en la EP tienen lugar a través de la combinación de múltiples vías, que se entrecruzan y retroalimentan entre sí ^(4,19). Todos los procesos influyen y son influenciados por los demás procesos, desencadenando una cascada tóxica dentro de la célula.

El destino final de todos estos mecanismos parece ser el estrés oxidativo, el cual conduce a la disfunción celular y, con el tiempo, a la muerte neuronal ^(4,6). Este estado oxidativo favorece la agregación de AS, potencia la excitotoxicidad por Ca²⁺, altera las vías de degradación proteica y desencadena una tormenta de citoquinas, produciendo neuroinflamación ^(4,21).

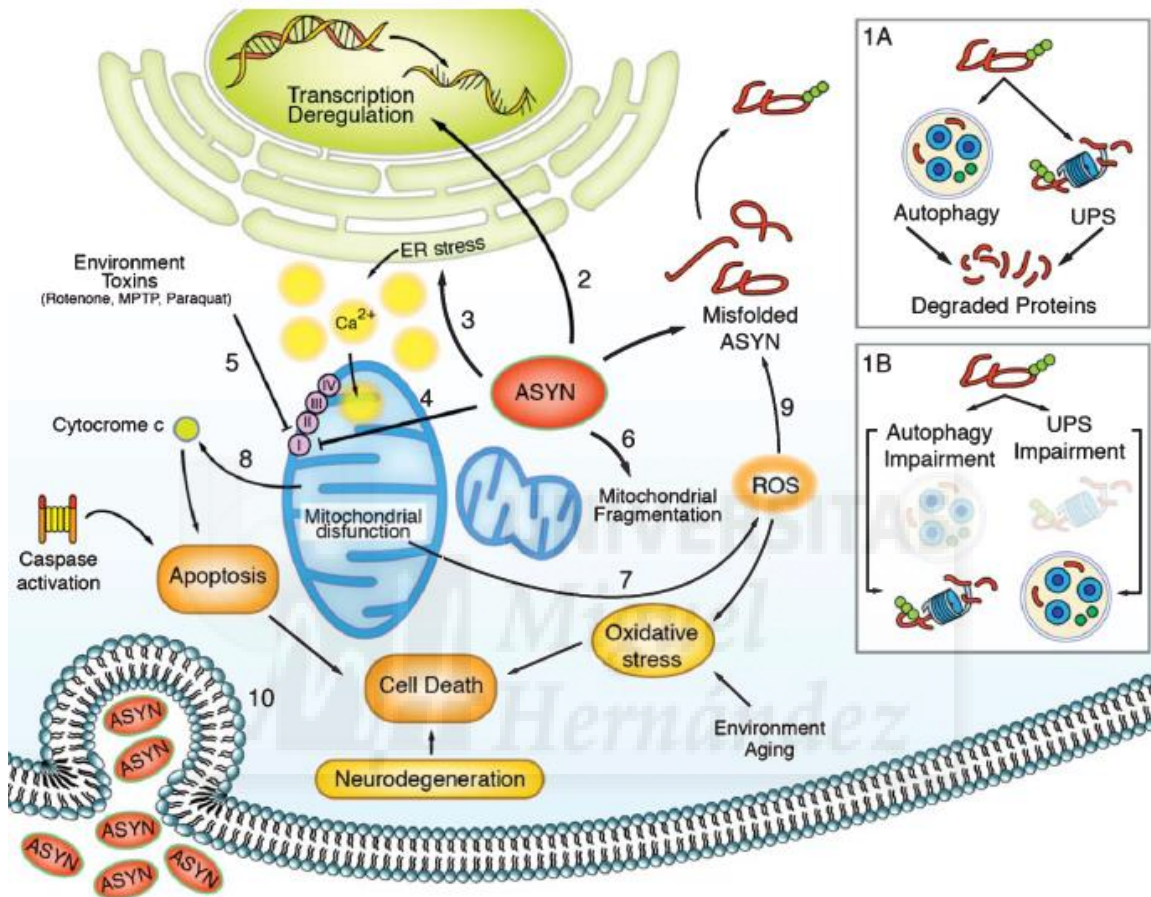


Figura 5. Resumen de los mecanismos tóxicos de la AS. En este mapa tóxico se puede observar la conexión entre los mecanismos subyacentes de la EP y cómo se entrelazan e interactúan entre sí, dando lugar a una sinergia que favorece la propagación tanto de la enfermedad como de los efectos tóxicos. Figura adaptada del artículo “*Limelight on Alpha-Synuclein: Pathological and Mechanistic Implications in Neurodegeneration*” ⁽¹⁶⁾.

6.6. Mecanismos de propagación y transmisión celular.

Las proteínas neurodegenerativas comparten diversas características con las proteínas priónicas, como el mal plegamiento y los procesos de nucleación y propagación ^(20,23). Al igual que los priones, la AS puede ser secretada de las

células, entrar en otras e inducir la formación de pequeños agregados intracelulares ⁽²⁰⁾.

Existen varios mecanismos que permiten la salida de la AS al espacio extracelular, como la exocitosis y el transporte asociado a exosomas o a vesículas sinápticas ^(20,24). También, puede alcanzar el espacio extracelular cuando una célula muerta libera su contenido al medio externo ^(20,24). Diversos factores, como el estrés oxidativo y la inhibición lisosomal, favorecen la liberación de la AS ^(20,24).

En cuanto a la entrada de la AS en las células receptoras, se han propuesto varios mecanismos, como la difusión pasiva a través de la membrana plasmática, la endocitosis y la internalización de exosomas o vesículas sinápticas dentro de las neuronas receptoras ⁽²⁰⁾.

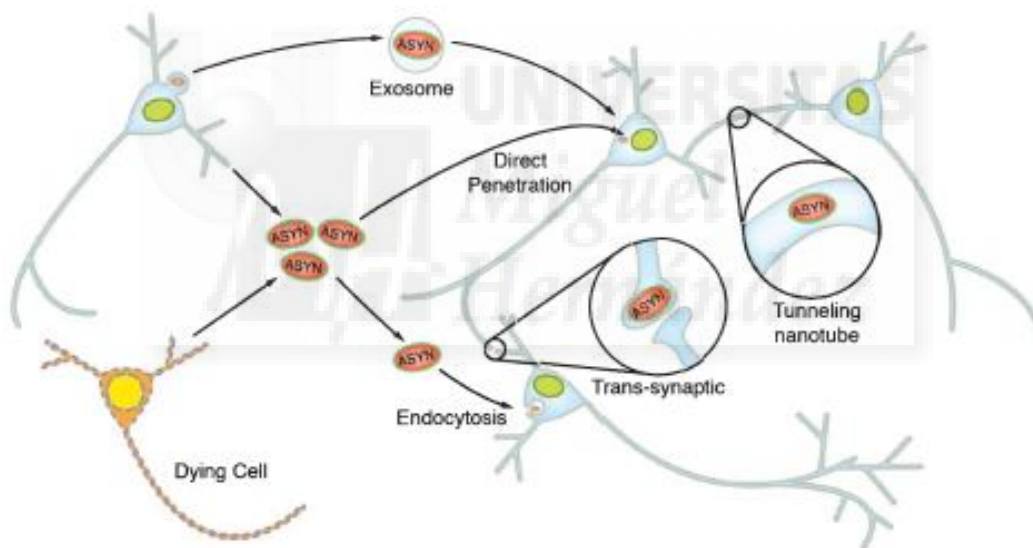


Figura 6. Mecanismos de propagación de la AS. La AS puede salir de las células vía exocitosis o vía exosomas y entrar en otras neuronas por difusión pasiva, si la membrana está comprometida, o por endocitosis. Existen otros mecanismos que involucran a neuronas vecinas, como son la formación de nanotubos y la transmisión transináptica. Figura adaptada del artículo “*Limelight on Alpha-Synuclein: Pathological and Mechanistic Implications in Neurodegeneration*” ⁽¹⁶⁾.

De entre todos estos mecanismos, los que contribuyen en mayor medida a la propagación de la AS son el transporte mediado por exosomas y por nanotubos.

6.6.1. Transmisión celular mediada por exosomas.

La transmisión de proteínas mediada por exosomas ha ido adquiriendo un interés creciente con los años tras demostrarse su participación en la diseminación de las enfermedades neurodegenerativas ⁽²⁴⁾. Los exosomas son pequeñas vesículas extracelulares de 30-100 nm de diámetro, que se originan en el compartimento endosomal, a partir de cuerpos multivesiculares ^(10,24). En un principio, se les atribuyó exclusivamente una función de eliminación de desechos ⁽²⁴⁾. Hoy, se consideran mediadores fundamentales de la comunicación intercelular, mediando la transferencia de múltiples moléculas (de señalización, tóxicas y regulatorias) entre las células ^(10,22). Los exosomas son liberados por todo tipo de células ^(10,20) mediante la fusión de los cuerpos multivesiculares con las membranas ^(9,23), en un proceso regulado por el calcio y la actividad glutamatérgica ^(21,22,24).

El interés de los investigadores por los exosomas está relacionado con su composición, que refleja el estado fisiológico y patológico de la célula donante, abriendo una ventana al cerebro ⁽¹⁰⁾. Los exosomas pueden transportar lípidos, proteínas, ADN, ARNm, microARN y ADN mitocondrial ⁽¹⁰⁾. Paralelamente, se ha demostrado la secreción activa de proteínas priónicas y agregados proteicos patológicos (AS, proteína tau, beta amiloide) asociados a exosomas ^(9,10,24). La encapsulación de estas especies proteicas no sólo facilita el transporte a largas distancias, sino que también constituye una protección frente a la degradación en el espacio extracelular ^(20,22,24).

Los exosomas se han detectado en multitud de fluidos biológicos como suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina y saliva ⁽¹⁰⁾. Se sabe que los niveles plasmáticos de AS exosomal son mayores en los pacientes con EP, por lo que los exosomas podrían representar una posible fuente de biomarcadores para el diagnóstico de la EP ⁽¹⁰⁾. Es posible conocer el origen de los exosomas examinando la composición lipídica de sus membranas y los marcadores específicos que presentan, como por ejemplo el marcador L1CAM (molécula de adhesión celular L1) que distingue a los exosomas provenientes del SNC ^(10,24). Estos mismos marcadores y lípidos de membrana definen la célula receptora que recibirá a los exosomas ⁽²²⁾.

La diseminación de las enfermedades neurodegenerativas no es el verdadero objetivo de los exosomas. Una de las teorías defiende que la transmisión mediante exosomas podría ser una vía de eliminación alternativa a la UPS y a la ALP, que se activa cuando éstos han sufrido daños y son incapaces de eliminar las proteínas defectuosas ⁽²⁴⁾. La función de los exosomas, pues, consistiría en transportar los monómeros dañados, los oligómeros y las fibrillas de AS a células sanas y funcionales para su correcta eliminación ⁽²¹⁾. Desgraciadamente, este mecanismo protector contribuye a la expansión de la enfermedad.

6.6.2. Transmisión celular mediada por nanotubos.

Los nanotubos constituyen una vía rápida y directa para la transferencia de agregados proteicos entre neuronas cercanas no interconectadas ^(9,23). Los nanotubos (TNTs) son tubos membranosos de 50-800 nm de diámetro compuestos por filamentos de actina, que pueden extenderse hasta 100 μm ^(9,23). La formación de TNTs está estimulada por la acumulación de agregados proteicos intracelulares, así como por el estrés oxidativo y lisosomal ^(9,23). El incremento en la formación de TNTs bajo estas circunstancias patológicas sugieren una posible función protectora ⁽²³⁾. Se ha propuesto a los TNTs como mecanismos de rescate adoptados por las células para deshacerse de los materiales tóxicos como agregados proteicos y organelas dañadas ⁽⁹⁾. Igualmente, se ha visto que los TNTs son capaces de rescatar funciones celulares transfiriendo organelas sanas, como lisosomas y mitocondrias, a las células dañadas ⁽⁹⁾. A pesar de su función protectora, los TNTs contribuyen a la propagación de la enfermedad al favorecer el tránsito de proteínas *prion-like* entre células ^(20,23).

6.7. Implicaciones diagnósticas de la a-sinucleína.

El diagnóstico definitivo de la EP sólo puede realizarse de forma post mortem. En vida, la EP puede determinarse por medio de la exploración sintomática, aunque este método no es el ideal. Otros trastornos, como el temblor esencial, cursan con los mismos síntomas y características de la EP, por lo que el diagnóstico diferencial es complicado y está sujeto a errores. Este problema podría solucionarse si se dispusiera de un marcador biológico adecuado.

Actualmente, no se cuenta con un marcador específico y fiable que permita un diagnóstico seguro de la EP. De este marcador se busca que esté presente en las etapas más tempranas de la enfermedad, que permita la diferenciación entre la EP y otros trastornos similares, y que su detección sea coste-efectiva y reproducible ⁽²⁵⁾. Con estas metas en mente, se consideró la AS como un posible candidato ⁽⁵⁾. Se ha analizado los niveles de AS en diversos fluidos biológicos como sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) y saliva, entre otros ^(3,5). De estos estudios, los más reveladores fueron los de LCR de los que se han podido sacar varias conclusiones:

- a. En el LCR de pacientes con EP se detectó una disminución de los niveles totales de AS en comparación con individuos sanos. La disminución de la AS en el LCR se correlaciona con un aumento en la severidad motora, por lo que se ha propuesto como un posible marcador de la progresión de la EP ⁽²⁵⁾. Esta medida por sí sola no es un buen indicador diagnóstico, puesto que no permite diferenciar la EP de otras sinucleinopatías ^(5,25).
- b. Se ha observado una elevación de los niveles de AS oligomérica en el LCR de pacientes con EP ^(5,25). La cantidad de AS detectada es mayor en los estadios más avanzados de la enfermedad, indicando una posible aplicación como indicador de la progresión de la enfermedad ⁽²⁵⁾.
- c. Los niveles de AS fosforilada en la Ser129 son significativamente más altos en personas con EP ^(5,25). Este incremento es constante en el tiempo, por lo que se está estudiando como un posible marcador de la progresión de la EP ⁽¹⁶⁾.

Estos resultados han sido respaldados por numerosos estudios, coincidiendo en que la cuantificación de distintas proteoformas de AS puede presentar un mayor poder diagnóstico que la medida exclusiva de la AS total ^(5,25). El cálculo de los ratios AS oligomérica/AS total y AS fosforilada en la Ser129/AS total aumentan el poder discriminatorio entre los pacientes con EP y los controles, presentando una mayor sensibilidad y especificidad diagnósticas ^(5,25).

Por otro lado, los resultados obtenidos en muestras plasmáticas no fueron concluyentes. Algunos estudios detectan un incremento de la AS oligomérica y tratan de convencer de su potencial como biomarcador, mientras que otros no

reportan diferencias significativas ⁽²⁵⁾. A pesar de ello, las investigaciones continúan, por lo que todavía es pronto para sacar conclusiones definitivas.

Además de los análisis en LCR y sangre, se ha estudiado también la detección de AS en muestras de saliva y en biopsias de colon, aunque los resultados fueron menos concluyentes ⁽²⁵⁾. Con todo, la detección de AS en el LCR parece ser el candidato más prometedor para el futuro diagnóstico de la EP ^(3,5,25).

6.8. Implicaciones terapéuticas de la a-sinucleína.

El tratamiento farmacológico empleado en la EP es meramente paliativo, incapaz de revertir las condiciones patológicas de la enfermedad. Cada vez se hace más necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos curativos, sobretudo dirigidos específicamente hacia las especies intermedias de la AS, que son las principales responsables de la citotoxicidad ⁽¹⁶⁾. Las nuevas terapias neuroprotectoras deben dirigir sus esfuerzos a múltiples vías patológicas con el fin de combatir el estrés oxidativo, la neuroinflamación y otros mecanismos tóxicos ⁽⁴⁾. La búsqueda de un tratamiento eficaz se centra en el desarrollo de fármacos y nanofármacos, así como también en la inmunoterapia y en la terapia génica. Las principales estrategias terapéuticas que se han propuesto hasta el momento son:

- a. Disminuir la producción de AS y corregir mutaciones ⁽⁸⁾. Con la ayuda del sistema de edición CRISPR-Cas9, se podría modular la producción de AS y corregir determinadas mutaciones en genes asociados a la EP, como PINK1, Parkin, DJ-1 o SNCA ^(3,21). También, sería interesante la modulación de las PTMs que incrementan la propensión de la AS a la agregación ⁽¹⁶⁾.
- b. Incrementar la eliminación intracelular de AS ⁽⁸⁾. Es posible fomentar la eliminación autofágica y promover la activación del proteosoma, modulando la expresión de chaperonas y proteínas lisosomales ^(5,16). Se ha visto que las sobreexpresiones de Beclina-1, un regulador autofágico, y de Parkina, una ubiquitina ligasa, mejoran la neurotoxicidad al promover la degradación autofágica y proteosomal de la AS, respectivamente ⁽²¹⁾.
- c. Incrementar la eliminación extracelular de AS. Sabiendo que la AS está presente en el espacio extracelular, se podría diseñar anticuerpos que

marcaran las proteínas dañadas para la degradación por parte de la microglía ⁽²²⁾.

- d. Impedir la entrada de AS en otras células. Se podría prevenir la propagación de la enfermedad mediante el uso de anticuerpos específicos contra las proteínas patológicas ^(5,20). Otra posibilidad es el empleo de inhibidores de la endocitosis, como Dynasore, que bloquea parcialmente la entrada de la AS en las células ⁽²⁰⁾.
- e. Estabilizar especies no tóxicas. Se están buscando pequeñas moléculas que bloqueen la agregación de AS o que estabilicen formas más estables y menos propensas a la agregación, como los tetrámeros y los oligómeros *off-pathway*, para así prevenir el mal plegamiento y la agregación ^(12,16).
- f. Acelerar el proceso de fibrilación. Acelerando la agregación de la AS, se evitaría la toxicidad generada por los pequeños oligómeros, que se convertirían rápidamente en fibrillas no tóxicas ⁽¹²⁾.

Las terapias más interesantes estudiadas hasta el momento implican el uso de anticuerpos, el tratamiento con moléculas activas antioxidantes y la modulación de la AS por parte de las propias sinucleínas.

6.8.1. Inmunoterapia.

La AS, a diferencia de los agregados en la enfermedad de Alzheimer, forma inclusiones intracelulares, dificultando las estrategias basadas en anticuerpos ⁽¹⁶⁾. Aunque los anticuerpos no puedan entrar en las células, éstos pueden atacar y neutralizar las proteínas de AS del espacio extracelular en su trayecto y propagación a otras células. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales capaces de reconocer específicamente diferentes proteoformas de la AS, a las que se unen con gran afinidad sin producir ninguna reacción cruzada con las especies monoméricas ni con otras proteínas amiloides similares ⁽⁵⁾. Las ventajas de los anticuerpos son su alta especificidad y afinidad, su larga vida media y su baja toxicidad ⁽⁵⁾.

La principal limitación de los anticuerpos es su gran peso molecular, que impide su paso a través de la barrera hematoencefálica. Para salvar este problema, se han diseñado fragmentos recombinantes de anticuerpos de menor peso

molecular, cuya afinidad y especificidad no se ven alteradas ⁽⁵⁾. Estos fragmentos presentan una mayor penetrancia en el cerebro y son relativamente fáciles de producir en grandes cantidades empleando sistemas bacterianos y levaduras ⁽⁵⁾. También, se han diseñado fragmentos de anticuerpos que estabilizan la forma monomérica de la AS ⁽⁵⁾.

Existen numerosas investigaciones en curso con anticuerpos, como la de la compañía AFFiRiS. Esta empresa ha desarrollado el AFFiTOPE-PD01, una vacuna peptídica que reduce los niveles cerebrales de AS y mejora el estado neurológico y la pérdida neuronal en ratones ^(5,16). Induce la producción de anticuerpos específicos que se unen a la AS tóxica, promoviendo su eliminación. Se cree que, administrado en las etapas más tempranas de la enfermedad, podría detener o enlentecer la progresión de la EP. Actualmente, se encuentra en estudio de fase 1 y reporta resultados positivos.

6.8.2. Antioxidantes y otras moléculas pequeñas.

Los beneficios terapéuticos de los fitoquímicos naturales en las enfermedades neurodegenerativas se han relacionado con sus propiedades antioxidantes. Los polifenoles (curcumina, ácido rosmarínico...), los flavonoides (baicaleína, epigallocatequina...) y los catecoles (ácido gálico, ácido cafeico...) reducen la toxicidad de la AS e inhiben su agregación ^(12,21). También, son capaces de deshacer las fibrillas ya formadas y estabilizar las especies oligoméricas *off-pathway* ^(12,21). Estos compuestos antioxidantes y otros, como la coenzima Q10, son capaces de combatir el exceso de ROS y el estrés oxidativo, y restaurar la función mitocondrial ⁽²¹⁾. Algunos de ellos como, por ejemplo, la curcumina, también actúan dificultando la entrada de AS en otras células ⁽²¹⁾.

Es interesante destacar que la nicotina y la hidroquinona, dos compuestos que se encuentran en los cigarrillos, producen estos mismos efectos sobre la AS ⁽¹²⁾. Este dato explicaría la menor incidencia de EP en fumadores que reflejan los datos epidemiológicos.

En general, todas estas moléculas pequeñas son capaces de inhibir o alterar de algún modo las vías de agregación de las proteínas. Consiguen alterar la estabilidad de monómeros y agregados al formar enlaces covalentes y no

covalentes con las proteínas ⁽¹²⁾. Las moléculas y antioxidantes mencionados en este apartado tienen la capacidad de generar agregados oligoméricos no tóxicos.

6.8.3. La beta-sinucleína y la gamma-sinucleína.

Para el mantenimiento de una correcta homeostasis sináptica es necesario que las tres sinucleínas actúen de forma coordinada. La AS no es la única sinucleína implicada en la patogenia de la EP. Las alteraciones en los niveles de b-sinucleína (BS) y de g-sinucleína (GS) también contribuyen a la enfermedad. Ambas sinucleínas, especialmente la BS, modulan la agregación de la AS, reduciendo la producción de agregados *on-pathway* y limitando su propagación y fibrilación ^(12,15,21). El rol protector de la BS parece estar relacionado con la ausencia de 11 aminoácidos (residuos 73-83) en su región NAC, característica que la hace menos propensa a formar fibrillas ⁽¹⁶⁾. No obstante, y al igual que la AS, existen ciertos estresores celulares que pueden inducir su fibrilación y favorecer la formación de agregados y la pérdida de neuronas dopaminérgicas ⁽¹⁶⁾.

El uso de la BS y de la GS se ha analizado en estudios preclínicos con el objetivo de reducir los niveles de AS agregada ⁽¹⁵⁾. Los resultados obtenidos fueron positivos, sugiriendo que la BS y la GS podrían actuar como chaperonas regulando la fibrilación de la AS ⁽¹²⁾.

6.8.4. Otros frentes.

Las posibilidades terapéuticas en la EP son ilimitadas. Debido a la variedad de mecanismos tóxicos implicados en la EP, existen numerosos acercamientos clínicos y terapéuticos que están siendo investigados. Uno de los grandes desafíos que acompañan al desarrollo de fármacos en la EP es su transporte al cerebro, su lugar de acción. La barrera hematoencefálica impide el paso de fármacos y anticuerpos al cerebro, dificultando su acción terapéutica.

Las nuevas tecnologías han supuesto un gran avance permitiendo solventar este problema gracias al desarrollo de micropartículas, nanopartículas, hidrogeles, micelas y liposomas ^(2,16,24). Estas estructuras no sólo protegen las moléculas

farmacológicas de la degradación, sino que también mejoran ciertas características fisicoquímicas, como su solubilidad y disponibilidad ⁽²⁾.

7 | Discusión

La EP se ha convertido en un problema de magnitud mundial. El aumento en la esperanza de vida y el envejecimiento de la población han contribuido enormemente a la mayor prevalencia de esta enfermedad. Según datos de la Sociedad Española de Neurología, la prevalencia actual podría triplicarse de aquí a 30 años debido al aumento de la esperanza de vida y a los avances diagnósticos y terapéuticos.

Tras más de 200 años, nuestra comprensión de la enfermedad ha aumentado considerablemente. Los investigadores ya no se enfocan tanto en el desarrollo de tratamientos paliativos, sino que están centrando toda su atención en la AS y sus posibilidades terapéuticas. La relación entre la AS y la EP es ahora innegable. Aunque la estructura de esta proteína ha dejado de ser un misterio, todavía se desconocen varios aspectos acerca de su papel fisiológico y patológico. Algo que no se discute es que la AS presenta una función neuroprotectora en condiciones fisiológicas, y que un aumento o disminución de sus niveles produce toxicidad y desajustes neurológicos ⁽¹⁶⁾.

Los mecanismos por los que la agregación de la AS genera dichas alteraciones todavía no han sido plenamente descritos. La EP es una enfermedad compleja en la que participan numerosos factores y mecanismos tóxicos que actúan de forma sinérgica, retroalimentándose unos a otros y contribuyendo a la propagación de la enfermedad. Esta neurodegeneración está causada por las distintas y abundantes proteoformas de la AS. Estas proteoformas presentan diferentes características entre sí, de manera que no todas las especies de la AS presentan la misma toxicidad y capacidad de propagación. La evidencia actual señala a los oligómeros como los principales causantes de la toxicidad y a las especies fibrilares como las encargadas de la propagación de la enfermedad ^(21,24).

Actualmente, se barajan dos hipótesis que podrían explicar la neurotoxicidad producida por la AS: una ganancia de toxicidad y/o una pérdida de función. Una

hipótesis no excluye a la otra, pudiendo actuar ambas de forma conjunta en el desarrollo de la enfermedad ^(12,21).

Diversos estudios han reportado resultados favorables que sitúan a la AS en el foco del desarrollo de nuevos marcadores diagnósticos y terapias curativas que permitan un mejor manejo de la enfermedad parkinsoniana. Existen numerosas investigaciones en curso que están aportando información nueva y que están contribuyendo a descifrar los interrogantes de esta patología y sus mecanismos subyacentes. Los avances reportados hasta el momento constituyen un aporte inestimable a la ciencia y, aunque estamos más cerca que nunca de hacer frente a esta enfermedad y a sus graves consecuencias, todavía queda mucho por investigar y descubrir.

8 | Conclusiones

El campo de estudio de la AS ha evolucionado enormemente con los años. En las últimas décadas, se ha podido observar un aumento exponencial en el número de estudios y publicaciones relacionadas con la AS, lo que refleja el gran interés de la comunidad científica por resolver las incógnitas que rodean a esta proteína. Es necesario destacar que cualquier aporte científico acerca de la AS contribuye al entendimiento, no sólo de la Enfermedad de Parkinson, sino de muchas otras enfermedades neurodegenerativas. Del mismo modo, los hallazgos en estudios sobre la AS en otras patologías, como la enfermedad de Alzheimer, aportan algo de luz a la comprensión de la Enfermedad de Parkinson. Los resultados hasta el momento son esperanzadores, especialmente en lo referente a la búsqueda de marcadores diagnósticos y terapias curativas. Aun así, serán necesarios años de investigación y dedicación para llegar a comprender por completo la Enfermedad de Parkinson.

9 | Bibliografía

1. Zarranz JJ. Neurología. 6ª ed. Barcelona, España: Elsevier; 2018. ISBN: 978-84-9113-071-0

2. Del Rey NL-G, Quiroga-Varela A, Garbayo E, Carballo-Carbajal I, Fernández-Santiago R, Monje MHG, et al. Advances in Parkinson's Disease: 200 Years Later. *Front Neuroanat.* 2018;12:113. DOI: 10.3389/fnana.2018.00113
3. Maiti P, Manna J, Dunbar GL. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Transl Neurodegener.* 2017;6:28. DOI: 10.1186/s40035-017-0099-z
4. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 2015;9:91. DOI: 10.3389/fnana.2015.00091
5. Vaikath NV, Hmila I, Gupta V, Erskinet D, Ingelsson M, El-Agnaf OMA. Antibodies against alpha-synuclein: tools and therapies. *J Neurochem.* 2019;150(5):612-25. DOI: 10.1111/jnc.14713
6. Belarbi K, Cuvelier E, Destée A, Gressier B, Chartier-Harlin M. NADPH oxidases in Parkinson's disease: a systematic review. *Mol Neurodegener.* 2017;12:84. DOI: 10.1186/s13024-017-0225-5
7. Wassouf Z, Schulze-Hentrich JM. Alpha-synuclein at the nexus of genes and environment: the impact of environmental enrichment and stress on brain health and disease. *J Neurochem.* 2019;150(5):591-604. DOI: 10.1111/jnc.14787
8. Delenclos M, Burgess JD, Lamprokostopoulou A, Outeiro TF, Vekrellis K, McLean PJ. Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *J Neurochem.* 2019;150(5):566-76. DOI: 10.1111/jnc.14806
9. Victoria GS, Zurzolo C. The spread of prion-like proteins by lysosomes and tunneling nanotubes: Implications for neurodegenerative diseases. *J Cell Biol.* 2017;216(9):2633-44. DOI: 10.1083/jcb.201701047
10. D'Anca M, Fenoglio C, Serpente M, Arosio B, Cesari M, Scarpini EA, et al. Exosome Determinants of Physiological Aging and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci.* 2019;11:232. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00232
11. Wang C, Zhao C, Li D, Tian Z, Lai Y, Diao J, et al. Versatile Structures of α -Synuclein. *Front Mol Neurosci.* 2016;9:48. DOI: 10.3389/fnmol.2016.00048
12. Breydo L, Wu JW, Uversky VN. α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(2):261-85. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.10.002

13. González N, Arcos-López T, König A, Quintanar L, Márquez MM, Outeiro TF, et al. Effects of alpha-synuclein post-translational modifications on metal binding. *J Neurochem.* 2019;150(5):507-21. DOI: 10.1111/jnc.14721
14. Sulzer D, Edwards RH. The physiological role of α -synuclein and its relationship to Parkinson's Disease. *J Neurochem.* 2019;150(5):475-86. DOI: 10.1111/jnc.14810
15. Uversky VN. Looking at the recent advances in understanding α -synuclein and its aggregation through the proteoform prism. *F1000Res.* 2017;6:525. DOI: 10.12688/f1000research.10536.1
16. Wales P, Pinho R, Lázaro DF, Outeiro TF. Limelight on Alpha-Synuclein: Pathological and Mechanistic Implications in Neurodegeneration. *J Parkinsons Dis.* 2013;3(4):415-59. DOI: 10.3233/JPD-130216
17. Press-Sandler O, Miller Yifat. Molecular mechanisms of membrane-associated amyloid aggregation: Computational perspective and challenges. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2018;1860(9):1889-905. DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.03.014
18. Roberts HL, Brown DR. Seeking a Mechanism for the Toxicity of Oligomeric α -Synuclein. *Biomolecules.* 2015;5(2):282-305. DOI: 10.3390/biom5020282
19. Alam P, Bousset L, Melki R, Otzen DE. α -synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities. *J Neurochem.* 2019;150(5):522-34. DOI: 10.1111/jnc.14808
20. Steiner JA, Angot E, Brundin P. A deadly spread: cellular mechanisms of α -synuclein transfer. *Cell Death Differ.* 2011;18(9):1425-33. DOI: 10.1038/cdd.2011.53
21. Marvian AT, Koss DJ, Aliakbari F, Morshedi D, Outeiro TF. In vitro models of synucleinopathies: informing on molecular mechanisms and protective strategies. *J Neurochem.* 2019;150(5):535-65. DOI: 10.1111/jnc.14707
22. Stefanis L, Emmanouilidou E, Pantazopoulou M, Kirik D, Vekrellis K, Tofaris GK. How is alpha-synuclein cleared from the cell. *J Neurochem.* 2019;150(5):577-90. DOI: 10.1111/jnc.14704
23. Zhang Z, Nie S, Chen L. Targeting prion-like protein spreading in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2018;13(11):1875-8. DOI: 10.4103/1673-5374.239433

24. Schneider A, Simons M. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell Tissue Res.* 2013;352(1):33-47. DOI: 10.1007/s00441-012-1428-2
25. Fayyad M, Salim S, Majbour N, Erskinet D, Stoops E, Mollenhauer B, et al. Parkinson's disease biomarkers based on α -synuclein. *J Neurochem.* 2019;150(5):626-36. DOI: 10.1111/jnc.14809

