



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

ALFA SINUCLEINA: RELEVANCIA BIOLÓGICA, FORMACIÓN DE FIBRAS Y COMPUESTOS INHIBIDORES.

FRANCISCO JOSÉ PÉREZ GERVILLA

Máster Universitario CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

(Especialidad/Itinerario Química Biológica)

Centro de Estudios de Postgrado

Año Académico 2019-20

ALFA SINUCLEINA: RELEVANCIA BIOLÓGICA, FORMACIÓN DE FIBRAS Y COMPUESTOS INHIBIDORES.

FRANCISCO JOSE PÉREZ GERVILLA

Trabajo de Fin de Máster

Centro de Estudios de Postgrado

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2019-20

Palabras clave del trabajo:

Alfa sinucleina, formación de fibras, inhibidores, Parkinson.

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Bartolomé Vilanova Canet.

Nombre Tutor/Tutora (si procede)

Nombre Tutor/Tutora (si procede)

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) afecta al 1% de las personas mayores de 60 años. Es una enfermedad progresiva del sistema nervioso que se caracteriza por la muerte de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro y por la disminución en la producción de dopamina. Además, estudios *post mortem* de cerebros de pacientes que han padecido la EP revelan la presencia de inclusiones neuronales conocidas como “cuerpos de Lewy” formadas principalmente por agregados insolubles de la proteína α -sinucleína (α -SIN). Aunque la causa de la EP es desconocida, se apunta a que la degeneración neuronal y la formación de cuerpos de Lewys podrían estar relacionadas con el desarrollo de la EP.

La α -SIN es una proteína intraneuronal formada por 140 aminoácidos que se caracteriza por carecer de estructura secundaria en disolución acuosa. Sin embargo, cuando interacciona con micelas o vesículas adopta una estructura alfa helicoidal. Dada su relación con la EP, se han realizado diversos estudios sobre la estructura y tendencia a formar fibras de la α -SIN con la finalidad de determinar, a nivel molecular, los factores que alteran la formación de fibras y sus consecuencias en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.

En este Trabajo de Fin de Máster se ha realizado una revisión bibliográfica extensa de la α -SIN, de sus características estructurales, función biológica, de los factores que alteran el proceso de agregación o de formación de fibras y de los posibles inhibidores de su agregación. En la revisión bibliográfica se ha identificado un conjunto amplio de compuestos que presentan dicha capacidad inhibidora, teniendo especial interés los antibióticos β -lactámicos ya que presentan la capacidad de traspasar la barrera hematoencefálica por lo que sería plausible encontrar cantidades relevantes de este fármaco en la zona de interés. Por este motivo, en este Trabajo de Fin de Máster también se han iniciado estudios preliminares de la capacidad inhibidora de compuestos β -lactámicos como son la ceftriaxona, la ceftazidima y el aztreonam sobre el proceso de formación de fibras de la α -SIN. Los resultados obtenidos indican que la ceftriaxona podría inhibir temporalmente la formación de fibras, aunque los otros compuestos carecen de dicha actividad inhibidora. Los resultados obtenidos no han permitido identificar los grupos funcionales responsables de la inhibición de la formación de fibras por lo que será necesario ampliar el espectro de compuestos para poder esclarecer cuáles son los grupos funcionales necesarios en la estructura química de los compuestos β -lactámicos que les confieran capacidad inhibidora de la formación de fibras.

Índice

1. Objetivos	1
2. Alfa-sinucleína: características	1
2.1. Estructura y función	2
2.2. Proceso de agregación y formación de fibras	7
2.3. Relación con la enfermedad de Parkinson.....	9
3. Factores que alteran el proceso de agregación de la alfa-sinucleína	11
3.1. Condiciones experimentales	11
3.2. Membranas lipídicas.....	14
3.3. Cationes Metálicos.....	15
3.3.1. Cationes Metálicos en la enfermedad de Alzheimer.	15
3.3.2. Cationes metálicos en la enfermedad de Parkinson.....	17
3.3.3. Interacción entre cationes metálicos y la alfa-sinucleína.....	18
3.3.3.1. Interacción cobre -alfa-sinucleína.....	19
3.3.3.2. Interacción hierro-alfa-sinucleína.....	22
3.4. Modificaciones post-traduccionales	23
4. Alfa-sinucleína como diana terapéutica	25
4.1. Fármacos que actúan en la producción de proteína.	26
4.1.1. Inhibidor de la prolioligopeptidasa (PREP).....	26
4.1.2. Irisflorentin	26
4.1.3. N-Butilidenftalida	27
4.1.4. Onjisaponina B	27
4.2. Fármacos que inhiben la formación de fibras.....	28
4.2.1. Escualamina	28
4.2.2. Polifenoles	29
4.2.3. Ceftriaxona.....	29
4.2.4. Rifampicin.	31
4.2.5. Synuclear D.....	32
4.2.6. Ginsenósido Rb1	33
4.2.7. Nortriptilina	33
4.2.8. ELN484228.....	34

4.2.9. NDGA.....	34
4.2.10. Lataxifolina.....	36
4.3. Fármacos que siguen otras vías y terapias en fase de ensayo clínico	37
5. Materiales y métodos.	38
5.1. Materiales.....	38
5.1.1. Reactivos.....	38
5.1.2. Disoluciones.....	38
5.2. Producción de alfa-sinucleína.....	38
5.2.1. Condiciones previas.....	38
5.2.2. Precultivo	39
5.2.3. Cultivo.	39
5.2.4. Separación de la proteína.....	40
5.2.5. Purificación de la proteína.....	40
5.2.6. Diálisis y preconcentración.....	41
5.2.7. Electroforesis.....	41
5.3. Estudio de la formación de fibras por fluorescencia.....	41
5.4. Tratamiento matemático de la cinética de formación de fibras	42
6. Resultados y discusión	43
6.1. Producción de alfa-sinucleína nativa.....	43
6.2. Optimización del método de seguimiento de formación de fibras	46
6.3. Estudio de la capacidad inhibidora de la ceftriaxona y el aztreonam.....	51
6.4. Estudio de la capacidad inhibidora de la ceftazidima.....	53
7. Conclusiones.	56
8. Bibliografía	58

1. Objetivos.

La alfa-sinucleína (aSIN) es una proteína intraneuronal responsable del desarrollo de un conjunto de enfermedades neurodegenerativas, denominadas sinucleopatías, entre las que destaca la enfermedad de Parkinson. Todas estas patologías se caracterizan por presentar agregados intracelulares de aSIN, denominados cuerpos de Lewy, cuya acumulación se incrementa notablemente en pacientes con Parkinson.

Dada la importancia que presenta la agregación de la alfa-sinucleína en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y al importante esfuerzo que se está realizando actualmente en el diseño y síntesis de posibles inhibidores de la formación de fibras, en este trabajo de fin de máster se pretende realizar una revisión de la importancia biológica de la alfa-sinucleína, del proceso de formación de fibras y de las líneas de investigación que se están llevando a cabo para inhibir la formación de fibras.

Para alcanzar el objetivo global propuesto, se plantean los siguientes objetivos parciales:

- a) Realizar una revisión bibliográfica de las características estructurales y funcionales de la alfa-sinucleína, de su implicación en la enfermedad de Parkinson, de los factores que aceleran la formación de fibras y una descripción de los compuestos que tengan como diana a esta proteína y puedan inhibir la formación de agregados/fibras.
- b) Producir alfa-sinucleína y realizar un estudio preliminar de la capacidad inhibidora de algunos compuestos β -lactámicos como son la ceftriaxona, el aztreonam y la ceftazidima.

A continuación, se presenta la revisión bibliográfica correspondiente al objetivo parcial a). La búsqueda bibliográfica se ha realizado en distintas bases de datos científicas como son Pubmed, Dialnet y Scifinder, entre otras.

2.-Alfa-sinucleína: características

La alfa-sinucleína (a-SIN) es una proteína neuronal que fue descubierta por Maroteaux y col. en 1988 [George, 2001]. Pertenece a la familia de sinucleínas que incluye tres proteínas denominadas α , β y γ . La α y β sinucleínas están localizadas en los terminales nerviosos presinápticos y se encuentran ausentes en los tejidos periféricos [Jia, 1999].

Aunque la función fisiológica de la α -SIN no es del todo clara, en los últimos años se ha relacionado con cierta actividad y plasticidad sináptica, con la síntesis de neurotransmisores, con el metabolismo de la dopamina y con el mantenimiento de vesículas sinápticas [Burré, 2015]. Por otra parte, la γ -sinucleína abunda en el sistema nervioso periférico y en la retina, y debido a su excesiva expresión en determinados tumores, sirve como marcador de progresión del cáncer de pecho y de ovario [Jia, 1999].

La acumulación anormal de la α -SIN en el organismo ha sido relacionada con un conjunto de enfermedades denominadas sinucleopatías que incluyen la enfermedad de Parkinson, la de Alzheimer, la demencia de cuerpos de Lewis y la Atrofia sistémica múltiple [Waxman, 2009]. Por este motivo, en la última década, ha aumentado el interés por estudiar las bases moleculares que relacionan los procesos de agregación de la α -SIN con ciertas enfermedades neurodegenerativas.

2.1. Estructura y función

La α -SIN está formada por 140 aminoácidos (Figura 1). Su estructura primaria se divide en tres dominios diferentes: a) un dominio N-terminal (residuos 1-60) que presenta cuatro repeticiones de 11 residuos que contienen la secuencia KTKEG(Q)V [Bussell, 2003], b) un componente no amiloide (NAC) (residuos 61-95) con una abundancia de residuos hidrofóbicos que son esenciales en el proceso de agregación [Plotegher, 2014] y c) una región C terminal (residuos 96-140) que debido a la presencia de residuos Pro, Asp y Glu posee una elevada concentración de cargas negativas. Las dos primeras regiones sirven de enlace a las membranas biológicas; mientras que la tercera es la responsable de facilitar la interacción de la α -SIN con más de 30 proteínas diferentes y mantener la solubilidad de los monómeros [Uversky, 2009].



Figura 1: Referencia propia. Estructura primaria de la α -SIN. En rojo se ha resaltado el dominio N-terminal, en azul la región NAC y en verde la región C-terminal. La α -SIN no presenta residuos cisteína ni triptófano en su estructura primaria.

Se han realizado diversos estudios espectroscópicos para analizar la estructura secundaria de la α -SIN. El análisis del espectro de dicroísmo circular (CD) de la proteína indica un 2% de carácter α -helicoidal y un 70% de conformación al azar en disolución acuosa [Weinreb, 1996]. Mediante la técnica SAXS se obtuvo un radio de giro de 41 Å que indica que la proteína carece de estructura secundaria; sin embargo, presenta una estructura más compacta que la correspondiente a un estado de estructura aleatoria (random coil en inglés) [Ubersky, 2001].

La espectroscopia IR con transformada de Fourier se ha utilizado para verificar esta información comprobándose la presencia de un pico ancho a 1650 cm^{-1} que es una banda característica de las amidas y aparecen en proteínas desnaturalizadas o que presentan una estructura aleatoria. La aplicación de la RMN a la proteína en medio acuoso ha permitido demostrar que la proteína existe como una mezcla de confómeros desordenados. Estos resultados corroboran que la α -SIN es una proteína desordenada, estabilizada por interacciones de largo alcance que inhiben la agregación espontánea. En general, la ausencia de orden se debe a su elevada carga y a su baja hidrofobicidad. Por este motivo, la α -SIN es considerada una proteína intrínsecamente desordenada ya que carece de estructura en disolución acuosa. Actualmente, está aceptado que la α -SIN intracelular es monomérica [Sung, 2007].

Las conformaciones de estructura desordenada indicadas anteriormente se pueden alterar debido a diversos factores como la adición de alcoholes, modificación del pH o de la temperatura. Los trabajos de Munishkina y Natalello han demostrado que la adición de alcoholes primarios en el medio acuoso aumenta el grado de plegamiento β de la proteína; mientras que la adición de alcoholes fluoro sustituidos promueve conformaciones ricas en estructuras helicoidales [Munishkina, 2003] [Natalello, 2011]. Por otra parte, la conformación plegada se ve favorecida a pH ácido o a elevada temperatura [Uversky, 2009].

En la figura 2 se observa cómo afecta el pH del medio a la conformación de la proteína. Tal y como se puede observar del espectro de dicroísmo circular, a pH ácido la proteína presenta un cierto orden. El principal motivo de este cambio se debe a que a pH ácido las cargas negativas presentes en la proteína se anulan aumentando el carácter hidrófilo de la misma -se puede apreciar en el aplanamiento de la curva a 196 nm [Uversky, 2001b]. Todo esto respaldado con el estudio de Buell y *col.* que estudiaron la variación de la carga neta en función del pH que se muestra en la figura 3. Cabe destacar que entre los valores de pH 5-6 la proteína muestra una protonación parcial debido a la parte ácida formada por 16 carboxilatos, 13 de los cuales muestran unos valores altos de pKa [Buell, 2014].

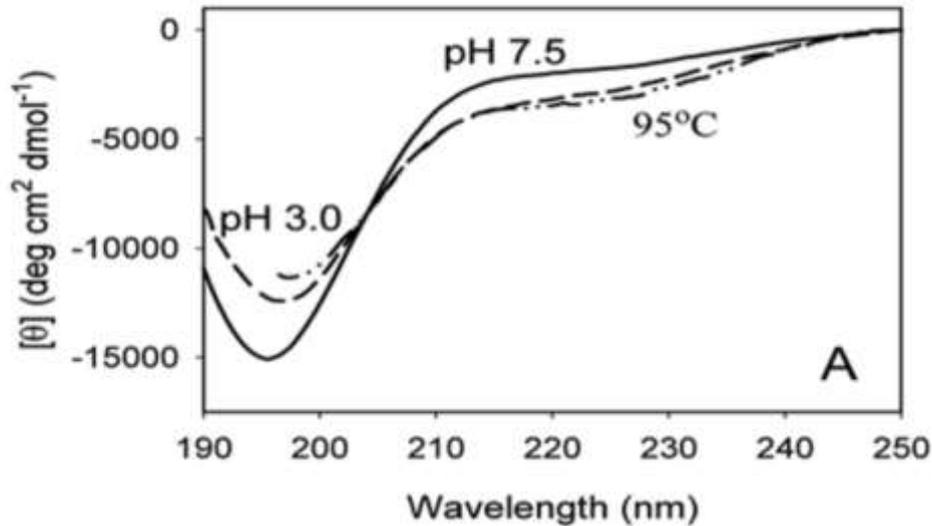


Figura 2: Espectro de dicroísmo circular de la proteína a pH 3,0 y a pH 7,5 a 25°C. El espectro a pH 7,5 también se ha realizado a 95 °C. Nótese el cambio de intensidad en el mínimo que aparece a los 196 nm [Uversky, 2009].

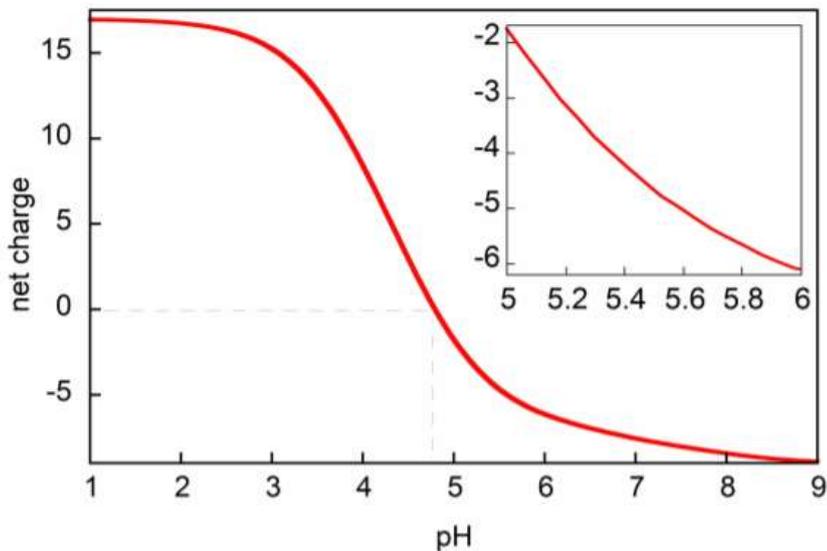


Figura 3: Estimación de la carga neta de la proteína en función del pH basado en los valores de pKa y los coeficientes de Hill a 250 μ M de la α -SIN. [Buell, 2014]

La actividad fisiológica de la α -SIN se ha relacionado con su facilidad a unirse con una gran variedad de membranas lipídicas [Wang, 2011]. En los últimos años, se han estudiado los factores que influyen en la unión de la α -SIN a membranas biológicas, comprobándose que la unión depende de la composición

y naturaleza química de los lípidos que constituyen la membrana y el tamaño de las mismas [Theilet, 2016] [Santher, 2010]. Se ha demostrado que la α -SIN interacciona preferentemente con lípidos aniónicos, con membranas que presentan defectos de empaquetamiento y vesículas unilaminares de pequeño tamaño [Hugo, 2016][Salahuddin, 2014]. Esta interacción se produce a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que promueven un aumento del orden de forma que la proteína adopta una conformación helicoidal. Por otra parte, la interacción con membranas puede modificar las propiedades fisicoquímicas de las mismas, comprobándose que la α -SIN aumenta la estabilidad térmica de las vesículas [Pirc, 2015].

En general, cuando la α -SIN interacciona con membranas, los residuos 2-25 actúan de punto de unión a la membrana; mientras que los residuos 26-97 se encuentra en equilibrio entre una conformación helicoidal o de estructura aleatoria dependiendo de la composición lipídica de la membrana [Fusco, 2014]. En el caso de unirse a una micela de dodecil sulfato de sodio (SDS), la proteína forma dos hélices antiparalelas (residuos 3-37 y 45-92) separadas por una secuencia de unión corta de 5 residuos (38-42) [Bussell, 2003]. Este cambio se aprecia en estudios de relajación de RMN que permitieron determinar los parámetros de orden (S^2) de la proteína en un medio micelar de SDS, comprobándose que los residuos 30-37, 65-70 y 83-89 experimentaban una mayor reducción de dichos parámetros a causa de su interacción con las micelas [Ulmer, 2005; Alderson, 2013]. Por otra parte, si la unión se lleva a cabo con micelas de tipo SUV (Vesículas unilaminares de pequeño tamaño) la conformación que adopta la α -SIN es de hélice extendida [Middleton, 2010]. Dichas conformaciones aparecen representadas en la figura 4A y la figura 4B.

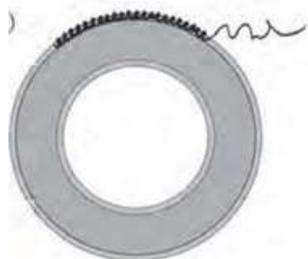


Figura 4A: Representación visual de la estructura propuesta de la α -SIN cuando está unida a SUV [Pirk, 2015].



Figura 4B: Imagen obtenida del Protein Data Base (1XQ8). Estructura de la α-SIN cuando está unida a micelas de SDS. En esta representación aparecen dos hélices alfa conectadas por una estructura desordenada.

Aunque la función fisiológica de la α-SIN no está completamente definida, diversos autores sugieren que está asociada a un número amplio de procesos que se resumen a continuación [Emamzadeh, 2016].

- *Supresión de la apoptosis en células dopaminérgicas*, reduciendo la actividad de la kinasa C, la cual regula la apoptosis celular siendo sensible al estrés oxidativo. La α-SIN reduce la expresión de la proteína Kinasa C a través de la desactivación del factor nuclear kB [Emamzadeh, 2016] [Jin, 2011].
- *Regulación de los niveles de glucosa*. Se ha observado que la proteína facilita el transporte de glucosa hacia el interior de diversos tejidos, disminuyendo el nivel de glucemia en el organismo [Rodríguez-Araujo, 2015].
- *Modulación de la actividad de la calmodulina*. La calmodulina es una proteína que se ha relacionado con los mecanismos de memoria tanto a corto como a largo plazo. Se ha observado que la α-SIN puede interactuar con la calmodulina a través de un mecanismo dependiente de la presencia de Ca^{2+} [Emamzadeh, 2016].
- *Mantenimiento de los niveles de ácidos grasos poliinsaturados*. El cerebro contiene acil-coa sintetasa, una enzima que sintetiza diferentes ácidos grasos poliinsaturados. Se ha sugerido que esta enzima está regulada por la α-SIN que controla la formación del complejo enzima-sustrato [Emamzadeh, 2016].

- *Actividad antioxidante.* El desarrollo de la enfermedad del Parkinson se ve favorecida por la oxidación de los fosfolípidos insaturados, provocando un gran daño a las membranas biológicas. Gracias a la interacción que presenta la a-SIN con las membranas, se produce una disminución significativa de esta oxidación [Emamzadeh, 2016]. Estudios recientes han indicado que la oxidación de la a-SIN *in vitro* favorece la disminución de especies radicalarias [Adrover, 2019].
- *Regulación de la síntesis de dopamina.* La a-SIN disminuye la actividad de la tirosina hidroxilasa, la cual participa en el proceso de formación de dopamina en las células dopaminérgicas. La a-SIN interacciona con la fosfatasa 2A que a su vez interacciona con la tirosina hidroxilasa [Emamzadeh, 2016].
- *Modulación del tráfico de vesículas.* La formación de vesículas sinápticas comienza curvando la membrana. Al mismo tiempo, la a-SIN se une de forma selectiva a esta membrana curvada afectando al tráfico de vesículas en el espacio sináptico. Esta unión reduce la velocidad de formación de vesículas lo que es importante para mantener la homeostasis sináptica [Pranke, 2011].

2.2 Proceso de agregación y formación de fibras

El proceso de formación de fibras es una característica importante de esta proteína ya que se ha detectado su aparición en la enfermedad del Parkinson. La formación de fibras se inicia con la agregación de monómeros de a-SIN generando oligómeros que pueden evolucionar hacia la formación final de fibras (figura 5). Las implicaciones biológicas de la formación de estos oligómeros y de las fibras se discutirá más detalladamente en el siguiente apartado.

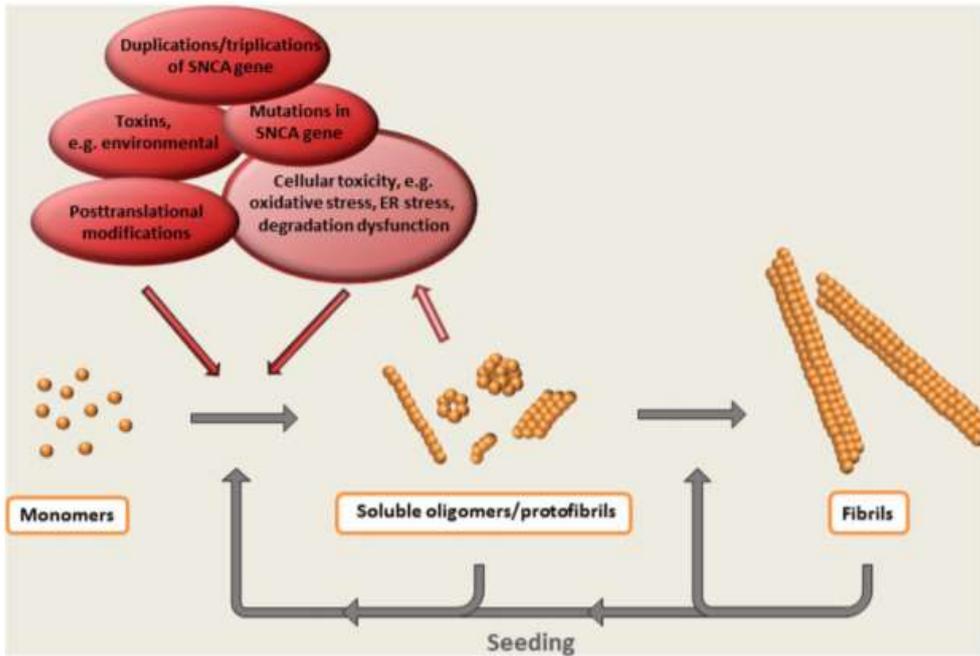


Figura 5: Representación gráfica sobre la agregación de la α -SIN paso a paso desde la formación de oligómeros a la formación de fibras [Martin, 2016].

Tal y como se puede apreciar en la figura 5, hay una serie de factores que pueden favorecer la formación de oligómeros, tales como el estrés oxidativo, modificaciones post-traduccionales, y/o toxinas.

La cinética de formación de fibras ha sido estudiada ampliamente por diversos autores y se muestra en la figura 6 [Mariño, 2020].

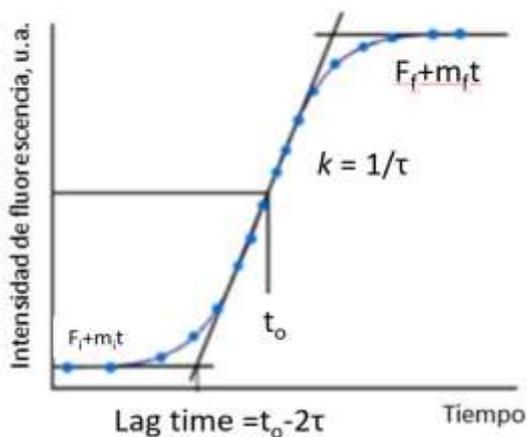


Figura 6: Representación gráfica de la cinética de formación de fibras de la α -SIN mediante fluorescencia. [Mariño, 2020].

En la figura 6 se observa que la formación de fibras sigue un comportamiento sigmoideal con la presencia de tres zonas diferenciadas. La primera fase de formación de fibras es la denominada iniciación, consistente en la formación de un núcleo de fibras que servirá de base para el crecimiento posterior de las mismas. Es un proceso lento debido a la elevada barrera energética que supone la creación nueva de un núcleo que actuaría de semilla para la fibrilación. En la representación gráfica se muestra como una línea recta de pendiente prácticamente nula. En el organismo, esta fase se puede acelerar con la presencia de micelas que aumentan la concentración de α -SIN en la región cercana a la micela [Mariño, 2020].

En la segunda fase se produce el crecimiento de las fibras a partir del núcleo de fibras anteriormente formadas. El proceso de crecimiento puede ser de elongación o de cristalización en la superficie. De los resultados experimentales se ha observado que el mecanismo de crecimiento en la α -SIN es el de elongación. Corresponde con una subida exponencial en la representación gráfica. En la gráfica aparecen unos parámetros que se definen como: t_0 , el cual representa el tiempo que tarda en comenzar esta segunda fase, k , una constante cinética aparente que se calcula realizando la inversa a la constante anterior y $t_0 - 2\tau$ que es conocido como tiempo de latencia (tiempo que tarda en aumentar la señal de forma abrupta). La constante cinética k está relacionado con la fase de crecimiento de las fibras y la finalización de la primera fase [Mariño, 2020].

Finalmente, se define la tercera fase de saturación o de equilibrio de la formación de fibras que se corresponde en la representación gráfica con una recta de pendiente nula [Mariño, 2020].

2.3. Relación con la enfermedad de Parkinson

El Parkinson es una de las enfermedades degenerativas más comunes. Afecta alrededor de 4 millones de personas en el mundo y es originado por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra compacta del cerebro. A continuación, se describen algunas de las evidencias experimentales que relacionan genética y patológicamente la α -SIN con la EP.

- a) Mutaciones. Se ha observado que diversos puntos de mutación de la α -SIN (por ejemplo A30P, E46K y A53T, entre otros) aceleran la enfermedad de Parkinson [Zarranz, 2004][Proukakis, 2013] [Pasanen, 2014].
- b) Los cuerpos de Lewis y neuritos de Lewis, lesiones características de la EP, están compuestos fundamentalmente por fibras de α -SIN [Krishnan, 2003].

- c) En modelos de animales en los que se ha inducido la EP por exposición a diferentes compuestos neurotóxicos se ha observado la acumulación de depósitos de a-SIN [Betarbet, 2000][Breydo, 2012].
- d) Pacientes que padecen la EP muestran una mayor concentración de oligómeros de a-SIN en el líquido cefalorraquídeo en comparación con pacientes control que no padecen la enfermedad [El-Agnaf, 2006].

Las evidencias anteriores refuerzan la idea de que la modificación estructural de la a-SIN y su posterior formación de agregados y/o fibras debe ser un factor clave para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (véase Figura 7).

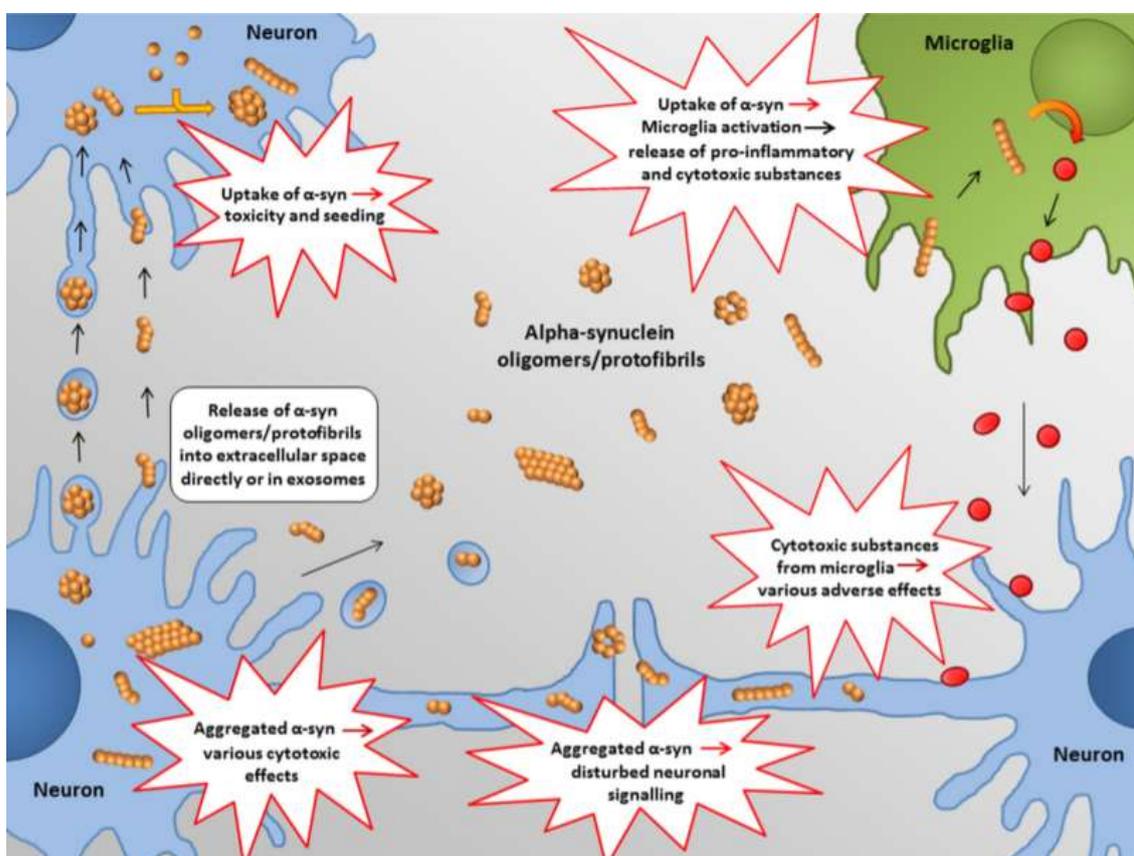


Figura 7: Diferentes dianas neuronales en las que los oligómeros de la a-SIN puede interactuar y ocasionar daños en dichas neuronas [Martin, 2016].

3. Factores que afectan al proceso de agregación de la α -SIN

Como se ha indicado anteriormente, la α -SIN es una proteína intrínsecamente desordenada cuya acumulación anormal está relacionada con el progreso de la enfermedad de Parkinson. La hipótesis más aceptada es que diversos factores externos aceleran la agregación y posterior formación de fibras que constituyen los cuerpos de Lewis característicos de la enfermedad de Parkinson. Dada la relevancia de la formación de agregados, se describe a continuación los factores que pueden acelerar dicho proceso.

3.1. Condiciones experimentales

Se ha descrito que en los estudios realizados *in vitro*, el pH, la temperatura, la concentración de la proteína y la agitación de la muestra afectan al proceso de agregación o de formación de fibras. A continuación, se detallan sus características.

- *pH*. Se ha estudiado la formación de fibras a diferente pH y se ha comprobado que a pH ácido se acelera la formación de las mismas mientras que a un pH superior a 6,0 la cinética es más lenta. Este hecho es debido a que a pH ácido se neutralizan las cargas negativas de la parte ácida de la proteína, favoreciendo la formación de oligómeros, y observándose un aumento de la formación de fibras, cómo indica la señal de fluorescencia en la figura 8 [Buell, 2014].

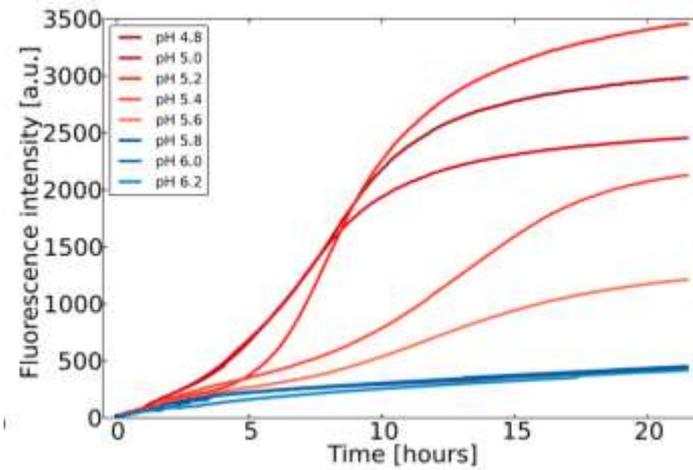


Figura 8: Cambios en la formación de fibras dependiendo del pH en el cual hayan sido incubadas [Buell, 2014].

- *Temperatura.* Se ha comprobado que en el intervalo de 30 a 45 °C, un aumento de la temperatura favorece la formación de fibras. [Buell, 2014]. El análisis de las constantes de formación de fibras con la temperatura se realizó con la ecuación de Arrhenius (Figura 9), obteniéndose una entalpia de activación del orden de los 50 KJ/mol [Buell, 2014].

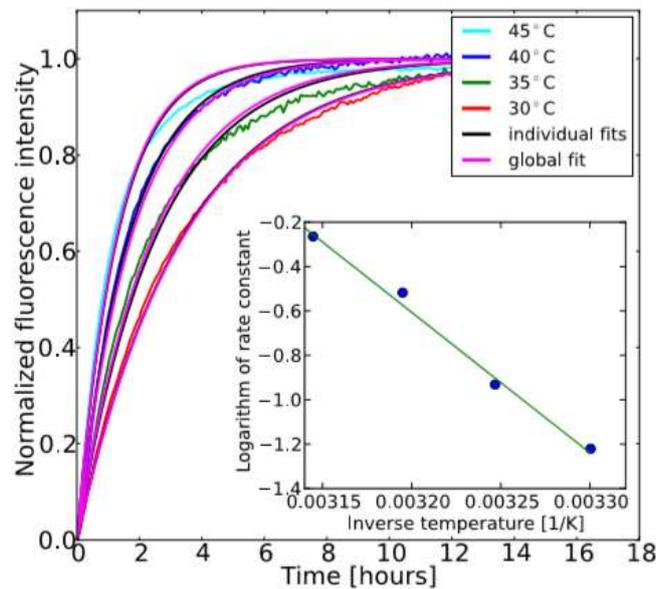


Figura 9: Agregación de la proteína en función de la temperatura. [Buell, 2014]

- **Concentración de proteína.** El efecto de la concentración de proteína sobre la cinética de formación de fibras a 37°C se muestra en la figura 10. Como se ha indicado anteriormente, la formación de fibras sigue un comportamiento sigmoïdal con una fase inicial, posterior crecimiento exponencial y la fase final de formación de fibras que es consistente con un modelo dependiente de la nucleación inicial. Un aumento de la concentración de proteína disminuye la fase inicial de nucleación y aumenta la constante cinética de formación de fibras. Es importante destacar que la concentración fisiológica de la α -SIN en los terminales sinápticos es del orden de 40–45 μ M [Brown, 2018].

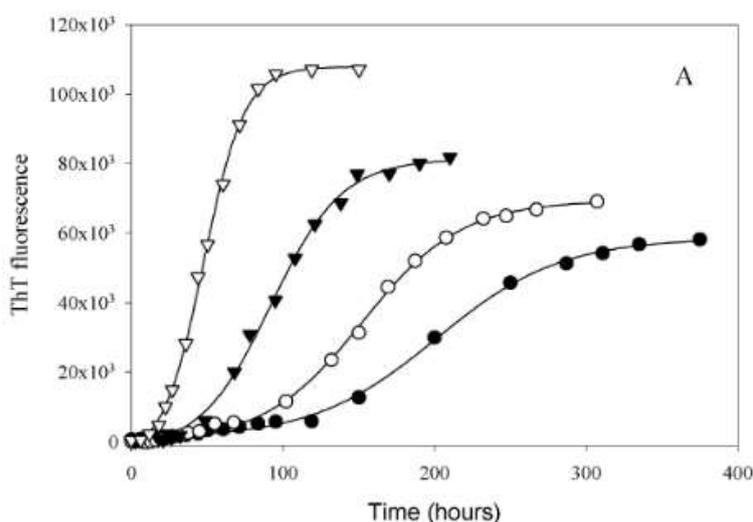


Figura: 10: Efecto de la concentración de proteína sobre la formación de fibras respecto al tiempo a diferentes concentraciones de proteína: ● (21 μ M), ○ (70 μ M), ▼ (105 μ M) y ▽ (190 μ M) [Uversky, 2001b].

- **Agitación.** Estudios *in vitro* indican que la agitación de la muestra favorece la formación de fibras, dejando a otras variables como la fuerza iónica y la concentración de proteína atenuadas en comparación con la agitación [Uversky, 2001a]. No obstante, también puede provocar la fragmentación de las fibras, por lo que hay que optimizar el proceso para no contrarrestar los beneficios de la agitación [Buell, 2014]. Se ha comprobado que cuando se agita la muestra a 300 rpm se acelera la formación de fibras mientras que sobre valores de 600 rpm se forman fibras más pequeñas, retardando la formación de fibras [Lise, 2010] [Morinaga, 2010].

3.2. Membranas lipídicas.

La α -SIN puede interactuar con un conjunto amplio de membranas lipídicas que actúan como mediadores de su función biológica - ya sea para su transporte o inserción dentro de la célula-, pero a su vez pueden modular la formación de fibras amiloideas. En la célula, se establece un equilibrio entre la forma libre de la proteína y la proteína enlazada a las membranas, cuyo desplazamiento puede ocasionar la formación de fibras [Katja, 2011]. Si la proteína presenta una gran afinidad por la membrana lipídica, se genera una zona superficial donde hay una mayor concentración de proteína favoreciendo cambios conformacionales que aceleran su agregación [Galvagnion, 2016]. En los últimos años, se han realizado diferentes estudios para evaluar los factores que condicionan la formación de fibras debido a la presencia de membranas que se detallan a continuación.

Estudios realizados por Galvagnion y *col.* con lípidos modelo de vesículas presinápticas (fosfatidilserina, fosfatidilcolina, etc.) indican que a una elevada concentración de lípido (relación lípido: proteína mayor que 40) esencialmente las moléculas de α -SIN se encuentran enlazadas a las vesículas en una conformación de hélice extendida, y la cinética de formación de agregados es lenta debido a la baja concentración de monómero libre en disolución [Galvagnion, 2015]. Sin embargo, cuando se reduce la concentración de lípido (relación lípido: proteína entre 2-15) la concentración de monómero libre aumenta considerablemente y la nucleación primaria se realiza en la superficie de la vesícula, favoreciendo la formación de fibras en al menos tres órdenes de magnitud respecto a la constante obtenida en ausencia de vesículas. Este resultado se ha observado en vesículas de pequeño tamaño (SUV, 20 nm diámetro) y de gran tamaño (LUV, > 100 nm de diámetro) por lo que es independiente del tamaño de las vesículas estudiadas. Mediante estudios de simulación de dinámica molecular se ha corroborado que la interacción del monómero en la superficie de una membrana lipídica favorece tránsitos conformacionales 5 veces más rápido que en ausencia de membranas lipídicas [Banerjee, 2017]. En un estudio reciente se ha comprobado que la relación sinucleína: vesícula en células sinápticas es del orden de 10; mientras que la relación utilizada en los estudios de Galvagnion fue de 100 [Galvagnion, 2015].

Otras propiedades para tener en cuenta son la composición química de la membrana lipídica y sus propiedades mecánicas. Respecto a la composición, se han estudiado fosfolípidos de cabeza polar como el fosfatidilglicerol, el ácido fosfatídico, fosfatidilserina y el fosfatidilinositol y de cabeza apolar como la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina. Los fosfolípidos aniónicos interactúan mucho mejor con la proteína, debiéndose a la interacción entre cargas de ambas partes -dicho estudio se realizó en membranas de tipo SUV (tipo unicapa y pequeñas de tamaño) que son las preferentes por la proteína [Katja, 2011]. Por

otra parte, las propiedades mecánicas de los fosfolípidos con cadena cortas y por lo tanto más fluidos en la membrana interaccionaban con mayor facilidad con la proteína desplazando el equilibrio de la proteína y por ende aumentando la formación de fibras [Galvagnion, 2016].

3.3. Cationes Metálicos.

En los seres vivos es imprescindible un proceso de homeostasis para mantener sus funciones vitales, por lo que ciertas proteínas interaccionan con los cationes metálicos para regular las funciones del organismo y para almacenarlos. En numerosos estudios se ha demostrado que algunas enfermedades neurodegenerativas pueden estar causadas por una ruptura de la homeostasis de ciertos oligoelementos en el cerebro, o bien en casos donde se ha estado de forma continuada en contacto con estos metales en el exterior y por ende una mayor concentración en el interior [Mcdowall, 2016]. Se han llevado a cabo estudios sobre dos metales de transición importantes para el organismo, como son el hierro y el cobre, en dos enfermedades neurodegenerativas: el Alzheimer y el Parkinson.

3.3.1. Cationes Metálicos en la enfermedad de Alzheimer.

El cobre y el hierro son los metales de transición con mayor importancia en la enfermedad de Alzheimer. En el caso del hierro, se le ha asociado con la generación de radicales libres mediante la reacción de Fenton, liberando radicales hidroxilos. Asimismo, este radical puede volver a reaccionar con el hierro o bien con el cobre produciendo peróxido de hidrógeno [Rivera, 2010]. Se ha comprobado la presencia de hierro gracias a la presencia de ferritina en el cerebro de los pacientes que han sufrido Alzheimer y de hierro en el hipocampo [Rivera, 2010].

En el caso del cobre, se ha detectado una alta concentración de este metal en el cerebro de los pacientes fallecidos con Alzheimer, y se sugiere que interviene en los procesos redox [Rivera, 2010].

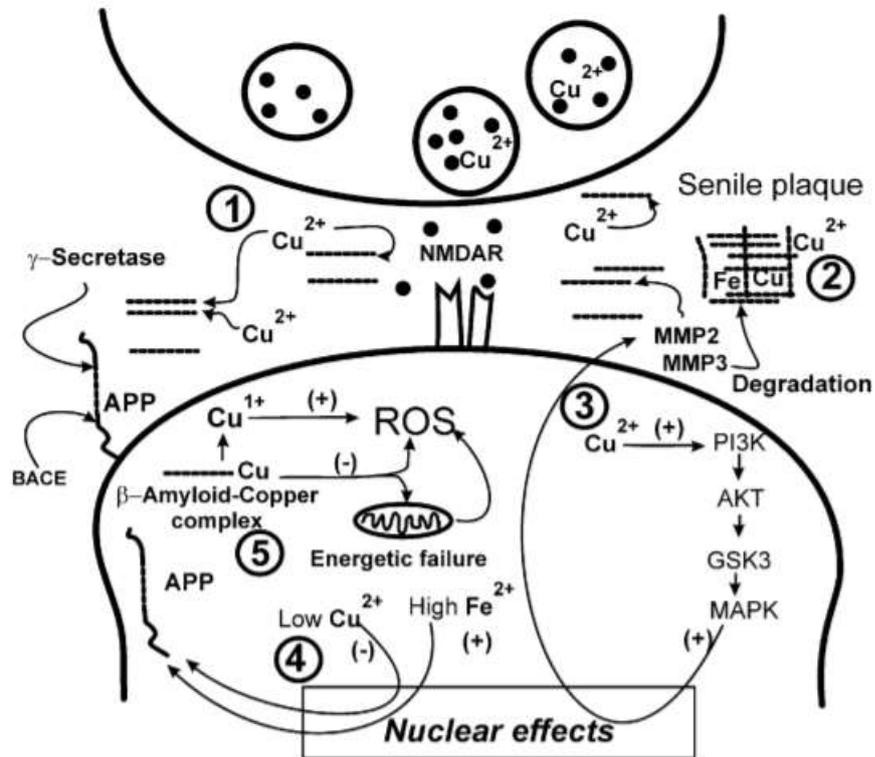


Figura 11: Representación de la función del cobre y del hierro en la enfermedad del Alzheimer. 1) Los iones del cobre en el espacio sináptico son liberados junto al glutamato. 2) Se sospecha que el cobre se encuentra formando placas seniles por mediación de nuevos enlaces covalentes entre polipéptidos. 3) El cobre intracelular se ve envuelto en la expresión de la matriz metaloproteínasa. 4) El alto contenido en hierro provoca un aumento en la expresión de la APP a través del IRE (elemento de respuesta del hierro). 5) El cobre uniéndose a los beta amiloides provocando una liberación de radicales libres [Rivera, 2010].

3.3.2. Cationes metálicos en la enfermedad de Parkinson.

Los metales de transición que más afectan a esta enfermedad son el hierro y el cobre. En el caso del hierro, se han encontrado niveles altos en la sustancia negra compacta, lo que sugiere que una acumulación del mismo puede presentar una elevada toxicidad. Un estudio más a fondo de esta parte del cerebro ha revelado la presencia de una elevada cantidad de Ferritina en el tejido muerto por lo que se sugiere que por una serie de procesos químicos esta zona del cerebro actúa como un reservorio de hierro, lo que provoca la muerte de las neuronas de esa zona. Las posibles causas de esta acumulación pueden ser provocadas por la activación del receptor de la N-metil-D-Aspartato activado por el óxido nítrico (NO). Este compuesto activa el transporte de hierro al espacio sináptico a través de la transferrina. [Rivera, 2010]

En el caso del cobre, se han realizado estudios que sugieren que el cobre puede ser tan tóxico como un agente que protege frente a esta enfermedad, dependiendo de las condiciones experimentales y de su concentración. En el caso de un agente tóxico es provocado por una gran concentración de cobre, debido a su interacción con la α -SIN lo cual provoca que esta proteína forme fibras y se acumule. Además, esta incubación puede provocar la liberación de radicales libres sobre todo con la presencia de agua oxigenada. [Rivera, 2010]

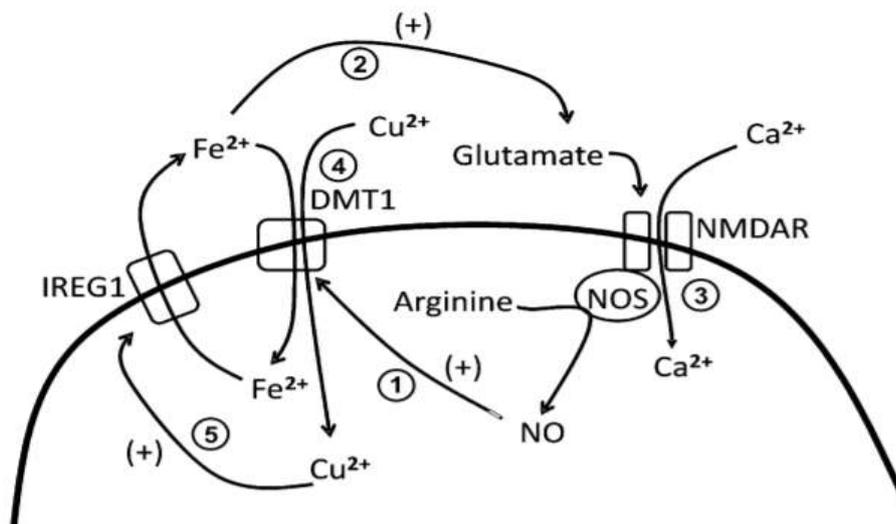


Figura 12: Modulación recíproca del cobre y hierro. 1) En este caso el glutamato incrementa la cantidad de hierro a través de una señal dependiente de la concentración de NO. 2) A su vez el hierro incita el aumento del glutamato. 3) El exceso de glutamato lidera a una toxicidad en la neurona provocada por N-Metil-D-aspartato. 4) Cobre puede proteger de esta toxicidad compitiendo por el transporte del hierro a través de la DMT1. 5) Favoreciendo la liberación del hierro excedente por el canal IREG1 [Rivera, 2010].

3.3.3. Interacción entre cationes metálicos y la alfa-sinucleína.

Existen evidencias experimentales que demuestran que los cationes metálicos interaccionan con la α -SIN modificando su estructura conformacional y favoreciendo la formación de fibras.

Uversky y *col.* estudiaron el efecto de la presencia de cationes metálicos sobre la cinética de formación de fibras [Uversky, 2001a] [Uversky 2001b]. Analizaron un conjunto amplio de cationes metálicos monovalentes, divalentes y trivalentes por mediación de fluorescencia, una técnica muy común para medir la cantidad de fibras que se han formado. Los resultados obtenidos indican que los metales divalentes y trivalentes aumentan la formación de fibras; mientras que los monovalentes no alteran dicho proceso (ver figura 12). Este resultado se explica por el hecho de que un catión pequeño y polivalente es más eficiente para alterar la estructura de la proteína que un catión monovalente, tal y como demuestra la dependencia de la carga con la intensidad intrínseca de la fluorescencia. [Uversky, 2001b]

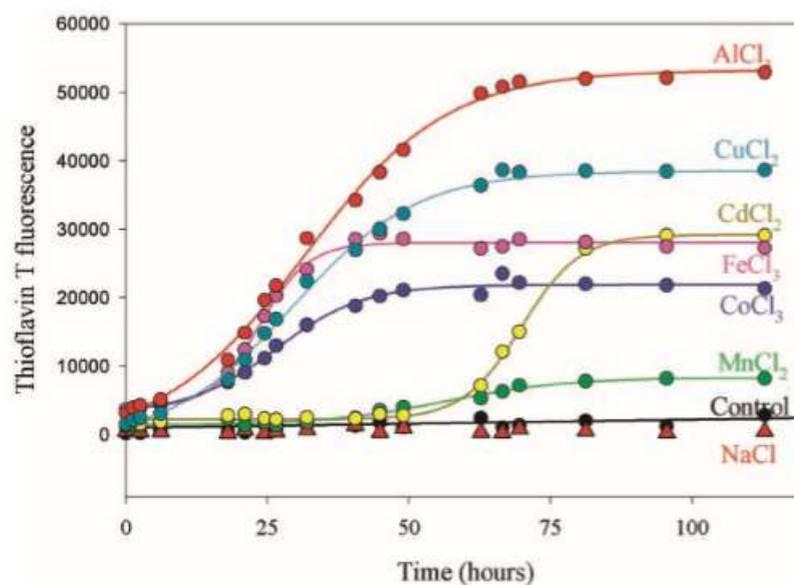


Figura 13: Cinéticas de la formación de fibras de la α -SIN en presencia de iones metálicos. La α -SIN fue incubada con agitación a 37°C a una concentración de 35 μ M en tampón fosfato a un pH de 7,5. La concentración de iones metálicos fue 2 mM [Uversky, 2001b].

El cobre se encuentra principalmente en las enzimas que participan en alguna reacción redox (véase la SOD 1 que emplea el Cu^{2+} reduciéndolo a Cu^+) [Eleonora, 2015]. Mientras que en el caso de las células dopaminérgicas de la sustancia negra contienen hierro formando un complejo con una proteína llamada neuromelanina la cual aporta el pigmento negro a esta parte del cerebro. En caso de que haya un exceso de hierro libre, puede dañar de forma permanente al cerebro [Mcdowall, 2016].

Se ha observado que el cobre y el hierro alteran la conformación de la α -SIN y en consecuencia afectan a la formación de fibras. De hecho, el Cu^{2+} es uno de los más potentes a la hora de inducir la formación de fibras. Sin embargo, los resultados obtenidos *in vitro* no son concluyentes [Mcdowall, 2016].

3.3.3.1 Interacción entre cobre-alfa-sinucleína.

Se han identificado tres sitios de unión del Cu^{2+} en la α -SIN. El primero en la región N-terminal entre los residuos M1-M5 ($K_d=0.1-50\mu\text{M}$), el segundo en el residuo H50 y el tercero localizado en la parte C-terminal entre los residuos P116 y P127 (en la figura 14 se observa el desplazamiento químico de algunas señales correspondientes a los residuos involucrados en la unión). Aunque el primero de ellos presenta la mayor afinidad, el sitio de unión C-terminal está muy cercano a un punto sensible a sufrir una fosforilación, el de la S129. Si esto ocurriera, la afinidad en este punto aumentaría considerablemente. Este hecho es importante debido a que en los cuerpos de Lewys se ha encontrado proteína fosforilada y la presencia de metales [Mcdowall, 2016].

Se han llevado a cabo estudios de espectrometría de masas y de ITC que indican que la α -SIN se une al Cu^{2+} con una estequiometría 1:1. El entorno de coordinación en el sitio de más afinidad puede ser tanto plano cuadrado o tetraédrico. Esto puede variar si la proteína se une a una membrana ya que dejaría libre al Cu^{2+} o bien si sufre una acetilación en la región N-terminal ya que el cobre se coordinaría en el H50 o en el sitio C-terminal, pero si ocurre la mutación H50Q, el segundo sitio está inhibido y por ende solo podría unirse al tercero. Por otra parte, si se produjera la mutación H50A, aumentaría la afinidad [Mcdowall, 2016].

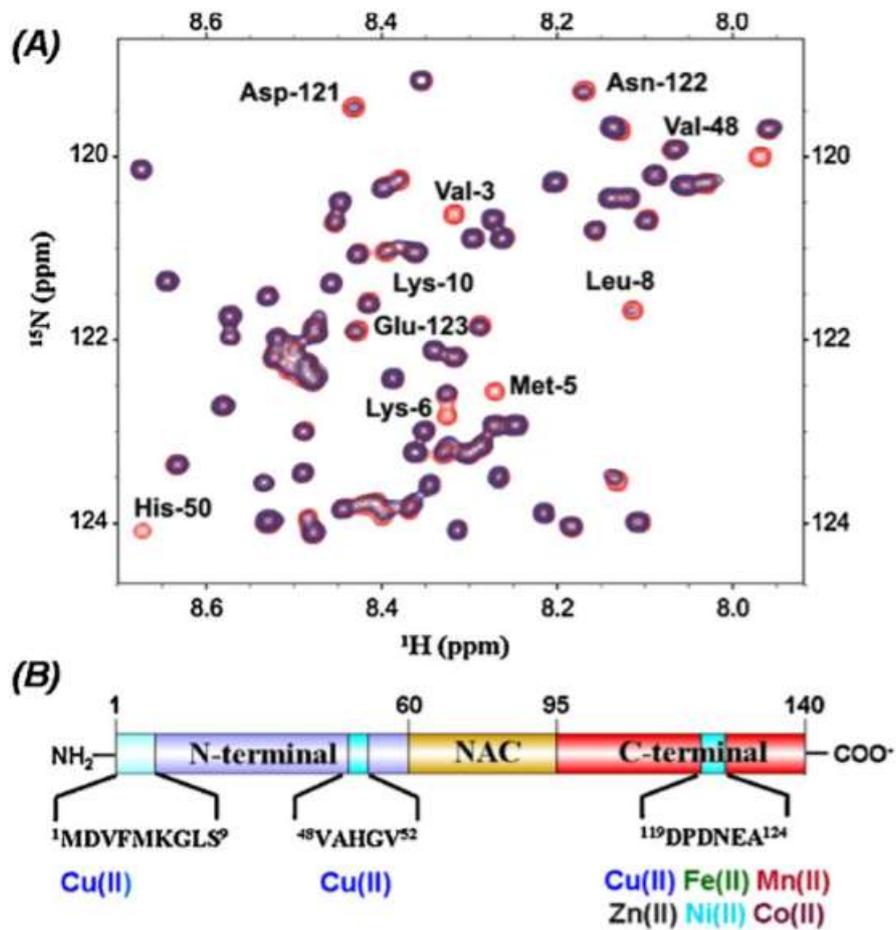


Figura 14: Mapeado de las interacciones del Cu^{2+} con la α -SIN. A) Espectro de RMN de la α -SIN con ausencia de cobre (rojo) con la presencia de Cu^{2+} en azul. B) Regiones de la α -SIN localizadas mediante resonancia donde el Cu^{2+} presenta interacción [Binolfa, 2012].

La estequiometría y geometría de los complejos formados en los sitios de unión se representan en la figura 15:

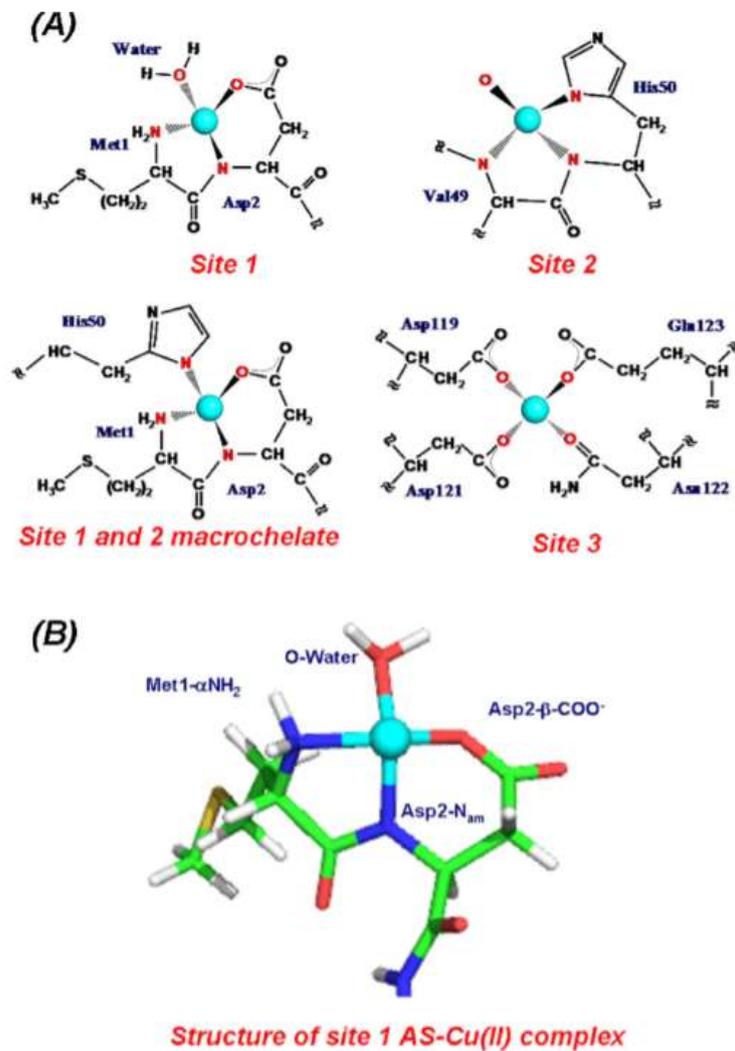


Figura 15:A) Representación esquemática de las esferas de coordinación entre el Cu^{2+} y la α -SIN. Sitio 1: Asociado con el grupo amino de la metionina 1. Sitio 2: asociado con la histidina-50. Sitio 3: asociado con el aspartato 121 en la región C-terminal. Además, se ha llevado a cabo la unión de una macroquelado entre los sitios de unión 1-2. B) Estructura del sitio 1 determinada por QM/MM simulaciones [Binolfa, 2012].

Binolfi y *col.* estudiaron la afinidad de la α -SIN hacia el Cu^{2+} , quedando reflejado en la tabla 1.

ORDEN DE DISOCIACIÓN (M)	SITIOS DE UNIÓN	CONDICIONES EXPERIMENTALES
10^{-5}	Sitio 3	Buffer MES pH 6,5 a 37°C
10^{-7}	Sitio 1	Buffer MES pH 6,5 a 7,5. NaCl 100mM a 15°C
10^{-7}	Sitio 1	Buffer MOPS, pH 7, NaCl 100 mM a 25°C.
10^{-10}	ITC	Buffer PIPES pH 7, 4, NaCl 103 mM, 1:4 Cu(II):Gly ratio, 37°C.
10^{-10}	ITC	Buffer MOPS, pH 7 1:4 Cu(II): Gly ratio, 25°C.
10^{-10}	Macroquelato	Buffer MOPS pH 7,4.

Tabla 1: Constantes de disociación calculadas en función del sitio de unión del cobre, calculadas con diferentes técnicas y condiciones experimentales. Los sitios de unión del cobre aparecen en la figura 15. [Binelfa, 2012].

Los datos de la tabla 1 sugieren que el sitio de unión 1 es más estable que los demás lugares de unión. Dichos autores estudiaron la formación de un macroquelato que también sería favorable desde un punto de vista termodinámico.

En los últimos años se han realizado estudios con el Cu^+ que es la forma predominante del cobre en los ambientes reductores de las células. Se ha comprobado que los sitios de anclaje a la sinucleína son tres: el sitio 1 que implica los residuos M1-M5, el sitio 2 de unión a la H50 y el tercero implica a los residuos M116 y M117. Las constantes de disociación son del orden de micromolar [Miotto, 2014*].

3.3.3.2. Interacción hierro-alfa sinucleína.

Se ha comprobado que la α -SIN muestra afinidad por el Fe^{3+} . Estudios de ITC han demostrado que el hierro posee dos puntos potenciales de unión a la proteína (figura 16), localizados en la región C-terminal. Se ha sugerido que los residuos que participan en la unión con el hierro son los residuos D119, S128 y S129. Esta afinidad puede explicarse debido a la habilidad que presenta el Fe^{3+} de neutralizar las cargas negativas de la región C-Terminal, estabilizando una estructura parcialmente ordenada [Ramis, 2018]

Adicionalmente, se ha comprobado mediante estudios de ITC que el Fe^{3+} presenta mayor afinidad de unión a la proteína que el Cu^{2+} (constante de disociación aparente del Cu^{2+} con la α -SIN es del orden de 200 μM , y la del Fe^{3+} 50 μM), provocando cambios estructurales importantes que favorecen la formación de fibras [Mcdowall, 2016]. Por otra parte, el Fe^{3+} acelera en un orden de magnitud la formación de agregados de sinucleína con respecto al Cu^{2+} .

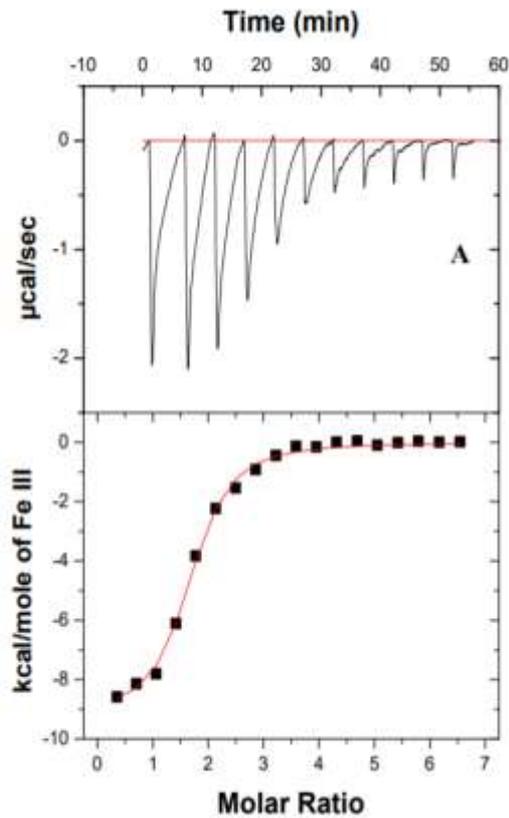


Figura 16: Calorimetría de valoración isoterma de la proteína nativa con Fe^{3+} [RAO, 2007].

3.4. Modificaciones post-traduccionales

Las modificaciones post-traduccionales detectadas en esta proteína han demostrado jugar un papel crucial en la formación de los cuerpos de Lewys y el desarrollo de sinucleopatías. Estos cambios tienen lugar predominantemente en el dominio C-terminal de la proteína ya que es una zona rica en ácidos y en residuos prolina. A continuación, se realiza una breve descripción de las modificaciones observadas en la α -SIN.

1. *Fosforilación*. Se ha identificado la fosforilación en los residuos S87, Y125, Y133 y Y136, aunque la forma patológicamente relevante es la S129 que se ha encontrado acumulada en los cuerpos de Lewys. No se conoce del todo el mecanismo de fosforilación *in vivo*, pero en estudios *in vitro* se han identificado a unas enzimas kinasas (CKII, GRKs y LRRK2) responsables de la fosforilación de la proteína en la posición S129 y S87 [Erika, 2013]. Los estudios realizados hasta el momento sobre el efecto de la fosforilación en el proceso de formación de fibras no son concluyentes. Para prevenir la fosforilación y sus posibles consecuencias negativas se ha planteado utilizar las mutaciones de la sinucleína 129D dando resultados conflictivos en referente a la formación de fibras, dejando este campo abierto a otras investigaciones [Xu, 2016].

2. *Nitración-oxidación*. Los residuos susceptibles de sufrir la reacción de nitración son la Y39, Y125, Y133 y los residuos metionina. La nitración de la Y39 conlleva un cambio en la habilidad de la proteína a unirse a vesículas lipídicas [Erika 2013], lo cual es crucial para que esta proteína regule los neurotransmisores en el espacio presináptico. Sin embargo, en el residuo Y125 la nitrosilación aumenta la agregación de la proteína [Espejo, 2013]. Por otra parte, los residuos M1, M5, M116 y M127 pueden ser oxidados a sulfóxidos por diferentes agentes oxidantes producidos en los sistemas biológicos como son el peróxido de hidrógeno, las cloraminas y el peroxinitrilo [Miotto, 2014].

3. *Glicación*. Se ha encontrado una alta evidencia de que esta reacción no enzimática contribuye a la pérdida de funcionalidad y de solubilidad de las proteínas modificadas. Esta reacción tiene lugar en presencia de azúcares reductores, dando lugar a la formación de un conjunto heterogéneo de compuestos denominados como AGEs (advanced glycation end-products) [Hugo, 2017]. La glicación se inicia con la reacción de condensación entre el grupo carbonilo de la glucosa o azúcares reductores y los grupos amino libre presentes en las proteínas para formar una aldimina inestable o Base de Schiff, que se reordena a una cetoamina, denominada compuesto de Amadori. En la etapa intermedia, las Bases de Schiff y los compuestos de Amadori sufren procesos de oxidación, deshidratación y fragmentación generando compuestos carbonílicos y dicarbonílicos (RCS), tales como el glicolaldehído, el glioxal, el metilglioxal o la 3-desoxiglucosona, así como compuestos reactivos de oxígeno (ROS). En la etapa final, la evolución del compuesto de Amadori y la acción de los RCS y ROS sobre los nucleófilos proteicos (p.e. lisinas, argininas y cisteínas) conduce a la formación de los AGEs. Los AGEs se han detectado en pacientes diabéticos con enfermedades neurodegenerativas debido a la acumulación de azúcares reductores en el riego sanguíneo provocado por la enfermedad de la diabetes [Hugo, 2010] [Salahuddin, 2014].

4. *Mutaciones genéticas*. Está ampliamente descrito que la α -SIN puede sufrir mutaciones relacionadas a casos particulares de la enfermedad de Parkinson como son las mutaciones A53T, A30P, E46K, H50Q y G51D que alteran su capacidad de interaccionar con membranas biológicas y de formar fibras [McDowall, 2016] [Snead, 2014]. Por ejemplo, la mutación A30P provoca una pérdida de la capacidad de la proteína a unirse a la membrana lipídica, favoreciendo la formación de oligómeros, pero disminuyendo la formación de fibras. Por otra parte, la mutación A53T no provoca ningún cambio significativo en su unión a membranas, pero aumenta la formación de fibras; mientras que la mutación E46K muestra un incremento de su afinidad a las membranas y a la formación de fibras [McDowall, 2016].

4. Alfa-sinucleína como diana terapéutica.

En los apartados anteriores se ha resaltado la importancia de la α -SIN en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Respecto a la enfermedad de Parkinson, las distintas acciones terapéuticas que se llevan a cabo actualmente tienen como finalidad restablecer los niveles de dopamina proveniente de las neuronas dopaminérgicas que han sido alterados por la disfuncionalidad de la α -SIN [Álvarez, 2018].

En este apartado, se detallará con cierta extensión las distintas líneas de investigación que se han planteado en los últimos años para la inhibición parcial o total de la formación de fibras. A partir de la información obtenida de la bibliografía consultada se ha decidido presentar los fármacos potenciales en base a su modo de acción: fármacos que afectan a la producción de α -SIN, fármacos que inhiben la formación de fibras y, por último, aquellos fármacos que siguen otras otras vías y terapias en fase de ensayo clínico.

4.1. Fármacos que actúan en la producción de proteína.

4.1.1. Inhibidor de la prolioligopeptidasa (PREP)

El compuesto KYP-2047 inhibe la prolioligopeptidasa (PREP) e hidroliza péptidos de al menos 30 aminoácidos por mediación de los residuos prolina. Las alteraciones de la proteína PREP se han apreciado en pacientes con enfermedades neurodegenerativas lo que parece indicar que dicha proteína podría ayudar a disminuir los efectos adversos de estas enfermedades. Por este motivo, se incubó la proteína en un medio donde había células que sobre expresaban la a-SIN observando que las células sobrevivían más tiempo que las que no estaban cultivadas con la proteína inhibidora. Se sugiere que el mecanismo de inhibición consiste en una alteración de parte del código genético que provoca una sobreexpresión de la proteína, dificultando la sobreexpresión [Álvarez, 2018]. Algunos autores sugieren que éste inhibidor interacciona con la proteína después de sufrir esta misma un estrés oxidativo disminuyendo la cantidad de a-SIN dentro de la célula [Myöhänen, 2011].

4.1.2. Irisflorentin

Este fármaco es un derivado de las raíces de *Belamcanda Chinensis* que ha sido utilizado ampliamente en la medicina tradicional china para el tratamiento de trastornos inflamatorios.

Se ha probado *in vivo* en modelos de *Caenorhabditis elegans*, un nematodo de la familia Rhabditidae, observando que previene la acumulación de la a-SIN además de una mejora de la degeneración dopaminérgica. Se presume que esta última función se deba a su papel neuroprotector asociado a su actividad antioxidante e inhibidora de la apoptosis celular.

Otra función secundaria de este fármaco es la supresión de las respuestas inflamatorias inducidas por LPS disminuyendo los niveles de la NO sintasa que regula la producción de NO en el cuerpo, lo que provoca un descenso de la inflamación en el cerebro de los pacientes con enfermedades neurodegenerativas y por tanto disminuye el daño neuronal en esa región [Álvarez, 2018].

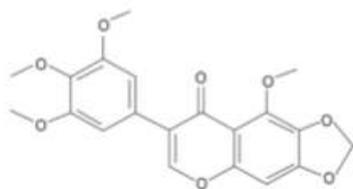


Figura 17: Representación química de la Irisflorentin.

4.1.3. N-Butilidenftalida

En estudios realizados *in vivo* mediante el uso de la especie *Caenorhabditis elegans* se ha comprobado que este compuesto reduce la degeneración de las neuronas dopaminérgicas atenuando la concentración de α -SIN a nivel intracelular. Además, reduce la pérdida de lípidos y restablece el comportamiento sensorial de los alimentos y el nivel de dopamina. Aun así, se requieren ensayos clínicos adicionales para evaluar la idoneidad del compuesto para el control de enfermedades neurodegenerativas [Álvarez, 2018].

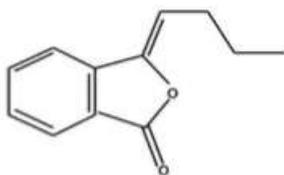


Figura 18: Representación química de la N-Butilidenftalida.

4.1.4. Onjisaponina B

Este fármaco provoca la autofagia de la α -SIN dependiente de la señalización vía Atg7 y AMPK-mTOR. También puede inhibir la aglomeración de proteína. Además, se ha observado que puede actuar frente a una mutación de la α -SIN, específicamente sobre la A53T provocando una aceleración de la eliminación de la α -SIN por lo que impediría futuras agregaciones de esta proteína. A pesar de los estudios realizados, se desconoce la relación existente entre los dos mecanismos de autofagia con el neuroprotector [Álvarez, 2018].

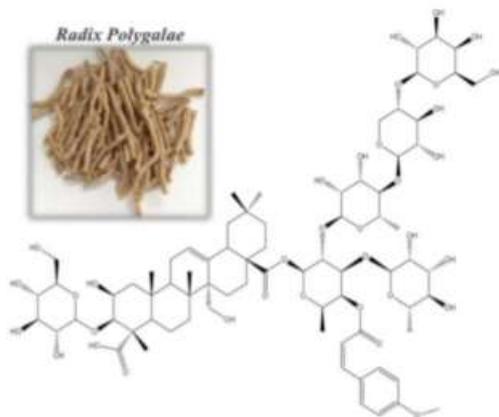


Figura 19: Representación química de la Onjisaponina B.

4.2. Fármacos que inhiben la formación de fibras.

4.2.1. Escualamina

La escualamina pertenece a la familia de los derivados 3-4 diamino del ácido escuárico y presentan múltiples aplicaciones. En el ámbito de la química medicinal exhiben una gran capacidad anticancerígena y antiviral [Ximenis, 2017].

Esta familia de compuestos interacciona con las membranas lipídicas que poseen fosfolípidos cargados negativamente, compitiendo con la α -SIN para unirse a la membrana lo que altera de forma significativa su futura agregación [Álvarez, 2018]. No obstante, se ha comprobado que la escualamina no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y presenta poca especificidad a la hora de actuar frente a la α -SIN [Pineda, 2017]. También se ha comprobado que reduce la toxicidad de dichas aglomeraciones de la proteína debido a su interacción con éstas [Álvarez, 2018].

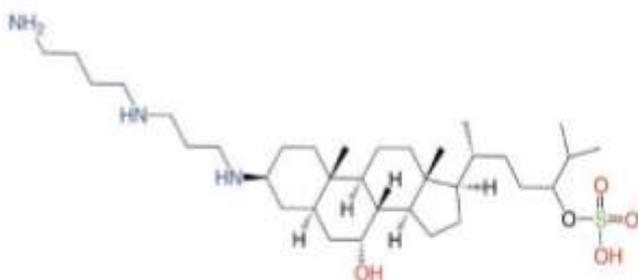


Figura 20: Representación química de la escualamina.

4.2.2. Polifenoles

Los compuestos polifenólicos se encuentran en frutas y vegetales y aportan numerosos beneficios a nuestra dieta. Se ha descrito que los compuestos baicaleína, galato de epigalocatequina, ácido rosmarínico, ácido tánico, miricetina y catequina, entre otros, presentan capacidad inhibidora de la formación de fibras y actúan como desestabilizadores del ensamblaje de fibras formando oligómeros solubles de sinucleína. Caruana y *col.* han realizado un estudio de actividad-estructura sobre 14 compuestos fenólicos naturales y han sugerido que las características moleculares necesarias para que un compuesto polifenólico pueda inhibir o desestabilizar las fibras de α -SIN son dos: presencia de grupos aromáticos en la estructura para interaccionar de forma no-covalente con la sinucleína, y grupos hidroxilo próximos en el anillo fenilo (aumenta el carácter inhibidor en el orden 3>2>1 grupos OH en el mismo anillo) [Caruana, 2011]

4.2.3. Ceftriaxona

La ceftriaxona pertenece a la familia de antibióticos β -lactámicos. Se ha estudiado su capacidad inhibidora y se ha comprobado que este compuesto inhibe la formación de fibras de la α -SIN y abre la puerta a otros posibles candidatos. Los aminoácidos de la estructura primaria de la α -SIN que interaccionan con este compuesto son E131, E137 y E139. En la figura 21 se muestran los grupos funcionales de la ceftriaxona que interaccionan con la α -SIN [Ruzza, 2014]

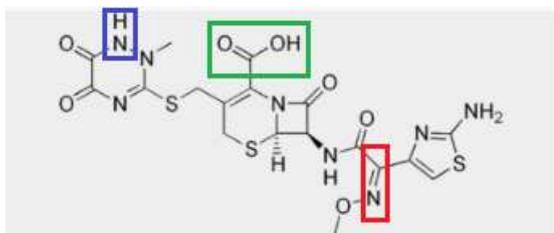


Figura 21: Representación química de la ceftriaxona [Ruzza, 2014].

La zona resaltada en color rojo corresponde a un grupo oximino el cual interacciona con el residuo E131. La segunda zona (color verde) pertenece a la parte carboxílica de la ceftriaxona, la cual está desprotonada e interacciona con el E139, mientras que la última estructura marcada de color azul interacciona con E137 [Ruzza, 2014]

Estudios realizados por Ruzza indican que existen otras dos conformaciones más en las cuales la ceftriaxona inhibe la formación de fibras. Todas ellas tienen en común las mismas zonas de interés, pero cambian los puntos de interacción con la proteína. Se pueden apreciar dichos cambios en la figura 22 [Ruzza, 2014].

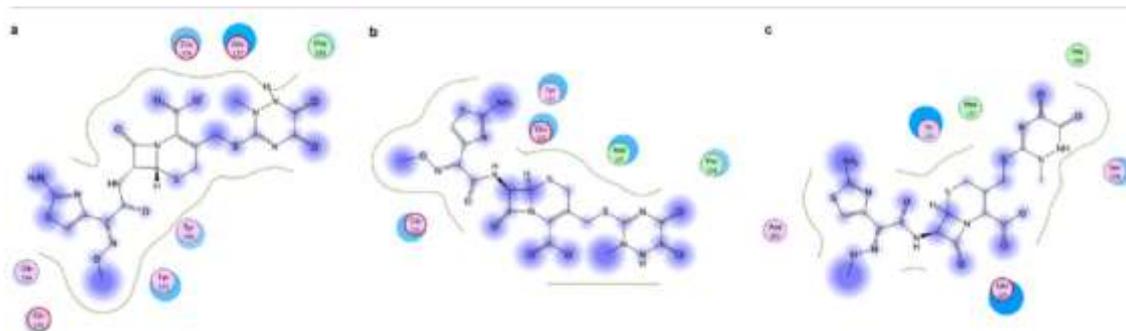


Figura 22: Representación gráfica de las interacciones de la α -SIN con la ceftriaxona [Ruzza, 2014].

Ruzza estudió el efecto inhibitor de la ceftriaxona y comprobó su eficacia con una proporción de 5:1 respecto a la proteína (Figura 23) [Ruzza, 2014].

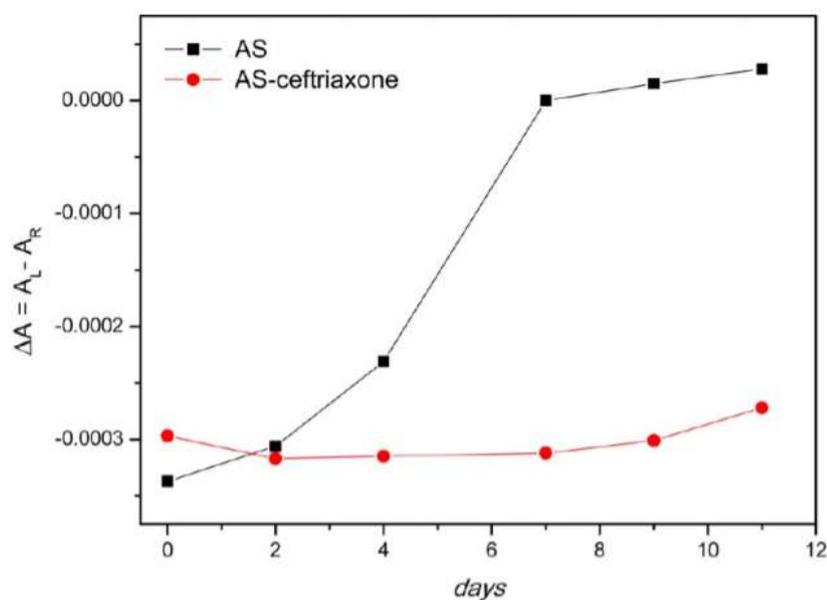


Figura 23. Representación gráfica de la inhibición de la ceftriaxona sobre el proceso de formación de fibras de la α -SIN respecto a la intensidad a 200 nm y con una equivalencia de 5 de ceftriaxona [Ruzza, 2014].

4.2.4. Rifampicin.

El rifampicin pertenece a la familia de la rifamicinas, antibióticos macrocíclicos que inhiben la síntesis de ARN bacteriano, y es ampliamente utilizado para el tratamiento de la tuberculosis y de la lepra. Su estructura se muestra en la figura 24.

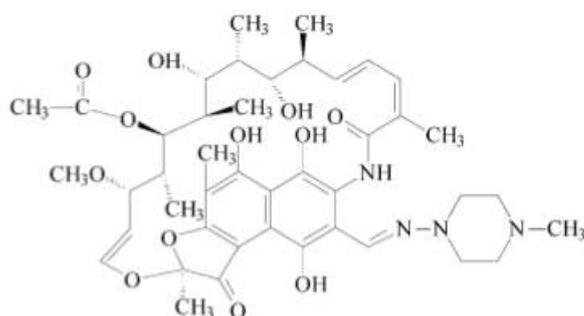


Figura 24: Representación química del Rifampicin.

Se ha comprobado por estudios de fluorescencia usando ThT que este fármaco inhibe la formación de fibras de la α -SIN [Álvarez, 2018]. En la figura 25 se muestra la inhibición para concentraciones superiores a 50 micromolar. Se ha sugerido que el mecanismo de inhibición consiste en la desestabilización de especies intermedias (oligómeros) formadas en las etapas iniciales de la formación de fibras [Jie LI, 2004].

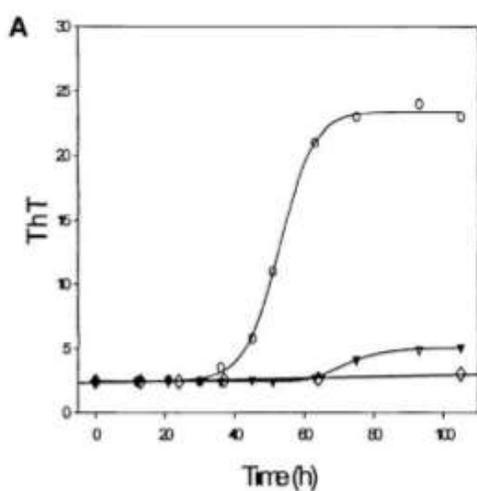


Figura 25: Representación gráfica de la inhibición del rifampicin sobre la α -SIN. Experimentos realizados en ausencia de inhibidor (\circ) o en presencia de 50 μ M de rifampicin (\blacktriangledown) y 100 μ M de rifampicin (\diamond) [Álvarez, 2018].

4.2.5. Synuclean D

El SynuClean-D es un compuesto que presenta dos anillos aromáticos en su estructura que le confieren posibilidades terapéuticas en enfermedades neurodegenerativas (figura 26). Recientemente se ha demostrado que es capaz de inhibir la agregación proteica (figura 27), destruir fibras amiloides ya formadas en la α -SIN nativa y detener la degeneración de neuronas dopaminérgicas en modelos de animales con la enfermedad de Parkinson [Pujol, 2018].



Figura 26: Representación química del synuclean D

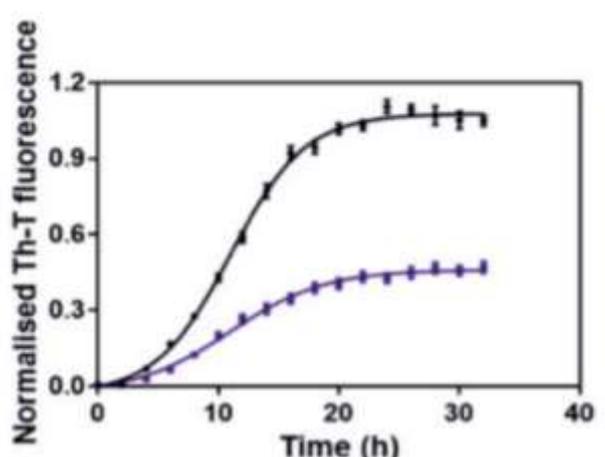


Figura 27: Efecto de la synucleina D en la agregación de la α -SIN *in vitro*. En esta figura aparece representada la variación de la fluorescencia respecto al tiempo de incubación en presencia y ausencia de inhibidor [Pujol, 2018].

4.2.6. Ginsenosido Rb1

Este fármaco es el principio activo del Panax Ginseng, una planta medicinal de origen chino. Se ha demostrado que este fármaco es un potente inhibidor de la fibrilación y por ende de la toxicidad de la a-SIN mediante la desagregación de las fibras ya formadas e impidiendo su agregación [Álvarez, 2018].

El siguiente paso que se plantea es obtener la estructura base que proporciona este efecto y experimentarlo con animales. [Álvarez, 2018]. La parte activa de este fármaco se haya en su estructura cíclica ya que los otros miembros de la familia no poseen estos ciclos y no posee una característica inhibidora de la a-SIN [Mustafa, 2015].

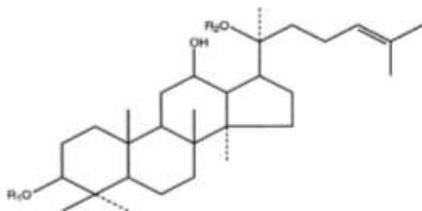


Figura 28: Representación gráfica del Ginsenosido Rb1.

4.2.7. Nortriptilina

Este fármaco es un antidepresivo tricíclico derivado del dibenzociclohepteno, actúa bloqueando la recaptación de noradrenalina y de serotonina por la membrana neuronal.

Estudios *in vitro* indicaron que la nortriptilina inhibe la agregación de la a-SIN al unirse directamente a la forma monomérica soluble realizando un cambio de conformación del monómero impidiendo que se agregue. Se han probado con diferentes modelos de animales dando resultados positivos por lo que todo parece indicar que podría impedir la progresión de la patología de la a-SIN. [Álvarez, 2018]. El mecanismo de inhibición que sigue este fármaco es de unión a la a-SIN impidiendo que formen los oligómeros y por ende la formación de fibras. Este mecanismo es dependiente de la concentración tal y como se puede apreciar en la figura 29 [Timothy, 2017].

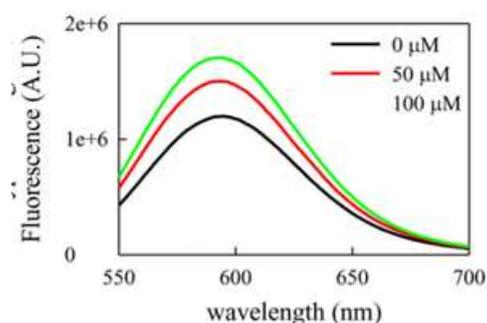


Figura 29: Interacción de la α -SIN con la nortriptilina incrementando la concentración de NOR lo que demuestra que disminuye la formación de fibras y que es dependiente de la concentración [Timothy, 2017].

4.2.8. ELN484228

Este fármaco es una molécula pequeña que contiene un grupo de bencenosulfonamida. Se mostró activo en presencia de la α -SIN interfiriendo en el mecanismo de agregación en los monómeros de la proteína, es decir, uniéndose a la proteína [Gergely, 2014]. Se ha probado un tratamiento con células que sobreexpresan la α -SIN, las cuales presentan la mutación A53T dando como resultado una mejora significativa a las alteraciones inducidas por la α -SIN incluyendo la dinámica vesicular y la neurotoxicidad. Estos hallazgos manifiestan el valor potencial de esta molécula como una herramienta de investigación [Gergely, 2014] [Álvarez, 2018].

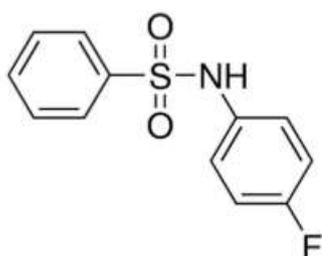


Figura 30: Representación gráfica del ELN484228.

4.2.9. NDGA

Se han llevado a cabo experimentos de fluorescencia con este fármaco descubriendo que inhibe la nucleación tanto primaria como secundaria, véase figura 31.

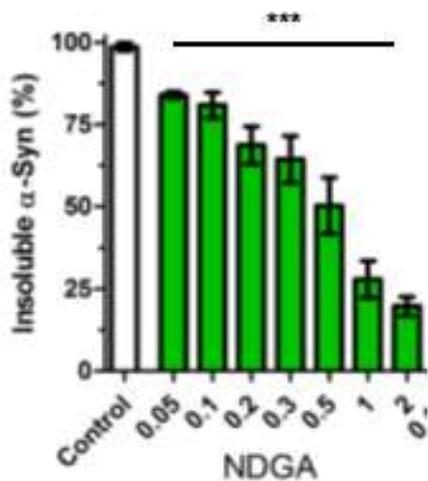


Figura 31: Representación gráfica de la inhibición de la formación de fibras de la α -SIN en función de la concentración de NDGA [Malcolm, 2018].

Se sospecha que la interacción provoca que la proteína no pueda formar la estructura de hélice α por lo que los agregados que forma son diferentes de los que formaría naturalmente [Malcolm, 2018]. La máxima inhibición se ha alcanzado cuando la reacción fue equimolar en NDGA como en α -SIN. Para comprobar que realmente había sido inhibido se comprobó con una imagen de transmisión electrónica, dando como resultado la figura 32.

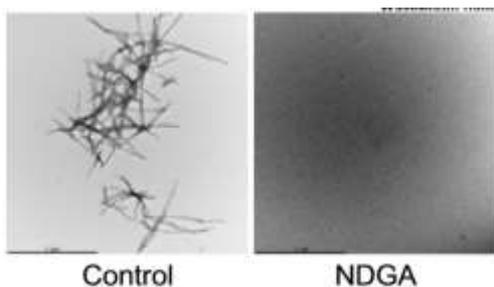


Figura 32: Comparativa por transmisión electrónica de dos muestras, una sin añadir NDGA y la otra añadiendo NDGA, observándose en esta última una inhibición en la formación de fibras [Malcolm, 2018]

Se puede observar que la proteína ha formado fibras en el experimento control; mientras que no se han observado al añadir el inhibidor NDGA a concentraciones equimolares, por lo que la concentración es muy importante en esta reacción.

Se ha comprobado que para que el proceso de inhibición ocurra se necesita una oxidación del NDGA y posteriormente una ciclación. Para comprobar esta hipótesis se realizó una mezcla de NDGA con un antioxidante y se apreció un efecto negativo sobre la α -SIN [Álvarez, 2018].

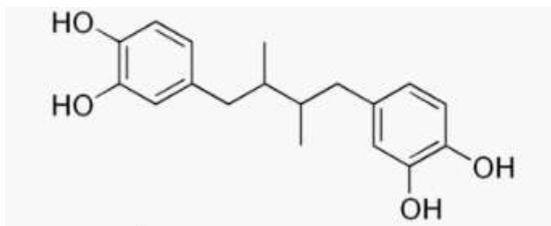


Figura 33: Representación química de la NDGA.

4.2.10. Lataxifolina

Es un constituyente que se encuentra en la comida que inhibe la formación de fibras HEWL (una proteína de la clara de huevo) lo cual hizo suponer que podría inhibir la formación de fibras de otras proteínas. Al intentarlo con la α -SIN obtuvieron resultados positivos (figura 34). Se cree que impide la formación de estructuras tipo beta [Mohsen, 2017].

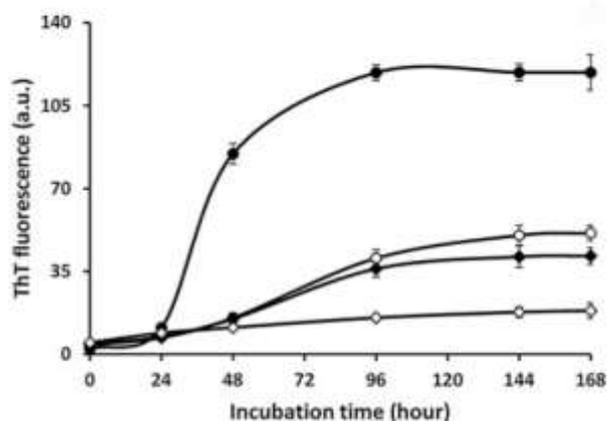


Figura 34: Representación gráfica de la señal de fluorescencia frente al tiempo de incubación a 37°C. Concentración de la proteína 50 micromolar. En ausencia de inhibidor (●). En presencia de 25 μ M (○), 50 μ M (◆) y 100 μ M (◇) de inhibidor.

4.3. Fármacos que siguen otras vías y terapias en fase de ensayo clínico

El trabajo realizado por Fernández muestra que la modulación de la enzima lisosomal denominada β -glucocerebrosidasa (enzima GBA), enzima responsable del metabolismo de la glucocerebrosida cuya deficiencia puede ocasionar una acumulación de a-SIN en los lisosomas, puede alterar la concentración de sinucleína [Fernández, 2019]. Mediante un estudio genético analizaron los factores que alteran la funcionalidad de la GBA y concluyeron que ciertas mutaciones eran un factor de riesgo a sufrir acumulaciones de la a-SIN. A raíz de este estudio, el grupo de Siveira y colaboradores analizó la acción del ambroxol y observó que actúa como una chaperona que mejora la función lisosómica en células que poseían una mutación en el gen de la GBA, lo que abre nuevas puertas de terapia [Silveira, 2019].

Finalmente, se describen algunas de las terapias que se encuentran en fase de ensayo clínico.

El laboratorio Roche tiene al anticuerpo RO7046015 en un ensayo clínico de fase II cuya acción es la de capturar las formas tóxicas de la proteína a medida que se propagan. En estudios preclínicos, el anticuerpo redujo la neurodegeneración y la extensión de la a-SIN en un modelo de ratón transgénico. Los datos de la fase I mostraron que RO7046015 fue bien tolerado en pacientes con enfermedades neurodegenerativas.

Por otra parte, el laboratorio Biogen está estudiando el anticuerpo B1B054 y Affiris está desarrollando dos vacunas denominadas PD01A y PD03A que estimulan al sistema inmune para crear sus propios anticuerpos que se unen preferentemente a las fibrillas de a-SIN. Ambos estudios se encuentran actualmente en fase de ensayo I [Álvarez, 2018].

La empresa NeuroporeTherapies, en colaboración con UCB (Union chimique belge) ha completado con éxito ensayos de seguridad de su molécula NPT200-11, un estabilizador de a-SIN en voluntarios sanos. En modelos de ratón transgénicos, el compuesto disminuyó la neurodegeneración.

Sanofi Genzyme tiene en fase de ensayo II a una molécula inhibidora de la glucosilceramidasa (GBA), denominada SAR402671, que actúa reduciendo la producción de glucosilceramida y evitando la agregación de la a-SIN [Silveira, 2019].

A continuación, paso a describir la parte correspondiente al objetivo parcial b).

5. Materiales y métodos.

5.1. Materiales.

5.1.1. Reactivos.

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de las empresas comerciales ACROS Organics, Thermofisher, Sigma-Aldrich y Scharlau. La α -SIN fue producida siguiendo la metodología descrita en esta memoria y los antibióticos utilizados (ceftriaxona, aztreonam y ceftazidina) se encontraban a disposición del grupo de investigación en Reactividad Molecular y diseño de Fármacos (ReacMol) de la universitat de les Illes Balears, donde se ha desarrollado este proyecto.

5.1.2-Disoluciones.

Las disoluciones tampón (DT) utilizadas en este trabajo se indican a continuación:

- DT1: Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM, pH 8,0.
- DT2: Tris-HCl 10 mM, pH 7,4.
- DT3: Tris-HCl 10 mM, NaCl 600 mM, pH 7,4.
- DT4: Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM, azida sódica 0,1% en peso, pH 7,5.
- DT5: MES 20mM, NaCl 150mM, azida sódica 0,1% en peso, pH 6,0.
- DT6: Acetato de sodio 20mM, NaCl 150 mM, azida sódico 0,1% en peso, pH 4,5.
- DT7: Tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,0.

Por otra parte, las disoluciones utilizadas de los antibióticos son: Ceftriaxona (2mM), Aztreonam (2 mM), Ceftazidima (2mM).

Para los estudios de formación de fibras se utilizó una concentración 1 mM del cromóforo de thioflavina T (ThT) a pH 8,0.

Se utilizó un pH-metro digital Crison modelo Basic 20+ que presenta un electrodo de vidrio Crison modelo 50 29 para la comprobación del pH del medio.

5.2-Producción de alfa-sinucleína.

5.2.1. Condiciones previas.

Para la producción de la proteína se ha requerido el uso de una cepa de bacterias *E. coli* modificadas genéticamente con un plásmido que incluía la secuencia de nucleótidos que codifican para la α -Syn humana y otra para una β -lactamasa que aporta a las células resistencia a la ampicilina. El material empleado ha tenido que estar completamente esterilizado, para impedir la formación de colonias parasitarias. Para llevar a cabo la esterilización se ha utilizado una autoclave, a alta presión y temperatura.

Otra medida que se utiliza para evitar contaminar el cultivo de bacterias es el uso de una campana de flujo positivo con el propósito de que no entre aire con posibles contaminantes cuando estemos manipulando el precultivo y el cultivo. Además, siempre que se utilice la campana de flujo se limpiará previamente con etanol para desinfectar la zona.

El proceso de producción de la proteína se ha dividido en diferentes etapas: precultivo, cultivo, separación de la proteína, purificación de la proteína, gel de electroforesis e diálisis y preconcentración de la proteína.

5.2.2. Precultivo

En esta primera fase, se establece una colonia inicial de bacterias que más adelante se traspasará a otra zona de cultivo donde se formará la colonia de bacterias propiamente dicho.

Se prepara una disolución de 1l de cultivo *Luria Bertani* (LB), con una concentración de 25 g/l, y posteriormente se autoclava la disolución. A continuación, se introducen 20 ml de LB más 40 μ L de ampicilina (5 mg/mL).

Se añaden 2-5 μ L de la cepa bacteriana modificada genéticamente con un plásmido que incluye una secuencia de nucleótidos que codifican la α -SIN y otra para una β -lactamasa que le aporta resistencia a la ampicilina. Se deja incubar toda la noche a 37°C y 180 rpm.

5.2.3 Cultivo.

La suspensión celular resultante se adicionó a 1L de medio LB que contenía ampicilina (100 μ g/mL). Se incubó la mezcla anterior hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm superior a 0,6 D.O. A continuación, se adicionó 1 ml de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 M con la finalidad de inducir la formación de la α -SIN y se incubó durante otras 4 horas a 37°C y 180 rpm.

Una vez transcurrido el tiempo indicado, las células se separaron del medio de cultivo mediante centrifugación a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C y se guardó el pellet resultante.

5.2.4. Separación de la proteína.

El pellet anterior se resuspendió en la proporción 1/10 del volumen inicial de LB empleando la DT1, agitando durante 1h en un baño de hielo. Posteriormente, se llevó a cabo la lisis celular sonicando la suspensión anterior durante 2 min. La mezcla resultante se centrifugó durante 20 min a 4°C a 10Kxg con el fin de descartar el precipitado (P1) y recuperar el sobrenadante (S1). Seguidamente, se añadió sulfato de estreptomicina hasta alcanzar la concentración del 1%(m/v) y se agitó durante 15 min en un baño de hielo, con la finalidad de precipitar los ácidos nucleicos (P2). La mezcla obtenida se centrifugó durante 30 min a 13,5 Kxg y a 4°C recuperándose el sobrenadante (S2). En este paso se procede a precipitar todas las proteínas de la disolución, adicionando sulfato de amonio (29,5 g de sulfato por cada 100 ml de disolución) agitándose 1 h en un baño de hielo para precipitar la proteína producida. Se centrifugó la mezcla durante 30 min a 13,5 kxg a 4°C, y se descartó el sobrenadante (S3) y se guardó el pellet (P3).

5.2.5. Purificación de la proteína.

Se procedió a resuspender la disolución del pellet P3 en DT2 en un volumen igual a 1/20 veces el volumen inicial de medio *LB* y la disolución se filtró utilizando un filtro de membrana de nailon con un diámetro de poro de 45 µm. Para la purificación de la proteína de interés se utilizó un cromatógrafo de la marca AKTA con un procedimiento ya establecido y optimizado, utilizando una resina de intercambio aniónico GE Healthcare Q de 6 ml y un colector de fracciones. Para llevar a cabo la elución se aplicó un gradiente de NaCl de 0 a 600 mM utilizando dos tampones diferentes (DT2 y DT3) con un flujo de 4 mL/min. Se utilizó la espectrometría UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm como método de detección. Las fracciones de sinucleína obtenidas se juntaron y la muestra se concentró, utilizando tubos equipados con una membrana de 5000 Da como peso molecular de corte y centrifugando varias veces. El grado de pureza de la α -SIN se comprobó usando SDS-PAGE y MALDI-TOF/TOF por mediación gel de electroforesis; mientras que la masa exacta se determinó con un espectrómetro de masas Q-Exactive Orbitrap de alta resolución equipado con una sonda de ionización por electrospray de alta temperatura (HESI) (Thermo Fisher).

5.2.6. Diálisis y preconcentración.

En esta fase se procede a realizar una diálisis de la proteína, para cambiar la disolución tampón de la proteína. Se ha dializado en diferentes tampones; DT4, DT5 o DT6. Más adelante, se determinó la concentración de proteína midiendo la absorbancia a 280 nm sabiendo que el coeficiente de absorción molar a esa longitud de onda es $5960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ de acuerdo al valor determinado a partir de su secuencia primaria mediante la plataforma online ExpASy-ProtParam. En caso de que la muestra necesite una preconcentración, se recoge la muestra en unos tubos equipados con una membrana de 5000Da como peso molecular de corte y se centrifuga repetidas veces a 4°C y 4Kxg.

5.2.7. Gel electroforesis

Se procedió a realizar una electroforesis de los cultivos realizados utilizando los geles BIORAD Mini-PROTEAN TGXTM para determinar la presencia de la proteína. En cada uno de los pocillos se añadieron $15 \mu\text{L}$ de las alícuotas recogidas en el proceso de producción de la $\alpha\text{-SIN}$, dichas alícuotas fueron tratadas previamente con Laemmi/DTT. La electroforesis se llevó a cabo a 200V durante 30 minutos y los geles se tiñeron con azul de Coomasie.

5.3. Estudio de la formación de fibras por fluorescencia

El método empleado para la formación de fibras de la $\alpha\text{-SIN}$ consiste en el análisis de la intensidad de fluorescencia de una disolución que contiene a la proteína con el cromóforo Thioflavina T. Este fluoróforo no presenta fluorescencia ya que los estados excitados se desactivan debido a la rotación alrededor del eje central de su estructura molecular, pero en presencia de fibras, este compuesto puede insertarse en las cavidades producidas por la aglomeración de la proteína quedándose impedida la rotación interna que provoca un aumento de la señal de fluorescencia.

Los experimentos de seguimiento de la formación de fibras se realizaron por duplicado. El procedimiento se describe en los siguientes apartados.

1) Se adicionó 800 μL de proteína a 500 μL de buffer o a una mezcla de buffer e inhibidor (de los cuales 200 μL era de inhibidor) en un tubo eppendorf de 1 mL. El tubo se colocó en un agitador marca Thermo Shaker modelo TS-100 de la casa comercial Biosan y se agitó la muestra a 500 rpm a 37 °C durante 5 días.

2) A ciertos intervalos de tiempo, se extraían 30 μL de la muestra de proteína (70-80 μM), adicionándose a una cubeta de fluorescencia junto a 50 μL de cromóforo ThT (1 mM, pH 8) y 1,10 ml de DT7. La concentración final de proteína en la cubeta de medida fue de 1,52 μM . Posteriormente se registraba su espectro de fluorescencia, seleccionando una longitud de onda de excitación de 450 nm; mientras que la señal emitida por la cubeta se recogía entre 460 a 560 nm utilizando el Fluorímetro modelo RF-5301PC de la marca comercial Shimadzu. Posteriormente, se analizaba el espectro obtenido buscando a qué longitud de onda se encontraba el máximo de intensidad que fue de 480 nm.

5.4. Tratamiento matemático de la formación de fibras

Para analizar la formación de fibras, se representa la intensidad máxima de emisión de la tioflavina T frente al tiempo de incubación. El modelo matemático que se utiliza para ajustar los datos experimentales a una cinética de formación de fibras es el siguiente:

$$F = (F_i + m_i t) + \frac{F_t + M_t t}{1 + e^{-\frac{t - t_0}{\tau}}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde F es la intensidad de fluorescencia a un tiempo t, F_i y F_t corresponden a las intensidades de fluorescencia de la fase inicial y final respectivamente, m_i y m_t son las pendientes de la fase inicial y de la fase de saturación, t_0 representa el tiempo que tarda en comenzar la segunda fase y τ está relacionada con la constante cinética aparente formación de fibras.

Tal y como se puede apreciar, la ecuación 1 consta de dos términos. El primer término, dependiente del tiempo, se corresponde con una línea recta de pendiente m_i ; mientras que el segundo término correspondería a una fracción matemática, cuyo numerador es otra línea recta correspondiente a la saturación de formación de fibras mientras que el denominador explicaría el carácter exponencial de la función.

Para calcular las constantes de la función presentada en la ecuación 1, se realizó un ajuste matemático de los datos experimentales con el programa SigmaPlot 10.0.

6. Resultados y discusión

6.1. Producción de α -SIN nativa.

Inicialmente se procedió a la producción y purificación de la proteína utilizando el procedimiento descrito en el apartado 5.2. Una vez producida, fue purificada por cromatografía. Las diferentes fracciones del pico mayoritario fueron analizadas utilizando electroforesis de SDS-PAGE lo que mostró la presencia de una única banda a 14200 Da (figuras 35 y 36). Posteriormente, se utilizó el MALDI-TOF/TOF para determinar el peso molecular exacto de la proteína responsable de dicha banda. El peso fue de 14464 Da (Figura 37), lo que se correspondía a la α Syn nativa. Su espectro UV-VIS mostró un máximo a 275 nm, debido a la presencia de Tyr (Figura 37).



Figura 35: De izquierda a derecha: Patrón, Precultivo I, Precultivo II, Cultivo I y Cultivo II y las últimas fracciones cromatográficas. Las distintas fracciones coinciden con la banda de ~14,200 Da del marcador. No se observa la presencia de contaminantes o de especies oligoméricas.

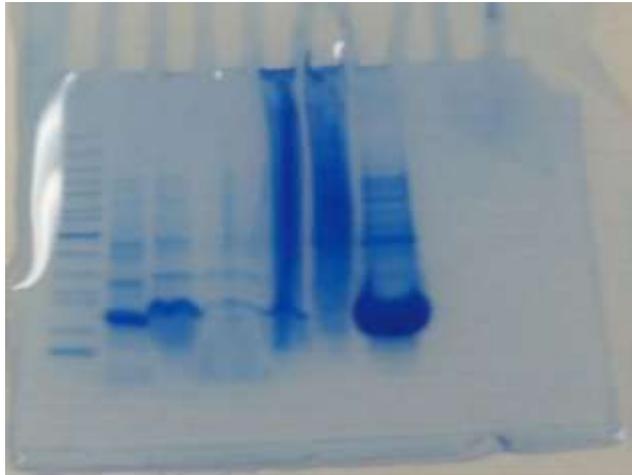


Figura 36: De Izquierda a derecha:
Patrón, sobrenadante I, sobrenadante II, sobrenadante III, sobrenadante IV, pellet I,
pellet II y pellet III.

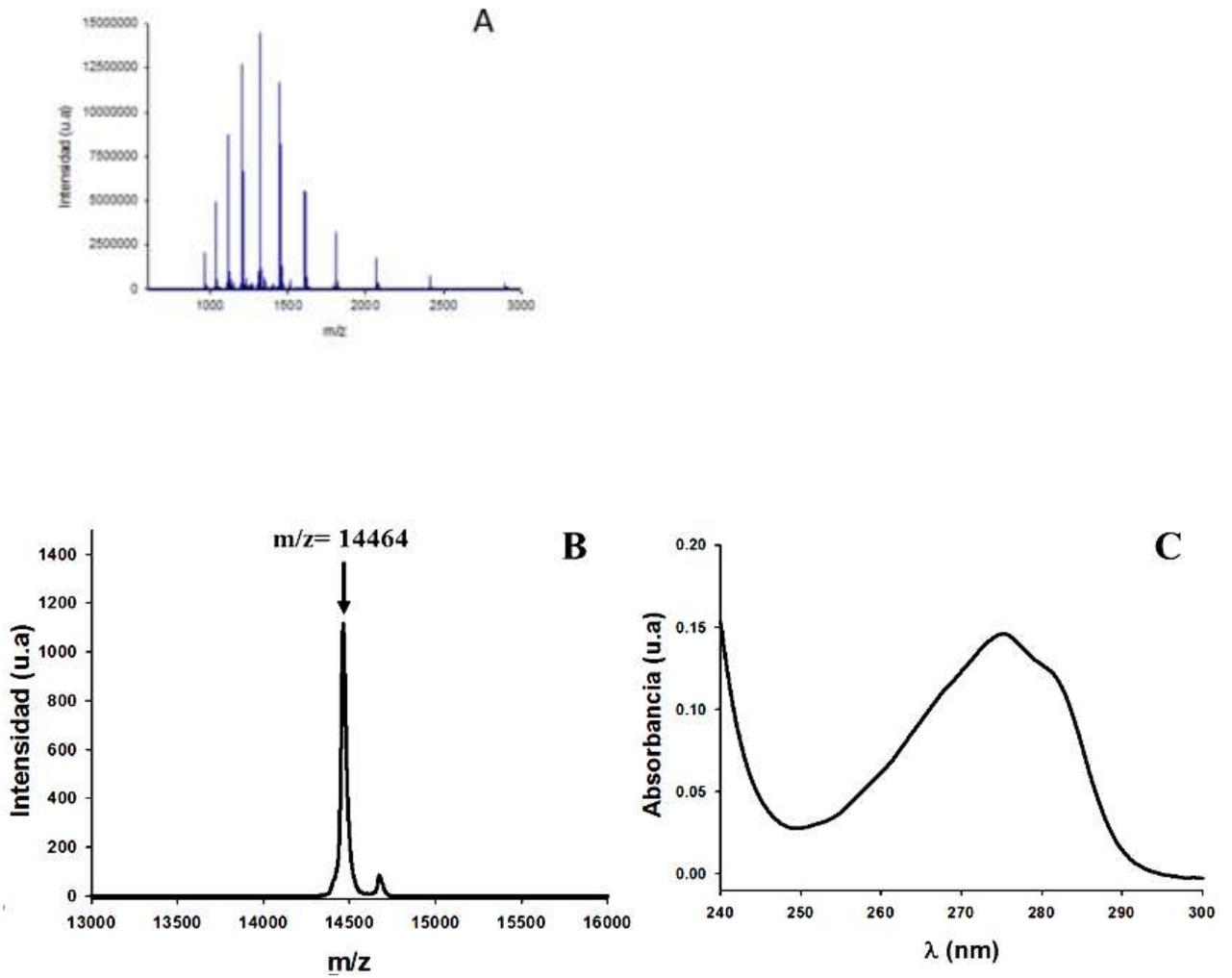


Figura 37 A. Espectro de masas ESI-Orbitrap de la α -SIN producida y purificada en este trabajo. B. Espectro MALDI-TOF de la α -SIN producida y purificada en este trabajo. C. Espectro UV-VIS de la α Syn nativa (100 μ M) monomérica y purificada a 25 °C

6.2. Optimización del método para el seguimiento de la formación de fibras

En este apartado se ha realizado un estudio previo para determinar las condiciones experimentales óptimas de pH para el seguimiento de la formación de fibras utilizando el compuesto thioflavina T. Las disoluciones tamponadas utilizadas fueron el DT4, DT5 o DT6. A continuación, se procedió a analizar la formación de fibras en las disoluciones tampón indicadas anteriormente. Los resultados se representan en la figura 38.

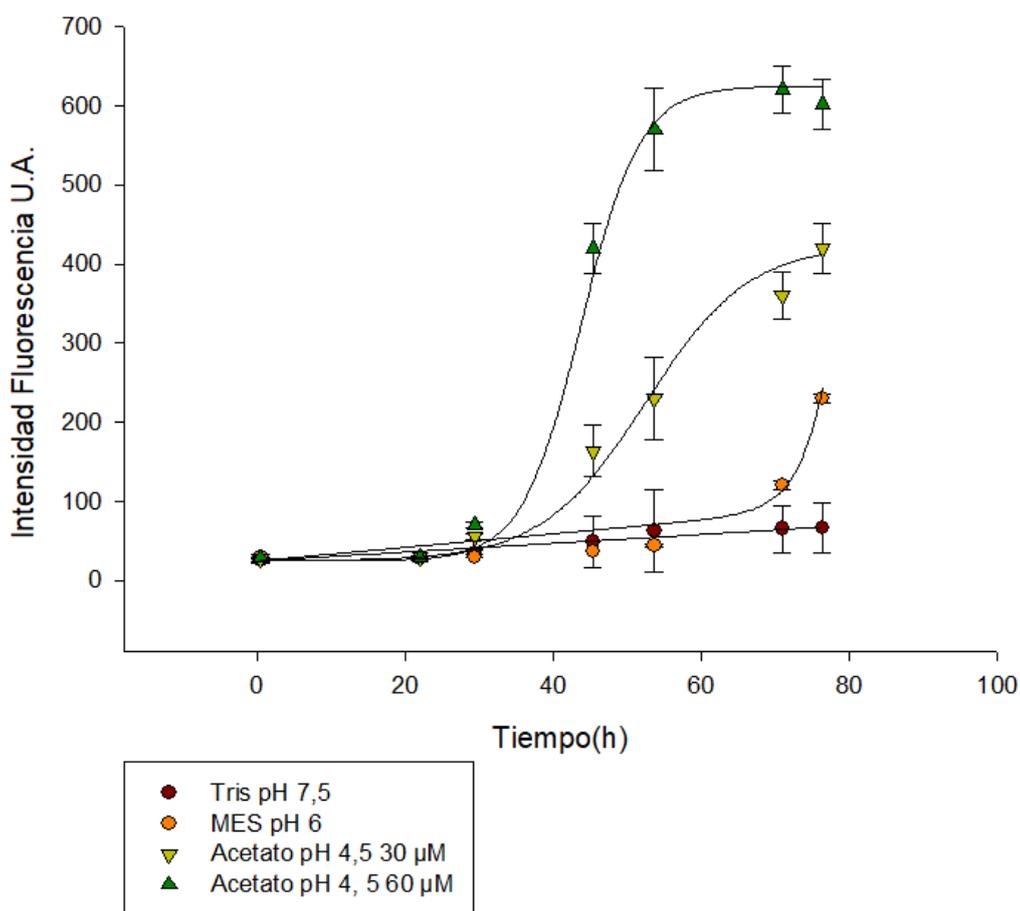


Figura 38: Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de una disolución 30 µM de a-SIN en presencia de ThT en diferentes disoluciones tampón (DT4, DT5 y DT6).

Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación 1 y se obtuvieron los parámetros t_0 , τ y k que se muestran en la tabla 2

Tabla 2: Valores de las constantes t_0 , τ , K y $t_0-2\tau$ obtenidos del ajuste de los datos obtenidos en la figura 38 a la ecuación 1.

	pH 7,5 (30 μ M de proteína en 20 mM TRIS)	pH 6,0 (30 μ M de proteína en 20 mM MES)	pH 4,5 (30 μ M de proteína en tampón acetato)	pH 4,5 (60 μ M de proteína en tampón acetato)
t_0 (h)	132 \pm 5	84 \pm 4	52 \pm 2	24 \pm 2
τ (h)	10 \pm 0,5	9,1 \pm 0,4	7,0 \pm 0,7	3,7 \pm 0,4
k (h ⁻¹)	0,10 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02	0,14 \pm 0,01	0,27 \pm 0,02
$t_0-2\tau$ (h)	112 \pm 5	66 \pm 4	38 \pm 3	17 \pm 2

Tal y como se puede apreciar en la figura 38, la disminución del pH acelera la formación de fibras en las condiciones experimentales utilizadas. Los parámetros t_0 y τ disminuyen a medida que el pH es más ácido y su diferencia se relaciona con la fase de nucleación, lo que indica que aceleran el proceso de formación de fibras. De los valores de la tabla 2 también se puede apreciar que disminuye notablemente el tiempo de latencia ($t_0-2\tau$), lo que se relaciona con la finalización de la fase de nucleación. Además, un aumento de la concentración de proteína a pH 4,5 también incrementa la constante cinética de formación de fibras. Estos resultados están de acuerdo con lo publicado por Alexander y colaboradores. [Buell, 2014]

Adicionalmente, se analizó cómo influía la presencia de un medio micelar, como es el dodecil sulfato sódico-SDS, en la cinética de formación de fibras. En la figura 39 se han representado los experimentos realizados a dos concentraciones diferentes de SDS a pH 6,0 (disolución tampón DT5).

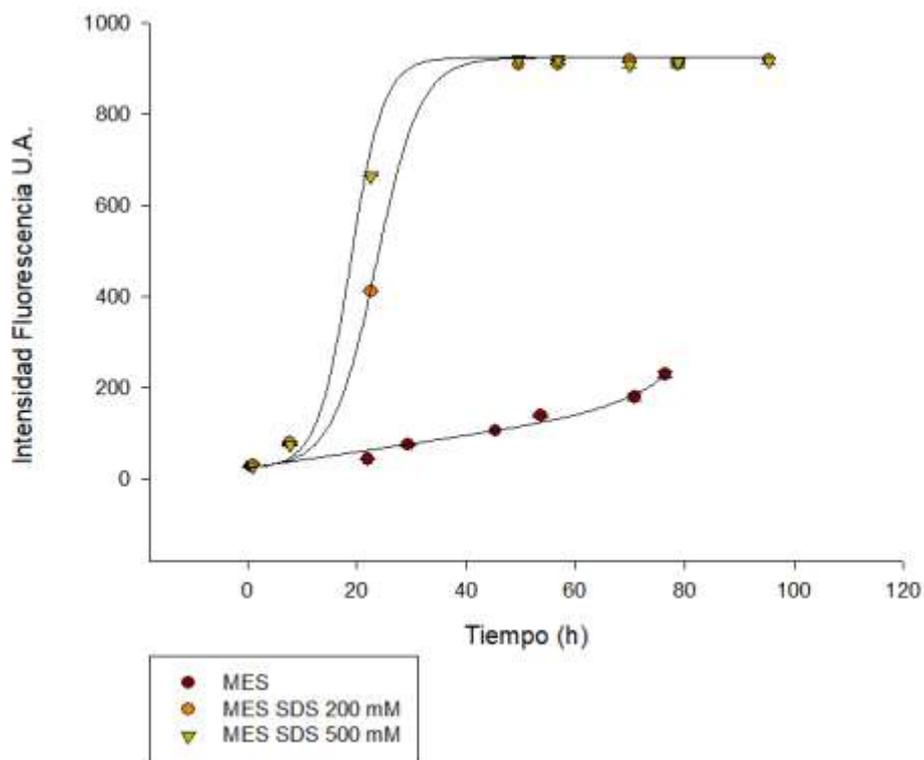


Figura 39: Representación gráfica de la disolución DT5 con distintas concentraciones de SDS.

En la tabla 3 se muestran los parámetros obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la ecuación 1. Se comprueba que el tiempo t_0 y la constante cinética k , se modifican significativamente con la presencia de SDS.

Tabla 3: Valores de las constantes t_0 , τ , K y $t_0-2\tau$ obtenidos del ajuste de los datos obtenidas en la figura 39 a la ecuación 1.

	a-SIN en tampón MES	a-SIN en tampón MES + SDS 200mM	a-SIN en tampón MES + SDS 500mM
t_0 (h)	84 ± 4	23 ± 2	18 ± 2
τ (h)	$9,0 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,6$
k (h ⁻¹)	$0,11 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,02$
$t_0-2\tau$ (h)	66 ± 4	15 ± 3	12 ± 3

Tal y como se puede apreciar en la figura 39, la señal de fluorescencia del fluoróforo ThT se incrementa con la presencia de SDS. Este resultado sugiere que el entorno micelar favorece la acumulación local de la α -SIN, acelerando la formación de fibras tal y como apreciaron Alexander y colaboradores [Buell, 2014]. Además, es importante destacar que la presencia de SDS facilita cinéticamente la fase inicial de formación de fibras, tal y como se puede apreciar al ver la disminución que presentan todos los parámetros mostrados en la tabla (a excepción de la constante cinética k que aumenta ligeramente), lo que se relaciona con una aceleración en la formación de fibras.

A continuación, se procedió a estudiar el posible efecto inhibitorio de la formación de fibras de los compuestos ceftriaxona y aztreonam en presencia de SDS (500 mM).

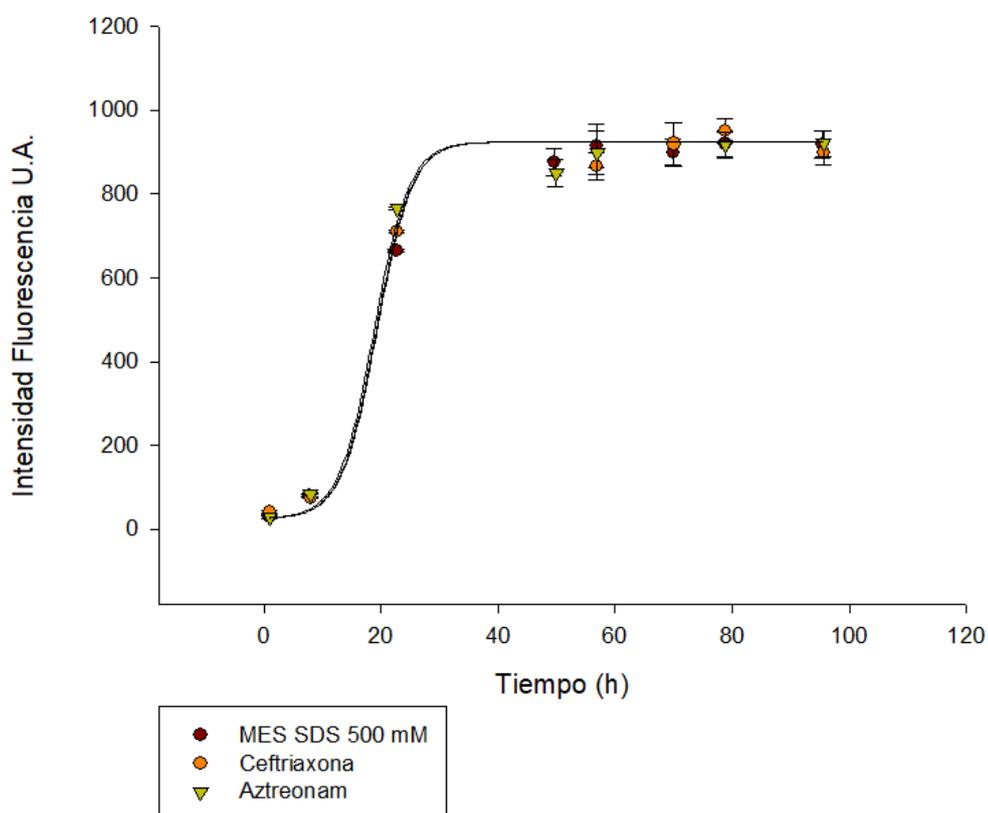


Figura 40: Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de ThT en la disolución tampón DT5, a pH 6,0 con SDS (500 mM) en ausencia o presencia de ceftriaxona y aztreonam.

Los resultados mostrados en la figura 40 se han ajustado a la ecuación 1 y se presentan en la tabla 4. Los valores de t_0 y de la constante cinética no se modifican por la presencia de los compuestos β -lactámicos. Estos resultados sugieren que estos compuestos no inhiben la formación de fibras en estas condiciones experimentales. No obstante, el trabajo publicado por Ruzza y col. [Ruzza, 2014] indicaba que la ceftriaxona alteraba la estructura secundaria de la sinucleína e inhibía la formación de fibras a un pH superior. Estos resultados indican que la presencia del medio micelar formado por el SDS acelera notablemente la cinética de formación de fibras y no permite observar en estas condiciones experimentales el posible efecto inhibitor de los compuestos ceftriaxona o aztreonam. Por este motivo, se optó por utilizar la disolución tampón DT6 a pH 4,5 en ausencia de SDS para realizar el estudio de la capacidad inhibitor de la formación de fibras por compuestos β -lactámicos.

Tabla 4: Valores de las constantes t_0 , τ , k y $t_0-2\tau$ obtenidos del ajuste de los datos obtenidas en la figura 40 a la ecuación 1.

	pH 4,5 , tampón MES en presencia de SDS 500 mM	Ceftriaxona + MES SDS 500mM	Aztreonam + MES SDS 500mM
t_0 (h)	18 ± 2	19 ± 2	19 ± 3
τ (h)	$3,0 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,2$
k (h^{-1})	$0,33 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$
$t_0-2\tau$ (h)	12 ± 2	13 ± 3	12 ± 3

Como conclusión de este estudio preliminar, las condiciones experimentales para la posterior realización de los experimentos de inhibición serán: disolución DT6 a pH 4,5 con una concentración de proteína 60 μ M, con una proporción de concentraciones 1:2 proteína-inhibidor, a una temperatura de 37 °C y con agitación constante a 500 rpm.

6.3. Estudio de la capacidad inhibidora de la ceftriaxona y el aztreonam.

En este apartado, se ha estudiado el posible efecto inhibidor de los compuestos ceftriaxona y aztreonam. La ceftriaxona es una cefalosporina que presenta el anillo β -lactámico fusionado a un anillo de tiazolidina. Mientras que el aztreonam es una monolactama, en la que el anillo betalactámico de cuatro miembros no se encuentra fusionado a otro anillo. Sin embargo, este compuesto se ha elegido para este estudio por su semejanza con algunos grupos funcionales con la ceftriaxona: posee un grupo oximino, un sustituyente amino tiazol y un grupo ácido enlazado al nitrógeno 1 del anillo beta-lactámico.

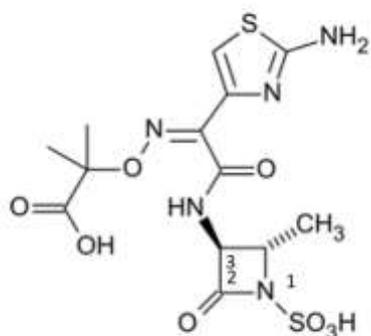


Figura 41: Representación química del Aztreonam.

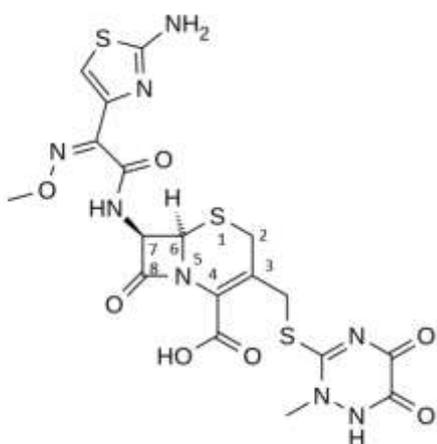


Figura 42: Representación química de la ceftriaxona.

En la figura 42 se ha representado la variación de la intensidad de fluorescencia, utilizando el cromóforo ThT, de la α -SIN en ausencia o en presencia de los compuestos ceftriaxona y el aztreonam en un período de incubación de 80 h.

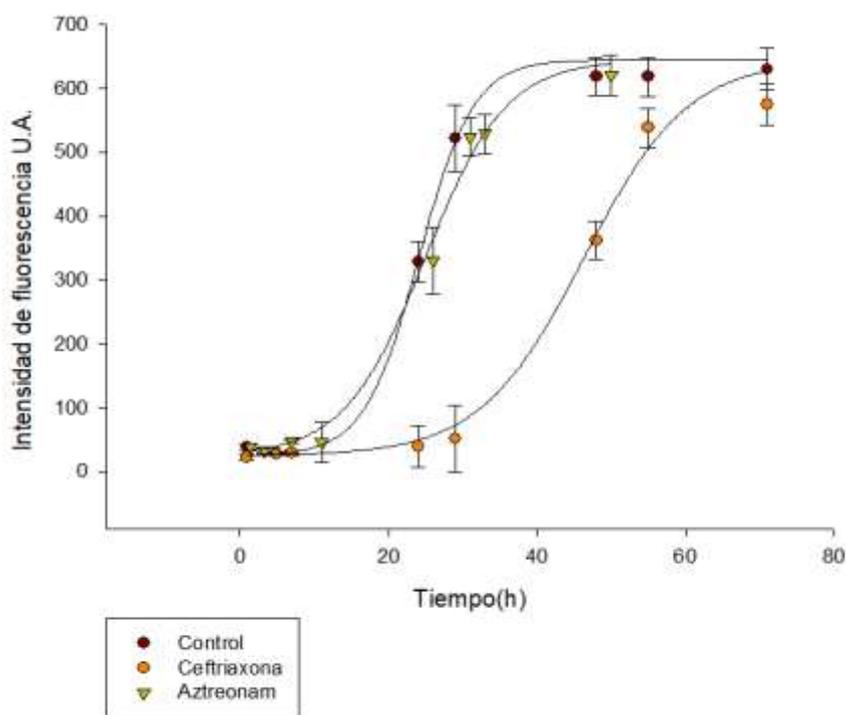


Figura 43: Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de la muestra sin y con inhibidor.

Tal y como se puede apreciar en la figura 43, la ceftriaxona ha actuado como un inhibidor para la formación de fibras de la α -SIN de forma parcial, es decir, ha inhibido de forma temporal la formación de fibras ya que a partir de un cierto margen de tiempo, las fibras se han formado. Realizando el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 1, se obtienen los parámetros indicados en la tabla 5. En esta tabla se comprueba que la presencia de ceftriaxona aumenta notablemente el tiempo t_0 , disminuye la constante cinética de formación de fibras, y duplica aproximadamente el tiempo de retraso. Sin embargo, la presencia de aztreonam no modifica los parámetros de la ecuación 1. Estos resultados sugieren que el aztreonam no presenta capacidad inhibidora de la formación de fibras en las condiciones experimentales utilizadas, a pesar de compartir algunos de los grupos funcionales que presenta la ceftriaxona responsables de la inhibición de la formación de fibras.

Tabla 5: Valores de las constantes t_0 , τ , k y $t_0-2\tau$ obtenidos del ajuste de los datos obtenidas en la figura 43 a la ecuación 1.

	Control (DT6)	Ceftriaxona 2mM (DT6)	Aztreonam 2mM (DT6)
t_0 (h)	24±3	46±2	24±4
τ (h)	3,6±0,5	5,4±0,3	3,2±0,3
k (h ⁻¹)	0,27±0,04	0,18±0,02	0,14±0,03
$t_0-2\tau$ (h)	17±3	35±4	18±2

6.4. Estudio de la capacidad inhibidora de la ceftazidima.

En este apartado se analizó la posible capacidad inhibidora de otro compuesto β -lactámico como es la ceftazidima, el cual pertenece a la misma familia de antibióticos que la ceftriaxona. La ceftazidima posee un grupo piridinio enlazado al carbono 3'. Los resultados experimentales de modificación de la intensidad de fluorescencia de la tioflavina T con el tiempo en presencia y ausencia de ceftazidima se han representado en la figura 44.

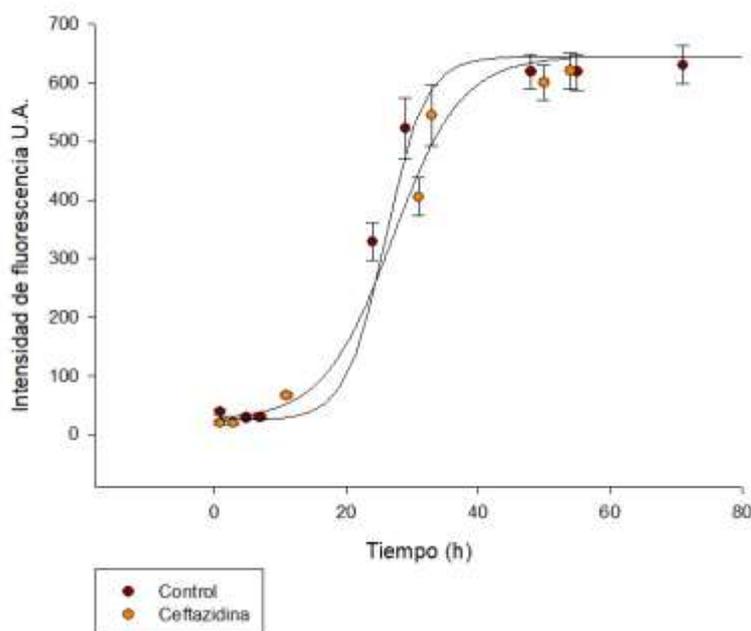


Figura 44: Representación gráfica de la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo para una muestra de sinucleína en presencia y ausencia de ceftazidima.

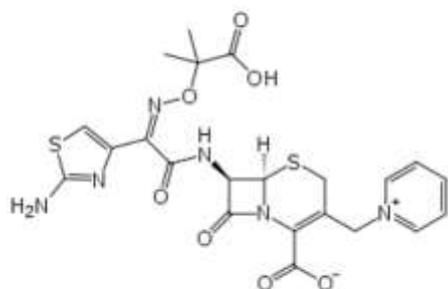


Figura 45: Representación química de la ceftazidima.

Los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste a la ecuación 1 se muestran en la tabla 6. Tal y como se aprecia en la tabla 6, la presencia de ceftazidima en el medio de incubación de la proteína no modifica los parámetros cinéticos de formación de fibras lo que sugiere que este compuesto no presenta capacidad de inhibir la formación de fibras.

Tabla 6: Valores de las constantes t_0 , τ , K y $t_0-2\tau$ obtenidos del ajuste de los datos obtenidas en la figura 44 a la ecuación 1.

	Control (DT6)	Ceftazidima 2mM (DT6)
t_0 (h)	26 ± 3	27 ± 3
τ (h)	$3 \pm 0,4$	$3 \pm 0,6$
k (h ⁻¹)	$0,33 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,04$
$t_0-2\tau$ (h)	20 ± 2	21 ± 3

En resumen, en estos experimentos *in vitro* se ha comprobado que la ceftriaxona podría actuar como un fármaco inhibidor de la formación de fibras en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. Actúa modificando el valor de t_0 con un desplazamiento de la curva, afectando el tiempo que tardaría la proteína a formar las fibras. Por otra parte, la ceftazidima que pertenece a la misma familia de antibióticos β -lactámicos, o el aztreonam no presentan ningún efecto sobre los parámetros de la ecuación 1 ya que los valores obtenidos difieren muy poco de los parámetros obtenidos en ausencia de compuesto β -lactámico.

En base a estos resultados, se puede afirmar que la única presencia de alguno de los grupos funcionales presentes en la ceftriaxona en otros compuestos β -lactámicos no es suficiente para que un compuesto β -lactámico actúe como inhibidor de la formación de fibras. Por otra parte, el grupo aromático presente en la posición 3' en la ceftriaxona difiere notablemente del grupo piridinio que presenta la ceftazidima y podría ser la causa de su nula capacidad inhibidora.

Teniendo en cuenta el número reducido de estructuras químicas estudiadas en este trabajo, se requieren estudios adicionales para esclarecer cuáles son los grupos funcionales que deben presentar los compuestos β -lactámicos para poder presentar capacidad inhibidora de la formación de fibras. Por otra parte, es importante destacar que en este trabajo se ha realizado el estudio a pH ácido para reducir el tiempo de análisis de la formación de fibras por lo que sería interesante realizar estudios posteriores a pH biológico que aporten información adicional para el posible diseño de nuevos inhibidores de la formación de fibras en la a-SIN.

7.-Conclusiones.

En este trabajo se ha llevado a cabo una revisión de las propiedades estructurales de la α -SIN, de su acción biológica, de su relación con la enfermedad de Parkinson, de los factores que controlan la cinética de formación de fibras y de posibles inhibidores. Esta revisión se ha complementado con la producción de la proteína y el estudio de la capacidad inhibidora de tres compuestos con actividad antibiótica. Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido concluir que:

- a. La α -SIN en disolución acuosa carece de estructura secundaria. Sin embargo, en presencia de micelas o vesículas laminares adquiere estructura alfa helicoidal. La versatilidad estructural de esta proteína es necesaria para su actividad biológica, principalmente para el ensamblaje y mantenimiento de vesículas.
- b. Los trabajos consultados sugieren que, aunque la actividad biológica de la α -SIN no está completamente definida, su presencia en los terminales presinápticos sugieren que presenta un papel biológico importante en el mantenimiento de la vesículas sinápticas y en la regulación de la síntesis de la dopamina.
- c. Existen evidencias experimentales que permiten relacionar genética y patológicamente la α -SIN con la enfermedad de Parkinson.
- d. Está aceptado que existen diversos factores externos que aceleran la agregación y posterior formación de fibras de α -SIN.
- e. La presencia de cationes metálicos divalentes o trivalentes, especialmente el cobre y el hierro, pueden afectar a la cinética de formación de fibras por lo que el control de las concentraciones adecuadas de estos metales en el organismo podría inferir sobre la cinética de fibrilación.
- f. Factores genéticos, estrés oxidativo y modificaciones post-traduccionales pueden modificar la formación de fibras, por lo que el conocimiento de estos factores permitirán diseñar nuevas vías de control de formación de fibras y del desarrollo de la enfermedad de Parkinson.
- g. En la bibliografía se ha descrito un amplio espectro de compuestos capaces de inhibir la formación de fibras en la α -SIN lo que permite utilizar una gran variedad de rutas de trabajo para lograr este objetivo.

- h. Del estudio experimental se deduce que en un sistema micelar (SDS), la velocidad de formación de fibras aumenta considerablemente hasta el punto que los posibles inhibidores no ejercen ningún efecto en las condiciones experimentales utilizadas.
- i. En presencia del compuesto β -lactámico ceftriaxona, la formación de fibras en la α -SIN se reduce temporalmente.
- j. Los compuestos aztreonam y ceftazidima no inhiben la formación de fibras a pesar de que estos compuestos comparten algunos de los grupos funcionales presentes en la ceftriaxona.
- k. Se requieren estudios adicionales con un conjunto más amplio de compuestos β -lactámicos para esclarecer cuáles son los grupos funcionales necesarios para que éstos compuestos actúen como inhibidores del proceso de fibrilación proteica.

8. Bibliografía

[Adrover, 2019] Miquel Adrover, Bartomeu Vilanova, Juan Frau, Ana Belen Uceda, Humberto Martinez-Orozco y Laura Mariño Pérez (2019) *Nitration and Glycation Diminish the α -Synuclein Role in the Formation and Scavenging of Cu²⁺-Catalyzed Reactive Oxygen Species*. ACS Chem. Neurosci. 10, 2919-2930.

[Alderson, 2013] Reid Alderson & John L Markley (2013) *Biophysical characterization of synuclein and its controversial structure*, Intrinsicly Disord. Proteins. 1, e26255-1 – e26255-22.

[Álvarez, 2018] Álvarez Paloma (2018) *A-sinucleína como diana en el diseño de fármacos*. Trabajo fin de grado.

[Banerjee, 2017] Siddhartha Banerjee, Mohtadin Hashemi, Zhengjian, Sibaprasad Maity¹, Jean-Christophe Rochet & Yuri L. Lyubchenko (2017) *A novel pathway for amyloids self-assembly in aggregates at nanomolar concentration mediated by the interaction with surfaces*. Sci. Rep. 7, 1-11.

[Betarbet, 2000] Ranjita Betarbet, Todd B. Sherer, Gillian MacKenzie, Monica Garcia-Osuna, Alexander V. Panov and J. Timothy Greenamyre (2000) *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. Nat. Neurosci. 3, 1301-1306.

[Binolfa, 2012] Andrés Binolfa, Liliana Quintanar b, Carlos W. Bertoncini, Christian Griesinger, Claudio O. Fernández (2012) *Bioinorganic chemistry of copper coordination to alpha-synuclein: Relevance to Parkinson's disease*. Coord. Chem. Rev. 256, 2188-2201.

[Breydo, 2012] Leonid Breydo, Jessica W. Wu y Vladimir N. Uversky (2012) *α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease*. Biochim. Biophys. Acta. 1822, 261-285.

[Brown, 2018] James W. P. Brown, Georg Meisl, Tuomas P. J. Knowles, Alexander K. Buell, Christopher M. Dobson y Céline Galvagnion (2018) *Kinetic Barriers to alpha synuclein protofilament formation and conversion into mature fibrils*. Chem. Commun. 54, 7854-7857.

[Buell, 2014] Alexander K. Buell, Céline Galvagniona, Ricardo Gaspar , Emma Sparr , Michele Vendruscolo , Tuomas P. J. Knowlesa , Sara Linse y Christopher M. Dobson (2014) *Solution conditions determine the relative importance of*

nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. PNAS. 111, 7671-7676.

[Burré, 2015] Jacqueline Burre (2015) *The synaptic Function of α -synuclein*. J. Parkinson's Dis. 5, 699-713.

[Caruana, 2011] Maria Caruana, Tobias Högen, Johannes Levin, Andreas Hillmer, Armin Giese y Neville Vassallo (2011) *Inhibition and disaggregation of α -synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds*. FEBS letters 585, 1113-1120.

[Dehay, 2015] Benjamin Dehay, Mathieu Bourdenx, Philippe Gorry, Serge Przedborski, Miquel Vila, Stéphane Hunot, Andrew Singleton, C Warren Olanow, Kalpana M Merchant, Erwan Bezard, Gregory A Petsko, Wassilios G Meissner (2015) *Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's Disease: mechanistic and therapeutic considerations*. Lancet. Neurol. 14, 855-866.

[El-Agnaf, 2006] Omar M. A. El-Agnaf, Sultan A. Salem, Katerina E. Paleologou, Martin D. Curran, Mark J. Gibson, Jennifer A. Court, Michael G. Schlossmacher y David Allsop (2006) *Detection of oligomeric forms of α -synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease*. FASEB J. 20, 419-425.

[Eleonora, 2015] Carboni Eleonora y Lingor Paul (2015) *Insights on the interaction of alpha-synuclein and metals in the pathophysiology of Parkinson's disease*. Metallomics. 7, 395-404.

[Emamzadeh, 2016] Emamzadeh Fatemeh (2016) *Alpha-synuclein structure, functions, and interactions*. J. Res. Med. Sci. 21-29.

[Espejo, 2013] Fernandez Espejo Emilio (2013) *Agregación de Alfa sinucleina y degeneración parkinsoniana*. Fisiología. Boletín Informativo de la SECF.

[Erika, 2013] Guerrero Erika, P. Vasudevaraju (2013) *Recent Advances in Alfa synuclein Functions, advance glycation, and toxicity: implications for Parkinson's Disease*. Mol. Neurobiol. 47, 525-536.

[Ewa, 2014] Ewa A. Mirecka, Hamed Shaykhalishahi, Aziz Gauhar, Serife Akgül, Justin Lecher, Dieter Willbold, Matthias Stoldt, and Wolfgang Hoyer (2014) *Sequestration of a β -hairpin of α -synuclein aggregation*. Angew. Chem. Int. 53, 4227-4230.

[Flores, 2016] Gonzalez Florencia, Socias Sergio, César Ávila, Torres-Bugeau, Leandro Barbosa, Andres Binolfi, Julia Sepúlveda-Díaz, Elaine Del-Bel, Claudio O. Fernandez, Dulce Papy-Garcia, Rosangela Itri, Rita Raisman-Vozari y Rosana Chehín. (2016) *Repurposing doxycycline for sinucleinopathies: remodelling of α -synuclein oligomers towards non-toxic parallel beta-sheet structured species*. Sci. Rep. 7, 1-13.

[Galvagnion, 2016] Céline Galvagnion , James W. P. Brown , Myriam M. Ouberai , Patrick Flagmeier , Michele Vendruscolo , Alexander K. Buell, Emma Sparr y Christopher M. Dobson (2016) *Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of α -synuclein*. PNAS. 113, 7065-7070.

[Galvagnion, 2015] Céline Galvagnion, Alexander K. Buell, Georg Meisl, Thomas C.T. Michaels, Michelle Vendruscolo, Tuomas P.J. Knowles y Christopher M. Dobson.(2015) *Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation*. Nat. Chem. Biol. 11, 229-234.

[George, 2001]: George Julia (2001) *The synucleins*. Genome Biol. 3, 3002.1–3002.6.

[Haiyang, 2017] Haiyang Wang, Chongyang Tang, Zhenfeng Jiang, Xiao Zhou, Jianhang Chen, Meng Na, Hong Shen, Zhiguo Lin (2017) *Glutamine promotes Hsp70 and inhibits α -Synuclein accumulation in pheochromocytoma PC12 cells*. Exp. Ther. Med. 14, 1253-1259.

[Hugo, 2017] Miranda Vicente Hugo, Szegó M. Éva, Luís M.A. Oliveira, Carlo Breda, Ekrem Darendelioglu y Rita M. de Oliveira (2017) *Glycation potentiates α -synuclein-associated neurodegeneration in synucleinopathies*. Brain. 1-21

[Hugo, 2010] Hugo Vicente Miranda y Tiago Fleming Outeiro (2010) *The sour side of neurodegenerative disorders: the effects of protein glycation*. J. Pathol. 221, 13-25.

[Hugo, 2016] Hugo Vicente Miranda, Omar El-Agnaf y Tiago Fleming Outeiro. (2016) *Glycation in Parkinson's disease and Alzheimer's disease*. Movement Disord. 31, 782-790.

[Jie Li, 2004] Jie Li, Min zhu, Sudha Rajamani, Vladimir N. Uversky y Anthony L. Fink (2004) *Rifampicin inhibits α -synuclein fibrillation and disaggregates fibrils*. Chem. Biol. 11, 1513-1521.

[Jin, 2011] Robert Jin, MA; Jian-Ping He, Ronald C. Kessler, Sing Lee, MB, BS, FRCPsych; Nancy A. Sampson, BA; Maria Carmen Viana, Laura Helena Andrade, Chiyi Hu,; Elie G. Karam,; Maria Ladea, Maria Elena Medina-Mora, Yutaka Ono, Jose Posada-Villa,; Rajesh Sagar, J. Elisabeth Wells, Zahari Zarkov (2011). *Prevalence and Correlates of Bipolar Spectrum Disorder in the World Mental Health Survey Initiative*. Arch. Gen. Psychiatry. 68, 241-251.

[Katja, 2011] Pirc Katja, Ulrih Poklar Natasa (2011) *Alpha-Synuclein Interactions with membranes*. University of Ljubljana Biotechnical Faculty 87-110.

[Krishnan, 2003] Sampathkumar Krishnan Eva Y. Chi, Stephen J. Wood, Brent S. Kendrick, Cynthia Li, William Garzon-Rodriguez, Jette Wypych, Theodore W. Randolph, Linda O. Narhi, Anja Leona Biere, Martin Citron y John F. Carpenter. (2003) *Oxidative Dimer Formation Is the Critical Rate-Limiting Step for Parkinson's Disease α -Synuclein Fibrillogenesis*. Biochemistry. 42, 829-837.

[Kurni, 2018] Martin Kurni, Cagla Sahin, Camilla Bertel Andersem y Nikolai Lorenzen (2018) *Potent α -Synuclein Aggregation Inhibitors, Identified by High-Throughput Screening, Mainly Target the Monomeric State*. Cell. Chem. Biol. 25, 1389-1402.

[Mariño, 2020] Laura Mariño Perez. *Effect of glycation on the protein structure, conformation and aggregation tendency*. Tesis doctoral publicada en la UIB en el 2020.

[Martin, 2016] Martin Ingelsson (2016). *Alpha-synuclein oligomers-neurotoxic Molecules in Parkinson's disease and other lewy Body disorders*. Front. Neurosci. 10, 1- 10.

[Malcolm, 2018] Malcolm J. Daniels, J. Brucker Nourse Jr., Hanna Kin, Valerio Sainati y Marco Schiavina (2018) *Cyclized NDGA modifies dynamic α -synuclein monomers preventing aggregation and toxicity*. Sci. Rep. 9, 2937.

[Mcdowall, 2016] J.S. Mcdowall, D.R. Brown (2016) *Alpha-synuclein: relating metal to structure, function and inhibition*. Metallomics. 8, 385-397.

[Miotto, 2014] Miotto MC, Esaú E. Rodriguez, Ariel A. Valiente- Gabioud, y Valentina Torres-Monserrat (2014) *Site-Specific Copper-Catalyzed Oxidation of α -Synuclein: Tightening the Link between Metal Binding and Protein Oxidative Damage in Parkinson's Disease*. Inorg. Chem. 53, 4350-4358.

[Morinaga, 2010] Akiyoshi Morinaga, Kazuhiro Hasegawa, Ryo Nomura y Tadazaku Ookoshi (2010) *Critical role of interfaces and agitation on the nucleation of A β amyloid fibrils at low concentrations of A β monomers*. BBA. 1804, 986-995.

- [Mohsen, 2017] Mahdavimehr Mohsen, Merantan Ali Akbar y Maryam Ghobeh. (2017) *Inhibition of HEWL fibril formation by taxifolin: Mechanism of action*. Plos One. 1-20.
- [Munishkina, 2003] Larissa A. Munishkina, Cassandra Phelan, Vladimir N. Uversky, y Anthony L. Fink (2002) *Conformational behavior and aggregation of alfa sinuclein in Organic solvents: modeling the effects of membranes*. Biochemistry. 42, 2720-2730.
- [Mustafa, 2015] T. Ardah Mustafa, E. Paleologou Katerina, Gouhua Sindhu Menon y Salema Abul Khair (2015) *Ginsenoside RB1 inhibits fibrillation and toxicity of alpha-synuclein and disaggregates preformed fibrils*. Neurobiol. Dis. 74, 89-101.
- [Myöhänen, 2011] TT Myöhänen, MJ Hannula , R Van Elzen , M Gerard , P Van Der Veken , JA García-Horsman , V Baekelandt , PT Männistö and AM Lambeir (2011) *A prolyl oligopeptidase inhibitor, KYP-2047, reduces α -synuclein protein levels and aggregates in celular and animal models of Parkinson´s disease*. Brit. J. Pharmacol. 166, 1097-1113.
- [Natalello, 2011] Natalello Antonio, Federico Benetti, Silvia Maria y Giuseppe Legname (2011) *Compact conformations of alfa sinuclein induced by alcohols and copper*. Proteins. 79, 611-621.
- [Omar, 2004] M.A. Omar, Paleologou Katerina, Brett Greer y Abdulmawala Abogrein (2004) *A strategy for designing inhibitors of α -synuclein aggregation and toxicity as a novel treatment for Parkinson´s disease and related disorders*. FASEB J. 1315-1317.
- [Pasanen, 2014] Petra Pasanen, Liisa Myllykangas, Maija Siitonen y Anna Raunio (2014) *A novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson´s disease-type pathology*. Neurobiol. Aging. 35, 2180.e1-2180.e5.
- [Pirc, 2015] Pirc Katja, Ulrich Poklar Natasa (2015) *Alpha-Synuclein Interactions with membranes*. University of Ljubljana Biotechnical Faculty, 87-110.
- [Pineda, 2019] Pineda André, Burré Jacqueline (2017) *Modulating membrane binding of α -synuclein as a therapeutic strategy*. PNAS. 114, 1223-1225.
- [Plotegher, 2014] Nicoletta Plotegher, Elisa Greggio, Marco Bisaglia y Luigi Bubacco (2014) *Biophysical groundwork as a hinge to unravel the biology of alfa synuclein aggregation and toxicity*. Mol. Physiol. 1-48.

[Pranke, 2011] iwona Pranke, Vincent Morello, Joellë Bigay, Kimberley Gibson y Jean-Marc Verbatz. (2011) *Alpha Synuclein and ALPS motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding*. J. Cell. Biol. 194, 89-103.

[Proukakis, 2013] Christos Proukakis, Christopher G. Dudzik, Timothy Brier y Donna S. Mackay (2013) *A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease*. Neurology. 12, 1062-1064.

[Pujols, 2018] Jordi Pujols, Samuel Peña-Díaz, Diana F. Lázaro , Francesca Peccati, Francisca Pinheiro, Danilo González , Anita Carija, Susanna Navarro, María Conde-Giménez, Jesús García , Salvador Guardiola , Ernest Giralt, Xavier Salvatella, Javier Sancho, Mariona Sodupe, Tiago Fleming Outeiroc, Esther Dalfób, y Salvador Ventura (2018) *Small molecule inhibits α -synuclein aggregation, disrupts amyloid fibrils, and prevents degeneration of dopaminergic neurons*. PNAS. 115, 10841-10486.

[Ramis, 2018] Rafael Ramis, Joaquín Ortega-Castro, Bartolomé Vilanova, Miquel Adrover y Juan Frau (2018) *A Systematic DFT Study of Some Plausible Zn(II) and Al(III) Interaction Sites in N-Terminally Acetylated α -Synuclein*. J. Phys. Chem. 122, 690-699.

[RAO, 2007] Bharathi Rao (2007) *Thermodynamics imprinting reveals differential binding of metals to alpha synuclein: Relevance to Parkinson 's disease*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 359, 115-120.

[Rivera, 2010] Susana Rivera Mancía, Iván Pérez-Neri, Camilo Ríos a Luis Tristán-López, Liliana Rivera-Espinosa y Sergio Montes (2010) *The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases*. Chem-Biol Interact. 186, 184-199.

[Rodriguez-Araujo, 2015] Gerardo Rodriguez-Araujo, Hironori Nakagami y Yoichi Takami (2015) *Low alpha-synuclein levels in the blood are associated with insulin resistance*. Sci. Rep. 5, 12081.

[Ruzza, 2014] Paolo Ruzza, Giuliano Siligardi, Rohanah Hussain y Anna Marchiani (2014) *Ceftriaxone Blocks the Polymerization of α -Synuclein and Exerts Neuroprotective Effects in Vitro*. ACS Chem. Neurosci. 5, 30-38.

[Salahuddin, 2014]. Salahuddin Parveen, Gulam Rabbani y Rizwan Hasan Khan (2014) *The role of advanced glycation end products in various types of neurodegenerative disease: a therapeutic approach*. Cell. Mol. Biol. Lett. 19, 407-437.

- [Santher, 2010]. Santner Aaron y Vladimir N. Uversky (2010) *Metalloproteomics and metal toxicology of α -synuclein*. *Metallomics*. 2, 378-392.
- [Silveira, 2019] Silveira C, J. Mackingley, K. Coleman y Z. Li (2019) *Ambroxol as a novel disease-modifying treatment for Parkinson's disease dementia: protocol for a single-centre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. *BMC Neurology*. 19, 20.
- [Snead, 2014] David Snead y David Eliezer (2014) *Alpha-Synuclein Function and Dysfunction on Cellular Membranes*. *Exp. Neurobiol.* 23, 292-313.
- [Sung, 2007] Yoon-hui Sung y David Eliezer (2007) *Residual structure, backbone dynamics, and interaction within the synuclein family*. *J. Mol. Biol.* 372, 689-707.
- [Theillet, 2016] Theillet Francois-Xavier Theillet, Andres Binolfi, Beata Bekei y Andrea Martorana (2016) *Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells*. *Nature*. 30, 45–50.
- [Timothy, 2017] Collier Timothy, Kinshuk Srivastava, Craig Justman, Tom Grammatopoulos y Birgit Hutter-Paier (2017) *Nortriptyline inhibits aggregation and neurotoxicity of α -synuclein by enhancing reconfiguration of the monomeric form*. *Neurobiol. Dis.* 106, 191-204.
- [Ulmer, 2005] Tobias S. Ulmer, Ad Bax, Nelson B. Cole, y Robert L. Nussbaum (2005) *Structure and Dynamics of Micelle-bound Human α -Synuclein*. *J. Biol. Chem.* 280, 9595-9603.
- [Uversky, 2001a] Vladimir N. Uversky, Jie Li y Anthony L Fink (2001) *Pesticides directly accelerate the rate of α -synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease*. *FEBS Lett.* 500, 105-108.
- [Uversky, 2001b] Vladimir N. Uversky, Jie Li y Anthony L Fink (2001) *Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein*. *J. Biol. Chem.* 276, 44284 - 44296.
- [Uversky, 2009] N. Uversky Vladimir, Eliezer David (2009) *Biophysics of Parkinson's Disease: Structure and Aggregation of α -Synuclein*. *Curr. Protein Pept. Sci.* 10, 483-499.
- [Wang, 2011] Wei Wang, Iva Perovic, Johnathan Chittuluru , Alice Kaganovich , Linh T. T. Nguyen, Jingling Liao, Jared R. Auclair , Derrick Johnson, Anuradha Landeru, Alana K. Simorellis , Shulin Ju, Mark R. Cookson , Francisco J. Asturias , Jeffrey N. Agar , Brian N. Webb , ChulHee Kang , Dagmar Ringe, Gregory A.

Petsko, Thomas C. Pochapsky y Quyen Q. Hoang (2011) *A soluble α -synuclein constructs forms a dynamic tetramer*. PNAS. 108, 17797-17802.

[Waxman, 2009] Elisa Waxman y Benoit Giasson (2009) *Molecular mechanisms of α -synuclein neurodegeneration*. Biochim. Biophys. 1792, 616-624.

[Ximenis, 2017] Marta Ximenis, Emilio Bustero, Andrés G. Algarra, Manel Vega, Carmen Rotger, Manuel G. Basallote, Antonio Costa (2017) *Kinetic Analysis and Mechanism of the Hydrolytic Degradation of Squaramides and Squaramic Acids*. J. Org. Chem. 82, 2160-2170.

[Xu, 2016] Lingjia Xu y Jiali Pu (2016) *Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application*. J. Biol. Chem. 291, 4374-4385.

[Zarranz, 2004] Juan J. Zarranz, Javier Alegre, Juan Gómez-Esteban y Elena Lezcano (2004) *The New Mutation, E46K, of alpha-Synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia*. Ann. Neurol. 55, 164-173.