

Mecanismos de Neurotoxicidad en la Enfermedad de Parkinson

Dra. Rommy von Bernhardt M.
Departamento Neurología
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile.

La Enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo del movimiento. Una de sus características más llamativa es la degeneración de las neuronas productoras de dopamina en el mesencéfalo. Se han propuesto variadas etiologías para la Enfermedad de Parkinson, las que van desde las mutaciones genéticas hasta la exposición a toxinas ambientales. Mutaciones que conducen a la falla del sistema ubiquitina-proteasoma se han identificado en pacientes con Parkinson familiar. Las mutaciones genéticas en la α -sinucleína (o de otras proteínas asociadas a la función del proteasoma, como la *parkina*), resultan en la acumulación de ella, produciendo una “ganancia de función tóxica”. A pesar que estas mutaciones no se observan en la forma esporádica de la enfermedad, la alteración de la función proteasomal también podría contribuir a la neurodegeneración, permitiendo la acumulación de proteínas mal plegadas. De hecho, se ha mostrado que una elevación de la proteína α -sinucleína silvestre es suficiente para desarrollar la patología. Durante estos últimos años, la investigación ha dado luces sobre los mecanismos biológicos adicionales que podrían subyacer a la degeneración de estas células, además que α -si nucleína ha sido identificada como el componente principal de los cuerpos de Lewy, la característica neuropatológica definitoria del Parkinson. Otra hipótesis es que la captura defectuosa de la dopamina hacia las vesículas de neurotransmisores aumenta la presencia de dopamina libre en el citoplasma, induciendo la agregación de la α -si nucleína como protofibrillas,

conduciendo con ello hacia la inflamación y la generación de especies reactivas de oxígeno. Todos ellos constituyen mecanismos potenciales de daño celular.

Palabras clave: α -sinucleína, cuerpos de Lewy, demencia, dopamina, enfermedades neurodegenerativas, estrés oxidativo, proteasoma, ubiquitina.

Abstract

Parkinson's disease is a neurodegenerative movement disorder. One of its striking features is the degeneration of dopamine-producing neurons in the midbrain. Several etiologies have been proposed for Parkinson's disease, ranging from genetic mutations to environmental toxins. Mutations leading to failure of the ubiquitin-proteasome system have been identified in patients with familial Parkinson. The genetic mutations in α -synuclein (or other proteins associated to the proteasome, such as *parkin*), results in the accumulation of this protein, causing toxic gain of function. Although those mutations are not observed in the sporadic form of the disease, the impairment of the proteasomal function could also contribute to neurodegeneration, allowing the accumulation of misfolded proteins. In fact, it has been shown that an elevation in wild-type α -synuclein protein is enough to develop the disorder. During the last few years, research have shed light on additional biological mechanisms that underlie the degeneration of these cells, and α -synuclein has been identified as the main component of Lewy bodies, the defining neuropathological characteristic of Parkinson. Another hypothesis is that the defective uptake of dopamine into the neurotransmitter vesicles increases the presence of free dopamine in the cytoplasm, inducing aggregation of α -synuclein protofibrils, leading to inflammation and the generation of reactive oxygen species. All the mechanisms mentioned constitute potential mechanisms for cell damage.

Key words: α -synuclein, dementia, dopamine, Lewy body, neurodegenerative diseases, oxidative stress, proteasome, ubiquitin.

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo progresivo caracterizado por síntomas motores severos. La anatomía patológica revela una pérdida pronunciada de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra, que resulta en la depleción de dopamina en el Estriado, la estructura que recibe las proyecciones de dichas neuronas (1). Otros sistemas neuronales, incluyendo algunos núcleos catecolaminérgicos, también son afectados en la EP, pero con menor severidad.

Existe evidencia que las alteraciones en el plegamiento (estructura tridimensional) y la agregación proteica constituye una causa probable para varias enfermedades neurológicas. La característica esencial de estas patologías por alteración conformacional es la existencia de una proteína determinada, la cual al plegarse, adquiere una conformación alternativa estable, y en la mayoría de los casos, resulta en su agregación y acumulación en tejidos como depósitos fibrilares (2).

I. Fisiopatología General de la Enfermedad de Parkinson:

Los síntomas clásicos de la EP (bradicinesia, temblor de reposo, rigidez en rueda dentada e inestabilidad postural) sólo se manifiestan cuando se ha perdido el 70-90% de las neuronas dopaminérgicas en la pars compacta de la sustancia nigra (SNc) (3). Si bien el daño de la SNc es lo característico de la EP, además se observa patología extranigral extensa, indicando que otras poblaciones celulares también son susceptibles a la neurodegeneración.

La presencia de cuerpos de Lewy y neuritas distróficas se asocian a la neurodegeneración y constituyen una marca patológica de la EP. Los cuerpos de Lewy consisten en inclusiones redondeadas eosinófilas que contienen un centro de α -

sinucleína agregada, junto a otras proteínas y un área de fibras radiadas. El patrón de distribución de estas estructuras se correlaciona con la severidad de la neurodegeneración. Sin embargo, no todas las formas de EP contienen cuerpos de Lewy; como se menciona más adelante, mutaciones que afectan a otras proteínas, como parkin, en general no los presentan.

Si bien sólo el 10% de los pacientes tiene una EP familiar, con un componente genético definido (en contraste al 90% con una EP esporádica), estos pacientes han permitido estudiar los factores de riesgo específicos asociados a la enfermedad. Mutaciones en 3 genes, *α-sinucleína*, *parkin* (una ligasa de ubiquitina E3 que participa en la degradación de múltiples compuestos) (4,5), y *DJ-1* (su papel no está claramente definido, pero sería compensatorio durante eventos oxidativos) se asocian a EP de inicio temprano, y mutaciones en *UCH-L1* (Ubiquitina hidrolasa carboxi-terminal L1, con actividad beneficiosa como hidrolasa, pero que también tendría una actividad ligasa potencialmente dañina) (6), se asocia a EP (3). De las proteínas mencionadas, la *α-Sinucleína*, parece ser la responsable más directa de la Enfermedad de Parkinson (EP). Mutaciones en la *α-Sinucleína* producen la acumulación aberrante de la proteína, determinando una “ganancia función” tóxica que lleva al desarrollo del Parkinson. Más aún, el estudio de familias con una EP autosómica dominante mostró que una elevación de la proteína *α-Sinucleína* “silvestre” normal es suficiente para que se desarrolle la EP (7). En los pacientes sin una herencia genética clara, los mecanismos patogénicos han sido más difíciles de entender, y una serie de factores, incluyendo toxinas ambientales, estrés oxidativo, y disfunción mitocondrial, han sido propuestos (8).

II. Mecanismos biológicos de la neurodegeneración por α -sinucleína:

La α -sinucleína fue descubierta en 1997. Modelos mutantes transgénicos de α -sinucleína han sido muy útiles para entender su papel en la EP (9). Los efectos deletéreos de la expresión de α -sinucleína mutante parecen depender de la ganancia funcional de la proteína; mientras que la pérdida de α -sinucleína parece tener efectos mínimos sobre el desarrollo. Como ya se mencionó, basta con que exista una sobreexpresión de α -sinucleína normal para que se produzca la EP (7). Una implicancia importante de esta observación es que el metabolismo aberrante de la α -sinucleína silvestre podría ser la causa de la pérdida de las células dopaminérgicas en los pacientes que tienen la forma no-familiar de la EP. Sin embargo, aunque la idea es atractiva, se debe ser cauteloso, ya que en los pacientes estudiados (7), la duplicación de la región que contenía α -sinucleína, incluía además aproximadamente 17 genes adicionales (los que también podrían participar en la patogenia de la EP).

Estudios en modelos experimentales y en el tejido cerebral de pacientes con EP sugieren que la polimerización anormal de la α -sinucleína formando filamentos, y posteriormente agregados, pueden alterar la función de las neuronas, los astrocitos y los oligodendrocitos (10). Además, estas inclusiones, especialmente si son de gran tamaño, potencialmente pueden alterar en forma directa el tráfico intracelular u otras funciones, favoreciendo la muerte celular por otros tipos de estrés (Fig. 1).

En modelos experimentales de EP, la sobre expresión de α -sinucleína puede matar en forma selectiva a neuronas dopaminérgicas. Estudios posteriores usando transfección viral de α -sinucleína y algunas de sus variantes mutantes han mostrado que las neuronas dopaminérgicas son considerablemente más vulnerables que las neuronas no dopaminérgicas en la sustancia nigra (11). La selectividad de la toxicidad para las

neuronas dopaminérgicas ha recibido diversas explicaciones (Fig. 1). Varios grupos plantean que los oligómeros y protofibrillas de α -sinucleína son un componente importante de la toxicidad de la EP. Se ha mostrado que la forma protofibrilar de la α -sinucleína podría permeabilizar las vesículas membranosas de manera transitoria, alterando la homeostasis intracelular (por ejemplo, del calcio), predisponiendo a las células a sufrir apoptosis (12). Además se ha visto que la toxicidad de α -sinucleína aumenta por la generación de radicales de oxígeno en presencia de dopamina (13), y que la dopamina, *in vitro*, puede formar aductos con α -sinucleína (14). La inhibición farmacológica de la producción de dopamina (inhibidor de tirosina hidroxilasa), es capaz de eliminar la apoptosis inducida por α -sinucleína.

III. La disfunción del proteasoma en la Enfermedad de Parkinson:

En la EP, los cuerpos de Lewy ricos en α -sinucleína son, casi con certeza, el resultado de la remoción ineficiente de la α -sinucleína. La formación de cuerpos de Lewy, dependería del balance entre la tendencia de α -sinucleína de agregarse en forma espontánea y la habilidad de las células de eliminar la proteína antes que llegue a su concentración crítica (15). Se debe tener en consideración que los cuerpos de Lewy pueden representar una respuesta defensiva del organismo, cuyo objetivo es evitar la citotoxicidad inherente a los compuestos que se acumulan en ellos.

Aunque la conexión entre agregados de proteína mal plegada y el daño neuronal aún es incompleta, hay evidencia, tanto en EP como también en otras patologías neurodegenerativas, que la alteración en la remoción de proteínas dañadas es parte del proceso patológico. En condiciones fisiológicas, las proteínas celulares son destinadas a su destrucción a través de 2 sistemas, mediante proteínas chaperonas del tipo de shock térmico (Heat-shock - Hsps), o por la vía ubiquitina-proteasoma. Estos 2 sistemas

aseguran que proteínas mal plegadas sean rápidamente eliminadas. La unión de los Hsps destina las proteínas a ser degradadas tanto por la vía lisosomal como la vía proteasomal, mientras que la ubiquitina representa la vía proteasomal principal. La ubiquitinación (Fig. 1) es un proceso altamente ordenado en el cual se unen moléculas de ubiquitina a los residuos lisina de una proteína, a través de un proceso enzimático de 3 etapas (E1-E3). Las proteínas así marcadas son degradadas por el proteasoma. Existen evidencias que en pacientes con EP, la actividad proteasomal está reducida en la SNc (16), y también que la α -sinucleína inhibe la actividad proteasomal de manera dependiente-de-concentración (10).

Se propone que un sistema ubiquitina-proteasoma alterado puede sensibilizar poblaciones celulares específicas al estrés exógeno, predisponiendo estas células a la muerte celular. Estudios realizados en células con alteraciones del plegamiento de proteínas sugieren que la desregulación a nivel del retículo endoplásmico, un efecto que se ha denominado “respuesta de proteína no plegada” sería la ruta “río abajo” responsable de la muerte celular (17). Una función reducida del proteasoma puede afectar muchas funciones celulares que normalmente dependen en la degradación proteica adecuada. También, como se mencionó previamente, la reducción de la remoción de la α -sinucleína protofibrilar puede ser directamente tóxica, y por último, como se discutirá a continuación, se podría alterar la homeostasis de la dopamina y aumentar el estrés oxidativo. Este tercer mecanismo es especialmente atractivo, y de hecho, la inhibición experimental del proteasoma afecta especialmente neuronas dopaminérgicas, en comparación a neuronas GABA-érgicas (18).

IV. Inflamación y estrés oxidativo en la Enfermedad de Parkinson:

Uno de los aspectos más sorprendentes de las enfermedades neurodegenerativas (incluyendo la EP) es la vulnerabilidad selectiva de la población neuronal dañada. Así, aunque la α -sinucleína por ejemplo, se expresa en regiones extensas del sistema nervioso central, la neurodegeneración se restringe principalmente a la sustancia nigra.

Las neuronas dopaminérgicas están particularmente expuestas a estrés oxidativo debido a que el metabolismo de la dopamina origina una serie de moléculas que son potencialmente tóxicas si no son eliminadas adecuadamente. La dopamina se comporta como un compuesto generador de radicales libres; puede auto-oxidarse a pH fisiológico formando especies dopamina-quinonas tóxicas, radicales súper óxido y peróxido de hidrógeno (19). También puede ser deaminada enzimáticamente por la Mono Amino Oxidasa (MAO) en el metabolito no tóxico ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y peróxido de hidrógeno (20), y por otros procesos oxidativos. Así, el metabolismo de la dopamina genera grandes concentraciones de ROS, los que pueden activar las cascadas apoptóticas e inducir muerte neuronal (4). La acumulación de ROS es tóxica *per se* (21), y genera estrés oxidativo como consecuencia de la depleción de antioxidantes celulares (Ej. vitamina E y glutatión reducido), lo que aumenta la peroxidación lipídica de la membrana, el daño del DNA, y la oxidación con alteración del plegamiento proteico (22). Además del daño oxidativo general, hay evidencias que la interacción entre α -sinucleína y metabolitos de dopamina determina la neurodegeneración preferencial de neuronas dopaminérgicas.

Junto a toda una serie de alteraciones posibles, los agregados proteicos anormales también podrían actuar como irritantes, produciendo una reacción inflamatoria crónica capaz de inducir cambios sinápticos y muerte neuronal (23). De hecho, los hallazgos

que sugieren la existencia de un proceso de inflamación crónica incluyen la existencia de astrocitosis y activación microglial en el cerebro de estos pacientes, en especial en las cercanías de los agregados proteicos. En la EP, junto a los varios mecanismos tóxicos y genéticos que pueden producir daño neuronal, los compuestos liberados por neuronas dañadas puede inducir la liberación de factores microgliales neurotóxicos, agravando la neurodegeneración (24). Entre los compuestos liberados se encuentra la neuromelanina, la cual es un quelante fuerte del hierro. El complejo neuromelanina-hierro activa la microglía *in vitro*, produciendo la liberación de compuestos neurotóxicos tales como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), Interleuquina-6 (IL-6) y óxido nítrico (NO).

Se ha descrito un incremento de la concentración de hierro total en la sustancia nigra en casos de EP severos, aunque el mecanismo subyacente no es conocido (25). El hierro también contribuye al incremento de la generación de radicales de oxígeno (ROS), aumentando el estrés oxidativo y la agregación proteica, incluyendo la agregación de α -sinucleína. La agregación acelerada de α -sinucleína a su vez puede inducir la formación de más ROS (26, 27). Por último, la dopamina estabiliza la forma protofibrilar de la α -sinucleína, la cuál sería tóxica. De esta manera, en el ambiente oxidativo de una neurona dopaminérgica, α -sinucleína participa en la generación de un círculo vicioso que lleva a la muerte neuronal (27).

V. Recapitulación:

La acumulación intracelular anormal de α -sinucleína podría ser un elemento causal común para la EP familiar y esporádica. Es posible que gatillantes de diversas etiologías generen una cascada de eventos que lleve al mal-plegamiento o pérdida de función normal de α -sinucleína, y que en neuronas dopaminérgicas, afecte el metabolismo de la

dopamina, aunque la falta de información respecto a la conexión entre la α -sinucleína y el daño neuronal no permite entender cabalmente la vulnerabilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas. Una posibilidad podría estar dada por la participación de la dopamina en la formación de protofibrillas y en la generación de estrés oxidativo. Sin embargo, para la EP esporádica, es posible que sea varias las alteraciones responsables, cuyos efectos son relativamente moderados cuando están solas, pero que tienen efectos devastadores cuando actúan juntas. La exploración de factores capaces de modificar la actividad proteosomal es un área interesante para entender la relación entre agregación proteica y enfermedades neurodegenerativas, y tienen además la potencialidad de permitir el desarrollo de agentes terapéuticos capaces de prevenir o enlentecer la progresión de la EP y otras patologías neurodegenerativas.

Referencias:

1. Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis Of Parkinson's Disease: Dopamine, Vesicles And α -Synuclein. *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3: 932-942.
2. Soto C. Unfolding the Role Of Protein Misfolding in Neurodegenerative Diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4: 49-60.
3. Dawson Tm, Dawson Vl. Rare Genetic Mutations Shed Light on the Pathogenesis of Parkinson Disease. *J Clin Invest.* 2003; 111: 145-151.
4. Mouradian Mm. Recent Advances in the Genetics and Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Neurology* 2002; 58: 179-185.
5. Shimura H, Schlossmacher Mg, Hattori N, Frosch Mp, Trockenbacher A, Schneider R, Et Al. Ubiquitination of a New Form of α -Synuclein by Parkin From Human Brain: Implications for Parkinson's Disease. *Science* 2001; 293: 263-269.
6. Liu Y, Fallon L, Lashuel Ha, Liu Z, Lansbury Pt Jr. The Uchl-1 Gene Encodes Two Opposing Enzymatic Activities that Affect α -Synuclein Degradation and Parkinson's Disease Susceptibility. *Cell* 2002; 111: 209-218.
7. Singleton A, Farrer M, Johnson J, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Et Al. Alpha-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science.* 2003; 302: 841.
8. Sherer Tb, Betarbet R, Greenamyre Jt. Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Curr Opin Investig Drugs.* 2001; 2: 657-662.
9. Maries E, Dass B, Collier Tj, Kordower Jh, Steece-Collier K. the Role of α -Synuclein In Parkinson's Disease: Insights from Animal Models. *Nat Rev Neurosci.* 2003 ; 4 : 727-738.
10. Giasson Bi, Lee Vm. are Ubiquitination Pathways Central to Parkinson's Disease? *Cell* 2003; 114: 1-8.
11. Kirk D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen Te, Mucyczka N, et al. Parkinson-Like Neurodegeneration Induced by Targeted Over Expression of α -Synuclein in the Nigrostriatal System. *J Neurosci* 2002; 22: 2780-2791.
12. Volles Mj, Lansbury Pt Jr. Zeroing in on the Pathogenic Form of Alpha-Synuclein and its Mechanism of Neurotoxicity in Parkinson's Disease. *Biochemistry* 2003; 42: 7871-7878.
13. Xu J, Kao Sy, Lee Fj, Song W, Jin Lw, Yankner Ba. Dopamine-Dependent Neurotoxicity Of α -Synuclein: A Mechanism for Selective Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Nat Med.* 2002; 8: 600-606.
14. Conway Ka, Rochet Jc, Bieganski Rm, Lansbury Pt Jr. Kinetic Stabilization of the α -Synuclein Protofibril by a Dopamine- α -Synuclein Abduct. *Science* 2001; 294: 1346-1349.
15. Conway Ka, Lee Sj, Rochet Jc, Ding Tt, Williamson Re, Landsbury Pt Jr. Acceleration of Oligomerization, Not Fibrillization, Is a Shared Property of Both α -Synuclein Mutations Linked to Early-Onset Parkinson's Disease: Implications for Pathogenesis and Therapy. *Proc Natl Acad Sci Usa* 2000; 97: 571-576.
16. Mcnaught Ks, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow Cw. Altered Proteasomal Function in Sporadic Parkinson's Disease. *Exp Neurol* 2003; 179: 38-46.
17. Forman Ms, Lee Vm, Trojanowsky Jq. "Unfolding" Pathways in Neurodegenerative Disease. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 407-410.

18. Mcnaught Ks, Mytilineou C, Jnobaptiste R, Yabut J, Shashidharan P, Jennert P, et al. Impairment Of The Ubiquitin-Proteasome System Causes Dopaminergic Cell Death and Inclusion Body Formation in Ventral Mesencephalic Cultures. *J Neurochem.* 2002; 81: 301-306.
19. Graham Dg. Oxidative Pathways For Catecholamines in the Genesis of Neuromelanin and Cytotoxic Quinones. *Mol Pharmacol.* 1978; 14: 633-643.
20. Maker Hs, Weiss C, Silides Dj, Cohen G. Coupling of Dopamine Oxidation (Monoamine Oxidase Activity) to Glutathione Oxidation Via the Generation of Hydrogen Peroxide in Rat Brain Homogenates. *J Neurochem.* 1981; 36: 589-593.
21. Bamham Kj, Masters Cl, Bush Ai. Neurodegenerative Diseases and Oxidative Stress. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3: 205-214.
22. Floor E, Wetzel Mg. Increased Protein Oxidation in Human Substantia Nigra Pars Compacta in Comparison With Basal Ganglia and Prefrontal Cortex Measured With an Improved Dinitrophenylhydrazine Assay. *J Neurochem.* 1998; 70: 268-275.
23. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in Neurodegenerative Disease – A Double-Edged Sword. *Neuron* 2002; 35: 419-432.
24. Wilms H, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Zecca L, Lucius R. Activation of Microglia By Human Neuromelanin Is Nf-Kb Dependent And Involves P38 Mitogen-Activated Protein Kinase: Implications for Parkinson's Disease. *Faseb J.* 2003; 17: 500-502 (2003).
25. Zecca L, Youdim Mbh, Rieder P, Connor Jr, Crichton Rr. Iron, Brain Ageing and Neurodegenerative Disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5 : 863-873.
26. Junn E, Mouradian Mm. Human α -Synuclein Over Expression Increases Intracellular Reactive Oxygen Species Levels and Susceptibility to Dopamine. *Neurosci Lett.* 2002 ; 320 : 146-150.
27. Tabner Bj, Turnbull S, El-Agnaf Om, Alisop D. Formation Of Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radicals from A(β) And α -Synuclein as a Possible Mechanism of Cell Death In Alzheimer's Disease And Parkinson's Disease. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32: 1076-1083.

Figura 1: Mecanismos de neurodegeneración en la Enfermedad de Parkinson.

Mutaciones en la α -sinucleína, su duplicación, o alteraciones indirectas sobre su manejo, determinan la acumulación intracelular de α -sinucleína, determinando su oligomerización espontánea. La α -sinucleína mutante, protofibrillas y agregados proteicos intracelulares pueden alterar la función del proteosoma. La incapacidad de eliminar adecuadamente la α -sinucleína determinaría la aparición de los cuerpos de Lewy. Otras mutaciones, que incluyen a parkin y UCH-L1, y que afectan a algunos pacientes con EP, también se asocian a alteraciones del proteosoma. La dopamina participa en la generación de radicales de oxígeno y también puede formar aductos estables con la protofibrillas, aumentando su toxicidad. En combinación a otros elementos de estrés celular, estos mecanismos llevan a la muerte celular.

