

## **INTRODUCCIÓ**

## **1. LA FAMÍLIA DE LES SINUCLEÏNES**

Les sinucleïnes pertanyen a una família de proteïnes solubles estretament relacionades que deriven de tres gens diferents, descrits només en vertebrats. Estructuralment es caracteritzen per un extrem carboxil terminal acídic i per 5 o 6 motius repetits (KTKEGV) distribuïts per l'extrem amino terminal (Giasson i col., 2000; Clayton i George, 1999; Hashimoto i Mashliah 1999; Goedert, 1999; Trojanowski i col., 1998; Clayton i George, 1998).

Actualment es coneixen 4 membres de la família de les sinucleïnes la constitució aminoacídica de les quals va de 127 a 140.

La primera sinucleïna es va descriure al 1988, després de ser purificada de les electroplaques del peix Torpedo, així com de cervell de rata (Maroteaux i col., 1988) i es coneix amb el nom **d'α-sinucleïna** (Giasson i col., 2000; Clayton i George, 1999; Hashimoto i Mashliah, 1999; Goedert, 1999; Trojanowski i col., 1998; Clayton i George, 1998; Ueda i col., 1993). Més tard, però, i posterior a l'aïllament del pèptid NAC (Non Amyloid Component o component no amiloide) de les plaques senils riques en amiloide en pacients d'Alzheimer, també es va anomenar component no amiloide (NAC) de la proteïna precursora de les plaques. L'α-sinucleïna i el pèptid NAC són idèntics del residu 61 al 95 (Giasson i col., 2000; Clayton i George, 1999; Hashimoto i Mashliah, 1999; Goedert, 1999; Clayton i George, 1998; Ueda i col., 1993). El gen de l'α-sinucleïna es va mapejar al cromosoma 4q21.3-q22 (Giasson i col., 2000; Clayton i George, 1999; Spillantini i col., 1995).

El segon membre de la família de les sinucleïnes, la que actualment es coneix com la **β-sinucleïna**, és altament homòloga a la forma α. Originàriament es va aïllar de cervell boví i es va anomenar fosfoneuroproteïna-14 degut als seu pes molecular de 14 kilodaltons (Giasson i col., 2000; Clayton i George, 1999; Hashimoto i col., 1999; Goedert, 1999; Trojanowski i col., 1998; Clayton i George, 1998; Tobe i col., 1992). El gen de la β-sinucleïna es va mapejar al cromosoma 5q35 (Giasson i col., 2000; Clayton i George, 1999; Clayton i George, 1998).

Tan la forma β com la forma α es troben localitzades sobretot a la terminal presinàptica, a més trobar-se al citosol; la forma α és ubíqua, mentre que la forma β és especialment abundant en telencèfal (Shibayama-Imazu i col., 1993; George i col., 1995; Buchman i col., 1998a; Iwui i col., 1995a; Irizarri i col., 1996; Giasson i col., 2000; Clayton i George, 1999; Clayton i George, 1998).

A part del teixit neural que constitueix el lloc predominant de les sinucleïnes, aquestes també s'han caracteritzat en altres teixits, com són les plaquetes en el cas de l' $\alpha$ -sinucleïna (Hashimoto i col., 1997) i les cèl·lules de Sertoli per la  $\beta$ -sinucleïna (Shibayama-Imazu i col., 1998).

El tercer membre de la família de les sinucleïnes, donat que es va aïllar d'un teixit de càncer de mama, va anomenar-se producte gen-específic del càncer de mama (Giasson i col., 2000; Clayton i George, 1999; Clayton i George, 1998; Ji i col., 1997; Lavedan i col., 1998). Actualment s'anomena  $\gamma$ -sinucleïna i, tot i que predomina en el sistema nerviós perifèric, també es troba en els ganglis sensorials del cervell i medulla espinal (Buchman i col., 1998a,b). Contràriament a les formes  $\alpha$ - i  $\beta$ -sinucleïna la seva localització és bàsicament citosòlica. S'ha mapejat al cromosoma 10q23 (Giasson i col., 2000; Clayton i George, 1999; Ji, 1997; Lavedan i col. 1998). A part del teixit derivat de càncer de mama i del teixit neural, també podem trobar la forma  $\gamma$  en l'epidermis (Ninkina i col., 1999).

L'últim membre de la família de les sinucleïnes i també el més desconegut, és la sinoretina, distribuïda igualment per tot el citoplasma, amb un augment d'expressió a la retina. En cervell s'expressa molt poc (Giasson i col., 2000; Surguchov i col., 1999).

Mentre que l' $\alpha$ -sinucleïna està íntimament relacionada amb els mecanismes implicats de malalties neurodegeneratives, no succeeix el mateix amb les formes beta i gamma sinucleïnes. Un resum de la família de les sinucleïnes és el que es pot observar a la taula 1.

<i>Isoforma de sinucleïna<sup>a</sup></i>	<i>Gen Humà<sup>b</sup></i>	<i>Altres noms<sup>c</sup></i>	<i>Referències<sup>d</sup></i>
Alfa	SNCA, 4q21.3-q22	NACP (humà) Sinlefina (canari)	Maroteaux i col., 1988; Ueda i col., 1993; George i col., 1995; Polymeropoulos et al., 1997
Beta	SNCB, 5q35	PNP-14	Nakajo et al., 1990; Jakes et al., 1994
Gamma	SNCG, 10q23.2-q23.3	BCSG-1, persina	Akopian and Wood, 1995; Ji et al., 1997; Lavedanet al., 1998; Ninkina et al., 1998
Sinoretina	?	δ-sinucleïna	Surguchov A et al, 1999

**Taula 1. Nomenclatura dels gens de la sinucleïna i proteïnes**

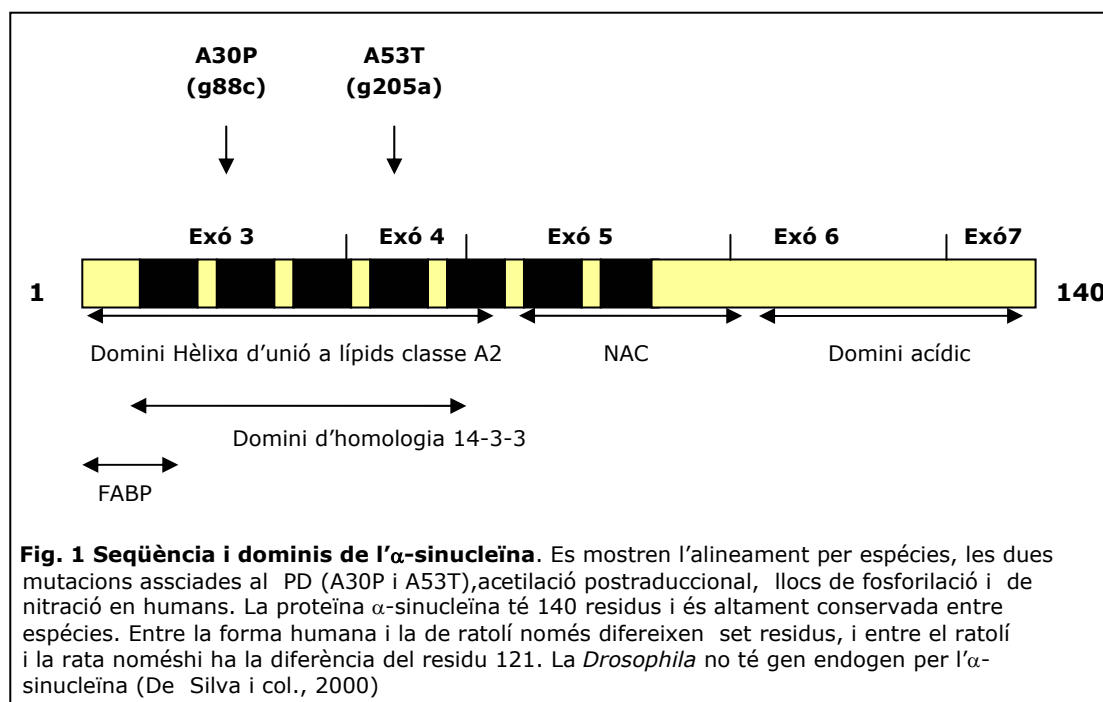
S'han identificat tres gens en vertebrats que produeixen sinucleïnes estretament relacionades, les quals posteriorment s'han anomenat alfa, beta i gamma sinucleïna.

**b** Nom i localització cromosòmica donada per la base de dades OMIM (Online Mendelian Inheritance). **c** Tal com s'han anomenat a la literatura abans de convergir en el nom de sinucleïnes. **d** Primeres citacions a través d'identificacions diferents dels gens i de les proteïnes de la sinucleïna (de Silva i col., 2000).

## **2. L'α-SINUCLEÏNA**

### **2.1 Estructura de la sinucleïna**

Un bon punt d'inici per estudiar la funció de la sinucleïna és considerar la seva estructura, la qual és molt distintiva, ordenada i molt conservada dins dels vertebrats (Clayton i George, 1998). Totes tres isoformes de sinucleïna comparteixen el mateix disseny modular (Fig.1). Els primers dos terços de la seqüència (90 residus) estan organitzats al voltant d'un motiu amfipàtic, que es repeteix cada 11 residus. La resta de domini C-terminal està ordenat de manera menys òbvia però generalment és acídica, amb preponderància pels residus de glutamat. La cisteïna i el triptòfan són dos residus oxidables que es troben conspícuament absents a totes les sinucleïnes .



Aquest esquema de seqüència és similar per les tres isoformes de sinucleïna i les diferències que existeixen entre elles són bastant subtils. La seqüència de l'isoforma gamma divergeix sobretot en la cua acídica, que és una mica més curta (30 vs 40-43 residus) i perd la cua de tirosines de la part terminal característica de les isoformes alfa i beta.

Quan es dissol l'α-sinucleïna recombinant en medi aquós i s'analitza per diàscopia circular, les cadenes individuals no adopten una estructura secundària uniforme o consistent, sinó que, més aviat queden de forma "nativament desplegada" (Weinreb i col., 1996). En presència de fosfolípids acídics, però, les cadenes s'estabilitzen en una conformació que majoritàriament és d'hèlix alfa (Davidson i col., 1998). La formació d'una hèlix alfa dependent de fosfolípids es va predir en base a la periodicitat típica dels 11 residus de la seqüència i a la organització amfipàtica de residus específics (George i col., 1995). Concretament l'estructura secundària ve definida per 2 cadenes d'hèlix alfa interrompudes per un petit bucle (Chandra i col., 2003). A més d'aquests dominis N-terminals d'hèlix alfa (residus 1-67), l'α-sinucleïna té una part hidrofòbica central (residus 61-95), i una regió C-terminal (residus 96-140) rica en prolina i en residus acídics glutamat i aspartat. El domini hèlix alfa N-terminal inclou un hexàmer molt conservat en totes les espècies (KTKEGV) que dona a l'α-sinucleïna els trets estructurals amfipàtics de les apolipoproteïnes classe A2, les quals per poder actuar com a portadors de lípids extracel·lulars, interaccionen de forma reversible amb mol·lècules lipídiques

(Segrest i col., 1992). En l' $\alpha$ -sinucleïna aquest domini seria el responsable de donar-li una conformació helicoidal estable per la unió d'aquesta amb miscel·les lipídiques (Weinreb i col., 1996; Davidson i col., 1998), igual com de la unió dèbil de la sinucleïna amb les vesícules sinàptiques (Jensen i col., 1998) i també de la capacitat que té l' $\alpha$ -sinucleïna de desfer bicapes lipídiques (Jo i col., 2000). Contràriament a les apolipoproteïnes, però, la seqüència de les sinucleïnes està molt més conservada en totes les espècies, suggerint-se una funció molt més transcendental que la de unir lípids de forma reversible.

La part central de l' $\alpha$ -sinucleïna (residus 61-95) es coneix com el component no-A $\beta$  de les plaques (NACP) (Ueda i col., 1993). Comprèn la part altament amiloidogènica de la molècula (Ueda i col., 1993; Han i col., 1995) responsable de l'habilitat que té l' $\alpha$ -sinucleïna per **(a)** canviar de conformació desestructurada a full  $\beta$  (Serpell i col., 2000; El-Agnaf i Irvine, 2000), **(b)** per formar fulls  $\beta$  cilíndrics (Perutz i col., 2002) i **(c)** per formar protofibril·les semblants a l'A $\beta$  i fibril·les (Harper i col., 1997a,b; Walsh i col., 1997,1999; Conway i col., 1998; Hashimoto i col., 1998; El-Agnaf i col., 1998; Giasson i col., 1999,2001; Harper i col., 1999; Narhi i col., 1999; Conway i col., 2000b; el-Agnaf i Irvine, 2000,2002; Ding i col., 2002). Aquests trets distingeixen l' $\alpha$ -sinucleïna de la forma  $\beta$  i  $\gamma$  les quals són incapaces de copolimeritzar (Biere i col., 2000).

L'extrem C-terminal sembla ser crític per l'activitat chaperona de l' $\alpha$ -sinucleïna (Kim i col., 2000; Souza i col., 2000a; Park i col., 2002a).

Per espectroscòpia NMR de l' $\alpha$ -sinucleïna en solució s'ha demostrat que l'extrem C-terminal roman lliure i desplegat i no s'associa amb vesícules o miscel·les (Eliezer i col., 2001). A més, és una de les 2 regions de l' $\alpha$ -sinucleïna (residus 2-19 i 123-140) que presenta semblança amb les FABPs citosòliques (*Fatty Acid Binding Protein* o proteïnes d'unió a àcids grassos). Aquest fet ha portat a classificar l' $\alpha$ -sinucleïna com a una nova FBAP (Sharon i col., 2001), paper que es reafirma demostrant la interacció de l' $\alpha$ -sinucleïna amb àcids grassos per tal de regular la formació d'oligòmers altament insolubles (Sharon i col., 2003).

Així doncs, aparentment la sinucleïna existeix en una varietat de conformacions a la natura: en una conformació nativament desplegada en solució aquosa, com a hèlix alfa en presència de fosfolípids acídics, com a full beta en els agregats insolubles dels cossos de Lewy, i probablement en altres conformacions en agregats d'elevat pes molecular que s'han observat ocasionalment en cervells normals (Nakajo i col., 1990; Maroteaux i Scheller, 1991; Shibayama-Imazu i col., 1993; Georges i col., 1995). Aquest tret suggereix que l'estructura de la proteïna a la cèl·lula és altament dinàmica i depenent de context. Donada la gran conservació de seqüència que existeix entre espècies, aquesta plasticitat estructural tindria un paper central en la funció de la proteïna.

## **2.2 Genètica de l' $\alpha$ -sinucleïna**

L' $\alpha$ -sinucleïna va esdevenir neurològicament més interessant quan al 1997 se li va detectar una mutació relacionada amb una forma primerenca poc comú de la malaltia de Parkinson en la que es substituïa un únic nucleòtid (Polymeropoulos i col., 1997). Aquesta mutació puntual consisteix en una substitució d'una alanina per una treonina al residu 53 (A53T). Va ser la primera identificació d'un al·lel genètic específic amb un paper causal a la malaltia de Parkinson. De forma molt propera en el temps, a l'any 1998 en una família alemana no relacionada amb les famílies anteriors, es va descobrir una segona mutació, concretament la substitució d'una alanina per una prolina en el residu 30 (A30P) (Kruger i col., 1998). Aquesta mutació s'ha localitzat també a la mateixa zona de l' $\alpha$ -sinucleïna que la mutació A53T. Molt recentment, en una família del País Basc, s'ha descobert una altra mutació en el gen de l' $\alpha$ -sinucleïna que consisteix en la substitució d'un àcid glutàmic per una lisina (E46K) en la posició 46 (Zarranz i col., 2004).

Els tres tipus de mutacions es troben en la regió que comprenen les repeticions imperfectes de 6 aminoàcids, separades per 11 aminoàcids, properes a l'extrem N-terminal. Les tres mutacions puntuals són dominants, per tant estan més properes a produir un guany d'una funció tòxica que una pèrdua de funció.

La nova mutació descrita per Zarranz i col. és la primera de les tres a substituir un residu àcid per un de bàsic, de manera que representa un canvi molt més dràstic per l'estructura molecular de la sinucleïna que les altres dues.

La substitució de l'àcid glutàmic per la lisina podria afectar de 2 maneres les propietats físico-químiques de l' $\alpha$ -sinucleïna. Per una banda el canvi d'una càrrega positiva per una de negativa podria canviar la polaritat de la proteïna, afectant l'habilitat de la sinucleïna d'interaccionar amb lípids, modulant la interacció de la sinucleïna amb els fosfolípids de membrana i probablement modificant els processos vesiculars com el trànsit i alliberament de neurotransmissors (Willingham i col., 2003).

En segon lloc, la introducció d'un residu de lisina aporta un lloc adicional per modificacions covalents potencials com seria el cas de la ubiquitinació. Aquestes modificacions post-traduccionals podrien tenir implicacions en l'eliminació o l'estabilitat de la proteïna, en la tendència a agregació, en la interacció amb altres proteïnes o bé, en la seva distribució intracel·lular (Takahashi i col., 2002; Takahashi i col., 2003; Giasson i col., 2000). De moment el que s'ha proposat fins ara és que aquestes substitucions alteren l'estructura d'hèlix alfa, eixamplant-se així els fulls beta; d'aquesta manera la proteïna tindria més tendència a l'auto-agregació (Polymeropoulos i col., 1997; Kruger i col., 1998; Vogel, 1997; Heintz i Zoghbi, 1997).

### **2.3 Models amb animals transgènics.**

Els mecanismes a partir dels quals una mutació en el gen de l' $\alpha$ -sinucleïna desemboca en un procés neurodegeneratiu encara es desconeixen, però el descobriment de la implicació d'aquesta en la patofisiologia d'un nombre important d'alteracions neurodegeneratives, sobretot en la malaltia de Parkinson, ha plantejat la possibilitat de generar models amb animals transgènics, per estudiar tan les pèrdues com els guanys de funció que implicaria una modificació en el gen de l' $\alpha$ -sinucleïna.

#### **2.3.1 Ratolins nuls per a l' $\alpha$ -sinucleïna: pèrdua de funció**

Una de les hipòtesis que es formulen respecte l'efecte de la mutació en el gen humà de l' $\alpha$ -sinucleïna gira entorn d'un paper negatiu dominant com a forma d'expressió de la proteïna humana mutada. Aleshores, en l'estat patològic hereditari, l'activitat de la proteïna normal esdevindria disminuïda.

Basant-se doncs en aquesta hipòtesi, Abeilovich i col. van generar un model animal en ratolins en els quals se'ls havien eliminat els dos primers exons del gen de l' $\alpha$ -sinucleïna, que codificaven pels aminoàcids de l'1 al 41 i per sobre de seqüències no traduïdes, de manera que la transcripció del gen quedava totalment bloquejada (Abeilovich i col., 2000). Els ratolins mutats resultants, tan homozigots com heterozigots eren viables, de mida normal i fèrtils sense presentar cap anormalitat anatòmica important, indicant d'aquesta manera que l' $\alpha$ -sinucleïna no és una proteïna essencial per al desenvolupament. Les neurones dopaminèrgiques de la substància negra tenien una aparença típicament normal així com una densitat normal de projeccions dopaminèrgiques a l'estriat. L'eliminació de l' $\alpha$ -sinucleïna no resulta tampoc en canvis en l'expressió o distribució de les proteïnes sinàptiques vesiculars.

Tot i la manca d'anomalies morfològiques, els animals nuls per l' $\alpha$ -sinucleïna pateixen importants dèficits neuroquímics, electrofisiològics i de comportament. Els models amb animals transgènics mutats per l' $\alpha$ -sinucleïna han servit per estudiar el seu paper en la malaltia del Parkinson, arribant-se a conclusions sorprenents. Mentre que mutacions en altres gens poden resultar en la proteïna malmesa conduint a una pèrdua de funció o a proteïnes inactives, els estudis en l' $\alpha$ -sinucleïna mostren fins ara que els efectes perjudicials ocasionats per una mutació resultarien en un guany de funció; la pèrdua d' $\alpha$ -sinucleïna sembla tenir efectes mínims durant el desenvolupament. Estudis complementaris tan en *Drosophila* com en línies transgèniques de ratolí mostren que una sobreexpressió, tan de la forma mutada com de la forma no mutada de l' $\alpha$ -sinucleïna pot resultar en la degeneració de les neurones dopaminèrgiques; tot i així, no tots els models de ratolins transgènics desenvolupen dèficits dopaminèrgics (Maries i col., 2003).



Així doncs, els ratolins *knock-out* per l' $\alpha$ -sinucleïna són fèrtils i semblen normals, i el desenvolupament del sistema dopaminèrgic és comparable al dels animals salvatges (Abeliovich i col., 2000; Cabin i col., 2002).

### **2.3.2 Ratolins transgènics per l' $\alpha$ -sinucleïna: models genètics de guany de funció.**

La finalitat que es persegueix amb els models transgènics de guany de funció, és la de provar si la sobreexpressió de la proteïna normal o anormal és la responsable de la patologia. El patró d'herència dominant de l' $\alpha$ -sinucleïna lligada a la malaltia de Parkinson i a la Demència amb Cossos de Lewy, present tant en els casos familiars com esporàdics indica que la toxicitat de l' $\alpha$ -sinucleïna estaria involucrada en la patogènesi, esperant-se doncs que les mutacions de l' $\alpha$ -sinucleïna condueixin a la degeneració de les neurones dopaminèrgiques de forma anàloga a com succeeix en pacients humans. Aquest fet ha conduït a la generació de models amb ratolins transgènics portadors de moltes còpies de l' $\alpha$ -sinucleïna mutada sota el control de diferents promotors específics de neurones (Thy1 o PDGF (per l'expressió en neurones en general o bé tirosina hidroxilasa per l'expressió específica en neurones catecolaminèrgiques)). En alguns casos, enlloc de sobreexpressar la forma mutada, s'ha sobreexpressat la forma no mutada de l' $\alpha$ -sinucleïna (Abeliovich i col., 2000; Van der Putten i col., 2000; Kahle i col., 2000; Rathke-Hartlieb i col., 2001; Matsuoka i col., 2001; Feany i col., 2000).

La primera línia de ratolins transgènics per l' $\alpha$ -sinucleïna (Mashliah i col., 2000) sembla que recull de forma majoritària tots els fenòmens patològics humans de la via de l'estriat, incloent les inclusions neuronals positives tant per la ubiquitina com per la sinucleïna, una reducció de marcadors dopaminèrgics de l'estriat i dèficits en el sistema motor.

Tot i que alguns d'aquest fenotips es desenvolupen mol aviat en el temps, aproximadament als dos mesos d'edat, aquests van esdevenint més greus de forma progressiva, suggerint-se així una dependència de la progressió de la malaltia amb l'edat. No s'han trobat pèrdues de les neurones de la substància negra i les inclusions tampoc presenten les típiques inclusions fibril·lars. A banda d'aquests resultats i a partir d'anàlisis d'altres línies transgèniques de ratolí s'han obtingut resultats contradictoris, com per exemple els corresponents als estudis en els que s'ha sobreexpressat l' $\alpha$ -sinucleïna humana i la forma mutada A53T sota el domini del promotor específic neuronal Thy1. S'han trobat acumulacions granulars no fibril·lars en diferents tipus cel·lulars, sobretot a les neurones motores de la medulla espinal, on aquest dipòsit es correlaciona amb signes de degeneració a neurones motores, denervació i aprimament de les terminals nervioses en les unions neuromusculars juntament amb una incapacitat progressiva de generar moviment, suggerint-se així que l'acumulació d' $\alpha$ -sinucleïna, tan la forma normal

com la forma mutada podria resultar en la mort de diferents poblacions cel·lulars (Van der Putten i col., 2000). De forma sorprenent però, la sobreexpressió de l'altra forma mutada d' $\alpha$ -sinucleïna, A30P sota el control del mateix promotor Thy1 no sembla que resulti en alteracions motores ni en el moviment o en la pèrdua de marcadors dopaminèrgic (Kahle i col., 2000); Rathke-Hartlieb i col., 2001). En un altre model de ratolins transgènics també s'ha expressat la forma A30P de l' $\alpha$ -sinucleïna però aquesta vegada sota el control del promotor de tirosina hidroxilasa. No s'han trobat incusions tipus cossos de Lewy ni alteracions en els paràmetres nigroestriatals com el nombre de neurones dopaminèrgiques, concentració de catecolamines o el test de rotació, tot i l'elevada sobreexpressió d' $\alpha$ -sinucleïna (Rathke-Hartlieb i col., 2001; Matsuoka i col., 2001). Així doncs tots aquest resultats suggereixen que tan els nivells d'expressió del transgen com el rerefons genètic jugarien un paper importantíssim en la producció de fenotip parkinsonià.

Un tret important que cal destacar és que en tots els ratolins transgènics en els que s'han trobat acumulacions similars als cossos de Lewy, aquests eren granulars i els mancava el component fibril·lar. Això suggereix que l'acumulació d' $\alpha$ -sinucleïna no és suficient sinó que ha de patir algun tipus de modificació com l'oxidació o la nitració (Przedborski i col., 2001; Paxinou i col., 2001; Conway i col., 2000).

### **2.3.3 Model genètic a *Drosophila*.**

El model genètic de *Drosophila* que recentment s'ha generat expressa tan la forma normal de l' $\alpha$ -sinucleïna com les formes mutades associades a la malaltia de Parkinson A30P i A53T. S'han dissenyat diverses línies de mosques transgèniques que expressen l' $\alpha$ -sinucleïna en tipus cel·lulars específics: en totes les neurones, en les neurones de la retina, o només en les cèl·lules dopaminèrgiques (Feany i col., 2000). Cal destacar que quan s'expressen tan la forma normal com la forma mutada de l' $\alpha$ -sinucleïna en neurones apareixen acumulacions semblants als cossos de Lewy positives per l' $\alpha$ -sinucleïna i s'observa neurodegeneració en les que són positives per a tirosina hidroxilasa. A més a més, les mosques que sobreexpressen l' $\alpha$ -sinucleïna desenvolupen alteracions motores que progressen amb el temps. L'expressió de totes les formes humanes d' $\alpha$ -sinucleïna genera degeneració progressiva en les cèl·lules fotorreceptores. Aquest fenotip de l'ull representa un gran avenç metodològic ja que es tracta d'un fenomen extern, detectable i permet la millora d'un sistema de criatge genètic per a gens modificadors, supressors o potenciadors que podrien epistàssicament alterar l'expressivitat de la patologia, modificant-ne tan el grau com l'edat d'aparició. Aquest fet porta a la identificació de molècules que podrien interaccionar amb l' $\alpha$ -sinucleïna, o bé, formar part de la mateixa via cel·lular. Així doncs el model de *Drosophila* és molt

interessant però té el problema de la manca d' $\alpha$ -sinucleïna endògena per aquests animals, i per tant fa difícil l'extrapolació dels resultats obtinguts a humans.

Estudis fets a *Drosophila* de línies que sobreexpressen la forma no mutada i línies que sobreexpressen la mutació A53T desenvolupen la patologia dels cossos de Lewy i tenen un patró adult de pèrdua de neurones dopaminèrgiques. S'ha trobat un efecte similar en ratolins transgènics que expressen tan la forma mutada com la forma no mutada de l' $\alpha$ -sinucleïna; aquestes línies desenvolupen diferents graus de la patologia i anormalitats basades en la sinucleïna, amb importants canvis en les tasques locomotores del comportament (Maries i col., 2003).

Aquestes mutacions no s'han trobat en anàlisis posteriors d'altres grups de pacients amb malaltia de Parkinson d'arreu del món, i no sembla que estiguin lligades a les formes esporàdiques de la malaltia (El-Agnaf i col., 1998b; Farrer i col., 1998; Higuchi i col., 1998; Ho i Kung, 1998; Lucotte i col., 1998; Warner i Schapira, 1998; Hu i col., 1999).

No obstant, tot i que la mutació genètica de l' $\alpha$ -sinucleïna sigui una causa molt poc freqüent de la malaltia de Parkinson, la proteïna normal s'ha vist implicada sobretot en formes comuns d'aquesta malaltia a partir d' un altre criteri: l' $\alpha$ -sinucleïna sembla ser el component més important dels cossos de Lewy (Spillantini i col., 1997; Wakabayashi i col., 1997; Irizarri i col., 1998; Spillantini i col., 1998b; Giasson i col., 1999).

	Ratolins KO	Mosques TG	Ratolins TG	Ratolins TG	Ratolins TG	Ratolins TG	Ratolins TG
Promotor		<i>Ddc/elav/gmr</i>	PDGFβ	<i>Thy1</i>	<i>Thy1</i>	TH	TH
Forma d'α-sinucleïna humana		WT/A30P/A53T	WT	WT/A30P	A53T	WT/A30P/A53T	A30P
<b>Fenotips</b>							
<i>Fenotip dopaminèrgic</i>							
*Pèrdua de neurones DA	No	Sí	No	No	ND	No	No
*Pèrdua de terminals nervioses DA	No	NA	Sí	ND	ND	ND	ND
* Disminució en el contingut de DA	Sí	NA	ND <sup>b</sup>	No	ND	No	No
<i>Dipòsits d'α-sinucleïna</i>							
*Neurites distròfiques	NA	Sí	Sí	Sí	Sí <sup>c</sup>	No	Sí
*Cossos de Lewy	NA	Sí	Sí	Sí	Sí <sup>c</sup>	Sí <sup>c</sup>	No
<i>Fenotip de defecte motor</i>							
*Alteració motora	No	Sí	Sí	Sí	Sí <sup>c</sup>	No	No
<i>Progressivitat</i>	ND	Sí	Sí	Sí	Sí <sup>c</sup>	ND	ND

**TAULA 2. Models animals d'α-sinucleïnopatia.** PDGFβ i Thy 1 són promotors panneuronals. El promotor TH condueix l'expressió del transgen en les neurones catecolaminèrgiques. Els promotors de mosca *Ddc*, *elav*, i *gmr* condueixen l'expressió del transgen en neurones dopaminèrgiques, del cervell i d'ulls respectivament b) però amb activitat TH reduïda c) El fenotip està descrit a les neurones motores, però no a les de la substància negra ND, no determinat; NA, no aplicable; TG, transgènic; KO, knockout ;WT, wild-type (Pérez-Sánchez F i col., 2002)

#### 2.4. Els cossos de Lewy

Les neurones en estat degeneratiu de cervells afectats per alguna sinucleïnopatia presenten unes inclusions típiques anomenades Cossos de Lewy (LB). Els cossos de Lewy són inclusions intraneuronals altament insolubles, essent l'α-sinucleïna el seu component principal, d'aquí el nom de sinucleïnopaties. Són les següents (taula 3): la malaltia de Parkinson (PD), la forma pura i la forma comú de la demència amb cossos de Lewy (DLBp i DLBc respectivament) (Iseki i col., 1998; Takeda i col., 1998; Arai i col., 1999; Baba i col., 1998; Spillantini i col., 1998b), el Síndrome de Down (Lippa i col., 1999) i la malaltia d'Alzheimer (Lippa i col., 1998; Trojanowski i col., 1998). En un grup apart, però dins de les sinucleïnopaties existeix un altre tipus de malaltia neurodegenerativa, en la que tan els oligodendròcits com les neurones presenten inclusions citoplasmàtiques amb

la sinucleïna com a component principal, es tracta de l'Atrofia Multisistèmica (MSA) (Arima i col., 1998a; Spillantini i col., 1998a; Wakabayashi i col., 1998a,b).

<b>Sinucleïnopaties</b>
<p><b>Malaltia de Parkinson (PD)</b>            Esporàdica            Familiar amb l'<math>\alpha</math>-sinucleïna mutada            Familiar amb altres proteïnes mutades a part de l'<math>\alpha</math>-sinucleïna</p>
<p><b>Demència amb cossos de Lewy (DLB)</b>            Demència amb cossos de Lewy forma pura            Demència amb cossos de Lewy forma comú (amb            Característiques de la malaltia d'Alzheimer)            Malaltia d'Alzheimer familiar amb mutacions a l'APP            Malaltia d'Alzheimer familiar amb mutacions a PS-1            Malaltia d'Alzheimer familiar amb mutacions PS-2            Síndrome de Down</p>
<p><b>Atròfia sistèmica múltiple (MSA)</b>            Síndrome shy-Drager            Degeneració a la substància negra            Atròfia olivopontocerebel·lar</p>
<p><b>Acumulació de Ferro al cervell, amb neurodegeneració tipus I</b>            Síndrome Hallervorden-Spatz            Distròfia neuroaxonal</p>
<p>Altres patologies que poden tenir lesions <math>\alpha</math>-sinucleïna-immunoreactives            Alteració traumàtica del cervell            Malaltia de Pick            Esclerosi Lateral Amiotròfica</p>

**Taula 3. Classificació de les sinucleïnopaties.** APP: Proteïna precursora de l'amiloide. PS-1 i PS-2: presenilina-1 i -2 (Galvin i col., 2001).

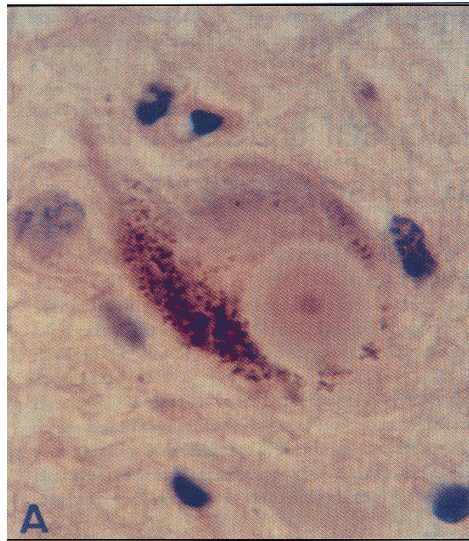
Ultraestructuralment la distribució neuronal i glial de les inclusions d' $\alpha$ -sinucleïna depèn del tipus de malaltia. En neurones es troben en les neurites distròfiques anomenades neurites de Lewy (Irizarri i col., 1998; Spillantini i col., 1998a,b; Braak i col., 1999, Duda i col., 2002a,b) i en el pericari neuronal, anomenat-se cossos de Lewy (Forno i col., 1996; Wakabayashi i col., 1997; Spillantini i col., 1997; Baba i col., 1998; Ince i col., 1998; Mezey i col., 1998; Takeda i col., 1998; Irizarri i col., 1998; Spillantini i col., 1998a,b; Braak i col., 1999). Alguns agregats d' $\alpha$ -sinucleïna també es poden trobar extracel·lularment (Den Hartog i Bethlem, 1960; Togo i col., 2001).

En neurones la localització intracel·lular d'inclusions insolubles d' $\alpha$ -sinucleïna que, a més, són resistent a proteases (Neumann i col., 2002) contrasta altament amb la sinucleïna que en condicions normals es pot trobar de forma soluble a la terminal pre-sinàptica. En algunes malalties com l'Atròfia Multisistèmica (MSA) els agregats d' $\alpha$ -sinucleïna es presenten sobretot en forma d'inclusions glials citoplasmàtiques (GCI) (Braak i Braak, 1999; Burn i Jaros, 2001). Tot i que també es troben estructures similars als GCI, immunoreactives per  $\alpha$ -sinucleïna en altres patologies com la malaltia de Parkinson

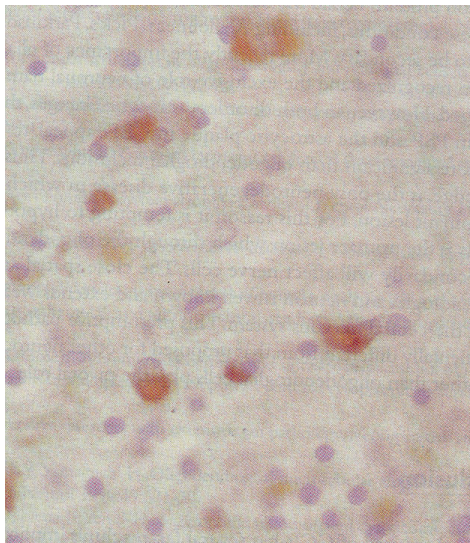
(Hishikawa i col., 2001; Mori i col., 2002; Piao i col., 2000,2001) els GCIs són marcadors específics d'MSA.

Morfològicament els cossos de Lewy es divideixen en els LB del tronc de l'encèfal i en els LB corticals. Els primers predominantment es localitzen al tronc de l'encèfal, que inclou substància negra i locus ceruleus, igual com el diencèfal. Mitjançant la tinció d'hematoxilina-eosina (HE) s'identifiquen com a inclusions esfèriques eosinòfiles amb un cor central envoltat per un hal.lus més dèbil. Els LB corticals es localitzen més aviat a les àrees límbiques com són l'amígdala i els córtex entorrinal, insular i cingulat. Morfològicament poden presentar una forma esfèrica o irregular, amb una eosinofilia més lleu que en el cas dels LB del tronc de l'encèfal, i poden no presentar hal.lus ni cor. Ambdós tipus de LB comparteixen uns filaments intermediaris visibles al microscopi electrònic que tenen un diàmetre de 7 a 15 nm (filaments-LB) (Duffy i col., 1965). Al tronc de l'encèfal aquests filaments s'arrangen de forma molt compacta amb perfils circulars al centre, i radiats del centre a la perifèria (Roy i col., 1969). En canvi en els LB corticals, els perfils circulars al centre són rars i els filaments no estan arranats a la perifèria seguint un patró radial (Kosaka, 1978).

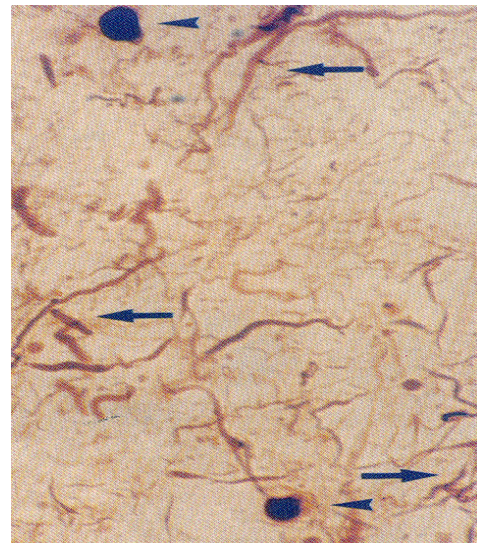
Mitjançant la tinció HE sovint és difícil diferenciar els LB corticals d'altres tipus d'estructures neuronals com les neurofilaments aparellats del neuròpil (*neurofibrillary tangles* o NFT) i les neurones ovoidals. La millor manera d'identificar-los és fent immunohistoquímica amb anti- $\alpha$ -sinucleïna, o bé, amb anti-ubiquitina (Kuzuhara i col., 1988), tot i que aquesta última no és específica per la detecció de les sinucleïnopaties (Leigh i col., 1989). (fig2)



**FIG. 2a Cos de Lewy a la malaltia de Parkinson.**  
Neurona pigmentada de la pars compacta de la substància negra, amb les inclusions citoplasmàtiques típiques amb un core central i un hal·lus perifèric més pàlid (Ferrer i col, 2002)

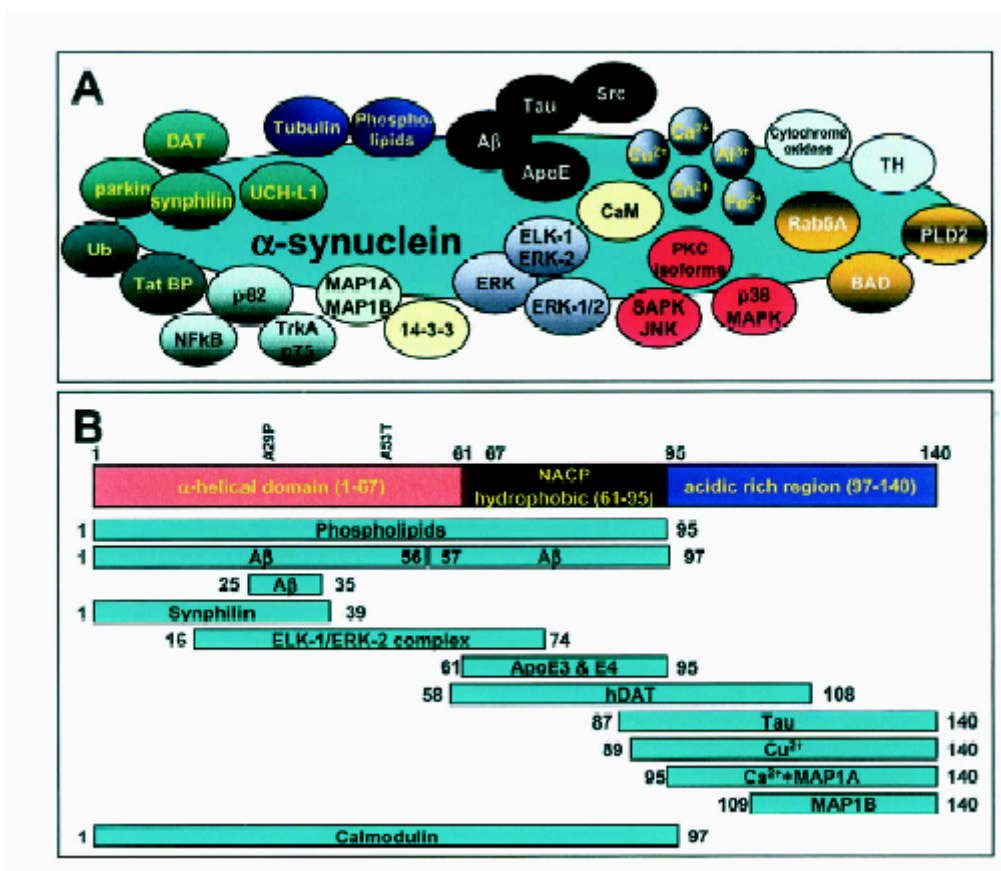


**Fig 2b. Inclusions Glials Citoplasmàtiques (GCI) en cerebel d' MSA.** Immunohistoquímica per (-sinucleïna (Ferrer i col, 2002)



**Fig 2c. Neurites distròfiques en córtex cerebral de DLBDc** Immunohistoquímica per ubiquitina (Ferrer i col, 2002)





**FIG 3. PROTEÏNES QUE INTERACCIONEN I/O CO-LOCALITZEN AMB L'α-SINUCLEÏNA A.**

Totes les proteïnes per les quals està descrit que interaccionen amb la sinucleïna. No es coneix si les proteïnes competeixen per un mateix lloc d'unió o si la unió a la sinucleïna depèn de canvis conformacionals, o si s'extrau d'una unió alostèrica. També està per resoldre si la interacció es produeix en diferents compartiments cel·lulars. Canvis conformacionals deguts a la temperatura o al pH o bé modificacions post-traduccionals, podrien alterar l'estat d'agregació de la sinucleïna, i en conseqüència les proteïnes d'unió. A més de lípids, l'α-sinucleïna es pot unir a una gran varietat de proteïnes incloent la **PLD2** (Jenco i col., 1998), **UCH-L1** (Liu i col., 2002), **parkina** (Shimura i col., 2001), **sinfilina** (Engelender i col., 1999; Kawamata i col., 2001; Ribeiro i col., 2002), **14-3-3** (Ostrerova i col., 1999; Xu i col., 2002), diferents isoenzims de la **PKC**, **BAD**, **ERK** (Ostrerova i col., 1999), **Rab5A** (Sung i col., 2001), el complexe **ELK-1/ERK-2** (Iwata i col., 2001a), **ERK-1/2**, **p38 MAPK**, i **SAPK/JNK mitogen activated kinases** (MAPKs, Iwata i col., 2001b), **Aβ** (Yoshimoto i col., 1995; Jensen i col., 1997; Kim i col., 2001), **MAP1B** (Jensen i col., 2000), tubulina heterodimèrica però no la dels microtúbuls (Alimi col., 2002; Payton i col., 2001), **tau** (Jensen i col., 1999; Lee i col., 1998), **TBP-1** (Ghee i col., 2000; Snyder i col., 2003), el **DAT** (Torres i col., 2001), el complex mitocondrial IV **cytochrom oxidase** (Elkon i col., 2002) **TH** (Perez et al., 2002), i la **calmodulina** (Lee et al., 2002a,b,c; Martinez i col., in press). També pot interaccionar amb cations divalents com el  $Fe^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  (Paik i col., 1997, 1999, 2000; Kim i col., 2000; Souza i col., 2000a,b; Nielsen i col., 2001; Uversky i col., 2001d). Per la majoria d'aquestes interaccions calen confirmacions per vies independents igual com tampoc està clara la seva implicació patofisiològica. Només algunes de les proteïnes interaccionants poden trobar-se als cossos de Lewy **B**. Dominis d'interacció putiatius de l'α-sinucleïna responsables de la unió amb els seus lligands i proteïnes. Els números de les barres corresponen als residus d'α-sinucleïna (Kumlesh i col., 2003).



Molt abans però, que al 1997 es reconegués l' $\alpha$ -sinucleïna com a component principal de les inclusions citoplasmàtiques esmentades, va ser Friedrich H. Lewy al 1912 qui va descriure per primera vegada el prototip d'aquestes inclusions, utilitzant tècniques histològiques, en un cervell afectat de Parkinson, anomenant-les cossos de Lewy.

Des d'aleshores s'han anat estudiant aquestes inclusions i s'hi han vist implicades un munt de proteïnes que es mostren a la fig3. Tot i així per moltes d'aquestes proteïnes no existeixen evidències clíniques de la seva implicació en la formació dels agregats o en el desenvolupament de la malaltia des d'un punt de vista patofisiològic. Només n'existeixen unes de les quals sí que s'evidencia la seva implicació en les sinucleïnopaties i són: **l' $\alpha$ -sinucleïna, la parkina, UCHL-1, chaperones (Hsp70), l'ubiquïtina i el complex del proteosoma.**

Existeixen dues hipòtesis predominants respecte la formació dels cossos de Lewy. D'una banda una mutació en el gen de l' $\alpha$ -sinucleïna en la forma familiar de la malaltia de Parkinson, o bé la interacció aberrant d'aquesta amb altres proteïnes axonals (p.e. subunitats de neurofilaments) en formes esporàdiques de PD o de DLB conduirien a la precipitació de l' $\alpha$ -sinucleïna amb altres proteïnes en agregats filamentosos i insolubles que s'ubiquïtinarien formant-se els cossos de Lewy típics de les esmentades patologies (Baba i col., 1998).

D'altra banda la descripció dels agrosomes ha donat peu a una altra etiogènesi per a les inclusions d' $\alpha$ -sinucleïna (Johnston *i col.*, 1998; Wigley *i col.*, 1999; Kopito, 2000). L'estrés proteolític és una situació cel.lular en la qual els nivells de proteïnes innecessàries sobrepassa la capacitat d'eliminació proteica, degut o bé a un augment en la producció de proteïnes, o bé a alteracions en la proteòlisi. Davant d'aquesta situació les proteïnes no degradades esdevenen reàcies al reconeixement per part del proteosoma (Sherman i Goldberg, 2001). S'ha demostrat en línies no neuronals que aquestes proteïnes, mitjançant un transport retrògrad, viatgen a través dels microtúbuls cap al centrosoma perinuclear (centre organitzador de microtúbuls) (Johnston *i col.*, 1998; Wigley *i col.*, 1999).

En aquest sistema també s'hi recluten tan el complex enzimàtic ubiquïtina-proteosoma (UPS), com les proteïnes d'estrès o *heat-shock proteins* (Fabuni *i col.* 2000). Aquests i altres components, organitzats com a un cor central de partícules electrodenses, estan dins un embolcall d'elements del citoesquelet, que engrandeixen l'estructura del centrosoma formant els agrosomes (Johnston *i col.*, 1998; Wigley *i col.*, 1999). Aquest cossos d'inclusió tenen l'activitat proteolítica augmentada, i es creu que la seva formació serveix per a compartimentalitzar i processar aquelles proteïnes anòmales, que

potencialment són citotòxiques (Kopito, 2000). Es creu que aquest mecanisme emfatitza la formació d'inclusion proteiques tan en condicions normals com patològiques (Kopito, 2000; French i col., 2001; Ma i Lindquist, 2001; Waelter i col., 2001; Hoffner i col., 2002; Serrando i col., 2002).

Així doncs, la formació dels cossos de Lewy podria representar una resposta relacionada amb l'agresoma per tal de facilitar l'eliminació de proteïnes mal degradades i/o potencialment citotòxiques. A més a més, ambdós tipus d'inclusions presenten una organització ultrastructural similar, i igual com els agresomes, els cossos de Lewy també segresten una gran varietat de proteïnes malmeses, elements del citoesquelet, components de l'UPS i HSP (Lowe i col., 1990; Ii i col., 1997; Good i col., 1998; Giasson i col., 2000; Auluck i col., 2002). Donat que l' $\alpha$ -sinucleïna és el component principal dels cossos de Lewy, i donada també la seva predominància a la terminal sinàptica, es suggereix un transport retrògrad per a formar finalment les inclusions (Spillantini i col., 1998; Jensen i col., 1999). D'acord amb aquesta hipòtesi, s'ha demostrat en línies cel·lulars que l' $\alpha$ -sinucleïna es transporta juntament amb altres proteïnes per formar agresomes (Waelter i col., 2001).

### **2.5. Inclusions citoplasmàtiques glials (GCI)**

Al 1989 es van descriure unes inclusions argirofíliques en pacients d'Atròfia Multisistèmica (MSA) (Papp i col., 1989). Es van observar per primera vegada mitjançant un tipus d'impregnació argèntica desenvolupada per Gallyas (Gallyas, 1971) amb la finalitat de demostrar canvis neurofibril·lars tipus Alzheimer, i tot i que per la seva configuració es podrien confondre amb els filaments del neuròpil (*neurofibrillary tangles* (NFT)), la seva localització cel·lular, dimensió, ultraestructura, perfil immuncitoquímic i distribució, són totalment diferents (fig 2b). Els GCI, no només s'han observat amb el mètode de Gallyas específic per tenyir inclusions anormals, sinó que també s'han observat amb altres tècniques més barroeres d'impregnació argèntica com el mètode de Bielschowsky. La forma varia de triangular, forma de mitja lluna, oval o cònica i ocasionalment en forma de flama, aseblant-se a les NFT. La seva mida és també variable, sovint ocupant tot el citoplasma desplaçant el nucli eccentricament.

Ultraestructuralment són tubulars, compostos d'una paret rodona, més aviat ovoïda, amb un diàmetre extern de 20-30 nm., envoltant de forma molt clara una zona central. La superfície externa dels GCI està a més a més envoltada per un material granular, confós, que fa augmentar el seu diàmetre de 40 a 50 nm. (Papp i col., 1989).

Tan pel microscopi òptic, utilitzant tècniques d'impregnació argèntica i tècniques immunohistoquímiques, com pel microscopi electrònic, s'han identificat els oligodendròcits com les cèl·lules hosta dels GCI. Concretament són tres els tipus

d'oligodendròcits: en cèl.lules satèl.lit adjacents a les neurones de la substància gris, en la variant interfascicular de la substància blanca i en els oligodendròcits perivasculars de les àrees afectades (Papp i col., 1992).

Immunohistoquímicament uns primers estudis dels GCIs van demostrar la seva positivitat per ubiquitina, tau i per les formes  $\alpha$ - i  $\beta$ - tubulina (Papp i col., 1989).

Recentment s'ha demostrat que l' $\alpha$ -sinucleïna que es diposita en lesions sinucleïnopàtiques està fosforilada en la Serina 129 (Ser<sup>129</sup>). És a dir que tan en les inclusions citoplasmàtiques glials (GCI) de l'Atròfia Multisistèmica (MSA) (Fujiwara i col., 2002), com en PD com en DLB hi ha una forta reacció anti- $\alpha$ -sinucleïna en LB corticals del tronc de l'encèfal, i en les neurites de Lewy, igual com succeeix en en les neurites distròfiques de la corea de Huntington.

## **2.6. Fosforilació de l' $\alpha$ -sinucleïna**

La fosforilació de l' $\alpha$ -sinucleïna en Ser129 (Okochi i col., 2002) és un marcador específic de les lesions sinucleïnopàtiques (Fujiwara i col., 2002) i a més a més, augmenta la probabilitat que aquesta formi fibril.les (Fujiwara i col., 2002) de manera comparable als efectes de les mutacions associades a la malaltia de Parkinson i a l'efecte de l'estrès oxidatiu tal i com ho demostren els experiments realitzats *in vitro* (Mashlia i col., 2000.; Lee i col., 2002; Giasson i col., 2002; Baba, i col., 1998). Igual que amb els agregats proteics d'altres malalties neurodegeneratives les fibril.les d' $\alpha$ -sinucleïna també són resistent a la digestió per part de la Proteïnasa K. Alguns exemples serien la proteïna priònica (PrP) i la proteïna  $\beta$ -amiloide (Downing i Lazo, 1999). En canvi la forma  $\beta$  de la sinucleïna, que no és amiloidogènica, és sensible a l'acció de la proteïnasa K, probablement degut a la manca d'una regió crítica d'aminoàcids en el domini NAC (Mori i col., 2002). A part de l'augment en la fosforilació que presenta la forma patogènica de l' $\alpha$ -sinucleïna, aquesta, en general, esdevé estretament regulada per mecanismes de fosforilació i defosforilació. En condicions d'equilibri estable, sembla que l' $\alpha$ -sinucleïna està defosforilada, donat que cal tractament amb inhibidors de fosfatases per a detectar nivells significatius de fosforilació (Okochi i col., 2000). De totes maneres la influència del grau de fosforilació tan en l'estat d'agregació de l' $\alpha$ -sinucleïna, com en la implicació funcional, com en el nivell de patogenicitat encara no es coneix, tot i que existeixen diverses hipòtesis al respecte. Així com anteriorment s'ha esmentat que la capacitat de fibrilació de l' $\alpha$ -sinucleïna depèn del grau de fosforilació, d'altra banda es postula que cal un elevat grau de fosforilació en tirosina per tal que l' $\alpha$ -sinucleïna pugui ser degradada correctament (Negro i col., 2002). Concretament una de les proteïnes tirosina-fosforilasa seria Syk (p72Syk) que a més colocalitza amb l' $\alpha$ -sinucleïna en cervell de ratolí (Negro i col., 2001) amb una capacitat de fosforilar l' $\alpha$ -sinucleïna predominant

sobre altres quinases com la CK1, CK2 (Casein Kinases 1 i 2 que fosforilen en serina 87 i 129) (Nakajo i col., 1993; Okochi i col., 2000) i Lyn o Fyn (quinases de la família Src que fosforilen també la tirosina 125 de l'extrem carboxil-terminal de l' $\alpha$ -sinucleïna (Ellis i col., 2001; Nakamura i col., 2001). Està demostrat que la fosforilació per part de Syk evita l'agregació de l' $\alpha$ -sinucleïna (Negro i col., 2002). Així doncs, depenent de quin aminoàcid estigui fosforilat, predominarà un estat menys agregat o més agregat, i per tant, més patogènic.

Altres quinases de les quals l' $\alpha$ -sinucleïna n'és substrat són la PKC i la PKA en els dominis repetits, i els receptors acoblats a proteïna G (GRKs) també en la Ser<sup>129</sup> (Pronin i col., 2000). Així doncs, l' $\alpha$ -sinucleïna podria estar implicada en les vies de transducció del senyal regulades per aquestes quinases. Per exemple, es sap que la fosforilació de l' $\alpha$ -sinucleïna per part de les GRKs està influenciada per la presència de fosfolípids, i que la fosforilació resultant redueix la interacció de l' $\alpha$ -sinucleïna amb altres fosfolípids i amb la fosfolipasa D2 (PLD2) (Pronin i col., 2000). Així doncs, els GRKs podrien estar regulant de forma indirecta la PLD2, a través de la fosforilació de l' $\alpha$ -sinucleïna.

Pel què fa a les mutacions associades a la malaltia de Parkinson, tan la A30P, com la A53T, no s'han trobat indicis que aquestes afectin al grau de fosforilació de l' $\alpha$ -sinucleïna.

## **2.7. L' $\alpha$ -sinucleïna i les vesícules sinàptiques**

La transmissió sinàptica comença amb l'exocitosi de les vesícules sinàptiques durant la qual les vesícules es fusionen amb la membrana plasmàtica alliberant els neurotransmissors. La fusió de membranes durant el procés exocític és una forma de comunicació entre les neurones per tal d'anivellar el balanç entre l'emissió de senyals necessàries i d'evitar processos de fusió innecessaris. Per tal d'acomplir aquests requeriments, les neurones han evolucionat cap a una única i sofisticada xarxa d'interaccions proteïna-proteïna que garanteix la fidelitat del bescanvi d'informació. Una de les peces clau en la fusió de les vesícules sinàptiques és la rab3a, que serveix per a seleccionar i limitar el nombre de vesícules alliberades de la mateixa manera que també regula el tràfic vesicular durant la transmissió (Simons i Zerial, 1993; Pfeffer, 1994; Lledó i col., 1994; Fischer von Mollard i col., 1994; Zerial i McBride, 2001). Rab3a pertany a la família de proteïnes rab, que són petits bescanviadors de nucleòtids de guanina (GTP/GDP), en els quals el bescanvi GDP-GTP modifica l'afinitat de la proteïna rab per la membrana (Fischer von Mollard i col., 1994). Les vesícules sinàptiques contenen 3 isoformes de rab: **rab3a** que es troba en gairebé totes les sinapsis, almenys en cervell murí, **rab3b** i **rab3c** que només es troben en alguns subtipus de sinapsi (Fischer von Mollard i col., 1991; 1994; Jahn i Südhof, 1997). Les isoformes de Rab3 interaccionen amb diferents proteïnes, com a mínim, amb dues proteïnes efectores: la

**rabfilina-3A** (Li i col., 1994; Shirataki i col., 1994) i **la Rim** (Wang i col., 1997). Sembla ser que Rab3a no desenvolupa una funció essencial per a l'organisme, donat que tan cucs mutats (Nonet i col., 1997), com ratolins també mutats (Geppert i col., 1994), mancats de rab3a, eren viables. Els experiments en *Caenorhabditis elegans* nuls per rab3 tenen menys vesícules sinàptiques, sobretot a la zona activa de la sinapsi, però tenen moltes més vesícules a regions ectòpiques, de manera que en absència de rab3a, el transport vesicular es troba alterat (Nonet i col., 1997).

Altres estudis fets en ratolins *knock-out* per Rab3a mostren alteracions en la fusió vesicular mediada per calci, tot i que la morfologia de la sinapsi sembla normal (Geppert i col., 1994). Així doncs, a rab3a a mamífers i rab3 a *C. Elegans*, se les situa al final de la cadena de transport vesicular a la regió de compromís i fusió de les vesícules (Geppert i col., 1997).

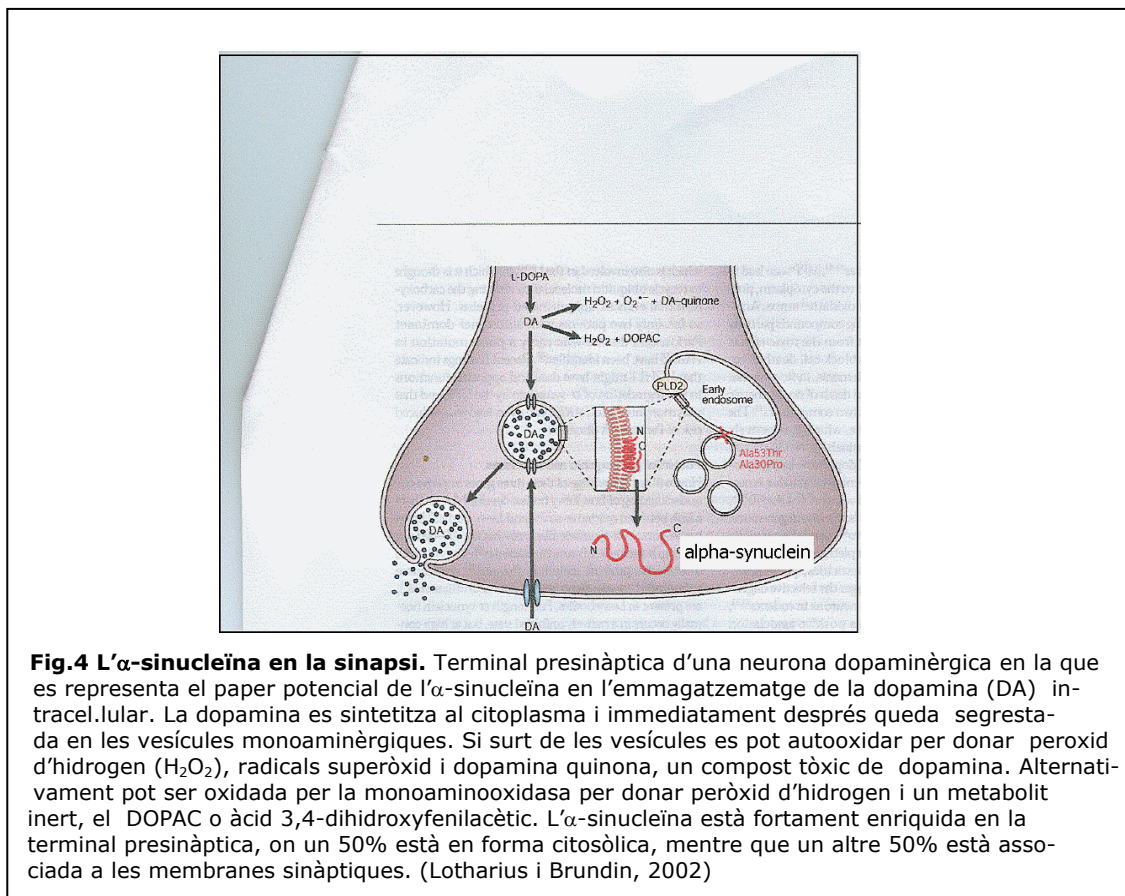
Les vesícules sinàptiques contenen una proteïna de membrana que s'anomena rabfilina, la qual s'uneix selectivament a la forma GTP de rab3a i de rab3c (Li i col., 1994). Els reduïts nivells de rabfilina observats en ratolins *knock-out* per rab3a, suporten la idea de la interacció d'aquesta proteïna amb rab3a *in vivo* (Geppert i col., 1994). A més a més, la sobreexpressió de rabfilina en cèl·lules cromafins, augmenta de manera considerable l'alliberament de neurotransmissor, reafirmant el paper de la rabfilina en la excitosi (Chung i col., 1995).

Tot i això, la funció de la rabfilina no és essencial per l'acció biològica de rab3a, donat que en ratolins nuls per a rab3a no es produeixen dèficits sinàptics (Schlüter i col., 1999).

Quan s'aïllen vesícules sinàptiques de neurones l' $\alpha$ -sinucleïna es localitza a la fracció pre-sinàptica que és alhora immunoreactiva per la sinaptofisina. Dins de la seva estructura proteica, la zona que conté un elevat grau de repeticions en l'extrem amino terminal, altament conservada al llarg de l'evolució, està destinada a mediar la interacció de l' $\alpha$ -sinucleïna amb les vesícules sinàptiques. Quan l' $\alpha$ -sinucleïna nativament desplegada s'uneix a membranes lipídiques (Davidson i col., 1998) o a vesícules de cervell de rata (Jensen i col., 2001), un 80% de la seva estructura passa a hèlix alfa. A més, la forma mutada A30P de l' $\alpha$ -sinucleïna perd de forma significativa la capacitat d'unir-se a vesícules (Jensen i col., 2001). Aquesta capacitat d'unir-se a vesícules de l' $\alpha$ -sinucleïna va ser investigada en cultiu primari de neurones d'hipocamp per Murphy i col. (Murphy i col., 2000) utilitzant una  $\alpha$ -sinucleïna anti-sentit, i van trobar que una reducció en l'expressió de l' $\alpha$ -sinucleïna conduïa a una reducció selectiva del *pool* vesicular presinàptic.

Molt recentment al nostre laboratori, utilitzant ratolins transgènics per l' $\alpha$ -sinucleïna hem trobat una relació específica entre aquesta i rab3a (Dalfó i col., 2004). Concretament la

forma d' $\alpha$ -sinucleïna mutada A30P interacciona amb rab3a, de manera que ambdues proteïnes jugarien un paper complementari però amb funcions diferents dintre del trànsit vesicular. Tots aquests fets, aplicats a les sinucleïnopaties, impliquen que la disponibilitat de vesícules compromeses per a l'alliberament es veuria compromesa, alterant-se consegüentment la funció sinàptica i/o iniciant-se la neurodegeneració.



### 3. ELS RECEPTORS GLUTAMATÈRGICS I LA TRANSMISSIÓ SINÀPTICA

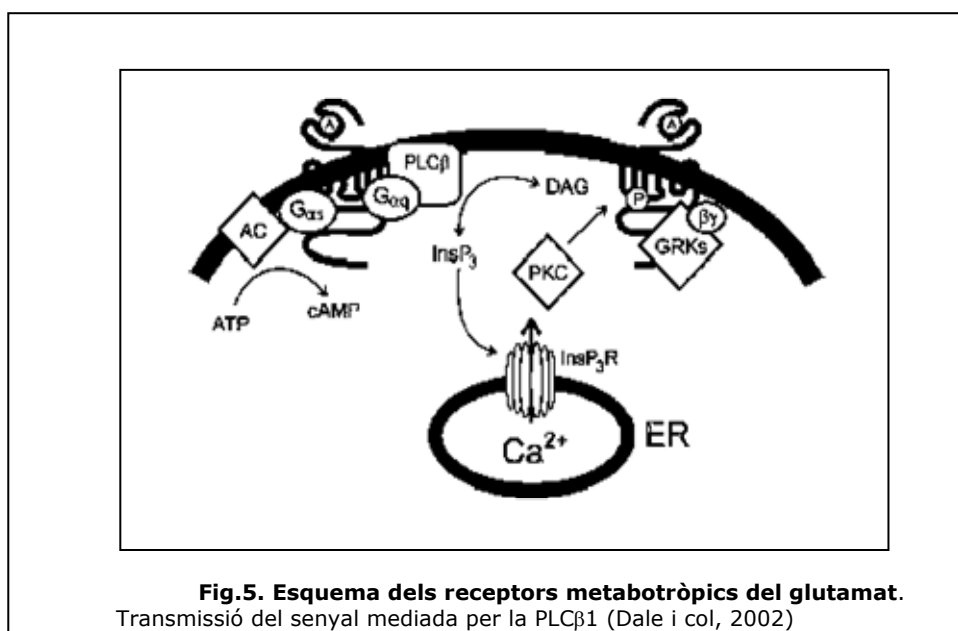
Els receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs) pertanyen a una gran família de proteïnes amb milers de lligands que van des d'amines biògenes, pèptids, glucoproteïnes, lípids, nucleòtids i ions (Hamm i col., 1998; Kolakowski i col., 1994). Els GPCRs estan formats per 7 seqüències que travessen la membrana formant una unitat de reconeixement i de connexió per a les proteïnes G. El receptor activat indueix un canvi conformacional a la subunitat ( de la proteïna G, alliberant-se el GDP, amb la immediata unió de GTP, de manera que es dissocia del receptor i modula diverses vies de transmissió del senyal (Martin i col., 1998), com són l'activació o inhibició de les adenilat ciclases, l'activació de fosfolipases i la regulació de canals tan de potassi com de calci (Hamm, 1998).

Una de les famílies més grans dels GPCRs és la que correspon a la dels receptors dels neurotransmissors metabotròpics que inclou els receptors metabotròpics del glutamat i GABA, els receptors de calci i els receptors per les feromones vomeronasals i del sabor.

Els receptors metabotròpics del glutamat (mGluRs) es classifiquen en els grups I, II i III (Conn i col., 1997; Michaelis i col., 1998; Ozawa i col., 1998). Dins dels receptors del grup I hi ha mGluR1 i mGluR5, associats a la proteïna Gq/11. Aquests, després de la unió del glutamat estimulen la fosfolipasa C  $\beta$ 1 (PLC $\beta$ 1). Els receptors del grup II i III inhibeixen l'adenilat ciclasa i activen els canals de potassi associats a proteïna (GIRKs).

L'activació de PLC $\beta$ 1 estimula el bescanvi de fosfatidilinositol (PI). Així es produeix la hidròlisis del fosfatidilinositol1-4,5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>) resultant en la generació de 2 missatgers intracel.lulars que són l'inositol-1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) i el diacilglicerol (DAG), el qual promou l'alliberament de calci i l'activació de la proteïna kinasa C (Conn i col., 1997; Hammond i col., 2003; Pin i Acher, 2002; Rebecchi i Pentylala, 2000; Rhee, 2001).

Curiosament els mGluRs del grup I i del grup III modulen la transmissió sinàptica del complex estriatopalidal (Smith i col., 2000; Valenti i col., 2003), i l'activació dels mGluRs del grup II inhibeixen l'excitació sinàptica de la pars reticulata de la substància negra (Bradley i col., 2000).



En un model de parkinsonisme fet en rata el bloqueig dels mGluRs del grup I inhibeixen els dèficits acinètics (Breysse i col., 2002; Ossowska i col., 2003). A més a més existeixen diferents línies d'investigació que apunten cap a la implicació dels mGluRs com a dianes farmacològiques per al control dels dèficits motors a la malaltia de Parkinson

(Feeley i col., 2003; Pisani i col., 2003). En canvi, pràcticament es desconeix el paper dels mGluRs en el còrtex cerebral de la DLBD.

#### **4. ESTRÈS OXIDATIU**

Històricament el concepte d'estrès oxidatiu s'ha utilitzat per a indicar un excés de radicals lliures d'oxigen, que afecten les defenses oxidants amb el conseqüent detriment. A partir d'aquesta definició, la detecció d'alteracions resultants de les espècies reactives d'oxigen és indicatiu d'estrès oxidatiu (Markesbery i col., 1996). Les espècies reactives d'oxigen són un producte derivat del metabolisme oxidatiu cel·lular i es generen al mitocondri durant la fosforilació oxidativa amb la producció de molècules que tenen electrons desaparellats, com el superòxid ( $O_2^-$ ). El superòxid és una molècula de vida curta que es redueix per la família d'enzims corresponent a les superòxid dismutases (SODs) per tal de generar peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ). La reducció d' $H_2O_2$ , per exemple a través de l'acció de cations divalents redox-actius, com ara el ferro, genera radicals hidroxil (OH) que són radicals lliures potents que portarien a l'alteració oxidativa de proteïnes, lípids i àcids nucleics. L'òxid nítric és un altre radical lliure de vida curta amb toxicitat limitada produït per una família d'enzims anomenada òxid nítric sintases. A partir de la interacció amb l'anió superòxid, l'òxid nítric forma el peroxinitrit ( $ONNO^-$ ), que és una altra espècie molt reactiva que pot portar a malmetre macromolècules a través de la nitració o de la generació de radicals lliures.

Les cèl·lules han evolucionat per a elaborar un seguit de defenses anti-oxidants, incloent SODs, reductases del glutatió i catalases (Markesbery i col., 1996).

La patologia de la malaltia de Parkinson implica degeneració neurològica en la substància negra (SN), acompanyada d'estrès oxidatiu i anomalies mitocondrials (Ebadi i col., 2001; Zhang i col., 2000). Un dels factors que més contribueix a l'estrès oxidatiu és la producció endògena de 6-hidroxdopamina (6-OHDA), un metabolit oxidatiu tòxic derivat de la dopamina (DA). Es sap que la 6-OHDA participa en la producció de peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i d'altres espècies d'oxigen reactives (ROS) capaces de destrossar els aparells tan funcionals com estructurals de la cèl·lula dins de la substància negra (Blum i col., 2001; Galindo i col., 2003). De forma similar els efectes tòxics de la 6-OHDA es corresponen amb peroxidació lipídica, pèrdua del glutatió endogen i apoptosi neuronal tal com es demostra per la condensació nuclear, degradació de l'ADN (Galindo i col., 2003) i l'expressió de les proteïnes c-Fos i c-Jun de resposta primerenca (Giandomenico i col., 1997). Està demostrat que l'estrès oxidatiu provoca neurodegeneració inhibint el complex I de la cadena de transport electrònic, amb la concomitant disfunció mitocondrial (Olanow, 1993). Justament aquesta disfunció ha estat implicada també en la patogènesi de la malaltia de Parkinson (Schulz i col., 1999; Schulz i col., 1994; Beal i col., 1996). Estudis *in vitro* demostren que l'estrès oxidatiu provoca l'agregació de l' $\alpha$ -



sinucleïna (Hashimoto i col., 1999), i que aquesta, per sí mateixa, és capaç de provocar alteracions mitocondrials fent incrementar les ROS (espècies reactives d'oxigen) de les línies cel·lulars neuronals (Hsu i col., 2000)

#### **4.1. L'MPTP i l' $\alpha$ -sinucleïna**

A principis dels anys 80 drogadictes del nord de Califòrnia que prenién heroïna sintètica van desenvolupar parkinsonisme agut degut al compost contaminant 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Langston i col.,1983). L'MPTP travessa la barrera hematoencefàlica, on la MAO-B de les neurones astroglials i serotoninèrgiques, el converteix a 1-metil-4-fenil-1,2,3 dihidropiridina (MPP+) (Chiba i col., 1984). La recaptació selectiva depenent d'energia de l'MPTP dins les neurones dopaminèrgiques i l'acumulació en vesícules sinàptiques són degudes a la selectivitat de la neurotoxina per les neurones dopaminèrgiques (Staal i col., 2000). L'MPP+ lliure citosòlic entra al mitocondri mitjançant un procés depenent d'energia. Els efectes del tòxic al mitocondri són: inhibir del complex I de la cadena mitocondrial o NADH coenzim Q10 reductasa, disminuir la producció d'ATP, alterar l'homeòstasi del calci i generar radicals lliures. Les espècies reactives d'oxigen (ROS) activen la caspasa-8 i la cascada de mort apoptòtica (Blum i col., 2001; Schmidt i col., 2001).

L'alliberament del citocrom C del mitocondri al citosol és el principal tret mol·lecular de la mort cel·lular programada, responsable de l'activació de les cascades que continuarien el procés apoptòtic. Curiosament s'ha demostrat, *in vitro*, que el citocrom C promou l'agregació de l' $\alpha$ -sinucleïna (Hashimoto i col., 1997; Kakimura i col., 2001).

L'MPTP també indueix un disminució del Glutatió reduït (GSH) així com un augment en els nivells de ferro en la pars compacta de la substància negra. La seva toxicitat es veu incrementada per deficiències genètiques de la SOD i dels peròxids de glutatió (Zhang i col., 2000). Ratolins transgènics que tenen una activitat augmentada de SOD al cervell, són més resistents a la toxicitat per MPTP induïda en les neurones dopaminèrgiques que els ratolins no transgènics (Przedborski i col., 1992). Aquest fets suggereixen que la producció de radicals superòxid tenen un paper clau en la neurotoxicitat de l'MPTP vers les neurones dopaminèrgiques. Tot i així, els radicals superòxid són molt poc reactius i s'ha acceptat de forma general que no tenen un paper important en la generació d'alteracions de forma directa (Przedborski i col., 2000). Un dels radicals que sí que és molt perillós a nivell cel·lular és el peroxinitrit, producte de la reacció amb l'anió peròxid i l'òxid nítric. Una de les accions més perilloses del peroxinitrit és atacar els anells fenòlics de les proteïnes, i en particular, dels residus de tirosina (Ohshima i col., 1990), per a formar nitrotirosina. S'ha demostrat en ratolins que l'MPTP augmenta significativament els nivells de nitrotirosina en l'estriat, tan de la forma lliure com de l'associada a

proteïnes (Schulz i col., 1995; Pennathur i col., 1999). La nitrotirosina pot inactivar enzims i receptors que depenen dels residus de tirosina per a la seva activitat (Ischiropoulos i col., 1992; Trotti i col., 1996) al mateix temps que evita la fosforilació dels residus de tirosina importants per a la transducció del senyal (Martin i col., 1990; Kong i col., 1996). Curiosament, l' $\alpha$ -sinucleïna constitueix una altra de les dianes per a la nitrotirosina. S'ha demostrat en cèl.lules HEK293 que l' $\alpha$ -sinucleïna salvatge és una diana selectiva de nitració després d'exposar les cèl.lules a peroxinitrit (Przedborski i col., 2001). A més a més, després d'una administració aguda en estriat a ratolins, només l' $\alpha$ -sinucleïna esdevé nitrosilada, i no altres proteïnes presinàptiques com la sinaptofisina (Przedborski i col., 2001). Aquestes dades demostren que l' $\alpha$ -sinucleïna és una diana específica de l'estrès oxidatiu induït per MPTP, les propietats de la qual esdevindrien alterades degut a la nitració de les seves tirosines.

L'administració d'MPTP resulta en la mort cel.lular nigroestriatal així com en la depleció de la dopamina de l'estriat en una gran varietat d'espècies que inclouen ratolí, rata, gat, gos, ovella i primats (German i col., 1996).

Respecte el tipus de mort ocasionada per l'MPTP existeixen controvèrsies. D'una banda es suggereix que dosis baixes administrades crònicament d'MPTP/MPP<sup>+</sup> provoquen apoptosi, mentre que administracions agudes de dosis més elvades provocarien necrosi (Nicotra i Parvez, 2000). L'administració aguda d'MPTP indueix mort cel.lular necròtica però no hi ha augment d' $\alpha$ -sinucleïna, contràriament al què passa amb l'administració crònica d'MPTP, que indueix apoptosi juntament amb un augment en l'expressió d' $\alpha$ -sinucleïna en la substància negra de ratolins i sangoneres. Aquesta redistribució de l' $\alpha$ -sinucleïna, de la localització sinàptica habitual al citoplasma, afavoriria la seva agregació en les neurones en estat degeneratiu i podria jugar un paper en la toxicitat de l'MPTP (Kowall i col., 2000; Vila i col., 2001).

Els models amb MPTP han significat un gran avenç en l'estudi de les malalties neurodegeneratives, i particularment l'ús d'animals transgènics, ha portat al desenvolupament d'estratègies terapèutiques (Vila i col., 2001; Vila i col., 2001).

Per exemple, ratolins deficients en la MAO-B, són incapaçs de transformar l'MPTP a MPP<sup>+</sup>, el seu metabolit actiu (Grimsby i col., 1997); aquells deficients en el transportador de dopamina (DAT) són resistents a la toxicitat per MPTP (Bezard i col., 1999).

Mitjançant microarrays d'ADNc fets a partir de ratolins transgènics tractats amb MPTP es van detectar canvis en l'expressió de gens implicat en l'estrès oxidatiu, processos d'inflamació, transducció del senyal i toxicitat per glutamat que sembla que es veu compensat per una elevada expressió de factors tròfics i defenses antioxidants. Tota aquesta cascada de gens que apareix després d'una exposició curta a MPTP succeeix

abans de la mort neuronal de les neurones dopaminèrgiques nigroestriatals (Mandel i col., 2002)

#### **4.2 Rotenona i pesticides**

L'administració crònica sistèmica de baixes dosi del pesticida lipofílic rotenona, inhibidor del complex I mitocondrial, s'ha vist que provoca depleció en la dopamina de l'estriat amb la consegüent degeneració i pèrdua de les neurones dopaminèrgiques de la substància negra, associat a hipoquinèsia i rigidesa (Betarbet i col., 2000). Concretament es va estudiar en un model de rata, mitjançant la injecció intravenosa de rotenona. Les neurones en degeneració de la nigra desenvolupen inclosions fibril·lars citoplasmàtiques immunoreactives per ubiquitina i per l' $\alpha$ -sinucleïna de forma similar als cossos de Lewy (Betarbet i col., 2000). Alguns pesticides, dintre dels quals hi hauria la rotenona i el paraquat, indueixen un canvi conformacional en l' $\alpha$ -sinucleïna i n'acceleren la taxa de formació de fibril·les *in vitro*, suggerint-se així una de les bases mol·leculars de la malaltia de Parkinson (Calabresi i col., 1997; Uversky i col., 2001; Sherere i col., 2002). L'exposició crònica a dosis subletals de rotenona provoca alteracions oxidatives tardanes degudes a un alliberament del citocrom C induït per peròxid juntament amb l'activació de la caspasa 3, trets que indiquen una alteració mitocondrial (Sherer i col., 2002).

#### **4.3 RAGE i l'estrès oxidatiu.**

Estudis *post-mortem* de malalts de Parkinson demostren que en la substància negra, a més de la inhibició del complex I mitocondrial (Schapira i col., 1994), els nivells de ferro estan més elevats (Dexter i col., 1989; Riederer i col., 1988), i existeixen processos de peroxidació lipídica (Dexter i col., 1994), així com alteracions oxidatives tan a àcids nucleics (Alam i col., 1997), com a proteïnes (Alam i col., 1997). Existeixen evidències que la majoria dels processos que contribueixen a la patogènesi de la malaltia de Parkinson, incloent l'estrès oxidatiu, tindrien el seu origen en les cèl·lules glials (Olanow i col., 1998). La microglia, els macròfags del sistema nerviós central, es troben en estat ramificat al cervell secretant factors per al creixement de les neurones i astroglia (Kreutzberg, 1996). El tret més característic de la microglia és la seva ràpida activació davant de qualsevol alteració al cervell, infecció, inflamació, trauma o isquèmia produint-se una resposta gradual.

L'activació de la microglia està associada amb la transformació de les cèl·lules a fagòcits capaços d'alliberar substàncies com radicals d'oxigen, oxid nítric, proteases i citoquines proinflamatòries (Lee i col., 2002) com les interleuquines IL-1 $\beta$ , IL-6, i el factor alfa de necrosi tumoral (TNF- $\alpha$ ), que poden provocar tan efectes citotòxics com citopàtics en el sistema nerviós central (Dickson i col., 1993). L'estimulació prolongada o excessiva de la

microglia inicia una cascada inflamatòria que contribueix a malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer o la malaltia de Parkinson (McGeer i col., 1993; Stoll i Jander, 1999), l'esclerosi múltiple (Boyle i McGeer, 1990) i la demència associada al virus de la immunodeficiència adquirida (HIV) (Kaul i col., 2001). Depenent de quin hagi estat l'estímul activant, la microglia, i en el cas de la malaltia d'Alzheimer també l'astroglia, secreten un ampli repertori de mol·lècules de la inflamació (Lue i col., 2001). De tots els candidats presents al cervell d'ancians, els que aparentment provoquen una resposta més forta a la microglia són els productes finals de glicosilació derivats de sucre (*advanced glycation end-products* (AGEs)). La reacció no enzimàtica dels sucres reductors o bé la fragmentació dels productes del sucre amb grups amino lliures dona lloc als AGE, una de les modificacions proteiques no enzimàtiques més comú (Miyata i col., 1994). Les proteïnes receptores per els AGE s'anomenen RAGE. El RAGE és un receptor que interacciona amb molts lligands com ara mol·lècules implicades amb l'homeòstasi, desenvolupament i inflamació en malalties com ara l'AD o la diabetis. A part de la seva unió amb els AGE, el RAGE també s'uneix a amfoterina, S100/calgranulina i fibril·les amiloidees (Schmidt i col., 2000; Schmidt i col., 2001). La proteïna RAGE pertany a la superfamília de les immunoglobulines l'expressió de la qual està augmentada en patologies com la malaltia d'Alzheimer i l'esclerosi múltiple (Schmidt i col., 1999). Immediatament després de la unió del RAGE al seu lligand es generen espècies reactives d'oxigen, que seràn fonamentals pels canvis induïts pel RAGE en les propietats cel·lulars. En el cas de les neurones, l'activació cel·lular induïda pel RAGE resultaria en últims termes en la inducció de la mort cel·lular programada (Schmidt i col., 2000).

## **5. EL PERQUÈ DE L'ESTUDI DE L' $\alpha$ -SINUCLEÏNA: LES $\alpha$ -SINUCLEÏNOPATIES**

### **5.1. Malaltia de Parkinson**

Al 1817 J. Parkinson va definir la malaltia que avui dia porta el seu nom en l'assaig sobre *Shaking Palsy* o *Paralysis agitans* (Parkinson, 1817). La malaltia de Parkinson és una alteració neurodegenerativa caracteritzada clínicament per rigidesa, aquinèsia, tremolor basal i inestabilitat postural, deguda a la degeneració progressiva del sistema dopaminèrgic nigrostriatal així com d'altres xarxes neuronals.

La causa: pèrdua de les neurones dopaminèrgiques de la *pars compacta* de la substància negra i l'aparició més o menys extesa d'unes inclusions intracitoplasmàtiques anomenades cossos de Lewy (LB) i neurites distròfiques (LN). La deficiència dopaminèrgica estriatal juntament amb altres dèficits bioquímics resultants són el quadre clínic que caracteritza la malaltia de Parkinson.

Epidemiològicament la malaltia de Parkinson està distribuïda per tot el món i afecta ambdós sexes, amb una lleugera predominància sobre el sexe masculí. On sí que hi ha diferències d'afectació és a nivell racial, donat que la raça blanca té prevalència per damunt dels asiàtics i de la raça negra, que és la que presenta un risc menor d'aparició de la malaltia (Lang i col., 1998a; Lang i col., 1998b).

### **5.1.1 Genètica de la malaltia de Parkinson**

Encara ens queda molt de camí per recórrer per tal de conèixer els mecanismes mol.leculars que condueixen a la malaltia de Parkinson. A partir del estudis patològics es sap que hi ha una pèrdua selectiva de les neurones dopaminèrgiques de la substància negra, així com una denervació dopaminèrgica a l'estriat, però el mecanisme que condueix a aquesta degeneració es desconeix. Els gens lligats a la forma familiar de la malaltia de Parkinson ens ofereixen la possibilitat d'elucidar les vies a través de les quals es produeix la mort selectiva de les neurones dopaminèrgiques d'aquests pacients. Fins avui s'han mapejat 10 loci (PARK 1-10) els qual s'ha vist que estan relacionats amb amb formes familiars de Parkinson (Bonifati i col. , 2003; Farrer i col., 1999; Funayama i col., 2002; Hampshire i col., 2001; Hicks i col., 2002; Liu i col., 2002; Polymeropoulos i col., 1996; Valente i col., 2001; van Duijin i col., 2000). A continuació en fem una descripció breu.

**PARK1** (OMIM 163890) està localitzat al cromosoma 4q21-22 i mitjançant anàlisis de lligament genètic d'una gran família italiana/grega/americana que patien una forma de parkinsonisme autosòmic dominant, es va identificar la mutació en l' $\alpha$ -sinucleïna (Greenmayer i col., 1999).

La mutació en la posició 53 de l'Alanina per Threonina (A53T) es va trobar com la responsable de la forma familiar de PD en aquesta família (Greenmayer i col., 1999). Per cribratges genètics addicionals s'ha identificat una altra mutació a la posició 30 d'una Alanina per una Prolina (A30P) en una família alemana amb PD familiar (Duda i col., 2000). Tot i la identificació d'una altra mutació molt recent d'un Glutàmic per una Lisina en la posició 46 (Glu46Lys) en una família d'origen Basc (Zarranz i col., 2004), diferents estudis han demostrat fins ara que la majoria de casos de PD no són deguts a mutacions o a polimorfismes en el gen de l' $\alpha$ -sinucleïna (Braak i Braak, 1991; Howells i col., 2000; Hsu i col., 2000), però la importància d'aquesta proteïna en la malaltia de Parkinson ha quedat sobradament demostrada per la seva presència en els cossos de Lewy.

**PARK2** (OMIM 602544) localitzat al cromosoma 6q25-27, és el locus corresponent al gen de la parkina i està ssociat a una forma autosòmica recessiva de parkinsonisme juvenil (ARJP) descrit per primera vegada al Japó. El gen de la parkina ve codificat per 12 exons de 1.5 Mb i correspon a una proteïna de 465 aminoàcids. S'expressa només a l'aparell de

Golgi, citosol i fraccions microsomals del cervell humà (Shimura i col., 1999). S'associa amb les membranes de les vesícules sinàptiques i és transportada a la terminal nerviosa a través del fluxe axoplàsmic (Kubo i col., 2001). La parkina és una ubiquitin E3 lligasa implicada en la degradació proteica depenent d'ATP del reticle endoplasmàtic (ERAD) (Shimura i col., 2000). S'han identificat alguns substrats candidats per aquesta proteïna. Són els següents: CDCrel-1, que és una proteïna vesicular sinàptica (Zhang i col., 2000); l' $\alpha$ -sinucleïna 22 (una forma glicosilada d' $\alpha$ -sinucleïna que s'acumula de forma no ubiquitinada en cervells de parkinson autosòmic recessiu (Shimura i col., 1999) i finalment el receptor Pael, una proteïna del reticle endoplasmàtic (Imai i col., 2001). La co-transfecció de parkina,  $\alpha$ -sinucleïna i sinfilina resulta en la formació d'inclusions d' $\alpha$ -sinucleïna ubiquitinada associada amb neurodegeneració cel·lular (Chung i col., 2001).

**PARK3** (OMIM 602404) localitzat al cromosoma 2p13 lligat a una forma autosòmica dominant de la malaltia de Parkinson identificat en algunes famílies del nord d'Europa (Gasser i col., 1998). Un estudi recent suggereix que PARK3 podria influenciar tant la susceptibilitat com l'edat d'aparició de la malaltia de Parkinson (DeStefano i col., 2002).

**PARK4** (OMIM 605543) localitzat al cromosoma 4p15 i identificat en una família d'Iowa, Amèrica, amb trets clínics que anaven des de la forma idiopàtica de la malaltia de Parkinson fins a la demència amb cossos de Lewy (DLB)(Gwin-Hardy i col., 2000). Els estudis patològics mostren un patró d'immunotinció característic per l' $\alpha$ -sinucleïna, incloent cossos de Lewy pleomòrfics, inclusions gials d' $\alpha$ -sinucleïna i neurites distròfiques distribuïdes (Gwin-Hardy i col., 2000).

**PARK5** o Ubiquitin carboxyl-terminal hidrolase (UCHL1) (OMIM 191342) és un altre gen que causaria la forma familiar de la malaltia de Parkinson. L'Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL-1) pertany a una família d'enzims que desfà cadenes de poliubiquitina per tal d'augmentar la disponibilitat d'ubiquitina monomèrica per al sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) (Larsen i col., 1996, 1998). L'UCHL-1 és una de les proteïnes més abundants al cervell, i on té un nivell més elevat d'expressió és a la pars compacta de la substància negra (Wilkinson i col., 1989). Els cossos de Lewy corticals de la Demència amb cossos de Lewy presenten immunoreactivitat per UCHL1 (Lowe i col., 1990). S'ha trobat una mutació en el gen d'UCHL-1 (Ile93Met) en una família alemana, amb un tipus d'herència autosòmica dominant (Leroy i col., 1998). Es creu que aquesta mutació disminueix l'activitat enzimàtica d'UchL1, però es desconeix de quina manera està lligada a la malaltia de Parkinson (Leroy i col., 1998). Curiosament UCHL1 presenta dues activitats enzimàtiques oposades, d'una banda l'activitat hidrolasa prèviament esmentada, i una activitat ubiquitina lligasa.

A part de la parkina (PARK2), existeixen altres loci relacionats amb la forma primerenca autosòmica recessiva de la malaltia de Parkinson. Són els loci **PARK6** (OMIM 605909),

**PARK7** (606324), relacionat amb la proteïna oncogènica **DJ-1** (Bonifati i col., 2002), implicada últimament en l'estrès oxidatiu (Mitsumoto i col., 2001; Mitsumoto i col., 2001) i **PARK9** (606693).

**PARK8** (OMIM 607060), identificat en una família japonesa amb una forma dominant de parkinsonisme (Funayama i col., 2002). Estudis patològics mostren que aquests pacients presenten degeneració de la substància negra sense l'aparició de cossos de Lewy (Hasegawa i col., 1997).

**PARK10** (OMIM 606852) és un locus trobat molt recentment lligat a una forma tardana de la malaltia de Parkinson amb el qual es suggereix que la variabilitat genètica és el contribuent més gran a la malaltia de Parkinson (Hicks i col., 2002).

Un altre dels gens implicats amb la malaltia de Parkinson és **Nurr 1**, un factor de transcripció dins de la superfamília de dits de zinc (Mages i col., 1994), identificat per primera vegada en cervell (Law i col., 1992) i en fetge en estat de regeneració (Searce i col., 1993). S'expressa sobretot en mesencèfal (Saucedo-Cardenas i col., 1998; Zetterstrom i col., 1996). En ratolins *knock-out* per Nurr1 les neurones dopaminèrgiques del mesencèfal no es desenvolupen correctament (Zetterstrom i col., 1997; Le i col., 1999), mentre que en el bulb olfatori aquest ratolins tenen una disminució del 60% de la dopamina (Zetterstrom i col., 1997). En humans doncs, està establerta la relació entre Nurr1 i la neurogènesi de les neurones dopaminèrgiques.

### **5.1.2 Patogènesi de la malaltia de Parkinson**

Encara que es desconeix l'etiologia de la malaltia de Parkinson, les hipòtesis patogenètiques actuals apunten cap a un efecte dels factors genètics juntament amb els ambientals (Shastri i col., 2001). La mort cel.lular del sistema nigro-estriatal inclou múltiples processos que van a parar a una via comú de moltes malalties neurodegeneratives. Aquests processos estan relacionats amb una cascada de múltiples factors nocius que inclouen la generació d'estrès oxidatiu i de radicals lliures amb un augment de la formació d'òxid nítric (NO) i amb la producció de residus de nitrotirosina, la interacció anormal de la neuromelanina amb el ferro juntament amb una acumulació anòmala de ferro, l'alteració de les proteïnes que uneixen ferro, de l'homeòstasi cel.lular del ferro i de la seva interacció amb l' $\alpha$ -sinucleïna. Tan els sistemes segrestadors de radicals lliures com el glutatió estan a nivells subòptims, mentre que l'enzim superòxid dismutasa (SOD) indueix encara més el cicle de l'estrès oxidatiu amb una activitat augmentada de l'MDA, 8-OHG i la producció de AGEs, indicant d'aquesta manera un augment en l'oxidació perjudicial de lípids, ADN i proteïnes de les neurones de la substància negra. A part, els productes derivats del metabolisme endogen de la

dopamina que també contribueixen a la generació d'estrès oxidatiu (Blum i col., 2001; Jenner, 1998; Schapira, 2001).

Altres mecanismes inclouen deficiències i implicacions del sistema mitocondrial, amb una disminució en la producció d'ATP i defectes bioenergètics, alteracions en l'homeòstasi del calci intracel·lular, i la subseqüent mort cel·lular programada que vindria donada per nivells inadequats de factors neurotròfics, l'activació de la via de les caspases i diferents proteïna-quinases, la contribució dels membres de la família Bcl i l'agregació de l' $\alpha$ -sinucleïna, amb la consegüent formació dels cossos de Lewy. Tot aquest procés es veuria accelerat per factors del sistema immunitari i canvis inflamatoris promoguts per la microglia. Cada un d'aquests factors formaria part de la patogènesis de la mort cel·lular, i a més a més, serien factors potencials etiològics en sí mateixos.

### **5.1.3 Clínica de la malaltia de Parkinson** (Jellinger i Mizuno, 2003)

El primer símptoma que es manifesta des dels inicis de la patologia és el tremolor basal que comença o en una mà o en una cama. El segon símptoma són les alteracions en la forma de caminar, que generalment també comencen en una cama, i el tercer símptoma característic és la bradiquinèsia, que causa dificultats en els moviments dels dits i sovint va associat a micrografia.

Les manifestacions clíniques dels malalts de Parkinson són les següents (Ince i McKeith, 2003):

- Tremolor
- Rigidesa
- Aquinèsia i bradiquinèsia, que són absència i lentitud en els moviments
- Pèrdua de la capacitat de mantenir-se dret: quan hi ha quelcom extern que altera la postura del pacient, aquest és incapaç de mantenir la postura.
- Alteracions en la forma de caminar: passes petites, lentes i arrossegant els peus. Podria ser degut a alteracions en la formació del ritme del sistema nerviós central, important en els moviments repetitius.
- Pèrdua dels moviments automàtics: alguns moviments de la musculatura esquelètica van conduïts automàticament i de forma inconscient, com són el moviment de l'ull, moviments d'expressió facial, empassar-se la saliva o el moviment del braç al caminar.
- Incapacitat de realitzar dos actes simultanis.
- Alteracions del sistema autònom: el restrenyiment és un dels fenòmens més comuns en malalts de Parkinson. Altres símptomes són pell oliosa i cara seborreica degut a un augment en la secreció apocrina rica en lípids. També es pot produir transpiració episòdica.



La pressió sanguínea sol ser baixa. Si aquest símptomes s'aprecien als inicis de la malaltia cal considerar la possibilitat que es tracti d'un pacient amb MSA.

- Funció intel·lectual: en els primers estadis de la malaltia no és comú que es manifesti demència, però sí que és possible a mesura que avanci l'estat del pacient (Aarsland i col., 2001). El risc de demència és més baix en aquells pacients que pateixen la forma de Parkinson en la que predomina el tremolor (Roos i col., 1996).
- Si la demència predomina, o cada vegada apareixen períodes més severes, cal plantejar-se la possibilitat d'estar davant d'un cas de DLB.
- Alteracions en el coneixement: Dèficits en l'estat cognitiu sense l'aparició de demència és un tret comú en la malaltia de Parkinson
- Depressió.

#### **5.1.4 Neuropatologia de la malaltia de Parkinson**

Histològicament la malaltia de Parkinson es caracteritza per la presència de nombrosos cossos de Lewy i neurites de Lewy juntament amb la pèrdua de neurones de la part central del cervell i altres nuclis subcorticals, en concret la substància negra i el locus ceruleus (Jellinger, 2001b; Lang i col., 1998a; Lang i col., 1998b).

També hi ha una depleció severa de les neurones melanitzades i de les neurones dopaminèrgiques immunoreactives per a l'enzim tirosina hidroxilasa (TH) en el grup A9 de la part compacta de la substància negra (Hardman i col., 1999; Ma i col., 1999a). La susceptibilitat de les neurones dopaminèrgiques a neurodegeneració s'ha vist que depèn de la seva distribució en compartiments de la substància negra, immunoreactius per a la calbindina (Damier i col., 1999). En aquest compartiments també hi ha una disminució en l'mRNA del transportador de dopamina (DAT) igual com de l' $\alpha$ -sinucleïna, en substància negra i córtex (Neystat i col., 1999).

Finalment, també s'ha observat una disminució del transportador vesicular de monoamines (VMAT2), en estadis primerencs de la malaltia de Parkinson en l'estriat i l'amígdala, però no en la substància negra (Ciliax i col., 1999; Miller i col., 1997)

#### **5.2 Demència amb cossos de Lewy (DLB)**

La demència amb cossos de Lewy (DLB) és un terme relativament nou que descriu un síndrome de demència de la vellesa, associat clínicament a un conjunt de trets neuropsiquiàtrics de coneixement fluctuant i al·lucinacions visuals, associat a evidències de parkinsonisme (McKeith i col., 1996). Patològicament la DLB està caracteritzada per una gran immunoreacció neuronal d' $\alpha$ -sinucleïna patològica i per una patologia tipus

Alzheimer. Fins avui encara no existeix una definició específica per la DLB, encara que ja fa temps que es diagnostica clínicament. Tot i que es desconeixen tant la incidència com la prevalència de la malaltia, està considerada, en la vellesa, com el segon síndrome neurodegeneratiu més comú. Les DLB formen un espectre de malalties, dividit a grans trets en dos grups: (Ince i col., 1998; Lennox i col., 1998; McKeith i col., 1996; Mirra i col., 1991). La forma pura (**DLBp**), que es caracteritza per l'absència de canvis tipus Alzheimer o per la presència de poques plaques senils, i la forma comú (**DLBc**) que contràriament a la DLBp, sí que està associada amb la malaltia d'Alzheimer, generalment en els estadis I-IV de Braak i Braak. El terme comú és per remarcar la seva incidència respecte la forma pura.

Genèticament, només s'han descrit unes poques famílies amb herència autosòmica dominant per la DLB (Ishikawa i col., 1997). Fins ara, l'evidència més gran és la que es decanta per l'allel de l'apolipoproteïna E  $\epsilon 4$  (Benjamin i col., 1995; Harrington i col., 1994; Katzman i col., 1995; Kawanishi i col., 1996; Lamb i col., 1998; Lippa i col., 1995; Olichney i col., 1996). S'ha de destacar però, la recent troballa de Zarranz i col. (Zarranz i col., 2004) en una família del País Basc afectada per Demència amb cossos de Lewy, en els que s'ha detectat una mutació, E46K, responsable de la DLB, dins la regió dels dominis repetits KTKEGV de l' $\alpha$ -sinucleïna, molt crítica per la funció de la proteïna.

### **5.2.1. Clínica de la DLB**

Les DLBs són primerament un síndrome de demència progressiva (Hansen i col., 1998; McKeith i col., 1994; McKeith i col., 1996; Perry i col., 1990). Les alteracions en la memòria són mínimes en els primers estadis de la malaltia, per tan, s'han d'escollir altres criteris de diagnosi més concrets per aquesta patologia com són la percepció visual, la capacitat de prestar atenció o la percepció visual-espacial (Calderon i col., 2001). Així doncs, s'han creat per consens uns criteris de diagnosi clínica que són els següents:

- Disminució de la capacitat cognitiva: tan de les modalitats corticals, com serien la memòria, el llenguatge i l'associació de la vista amb l'espai, com de les modalitats subcorticals, o sigui aprenentatge, velocitat psicomotora o habilitat visuoconstructiva (Calderon i col., 2001; Galloway i col., 1992; Hansen i col., 1990; Sahgal i col., 1992; Sahgal i col., 1992; Sahgal i col., 1995; Salmon i col., 1996). Els dèficits de memòria de les DLBs afecten sobretot la memòria semàntica i la conservació de la memòria a curt termini (Calderon i col., 2001; Lamb i col., 1998). En pacients de la DLBc, la baixada cognitiva és més important al principi de

la malaltia, mentre que el parkinsonisme és menys prevalent (Luginger i col., 2000).

- **Al·lucinacions visuals:** És un tret molt característic de la patologia que comença de manera molt important en els seus inicis i es manté tot al llarg de la malaltia (Ballard i col., 1997; Ballard i col., 1999). Aquestes al·lucinacions estan molt ben formades i estan relacionades sobretot amb persones i animals. (Klatka i col., 1996; McKeith i col., 1992; McShane i col., 1995)
- **Coneixement fluctuant:** els pacients amb DLB presenten períodes fluctuants en el seu estat de coneixement i nivell de consciència en períodes que van de minuts a dies o setmanes (McKeith i col., 1996).
- **Parkinsonisme:** Més del 75% dels pacients amb DLB desenvolupen alteracions en el moviment extrapiramidal fortament reminiscent a la malaltia de Parkinson (Ballard i col., 1997), però amb signes més greus (Louis i col., 1997). Tot i així el parkinsonisme no és essencial per a la diagnosi clínica de la malaltia.

### **5.2.2 Neuropatologia de la DLB**

El principal tret distintiu és l' $\alpha$ -sinucleïnopatia, manifestada en forma de cossos de Lewy d'ambdós tipus, els clàssics i els de tipus cortical i de neurites en degeneració. Els cossos de Lewy corticals sembla que afecten diverses poblacions de neurones com les cèl·lules piramidals i les interneurons gabaèrgiques (Gómez-Tortosa i col., 2000; Smith i col., 1995; Wakabayashi i col., 1995). D'acord amb els criteris consens de diagnosi clínica de la malaltia, un pacient sense cossos de Lewy es pot diagnosticar com a DLB (McKeith i col., 1996).

També s'han formulat unes guies consens de diagnosi patològic, perquè d'alguna manera es pogués classificar la severitat i la distribució anatòmica dels cossos de Lewy en el córtex cerebral. Aquest criteri, com s'ha fet molt sovint de forma errònia, no es poden utilitzar com a criteri diagnòstic. El sistema de classificació de la patologia dels cossos de Lewy corticals es basa en 5 àrees corticals: El córtex trasnientorrinal o àrea 29 de Brodman (BA29), el girus cingulat anterior (BA24), el girus medial/frontal (BA8/9), la part superior del girus medial/temporal (BA21) i el lòbul parietal o inferior (BA40). S'han escollit aquestes àrees en base a la seva implicació en la patologia dels cossos de Lewy. El sistema de classificació defineix 3 categories dins de les quals es poden assignar els casos: "tronc de l'encèfal-predominats", límbiques i neocorticals (McKeith i col., 1996). Aquestes guies es van formular abans de conèixer el paper de l' $\alpha$ -sinucleïna en la formació dels cossos de Lewy i els llindars per a classificar la patologia (0, 1-4 i +5 cossos de Lewy per regió) es van fer d'acord amb la immunohistoquímica per a ubiquitina o bé amb la tinció típica d'hematoxilina-eosina.

Tot i que no està clar que la immunohistoquímica per a l' $\alpha$ -sinucleïna sigui més sensible que la de la ubiquitina, sí que és més específica per a la detecció dels cossos de Lewy (Gómez-Tortosa i col., 2000). La distribució anatòmica dels cossos de Lewy no segueix un patró jeràrquic de distribució.

Es troben sobretot en els nuclis pigmentats de la part central del cervell així com en els del tronc de l'encèfal, els nuclis dorsals eferents del vague de la medulla, els nuclis colinèrgics del presencèfal (nuclis basals de Meynert) i regions límbiques corticals especialment l'amígdala i els córtex entorrinal i cingulat anterior (Alvord i col., 1974; Braak i col., 2001; Braak i col., 1994; de Vos i col., 1995; Den Hartog i col., 1960; Hansen, 1997; Iseki i col., 2001; Kosaka i col., 1996; Perry i col., 1990). Rarament es troben al córtex occipital (Perry i col., 1990). En alguns casos apareixen cossos de Lewy a l'amígdala sense la implicació clara de les neurones de la nigra (Hamilton, 2000). De totes maneres el diagnòstic d'exclusió per les DLBs és la immunohistoquímica per a l' $\alpha$ -sinucleïna (Spillantini i col., 1997).

A part dels cossos de Lewy, ultraestructuralment les DLBs també es caracteritzen per les neurites de Lewy, que són lesions neurítiques immunoreactives per a l' $\alpha$ -sinucleïna, ubiquitina i tau fosforilat (Dickson i col., 1987). Es troben en regions com són el nucli caudat, el putamen, el claustre, el tàlem i l'amígdala (Dickson i col., 1987).

La gliosi i la pèrdua de sinapsi també són característiques de les DLBs en general (Campbell i col., 2000; Hansen i col., 1990). La pèrdua de les sinapsis es correlaciona amb la demència, però no té cap valor com a criteri diagnòstic per a discriminar amb les altres demències. També s'han descrit lesions glials en les DLB, amb els astròcits en forma d'espina immunoreactius per a l' $\alpha$ -sinucleïna (Terada i col., 2000). Les lesions glials són escases en les DLBs i la presència concurrent dels cossos de Lewy permet diferenciar-les de l'atròfia multisistèmica (MSA), en la que les inclusions oligodendroglials immunoreactives per a l' $\alpha$ -sinucleïna són el principal tret característic (Lantos i col., 1998).

### **5.2.3. L' A $\beta$ PP i DLBs**

Anteriorment s'ha esmentat que en la variant comú de la DLB és freqüent l'acumulació de plaques senils i de filaments del neuròpil, típics de la malaltia d'Alzheimer (Gibb i col., 1987; Lippa i col., 1994; McKeith i col., 1996; Ince i col., 1998). El component principal de les plaques senils és la proteïna  $\beta$ -amiloide, derivada de la proteïna de membrana anomenada A $\beta$ PP (proteïna precursora de l'amiloide) (Kang i col., 1987; Selkoe i col., 1988; Duyckaerts i col., 2003). El component principal de la deposició  $\beta$ -amiloidea és el pèptid  $\beta$ A4, que s'allibera del processament de l'A $\beta$ PP (Masters i col., 1985). L'A $\beta$ PP està codificat per un únic gen de 19 exons al cromosoma 21 del qual en deriven diferents isoformes per *splicing* alternatiu: A $\beta$ PP695, A $\beta$ PP751, A $\beta$ PP770 en són els principals

transcrits (Yoshikai i col., 1990). L'A $\beta$ PP751 i l'A $\beta$ PP770, contenen l'exó 7, que codifica per un domini inhibidor de proteases anomenat "Inhibidor Kunitz de proteasa", o KPI. L'A $\beta$ PP695 és la forma predominant al teixit neural, mentre que les isoformes A $\beta$ PP751 i A $\beta$ PP770, tenen una expressió ubíqua, i a més a la glia estan altament expressades (Kitaguchi i col., 1988; Ponte i col., 1988; Tanzi i col., 1988; Kang i Muller-Hill, 1990). L'expressió proteica augmentada de les variants KPI en homogenats de cervell d'AD, s'ha suggerit com a possible origen de la deposició  $\beta$ -amiloidea (Moir i col., 1998).

### **5.3 Atròfia Multisistèmica (MSA)**

L'Atròfia Multisistèmica (MSA) és una de les malalties neurodegeneratives més enigmàtiques, tan clínicament com neuropatològicament. Es tracta d'una malaltia neurodegenerativa esporàdica que es manifesta amb parkinsonisme, atàxia cerebel·lar i disfunció del sistema autònom. Patològicament es caracteritza per atròfia olivopontocerebel·lar, degeneració de la substància negra i estriat, i la pèrdua de neurones en el sistema autònom. La combinació dels fenotips neuropatològics ens porta a classificar l'MSA en MSA-C, que conté l'MSA amb atròfia olivopontocerebel·lar, i l'MSA-P, que contempla la neurodegeneració de la substància negra (Lantos i Quinn, 2003; Dickson i col., 1999; Jellinger, 2003). L'epidemiologia de l'MSA es desconeix, tot i que hi ha un estudi en el que es presenta la relació home/dona de 1.3:1 (Wenning i col., 1997).

No es coneixen tampoc els factors que provoquen aquesta malaltia ja que no s'han trobat defectes a la cadena respiratòria mitocondrial ni de mitocondris ni de plaquestes de la substància negra (Gu i col., 1997). Sí que hi ha evidències d'alteracions en el sistema oxidatiu donat que s'han trobat increments de ferro i de ferritina a la substància negra i a l'estriat de pacients d'MSA (Dexter i col., 1992).

La singularitat de l'MSA però, és la identificació d'inclusions oligodendroglials típiques, anomenades inclusions citoplasmàtiques glials (GCI) descrites anteriorment (Lantos i Quinn, 2003; Lantos, 1998).

L'MSA és una sinucleïnopatia bastant desconeguda fins ara, no està descrita una epidemiologia concreta i genèticament no s'han trobat alteracions en els gens típics de malalties neurodegeneratives, com són en aquest cas l' $\alpha$ -sinucleïna (Ozawa i col., 1999), la proteïna tau, l'apolipoproteïna E o la sinfilina (Morris i col., 2000).

#### **5.3.1 Clínica de l'MSA**

Els trets clínics de l'MSA que s'utilitzen per a la diagnosi són el parkinsonisme, els signes piramidals i cerebel·lars, i mal funcionament en el sistema autònom (Wenning i col., 1994a). Un tret clínic que es manifesta en episodis primerencs és l'alteració en la fase

REM del son (RBD), durant el qual els pacients criden o parlen, poden agredir al company o caure del llit (Plazzi i col., 1997). Aquest símptoma apareix al principi de la malaltia i desapareix al cap de 2 anys. En canvi en pacients de Parkinson es pot manifestar en els estadis finals de la malaltia (Iranzo i col., 2000).

Un altre dels símptomes primerencs en homes, és la disfunció erèctil masculina (MED). Gairebé tots els pacients d'ambdós sexes presenten alteracions urinàries, incontinença, retenció o doble micturició. Els uroneuròlegs mantenen que aquest no són símptomes estrictament del sistema autònom, i que s'han de classificar dins d'una clínica apart.

Els pacients d'MSA es caracteritzen també per alteracions en el sistema autònom cardiovascular i per parkinsonisme.

Les alteracions cerebel·lars es manifesten com a alteracions en el moviment de l'ull i atàxies límbica o de la posició.

La parla dels pacients d'MSA també és característica. A part de la monotonía del parkinsonisme, la veu és més hipofònica, amb un augment del to al parlar, amb un to de veu anormalment ronc i tremolós.

Tot i alguns dèficits frontals dels pacients d'MSA, que es poden detectar mitjançant tests neuropsicològics, aquests no solen presentar demència (Robins i col., 1992). Un quadre de demència, parkinsonisme i alteracions en el sistema autònom és més típic d'una DLB que d'un cas d'MSA.