

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y
PARASITOLOGÍA

ESTUDIO DE UN MODELO CATECOLAMINÉRGICO DEL
SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO Y SU RELACIÓN CON
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON Y LAS DISFUNCIONES
SIMPÁTICAS DERIVADAS

MARÍA FELICIDAD CANO JAIMEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 17 de Juliol de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Juan José Toledo Aral
- D^a. Rosa Soler Tatché
- D. Santiago Ambrosio Viale
- D. Ignacio Marín Lozano
- D. Francisco Pérez Sánchez

Va ser dirigida per:

D^a. Isabel Fariñas Gómez

©Copyright: Servei de Publicacions
María Felicidad Cano Jaimez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6959-3

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITATĠ VALÈNCIA

Departament de Genètica



TESIS DOCTORAL

**Estudio de un modelo catecolaminérgico
del sistema nervioso periférico
y su relación con
la enfermedad de Parkinson y
las disfunciones simpáticas derivadas**

**MARIA FELICIDAD CANO JAIMEZ
VALÈNCIA 2007**

VNIVERSITAT^Ń DE VALÈNCIA

Facultat de Biologia



ESTUDIO DE UN MODELO CATECOLAMINÉRGICO
DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO
Y SU RELACIÓN CON
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON Y
LAS DISFUNCIONES SIMPÁTICAS DERIVADAS

Memoria presentada por
Maria Felicidad Cano Jaimez
para optar al grado de
Doctora

Directora
Isabel Fariñas Gómez



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departamento de Biología Celular y Parasitología
Área de Biología Celular
Unidad de Neurobiología Molecular

Dra. Dña. ISABEL FARIÑAS GÓMEZ, profesora titular del Departamento de Biología Celular y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia

CERTIFICA: Que Dña. MARIA FELICIDAD CANO JAIMEZ, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria que lleva como título “Estudio de un modelo catecolaminérgico del sistema nervioso periférico y su relación con la enfermedad de Parkinson y las disfunciones simpáticas derivadas” para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste, en cumplimiento con la legislación vigente, expido el siguiente certificado en Burjassot, abril de 2007.

Fdo. Dra. Dña. Isabel Fariñas Gómez

Quisiera dar las gracias a todos los que han hecho realidad este momento...

A Isabel por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y poner tanto empeño y paciencia en tratar de enseñarme y “abrirme tantas veces los ojos”.

Al Dr. Alun Davies por hacerme un hueco en su laboratorio, muy especialmente a Lucia y Nondas por enseñarme los cultivos periféricos contribuyendo así a este trabajo de tesis; también a Xavi, Humberto, Rosa,... porque todos me hicieron pasar una estancia inolvidable en Edimburgo.

Al Dr. Arnon Rosenthal porque sin su contribución con los ratones de sinucleína este trabajo no hubiera sido posible. Al Dr. Santiago Ambrosio por las determinaciones de noradrenalina y al Dr. José González Castaño por su aportación de la línea de células PC12 sin los cuales no se hubiera podido completar dicho trabajo de tesis.

A los profesores del departamento de Biología Celular de la UV porque todos contribuistéis a “engancharme” a este mundo de la investigación durante los años de carrera. En especial a Martina -MK, y los “churros”, Paco –mi eterna fuente bibliográfica-, Rosana -toda energía- y a Verdugo porque con él inicie esta aventura.

A mis compañeros de laboratorio, Elena, Sacri, Miguel (y Pili), Teresa, Celia, Laura -la primera hornada- por tantas horas y años y vivencias compartidas desde los orígenes del laboratorio... porque he aprendido mucho de vosotros y me habéis apoyado en los momentos difíciles. En especial a Miguel por compartir con él el mundo sinucleína y agradecerle sus inmunodetecciones de corazón y a Elena porque con ella me adentré en el mundo de los DRGs embrionarios. A Helena y Pili porque habéis impulsado una verdadera “revolución científica” en el lab. A M^a Ángeles, Nati, Zoraida, Mari Paz y M^a José, y Ana “la canaria” -la segunda hornada- por vuestro entusiasmo y aliento. Han sido tantos “cortaditos y populares” compartidos (y a los que los hicieron realidad)... A los “genéticos” del grupo de Ignacio, Sergio, Toni, Miguel, Jorge e Ignasi.

A antiguos compañeros de laboratorio, Mario, Lucía, Nuria, Almudena,... A Carmen y Paco por sus ánimos, ratos juntos y la pasión compartida por Manolo García. A los otros compañeros del departamento Gregori, Sabina, Anabel,... A Tomás, Pilar, Mari Tere y Enrique por su disponibilidad y apoyo técnico en la microscopía.

A mis compañeros y amigos del Cor de Cambra Mestral de Alaquàs, en especial a Xus y Manel, M^a Jesús y Victor, Elena y Vicente. También a Jose, María y Clara. Por vuestro apoyo. A Toni, por ayudarme en tantas incursiones informáticas. A Sandra, por compartir tantas inquietudes como amigas y mujeres. A Juani, por su inagotable amistad.

Al grupo de “Mantenimiento” del Campus, por subirme la adrenalina y endorfinas... en especial a Ana y su entusiasmo. A Joan y Vanesa –siempre más y mejor-. A los Pacos y los Pepes. A Diego por su iniciación al Tai-Chi en esta última etapa de tesis.

A mi hermano Juan Manuel y a Isa, y mis sobrinos Iván, Macarena y Carlos porque su amor y energía me han dado aliento para seguir adelante en este camino. También a mis padrinos, tías y tíos, primas y primos de Terrassa, Valencia, Ventorros de Balerna y Loja, por su apoyo y calor.

A mis padres, Manuel y Felicidad, por los valores que me han transmitido, su cariño y comprensión y estímulo para seguir siempre adelante. Va por vosotros. A mi abuela Caridad, por sus continuas muestras de cariño. También a mi abuela MamaEncarna.

A Juan, por su paciencia, comprensión y apoyo durante todos estos años. Por todo lo que hemos vivido y compartido juntos.

A la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana por financiar parte de este trabajo predoctoral. A *Joves Investigadors* por su lucha contra la precariedad becaria.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP)	3
1.1.1. <i>Síntomas clínicos de la EP: hipocinesia</i>	3
1.1.2. <i>Fisiopatología de la EP : ganglios basales y dopamina</i>	3
1.1.3. <i>Histopatología de la EP: pérdida neuronal y cuerpos de Lewy</i>	5
1.2. ETIOLOGÍA DE LA EP	6
1.2.1. <i>Factores ambientales: casos esporádicos y drogas “parkinsonianas”</i>	8
1.2.2. <i>La genética de la EP</i>	9
1.2.3. <i>El primer factor genético: el gen PARK1 y la α-SYN</i>	10
1.2.4. <i>Otros factores genéticos identificados</i>	13
1.2.5. <i>Patogénesis: neurodegeneración en la EP</i>	16
1.3. MODELOS ANIMALES EN EL CONTEXTO DE LA EP	19
1.3.1. <i>Modelos experimentales de parkinsonismo tóxico</i>	20
1.3.2. <i>Modelos genéticos por manipulación de genes asociados a EP familiar</i>	23
1.3.3. <i>Modelo de pérdida de función para la α-syn en ratón</i>	24
1.3.4. <i>Modelos de ganancia de función para la α-syn en ratón</i>	25
1.4. LA EP Y EL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO (SNP)	27
1.4.1. <i>Síntomas autonómicos en la EP</i>	27
1.4.2. <i>Organización del SNP: división autonómica y sensorial</i>	32
1.4.3. <i>Desarrollo del sistema nervioso simpático: gangliogénesis, neurotrofismo y señalización intracelular</i>	34
1.4.4. <i>Otros sistemas catecolaminérgicos: neuronas sensoriales viscerales</i>	41
1.4.5. <i>Vulnerabilidad del SNP a drogas “parkinsonianas”</i>	42
2. OBJETIVOS	44
3. MATERIAL Y MÉTODOS	46
3.1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS	47
3.1.1. <i>Animales y condiciones de estabulación</i>	47
3.1.2. <i>Genotipado</i>	47
3.1.3. <i>Inyección de BrdU</i>	49
3.1.4. <i>Inyecciones de MPTP</i>	49
3.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS <i>IN VIVO</i>	49
3.2.1. <i>Procesamiento histológico</i>	49
3.2.2. <i>Técnicas inmunohistoquímicas</i>	50
3.2.3. <i>Recuentos celulares</i>	52
3.3. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS	52
3.3.1. <i>Disección, disociación y sembrado de las células</i>	52
3.3.2. <i>Tratamientos</i>	56
3.3.3. <i>Recuentos de supervivencia neuronal</i>	56

3.3.4. Estudios morfométricos	57
3.3.5. Inmunocitoquímica.....	57
3.4. CULTIVO DE CÉLULAS PC12.....	58
3.4.1. Mantenimiento y tratamientos.....	58
3.4.2. Ensayos de viabilidad celular	59
3.4.3. Inmunofluorescencia.....	59
3.5. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	60
3.5.1. Extracción de proteínas	60
3.5.2. Electroforesis y transferencia	60
3.5.3. Inmunodetección.....	61
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
4. RESULTADOS.....	63
4.1. ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA A-SYN EN EL SNP	64
4.1.1. Marcadores específicos para la α -SYN.....	64
4.1.2. La α -SYN se expresa abundantemente en el sistema sensorial y el simpático.....	65
4.1.3. La α -SYN se expresa en neuronas postmitóticas	68
4.2. FENOTIPO <i>IN VIVO</i> DEL SNP DEL MUTANTE DE A-SYN	71
4.2.1. La α -SYN no es esencial para el desarrollo normal de la división sensorial del SNP: complejo petroso-nodoso (NOD).....	72
4.2.2. La α -SYN no es esencial para el desarrollo normal de la división simpática del SNP: ganglio cervical superior (SCG).....	73
4.3. FENOTIPO <i>IN VITRO</i> DE LAS NEURONAS PERIFÉRICAS DEL MUTANTE DE A-SYN.....	75
4.3.1. La α -SYN no modula la morfología o la respuesta neurotrófica de las neuronas sensoriales en cultivo.....	75
4.3.2. La α -SYN no modula la morfología o la respuesta neurotrófica de las neuronas simpáticas en cultivo.....	78
4.3.3. La α -SYN modula la vía de supervivencia de las PLC γ 1/PKC δ , pero no la de la PI3K/Akt	84
4.4. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LA A-SYN EN APOPTOSIS INDUCIDA EN NEURONAS SIMPÁTICAS ..	90
4.4.1. La α -SYN no participa en la apoptosis inducida por daño genético.....	90
4.4.2. La ausencia de α -SYN no modifica la muerte inducida por la droga parkinsoniana MPP ⁺	92
4.4.3. La sobreexpresión de α -SYN no modifica la muerte inducida por la droga parkinsoniana MPTP/MPP ⁺	96
4.4.4. Los niveles de α -SYN no modifican la respuesta del sistema simpático a la intoxicación <i>in</i> vivo con MPTP.....	99
5. DISCUSIÓN.....	103
6. CONCLUSIONES.....	117
7. BIBLIOGRAFIA.....	119

ABREVIATURAS

ara-C	citosina arabinósido
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i> o factor neurotrófico derivado de cerebro
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
COMT	catecol-O-metiltransferasa
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DAT	<i>dopamine transporter</i> o transportador de dopamina
DLB	demencia con cuerpos de Lewy
DMI	desipramina
DMSO	sulfóxido de dimetilo
E	día embrionario
EP	enfermedad de Parkinson
FAP	fallo autonómico primario
LB	<i>Lewy body</i> ; cuerpos de Lewy
LRRK2	<i>leucine-rich repeat kinase 2</i> ; quinasa con repeticiones ricas en leucina 2
MAO-B	<i>monoaminoxidasa tipo B</i>
MAPK/ERK	<i>mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase</i>
MPP⁺	1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MSA	<i>multisystem atrophy</i> o atrofia multisistémica
NAT	<i>noradrenalina transporter</i> ; transportador de noradrenalina
NGF	<i>nerve growth factor</i> ; factor de crecimiento nervioso
NOD	ganglio nodoso
NT-3	neurotrofina 3
6-OHDA	6-hidroxidopamina
P	día posnatal
PI3K	fosfatidil inositol 3'-quinasa
PINK1	<i>PTEN induced putative kinase 1</i> ; posible quinasa inducida por PTEN 1
PKC	proteína quinasa C
PKCδ	PKC delta
α-syn	gen <i>alfa-sinucleína</i> (o <i>α-sinucleína</i>)
α-SYN	proteína Alfa-sinucleína
SCG	ganglio cervical superior
SNA	sistema nervioso autonómico
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
SNpc	<i>substantia nigra pars compacta</i>
tg⁺	ratón transgénico que sobreexpresa la α -syn humana bajo el promotor del gen <i>TH</i>
tg⁻	ratón no transgénico
TH	tirosina hidroxilasa
UCHL1	<i>ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1</i> ; esterasa carboxi-terminal de ubiquitina L1
VMAT2	<i>vesicular monoamine transporter 2</i> ; transportador de monoaminas vesicular

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas forman un grupo heterogéneo que incluye desde enfermedades de tipo esporádico y hereditario, como las de Alzheimer o Parkinson, pasando por enfermedades puramente hereditarias, como la de Huntington, hasta enfermedades infecciosas debidas a priones. Estamos acostumbrados a considerar que cada enfermedad neurodegenerativa afecta a poblaciones neuronales específicas: la corea de Huntington causa la muerte de las neuronas del núcleo caudado, ocasionando movimientos caóticos, la enfermedad de Parkinson (EP) destruye neuronas de la *substantia nigra* (SN) y produce rigidez y temblor, impidiendo el inicio de los movimientos, la esclerosis lateral amiotrófica daña las neuronas motoras espinales y corticales y causa debilidad y espasmos, la enfermedad de Alzheimer afecta al hipocampo y los lóbulos parietales y previene la formación de nuevos recuerdos. Actualmente, sin embargo, se considera que este concepto, que podríamos llamar de *vulnerabilidad selectiva*, aunque operativamente muy útil es, en realidad, una simplificación (Hardy y Gwinn-Hardy, 1998). Así, los pacientes con corea de Huntington, EP y esclerosis lateral amiotrófica pueden desarrollar demencia en las fases tardías de la enfermedad, lo que refleja una patología cortical, y los pacientes con enfermedad de Alzheimer frecuentemente desarrollan parkinsonismo. Por tanto, se piensa que las enfermedades neurodegenerativas pueden ser generadas por mecanismos comunes. No hay que olvidar que las enfermedades neurodegenerativas comparten muchos aspectos en sus manifestaciones más tardías. En todas ellas se producen depósitos anormales de proteínas y déficit funcionales dramáticos de naturaleza progresiva, debidos a pérdida de neuronas y a alteraciones sinápticas (Hardy y Gwinn-Hardy, 1998). La aparente selectividad neuronal sería debida, por tanto, a que cada enfermedad afecta en grado variable a poblaciones distintas de neuronas a lo largo del tiempo durante el que se desarrolla la enfermedad. La plasticidad propia del sistema nervioso permitiría una cierta compensación funcional hasta que se produce una cantidad de daño tan grande que genera un fallo catastrófico, en la población neuronal más susceptible o afectada. El resultado es que, muchas veces, las enfermedades dan la apariencia de ser selectivas cuando, de hecho, tienen un efecto global que afecta a distintos sistemas funcionales en momentos distintos a lo largo de la evolución de la enfermedad.

La forma ideal de combatir estas enfermedades sería conocer con detalle las causas que las producen y poder detenerlas en sus inicios, antes de que los primeros signos inequívocos de deterioro se manifiesten. Desgraciadamente, hoy en día, el diagnóstico de estas enfermedades se produce en fases muy avanzadas de la patología, cuando ya se ha producido la pérdida de innumerables neuronas. Es, por tanto, importante encontrar procesos comunes a las distintas enfermedades que puedan proporcionarnos información acerca de cómo se generan estas neuropatologías en los primeros estadios. Análisis moleculares y genéticos realizados en los últimos años han descrito la participación de una proteína presináptica, la α -sinucleína (α -SYN), en la génesis de la EP y posiblemente de otras patologías, colectivamente denominadas α -sinucleopatías, constituyéndose en el primer posible elemento molecular común a distintas enfermedades neurodegenerativas.

1.1. Características de la enfermedad de Parkinson (EP)

La EP es una enfermedad neurodegenerativa asociada al envejecimiento y caracterizada por alteraciones motoras severas. Se trata de la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, tras la enfermedad de Alzheimer, y afecta sobre todo a la población de la tercera edad (prevalencia de 0,6-3,6% en el intervalo de 65-80 años en la población europea). La edad media de inicio de la enfermedad es 55 años y, entre esta edad y los 70 años, la incidencia aumenta hasta seis veces (de Lau y Breteler, 2006).

1.1.1. Síntomas clínicos de la EP: hipocinesia

La EP fue descrita originalmente en 1817, cuando el médico británico James Parkinson publicó una ponencia sobre lo que llamó la "parálisis temblorosa" (reeditado en Parkinson, 2002). En ese documento, se exponían los síntomas principales de la enfermedad que posteriormente llevaría su nombre. Los enfermos con EP presentan una sintomatología clínica típica (síntomas primarios), con disfunciones motoras características que incluyen la dificultad para iniciar el movimiento (acinesia), movimientos ralentizados (bradicinesia), rigidez muscular, temblor en reposo e inestabilidad postural. Existen otra serie de síntomas (síntomas secundarios) que acompañan a los motores, como depresión, cambios y/o problemas emocionales o alteraciones periféricas autonómicas, que pueden ser variables en su momento de aparición e intensidad dependiendo de cada individuo.

1.1.2. Fisiopatología de la EP : ganglios basales y dopamina

A principios de la década de 1960 se identificó el defecto cerebral fundamental que causa los síntomas más característicos de la EP: la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc). La muerte de estas neuronas causa una pérdida de inervación dopaminérgica en las regiones a las que la SNpc proyecta, los núcleos caudado y putamen, estructuras implicadas en el control del movimiento. La dopamina es un neurotransmisor de la familia de las catecolaminas que contribuye a la precisión de los movimientos y la coordinación de los cambios de postura en los mamíferos por su acción en los circuitos de los ganglios basales. Los llamados "ganglios basales" comprenden cuatro núcleos principales: el estriado (núcleos caudado, putamen y *accumbens* en humanos), el globo pálido (segmento externo e interno), la SN (parte compacta y reticular) y el núcleo subtalámico. Las fibras dopaminérgicas que inervan el estriado desde la SNpc establecen contactos sinápticos

con neuronas GABAérgicas de proyección que poseen receptores para dopamina de tipo D1 o de tipo D2. La acción de la dopamina sobre estas neuronas depende del tipo de receptor, ya que la acción sobre receptores D1 causa una despolarización de la neurona postsináptica, mientras que la interacción del neurotransmisor con receptores D2 causa una inhibición. Las neuronas estriatales GABAérgicas con receptores D1 y D2 proyectan a núcleos distintos, por lo que las acciones iniciadas por la dopamina pueden seguir dos caminos distintos, las llamadas “vía directa” y “vía indirecta” (Figura 1). La vía estriatopallidal directa se inicia con la activación por dopamina de neuronas del estriado a través de receptores D1; estas neuronas proyectan al globo pálido interno (GPi) y la SN reticular (SNr), causando una inhibición de las neuronas de estos núcleos. Las neuronas de estos núcleos también utilizan GABA como neurotransmisor en sus dianas en el tálamo, por lo que la acción inicial de la dopamina causa una desinhibición (activación) de las aferencias glutamatérgicas a la corteza motora. En la vía indirecta, las proyecciones estriatales no se dirigen directamente al GPi y la SNr sino que el globo pálido externo (GPe) y el núcleo subtalámico (STN) actúan como estaciones de relevo intermedias. Las neuronas estriatales con receptores D2, inhiben al GPe al recibir la estimulación dopaminérgica. Éste, a su vez, inhibe al STN cuyas neuronas son excitadoras glutamatérgicas y proyectan al GPi y a la SNr. En un estado normal, no deficiente en dopamina, está activada la proyección talámica sobre la corteza motora. En una situación en la que falta dopamina, como en la EP, su acción sobre ambas vías conduce a una inhibición anormal de dicha proyección, y como consecuencia, a los trastornos característicos (ver revisión de Lang y Lozano, 1998; Gerfen, 2006).

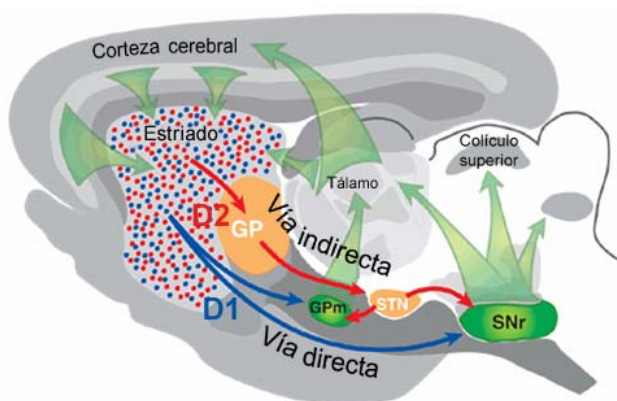


Figura 1. Vías centrales responsables del control del movimiento motor. Vías directa e indirecta señaladas sobre el esquema de una sección sagital de cerebro de ratón. La corteza cerebral y el tálamo proporcionan una innervación excitatoria (flechas verdes) al estriado. Las eferencias de los ganglios basales se originan del globo pálido medial (GPm) y la *substantia nigra pars reticulata* (SNr) dirigiéndose hacia los núcleos talámicos, que proyectan a áreas frontales de la corteza cerebral. La vía directa se origina a partir de las neuronas de proyección estriatal (puntos azules, neuronas con receptores D1) cuyos axones (flechas azules) se extienden hacia los núcleos GPm y SNr. La vía indirecta se origina a partir de las neuronas estriatopallidales (rojas, neuronas con receptores D2) cuyos axones terminan dentro del globo pálido (GP). Las neuronas del GP proyectan al núcleo subtalámico (STN), que a su vez proyecta al GPm y SNr. Por tanto, las neuronas estriatopallidales están conectadas indirectamente, a través del GP y el STN, con las eferencias de los ganglios basales. Modificado de Gerfen, 2006.

Los síntomas primarios de los síndromes parkinsonianos no aparecen hasta que ha desaparecido el 50% de las neuronas dopaminérgicas o la dopamina del estriado se ha reducido en un 75-80%, pudiendo transcurrir entre 10-20 años desde el inicio de la enfermedad hasta su detección, y de ahí la importancia de realizar un diagnóstico acertado en las etapas iniciales de la enfermedad (Dunnett y Björklund, 1999). De hecho, clínicamente, cualquier enfermedad que causa una deficiencia de dopamina en los núcleos caudado/putamen puede causar “parkinsonismo”, un síndrome caracterizado por temblor en reposo, rigidez, hipocinesia y acinesia e inestabilidad postural. La EP es la causa más común de parkinsonismo, siendo responsable del 80% de los casos. Puesto que otras formas de parkinsonismo distintas de la EP tienen síntomas similares pero requieren tratamientos diferentes, es esencial diagnosticar rápida e inequívocamente la enfermedad para iniciar el tratamiento adecuado. Actualmente, para confirmar el diagnóstico en la fase clínica se realiza una tomografía axial computerizada (TAC) para detectar lesiones típicas en el mesencéfalo. Otra técnica de diagnóstico es la tomografía por emisión de positrones (PET) con [¹⁸F]fluoroDOPA, análogo de la L-DOPA marcado radiactivamente. La captación de este precursor metabólico de la dopamina es directamente proporcional al número de terminales sinápticos dopaminérgicos presentes en una zona y, por tanto, el nivel de señal en el PET da una idea de si se han producido pérdidas de inervación dopaminérgica al área evaluada. Esta técnica muestra como en los enfermos de Parkinson existe una reducción de la captación predominantemente en el putamen (ver revisión de Lang y Lozano, 1998).

1.1.3. Histopatología de la EP: pérdida neuronal y cuerpos de Lewy

Aunque el diagnóstico de la EP en los pacientes se realiza en base a los síntomas clínicos, la confirmación definitiva requiere la identificación *post mortem* de las manifestaciones histopatológicas que definen a esta enfermedad. Los marcadores patológicos de la EP son la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la presencia de inclusiones proteicas citoplasmáticas intraneuronales, denominadas cuerpos de Lewy (LBs) (Shults, 2006). Las neuronas de la SNpc contienen, normalmente, cantidades importantes del pigmento neuromelanina (Marsden, 1983), lo que hace que su pérdida en pacientes con EP se manifieste como una despigmentación en la zona que ocupan. Las neuronas de este núcleo proyectan principalmente al putamen, núcleo en el que se produce el mayor déficit en dopamina durante la enfermedad (Bernheimer *et al.*, 1973). Las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, adyacente a la SN, están mucho menos afectadas en la EP y, por tanto, el déficit en dopamina es menor en el núcleo caudado al que éstas neuronas tegmentales proyectan (Price *et al.*, 1978).

El análisis *post mortem* del cerebro de un enfermo de Parkinson revela la presencia de LBs, así como de neuritas distróficas, conteniendo también acúmulos proteicos, en neuronas de la SNpc. Los LBs son agregados proteicos citoplasmáticos esféricos y muy eosinófilos en preparaciones convencionales de anatomía patológica. Están compuestos por diversas proteínas, incluyendo parkina, ubiquitina y neurofilamentos, aunque el componente mayoritario es la α -SYN (Spillantini *et al.*, 1998). Miden más de 15 μ m de diámetro y tienen una estructura organizada, con un centro denso hialino y un halo claro. Los análisis mediante microscopía electrónica muestran que el centro tiene una estructura gránulo-vesicular y que el anillo exterior está compuesto por fibrillas de 8-10 nm en una configuración radial desde el centro (Duffy y Tennyson, 1965). Los LBs se encuentran en todas las áreas cerebrales afectadas por la enfermedad (Forno, 1986; Spillantini *et al.*, 1998), lo que sugiere una relación causal. Aun así, los LBs no son específicos de la EP ya que pueden encontrarse en pacientes con enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, fallo autonómico progresivo (FAP) y en otras más (Shults, 2006) e, incluso, como una manifestación patológica incidental en personas de edad avanzada (Gibb y Lees, 1988).

Aunque la neuropatología más característica de la EP es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas, la neurodegeneración afecta también a neuronas noradrenérgicas (*locus coeruleus*), serotoninérgicas (núcleo del rafe), colinérgicas (núcleo basal de Meynert, núcleo dorsal motor del vago), e incluso a neuronas de la corteza cerebral, hipotalámicas, bulbo olfatorio y sistema nervioso autonómico (ganglios simpáticos, parasimpáticos y sistema nervioso entérico), en un patrón neurodegenerativo progresivo, que se manifiesta, generalmente, en estadios avanzados de la enfermedad (Braak *et al.*, 2004; Figura 2). Estas pérdidas neuronales son responsables de otros síntomas asociados a la EP, como la demencia de las etapas tardías de la enfermedad o los problemas periféricos que veremos más adelante, entre otros. El hecho de que la afectación no se restrinja a un solo tipo de neuronas sugiere que a alteraciones asociadas a la neurodegeneración característica de la EP pueden no estar operando de forma exclusiva en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, aunque la especificidad de la enfermedad en sus manifestaciones iniciales indique que las neuronas de este núcleo son especialmente vulnerables a dichas alteraciones.

1.2. Etiología de la EP

La falta de comprensión de las causas detonantes de esta enfermedad ha hecho que todavía estemos lejos de un tratamiento eficaz que prevenga el inicio de la enfermedad o que detenga su progresión. Las causas de la aparición de la enfermedad no están muy claras,

aunque parece que existen tanto razones ambientales como genéticas. El 90% de los casos de EP se denominan “idiopáticos” o “esporádicos”, sin un claro componente familiar hereditario detectable. Para estos casos se ha propuesto normalmente una causa ambiental. El 10% de los casos están causados por alteraciones en un único gen (Olanow y Tatton, 1999; de Lau y Breteler, 2006). La identificación de varios de estos genes ha hecho avanzar nuestra comprensión de los mecanismos implicados en la génesis de esta enfermedad (ver Tabla 1).

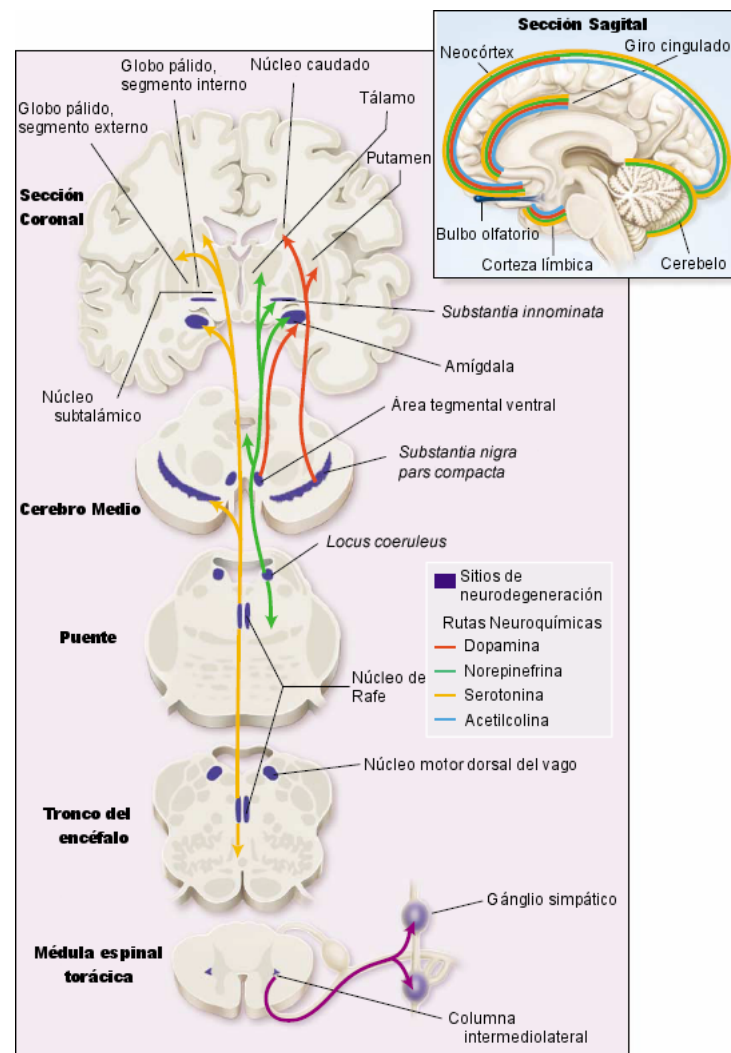


Figura 2. Regiones y vías neuroquímicas afectadas por la neurodegeneración asociadas a la EP. En azul oscuro se muestran los sitios con cambios patológicos en la EP. Las vías afectadas y destinos se muestran mediante flechas y el color indica el neurotransmisor utilizado tanto en las secciones coronales como en la sagital (rojo = dopamina, verde = noradrenalina, naranja = serotonina, azul claro = acetilcolina). La deficiencia en dopamina en la vía nigroestriatal causa los problemas motores clásicos de la EP. Modificada de Lang y Lozano, 1998.

1.2.1. Factores ambientales: casos esporádicos y drogas “parkinsonianas”

La hipótesis de que la EP es causada por una toxina ambiental ha sido la dominante hasta mediados de los años 90 cuando se descubrieron los primeros genes que causan EP familiar. Existían datos que apoyaban la génesis tóxica de la enfermedad, como eran la existencia de EP postencefálica, resultante de una infección, o el descubrimiento de que la administración del compuesto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) causaba parkinsonismo (Langston y Ballard, 1983). Así, a principios de los años 80, algunos heroinómanos en California se vieron expuestos a MPTP, un contaminante no previsto en un procesamiento modificado para la producción de heroína sintética, y desarrollaron un síndrome clínicamente idéntico a la EP en pocas semanas (Langston *et al.*, 1983). Según la hipótesis ambiental, fuertemente impulsada por este suceso, la neurodegeneración asociada a la EP tendría su origen en la exposición a alguna neurotoxina dopaminérgica. Compuestos parecidos al MPTP en cuanto al mecanismo de acción son, precisamente, compuestos que son utilizados como herbicidas (paracuato) o como insecticidas (rotenona). De hecho, los estudios epidemiológicos muestran un mayor riesgo de sufrir EP en zonas rurales con exposición a herbicidas y pesticidas (Tanner, 1992; Di Monte, 2003). Se ha sugerido la asociación de otras toxinas con el desarrollo de parkinsonismo, como es el caso, por ejemplo, de ciertos metales (hierro y cobre), cianuro, solventes orgánicos, monóxido de carbono y disulfuro de carbono (ver Di Monte, 2003). Sin embargo, no se han encontrado cantidades elevadas ni acúmulos de ninguna de estas toxinas en el cerebro de pacientes con EP y, cuando se ha observado parkinsonismo asociado a alguno de esos compuestos, no es el mismo que el que se asocia a la EP.

Otra posibilidad propuesta es que la neurodegeneración asociada a EP sea causada por una toxina endógena producida por alteraciones en el metabolismo normal, ya sea por exposición a determinados ambientes o a diferencias genéticas interindividuales. Esta hipótesis surge de la observación de que las neuronas afectadas primariamente en la EP son las neuronas dopaminérgicas, neuronas que tienen una carga natural de estrés oxidativo mayor que el de otras neuronas. El propio metabolismo de la dopamina genera especies reactivas de oxígeno (ROS) en el citoplasma celular (Cohen, 1984). Debido a su anillo catecol inestable, la dopamina puede sufrir oxidación espontánea en presencia de oxígeno molecular y agua y entonces producir peróxido de hidrógeno, superóxido y dopamina-o-quinona. Además de la autooxidación, la dopamina puede ser desaminada por la monoaminaoxidasa (MAO) y producir ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y peróxido de hidrógeno, el cual, puede ser convertido en radicales hidroxilo en presencia de hierro. Los niveles de hierro son especialmente elevados en las neuronas de la SNpc, por su asociación con la neuromelanina, lo que causa la producción elevada de iones hidroxilo a través de la llamada reacción de Fenton (Cohen, 1984). Además de

la reacción de las ROS con el resto de macromoléculas celulares, la dopamina y sus derivados pueden inhibir el complejo I de la cadena de transporte electrónica mitocondrial. En este sentido, se ha observado que la SN de enfermos con EP presenta actividad reducida del complejo I mitocondrial, un aumento de las ROS, que consecuentemente producen daño oxidativo a lípidos, proteínas o DNA, una mayor concentración de hierro, catalizador de la formación de radicales hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno, una reducción de los sistemas eliminadores del peróxido de hidrógeno, más neurotoxinas derivadas del metabolismo de la dopamina en el fluido cerebroespinal, así como un aumento de los niveles de enzimas detoxificantes como la superóxido dismutasa (ver revisión de Lotharius y Brundin, 2002).

1.2.2. La genética de la EP

La denominación “esporádico” refleja nuestra incapacidad para reconocer un componente genético, lo que puede ser debido a la complejidad de la posible base genética. Algunos estudios han sugerido que ciertos polimorfismos nucleotídicos en diversos *loci* se encuentran asociados a una mayor susceptibilidad a padecer EP (Li *et al.*, 2002), incluyendo polimorfismos en los genes *tau* (Martin *et al.*, 2001) y *APOE* (Zareparsari *et al.*, 2002). Aunque en algunos trabajos se había visto una falta de concordancia para la EP entre gemelos homocigóticos (Tanner *et al.*, 1999), trabajos posteriores con gran número de casos de EP han mostrado la importancia del componente genético en la aparición de la enfermedad (Sveinbjornsdottir *et al.*, 2000). Así, aproximadamente el 10% de los casos de EP son hereditarios y en algunas familias se ha asociado el padecer la enfermedad con alteraciones en un único gen (ver revisión de Huang *et al.*, 2004). El interés por estudiar en profundidad los casos monogénicos de la EP radica en que la mayor parte de los casos familiares de EP tienen características clínicas y patológicas que solapan de forma considerable con las de los casos esporádicos. Esto indica que comparten mecanismos patogénicos y, por tanto, la identificación de moléculas cuya alteración activa estos mecanismos es fundamental para nuestra comprensión de la génesis y evolución de la enfermedad. Se han identificado, hasta la fecha, seis genes ligados a EP hereditaria (*PARK1*, 2, 5, 6, 7 y 8). Aunque los productos de estos genes no encajan en una vía patogénica común, constituyen posibles claves para nuestra comprensión de qué vías moleculares pueden estar contribuyendo a la degeneración dopaminérgica.

El primer gen identificado en casos de EP familiar fue *alfa-sinucleína* (*SNCA* o *PARK1*), que codifica para la proteína Alfa-sinucleína (α -SYN), constituyente mayoritario de los LBs tanto en casos familiares como esporádicos de la EP (Polymeropoulos *et al.*, 1997). A este le siguieron genes como los que codifican para parkina (*PARK2*) (Kitada *et al.*, 1998) y UCHL1 (*PARK5*) (Leroy *et al.*, 1998). Las dos proteínas codificadas por ellos participan en la vía ubiquitina-proteosoma. Y más adelante, moléculas como DJ-1 (van Duijn *et al.*, 2001) o PINK1, con participación en estrés, o quinasas como LRRK2/dardarina (ver Tabla 1), de las que hablaremos a continuación.

Tabla 1. Loci/genes asociados a EP familiar monogénica

Locus/gen	Posición	Herencia	Inicio	Referencia
<i>PARK1</i> y <i>PARK4</i> : <i>SNCA</i> (α -sinucleína)	4q21	AD	Temprano	Polymeropoulos <i>et al.</i> , 1997 Singleton <i>et al.</i> , 2003
<i>PARK2</i> : parkina	6q25	AR	Juvenil	Kitada <i>et al.</i> , 1998
<i>PARK3</i>	2p13	AD	Clásico	Gasser <i>et al.</i> , 1998
<i>PARK5</i> : UCHL1	4p14	ND	Clásico	Leroy <i>et al.</i> , 1998
<i>PARK6</i> : PINK1	1p35-36	AR	Temprano, lento	Valente <i>et al.</i> , 2004
<i>PARK7</i> : DJ-1	1p36	AR	Temprano, lento	Bonifati <i>et al.</i> , 2003
<i>PARK8</i> : LRRK2	12p11.2-q13.1	AD	Clásico	Paisán-Ruiz <i>et al.</i> , 2004
<i>PARK10</i>	1p32	ND	Clásico	Hicks <i>et al.</i> , 2002
<i>PARK11</i>	2q36-37	ND	Clásico	Pankratz <i>et al.</i> , 2003
NA: NR4A2/Nurr1	2q22-23	ND	Clásico	Lee <i>et al.</i> , 2003

Locus, NA: no asignado. Herencia, AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva; ND: no determinada.

1.2.3. El primer factor genético: el gen *PARK1* y la α -SYN

En 1997, Polymeropoulos y colaboradores identificaron una mutación dominante en el gen *SNCA*, o α -syn como lo denominaremos en este trabajo, que codifica para la α -SYN en un grupo de familias de ancestro griego o siciliano. Esta primera mutación identificada consistía en la sustitución aminoacídica A53T. Después de ésta, se identificaron dos mutaciones adicionales: A30P en un grupo de familias alemanas (Kruger *et al.*, 1998) y E46K en familias españolas (Zarranz *et al.*, 2004). El cambio puntual y el modo de herencia autosómica dominante sugieren que la patología se produce por una ganancia de función de la forma mutada. La patología muestra que, en todos los casos, se produce pérdida de neuronas nigrales y presencia de LBs, aunque también se observan depósitos de α -SYN en otras zonas cerebrales. Además de las mutaciones puntuales en el gen de la α -syn, se ha visto que un aumento en el número de copias del gen, por duplicación (Chartier-Harlin *et al.*, 2004; Ibáñez *et al.*, 2004) o triplicación (Bradbury,

2003; Singleton *et al.*, 2003; Farrer *et al.*, 2004; Singleton *et al.*, 2004) producen EP familiar. Además, polimorfismos en el promotor del gen α -syn que producen aumento en la expresión de α -SYN se asocian a EP esporádico (Farrer *et al.*, 2001; Touchman *et al.*, 2001; Chiba-Falek *et al.*, 2003). Estos datos sugieren que aumentos en los niveles de α -SYN, incluso cuando ésta es normal, son también deletéreos. Otra de las razones que relacionan la α -SYN con la EP es que es el componente proteico mayoritario de los LBs (Spillantini *et al.*, 1997; Wakabayashi *et al.*, 1997), en los que adopta una conformación en hoja β -plegada, uniéndose a otras proteínas como sinfilina 1 (Wakabayashi *et al.*, 2000), parkina (Schlossmacher *et al.*, 2002) o la chaperona 14-3-3 (Kawamoto *et al.*, 2002), entre otras.

La α -SYN es una proteína pequeña, de 140 aminoácidos, codificada por un gen que se localiza en el cromosoma 4q22.1 (Chen *et al.*, 1995). Pertenece a la familia de las sinucleínas, junto con otras proteínas como la β -sinucleína (β -SYN) y la γ -sinucleína (γ -SYN), que se localizan en los cromosomas 5 y 10 respectivamente. Estructuralmente, la α -SYN presenta tres zonas bien diferenciadas o dominios (ver Figura 3). En primer lugar, la región N-terminal es la más conservada en la familia y se denomina dominio de homología 14-3-3, presentando una serie de repeticiones de 11 aminoácidos, homólogas y degeneradas. En el caso de la α -SYN presenta siete de estas repeticiones con una secuencia central consenso KTKEGV. Esta región de la molécula media su unión a lípidos y la dimerización. En segundo lugar, se encuentra la región más hidrofóbica de la proteína, entre los residuos 61-95, que corresponde a la secuencia peptídica NAC. Este dominio, se identificó como el componente no amiloide de las placas seniles presentes en los enfermos de Alzheimer (Uéda *et al.*, 1993). Por último, el extremo carboxilo tiene un alto grado de residuos acídicos. Respecto a su estructura conformacional, en su forma soluble, como monómero, la proteína se encuentra desplegada en su forma nativa (Weinreb *et al.*, 1996), pero puede formar oligómeros en los que se dispone como hélice α , estabilizada con hojas β , y más estructurada cuando se une a lípidos (Chandra *et al.*, 2003) tal como sucede en vesículas sinápticas o mitocondrias (Conway *et al.*, 2000), o bien sufrir una transición estructural a hoja β , tal y como se encuentra en los LBs.

La α -SYN había sido identificada inicialmente en rastreos independientes para: 1) proteínas enriquecidas en terminales sinápticos en la raya eléctrica *Torpedo californica* (Maroteaux *et al.*, 1988), 2) moléculas reguladas durante la reorganización de los núcleos del canto en las aves canoras -sinelfina- (George *et al.*, 1995), 3) precursor del componente no amiloide (NACP) de las placas seniles características de la enfermedad de Alzheimer (Uéda *et al.*, 1993). Tras la identificación en la raya eléctrica, se utilizó su cDNA para identificar y aislar en rata una proteína de 140 aminoácidos (Alfa-sinucleína). El producto del gen de la β -syn se aisló como una fosfoproteína específica y enriquecida en terminales sinápticos de cerebro en bovinos

y presente en rata y humano (PNP-14, “PhosphoNeuroProtein-14 kDa”) (Nakajo *et al.*, 1990, 1993). Fue en 1994 cuando Jakes *et al.* describieron las similitudes entre dos de estas secuencias proteicas en humanos, una equivalente a NAC y la sinucleína de rata de Maroteaux, y la otra similar a la PNP-14; por el reconocimiento de estas similitudes y precedentes, se sugirió el nombre de α - y β -sinucleína. La proteína α -SYN está muy conservada en vertebrados y en particular en mamíferos siendo la homología aminoacídica entre la proteína humana y la murina de más de un 95% (Clayton y George, 1998). Aunque la denominación de la proteína codificada por el gen de la α -syn es Alfa-sinucleína, utilizaremos la abreviatura de α -SYN en el presente trabajo. Por su conservación proteica entre especies y abundante expresión en el cerebro se le supone un papel biológico importante en neuronas. Su denominación de α -sinucleína obedece a la observación inicial de que parecía localizarse en los terminales nerviosos presinápticos y en la envoltura nuclear neuronal (Maroteaux *et al.*, 1988; Maroteaux y Scheller, 1991). Se sabe que interacciona con membranas lipídicas y, dada la localización específica, asociada principalmente a las vesículas sinápticas de los terminales nerviosos del cerebro (Uéda *et al.*, 1993; Iwai *et al.*, 1995), se le propone una función sináptica. El producto del gen ortólogo de la α -syn en pájaro pinzón, la sinelfina, también se localiza en terminales sinápticos y su distribución durante la remodelación de los núcleos del canto sugiere la participación de esta proteína en procesos de plasticidad neuronal y consecuentemente de aprendizaje (George *et al.*, 1995). Recientemente se ha visto que la sobreexpresión de α -SYN afecta el tráfico vesicular entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y, Rab1, pequeña GTPasa que controla el tráfico vesicular entre estos dos compartimentos, es capaz de rescatar de la pérdida neuronal producida en modelos de EP por sobreexpresión de α -SYN (Cooper *et al.*, 2006). Sin embargo, la función de la α -SYN es todavía bastante desconocida.

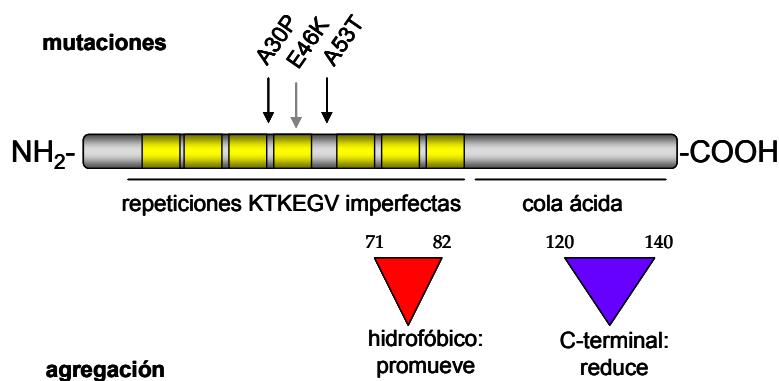


Figura 3. Estructura de la proteína α -SYN. Se muestran los dominios estructurales, así como la localización de los cambios aminoacídicos únicos que causan EP. También se señalan aquellas zonas que propician o reducen la capacidad de autoagregación. Adaptado de Cookson, 2005.

El patrón de expresión de la α -SYN en cerebros adultos está relativamente bien caracterizado. El RNA mensajero (mRNA) se detecta en múltiples poblaciones neuronales, con niveles muy abundantes en áreas como la amígdala, el hipocampo y la *substantia nigra* (Li *et al.*, 2002). La señal inmunocitoquímica de la proteína α -SYN, por otro lado, se concentra en los terminales presinápticos, como muestra el característico marcaje en forma de *puncta*, similar al de proteínas de localización exclusivamente sináptica (Iwai *et al.*, 1995; Irizarry *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 2000), lo que sugiere un rápido transporte de la proteína hacia las porciones más distales del axón. A nivel de microscopía electrónica se ha observado que el inmunomarcaje para α -SYN en los terminales presinápticos del SNC es citosólico y/o asociado a vesículas sinápticas (Iwai *et al.*, 1995; Irizarry *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 2000). Aunque el patrón de expresión de la α -SYN durante el desarrollo está menos caracterizado, sí se ha observado que aparece pronto en el desarrollo del cerebro de mamíferos, tanto de humanos como de roedores, aunque sólo en un número muy restringido de áreas, y que va aumentando en estadios posteriores. La expresión de α -SYN durante la embriogénesis también se restringe a las poblaciones neuronales pero, a diferencia de lo que ocurre en el cerebro adulto, la proteína se encuentra tanto en los somas como en las proyecciones de las neuronas que la expresan (Hsu *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1999; Baltic *et al.*, 2004).

En cuanto al SNP, inmunotinciones en ganglios sensoriales espinales de ratones, ratas y humanos adultos han mostrado que los somas de las neuronas sensoriales primarias de roedores, pero no de humanos, expresan niveles abundantes de α -SYN (Giasson *et al.*, 2001). Durante el desarrollo embrionario sólo se ha estudiado la expresión del mRNA de la α -SYN en ganglios espinales de pollo, mediante hibridación *in situ* (Tiunova *et al.*, 2000). Sólo en el caso de la γ -SYN se ha descrito expresión abundante en ganglios simpáticos y sensoriales de ratón (Ninkina *et al.*, 2003).

1.2.4. Otros factores genéticos identificados

Aparte del *locus PARK1*, se han descrito diversos *loci*, algunos cuya naturaleza génica ya ha sido identificada, asociados a EP familiar (Tabla 1). La parkina es una proteína de 465 aminoácidos con actividad ubiquitina ligasa (E3) que pertenece a la familia RBR de ubiquitina ligasas, caracterizadas por transferir moléculas de ubiquitina desde una proteína conjugadora de ubiquitina (E2) a una proteína específica, lo que la dirige hacia su degradación por el proteosoma (Shimura *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Las mutaciones detectadas en el gen que codifica para la parkina causan EP juvenil, antes de los 30 años (Kitada *et al.*, 1998; Mizuno *et al.*, 2001). La condición heterocigótica también causa disfunción dopaminérgica y EP pero con un inicio más

tardío (Hedrich *et al.*, 2002; Hilker *et al.*, 2002). Las mutaciones identificadas hasta la fecha representan el 50% de los casos de EP autosómica recesiva y son todas ellas de falta de función, sugiriendo que la activación deficiente del sistema de degradación de proteínas está implicada en la génesis de la enfermedad (Lücking *et al.*, 2000, 2003). La EP causada por falta de parkina presenta la característica pérdida de neuronas de la SNpc, pero no suele presentar LBs (Mizuno *et al.*, 2001). Aunque de expresión bastante generalizada, parkina se expresa abundantemente en el cerebro (Shimura *et al.*, 1999; Solano *et al.*, 2000) y se encuentra también en los LBs en casos de EP esporádica (Schlossmacher *et al.*, 2002). En mamíferos, parkina se localiza principalmente en el citoplasma de células postmitóticas, aunque una fracción se asocia con la membrana mitocondrial externa (Darios *et al.*, 2003). Sustratos específicos de esta proteína son, por ejemplo, la propia parkina, una variante o-glicosilada de la α -SYN, PAEL-R, un receptor del retículo endoplasmático rugoso similar a la endotelina, y tau (Imai *et al.*, 2001; Shimura *et al.*, 2001).

La esterasa carboxilo-terminal de ubiquitina L1 (UCHL1), también conocida como PGP 9.5), es una de las proteínas más abundantes del cerebro, representando el 1 o 2% del contenido proteico total (Wilkinson *et al.*, 1989). Pertenece a una familia de enzimas con actividad ubiquitina hidrolasa en el extremo carboxilo, que recicla la ubiquitina utilizada por el sistema de degradación ubiquitina-proteosoma. Posee, además, una actividad ubiquitina ligasa dependiente de dimerización. La expresión de esta proteína es altamente específica de neuronas y de células del sistema neuroendocrino difuso (Doran *et al.*, 1983) y se encuentra en los LBs y otros agregados proteicos (Wilkinson *et al.*, 1989). Su relación con la EP se descubrió al encontrarse, en dos hermanos con EP con herencia autosómica dominante, una mutación de cambio de sentido (I93M) responsable de una disminución del 50% en la actividad de UCHL1 (Leroy *et al.*, 1998). Posteriormente se encontró un nuevo polimorfismo (S18Y), muy frecuente en poblaciones orientales, que protege frente al riesgo de padecer EP de un modo dependiente de la dosis alélica (Maraganore *et al.*, 1999). Los niveles de UCHL1 se encuentran disminuidos en los cerebros de pacientes con EP o Alzheimer (Choi *et al.*, 2004). Aunque todos estos trabajos relacionan la mutación de este gen con el riesgo de padecer EP, existe cierta controversia sobre si *UCHL1* es realmente un gen implicado en la EP (Maraganore *et al.*, 2004; Healy *et al.*, 2006).

La implicación de *parkina* y posiblemente de *UCHL1* en EP sugiere que la etiología de la enfermedad pueda tener algo que ver con un funcionamiento anómalo de la degradación de algunas proteínas, quizá de α -SYN, entre otras.

Aunque los estudios ambientales sugerían que parte de la neurodegeneración dopaminérgica se podía explicar por disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, pronto se encontró que la mutación en ciertos genes conducía a un daño similar y al riesgo de padecer EP. DJ-1, producto del gen *PARK7* o *DJ-1*, parece formar parte de un mecanismo de respuesta a estrés oxidativo (Yokota *et al.*, 2003; Shendelman *et al.*, 2004; Taira *et al.*, 2004), actuando como chaperona en respuesta al aumento de ROS. Mutaciones en *PARK7* han sido identificadas como causantes de EP juvenil (Bonifati *et al.*, 2003). Existen varias mutaciones descritas en este gen, que juntas explican el 1% de los casos de EP juvenil (Abou-Sleiman *et al.*, 2003; Hague *et al.*, 2003). DJ-1 es una proteína de 189 aminoácidos de expresión ubicua en todo el cerebro, siendo más fuerte en aquellas regiones normalmente afectadas en la EP (Bonifati *et al.*, 2003), y localizada tanto en neuronas (Rizzu *et al.*, 2004) como en astrocitos (Bandopadhyay *et al.*, 2004). A diferencia de la α -SYN y la parkina, DJ-1 no es un componente esencial de los LBs (Bandopadhyay *et al.*, 2004), aunque se encuentra en asociación con inclusiones intraneuronales formadas por la proteína asociada a los microtúbulos, tau (Neumann *et al.*, 2004; Rizzu *et al.*, 2004). Aunque se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma y en terminales presinápticos, cuando se oxida se localiza en la mitocondria, lo que parece contribuir a su posible papel neuroprotector (Canet-Avilés *et al.*, 2004). La actividad de DJ-1 parece evitar la formación de agregados proteicos y, más concretamente, de protofibrillas de α -SYN (Shendelman *et al.*, 2004) con la cual se ha visto que interacciona (Meulener *et al.*, 2005). DJ-1 interacciona con parkina en situaciones de estrés oxidativo lo que podría proporcionar un vínculo entre degradación de proteínas y ROS (Moore *et al.*, 2005). De forma similar, el producto de *PARK6*, PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) es también una proteína mitocondrial que parece proteger a las células frente a la disfunción respiratoria (Valente *et al.*, 2004). Mutaciones en el gen *PINK1* han sido asociadas con parkinsonismo recesivo (Hatano *et al.*, 2004; Valente *et al.*, 2004). *PINK1*, junto con *DJ-1* y *PARK2*, son los tres genes recesivos autosómicos asociados a la EP hereditaria cuyo patrón fenotípico de la enfermedad es bastante similar para las tres mutaciones. Aunque se desconoce la función de PINK1 y el gen se transcribe de manera ubicua (Unoki y Nakamura, 2001), se piensa que tiene una función importante en fosforilación mitocondrial ya que 11 de las 14 mutaciones descritas se localizan en el dominio quinasa de *PINK1* (Hatano *et al.*, 2004; Valente *et al.*, 2004). Así, la fosforilación alterada de proteínas diana en la mitocondria puede representar un mecanismo patogénico, que conduce a un estrés anormal y neurodegeneración.

Otra quinasa recientemente implicada en la etiología de la EP es el producto del gen *LRRK2*. Se trata de una proteína citoplasmática de 286 kDa que se expresa abundantemente en el cerebro (Ross y Farrer, 2005) y con función desconocida. Mutaciones en el gen *LRRK2* (*PARK8*), en particular la G2019S, producen EP de manera autosómica dominante (Paisán-Ruíz *et al.*, 2004; Zimprich *et al.*, 2004), siendo ésta la mutación más frecuente tanto en la EP familiar

como en la esporádica. Dicha mutación cambia un residuo de glicina altamente conservado al principio del segmento de activación quinasa. Existen diversos trabajos que apoyan la idea de que los efectos dominantes de esta mutación se deben a la hiperactividad de la proteína y no a una pérdida de función y haploinsuficiencia (ver Marín, 2006). LRRK2 es un miembro de la familia de proteínas Roco y parece tener múltiples funciones. Entre estas funciones se incluye un dominio característico de esta familia denominado Roc, parecido a GTPasas pequeñas de la superfamilia Ras. El otro dominio característico se denomina COR de función desconocida. Además de estos dominios, existen otros como las repeticiones ricas en leucinas o el dominio quinasa. El motivo rico en leucinas puede tener una variedad de funciones incluyendo interacciones proteína/proteína y unión a sustrato para ubiquitinación. Se desconocen las funciones del dominio GTPasa y quinasa. En los cerebros provenientes de pacientes con EP con la mutación en *LRRK2* se ha demostrado tanto pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y/o presencia de ovillos neurofibrilares, depósitos de tau anormales, y sinucleinopatía con LBS (revisado en Taylor *et al.*, 2006). Aunque LRRK2 interacciona con parkina (Smith *et al.*, 2005), se desconocen los sustratos que fosforilan/interaccionan tanto con PINK1 como con LRRK2 y su implicación en la neurodegeneración.

En la siguiente tabla (Tabla 2) se resumen las moléculas que se han visto asociadas a la EP hereditaria y su función biológica.

Tabla 2. Función biológica de moléculas asociadas a EP hereditario

<i>Locus</i>	proteína	Función biológica
<i>PARK1</i>	α -SYN	Tráfico vesicular entre retículo endoplasmático y aparato de Golgi; y entre compartimentos sinápticos
<i>PARK2</i>	parkina	Ubiquitina ligasa (E3)
<i>PARK5</i>	UCHL1	Esterasa carboxilo-terminal de ubiquitina L1
<i>PARK6</i>	PINK1	Proteína quinasa mitocondrial, estrés oxidativo?
<i>PARK7</i>	DJ-1	Respuesta a estrés oxidativo?
<i>PARK8</i>	LRRK2	Proteína quinasa

1.2.5. Patogénesis: neurodegeneración en la EP

Existe controversia acerca del modo de muerte neuronal que se produce en la EP (ver Vila y Przedborski, 2003). El problema principal es que en las muestras humanas procedentes de autopsia muchas de las neuronas afectadas ya han muerto. Sí existen, sin embargo, evidencias de que marcadores biológicos del proceso de apoptosis (Bax, Bcl-XL, caspasa-3, -8 y -9)

aparecen alterados en muestras *post mortem* de EP (Hartmann y Hirsch, 2001; Tatton *et al.*, 2003). En los modelos experimentales de parkinsonismo tóxico sí se ha demostrado la participación de procesos apoptóticos (Tatton y Kish, 1997; Vila *et al.*, 2001), pero también de otras formas de muerte neuronal, como es el caso de la autofagia (Stefanis *et al.*, 2001; Gómez-Santos *et al.*, 2003) o la necrosis (Jackson-Lewis *et al.*, 1995). De todas formas, incluso si admitimos un proceso apoptótico para explicar toda la pérdida neuronal, estamos lejos de conocer los mecanismos que inducen dicho proceso en las neuronas dopaminérgicas. Aunque se desconoce cuáles son estos mecanismos que producen la neurodegeneración, las dos hipótesis más aceptadas actualmente son: 1) plegamiento anómalo de proteínas que conduce a su agregación patológica y 2) estrés oxidativo por disfunción mitocondrial, o incluso una combinación de ambas.

La deposición anormal de proteínas en neuronas del SNC es una característica común a prácticamente todas las enfermedades neurodegenerativas (ver, por ejemplo Ross, 1997), por lo que, aunque el tipo, localización y componentes de los agregados varía de una a otra enfermedad, su presencia correlaciona con la disfunción neuronal. Si las células son incapaces de activar suficientemente sus sistemas de chaperonas, implicadas en el replegamiento, o sus sistemas de degradación proteica, entonces se produciría el acúmulo de las proteínas nocivas. En este contexto, la relación con el envejecimiento podría fundamentarse en el hecho de que, con la edad, disminuye la capacidad de las neuronas de inducir ciertas chaperonas y la capacidad de degradación por proteosoma (Sherman y Goldberg, 2001). Con este argumento se podría pensar que los agregados son tóxicos y causan daño celular directamente, por ejemplo interfiriendo con el tráfico intracelular, o indirectamente, secuestrando proteínas que son importantes para la supervivencia neuronal. Pero, de ser así, debería detectarse una correlación directa entre la formación de inclusiones y la neurodegeneración aunque las evidencias más recientes, sobre todo en el caso de la enfermedad de Huntington (ver revisión de Bates, 2003), sugieren que éste no es el caso. Por el contrario, se podría pensar en las inclusiones citoplasmáticas como un intento, por parte de la célula, de secuestrar moléculas mal plegadas que puedan ser tóxicas (ver revisión de Kopito, 2000).

Las mutaciones patogénicas asociadas a EP familiar parecen causar la presencia y/o acumulación de proteínas con conformación anormal y, posiblemente, tóxica. Este es el caso de las mutaciones en los genes *α -syn*, *parkina* y *UCHL1*. La α -SYN parece ser propensa a la agregación, algo bastante sorprendente si se tiene en cuenta que la proteína nativa carece de estructura conformacional y está desplegada. La porción central hidrofóbica, cerca de los dominios repetidos, y ausente en la β -SYN, tiende a la autoasociación, contribuyendo a la agregación de la molécula (Giasson *et al.*, 2001; Cookson, 2005). *In vitro*, la α -SYN puede formar

fibrillas, lo que sugiere que esta molécula es suficiente por sí sola para formar inclusiones (Uversky, 2003) e induce su propia fibrilización y la de tau, tanto *in vitro* como *in vivo* (Giasson *et al.*, 2003). Sin embargo, y a pesar de la presencia de esta molécula en los LBs, se desconoce todavía la relación entre alteraciones en α -SYN y el inicio de la EP. Aunque la mutación A53T acelera la formación de fibrillas *in vitro*, la A30P no la favorece, sino que promueve tan sólo la formación de oligómeros (Giasson *et al.*, 1999; Conway *et al.*, 2000) y la α -SYN oligomérica se deposita en fracciones relativamente insolubles de tejido cerebral de pacientes con la triplicación génica (Miller *et al.*, 2004). En general, y aunque todavía en debate, se considera que, muy posiblemente, sean las formas oligoméricas de α -SYN las más tóxicas (ver revisión de Cookson, 2005) y no las fibrillas, por lo que sería la agregación de α -SYN, y no los LBs en sí mismos, lo que causaría la patología y el daño celular.

Además de la agregación proteica, agresiones tóxicas o mutaciones en ciertos genes (*DJ-1/PINK1*) podrían causar la misma situación, por ejemplo, mediante el daño molecular producido por ROS, que oxidan de forma anormal a las macromoléculas celulares, incluidas las proteínas. El descubrimiento de que el MPTP bloquea la cadena de transporte electrónico, al inhibir el complejo I mitocondrial (Nicklas *et al.*, 1987), o la observación de actividad anómala del complejo I en muestras de enfermos con EP (ver Greenamyre *et al.*, 2001), sugiere la posibilidad de que defectos en fosforilación oxidativa jueguen un papel en la patogenia de la EP. En la SNpc de los pacientes de EP se encuentran elevados los niveles de varios marcadores biológicos de daño oxidativo (ver Przedborski y Jackson-Lewis, 1998), daño que puede verse generado y/o aumentado por el propio metabolismo de la dopamina (ver apartado 1.2.1.). Asimismo, el estrés oxidativo global puede contribuir a un aumento de proteínas anómalas en las neuronas. En este sentido, se encuentra tanto que herbicidas y pesticidas causan el plegamiento anómalo y/o la agregación de la α -SYN (Uversky *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Manning-Bog *et al.*, 2002), y que la α -SYN de los LBs presenta modificaciones oxidativas anormales (Giasson *et al.*, 2000).

El conocimiento de qué conformación de la α -SYN es la más tóxica, el papel de los agregados y el estrés oxidativo en la toxicidad neuronal ayudarán en el diseño de posibles terapias basadas en estrategias antiagregación o antioxidación. En cualquier caso, y aunque el debate acerca de la patogenia en esta enfermedad está todavía abierto, se podría plantear un esquema similar al que se muestra en la Figura 4.

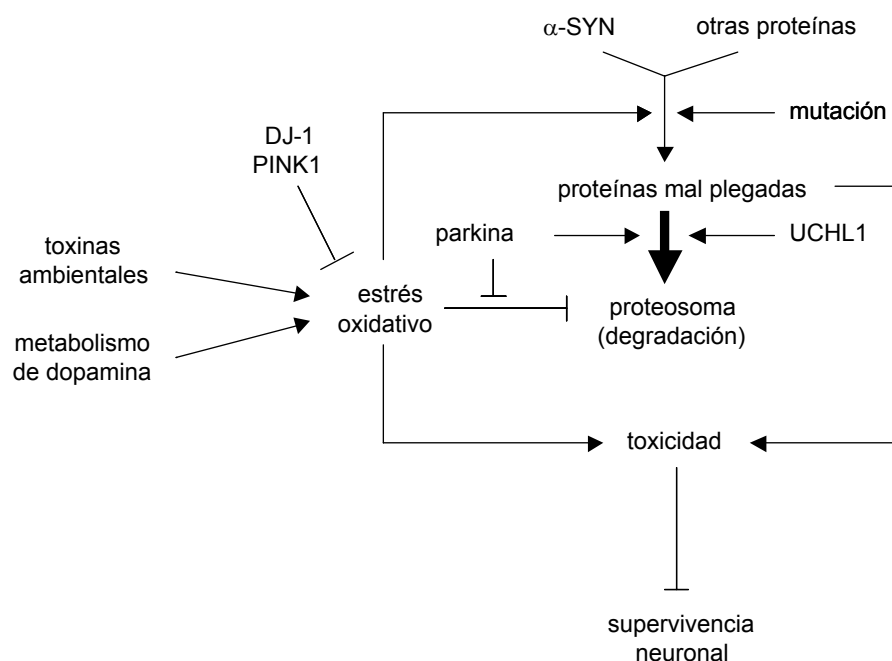


Figura 4. Esquema que propone una interrelación entre posibles procesos celulares implicados en la etiopatogenia de la EP y las moléculas asociadas a EP familiar. Adaptado de Marín y Vallejo, 2005.

1.3. Modelos animales en el contexto de la EP

Existen diversas aproximaciones al estudio experimental de la EP pero, como en cualquier patología humana, lo ideal es poder disponer de un modelo animal en el que se reproduzcan los síntomas de la enfermedad, para poder investigar los mecanismos subyacentes. Además, los modelos animales proporcionan un sustrato para el ensayo de posibles aproximaciones terapéuticas. En el contexto de la EP se ha intentado generar diferentes modelos animales, tanto genéticos como farmacológicos, para reproducir en mayor o menor medida la histopatología y/o sintomatología motora de los enfermos de EP. La generación de estos modelos se ha basado tanto en el uso de tóxicos parkinsonianos como en la modificación genética experimental de genes asociados a EP familiar en diversos organismos. Aún así, hoy día no existe un modelo perfecto, dado que cada modelo reproduce alguno o varios de los aspectos de la EP, desde acúmulos proteicos citoplásmicos, hasta la afectación de las neuronas dopaminérgicas, su liberación dopaminérgica o incluso su muerte, sin abarcarla completamente (ver, por ejemplo, Pérez-Sánchez *et al.*, 2002; Marín y Vallejo, 2005).

1.3.1. Modelos experimentales de parkinsonismo tóxico

Los modelos farmacológicos pretenden, por un lado, conocer qué factores ambientales pueden reproducir el fenotipo de la EP, y por otro lado, conocer los mecanismos moleculares por los que dicho fenotipo se produce. Estos modelos se basan en el uso de toxinas específicas de los sistemas catecolaminérgicos (Betarbet *et al.*, 2002). Entre las neurotoxinas que producen neurodegeneración dopaminérgica en modelos animales se encuentra la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), el MPTP y, más recientemente, el paracuato, la rotenona o el maneb. Todas estas toxinas, excepto el maneb que inhibe al complejo III de la cadena de transporte electrónico, inhiben al complejo I y consecuentemente conducen a la formación de ROS (ver revisión de Schober, 2004). Sin embargo, sólo el MPTP está claramente ligado a una forma de parkinsonismo humano y, por tanto, su empleo en primates ha constituido el modelo más valioso hasta la fecha. Aunque muy utilizados e intensamente explorados, hay que tener en cuenta que el carácter agudo de los efectos de la mayoría de estos neurotóxicos difiere de la lenta progresión de una enfermedad neurodegenerativa como la EP.

El mejor modelo farmacológico lo constituyen los monos tratados con MPTP. En primates como humanos, monos o babuinos, el MPTP causa síntomas parkinsonianos graves e irreversibles, indistinguibles de los de la EP esporádica, con degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y con algunos agregados de α -SYN (ver Kitamura *et al.*, 2000). En primates no humanos, tras la administración de dosis subcrónicas de MPTP, se observan inclusiones intraneuronales eosinófilas que recuerdan a los LBs (Forno *et al.*, 1986). Sin embargo, la susceptibilidad frente al MPTP fuera del grupo de los primates varía dependiendo de la especie, de la cepa e incluso de la edad y/o sexo del individuo (Sundstrom y Samuelsson, 1997). Así, por ejemplo, las ratas no son vulnerables al MPTP y, entre los ratones, hay cepas sensibles (DBA, C57Bl6) y cepas en las que este tóxico produce alteraciones en los niveles de dopamina pero no causa la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Sonsalla y Heikkila, 1986; Sundstrom *et al.*, 1987; German *et al.*, 1996). Tampoco se ha descrito la formación de LB en ratones tratados con MPTP (Hirsch *et al.*, 2003).

El MPTP administrado sistemáticamente atraviesa la barrera hematoencefálica y es transformado en el metabolito tóxico activo, MPP⁺, por la monoaminoxidasa tipo B (MAO-B) en el interior de los astrocitos o de las neuronas serotoninérgicas (Chiba *et al.*, 1984; Javitch y Snyder, 1984; Mayer *et al.*, 1986). Se desconoce todavía cómo es captado por los astrocitos y cómo el MPP⁺ accede al espacio extracelular, pero sí se sabe que la especificidad de este neurotóxico por neuronas catecolaminérgicas es debida a que el MPP⁺ utiliza específicamente los transportadores de catecolaminas (Javitch *et al.*, 1985), el transportador de dopamina (DAT)

en neuronas dopaminérgicas y el transportador de noradrenalina (NAT) en neuronas noradrenérgicas. Una vez en el citoplasma, el MPP⁺ accede al interior de las mitocondrias de forma aún desconocida, pero dependiente de energía, donde inhibe a la NADH coenzima Q10 reductasa del complejo I de la cadena transportadora de electrones, produciendo una disminución en los niveles de ATP y un incremento en radicales libres que aumentan el nivel de estrés oxidativo (Przedborski *et al.*, 2004). Parte del MPP⁺ accede al interior de las vesículas sinápticas a través del transportador de monoaminas vesicular (VMAT2), donde supuestamente es destruido en el ambiente ácido de las mismas (Javitch *et al.*, 1985; Bezard *et al.*, 1999; ver Figura 5).

La 6-OHDA fue el primer neurotóxico descubierto con acción específica sobre las neuronas catecolaminérgicas centrales, bien aplicado *in vitro* bien inyectado directamente al cerebro, por su imposibilidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Su inyección sistémica produce simpatectomía química al dañar el sistema nervioso periférico (Jonsson, 1983). Su toxicidad resulta muy específica de neuronas dopaminérgicas dada su similitud estructural con la dopamina, y la consiguiente entrada por los mismos transportadores, aunque no altera otras áreas que generalmente se ven afectadas en los enfermos de EP (Luthman *et al.*, 1989; Betarbet *et al.*, 2002; Del Tredici *et al.*, 2002; Figura 5). Respecto a su modo de acción, una vez en el interior de la neurona, la 6-OHDA inhibe el complejo I de la cadena mitocondrial y produce, además, estrés oxidativo adicional derivado del propio metabolismo y autooxidación de la molécula igual que sucede con la dopamina endógena (Cleeter *et al.*, 1992; Jeon *et al.*, 1995; Betarbet *et al.*, 2002). Entre los inconvenientes que presenta el modelo tóxico experimental con 6-OHDA está el que no reproduce alguno de los síntomas característicos de la EP como los LBS (Andrew *et al.*, 1993). Por otro lado, el daño que produce suele ser agudo, a diferencia de lo que sucede con la progresión de la EP en humanos, y el efecto puede ser bastante variable y, por tanto, su interpretación delicada (ver revisiones de Blum *et al.*, 2001; Schober, 2004; Bové *et al.*, 2005).

La rotenona es un compuesto natural que se utiliza como insecticida y que cruza la membrana celular libremente acumulándose en los orgánulos de la célula como la mitocondria, donde interfiere en la fosforilación oxidativa al inhibir el complejo I de la cadena transportadora de electrones (Schuler y Casida, 2001; Figura 5). Aunque los primeros modelos animales en rata no resultaron específicos, cambios específicos en las dosis y tiempos de exposición condujeron a protocolos con los que se obtienen alteraciones específicamente en neuronas dopaminérgicas, aparición de inclusiones fibrilares citoplásmicas similares a los LBS y activación de la caspasa 3 (Betarbet *et al.*, 2000; Alam y Schmidh, 2002; Hoglinger *et al.*, 2003; Sherer *et al.*, 2003).

Recientemente se ha puesto a punto el uso de la rotenona en *Drosophila melanogaster* en la que produce síntomas motores (Coulom y Birman, 2004). Aunque *in vitro* la rotenona produce acumulación y agregación de la α -SYN, daño oxidativo progresivo y una muerte dependiente de caspasas (Sherer *et al.*, 2002), no se ha observado la presencia de LBs, aunque sí de inclusiones proteicas en algunas neuronas dopaminérgicas residuales (Betarbet *et al.*, 2000; Hoglinger *et al.*, 2003; Sherer *et al.*, 2003). No obstante, no se entiende el daño específico a las neuronas dopaminérgicas cuando se trata de una sustancia lipofílica que difundiría por igual por todo el cerebro y que causa una inhibición uniforme del complejo I mitocondrial (Betarbet *et al.*, 2000)

Dada la semejanza estructural entre el MPTP/MPP⁺ con ciertos pesticidas como el paracuato (Barbeau *et al.*, 1985), se han expuesto roedores a este herbicida (Liou *et al.*, 1996; Brooks *et al.*, 1999). Existen evidencias de que el paracuato puede atravesar la barrera hematoencefálica a través de un sistema activo como el transportador de aminoácidos neutros (Shimizu *et al.*, 2001; McCormack y Di Monte, 2003). Al igual que sucedió con la rotenona, los primeros modelos no lograron reproducir ninguna respuesta neuropatológica típica de la EP, pero finalmente consiguieron que el modelo empleando paracuato produjera agregados intraneuronales de α -SYN y fibrillas amiloides, además de la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas (Thiruchelvam *et al.*, 2000; McCormack *et al.*, 2002).

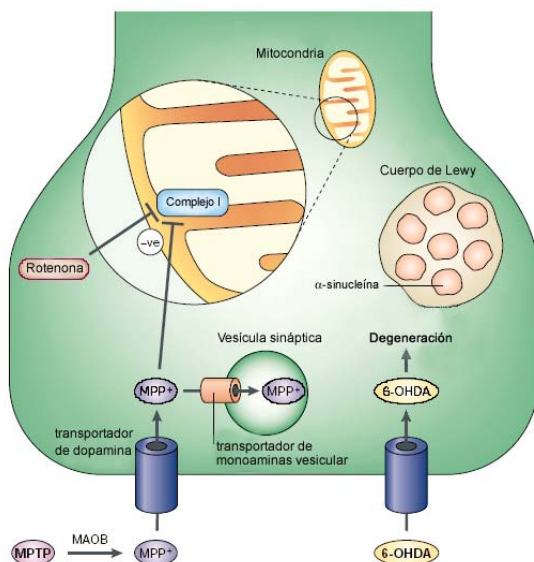


Figura 5. Modo de acción de neurotóxicos (MPP⁺, 6-OHDA, rotenona) sobre la neurona dopaminérgica. Las neurotoxinas producen disfunción mitocondrial y daño oxidativo. La 6-OHDA y el MPP⁺ entran a través del DAT, la rotenona entra por difusión pasiva. Los tres producen un aumento de radicales libres. Tanto el MPP⁺ como la rotenona inhiben al complejo I mitocondrial, y aumentan la expresión de α -SYN. Tanto el aumento en la expresión como la modificación por radicales libres de α -SYN podría conducir a la formación de los LBs. Modificado de Beal, 2001.

1.3.2. Modelos genéticos por manipulación de genes asociados a EP familiar

Disponer de modelos genéticos de una enfermedad ofrece grandes ventajas para el estudio de posibles mecanismos alterados, búsqueda de otras moléculas implicadas y ensayos terapéuticos. Hasta la fecha, no se ha generado un modelo genético animal perfecto de EP, aunque, sorprendentemente, las mejores perspectivas las han proporcionado los mutantes generados en *Drosophila*. La expresión dirigida de α -syn humana (mutada y salvaje) en drosófilas no causa alteraciones generales pero produce la pérdida de neuronas TH-positivas de forma progresiva en los adultos causando disfunciones motoras (Feany y Bender, 2000) que pueden ser revertidas mediante sobreexpresión de parkina (Haywood y Staveley, 2004) o de la chaperona hsp70 (Auluck *et al.*, 2002). A excepción de la α -syn, los cinco restantes genes relacionados con la EP en humanos tienen su ortólogo en *Drosophila* donde se explora el papel de las proteínas codificadas por estos genes (Whitworth *et al.*, 2006). Estos organismos modificados ofrecen la posibilidad de realizar búsquedas genéticas masivas de modificadores de la mutación que nos permitan avanzar en nuestro conocimiento de las alteraciones moleculares que subyacen a la EP (Bilen y Bonini, 2005). El ratón presenta un sistema nigroestriatal asimilable al de humanos y ofrece también la posibilidad de generar mutantes nulos y cepas transgénicas. Se han llevado a cabo intensos esfuerzos para conseguir un posible modelo genético de EP en ratón mediante la generación de múltiples cepas de ratones con modificaciones en genes que, en humanos, se asocian a EP familiar. A pesar de ello, no existe todavía ningún modelo genético de EP en ratón que recapitule las características de la patología humana (Pérez-Sánchez *et al.*, 2002; Marín y Vallejo, 2005).

Se han generado cuatro mutantes nulos para *parkina* (Goldberg *et al.*, 2003; Itier *et al.*, 2003; von Coelln *et al.*, 2004, Pérez y Palmiter, 2005), uno para *UCHL1* (Yamazaki *et al.*, 1988; Saigoh *et al.*, 1999) y otro para *DJ-1* (Golberg *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005), y de los ratones mutantes nulos para α -syn hablaremos en el siguiente apartado. Ninguno de estos tres tipos de ratones mutantes presenta pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc. En general, las afectaciones en la vía nigroestriatal son tenues, pero presentan alguna característica parkinsoniana. En los ratones mutantes para *parkina* y *DJ-1* se observa una respuesta reducida en la liberación de dopamina inducida en estriado. Asimismo, una sobreexpresión de los genes para *parkina* o *DJ-1* en la SN de animales intoxicados con MPTP y deficientes para cada uno de estos genes muestran menor vulnerabilidad (Paterna *et al.*, 2007). En el caso de los mutantes de *parkina* cada uno de los ratones presenta un fenotipo diferente, lo que podría explicarse por la ausencia total de mRNA para *parkina* en el caso del ratón mutante nulo para el exón 7 a diferencia del generado por delección del exón 3 (von Coelln *et al.*, 2004). El ratón con delección en el exón 7 es el que presenta el fenotipo más similar al que aparece en enfermos con EP idiopática o por mutación en *parkina*. Este ratón presenta pérdida de neuronas del locus

coeruleus con la consiguiente reducción de noradrenalina en bulbo olfatorio y médula espinal (von Coelln *et al.*, 2004). A diferencia de éste, los ratones con el exón 3 deletado muestran un aumento en los niveles de dopamina estriatal extracelular, además de una reducción en la excitabilidad en neuronas estriatales, y desajustes sensorimotors (Goldberg *et al.*, 2003). Por el contrario, en otro mutante de genotipo similar se observa una reducción de DAT en el estriado, y déficit motores y cognitivos (Itier *et al.*, 2003). Por último, en el mutante por delección del exón 2 no se observa ningún fenotipo parkinsoniano (Pérez y Palmiter, 2005). El ratón con fenotipo tembloroso tiene la mutación en este gen de manera espontánea y presenta niveles aumentados de metabolitos de la dopamina en estriado y tubérculo olfatorio. Por otro lado, aunque el ratón mutante nulo para *UCHL1* (o ratón *gad*, del inglés *gracile axonal dystrophy*) presenta un fenotipo con temblor, dificultad para moverse y atrofia muscular de las patas traseras, no se debe a una afectación nigroestriatal (Yamazaki *et al.*, 1988). Ya en el caso del ratón mutante nulo para *DJ-1* sólo aparece una reducción en su actividad locomotora tras tratamiento con metanfetamina o MPTP (Kim *et al.*, 2005). A nivel celular y subcelular en este mutante, se observa una mayor pérdida de neuronas dopaminérgicas y de terminales TH en el estriado cuyo efecto se revierte al introducir la expresión de DJ-1 en el ratón mutante. Sin embargo, los niveles de TH o dopamina y derivados permanecen inalterados. En resumen, estos animales modelo no reproducen fielmente el fenotipo parkinsoniano pero permiten estudiar algunos aspectos de la enfermedad.

1.3.3. Modelo de pérdida de función para la α -syn en ratón

Para estudiar la función normal de la α -SYN y su implicación en la EP se han desarrollado diferentes modelos animales carentes de α -SYN, además del uso de cultivos celulares/neuronales primarios o líneas celulares que inactivan la proteína. Entre los modelos animales, se han utilizado desde moscas *Drosophila* transgénicas, gusanos como *Caenorhabditis elegans* o el ratón del cual hablaremos seguidamente (ver revisión de von Bohlen, 2004).

Hasta la fecha existen cinco ratones mutantes nulos para α -syn, cuatro generados por ingeniería genética (Abeliovich *et al.*, 2000; Cabin *et al.*, 2002; Dauer *et al.*, 2002; Schlüter *et al.*, 2003) y uno encontrado de manera natural en una cepa de ratón que porta una delección en la zona en la que se encuentra el gen y que afecta además a otros genes (Specht y Schoepfer, 2001). Sólo el trabajo de Abeliovich *et al.* ha realizado un estudio funcional mostrando normalidad funcional motora y sensorimotora, aunque con atenuación en la locomoción en respuesta a anfetamina, y sin cambios en la concentración de dopamina o sus metabolitos en condiciones normales. El desarrollo del cerebro es aparentemente normal con un número normal de neuronas dopaminérgicas, aunque existen cambios específicos como una reducción en los

niveles estriatales de dopamina, y una recuperación de la liberación del neurotransmisor dopamina más rápida en una forma de plasticidad sináptica (Abeliovich *et al.*, 2000). Por tanto, la α -SYN jugaría un papel activador en la regulación y liberación sináptica de la dopamina. Tampoco existe ningún cambio en la expresión o localización de proteínas de vesículas sinápticas, aunque otros ratones mutantes nulos para α -syn muestran una reducción en el número de vesículas sinápticas de reserva, vesículas que son movilizadas durante estimulación repetida (Murphy *et al.*, 2000; Cabin *et al.*, 2002). Por otro lado, las diferentes líneas de ratones mutantes nulos para α -syn presentan resistencia total (Dauer *et al.*, 2002) o parcial (Schlüter *et al.*, 2003; Drolet *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2004; Klivenyi *et al.*, 2006) a la intoxicación con MPTP. Se desconoce el mecanismo por el cual la carencia de esta proteína protege a estas células frente al tóxico. Además, se ha comprobado que la falta de un fenotipo más llamativo en este mutante no es debido a la redundancia con otro miembro de la familia sinucleína, la β -SYN, proteína homóloga y de expresión en terminales presinápticos, como así se muestra en el ratón doble mutante nulo para α -syn y β -syn (Chandra *et al.*, 2004).

1.3.4. Modelos de ganancia de función para la α -syn en ratón

Por otro lado, los ratones transgénicos que sobreexpresan la α -syn pretenden reproducir en la mayor medida posible la patología humana. Se han generado diferentes cepas de ratones transgénicos, con formas salvajes y/o mutadas de la α -syn humana, bajo diferentes promotores, tanto neuronales generales como los promotores del gen *Thy1*, o de los genes que codifican para el factor trófico β procedente de las plaquetas (PDGF β) o la proteína priónica del ratón, o bien neuronales catecolaminérgicos como el del gen que codifica para la TH. Las diferencias observadas entre estos diferentes ratones responde, además de a un promotor génico diferente, al fondo genético de la cepa del ratón y al nivel de expresión de la proteína. Así, el primer ratón transgénico para la α -syn salvaje humana bajo el control del promotor del gen *PDGF β* presentó menor número de terminales dopaminérgicos, inclusiones citoplásmicas no fibrilares, de α -SYN y ubiquitina, y depósitos nucleares (Masliah *et al.*, 2000). Asimismo, existía una correlación entre el nivel de expresión del transgén y la formación de agregados, pérdida de terminales o neuronas dopaminérgicas, así como de síntomas motores dependientes de la edad. Desde ese primer ratón transgénico se han generado muchos otros (ver Tabla 3). Están los que presentan la forma salvaje humana de la α -syn (Kahle *et al.*, 2000; Masliah *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2001; Giasson *et al.*, 2002; Kahle *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Richfield *et al.*, 2002; Rockenstein *et al.*, 2002; Gispert *et al.*, 2003; Gómez-Isla *et al.*, 2003), con la mutación A53T (van der Putten *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2001; Giasson *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Gispert *et al.*, 2003; Gómez-Isla *et al.*, 2003), la A30P (Kahle *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Rockenstein *et al.*, 2002; Gómez-Isla *et al.*, 2003) o ambas (Richfield *et al.*, 2002). En cada caso se han

buscado posibles fenotipos, como la presencia de inclusiones o agregados proteicos o la alteración de proteínas relacionadas con el tráfico vesicular de la dopamina, y el desarrollo de un fenotipo motor. De los múltiples ratones transgénicos para la α -syn generados, sólo unos pocos muestran alteraciones en la vía nigroestriatal (Masliah *et al.*, 2000; Richfield *et al.*, 2002; Rockenstein *et al.*, 2002). Aunque ninguna de las cepas presenta una pérdida de neuronas dopaminérgicas, la línea de ratones que sobreexpresan las formas mutadas A30P + A53T de la α -syn bajo el promotor del gen *TH* presentan déficit motores relacionados con la edad. Aunque no se observa una pérdida de neuronas TH, presenta una pérdida progresiva de DAT en el estriado y una reducción en la dopamina y sus metabolitos (Richfield *et al.*, 2002; Thiruchelvam *et al.*, 2004). Los ratones que sobreexpresan la forma salvaje de la α -syn humana con el promotor del gen *Thy1* presentan desajustes sensorimotores, agravados con la edad y acompañados de un descenso en DAT y VMAT en estriado, además de una vulnerabilidad de la SNpc a dosis subtóxicas de MPTP (Song *et al.*, 2004). Además, estos ratones presentan complicaciones en olfacción y en la función gastrointestinal, síntomas también observados en la EP.

Tabla 3. Cepas de ratones transgénicos para α -syn

Ref.	α -syn	Promotor	Fondo	Expresión	Neuropatología	Fenotipo motor (edad)
1	wt	PDGF- β	C57Bl/6 x DBA/2	10-80%	↓TH; ↓DA; glia+, ubiquitina+ degeneración neuronas motoras ubiquitina+	moderado (3-6)
2	A53T	<i>Thy-1</i>	C57Bl/6		I: SN, STR, HP, Cx, B	severo (1-2)
3	wt, A30P	<i>Thy-1</i>	C57Bl/6	200%	ubiquitina-	normal
4	wt, A30P, A53T	<i>TH</i>	SW x C57Bl6/DBA		I: SC, B, C, Th, STR; GFAP+	sin analizar (12)
5	wt, A53T	prión	C57Bl/C3H	250-300%	I: M, C, B, SC; GFAP+, ubiquitina+	parálisis fatal (8-12)
6	wt, A30P, A53T	prión	C3H/HeJ x C57Bl/6J	> 400%	↓ DAT; ↓ DA, DOPAC, HVA	hipocinesia, ataxia (10)
7	wt, A30P, A53T	<i>TH</i>	C57Bl/6	30-50%	inclusiones oligodendrogiales	moderado (9-12)
8	wt	<i>PLP</i>	C57Bl/6 x DBA/2	0,1-1,2 ng/ μ g		normal (12)
9	wt, A30P	<i>Thy-1</i>	C57Bl/6 x DBA/2	10x cantidad en humano	GFAP+	sin analizar (6)
10	wt, A30P, A53T	prión	C57Bl/6J x SJL	>500%	morfología neuronal alterada; acumulación α -SYN	temblor, distonía (6)
11	wt, A53T	prión	FVB/N	>500%		hipocinesia

Referencias (Ref.): 1: Masliah *et al.*, 2000; 2: Van der Putten *et al.*, 2000; 3: Kahle *et al.*, 2000; 4: Matsuoka *et al.*, 2001; 5: Giasson *et al.*, 2002; 6: Lee *et al.*, 2002; 7: Richfield *et al.*, 2002; 8: Kahle *et al.*, 2002; 9: Rockenstein *et al.*, 2002; 10: Gómez-Isla *et al.*, 2003; 11: Gispert *et al.*, 2003. Todas las construcciones de " α -syn" corresponden al cDNA de la forma humana indicada (wt: forma salvaje; formas mutadas con la mutación A30P o A53T). "Expresión" indica los niveles de expresión del transgén con respecto a la expresión de la forma murina endógena, salvo alguna excepción indicada de otra forma. "Edad" indica el tiempo de aparición de los síntomas motores, en meses. En "Neuropatología" "+" significa niveles aumentados de la molécula indicada. Abreviaturas: B: tronco cerebral, C: cerebelo, Cx: corteza cerebral, DA: dopamina, DAT: transportador de dopamina, HP: hipocampo, I: inclusiones, M: mesencéfalo, SC: médula espinal, SN: *substantia nigra*, STR: estriado, T: telencéfalo, Th: tálamo, TH: tirosina hidroxilasa. Adaptado de Fernagut y Chesselet, 2004.

A pesar de la enorme variabilidad en la afectación de la vía nigroestriatal en las diferentes líneas de ratones transgénicos, estos organismos resultan muy útiles de estudiar por varias razones. En primer lugar, las mutaciones que presentan son las que se encuentran en los casos de EP familiar. En segundo lugar, la afectación motora y la patología agravada por la edad recuerdan a lo que sucede en las fases iniciales de la EP. En tercer lugar, el hecho de reproducir algunos aspectos de la enfermedad permite ensayar ciertas estrategias neuroprotectoras (ver revisión de Fleming *et al.*, 2005).

1.4. La EP y el sistema nervioso periférico (SNP)

En términos generales, el sistema nervioso periférico (SNP) es el sistema encargado de “sentir” el medio interno y externo al cuerpo y de “actuar” en consecuencia, mediante acciones de tipo involuntario. Está compuesto por el SNP sensorial, que recoge información sensorial y la transmite desde la periferia hacia el SNC, y por el SNP autonómico (SNA), que se divide, a su vez, en el SNA simpático, parasimpático y entérico, que difieren en sus acciones y en su ubicación con respecto a las estructuras que inervan. De hecho, el SNA entérico se denomina sistema nervioso entérico (Langley, 1921) ya que no se puede incluir dentro de la clasificación simpática o parasimpática.

1.4.1. Síntomas autonómicos en la EP

James Parkinson también describió en los enfermos de EP una disfunción autonómica clínica presentada como hipotensión ortostática, seborrea, salivación excesiva y disuria. Por tanto, además de las alteraciones en el cerebro, el SNP también se ve afectado en los enfermos que padecen la EP (Parkinson, 2002). Hoy en día se conocen estos y otros síntomas que indican afectación del SNA en los enfermos con EP (ver revisiones de Goldstein *et al.*, 2002; Chaudhuri *et al.*, 2006) que, si bien no resultan mortales, sí que deterioran aún más la calidad de vida de los pacientes. Algunas de estas afectaciones son:

- a) la hipotensión ortostática, esto es, una caída rápida de la tensión arterial al pasar a una posición erguida. Las personas que la padecen tienen una sensación de debilidad muscular, inestabilidad, visión borrosa cuando pasan del decúbito a la sedestación o al ortostatismo
- b) problemas urinarios o de estreñimiento
- c) problemas cutáneos, sobre todo, de aumento de la sudoración
- d) disminución de la salivación y problemas en la deglución
- e) impotencia

Estas disfunciones autonómicas pueden aparecer incluso como una manifestación inicial de la enfermedad en algunos casos de EP, sugiriendo una afectación muy temprana de estructuras autonómicas centrales y periféricas en la EP (Goetz *et al.*, 1986; Korczyn, 1990; Meco *et al.*, 1991; Kaufmann *et al.*, 2004). No obstante, el grado de hipocinesia y rigidez de los síntomas motores cardinales, suelen correlacionar con los valores de los síntomas autonómicos y, por tanto, ambas alteraciones pueden compartir mecanismos patológicos comunes.

Esta serie de síntomas aparecen por la afectación a múltiples niveles del sistema nervioso autónomo en los enfermos de EP, incluyendo alteraciones en el hipotálamo, núcleos (Edinger-Westphal, salivar, vagal dorsal) y ganglios parasimpáticos, así como núcleos (intermediolateral de la columna torácica) y ganglios simpáticos (ver Micieli *et al.*, 2003). Además, se ha detectado la presencia de LB en estas poblaciones neuronales, en particular en los ganglios simpáticos de los afectados por EP (Rajput y Rozdilsky, 1976; Orimo *et al.*, 2006). Particularmente, la regulación simpática al corazón está reducida y/o alterada en estos enfermos (ver revisión de Goldstein, 2003). Esta disfuncionalidad se debe a una disminución en la cantidad de noradrenalina en las terminaciones simpáticas al corazón que controla el ritmo cardíaco hecho comprobado por una captación reducida del análogo de noradrenalina meta-yodo-bencilguanidina (MIBG) marcado con ^{123}I , u otros análogos, en el corazón de los enfermos de EP desde los primeros estadios de la enfermedad (ver Courbon *et al.*, 2003; Goldstein, 2004; Figura 6). Esta desinervación simpática cardíaca se ha confirmado anatómicamente con la observación por inmunotinción con anticuerpos anti-TH en tejido cardíaco *post mortem* procedente de pacientes con EP (Orimo *et al.*, 2001, 2002, 2005; Amino *et al.*, 2005).

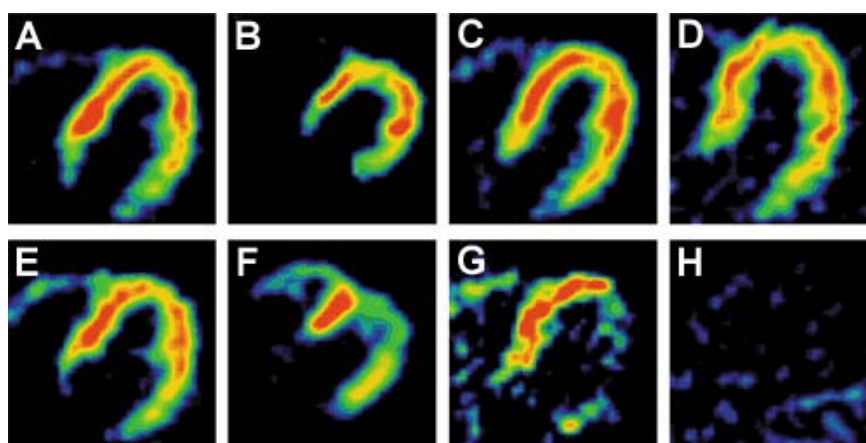


Figura 6. Neuroimagen del corazón en pacientes con EP mediante tomografía por emisión de positrones (PET). En las imágenes de arriba se ha utilizado amonio marcado con nitrógeno-13 y en las de abajo ^{18}F -dopamina. Algunos pacientes presentan niveles de radiactividad normales (A, E) pero la gran mayoría presenta niveles bajos (B-D, F, G) o casi nulos (H). Estas alteraciones se observan en pacientes de EP, incluso en ausencia de hipotensión ortostática. De Goldstein, 2003.

Aparte de la EP, existen tres entidades clínico-patológicas distintas que pueden producir fallo autonómico primario e hipotensión ortostática:

- a. *Fallo autonómico puro (FAP; Pure Autonomic Failure)*: disfunción autonómica (hipotensión ortostática y disfunción sexual y de la vejiga) sin signos de neurodegeneración central.
- b. *Atrofia multisistémica (MSA, del inglés Multiple System Atrophy, que incluye el síndrome Shy-Drager)*: fallo autonómico con degeneración progresiva en el SNC, puede ser parkinsoniana, cerebelar o mixta.
- c. *Enfermedad de Parkinson*: fallo autonómico con la degeneración progresiva en el SNC característica que causa el desorden del movimiento extrapiramidal.

En (a) y (c) se produce lesión posganglionar autonómica y disminuye, por tanto, la inervación simpática al corazón. En (b) la lesión es preganglionar y, por tanto, la inervación cardíaca está intacta. Además, a diferencia de la MSA o el FAP, casos con fallo autonómico severo que precedan a la EP típica no son frecuentes y la insuficiencia autonómica es generalmente menos severa (Benarroch, 1997; Banister y Mathias, 1999; Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de las entidades clínico-patológicas que presentan fallo autonómico con o sin desórdenes del movimiento

	FAP	MSA _P	MSA _C	MSA _M	EP-FA
Autonómico preganglionar		X	X	X	X
Autonómico posganglionar	X				X
Parkinsoniano		X		X	X
Cerebelar, piramidal o ambos			X	X	

FAP: fallo autonómico puro; MSA_P: MSA parkinsoniana, MSA_C: tipo cerebelar, MSA_M: tipo mixta, EP-FA: enfermedad de Parkinson con fallo autonómico. De acuerdo con este esquema, la EP con fallo autonómico (EP-FA) presenta lesión noradrenérgica posganglionar simpática a diferencia de la MSA parkinsoniana (MSA_P). De Goldstein, 2003.

Los cuerpos y neuritas distróficas de Lewy, cuyo componente mayoritario es la α -SYN, están presentes en diferentes regiones del SNA y/o en dianas de éste como el corazón (ganglios del surco interatrial, fibras nerviosas alrededor de las arterias coronarias y en el miocardio) (Iwanaga *et al.*, 1999; Figura 7), otras regiones del sistema simpático (núcleo intermediolateral de la medula torácica y los ganglios simpáticos) (Hartog Jager y Bethlem, 1960; Rajput y Rozdilsky, 1976; Jellinger, 1991; Wakabayashi y Takahashi, 1997) como el ganglio estrellado

(Orimo *et al.*, 2001), el plexo pélvico y la médula adrenal (Wakabayashi y Takahashi, 1997) en enfermos de EP. Sin embargo, este rasgo histopatológico no es exclusivo de la EP y también se observan LB y neuritis inmunorreactivas para α -SYN en células de afectados por FAP, MSA y parálisis supranuclear progresiva (PSP). Aunque la aparición de estos LBs o agregados tipo LB tiene lugar principalmente en la región nerviosa afectada en estas enfermedades, a veces, se encuentran fuera de estas regiones como en la *substantia nigra* en enfermos de FAP o en los ganglios simpáticos en la MSA (Hague *et al.*, 1992; Arai *et al.*, 2000; Nishie *et al.*, 2004; Sone *et al.*, 2005; Tabla 5).

En relación a la implicación de la α -SYN en las alteraciones autonómicas, se han encontrado pacientes con EP asociada a la mutación del gen de la α -syn que presentan síntomas de hipotensión ortostática, fallo neurocirculatorio simpático y muerte de las neuronas simpáticas que proyectan al corazón (Goldstein *et al.*, 2001). En el caso de los enfermos de EP por triplicación del gen de la α -syn presentan falta de proyección neuronal simpática al corazón (Singleton *et al.*, 2004). No existen estudios descritos sobre si también se da esta anomalía en enfermos de EP por duplicación del gen de la α -syn. Recientemente, se ha relacionado el grado de desinervación simpática al corazón con el número de LBs, la pérdida neuronal y la presencia de inmunorreactividad para la TH en los ganglios simpáticos de enfermos de α -sinucleinopatías (Orimo *et al.*, 2006).

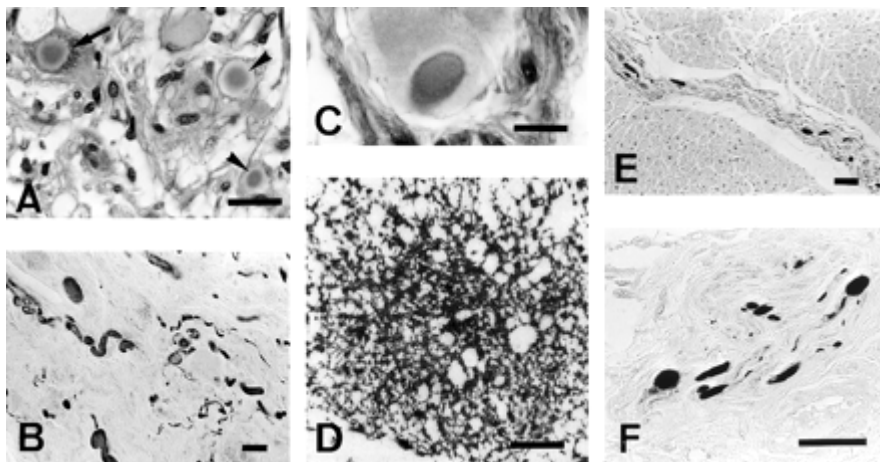


Figura 7. Fotografías de ganglios simpáticos (A-B) y plexos cardíacos (C-F) en pacientes de EP. (A) Cuerpos de Lewy en neuronas del ganglio simpático (flecha) y con más detalle (C, D). (B) Neuritis distróficas con expresión de α -SYN en el ganglio y (E) en el miocardio y con expresión de ubiquitina alrededor de los vasos sanguíneos en el corazón (F). De Iwanaga *et al.*, 1999.

Tabla 5. Características clínicas y patológicas de algunas α -sinucleopatías

	FAP	EP	DLB	MSA*
Fenotipo principal	autonómico (inervación simpática cardíaca alterada, hipotensión ortostática)	motor	demencia	<ul style="list-style-type: none"> • parkinsonismo • disfunción cerebelar y piramidal • fallo autonómico (inervación simpática cardíaca preservada)
Fenotipo secundario	sin otros síntomas neurológicos (si aparecen se reclasifica a EP, MSA o DLB)	<ul style="list-style-type: none"> • disfunción autonómica (hipotensión ortostática y desinervación posgang. simp. cardíaca) • complicaciones neuropsiquiátricas • alteraciones en olfacción, sensorial y sueño • depresión • demencia 	<ul style="list-style-type: none"> • parkinsonismo • desarreglos cognitivos • alucinaciones visuales • síntomas psiquiátricos • alteraciones de la consciencia • disfunción autonómica (desinervación posgangl. simp. cardíaca) 	depresión
Principal región afectada	SNA periférico	<i>substantia nigra</i>	corteza cerebral	corteza, cerebelo
Presencia de agregados proteicos y pérdida neuronal	<ul style="list-style-type: none"> • LB, LN, pérdida neuronal en sist. simpático y parasimp. pre- y posgangl. • LB, pérdida neuronal en SN, <i>locus coeruleus</i> • LB en núcleo dorsal del rafe y núcleo pedunculopontino 	<ul style="list-style-type: none"> • LB, LN, pérdida neuronal en SN, • LB y pérdida neuronal en <i>locus coeruleus</i>, rafe, núcleo basal de Meynert, núcleo dorsal del vago, corteza cerebral, hipotálamo, bulbo olfatorio y SNA 	<ul style="list-style-type: none"> • LB en sist. simpático, innervación al epicardio 	<ul style="list-style-type: none"> • ICGs en neuronas y glia, pérdida neuronal y gliosis en SN y regiones autonómicas** • agregados tipo LB o inclusiones neuronales citoplásmicas en ganglios simpáticos
Presencia de α -SYN en agregados	+	+	+	+

*MSA engloba a la degeneración estriatonigral, la atrofia olivopontocerebelar y el síndrome Shy-Drager predominando en cada caso bien el fallo parkinsoniano, cerebelar o autonómico, respectivamente (Graham y Oppenheimer, 1969). DLB, demencia con cuerpos de Lewy; EP, enfermedad de Parkinson; FAP, fallo autonómico puro; ICGs, inclusiones citoplásmicas gliales; LB, cuerpos de Lewy; LN, neuritas de Lewy; MSA, atrofia multisistémica; SN, *substantia nigra*; SNA, sistema nervioso autonómico. **regiones con inclusiones ICGs: oliva inferior, núcleo pontino, células cerebelares de Purkinje, putamen, núcleo caudado, globo palido, *locus coeruleus*, núcleo autonómico del tronco cerebral, columna intermediolateral de la médula espinal y núcleo de Onuf. Datos obtenidos de Martí *et al.*, 2003.

1.4.2. Organización del SNP: división autonómica y sensorial

El SNA de mamíferos consiste en una extensa red de nervios y ganglios, conectados al sistema nervioso central (tronco del encéfalo y médula espinal) por un lado y a las vísceras por el otro. Entre las dianas que inerva el SNA se encuentran los órganos de las cavidades abdominales y torácicas como el corazón, glándulas, vasos sanguíneos, varios órganos de la cabeza y cuello, y tejidos de la piel, controlando funciones de los sistemas respiratorio, circulatorio, digestivo y urogenital y los músculos involuntarios de dichos sistemas y de la piel. Todo este entramado de nervios y ganglios se organiza en grupos de ganglios que se pueden subdividir en ganglios paravertebrales, prevertebrales, paraviscerales e intramurales. Además, otro grupo de ganglios se localiza en la cabeza e inervan glándulas salivales, ojos y vasos sanguíneos craneales. Los ganglios paravertebrales forman dos cadenas (cadena simpática) a cada lado de la columna vertebral y están conectados a nivel torácico-lumbar con la médula espinal mediante nervios espinales denominados rama comunicante blanca, por la mielinización de sus axones. Por encima de la cadena simpática, a nivel cervical, se localizan los ganglios cervical superior, medio y, por debajo, el ganglio estrellado. Los ganglios prevertebrales forman un plexo (plexo abdominal formado por el ganglio celíaco y el ganglio mesentérico superior) situado cerca de la aorta abdominal. Los ganglios paraviscerales se encuentran próximos a las vísceras, la mayoría en el plexo cardíaco y pélvico y en menor número en el plexo próximo a la musculatura de la tráquea y los bronquios. Por último, los ganglios intramurales se localizan dentro de la pared del tracto gastrointestinal y biliar (Gabella, 1995).

Anatómicamente, la división simpática del SNA comprende los ganglios paravertebrales y prevertebrales y sus nervios asociados. Estos ganglios presentan la gran ventaja de que su tamaño relativamente grande, su localización discreta, a cierta distancia del órgano que van a inervar, y su accesibilidad permiten tanto su estudio en preparaciones histológicas como su aislamiento para estudios bioquímicos o en cultivo tras su disociación. La mayoría de las neuronas simpáticas posganglionares son noradrenérgicas, salvo algunas pocas que inervan las glándulas sudoríparas y las arterias musculares, que son colinérgicas. La división parasimpática del SNA comprende los ganglios autonómicos de la cabeza y nervios asociados como el vago. Las neuronas posganglionares parasimpáticas se localizan en pequeños ganglios cercanos a los órganos que van a inervar, más difíciles de identificar y menos accesibles que los ganglios simpáticos. Utilizan la acetilcolina como neurotransmisor. Los ganglios paraviscerales cardíacos y pélvicos están principalmente inervados por la división parasimpática, aunque los ganglios pélvicos también reciben inervación simpática (Baluk, 1995).

Las neuronas simpáticas posganglionares utilizan como neurotransmisor la noradrenalina, o norepinefrina, que pertenece a la familia de las catecolaminas, que incluye otros miembros

químicamente relacionados, como la dopamina, neurotransmisor de las neuronas de la SN. A partir de la dopamina se formará la noradrenalina y posteriormente, si es el caso, la adrenalina (o epinefrina) (ver Figura 8). Por tanto, todas estas células que sintetizan catecolaminas expresan TH, enzima limitante en esta ruta de biosíntesis (Nagatsu *et al.*, 1964). La noradrenalina sintetizada es liberada mediante la exocitosis de las vesículas sinápticas a la hendidura sináptica, activando los receptores adrenérgicos de la membrana postsináptica y receptores propios. Seguidamente, la mayor parte de la noradrenalina es recaptada hacia el citoplasma por el transportador de noradrenalina (NAT), situado en la propia membrana presináptica y que es bloqueable por drogas como la cocaína y las anfetaminas o por antidepresivos tricíclicos como la desipramina (Axelrod *et al.*, 1961), donde una pequeña proporción de neurotransmisor, a través del transportador de monoaminas vesicular 2 (VMAT2), entra y se reutiliza en nuevas vesículas mientras que la otra parte es metabolizada por la monoaminaoxidasa (MAO). La noradrenalina que no es captada por el terminal sináptico es degradada por otros tejidos mediante las enzimas MAO y catecol-O-metil transferasa (COMT) (Tellioglu y Robertson, 2001; Eisenhofer *et al.*, 2004; Figura 8).

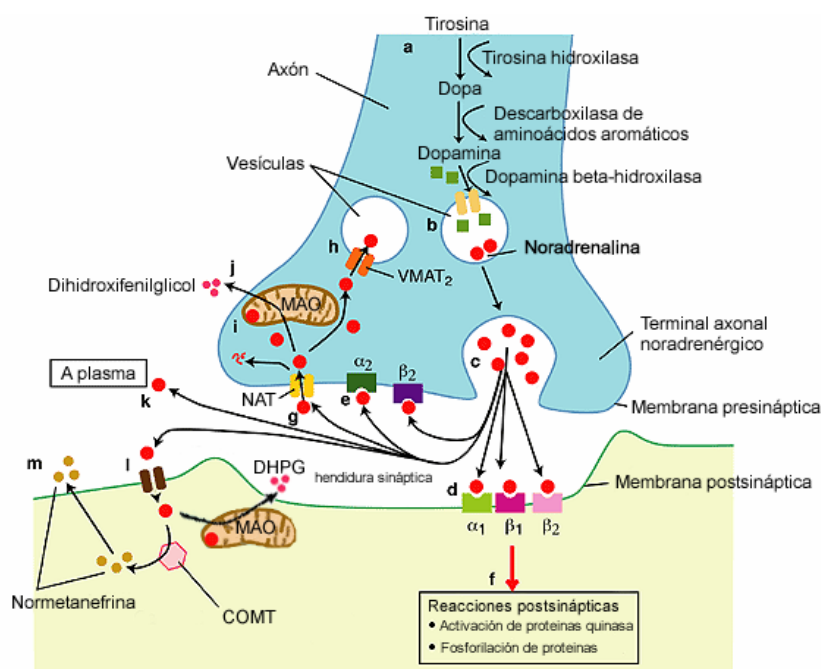


Figura 8. Diagrama de la síntesis, liberación y metabolismo de la noradrenalina. (a) La noradrenalina se sintetiza a partir de la tirosina, vía hidroxilación para formar dihidroxifenilalanina (dopa), descarboxilación para formar dopamina, e hidroxilación para formar noradrenalina, y (b) almacenada en vesículas. (c) Tras un estímulo, la noradrenalina se libera a la hendidura sináptica. (d) La noradrenalina liberada activa los receptores adrenérgicos localizados en la membrana postsináptica (α_1 , β_1 y β_2) y también (e) en la membrana presináptica (α_2 , β_2), activando cascadas postsinápticas (f). (g) El NAT es responsable de la recaptación presináptica de la noradrenalina de la hendidura sináptica. (h) Tras la recaptación, parte de la noradrenalina es reciclada en vesículas mediante la entrada por el VMAT2; (i) el resto es metabolizado en la mitocondria por la MAO, y (j) su producto, el DHPG, es liberado al torrente sanguíneo. (k) Parte de la noradrenalina queda en el plasma o (l) es captada por las células receptoras y metabolizada por la MAO o por la COMT para formar DHPG o normetanefrina, respectivamente. COMT, catecol-O-metil transferasa; DHPG, dihidroxifenilglicol; NAT, transportador de noradrenalina, MAO, monoaminaoxidasa; VMAT2, transportador de monoaminas vesicular tipo 2. Modificada de Tellioglu y Robertson, 2001.

Además del SNA, el SNP está constituido por la división sensorial. Ésta consiste en una serie de ganglios pares, craneales y espinales (cervicales, torácicos, lumbares y sacros), en los que se ubican los cuerpos de las neuronas sensoriales primarias. En la cabeza se localizan los ganglios craneales: el ganglio trigémino, geniculado, los auditivos, superior, yugular, petroso, nodoso, y en el tronco los ganglios espinales o ganglios de la raíz dorsal. Las neuronas sensoriales primarias, de tipo pseudounipolar, proyectan una de sus ramas hacia los distintos tejidos y órganos (piel, músculo, vísceras) en los que se asociarán con receptores específicos. La rama central se dirige e inerva la médula espinal. Esta organización permite la transmisión de información sensorial (nociceptiva, propioceptiva y mecanoceptiva) desde la periferia al SNC (Le Douarin *et al.*, 1992).

A continuación se muestra cómo diferentes modalidades nerviosas del SNP (simpáticas y sensoriales) inervan una estructura como el corazón (Figura 9).

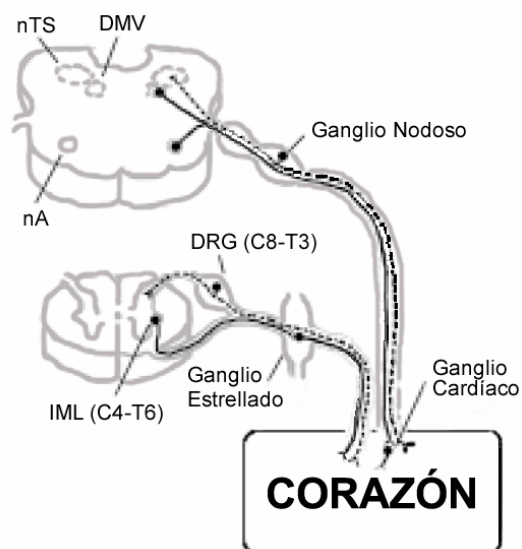


Figura 9. Ilustración de la localización de los cuerpos neuronales y las proyecciones que regulan la función cardíaca. Inervación simpática en trazo continuo, inervación sensorial en trazo discontinuo. C: nivel vertebral cervical, DMV: núcleo motor dorsal del vago, IML: columna intermediolateral, nA: núcleo ambiguo, nTS: núcleo del tracto solitario, T, nivel vertebral torácico. Adaptado de Hiltunen, 2001.

1.4.3. Desarrollo del sistema nervioso simpático: gangliogénesis, neurotrofismo y señalización intracelular

El sistema nervioso se deriva de la constitución del tubo neural embrionario, la cresta neural, y las placodas ectodérmicas. De la parte más dorsal del tubo neural recién formado se delaminan las denominadas células de la cresta neural que migran dorso-ventralmente, entre otras zonas, a la futura región que ocupará cada ganglio. Salvo en casos en los que hay contribución de placodas ectodérmicas craneales, estas células constituyen las neuronas y la glía de todos los ganglios autonómicos y sensoriales. Del engrosamiento de ciertas regiones ectodérmicas craneales de la región se forman las placodas, origen de las neuronas y la glía de

algún ganglio sensorial de la cabeza, como es el caso del complejo nodoso-petroso o los ganglios estato-acústicos (Le Douarin *et al.*, 1992).

Uno de los linajes celulares derivados de cresta neural más estudiados es el linaje simpato-adrenal (Landis y Patterson, 1981; Marusich y Weston, 1991). Las células de la cresta neural migran ventralmente hasta la aorta dorsal, junto a la que se agregan y diferencian para dar lugar a neuronas simpáticas posganglionares, o hasta el primordio de la glándula adrenal, en el que se diferencian en células cromafines (Doupe *et al.*, 1985). En embriones de ratón, los precursores simpáticos de ratón aparecen hacia el estadio E11,5 a lo largo de la aorta, en la región torácica, y posteriormente, por migración rostral posterior, en la región cervical (C1-C5) y, hacia E13,5, en la presunta región del SCG (Rubin, 1985). En estos estadios del desarrollo, los ganglios constituyen una columna uniforme a todos los niveles vertebrales y están compuestos por células gliales y neuroblastos que aunque empiezan a expresar TH siguen proliferando para formar el ganglio (Hall y Landis, 1991). Aunque en E13,5 las células precursoras están comprometidas con un destino neuronal (Hall y Landis, 1991), la división terminal de los precursores neuronales simpáticos se da entre E12,5 y E16,5 (Landis y Damboise, 1986) con un pico neurogénico en E14,5-E15,5. Mientras tanto, los precursores gliales del SCG están quiescentes durante este tiempo y proliferan a partir de E16,5 (Hall y Landis, 1991, 1992). La aparición del fenotipo noradrenérgico en los neuroblastos/neuronas simpáticas se puede caracterizar por la expresión más temprana del transportador de noradrenalina (NAT) y algo más tardía de la TH y la dopamina- β -hidroxilasa (DBH), enzima que transforma la dopamina en noradrenalina, en células de la cresta neural en diferenciación (Sieber-Blum, 1989a, b; Hall y Landis, 1992; Zhang y Sieber-Blum, 1992; Zhang *et al.*, 1997). La diversidad celular del SNP derivada de la cresta neural se genera por la acción de señales instructivas que inducen combinaciones específicas de factores de transcripción que controlan, a su vez, la especificación de los distintos subtipos celulares y la restricción progresiva de la multipotencia inicial de las células de cresta neural (McEvelly *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997; Anderson, 1999; Ma *et al.*, 1999; Hippenmeyer *et al.*, 2004). En el SNA, la influencia de miembros de la familia de los BMPs (BMP2 y 4; *bone morphogenetic protein*), que son secretados por la aorta, parecen jugar un papel fundamental en la inducción del fenotipo neuronal simpático mientras que la neuregulina GGF (*glial growth factor*) instruye la diferenciación de las células de Schwann (Anderson, 1997). En cuanto a los factores intrínsecos, el factor de transcripción Mash1 es esencial para la generación de las neuronas simpáticas determinando su diferenciación terminal (Guillemot *et al.*, 1993).

Una vez se ha producido la generación de las neuronas periféricas se inicia un proceso de selección modulado por miembros de las familias de factores neurotróficos relacionados con el

factor de crecimiento nervioso (NGF) y con el factor neurotrófico derivado de glía (GDNF) (Huang y Reichardt, 2001; Kirstein y Fariñas, 2002). Durante el desarrollo embrionario, para cada estructura o región neural, se produce un exceso inicial de neuronas que es posteriormente reducido por la competencia entre estas neuronas por factores tróficos que los territorios que inervan producen en cantidades limitantes (Levi-Montalcini, 1987). Cada población neuronal suele responder a uno o varios factores neurotróficos aunque suelen producirse cambios dinámicos tanto en la dependencia neurotrófica como en la expresión de los receptores neurotróficos durante el desarrollo (Airaksinen y Saarma, 2002; Kirstein y Fariñas, 2002). Además de en supervivencia neuronal, los factores neurotróficos son importantes reguladores de la proliferación y la diferenciación, y de otras funciones celulares como la migración y la dirección del crecimiento axonal o la plasticidad sináptica (Huang y Reichardt, 2001).

La familia mejor conocida dentro de los factores neurotróficos es la familia de las neurotrofinas que, en mamíferos, comprende a cuatro miembros: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5). Estas proteínas funcionan, como homodímeros asociados no covalentemente, activando proteínas de la familia Trk (*tropomyosin-related kinase*) de receptores tirosina quinasa que incluye tres miembros: TrkA, TrkB y TrkC. TrkA es el receptor para NGF, tanto BDNF como NT-4/5 activan TrkB y NT-3 es el ligando para TrkC aunque se une también a TrkA y TrkB con menor eficacia (Bibel y Barde, 2000; Huang y Reichardt, 2003; Figura 10). Además de a los Trk, todas las neurotrofinas se unen con menor afinidad al receptor $p75^{NTR}$, glicoproteína transmembrana a la que hoy en día se le atribuyen diversas funciones (Bibel y Barde, 2000; Dechant y Barde, 2002; Lu *et al.*, 2005).

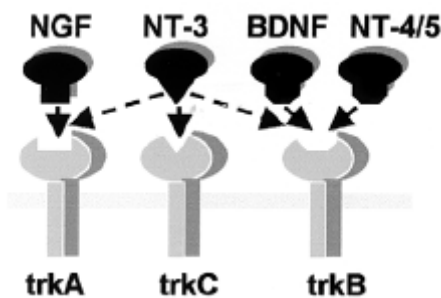


Figura 10. Esquema de la especificidad de unión entre las neurotrofinas y los receptores Trk. De Fariñas *et al.*, 2002.

Los Trk son proteínas transmembrana de tipo I y pertenecen a la superfamilia de receptores tirosina quinasa. El dominio extracelular contiene dos regiones ricas en cisteínas (dominios 1 y 3) flanqueando un dominio que consta de tres motivos de 24 residuos ricos en leucinas (dominio 2). Les siguen dos dominios inmunoglobulina del tipo C2 en la región yuxtamembrana (dominios 4 y 5) (Figura 11). Es el dominio 5 el mayor responsable de la unión

con la neurotrofina y los dominios ricos en cisteína y leucina tienen un efecto modulador de dicha interacción. Es importante la glicosilación del receptor Trk ya que regula su correcta localización en la membrana e inhibe su activación espontánea (Friedman y Greene, 1999). El principal producto de la transcripción de los genes *trk* es una proteína de 80 kDa, que tras varias etapas de glicosilación origina proteínas de 110 y 140 kDa (gp140^{TrkA}) (Martín-Zanca *et al.*, 1989) o de 145 kDa (gp145^{TrkB} y gp145^{TrkC}) (Klein *et al.*, 1989; Lamballe *et al.*, 1991). Además de estas variantes, existen isoformas alternativas para cada Trk. Existen isoformas con ausencia o presencia de algunos aminoácidos en la parte extracelular yuxtamembrana lo que parece regular la especificidad en la respuesta de los Trk a unas u otras neurotrofinas. Otras isoformas presentan inserciones en el dominio quinasa o carecen de la mayor parte del dominio intracelular. Se ha propuesto que estas isoformas podrían formar heterodímeros inactivos con las Trk funcionales actuando como dominantes negativos o bien a modo de proteínas presentadoras de neurotrofinas a receptores funcionales (ver revisión de Roux y Barker, 2002; Huang y Reichardt, 2003).

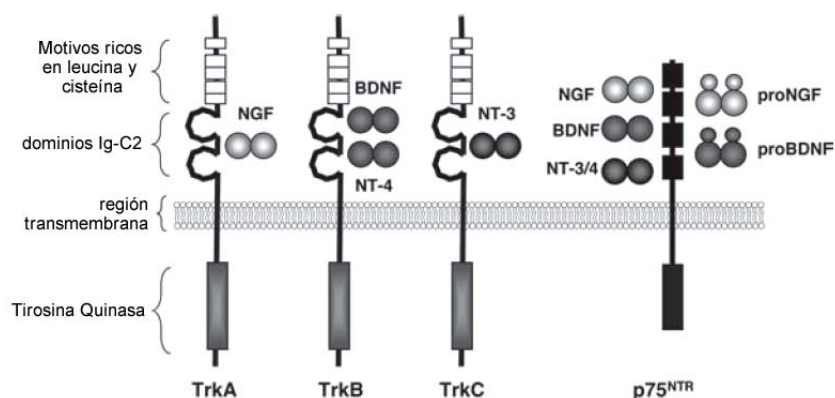


Figura 11. Neurotrofinas y estructura extracelular de sus Trk. Las neurotrofinas funcionan como dímeros que se unen a receptores Trk y p75^{NTR} y se sintetizan como proproteínas que se unen exclusivamente a p75^{NTR}. El dominio extracelular de los Trk contiene un dominio rico en leucinas flanqueado por dos de cisteína, y yuxtamembrana presenta dos dominios inmunoglobulina tipo C2. Modificado de Arévalo y Wu, 2006.

Las neurotrofinas se unen directamente y dimerizan a los receptores Trk resultando en la activación y autofosforilación de residuos tirosina quinasa presentes en la zona de activación del dominio citoplasmático. Aunque los receptores Trk contienen 10 tirosinas evolutivamente conservadas, sólo tres de ellas, Y670, Y674 y Y675, son las responsables de la autofosforilación del dominio quinasa que controla la actividad tirosina quinasa fuera de la zona de activación. La fosforilación de estos aminoácidos conduce a una activación quinasa completa. La fosforilación de los otros residuos promueve la señalización creando sitios de anclaje para proteínas adaptadoras, acoplando estos receptores a cascadas de señalización intracelular, que incluyen las vías Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt y PLC γ 1/PKC δ (Kaplan y Miller, 2000; Huang y Reichardt, 2003; Figura 12), implicadas en supervivencia.

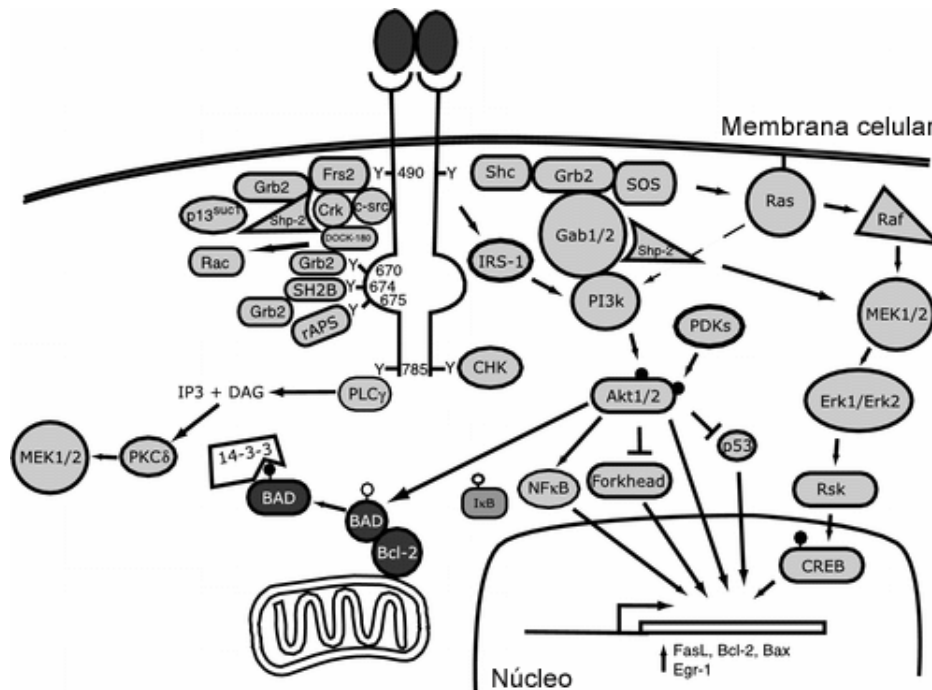


Figura 12. Diagrama de las vías de señalización intracelular tras activación de los receptores *Trk* de membrana: *PI3K/Akt*, *Ras/Raf/MEK/ERK* y *PLCγ1/PCKδ*. Modificado de Huang y Reichardt, 2003.

La cascada de señalización *Ras/Raf/MEK/ERK* se inicia con la fosforilación del residuo Y490 y el acoplamiento de una proteína adaptadora. *Shc* es la proteína adaptadora que se une a través de su dominio PTB a Y490 y es activada a través de sus tirosinas. Una vez fosforilada, fosfo-*Shc* interacciona con los complejos preformados *Grb2-SOS* (*Ras exchange factor son of Sevenless*) que participan en la activación transitoria de *Ras* (Nimnual *et al.*, 1998). En consecuencia, *Ras* activa *PI3K*, la vía de la p38 MAPK/proteína quinasa activadora de MAPK 2 y la vía *c-Raf/ERK* (Xing *et al.*, 1998; Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). La activación de *ERK1* y *ERK2* requiere la fosforilación secuencial de *Raf* a *MEK1* y/o *MEK2* y de éstas a *ERK1* y *ERK2* (English *et al.*, 1999). Si bien la señalización a través de *Shc/Grb2/SOS* media una activación transitoria de la vía de señalización de *ERK* (Grewal *et al.*, 1999), una activación prolongada se consigue con la unión al residuo fosforilado Y490 de la proteína adaptadora *FRS2* (*fibroblast growth factor receptor substrate-2*) (Meakin *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2002). La fosforilación de *FRS2*, proteína que se encuentra anclada a membrana, recluta a un complejo formado por las proteínas adaptadoras *Grb2* y *Crk*, la fosfatasa *Shp2*, el substrato quinasa dependiente de ciclina *p13suc1* y *Src* (Meakin *et al.*, 1999). La señalización por *Trk* aumenta la asociación de *Crk* con *FRS2* (Kao *et al.*, 2001). La asociación con *Crk* resulta en la activación con el factor intercambiador de nucleótidos de guanina C3G, y ésta por la pequeña proteína G *Rap1* (Nosaka *et al.*, 1999). *Rap1*-GTP estimula *B-Raf* iniciando la cascada de *ERK*. De entre las dianas moleculares de *ERK* se

incluyen las quinasas S6 ribosomales (RSKs). Tanto las RSKs como la proteína quinasa activadora de MAPK 2 fosforilan CREB (*cAMP-regulated enhancer-binding protein*) y otros factores de transcripción (Xing *et al.*, 1998). Se ha visto que CREB regula genes esenciales para la supervivencia *in vitro* de neuronas simpáticas (Riccio *et al.*, 1999).

La activación directa de PI3K a través de Ras es la principal vía a través de la cual la señalización por Trk promueve supervivencia en la mayoría de las neuronas (Vaillant *et al.*, 1999). No obstante, existen algunas neuronas que activan PI3K a través de la fosforilación de IRS-1 (*insulin-receptor substrate-1*) (Yamada *et al.*, 1997). Además de la activación de PI3K a través de Shc-Grb2-SOS-Ras, los dominios SH3 de Grb2 son capaces de interactuar con las proteínas adaptadoras Gab1 y Gab2, además de SOS (Holgado-Madruga *et al.*, 1996; Vaillant *et al.*, 1999). Una vez translocada a la membrana, Gab1/2 se fosforila a través de la actividad tirosina quinasa de Trk, resultando en la formación de sitios de reconocimiento para proteínas con dominios SH2 como la PI3K (Holgado-Madruga *et al.*, 1997). La ocupación de los dos dominios SH2 de la p85, subunidad reguladora de la enzima, por tirosinas fosforiladas provoca un cambio de conformación de la subunidad p110, subunidad catalítica de la enzima, activando su actividad quinasa (Rordorf-Nikolic *et al.*, 1995). La PI3K cataliza la fosforilación de los fosfatidil inosítoles difosfato (PtdIns4,5-P₂). Una vez fosforilados estos lípidos de membrana actúan como segundos mensajeros sobre múltiples efectores que son reclutados a la membrana plasmática. Este es el caso de la Ser/Thr quinasa Akt/PKB que con su dominio de homología a Pleckstrina (dominio PH) se une a los fosfatidil inosítoles trifosfato (Frech *et al.*, 1997). Tras su unión a membrana, Akt/PKB es activada por fosforilación en dos residuos diferentes (Alessi *et al.*, 1996), la Thr308 fosforilada por PDK1, quinasa reclutada a membrana por unión de su dominio PH a los fosfatidil inosítoles trifosfato (Alessi *et al.*, 1997; Stokoe *et al.*, 1997), y la Ser473 fosforilada por el complejo mTOR/Rictor/GβL (Sarbasov *et al.*, 2005). Dado que la principal función de la señalización por PI3K es la de promover supervivencia neuronal, los substratos de Akt incluyen proteínas implicadas en diferentes niveles de las vías de muerte celular. Entre los substratos que Akt fosforila se incluye Bad (Datta *et al.*, 2000), el factor de transcripción Forkhead (FKHRL1) (Brunet *et al.*, 1999), GSK3β (*glycogen synthase kinase 3-β*; Crowder y Freeman, 2000; Hetman *et al.*, 2000), la caspasa 9 de humanos, que no la de ratón (Brunet *et al.*, 1999) o la quinasa del inhibidor del factor de transcripción NF-κB (IKKβ; Madrid *et al.*, 2000).

La fosforilación de Y785 de TrkA, y sitios análogos en TrkB y TrkC, recluta a la PLC-γ1 y es activada mediante fosforilación por el dominio catalítico de Trk (Kaplan y Miller, 2000). La fosfolipasa PLC-γ1 activada hidroliza fosfatidil inosítoles y genera diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (Vetter *et al.*, 1991). Este fosfolípido induce la liberación de Ca²⁺ almacenado, aumentando los niveles de Ca²⁺ citoplásmico y, por tanto, activando muchas vías

controladas por este segundo mensajero como la vía de la PI3K (Egea *et al.*, 2001). Además, el NGF activaría una proteína quinasa regulada por DAG, PKC δ , necesaria para la activación de la vía de las ERKs y para el crecimiento neurítico (Corbit *et al.*, 1999).

Las neuronas simpáticas son dependientes de las neurotrofinas NGF y NT-3. Neuronas simpáticas aisladas a partir de embriones o neonatos de roedores mueren en cultivo si no se les suministra NGF (Chun y Patterson, 1977). Si se aumenta experimentalmente la cantidad de NGF disponible durante el desarrollo se rescatan neuronas simpáticas que morirían de forma natural, mientras que el descenso manipulado en los niveles del factor trófico conduce a una muerte exacerbada de las neuronas simpáticas (Levi-Montalcini, 1987; Albers *et al.*, 1994). De la misma manera, ratones deficientes nulos en los genes que codifican para NGF o su receptor TrkA pierden al menos 80% de las neuronas simpáticas antes de la segunda semana después del nacimiento (Crowley *et al.*, 1994; Smeyne *et al.*, 1994; Fagan *et al.*, 1996). El NGF se sintetiza en los territorios con inervación simpática y los axones de las neuronas simpáticas posganglionares transportan NGF (Levi-Montalcini, 1987). La reducción considerable (50%) en neuronas simpáticas que se observa en los mutantes para NT-3 indica que esta neurotrofina también es esencial para la supervivencia de las neuronas simpáticas (Fariñas *et al.*, 1994; Ernfors *et al.*, 1994; Francis *et al.*, 1999). Aunque NT-3 no parece capaz de mantener la supervivencia de neuronas simpáticas postnatales *in vitro*, los simpatoblastos, que tampoco sobreviven en medios sin suero, pueden ser mantenidos en cultivo con concentraciones bajas de NT-3 (Birren *et al.*, 1993; DiCicco-Bloom *et al.*, 1993). Este resultado está de acuerdo con la observación de que los simpatoblastos no expresan TrkA sino TrkC durante la embriogénesis (Birren *et al.*, 1993; DiCicco-Bloom *et al.*, 1993). Aunque esto sugirió durante un tiempo que la dependencia del sistema simpático de estas dos neurotrofinas sería, posiblemente, secuencial, los estudios en mutantes para NGF y NT-3 han revelado que la dependencia *in vivo* para NT-3 y NGF en neuronas simpáticas se produce simultáneamente y que la acción de NT-3 se produce a través de TrkA (Francis *et al.*, 1999). Eso sí, la población mantenida por NT-3 es una subpoblación de aquella que requiere NGF para sobrevivir (Francis *et al.*, 1999). Por otro lado, las neuronas simpáticas posganglionares sintetizan BDNF y éste regula la inervación por parte de las neuronas simpáticas centrales (Causing *et al.*, 1997).

La familia de factores neurotróficos relacionados con el GDNF (GFLs), que incluye además a artemina, persefina y neurturina, también contribuyen al desarrollo y supervivencia de las neuronas simpáticas durante la embriogénesis. Todos estos factores señalizan a través de la tirosina quinasa c-RET, aunque no se unen directamente a ella sino que lo hacen a través de coreceptores conocidos como GFR α (1-4) unidos a la membrana plasmática a través de uniones de tipo glicosil fosfatidilinositol (Airaksinen y Saarma, 2002). Estos coreceptores, que no pueden

señalar por sí mismos, presentan, aunque con un cierto solapamiento, relaciones de especificidad con los miembros de la familia. A partir de RET se activan distintas vías intracelulares de transducción de la señal que conducen a distintos comportamientos celulares, entre ellos la supervivencia (Airaksinen y Saarma, 2002). Aunque en este trabajo de tesis doctoral no se ha evaluado el papel de GDNF en la supervivencia de neuronas periféricas, sí que hay que resaltar que RET y algunos miembros de la familia del GDNF muestran acciones en el desarrollo de los ganglios simpáticos. Esto se hace evidente en el análisis de mutantes nulos para factores y receptores de esta familia, observándose problemas en la proliferación de los precursores simpáticos en los mutantes de *Ret*, *Artn* y *Gfra3* y cambios, aunque muy moderados, en el número de neuronas simpáticas en el mutante de *Gdnf* y *Gfra1* (Airaksinen y Saarma, 2002).

1.4.4. Otros sistemas catecolaminérgicos: neuronas sensoriales viscerales

Además de la expresión de TH en el SNA, el ganglio nodoso presenta una población de neuronas, entre 15-20% del total, que también expresa TH (Dahlqvist y Forsgren, 1992) y dependen del factor neurotrófico BDNF (Erickson *et al.*, 2001). El nodoso o complejo ganglionar sensorial nodoso-petroso (denominado así porque en ratón no puede individualizarse morfológicamente el ganglio nodoso y el ganglio petroso) es un ganglio sensorial craneal eminentemente visceral, componente crítico en los reflejos autonómicos cardiovascular, respiratorio y visceral, ya que transmite información relativa a la presión sanguínea, distensión gástrica y la oxigenación sanguínea al SNC (Figura 9). Muchas de las neuronas nodosas-petrosas transmiten información sensorial de tipo visceral, tanto de la vasculatura arterial como información para el control de la respiración. Por ejemplo, transmiten información quimiosensorial desde las células glómicas del cuerpo carotídeo, que responden a cambios en la presión parcial de oxígeno en sangre, e información mecánica desde los barorreceptores, aferentes a modo de terminaciones libres que inervan regiones especializadas en el tracto cardiaco y que responden a deformaciones mecánicas causadas por cambios rápidos en la presión arterial sanguínea. La lesión de estas neuronas puede producir hipotensión postural, respuestas cardiovasculares inadecuadas a cambios gravitacionales, e insuficiencia respiratoria. Por tanto, entre las diversas estructuras que inerva el ganglio nodoso en el cuerpo, a través del nervio vago, se encuentra el corazón y vasos sanguíneos como la aorta (Zhuo *et al.*, 1997).

Embriológicamente, el ganglio nodoso se forma a partir de la migración de las células derivadas de la placoda ectodérmica durante E10,5 en el ratón (Morin *et al.*, 1997), con el pico de neurogénesis en E14 (Altman y Bayer, 1982), y la muerte celular programada en E12-E16 (Davies y Lumsden, 1990). Respecto a la dependencia trófica para la supervivencia neuronal

sensorial los estudios en ratones mutantes nulos de los genes que codifican para BDNF, NT-3 o NT-4/5 han mostrado una pérdida del 40-60% de las neuronas totales del ganglio en cada caso (Ernfors *et al.*, 1994a, 1994b; Liu *et al.*, 1995; Conover *et al.*, 1995; Silos-Santiago *et al.*, 1997; Fariñas *et al.*, 1994; Ernfors *et al.*, 1994; Erickson *et al.*, 1996, 2001). Asimismo, desaparece un 95% de las neuronas que constituyen el ganglio nodoso en ausencia del receptor TrkB (Silos-Santiago *et al.*, 1997) o en el ratón doble mutante nulo para BDNF/NT-4/5 (Conover *et al.*, 1995; Silos-Santiago *et al.*, 1997; Erickson *et al.*, 1996), sugiriendo que las neuronas nodosas son heterogéneas respecto a la respuesta a los diferentes ligandos de TrkB y que BDNF y NT-4/5 son los principales ligandos de TrkB actuando de modo no redundante y complementario sobre poblaciones celulares discretas de neuronas nodosas. Las neuronas sensoriales quimiorreceptoras y barorreceptoras comparten el requerimiento por la neurotrofina BDNF, que se expresa en los territorios diana en el momento del establecimiento de la inervación sensorial, y algunas de estas neuronas expresan tirosina hidroxilasa (Brady *et al.*, 1999). Por el contrario, la población de neuronas nodoso-petrosas dependientes de NT-4/5 pertenecen a otro grupo y son todas ellas negativas para tirosina hidroxilasa (Erickson *et al.*, 1996).

1.4.5. Vulnerabilidad del SNP a drogas “parkinsonianas”

Las drogas más usadas para analizar la susceptibilidad del SNP han sido el MPTP/MPP⁺ y la 6-OHDA. Se ha estudiado el efecto de estos neurotóxicos sobre las neuronas simpáticas de roedores (Luthman y Jonsson, 1986; Luthman y Sundstrom, 1990; Alkadhi y Hogan, 1992; Takatsu *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2004; Fukumitsu *et al.*, 2006), primates (Goldstein *et al.*, 2003), cánidos (Johannessen *et al.*, 1990) y aves (Bhave *et al.*, 1996). A nivel del sistema simpático de roedores, el MPTP produce desinervación cardíaca (Takatsu *et al.*, 2000) y descenso de la noradrenalina (Wallace *et al.*, 1984; Ambrosio *et al.*, 1988; Fuller *et al.*, 1989). Funcionalmente se ha visto un descenso de NAT de los terminales simpáticos posganglionares cardíacos (Fukumitsu *et al.*, 2006) así como un aumento de los radicales libres y agentes antioxidantes (Bhave *et al.*, 1996) y un descenso de la contractibilidad de los miocitos cardíacos (Ren *et al.*, 2004). Aunque la conversión de MPTP a MPP⁺ en el corazón parece no estar mediada por la MAO-B (Fuller y Hemrick-Luecke, 1986; Fuller *et al.*, 1988), la toxicidad del metabolito activo MPP⁺ estaría mediada por la entrada a través del receptor de membrana para monoaminas, en particular, el NAT (Jonsson *et al.*, 1986; Alkadhi y Hogan, 1992; Bhave *et al.*, 1996). De hecho, el tratamiento con desipramina, un bloqueador de la recaptación de noradrenalina, bloquea la intoxicación por MPTP o MPP⁺ (Luthman y Jonsson, 1986; Bhave *et al.*, 1996).

El primer efecto biológico observado de la 6-OHDA fue el descenso de modo duradero de noradrenalina en la proyección simpática al corazón (Porter *et al.*, 1963, 1965) y posteriormente se vio la destrucción de la inervación simpática al corazón (Dowell, 1976). La administración de este neurotóxico a perros se ha utilizado para estudiar el sistema cardiovascular (Soares-da-Silva *et al.*, 1988; Valette *et al.*, 1995; Ruffly y Leonard, 1997). En roedores y primates el tratamiento con 6-OHDA destruye selectivamente las neuronas catecolaminérgicas (Porter *et al.*, 1965; Porter y Stone, 1967; Sundstrom *et al.*, 1988; Luthman *et al.*, 1989; Goldstein *et al.*, 2003). Esta simpatectomía química puede ser total, como sucede tras la administración a animales neonatos ya que destruye cuerpos y terminales celulares noradrenérgicos (Angeletti y Levi-Montalcini, 1970; Angeletti y Levi-Montalcini, 1971; Jaim-Etcheverry y Zieher, 1971; Clark *et al.*, 1972; Finch *et al.*, 1973), o bien parcial en el caso de animales adultos, ya que destruye sólo los terminales noradrenérgicos (Thoenen y Tranzer, 1968; de Champlain, 1971; Clark *et al.*, 1972; Finch *et al.*, 1973). Se han estudiado los cambios que ocasiona la intoxicación en diferentes marcadores catecolaminérgicos como los niveles de expresión y actividad de la TH, catecolaminas y DOPA sobre todo de nervios adrenérgicos (Heikkila *et al.*, 1973; Kawamura *et al.*, 1999). A diferencia de lo que sucede con el MPTP, las distintas cepas de ratón no muestran diferencias en la respuesta a 6-OHDA (Luthman *et al.*, 1990). Por otro lado, la lesión con 6-OHDA en ratones neonatos en presencia de bloqueadores de la captación de la dopamina no produce fallo motor (Luthman *et al.*, 1989). Respecto a su modo de acción, parte de la neurotoxicidad producida por la 6-OHDA se debe a la inactivación de la COMT a nivel extracelular (Borchardt *et al.*, 1976).

En resumen, las neuronas catecolaminérgicas del SNP son susceptibles de ser intoxicadas con drogas que causan parkinsonismo y se observan disfunciones de estas neuronas en pacientes con EP.

2. OBJETIVOS

La EP es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada principalmente por alteraciones en el SNC que causan los característicos trastornos del movimiento. Sin embargo, muchos pacientes con EP manifiestan alteraciones autonómicas que aparecen durante el curso de la enfermedad, sugiriendo una afectación del SNP. El descubrimiento de que ciertas toxinas, como el MPTP, inducen síntomas de EP en los seres humanos ha sugerido la implicación de factores tóxicos ambientales en la aparición y desarrollo de la enfermedad. Los estudios genéticos, por otro lado, han identificado mutaciones en genes únicos que producen EP familiar sugiriendo un fuerte componente genético, a pesar de que los casos de EP familiar monogénica constituyen un 5-10%. Las primeras mutaciones asociadas a EP familiar con herencia autosómica dominante en humanos se identificaron en el gen *SNCA* que codifica para la α -sinucleína y conducían a cambios aminoacídicos únicos en la proteína, o a aumentos en la dosis génica. A pesar de que algunas evidencias sugieren que la α -SYN pueda estar implicada en plasticidad sináptica y en modulación de la neurotransmisión dopaminérgica en el SNC, su función normal es todavía desconocida. Para tratar de entender el papel de la α -SYN en situaciones normales y patológicas hemos llevado a cabo un análisis del papel que juega esta proteína en el SNP normal y expuesto a tóxicos ambientales que producen parkinsonismo. Los objetivos del trabajo han sido:

- 1. La caracterización del patrón de expresión de la α -SYN en el SNP**
- 2. El análisis del fenotipo de un mutante nulo para α -syn a nivel del SNP**
- 3. El estudio de la relación entre α -SYN y la respuesta de las neuronas simpáticas a tóxicos ambientales que producen parkinsonismo**

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales y tratamientos

3.1.1. Animales y condiciones de estabulación

En este estudio se han utilizado ratones de una cepa con fondo genético mixto 129/SvJ × C57BL/6J de genotipo salvaje ($\alpha\text{-syn}^{+/+}$) y mutante homocigoto para el gen de la $\alpha\text{-sinucleína}$ ($\alpha\text{-syn}^{-/-}$), que fue generada en el laboratorio del Dr. Arnon Rosenthal (Department of Neuroscience, Rinat Neuroscience, South San Francisco, USA) tal como se describe en Abeliovich *et al.* (2000). La colonia de ratones se mantuvo en condiciones de heterocigosis y los animales de genotipo salvaje y mutante para los distintos análisis se obtuvieron mediante cruces entre individuos de genotipo $\alpha\text{-syn}^{+/+}$ y entre individuos de genotipo $\alpha\text{-syn}^{-/-}$, respectivamente. Se han utilizado, además, ratones de una cepa transgénica (tg) en la que la expresión del cDNA que codifica para la forma salvaje de la $\alpha\text{-syn}$ humana se encuentra bajo el control del promotor largo del gen de la *TH* (*TH-h α -syn tg⁺*) sobre un fondo genético C57Bl6 puro y que presenta expresión en las poblaciones catecolaminérgicas del SNP además de las del SNC. Esta línea transgénica, no caracterizada previamente, también fue generada en el laboratorio del Dr. Rosenthal. El transgén se mantuvo siempre en heterocigosis mediante cruzamiento de individuos transgénicos heterocigotos con animales de genotipo salvaje de fondo C57Bl6 obtenidos de la compañía Charles River (Charles River Laboratorios España). Todos los animales fueron mantenidos en condiciones adecuadas de estabulación, en el Servicio de Producción Animal del Campus de Burjassot de la Universidad de Valencia.

Para los estudios embrionarios se pusieron a cruzar animales de los genotipos apropiados a última hora de la tarde. Si a la mañana siguiente, a primera hora, se observaba tapón vaginal indicativo de una cópula, se separaba la hembra para el seguimiento de la gestación y se consideraba como estadio embrionario (E) 0,5 el mediodía de ese día.

3.1.2. Genotipado

Para establecer el genotipo de cada animal se realizaba previamente la extracción de DNA a partir de un trozo del extremo de la cola, en el caso de los animales adultos, o bien de parte de la región posterior del cuerpo en el caso de los embriones. El procedimiento que se seguía se describe a continuación.

Protocolo de purificación de DNA genómico:

1. Se añade proteinasa K (0,1 mg/ml) en tampón específico (0,5% SDS, 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris pH 8,0 y 3 mM EDTA) suficiente para cubrir la muestra (500 µl aprox.).
2. Se incuba durante toda la noche a 55-60 °C en rotación.
3. Se centrifuga a 16000 g (Eppendorf 5417R) durante 5 min.
4. Se cogen unos 300 µl del sobrenadante y se transfieren a otro tubo Eppendorf. Se añaden 75 µl de acetato potásico 8 M (Panreac) y 500 µl de cloroformo (Panreac) y se agita.
5. Se congela a -20/-70 °C. Tras descongelar bien, al menos durante 1 h, se centrifuga a 16000 g durante 5 min.
6. Se recoge el sobrenadante (300 µl) en un tubo nuevo y se añade 1 ml de etanol absoluto.
7. Se agita bien y se centrifuga durante 5-10 min.
8. Se lava dos veces con etanol al 70% y se deja secar el precipitado. Alternativamente se puede pescar el DNA con una varilla de vidrio y se deja secar igualmente.
9. Se resuspende el DNA en 100 µl de agua milli-Q (Millipore) y se guarda a 4°C.

Una vez obtenido el DNA genómico de cada individuo, se determinó el genotipo de los animales mediante PCR (94°C/1', 62°C/30'', 72°C/1' durante 35 ciclos), utilizando los siguientes cebadores:

alelo salvaje *wt* directo GGC GAC GTG AAG GAG CCA GGG A

alelo salvaje *wt* inverso CAG CGA AAG GAA AGC CGA GTG ATG TAC T

alelo mutante *neo* directo CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC

alelo mutante *neo* inverso GAT ACT TTC TCG GCA GGA GCA A

El genotipo de los ratones *TH-hα-syn tg⁺* también se determinó por PCR (95°C/30'', 70°C/30'', 72°C/90'' durante 2 ciclos; 95°C/30'', 66°C/30'', 72°C/90'' durante 2 ciclos; 95°C/30'', 60°C/30'', 72°C/90'' durante 25 ciclos) y los cebadores fueron:

directo GAT CTA ATG GGA CGG AGG CCT TTC T

inverso ATC ACA ATT GTT CTT AGG CTT CAG GTT CGT AGT CT

3.1.3. Inyección de BrdU

Para los estudios de proliferación se procedió a la inyección intraperitoneal de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU, Sigma; 50 mg/kg peso animal) a partir de una solución de 10 mg/ml BrdU en suero salino (0,9% cloruro sódico en agua destilada) de las ratonas gestantes con embriones del estadio de interés. Las hembras se sacrificaron dos horas tras la inyección mediante dislocación cervical, se diseccionaron los embriones como se comenta más adelante y se procesó el material para la detección de la incorporación de BrdU mediante inmunocitoquímica.

3.1.4. Inyecciones de MPTP

Se administró un régimen crónico de inyecciones de MPTP (Sigma, 200 mg/kg) a ratones macho de doce semanas de edad. El tóxico se disolvió en suero salino a una concentración de 10 mg/ml y se administró una inyección intraperitoneal a cada ratón, a razón de 40 mg MPTP/kg peso animal, cada día durante 5 días consecutivos. Paralelamente, otra tanda de animales fueron inyectados el mismo número de veces con suero salino. Los animales fueron sacrificados 4 días tras la última inyección y se diseccionaron cuidadosamente corazón y glándulas adrenales de cada animal para las cuantificaciones posteriores de proteínas mediante *western blot* y de neurotransmisores mediante HPLC.

3.2. Técnicas de análisis *in vivo*

3.2.1. Procesamiento histológico

Hembras preñadas en distintos días de gestación fueron sacrificadas mediante dislocación cervical y los embriones extraídos y fijados por inmersión en solución fijadora de Carnoy (60% etanol absoluto, 30% cloroformo, 10% ácido acético). Los embriones fueron deshidratados (etanol 70%-96%-100%), aclarados en tolueno y embebidos en parafina y se obtuvieron series de cortes sagitales de 7 μ m mediante un microtomo de parafina (Leica). Las secciones fueron recogidas sobre portaobjetos (O. Kindler GmbH), pretratados con una solución de gelatina alumbre (1:10 de la solución madre que contiene alumbre de cromo al 0,14%, gelatina al 0,45% y azida sódica al 0,1%, Prolabo), y teñidas con solución de Nissl (violeta de cresilo al 2%) o con hematoxilina de Gill nº 2 (Sigma). Para el análisis histológico de los ganglios simpáticos y sensoriales de animales postnatales, se procedió a la disección de los ganglios y posterior fijación y procesado igual a los realizados para los embriones.

3.2.2. Técnicas inmunohistoquímicas

Para realizar las detecciones inmunocitoquímicas en cortes de parafina se procedió a la desparafinación con xilol (Panreac), durante 15 min, e hidratación de las preparaciones histológicas en una batería de alcoholes de concentración decreciente (100, 96, 70%), seguido del lavado en tampón fosfato, 0,1 M (4 Na₂HPO₄ 0,1 M: 1 NaH₂PO₄ 0,1 M, Panreac) a pH 7,4 (PB).

En aquellos casos en los que la detección inmunocitoquímica se basó en el marcaje con peroxidasa, se bloqueó la peroxidasa endógena mediante una incubación en metanol al 10% y H₂O₂ al 3% en PB durante 15 min, seguido de un lavado con PB. En el caso de que la detección a realizar fuese la de la BrdU inyectada, se procedió a la desnaturalización de la cromatina con HCl 2 N durante 20 min a 37 °C, seguida de una neutralización con borato sódico 0,1 M, pH 8,5, durante 10 min.

En todos los casos, previo a la adición del anticuerpo primario, se bloquearon las uniones inespecíficas incubando las secciones en PB con Triton X-100 (Sigma) al 0,2% y suero de cabra al 10% (solución de bloqueo) durante 1 h a temperatura ambiente. La incubación con anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, a la dilución que se especifica en la siguiente tabla (Tabla 6), se realizó durante toda la noche.

Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados para inmunocitoquímica

Anticuerpo primario	dilución (concentración)	origen (referencia comercial, clon)
conejo anti-fosfo-Akt	1:100 (no especific.)	Cell Signaling (9611)
conejo anti-PKC-delta	1:200 (200 µg/ml)	Santa Cruz (sc-213, C-17)
conejo anti-caspasa 3 activada	1:300 (no especific.)	Cell Signaling (9661)
conejo anti-LSox5	1:100 (no especific.)	Julio A. Barbas
conejo anti-tirosina hidroxilasa	1:300 (67 µg/ml)	Pel-Freez (P40101)
ratón IgG anti- α -sinucleína humana	1:200 (no especific.)	Zymed Labs (LB509)
ratón IgG ₁ anti-bromodesoxiuridina	1:300 (53 µg/ml)	Dako (M0744)
ratón IgG ₁ anti-sinucleína-1	1:100-1:500 (250 µg/ml)	Trans Labs (S63320, clon 42)
ratón IgG _{2a} anti- β -tubulina III	1:700 (1000 µg/ml)	Covance (MMS-435P, clon TUJ1)

Tras varios lavados con PB, las secciones fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios apropiados según el anticuerpo primario y el sistema de detección deseado, todos ellos recogidos en la Tabla 7.

Tabla 7. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunohistoquímica

	marcador	dilución	casa comercial
Método de la peroxidasa			
caballo IgG anti-ratón	biotina	1:300	Vector Labs
cabra IgG anti-conejo	biotina	1:300	Vector Labs
Inmunofluorescencia			
F(ab') ₂ cabra anti-IgG de ratón	AlexaFluor 488	1:1000	Molecular Probes
F(ab') ₂ cabra anti-IgG de conejo	AlexaFluor 488	1:1000	Molecular Probes
F(ab') ₂ cabra anti-IgG de ratón	Cy3	1:1500	Jackson ImmunoRes.
F(ab') ₂ burro anti-IgG de conejo	Cy3	1:1500	Jackson ImmunoRes.

Para las detecciones basadas en peroxidasa, se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados y, tras varios lavados con PB, se procedió a la incubación de las secciones con el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC) (Vector Labs; Pierce), según especificaciones del fabricante, durante 1 h a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PB, la peroxidasa del complejo se reveló mediante una solución de 3,3'-diaminobencidina 4-HCl (DAB, Sigma) al 0,05% y H₂O₂ al 0,003% en PB durante 5 min y/o hasta que se apreciaba la aparición de la reacción coloreada específica en el tejido en inspección ocular bajo una lupa. Tras lavar las secciones con PB y agua, éstas fueron deshidratadas en una batería de alcoholes de concentración creciente (70, 96, 100 %), aclaradas con xilol, y montadas de forma permanente con medio de montaje (Eukitt, Panreac) y cubreobjetos.

En el caso de las detecciones fluorescentes se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos que emitían o bien en el espectro verde (AlexaFluor 488) o bien en el rojo (Cy3) y, tras la incubación en los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 h a temperatura ambiente y los correspondientes lavados, las secciones fueron incubadas en una solución de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) a 10-50 µg/ml durante 5 min y, tras lavar con agua destilada, se montaron las preparaciones colocando 20-80 µl de medio de montaje comercial especial para muestras fluorescentes (FluorSave™, Calbiochem). Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia convencional (Nikon E600) o en microscopio confocal (Leica Multispectral del Servicio de Microscopía Electrónica de los Servicios Centrales de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia).

3.2.3. Recuentos celulares

Los ganglios nodoso (NOD) y cervical superior (SCG) fueron identificados y mapeados en las series de cortes sagitales de los distintos embriones utilizando una lupa binocular. Se tomaron fotografías al microscopio de una sección de cada cuatro y se contabilizaron las células BrdU positivas y el resto de células, identificadas por la contratinción con hematoxilina de Gill nº 2, en cada una de las secciones fotografiadas. Se promedió el número de células contadas en los cortes seleccionados extrapolándolo al número total de secciones que constituían cada ganglio, tal como se describe en Fariñas *et al.*, (1996). El recuento en los ganglios postnatales se realizó de igual modo que en los embrionarios pero en preparaciones teñidas con violeta de cresilo al 2% (tinción de Nissl).

3.3. Cultivos celulares primarios

3.3.1. Disección, disociación y sembrado de las células

Para las disecciones se utilizó material de acero inoxidable (Dumont Dumostar) más o menos fino, dependiendo de la consistencia y edad del tejido a diseccionar, que se desinfectó con alcohol al 70% durante al menos una hora antes de empezar cada disección, así como placas de plástico estériles de 60 y 100 mm de diámetro (Orange Scientific).

Para la obtención de los embriones y ganglios se siguió el siguiente procedimiento.

Protocolo de disección de los embriones de ratón:

1. Se sacrifica la ratona gestante mediante dislocación cervical.
2. Se limpia el abdomen de la hembra con alcohol al 70%.
3. Se realiza una pequeña incisión en la piel de la ratona a nivel abdominal, cortando desde el centro hacia los lados.
4. Se coge con pinzas el útero con los embriones y se corta a cada lado de los ovarios asegurando la extracción de todos los embriones y se colocan en una placa de 100 mm de diámetro con medio L15.
5. Se separa cada uno de los embriones del útero con las tijeras y con pinzas se facilita la extracción de la bolsa embrionaria. Se eliminan los posibles restos de membranas.

Protocolo de disección de los ganglios NOD y SCG de los embriones E14,5:

1. Se decapitan los embriones y elimina la parte superior de la cabeza por encima de los ojos con tijeras finas. Se divide la cabeza por el plano sagital y eliminan los posibles restos de cerebro que pudieran quedar adheridos.
2. Colocando una mitad del cráneo con el plano cortado hacia arriba, se realiza una pequeña incisión con pinzas finas a nivel del hueso occipital y se levanta hacia la región posterior de la cabeza. Debajo de este hueso y pegado a la estructura ósea del oído interno se encuentran los ganglios NOD y SCG.
3. Se recolectan cuidadosamente los ganglios con pinzas muy finas. Ambos ganglios tienen aspecto blanquecino y transparente. El NOD es una estructura con forma redondeada, mientras que el SCG es una estructura con forma alargada que se encuentra en la base inferior del NOD.
4. Se eliminan las raíces de dichos ganglios con bisturís de modo que queden lo más limpios posible.
5. Se recogen los ganglios con pipeta Pasteur de vidrio pretratada para hacerla antiadherente y se depositan en un tubo falcon de 10 ml (Orange Scientific).

Para la disección de los ganglios NOD y SCG en animales P7 se puede seguir el procedimiento de los E14,5. Después, hay que asegurarse de eliminar todo el tejido circundante (raíces nerviosas, tejido conjuntivo, grasa, etc.) y es necesario trocear los ganglios con bisturís de modo que el tejido quede más accesible a las enzimas digestivas.

Para la recolección de los ganglios fue necesario el empleo de pipetas Pasteur largas de vidrio tratadas para evitar que el tejido aislado se pegara al vidrio. El tratamiento, que siempre se realizó en campana de flujo laminar (Telstar), consistió en:

1. Estrechamiento de la punta de vidrio con llama para eliminar cualquier imperfección del vidrio que pudiera dañar los ganglios y disminuir el volumen de paso.
2. Recubrimiento de la pipeta con una solución Sigmacote (Sigma) aspirando varias veces la solución mediante el empleo de una tetina de plástico. Se trata de una solución antiadherente de silicona en heptano que forma una capa covalente y microscópica sobre el cristal. Se deja secar unos minutos.
3. Lavado con agua milli-Q estéril, aspirando y soltando varias veces. Se deja secar unos minutos.
4. Recubrimiento de la pipeta con cualquier tipo de suero estéril, como suero de caballo (HS; Gibco). Se deja secar unos minutos.

Todos los medios utilizados fueron filtrados a través de filtros de tamaño de poro 0,2 µm (Millipore) para su completa esterilización. Se utilizó medio de cultivo L15 (Gibco) para la disección de los embriones y/o animales postnatales y medio F12 (Gibco) para el lavado de los ganglios, células y placas, adicionando al medio antibiótico/antimicótico (60 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, Gibco). También se utilizó medio HBSS sin calcio y sin magnesio (Gibco) al que se le añadió 0,2% Na₂HCO₃ (Sigma) para las digestiones. Antes de su uso, los medios de cultivo fueron atemperados a 37°C.

Para la disociación de las células se procedió en la forma que se indica a continuación.

Protocolo de disociación de las células:

1. Se lavan los ganglios recolectados con medio F12. Para ello se añade más medio F12 en el tubo con los ganglios y se centrifuga. Los ganglios embrionarios se centrifugan a 2000 g durante 2 min mientras que los ganglios de P7 se centrifugan a 1300 g durante 2 min. Se elimina el sobrenadante.
2. Se procede a la digestión enzimática para disociar las células. Para los ganglios embrionarios se añade tripsina al 0,05% (Worthington) en HBSS sin calcio y sin magnesio. Se incuba el contenido en baño a 37°C durante 15 min. Los ganglios postnatales requieren de la incubación secuencial con dos enzimas digestivas: colagenasa (Worthington) y tripsina. Primero se añade la colagenasa al 0,2% en F12 y se preincuba a 4°C durante 30 min. Posteriormente se incuba a 37°C durante 15 min. Se elimina la enzima con un lavado en F12. En segundo lugar, se añade la tripsina al 0,05% en HBSS sin calcio ni magnesio e incuba durante 20 min a 37°C. Se inactiva la tripsina añadiendo suero de caballo inactivado por calor (HIHS) (Gibco) al 10% en F12.
3. Se hacen dos lavados con F12. En el caso de las neuronas postnatales es necesario añadir DNAsa bovina pancreática (tipo IV, Sigma) a 40 µg/ml ya que se libera DNA de las células dañadas y esto dificulta la trituración y el lavado posterior de las células.
4. Tras eliminar el sobrenadante, se añade 1 ml de medio de cultivo definitivo, esto es, F12 suplementado (ver composición más adelante).
5. Se disgrega mecánicamente con una pipeta Pasteur pretratada, aspirando el volumen y expulsándolo de manera firme pero suave tratando de evitar tanto una excesiva disgregación como la formación de burbujas.
6. Se examina una gota de la suspensión celular bajo microscopio invertido para analizar el estado de disgregación.

7. Se realiza un recuento estimativo del número de células viables en cámara Neubauer. Para ello se mezclan 10 µl de la suspensión celular y 10 µl de azul tripán (0,1% azul tripán en suero salino, Sigma) y se colocan 10 µl de la mezcla bajo el cristal de la cámara. Se realiza el recuento de los cuatro cuadrantes principales de las células no teñidas y, por tanto, viables, y se aplica la siguiente fórmula para determinar el número de células vivas por mililitro de suspensión celular:

$$\text{N}^\circ \text{ células/ml} = (\text{recuento células}/4) * 2 * 10000$$

El número óptimo de células a sembrar para conseguir un cultivo a baja densidad es de unas 3000 por placa de 35 mm. En estos cultivos se trata de minimizar los posibles efectos de las neurotrofinas u otros factores tróficos que puedan liberar las propias neuronas y/o glía del cultivo.

Las placas de cultivo utilizadas para la siembra de las células obtenidas fueron placas de plástico estériles de dos tamaños: placas de 35 mm de diámetro (Nunc), para los recuentos de supervivencia, y placas de 24 pocillos (Orange Scientific) con cubres de cristal estériles (O. Kindler GmbH) para las inmunocitoquímicas. En ambos casos, el sustrato utilizado para la adhesión de las células fue poli-D/L-ornitina/laminina (Edgard *et al.*, 1984). Las soluciones de sustratos y las condiciones de tratamiento con los mismos fueron:

- poli-D/L-ornitina (Sigma), a 0,5 mg/ml en tampón borato 0,15 M pH 8,7. Se incuban las placas durante toda la noche con la solución de poli-D/L-ornitina, se lavan varias veces con agua milli-Q y se dejan secar.
- laminina (Sigma), a 20 µg/ml en HBSS sin calcio ni magnesio. Se incuban las placas, previamente tratadas con poli-D/L-ornitina, con la solución de laminina durante al menos 3 h a 37 °C en incubador.

El medio F12 suplementado en el que se sembraban las células disgregadas consistió en medio F12 con un suplemento compuesto por glutamina 2 mM, BSA al 0,35% (Albumax II; Gibco), 60 ng/ml de progesterona (Sigma), 16 pg/ml de putrescina (Sigma), 400 ng/ml de L-tiroxina (Sigma), 38 ng/ml de selenito sódico (Sigma), 340 ng/ml de triyodotironina (Sigma), 60 pg/ml de penicilina y 100 pg/ml de estreptomina (Gibco) (Davies *et al.*, 1993). A partir de la suspensión de células tras la disociación en 1 ml de F12 suplementado, se transfería este volumen a un tubo falcon de 50 ml, añadiendo el volumen de medio definitivo necesario para distribuir 1 ml de la suspensión celular por placa de 35 mm o 0,5 ml por pocillo de la placa de 24 pocillos ya que, previamente, se había añadido la mitad del volumen final en el pocillo junto con las neurotrofinas. Seguidamente, se movía

el tubo falcon suavemente para tratar de distribuir homogéneamente las células en el medio. Finalmente, se sembraba el volumen adecuado de la suspensión celular en las placas y se introducía en el incubador de CO₂ (Forma Scientific) (5% CO₂, 95% humedad).

Las neuronas periféricas pueden requerir un aporte neurotrófico específico dependiendo del tipo y edad para permitir su supervivencia en cultivo. Así, a las neuronas nodosas embrionarias en cultivo se les añadió factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF; Peprotech). A las neuronas simpáticas E14,5 del SCG se les añadió factor de crecimiento nervioso (NGF; Peprotech) y neurotrofina 3 (NT-3; Peprotech). A las neuronas P7 del SCG se les añadió NGF. La neurotrofina se añadió al medio de cultivo de la placa antes de añadir el resto de volumen con la suspensión celular.

3.3.2. Tratamientos

Los compuestos empleados para los diferentes tratamientos de las células en cultivo fueron citosina arabinósido (ara-C; Sigma) al 0,5 y 1 mM en F12 suplementado; rottlerina (Calbiochem) a 0,1, 1, 3 y 10 µM en DMSO; 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA; Calbiochem) a 0,1 µM en DMSO; 2-(4-morfolinil)-8-fenil-cromona (LY294002; Calbiochem) a 10, 20 y 50 µM en DMSO; 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺; Sigma) a 1, 10, 50 y 100 µM en F12 suplementado; desipramina (DMI; Sigma) a 4 nM y 10 µM en F12 suplementado; inhibidor de la quinasa asociada a Rho a 1,6 nM (ROCK; Calbiochem). El sulfóxido de dimetilo (DMSO; Sigma) necesario como disolvente de algunos de los compuestos utilizados se utilizó como máximo al 0,2% en el medio de cultivo final. Se comprobó previamente que esta concentración final de DMSO no tenía efecto en la supervivencia de las distintas poblaciones de células estudiadas y, en aquellos casos en los que el DMSO constituía el vehículo de la molécula ensayada, el control siempre fue DMSO a la misma concentración.

3.3.3. Recuentos de supervivencia neuronal

Los cultivos se realizaron a baja densidad, para minimizar los efectos tróficos auto/paracrinos de las propias neuronas y garantizar el estudio de los efectos inducidos por los factores neurotróficos que añade el propio investigador. El recuento de células en las placas de 35 mm se hizo sobre una retícula de tamaño fijo. Las dimensiones de la gradilla eran 12 x 12 mm y se trazó con un escalpelo sobre la base de una placa petri de plástico de 100 mm de diámetro utilizando un papel milimetrado y bajo los oculares de una lupa. Los recuentos celulares de supervivencia se

determinaron con el objetivo de 10x del microscopio invertido. Se estableció un criterio morfológico para la identificación de las neuronas como aquéllas con a) un soma bastante redondeado, refringente y más o menos grande, al menos con respecto al de otras células presentes en el cultivo, y b) presencia de neuritas más o menos largas. Para garantizar que los experimentos y réplicas ($n = 3$) eran comparables entre sí se realizaba, para cada experimento, un recuento inicial a las 6 h tras el sembrado inicial, tiempo suficiente para que las neuronas se depositaran sobre el fondo de la placa de cultivo y comenzasen a emitir las características neuritas que las hacen reconocibles morfológicamente. Tras este recuento, que en nuestros experimentos, rindió un número de neuronas de 300-800 en la superficie considerada, se añadieron los distintos tratamientos. Los recuentos de supervivencia neuronal se realizaron a 24, 48 y 72 h desde la siembra. El recuento de supervivencia se ha representado en todos los casos como el tanto por ciento de neuronas supervivientes respecto del recuento inicial a las 6 h.

3.3.4. Estudios morfométricos

El estudio del crecimiento neurítico en las neuronas nodosas embrionarias se realizó a partir de fotografías tomadas con óptica de contraste de fases cada 20 min hasta un total de 2 h. El crecimiento neurítico se determinó midiendo tanto los avances como los retrocesos de las neuritas de cada neurona.

El estudio en las neuronas embrionarias simpáticas se realizó en células fijadas a los tiempos establecidos de 2 y 6 h, cuando las neuritas ya se habían extendido una longitud adecuada. Tras la fijación, se fotografiaron las células de la región central de la placa a 20x en el microscopio invertido con óptica de contraste de fases, para su posterior análisis. A partir de las fotografías, se obtuvieron dibujos en papel de acetato de los perfiles de las diferentes neuritas que partían del soma de cada neurona. Tras el escaneado de los dibujos, se trataron las imágenes para homogeneizar las líneas de los dibujos utilizando un programa de análisis de imagen (*Scion Image* para *Windows* de *Scion Corporation*), se binarizó la imagen y se midió el perímetro de las neuritas, cuantificando así el crecimiento neurítico de cada neurona.

3.3.5. Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica de células en cultivo se realizó a partir de células sembradas sobre cubreobjetos de cristal en placas de 24 pocillos. La densidad celular en estos casos fue de 10000 células o más por pocillo. Inicialmente se procedió a eliminar cuidadosamente el medio de cultivo de

los pocillos y se fijaron las células con paraformaldehído (PFA; Panreac) al 4% en PB, a 37°C durante 20 min. Tras varios lavados con PB, se bloquearon las uniones inespecíficas con 0,2% Triton X-100 al 0,2%, glicina 0,1 M (Sigma), 10% de suero bovino (CS; Sigma) y gelatina al 0,1% (Panreac) en PB durante 30 min y agitación suave. Después se incubaron las células con el anticuerpo primario correspondiente (ver Tabla 6) diluido en la solución de bloqueo anteriormente mencionada, a 4°C durante toda la noche.

Tras el lavado del anticuerpo primario con PB en agitación, se incubaron los cubreobjetos con el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente (ver Tabla 7) diluido en la solución de bloqueo, durante 1 h en agitación a temperatura ambiente y posterior lavado con PB. Para poder detectar todas las células presentes en la preparación se tiñeron los núcleos con DAPI durante 5 min, se lavó la preparación con agua destilada y se realizó el montaje colocando unos 20 µl de medio de montaje para fluorescencia (FluorSave) en el portaobjetos y depositando sobre este el cubreobjetos con las células hacia el medio de montaje.

Alternativamente, para obtener una inmunocitoquímica para microscopio de campo claro se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados, ABC peroxidasa y revelado con solución DAB al 0,05% con H₂O₂ al 0,003% en PB durante unos minutos, tal y como se describe en el apartado 3.2.2.

3.4. Cultivo de células PC12

3.4.1. Mantenimiento y tratamientos

La línea celular PC12 (Greene y Tischler, 1976) procede de un feocromocitoma de rata y ha sido ampliamente utilizada como modelo de línea neural. Cuando se cultivan células PC12 en medio con suero o en presencia de EGF (factor de crecimiento epidérmico), éstas presentan una morfología redondeada y proliferan extensamente, de forma similar a células de la médula cromafín inmaduras y a simpatoblastos. Cuando se las cultiva en presencia de NGF, las PC12 cesan su división celular y extienden neuritas adoptando gradualmente características de neuronas simpáticas maduras. En nuestros experimentos, las células PC12 se mantuvieron en condiciones de proliferación con 10% HS y 5% FBS inactivados por calor en DMEM (Gibco) en placas de 100 mm de diámetro, y transferidas a una nueva placa a densidad subconfluente. Las células PC12 utilizadas pertenecían a dos líneas celulares estables de PC12 en las que se había introducido el vector pT7-7 conteniendo el gen reportero modificado *eyfp* (PC12-EYFP) o bien la construcción *hα-syn-eyfp* (PC12-EYFP-hα-SYN) (Martín-Clemente *et al.*, 2004) generosamente cedidas por el

laboratorio del Dr. José González Castaño, del Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Para los ensayos de supervivencia celular y para los de *western blot* las células se sembraron en placas de 96 pocillos y placas de 100 mm de diámetro, respectivamente, a una densidad de 3×10^6 células/cm² en DMEM con HS al 1,5%. A los dos días se trataron las células con MPP⁺ (0,2 y 0,5 mM), rottlerina (1, 3 y 5 µM) y las correspondientes combinaciones de MPP⁺ y rottlerina. Se tuvieron en cuenta las concentraciones de DMSO utilizadas y se añadieron a los respectivos controles.

3.4.2. Ensayos de viabilidad celular

Se realizaron ensayos de viabilidad celular a las 24, 48 y 72 h desde el inicio de los tratamientos. Para determinar la viabilidad celular se empleó el ensayo de reducción de una sal de tetrazolio (MTT, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio) (Mosmann, 1983). Para ello, se añadió MTT (Sigma) al 0,2 mg/ml a cada pocillo y se incubaron las células durante 60 min a 37°C. Tras lavado con PBS, el cristal de formazán de color azul oscuro e insoluble formado por la reducción por las hidrogenasas mitocondriales de las células vivas se solubilizó con 200 µl de DMSO por pocillo y se midió la absorbancia a 595-690 nm utilizando un lector colorimétrico de placas (Victor, Perkin-Elmer). Cada valor de absorbancia se relativizó respecto de su control sin tratamiento.

3.4.3. Inmunofluorescencia

El procedimiento fue el mismo que se describe en el apartado 3.3.5. de esta sección de *Material y métodos*. Las células se sembraron sobre cubreobjetos de cristal en placas de 24 pocillos a la misma densidad utilizada para los ensayos de viabilidad celular. A las 24 h de tratamiento se fijaron las células con PFA al 4% en PB durante 20 min a 37°C y se realizó la detección inmunofluorescente de algunos anticuerpos primarios que se indican en la Tabla 6. Para visualizar la preparación se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos utilizando Fluorsave. Las preparaciones se analizaron en el microscopio confocal para detectar la inmunofluorescencia y la señal de la EYFP.

3.5. Inmunodetección de proteínas por *western blot*

3.5.1. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas a partir de cultivos celulares y tejidos se realizó en tampón de lisis frío, consistente en Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 (Sigma), NaCl 150 mM (Sigma), EDTA 5 mM (Sigma), Triton X-100 al 1%, una mezcla de inhibidores de proteasas (complete Mini de Roche; concentración según especificación del fabricante) y de fosfatasa con una solución de ortovanadato sódico 1 mM (Sigma). Tanto en el caso de los cultivos primarios de neuronas simpáticas y nodosas embrionarias como en el caso de los cultivos celulares de PC12, la extracción se llevó a cabo 24 h tras el sembrado celular. Tras eliminar el medio de cultivo de las placas donde se sembraron las células, se realizaron dos lavados con PBS estéril y frío, para eliminar restos del medio de cultivo, y se añadió tampón de lisis. Tras realizar un barrido sobre la placa con un rascador para recoger todas las células posibles se transfirieron éstas a un tubo eppendorf en el que se dejó actuar el tampón de lisis durante 20 min en hielo. La extracción de la proteína de corazón y ganglios se realizó tras la extracción de las muestras y limpieza en PBS estéril. Para ello, se procedió a la disociación del tejido, utilizando un homogeneizador de cristal, en tampón de lisis dejándolo actuar, posteriormente, 20 min en hielo. Tras la lisis, se centrifugó la muestra a 16000 g durante 20 min y se recogió el sobrenadante cuidadosamente para evitar los restos celulares sedimentados transfiriéndolo a un tubo nuevo. A partir de una curva patrón con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA; Pierce) se determinó la concentración de proteína mediante el método *Biorad DC Protein Assay* y su detección colorimétrica en un espectrofotómetro (Victor, Perkin Elmer).

3.5.2. Electroforesis y transferencia

Los geles de poliacrilamida-SDS para proteínas y la transferencia a membranas se hicieron según protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizaron geles homogéneos de acrilamida (Pronadisa) al 10% o 15% (p/v) en condiciones desnaturizantes, y un gel de empaquetamiento al 4% (p/v). Se cargaron entre 25-50 μ g de proteína desnaturizada (100 °C durante 5 min en un termobloque) mezclada 2:1 con tampón de carga (volumen muestra: volumen tampón) (Tris-HCl 185 mM pH 6,8, SDS al 3,5%, glicerol al 30%, β -mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol al 0,25%) y se añadió en una de las carreras un marcador de pesos moleculares preteñido (rango 20-120 pb, Fermentas) y se sometió a electroforesis a 150 voltios hasta que el frente del marcador de pesos moleculares llegaba al otro extremo del gel (equipo Bio-Rad, Mini-Protean II). El tampón de

electroforesis constó de glicina 0,2 M (Sigma), Trizma base 25 mM (Sigma) y dodecilsulfato sódico (SDS, Panreac) al 1%.

Para la electrotransferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech) se utilizó un aparato Trans Blot SD de Biorad, a 120 voltios durante 1 h. El tampón de transferencia constó de Trizma-base 25 mM para electroforesis a pH 8,3, glicina 0,192 M y metanol al 20%. Posteriormente se comprobó la eficiencia de la transferencia de proteínas mediante tinción con rojo Ponceau (rojo Ponceau al 0,5% en ácido acético glacial al 1%, Sigma).

3.5.3. Inmunodetección

Se lavaron varias veces las membranas con la solución salina Tris (Trizma HCl 100 μ M pH 7,8 y NaCl al 0,9%) con Tween-20 (Sigma) al 0,1% (TBS-T), para eliminar los restos de rojo Ponceau. Después, se bloquearon las membranas con tampón bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación y se incubaron con los anticuerpos primarios a la concentración correspondiente en tampón bloqueo durante toda la noche a 4°C y agitación. Los anticuerpos primarios utilizados, dilución y casa comercial se especifican en la siguiente tabla (Tabla 8).

Tabla 8. Anticuerpos primarios usados en inmunodetección de proteínas

Anticuerpo primario	dilución (concentración)	casa comercial
conejo anti-tirosina hidroxilasa	1:300 (67 μ g/ml)	Pel-Freez
conejo anti-PGP9.5	1:1500 (no especific.)	UltraClone (RA95101)
ratón anti- β -actina	1:5000 (2400 μ g/ml)	Sigma (clon AC-15)
ratón IgG anti-GAPDH	1:3000 (0,67 μ g/ml)	Abcam
ratón IgG ₁ anti-sinucleína 1	1:1000 (250 μ g/ml)	Transduction Labs

Tras lavarse las membranas varias veces con TBS-T, se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-ratón (1:2000, Chemicon), anti-conejo (1:50000, Amersham Biosciences) conjugados con peroxidasa en tampón bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente y agitación.

Tras varios lavados con TBS-T seguido de uno con TBS, se reveló con luminol (Lumilight de Roche o ECL Advance de Amersham Pharmacia Biotech, este último más sensible), y se capturó la

señal luminiscente en un documentador de geles (*Gel Logic 440 Imaging System*, Kodak). Cuando fue necesario cuantificar los niveles de las bandas de proteínas se determinaron con el programa *Quantity One* de *BioRad Laboratories* utilizando como control la señal para β -actina o GAPDH.

3.6. Análisis estadístico

El programa de análisis estadístico utilizado ha sido el SPSS 12.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EEUU; *Statistical Product and Service Solutions*). Se realizó un test para la normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov, Sokal y Rohlf, 1995) y otro para la homogeneidad de varianzas (test Levene). Cuando los datos se distribuyeron normalmente y presentaron varianzas homogéneas se les aplicó una prueba paramétrica (test t de Student entre genotipos o modelo lineal general univariante entre tratamientos y genotipos; Sokal y Rohlf, 1995). En los casos de porcentajes se aplicó la transformación $\arcsen(\text{raíz}(\text{porcentaje}))$ antes de la aplicación de los tests estadísticos. En los tests se utilizaron valores de $\alpha < 0,05$ para determinar la significatividad estadística.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio del patrón de expresión de la α -SYN en el SNP

4.1.1. Marcadores específicos para la α -SYN

A fin de establecer el patrón espacial y temporal de expresión de la α -SYN en el SNP durante la embriogénesis utilizamos varios anticuerpos anti- α -SYN (ver Tabla 9), incluyendo cuatro anticuerpos comerciales y cuatro anticuerpos (mAb α -SYN 1-4) cedidos por el laboratorio del Dr. Arnon Rosenthal en Rinat Neuroscience Ltd., sobre cortes completos de embriones en distintos días embrionarios (E) postconcepción, dentro del periodo de desarrollo de las distintas subdivisiones del SNP.

Tabla 9. Anticuerpos anti- α -SYN

referencia	especie	procedencia	dilución	marcaje	inmunógeno
610787	ratón	Trans Labs	0,5-2,5 ng/ml	+++++	α -SYN de rata (aa. 15-123)
18-0215	ratón	Zymed	1:1000	+++	LB de pacientes con LB
AB5038	conejo	Chemicon	1:1000	+	α -SYN humana (aa. 111-131)
sc-7011 (C-20)	cabra	Santa Cruz	2 μ g/ml	-	α -SYN humana (C-ter)
sc-7012 (N-19)	cabra	Santa Cruz	2 μ g/ml	-	α -SYN humana (N-ter)
mAb α -SYN 1	ratón	A. Rosenthal	1 μ g/ml	+	α -SYN humana
mAb α -SYN 2	ratón	A. Rosenthal	1 μ g/ml	++++	α -SYN humana
mAb α -SYN 3	ratón	A. Rosenthal	1 μ g/ml	+++	α -SYN humana
mAb α -SYN 4	ratón	A. Rosenthal	1 μ g/ml	++	α -SYN humana

El anticuerpo que nos proporcionó mejores resultados fue el anticuerpo comercial de Transduction Labs, aunque los resultados obtenidos con los distintos anticuerpos fueron congruentes. Para analizar la especificidad de los anticuerpos se utilizaron controles positivos consistentes en cortes de cerebro humano obtenidos *post mortem* de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy (generosamente cedidos por el Dr. Isidro Ferrer de la Universidad de Barcelona), en los que aparecen agregados de α -SYN, y controles negativos consistentes en cortes de embriones mutantes nulos para *α -syn* (datos no mostrados). Además, se realizaron determinaciones mediante la técnica de *western blot* para confirmar que el anticuerpo utilizado para los análisis inmunocitoquímicos reconocía, en homogenados procedentes de ganglios del SNP, una sola banda correspondiente al tamaño descrito para la α -SYN en otras estructuras (Figura 13). Utilizando este anticuerpo, realizamos un seguimiento del patrón de expresión desde el estadio embrionario E10,5 hasta estadios postnatales (P) tempranos de ratón, identificando qué estructuras aparecían marcadas y cómo variaba la expresión de α -SYN a lo largo del tiempo.

Estudiamos tanto la distribución del marcaje como su intensidad, así como qué tipo/s celular/es expresaba/n dicha proteína realizando dobles marcajes con diversos marcadores celulares.

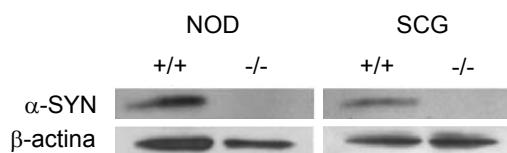


Figura 13. Detección de la proteína α -SYN (19 kDa) por western blot. Las muestras se obtuvieron a partir de homogenados de los ganglios NOD y SCG (50 μ g de proteína total por carril) de animales de E14,5 de genotipo salvaje (+/+) y mutante nulo para α -syn (-/-).

4.1.2. La α -SYN se expresa abundantemente en el sistema sensorial y el simpático

En embriones sólo se observa expresión de α -SYN en tejido neural, tanto en estructuras del SNP como del SNC, aunque el momento de inicio de la expresión varía para cada estructura. La expresión de la α -SYN se detecta muy pronto en el desarrollo embrionario del sistema nervioso (Tabla 10). En E10,5 se observa por primera vez expresión en algunas estructuras nerviosas y en E12,5 ya se puede observar expresión de α -SYN en diferentes regiones del SNC como los bulbos olfatorios, la *substantia nigra* o las zonas adyacentes al cuarto ventrículo. Quizá lo más sobresaliente en estos estadios es que la expresión de α -SYN es más abundante en estructuras del SNP que en núcleos cerebrales (Figura 14 y Tabla 10). En el SNP la α -SYN se localiza en diferentes ganglios, tanto sensoriales como autonómicos. A nivel craneal observamos ganglios sensoriales inmunorreactivos para α -SYN como el trigémino (TRI), el complejo nodoso-petroso (NOD), el complejo superior-yugular (SY) y el estado-acústico del oído interno (OI) (Figura 14 A). En E13,5, la α -SYN se localiza, además, en el núcleo mesencefálico del trigémino (TMN), que aunque localizado en el SNC está constituido por neuronas sensoriales primarias, y en el recientemente formado ganglio cervical superior (SCG), de modalidad simpática. También en este estadio comienza a observarse expresión de la α -SYN en los ganglios espinales de la raíz dorsal (DRG) (Figura 14 B). En general, no encontramos ningún ganglio periférico que no exprese α -SYN y la expresión de la proteína en estos ganglios es muy abundante y generalizada en estadios en los que a nivel del SNC se encuentra restringida a muy pocas neuronas.

La expresión de α -SYN se mantiene a lo largo del tiempo una vez aparece en cada estructura del SNP (ver Tabla 10). Al principio del desarrollo de cada estructura analizada aparecen solamente algunas neuronas altamente inmunorreactivas y, posteriormente, la expresión se generaliza al resto de neuronas del ganglio aunque con niveles de expresión más bajos (Figura 14). A nivel celular, la α -SYN se localiza tanto en las fibras (Figura 14 B) como en los somas de las neuronas periféricas (Figuras 14 C-E; 15). No hemos detectado expresión

nuclear de esta proteína en ninguna de las células observadas en cortes histológicos. Por otro lado, por la morfología y ubicación de las células que expresan α -SYN, así como por el momento en que se muestran inmunorreactivas, parece tratarse de una proteína neuronal.

Tabla 10. Estructuras que expresan α -SYN en el SNC y SNP durante el desarrollo

	E10,5	E11,5	E12,5	E13,5	E14,5	E15,5	E16,5	E17,5
<u>Sistema sensorial primario</u>								
ganglio trigémino		+++	+++	+++	+++	++	++	+++
ganglio estato-acústico			+++	+++	+++	++	++	n.d.
complejo superior-yugular			+++	+++	+++	++	++	n.d.
complejo nodoso-petroso		+	++	++	++	++	++	+++
ganglios espinales	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
TMN		++	++	++	++	++	++	++
<u>Sistema simpático</u>								
ganglio cervical superior				++	++	++	++	+++
ganglio estrellado					+++	n.d.	n.d.	n.d.
cadena simpática						++	++	+++
<u>Cerebro</u>								
cerebelo			-	-	-	-	-	++
corteza cerebral	-	-	-	-	-	-	-	++
estriado			-	-	-	-	-	++
hipocampo				-	-	-	+	++
<i>substantia nigra</i>			++	++	++	++	++	++
bulbos olfatorios			++	++	++	+	+++	+++
<u>Médula espinal</u>								
	+	+	++	+	+	++	++	+

Cualitativamente se indica la abundancia de expresión en las células que constituyen la estructura correspondiente con el número de signos +, dependiendo de si sólo algunas células expresan α -SYN (+), aproximadamente un 50% lo expresa (++) o prácticamente la totalidad la expresa (+++). Los signos (-) indican ausencia de expresión; n.d. no determinado; TMN, núcleo mesencefálico del trigémino.

Dado que los ganglios NOD y SCG son de origen y modalidad diferentes, constituyen estructuras técnicamente abordables y, sobre todo, expresan α -SYN durante todo su desarrollo, realizamos un estudio más profundo del patrón de expresión de la α -SYN en estas estructuras. Así, en el estadio E12,5, poco después de formarse el NOD, la α -SYN se empieza a expresar

fuertemente en el citoplasma y prolongaciones de algunas células de morfología típicamente neuronal, distribuidas por todo el ganglio (Figura 14 C). En el estadio E14,5 el número de células positivas para la α -SYN aumenta y se encuentran, además, diferentes niveles de expresión (Figura 14 D). En E16,5, el NOD presenta un marcaje más generalizado, aunque aún se encuentran algunas células con niveles de expresión altos repartidas por el ganglio (Figura 15 C). En cuanto al SCG, en E12,5 y E14,5 se observa un marcaje heterogéneo, esto es, algunas células negativas, otras con marcaje débil y otras con fuerte marcaje (Figura 14 E). En el SCG de E16,5 la expresión de α -SYN se generaliza a la mayor parte de células que constituyen el ganglio, pero se mantienen los diferentes niveles de expresión (Figura 15 A). Tanto en el NOD como en el SCG del ratón postnatal temprano existe una expresión generalizada, y más baja, de α -SYN en el citoplasma de las neuronas del ganglio, y unas pocas células siguen expresando altos niveles de α -SYN (Figuras 15B, D).

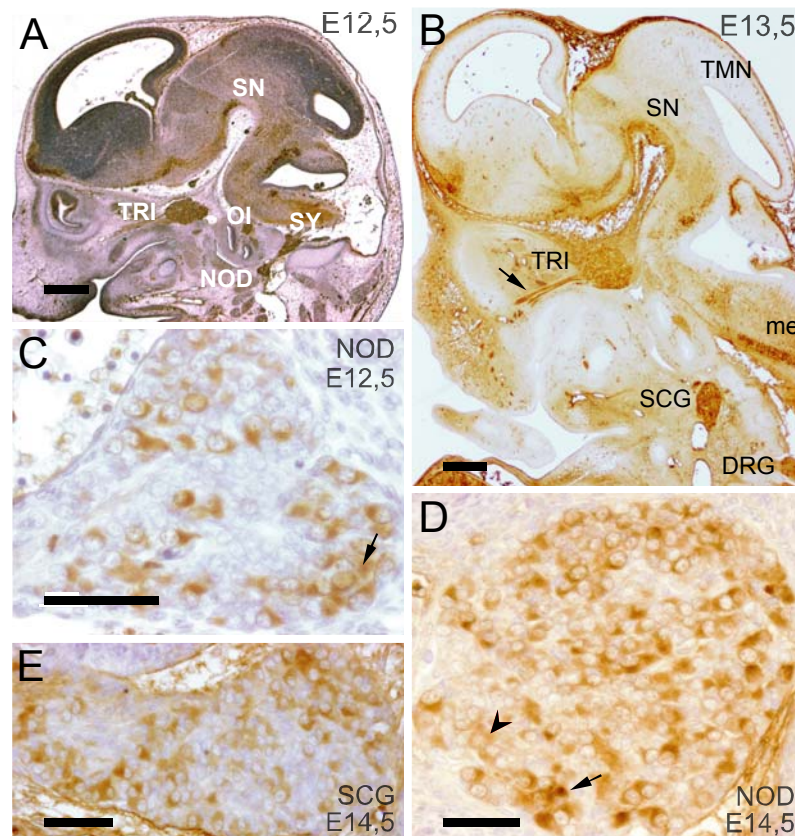


Figura 14. Expresión de la proteína α -SYN durante el desarrollo embrionario temprano de ratón detectada por inmunohistoquímica. (A) Corte sagital de la cabeza de un embrión de E12,5 mostrando la expresión de α -SYN en el SNC (predominante en la SN) y en el SNP donde se observa en múltiples ganglios: trigémino (TRI), complejo nodoso-petoso (NOD) o complejo superior-yugular (SY). (B) Corte sagital de la cabeza de un embrión de E13,5 con marcaje de α -SYN en ganglios periféricos como el ganglio cervical superior (SCG) o los sensoriales de la raíz dorsal (DRG) en el SNP, además de en médula espinal (me), núcleo mesencefálico del trigémino (TMN) o *substantia nigra* (SN) en el SNC. (C-D) Secciones de NOD de E12,5 (C) y E14,5 (D), mostrando mayor inmunorreactividad en el estadio más avanzado. (E) Sección de ganglio SCG de E14,5 con algunas células inmunorreactivas para α -SYN y con diferentes niveles de inmunorreactividad entre ellas. Algunas secciones se contratiñeron con solución de Nissl (A, C, D, E). La barra de escala es de 300 μ m (A, B) y de 50 μ m (C, D, E).

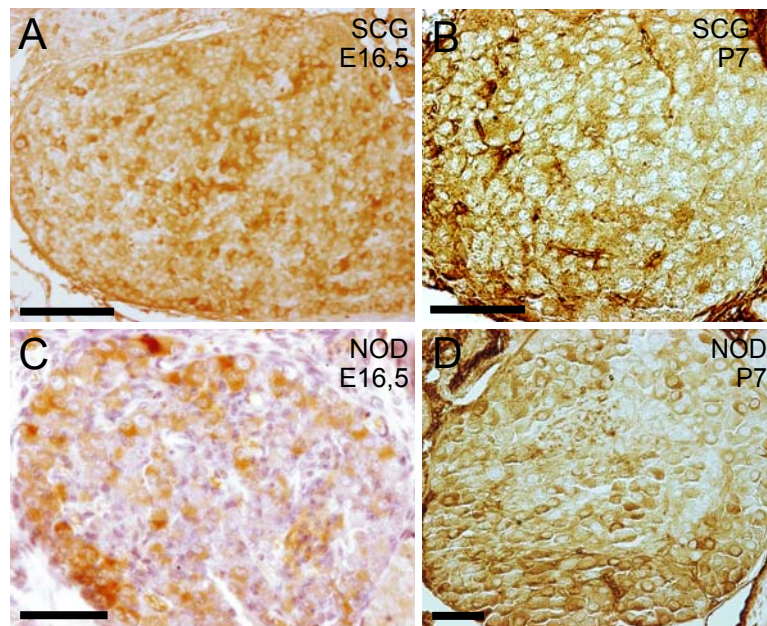


Figura 15. Expresión de la α -SYN en los ganglios NOD y SCG durante el desarrollo embrionario tardío y postnatal temprano de ratón detectada mediante inmunohistoquímica. Sección de SCG (A) y NOD (C) en el estadio embrionario E16,5 y de SCG (B) y NOD (D) postnatales (P7). La barra de escala es de 100 μ m (A) y 50 μ m (B, C, D).

4.1.3. La α -SYN se expresa en neuronas postmitóticas

Para identificar la naturaleza de las células que expresan α -SYN en ganglios periféricos se realizaron dobles marcajes. Para determinar si las células tenían capacidad proliferativa, realizamos la inyección y detección del marcador de proliferación BrdU. Para ello madres gestantes en el estadio E13,5 fueron inyectadas con una dosis de 50 mg/kg peso de BrdU dos horas antes de su sacrificio para la obtención de los embriones. En E13,5 se está produciendo la proliferación de los progenitores neurales de los ganglios NOD y SCG. En el caso del SCG proliferan tanto los progenitores neurales, derivados de la cresta neural, como los llamados simpatoblastos, que tienen ya atributos neuronales, como expresión de neurofilamentos o de enzimas de la ruta biosintética de neurotransmisores simpáticos, pero que todavía proliferan. Tras doble inmunomarcaje fluorescente con anticuerpos anti- α -SYN y BrdU en secciones sagitales de los embriones no se observó marcaje coincidente en las mismas células, ni del SCG ni del NOD (Figura 16). Continuando con la caracterización de las células inmunorreactivas para α -SYN, combinamos la expresión de α -SYN con la de un marcador glial como LSox5 mediante anticuerpos anti-LSox5 generosamente cedidos por el Dr. Julio A. Barbas del Instituto Cajal (CSIC) de Madrid. LSox5 es un factor de transcripción propio del linaje cartilaginoso que se detecta también en células gliales y/o derivados de la cresta neural (Pérez-Alcalá *et al.*, 2004). En secciones de embriones de E12,5 observamos la ausencia de expresión de LSox5 en

aquellas células positivas para α -SYN en los ganglios SCG y NOD (datos mostrados sólo para NOD, Figuras 17 G-I), indicando que la α -SYN no se expresa en glía satélite o células de Schwann. Utilizando anticuerpos anti- α -SYN y anti-neurofilamento (cadena pesada de 150 kDa) se observó que todas las células inmunorreactivas para α -SYN eran neuronas (Figuras 17 A-C). Estos datos sugieren que la α -SYN se expresa una vez la neurona ha iniciado su diferenciación y abandonado el ciclo celular.

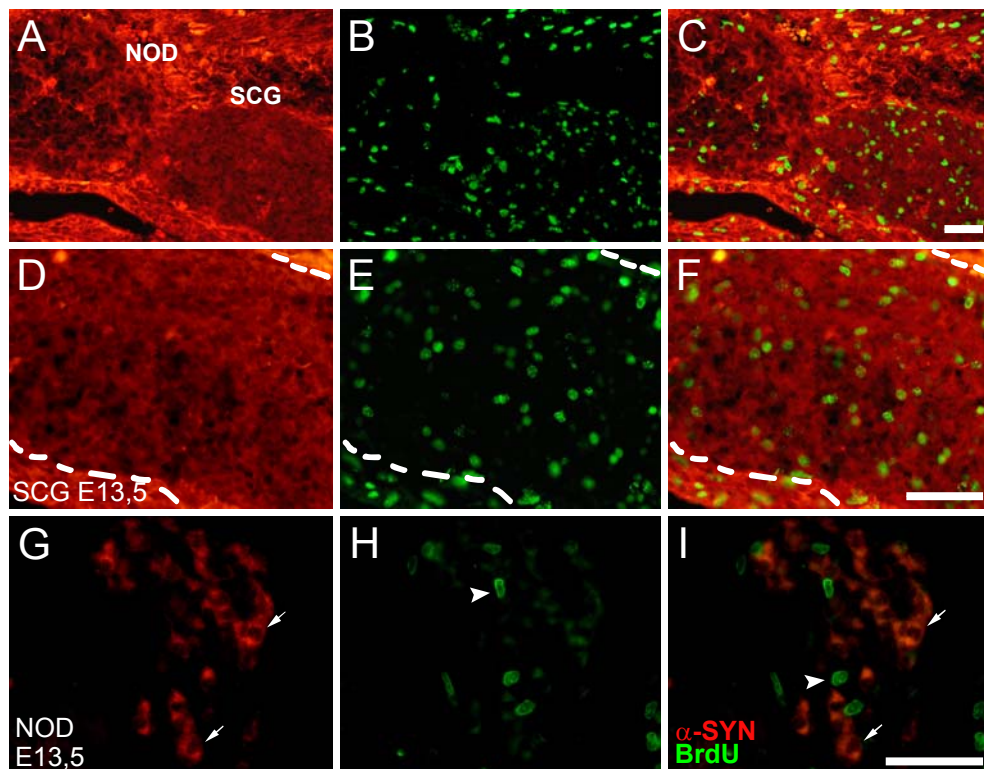


Figura 16. Expresión de la α -SYN en neuronas periféricas postmitóticas. Detección inmunofluorescente de α -SYN (A, D, G), BrdU (B, E, H) y ambas (C, F, I) en NOD y SCG (A-C), SCG a mayor aumento (D-F) y NOD a mayor aumento (G-I) de embriones de E13,5. Nótese la expresión de α -SYN en células con morfología neuronal (flechas en G, I) y células que expresan BrdU (cabeza de flecha en H, I) en el ganglio. La barra de escala es de 50 μ m (A-C, D-F, G-I).

Para profundizar en el conocimiento del fenotipo de las neuronas inmunorreactivas para α -SYN se analizó si estas células expresaban la enzima tirosina hidroxilasa (TH), implicada en la síntesis de los neurotransmisores de la familia de las catecolaminas. El NOD presenta una población relativamente minoritaria de neuronas catecolaminérgicas, que utilizan dopamina como neurotransmisor (Kummer *et al.*, 1993), mientras que todas las neuronas del SCG utilizan noradrenalina como neurotransmisor y, por tanto, son TH-positivas. La expresión de α -SYN se observó en todas las neuronas del NOD y, por tanto, la α -SYN no es un marcador específico de las neuronas sensoriales de tipo catecolaminérgico (Figuras 18 A-F). La mayoría de células del

SCG en E14,5 presentan una expresión baja de α -SYN, con algunas células que expresan niveles más altos de esta proteína (Figura 18 A). La expresión de TH estaba prácticamente generalizada a todas las células del SCG, con algunas células mostrando altos niveles de TH (Figura 18 B). Cuando se combinaron ambos marcajes se observó la existencia tanto de células que sólo expresaban α -SYN, células que expresaban α -SYN y TH, y células que parecían expresar sólo TH (Figura 18 C). Así, la ausencia de α -SYN en células del SCG que están incorporando BrdU, sugiere que la expresión de TH precede a la de α -SYN, ya que la primera se encuentra en simpatoblastos mientras que la segunda no. En el SCG del ratón neonato todas las neuronas expresan α -SYN y TH (Figura 18 I), aunque con niveles heterogéneos de expresión. La combinación de los datos de expresión embrionaria y postnatal en el SCG indica que la α -SYN sólo se expresa en neuronas postmitóticas. En conjunto, los patrones celulares de expresión sugieren, además, que la α -SYN no es una molécula exclusiva de poblaciones de neuronas catecolaminérgicas, al igual que sucede con las neuronas del SNC.

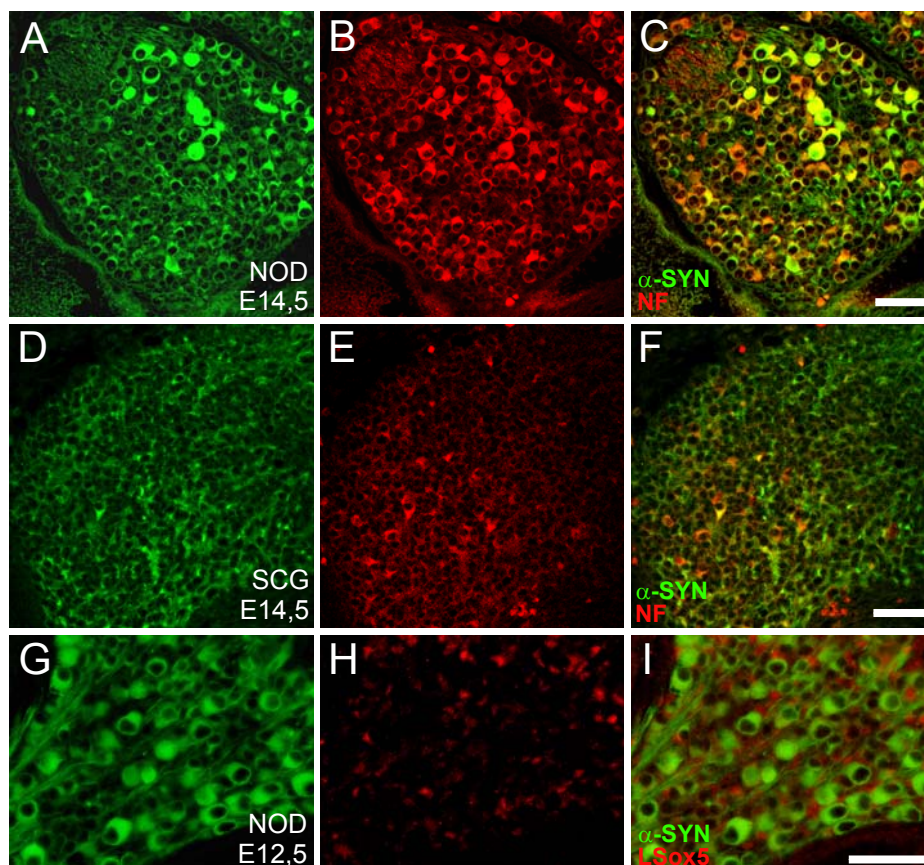


Figura 17. Expresión de la α -SYN en las neuronas de los ganglios periféricos embrionarios. Sección de ganglios NOD (A-C) y SCG (D-F) de E14,5 con expresión de α -SYN (A, D), neurofilamento (B, E) y ambos (C, F), detectados por inmunofluorescencia confocal. Nótese que el ganglio está constituido en su mayoría por neuronas, las cuales expresan diferentes niveles de α -SYN. (G-I) Sección de NOD de E12,5 tras tinción inmunofluorescente para α -SYN (G), LSox5 (H) y ambos (I). La barra de escala es de 50 μ m (A-C, D-F, G-I).

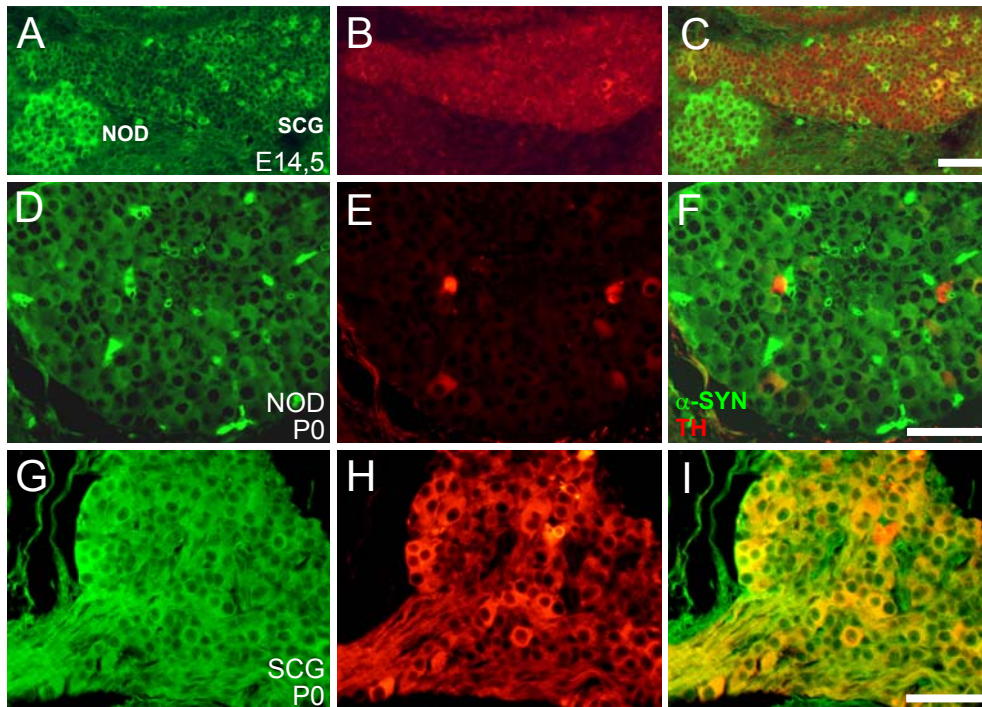


Figura 18. Expresión de α -SYN y de TH en los ganglios NOD y SCG detectadas por inmunofluorescencia. (A-C) Expresión de α -SYN (A, D, G), de TH (B, E, H) y ambas (C, F, I) en los ganglios NOD y SCG de E14,5 (A-C) y en NOD (D-F) y SCG (G-I) de neonato. Barra: 50 μ m.

4.2. Fenotipo *in vivo* del SNP del mutante de α -syn

La llamativa expresión de α -SYN en los ganglios NOD y SCG durante el desarrollo sugería una posible implicación de la α -SYN en la formación de estas estructuras nerviosas. Para estudiar dicha posibilidad, se utilizó el ratón mutante nulo para la α -syn. La cepa de ratones mutantes nulos para α -syn (α -syn^{-/-}) utilizados en este estudio ya ha sido caracterizada a nivel de ciertos aspectos del SNC (Abeliovich *et al.*, 2000). Estos ratones son nulos completos y, por tanto, carecen totalmente de α -SYN, también a nivel del SNP, como se comprobó en tinciones inmunocitoquímicas realizadas con los diferentes anticuerpos en embriones mutantes (datos no mostrados). Además, en *western blot* se observó que la banda específica de α -SYN que aparecía en homogenados de ganglios NOD y SCG no se detectaba en muestras procedentes de embriones mutantes (Figura 13). En esta cepa, por tanto, se podía analizar cuáles son las funciones esenciales de la α -SYN en el desarrollo de estructuras del SNP en un contexto fisiológico. En una inspección al microscopio óptico no se observaron diferencias aparentes en el aspecto o grado de formación de los distintos ganglios entre embriones α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-} de E14,5 por lo que decidimos realizar un análisis más profundo utilizando, para ello, dos ganglios con fuerte expresión de α -SYN, el NOD de modalidad sensorial y el SCG, de modalidad

simpática. Dado que a la formación de cualquier estructura nerviosa contribuyen procesos celulares como la proliferación, la neurogénesis y diferenciación neuronal y la supervivencia neuronal, entre otros, se trató de estudiar la posible implicación de la α -SYN en estos distintos procesos en animales α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-}.

4.2.1. La α -SYN no es esencial para el desarrollo normal de la división sensorial del SNP: complejo petroso-nodoso (NOD)

Se determinó el número de células que componían los ganglios nodosos de los embriones E14,5 de genotipo salvaje y mutante en tinciones con hematoxilina de Gill (Figura 19 A y C), aunque no se encontraron diferencias significativas entre los análisis realizados en animales α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-} (Figura 19 C). La actividad proliferativa del ganglio se estudió determinando el número de células que habían incorporado BrdU dos horas antes del sacrificio de la madre gestante (Figura 19 A), no detectándose diferencias en la incorporación total del nucleótido o en la tasa proliferativa entre animales de distintos genotipos (Tabla 11). Este resultado estaba de acuerdo con nuestros estudios de expresión que indicaban que las células proliferantes y las células gliales no expresaban α -SYN. Este análisis se completó con un estudio del número de neuronas al final del desarrollo embrionario, mediante el recuento de células con aspecto neuronal en tinciones con violeta de cresilo (tinción de Nissl) en animales neonatos de los dos genotipos. Tampoco en este estadio, en el que las neuronas son perfectamente reconocibles en tinciones histológicas convencionales, se observaron alteraciones en el número final de neuronas nodosas en los animales deficientes para α -SYN (Figuras 19 B, C).

Por tanto, la α -SYN no parece jugar un papel en algunas funciones celulares básicas en el desarrollo normal de los ganglios del sistema sensorial. No encontramos cambios en el número de neuronas en los animales mutantes para la α -syn, que reflejen una función esencial de la α -SYN en el proceso de neurogénesis o de muerte neuronal. Más aún, en un estadio E14,5 del NOD, periodo de neurogénesis y de proliferación de células gliales (Dong *et al.*, 1995), la actividad proliferativa no se encuentra alterada en los mutantes, consistente con la aparente ausencia de α -SYN en células que incorporan BrdU. Otros autores no han encontrado déficit en el número de neuronas sensoriales en los ganglios trigéminos y espinales de ratones deficientes en α -SYN pertenecientes a la misma cepa que la analizada aquí (Ninkina *et al.*, 2003; Papachroni *et al.*, 2005).

Tabla 11. Recuentos de proliferación y supervivencia celular en el NOD en E14,5

	nº de células BrdU ⁺	nº total de células	tasa proliferación (%)
$\alpha\text{-syn}^{+/+}$	1357 ± 95 (n = 4)	10837 ± 693 (n = 4)	13 ± 0
$\alpha\text{-syn}^{-/-}$	1158 ± 218 (n = 3)	10313 ± 460 (n = 3)	11 ± 2

Los datos se expresan como la media de los recuentos obtenidos en un número de animales independientes indicado entre paréntesis (n) ± error estándar de la media (X ± SEM). No se han encontrado diferencias significativas entre genotipos.

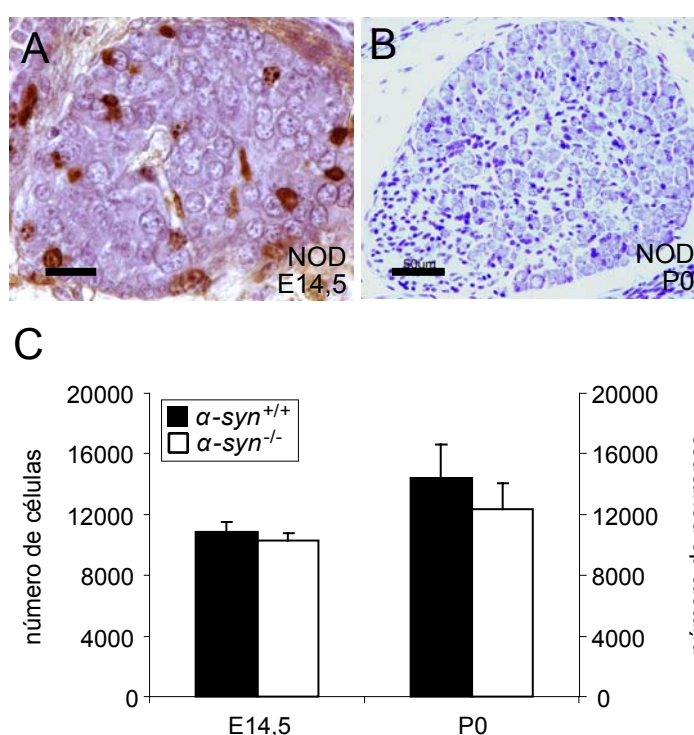


Figura 19. Secciones de ganglios nodosos y recuentos celulares procedentes de animales $\alpha\text{-syn}^{+/+}$ y $\alpha\text{-syn}^{-/-}$. (A) Sección de NOD de E14,5 que muestra inmunohistoquímica para BrdU (células marrones) y tinción con hematoxilina de Gill nº 2 (células azules). La barra de escala es de 50 μm . (B) Sección de NOD neonatal de ratón teñida con solución de Nissl. (C) Histograma que muestra la cuantificación del número total de células en E14,5 y del número de neuronas en P0 en ambos genotipos. Los datos mostrados representan la media de los recuentos en distintos animales (n = 4 en cada caso) ± SEM. Sin diferencias significativas entre genotipos.

4.2.2. La $\alpha\text{-SYN}$ no es esencial para el desarrollo normal de la división simpática del SNP: ganglio cervical superior (SCG)

La subdivisión autónoma del SNP era especialmente interesante en el contexto de la EP, como ya se ha comentado en la *Introducción*, por la que decidimos analizar los SCGs de animales $\alpha\text{-syn}^{+/+}$ y $\alpha\text{-syn}^{-/-}$ durante la embriogénesis y desarrollo postnatal temprano. En una

inspección al microscopio óptico del SCG en E14,5 no se observaron diferencias aparentes en el aspecto o grado de formación del ganglio entre embriones $\alpha\text{-syn}^{+/+}$ y $\alpha\text{-syn}^{-/-}$. Tampoco se observaron diferencias significativas cuando se determinó el número de células que componían los ganglios de los animales de genotipo salvaje y mutante en tinciones con hematoxilina de Gill (Figura 20 A; Tabla 12). La actividad proliferativa del ganglio se estudió determinando el número de células que habían incorporado BrdU dos horas antes del sacrificio del embrión (Figura 20 A), no detectándose diferencias en la incorporación total del nucleótido o en la tasa proliferativa entre animales de distintos genotipos (Tabla 12). Este resultado no era sorprendente ya que nuestros estudios de expresión indicaban que las células proliferantes no expresaban $\alpha\text{-SYN}$ y, por tanto, ni siquiera los neuroblastos estarían afectados en este momento del desarrollo. Sin embargo, la expresión restringida de $\alpha\text{-SYN}$ en neuronas que ya han abandonado el ciclo celular podría sugerir la posibilidad de que esta proteína participase en el propio proceso de diferenciación terminal. En este sentido, nuestros datos parecen excluir dicha posibilidad.

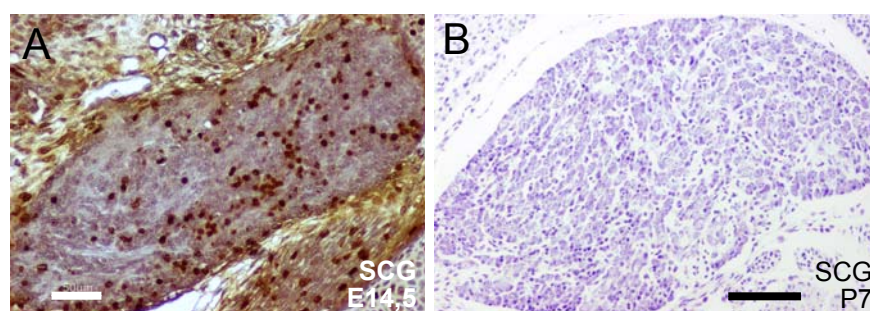


Figura 20. Secciones histológicas de ganglios SCG. (A) Sección de SCG de E14,5 que muestra una inmunohistoquímica para BrdU (células marrones) y tinción con hematoxilina de Gill n° 2 (células azules). (B) Sección de SCG neonatal teñida con solución de Nissl. La barra de escala es de 50 μm (A) y 100 μm (B).

Tabla 12. Recuentos de proliferación y supervivencia celular del SCG de animales E14,5 salvajes y mutantes nulos para $\alpha\text{-syn}$

	n° de células BrdU ⁺	n° total de células	tasa proliferación (%)
$\alpha\text{-syn}^{+/+}$	3638 \pm 309 (n = 4)	24398 \pm 2339 (n = 4)	15 \pm 0
$\alpha\text{-syn}^{-/-}$	4097 \pm 444 (n = 3)	24639 \pm 3321 (n = 3)	17 \pm 3

Los datos se expresan como la media de los recuentos obtenidos en un número de animales independientes indicado entre paréntesis (n) \pm SEM. No hay diferencias significativas entre genotipos.

La $\alpha\text{-SYN}$ sí parece expresarse en neuronas diferenciadas desde estadios tempranos del desarrollo del ganglio y, por tanto, era posible que participase en la regulación de la

supervivencia neuronal durante los periodos de muerte neuronal natural, que acontecen perinatalmente en el desarrollo de los ganglios simpáticos. Por ello, se determinó el número de neuronas en neonatos (Figura 20 B; Tabla 13), contando el número de células que, en preparaciones teñidas con violeta de cresilo, presentaban características morfológicas propias de neuronas, como son tamaño celular grande, citoplasma abundante y núcleo con nucleolo/s evidente/s. Dado que el periodo de muerte neuronal programada en el SCG se completa hacia el final de la primera semana postnatal, se realizó, además, una estimación del número de neuronas, a través de la medida del tamaño del ganglio en animales P15, una vez terminado el periodo de muerte celular programada. En ninguno de los casos, se observaron diferencias significativas entre animales de genotipo salvaje y mutante para α -syn (Tabla 13).

Tabla 13. Recuentos de neuronas y estimaciones de volumen en el SCG de animales neonatos/postnatales salvajes y mutantes nulos para α -syn

genotipo	nº neuronas en P0	volumen (mm ³) en P15
α -syn ^{+/+}	38101 ± 5747 (n = 3)	0,08 ± 0,01 (n = 2)
α -syn ^{-/-}	42851 ± 6882 (n = 4)	0,08 ± 0,01 (n = 2)

Los datos se expresan como la media de los recuentos obtenidos en un número de animales independientes indicado en paréntesis (n) ± SEM. Diferencias estadísticamente no significativas.

4.3. Fenotipo *in vitro* de las neuronas periféricas del mutante de α -syn

4.3.1. La α -SYN no modula la morfología o la respuesta neurotrófica de las neuronas sensoriales en cultivo

Experimentos realizados mediante inyección intracelular de vectores de expresión con el cDNA que codifica para la α -SYN humana en neuronas nodosas aisladas de ratón habían demostrado que la sobreexpresión de la forma humana salvaje, no mutada, incrementaba la apoptosis comparada con la condición en la que se inyectaba el vector vacío (Saha *et al.*, 2000). El efecto no parecía depender de la expresión de formas mutadas sino de la mera sobreexpresión de la molécula ya que las formas que portaban las mutaciones, que en humanos causan Parkinson, no incrementaban la apoptosis más que la forma salvaje. Esto sugería la implicación de α -SYN en la supervivencia de neuronas sensoriales viscerales. Para comprobar si una deficiencia en α -SYN puede producir algún efecto en la supervivencia de neuronas sensoriales viscerales, como las del NOD, realizamos un estudio *in vitro* de la respuesta neurotrófica de neuronas nodosas embrionarias obtenidas a partir de nuestros mutantes nulos.

Las células nodosas de genotipo salvaje en cultivo presentaron principalmente dos tipos de morfologías: células con soma grande, redondeado y refringente, y prolongaciones neuríticas más o menos largas, identificadas como neuronas (Figuras 21 A-C) y células más aplanadas y con prolongaciones más cortas y anchas identificadas como glía (Figura 21 A). A las 24 horas después de sembradas, todas las neuronas nodosas expresaban α -SYN aunque con niveles heterogéneos (Figura 21 D), tal como lo hacían *in vivo*. Se observó que la expresión de α -SYN correspondía a neuronas y no a glía (Figuras 21 B, F). De manera similar, cuando se realizó la inmunodetección de TH se encontró un número muy bajo de neuronas inmunopositivas (no cuantificado), como sucedía *in vivo* (Figura 21 E).

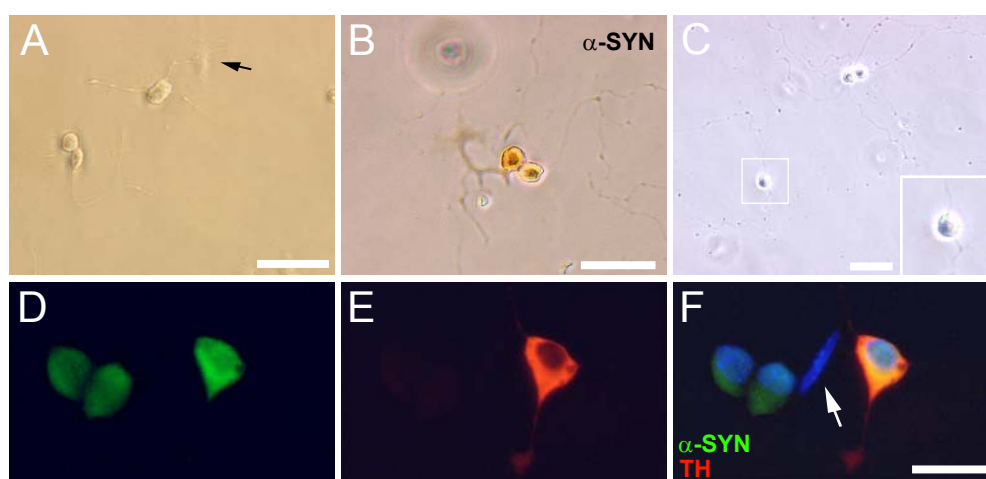


Figura 21. Caracterización de las neuronas nodosas de E14,5 en cultivo sobre laminina. (A) Aspecto general del cultivo en contraste de fases donde se observan neuronas y células gliales (flecha). (B) Neuronas que expresan α -SYN detectada mediante inmunoperoxidasa. (C) Ausencia de expresión α -SYN en las células procedentes de animales α -syn^{-/-}. Detección inmunofluorescente de α -SYN (D), TH (E), y ambas (F). Nótese la presencia de células gliales que no expresan ni α -SYN ni TH (flecha). La barra de escala es de 50 μ m (A, B, C) y 20 μ m (D-F).

Dentro del grupo de las neuronas se encontraron diversos fenotipos morfológicos, clasificados en función del número de neuritas que salían del cuerpo neuronal (Figura 22 B): unipolar, pseudounipolar, bipolar, multipolar. De estos, los fenotipos mayoritarios fueron el bipolar y el multipolar (Figura 22 C).

Las neuronas nodosas del estadio embrionario E14,5 fueron aisladas y cultivadas *in vitro* utilizando BDNF para permitir su supervivencia. Todos los cultivos se sembraron a muy baja densidad, siguiendo los protocolos y estrategias desarrolladas por el laboratorio del Dr. Alun Davies (Davies *et al.*, 1993). Este tipo de siembra minimiza los efectos tróficos auto/paracrinos de las propias neuronas y garantiza el estudio de los efectos inducidos por los factores neurotróficos que añade el propio investigador. Para establecer si la respuesta a BDNF podía ser modulada por α -SYN, decidimos realizar una curva dosis-respuesta de supervivencia de las

neuronas salvajes y mutantes frente a BDNF. Las curvas de supervivencia para las neuronas nodosas de genotipo salvaje y mutante resultaron idénticas (Figura 22 A). Por lo tanto, la supervivencia en cultivo de las neuronas nodosas embrionarias de mamífero, bajo un paradigma de dependencia neurotrófica, no cambia en ausencia de α -SYN.

A la concentración máxima utilizada de BDNF (10 ng/ml) la apariencia de las neuronas nodosas en cultivo procedentes de animales de genotipo salvaje o deficientes para α -syn era similar. Cuando se analizó la posible implicación de la α -SYN en el establecimiento de estas morfologías neuronales, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de los distintos morfotipos (Figura 22 C). Aunque tampoco se observaron diferencias cualitativas en tamaño o complejidad final de las neuronas entre genotipos, se analizó el crecimiento neurítico inicial durante las dos primeras horas a partir del sembrado de las neuronas α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-}. Para ello, se fotografiaron las neuritas de unas decenas de neuronas en diversos cultivos procedentes de distintos embriones de cada uno de los genotipos en el microscopio confocal con cámara incubadora a intervalos de 20 minutos (Figuras 23 A-F). Por ser el fenotipo mayoritario, se estudió el crecimiento neurítico de las neuronas con morfología multipolar. Mediante dibujo en papel de acetato de las fotografías del crecimiento de las neuritas y el empleo de un programa de análisis de imagen se determinó el crecimiento neurítico y se comparó entre genotipos (Figura 23 G). El análisis mostró que la ausencia de α -SYN no altera el ritmo de crecimiento neurítico temprano en neuronas nodosas embrionarias.

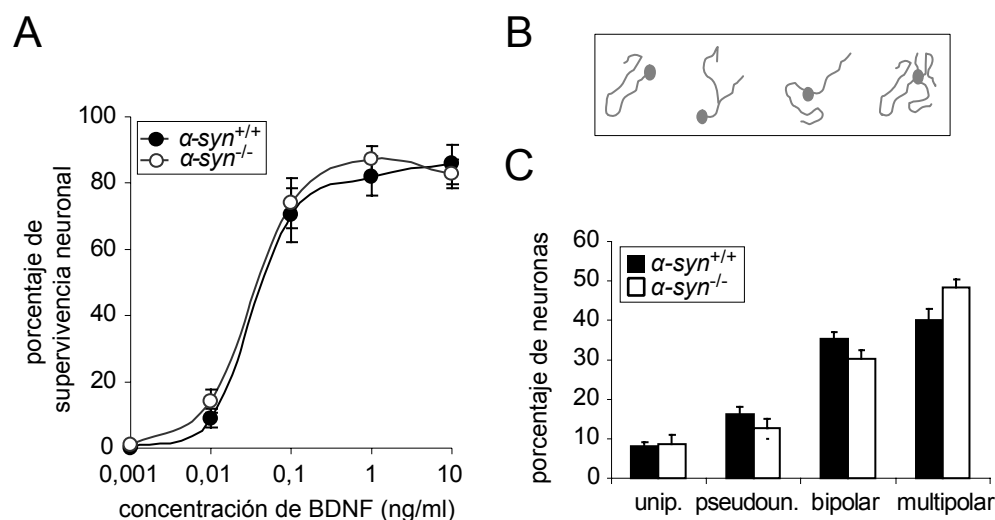


Figura 22. Supervivencia y morfología de las neuronas nodosas embrionarias en cultivo procedente de animales deficientes en α -SYN. (A) Curva dosis-respuesta de la dependencia neurotrófica de las neuronas nodosas aisladas de embriones α -syn^{+/+} (n = 18) y α -syn^{-/-} (n = 11) de E14,5 y cultivadas durante 48 h en presencia de distintas concentraciones de BDNF. (B) Dibujo ilustrativo de los morfotipos característicos de las neuronas nodosas embrionarias en cultivo. (C) Cuantificación de los morfotipos de al menos un centenar de neuronas nodosas procedentes de embriones α -syn^{+/+} (n = 3) y α -syn^{-/-} (n = 3) de E14,5 crecidas en presencia de 10 ng/ml de BDNF durante 24 h. El análisis estadístico no mostró ninguna diferencia significativa entre genotipos.

4.3.2. La α -SYN no modula la morfología o la respuesta neurotrófica de las neuronas simpáticas en cultivo

Nuestros datos *in vivo* indicaban que la α -SYN no es esencial para el desarrollo normal de las poblaciones simpáticas. Sin embargo, realizamos experimentos para evaluar con más precisión la respuesta neurotrófica de las neuronas simpáticas mutantes así como la posible participación de la α -SYN en el establecimiento de la morfología de estas neuronas. Para ello, se aislaron neuronas simpáticas tanto del estadio embrionario E14,5 como de animales postnatales de siete días de edad (P7) y se estudiaron *in vitro*.

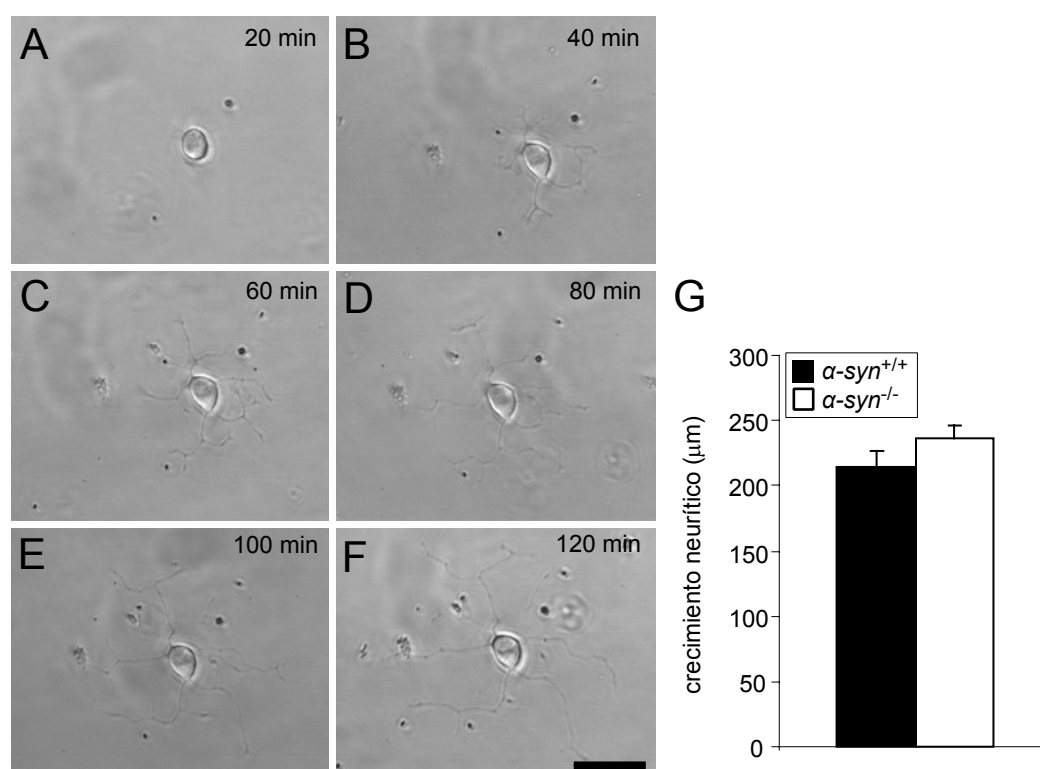


Figura 23. Crecimiento neurítico de neuronas nodosas embrionarias (E14,5) en cultivo. (A-F) Ejemplo ilustrativo del crecimiento neurítico inicial de neuronas nodosas de genotipo salvaje mediante secuencias de fotos tomadas a intervalos de 20 minutos durante 2 h. La barra de escala es de 20 µm. (G) Representación del crecimiento neurítico promedio \pm SEM (10 neuronas por animal; n = 8 animales en cada genotipo) para animales α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-}. No hay diferencias significativas entre genotipos.

En microscopía de contraste de fases se identificaron diferentes morfologías celulares en los cultivos de SCG de E14,5 sobre laminina: neuronas simpáticas, caracterizadas por tener un soma redondeado y voluminoso, bastante refringente, del que partían una serie de prolongaciones neuríticas relativamente largas; precursores neuronales (simpatoblastos), con el soma más pequeño y ovalado que las neuronas y con prolongaciones más cortas y de trazado

más tortuoso (Figura 24 A) y células con cuerpo celular plano, alargado o redondeado, sin extensiones citoplasmáticas evidentes, que correspondían a células gliales periféricas, difícilmente visibles en contraste de fases, aunque sí eran claramente evidenciables por la ausencia de marcadores neuronales (no mostrado). Cuando se realizaba una tinción inmunohistoquímica para la α -SYN en estos cultivos a las 24 h, las células inmunopositivas poseían una clara morfología neuronal (Figuras 24 B, D), al igual que aquellas que eran positivas para el marcador TH (Figuras 24 C, E). La tinción nuclear fluorescente con DAPI, que tiñe los núcleos de todas las células presentes en el cultivo, indicaba la existencia de células gliales próximas a las neuronales que no expresaban ni α -SYN ni TH (Figura 24 F). En inmunofluorescencia se observaba que todas las neuronas simpáticas expresaban α -SYN y TH, aunque cada célula mostraba un grado de intensidad variable para cada uno de los marcajes. Por tanto, tal como se observaba *in vivo*, la proteína α -SYN en cultivo sólo se encontraba en neuronas.

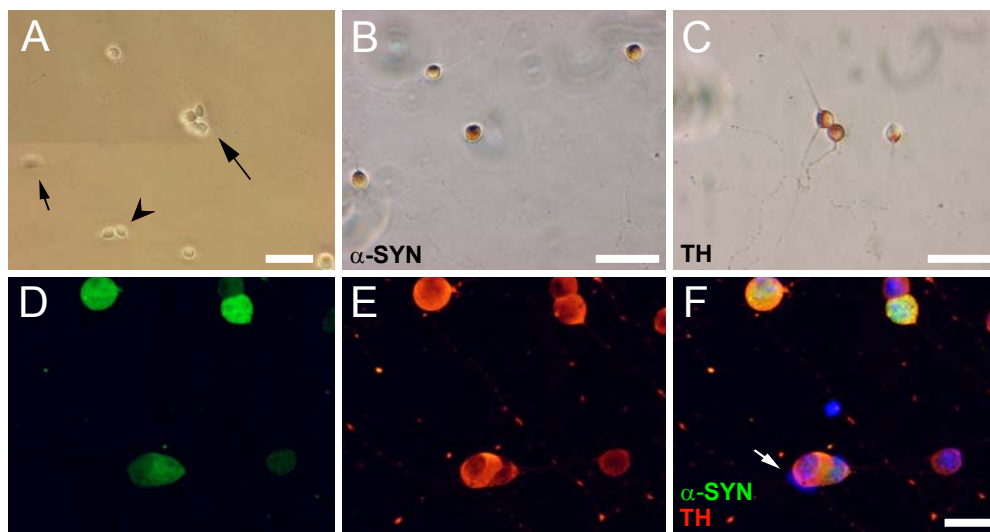


Figura 24. Caracterización de las células del SCG de E14,5 a las 24 h de cultivo. (A) En contraste de fase se pueden observar neuronas con largas prolongaciones neuríticas (flecha larga), precursores neuronales (cabeza de flecha) y glía (flecha corta). (B) Neuronas simpáticas expresando α -SYN (B) y TH (C) mediante inmunoperoxidasa. (D-F) Inmunofluorescencia para α -SYN (D), TH (E) y combinación de ambas (F). Nótese que las neuronas expresan niveles variables de α -SYN y que las células gliales no expresan ni α -SYN ni TH (flecha en F). La barra de escala es de 50 μ m (A-C) y 20 μ m (D-F).

Aunque la supervivencia neuronal embrionaria y postnatal *in vivo* en el SCG no parecía alterada por la falta de α -SYN, se realizó un estudio de dependencia trófica *in vitro*. Las neuronas simpáticas de E14,5 responden tanto a NT-3 como a NGF y, por tanto, la supervivencia se determinó para diferentes condiciones neurotróficas: NGF (10 ng/ml), NT-3 (10 ng/ml), NGF y NT-3 combinadas (5 ng/ml de cada una) a las 48 h. Se observó que cualquiera de las

condiciones tróficas era igualmente eficiente en mantener la supervivencia de las neuronas sembradas (Tabla 14). Tanto NGF como NT-3 parecían mantener la misma población de neuronas ya que se observaba la misma respuesta con ambas neurotrofinas y esta respuesta no era aditiva. Esta respuesta máxima no se veía modificada por la ausencia de α -SYN, ya que la respuesta era idéntica cuando se comparaban cultivos obtenidos a partir de embriones α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-} (Tabla 14).

Tabla 14. Recuentos de supervivencia en cultivo de las neuronas de SCG E14,5

	NGF	NT-3	NGF + NT-3
α -syn ^{+/+}	85 ± 9 (n = 5)	92 ± 12 (n = 4)	79 ± 4 (n = 26)
α -syn ^{-/-}	93 ± 11 (n = 7)	79 ± 5 (n = 4)	75 ± 3 (n = 24)

Neuronas simpáticas de embriones de E14,5 cultivados en tres condiciones neurotróficas consistentes en NGF a 10 ng/ml (NGF), NT-3 a 10 ng/ml (NT-3) y 5 ng/ml de NGF más 5 ng/ml de NT-3 (NGF + NT-3), durante 48 h. En cada caso se calculó el porcentaje de neuronas que sobrevivían con respecto al recuento inicial a las 6 h tras la siembra ± SEM. Los datos se muestran como la media de dichos porcentajes en un número de experimentos que se muestra entre paréntesis (n). Diferencias estadísticamente no significativas.

Se evaluó entonces la respuesta de supervivencia de las neuronas simpáticas de los dos genotipos frente a un rango de concentraciones de NGF o de NT-3, realizando curvas dosis-respuesta. Todos los cultivos, independientemente de su genotipo, mostraron, por un lado, que una parte de las neuronas simpáticas del estadio E14,5 sobreviven en ausencia de neurotrofinas y, por otro, una respuesta de supervivencia relacionada con la concentración de neurotrofina utilizada. Cuando se comparó el comportamiento de neuronas de distinto genotipo no se observaron diferencias significativas en las curvas dosis-respuesta entre neuronas de genotipo α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-} (Figuras 25 A, B).

El periodo de muerte neuronal natural de las neuronas simpáticas es perinatal y en esos momentos todas las neuronas dependen de NGF para su supervivencia. Por ello, se analizó la supervivencia de neuronas simpáticas obtenidas a partir de ratones P7 y mantenidas *in vitro* en presencia de NGF. En estos cultivos, la tinción inmunohistoquímica para la α -SYN indicaba que, al igual que en el caso de los ganglios embrionarios, se podía detectar la proteína desde el primer día de cultivo, y que las células inmunopositivas poseían también una clara morfología neuronal y que todas las neuronas simpáticas expresaban α -SYN y TH (Figuras 26 B-D).

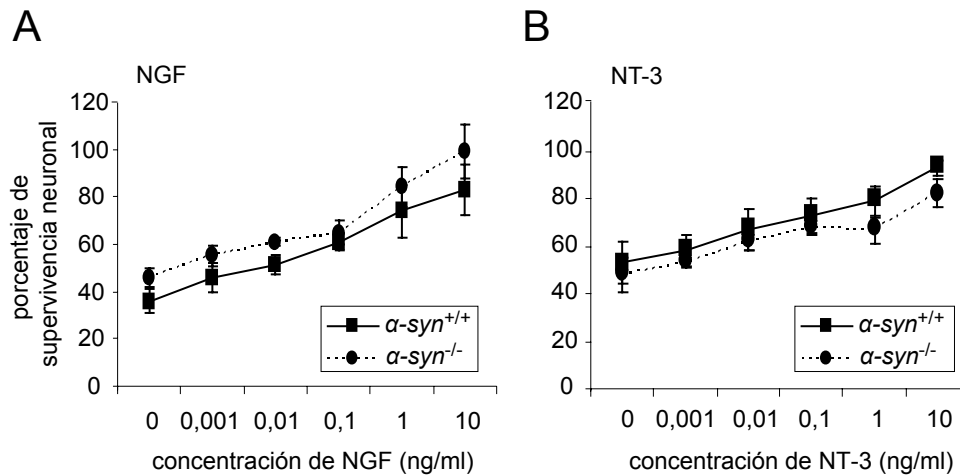


Figura 25. Supervivencia de las neuronas simpáticas embrionarias en diferentes condiciones neurotróficas a partir de animales deficientes en $\alpha\text{-SYN}$. Curva dosis-respuesta de la dependencia neurotrófica de las neuronas simpáticas de animales E14,5 para NGF ($\alpha\text{-syn}^{+/+}$ n = 5, $\alpha\text{-syn}^{-/-}$ n = 7) (A) y NT-3 ($\alpha\text{-syn}^{+/+}$ n = 4, $\alpha\text{-syn}^{-/-}$ n = 4) (B). Se muestra el porcentaje de neuronas que sobrevive tras 48 h a las distintas concentraciones de neurotrofina \pm SEM. No hay diferencias significativas.

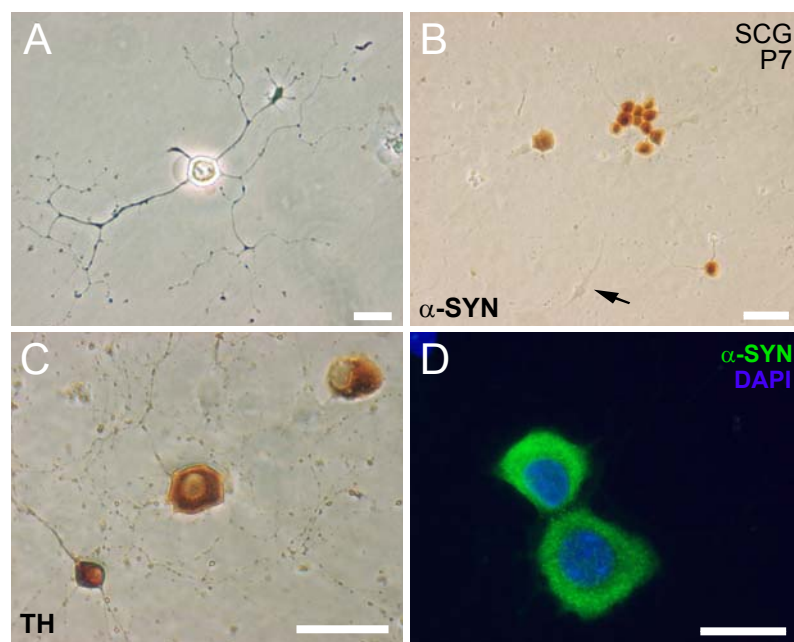


Figura 26. Caracterización de las células simpáticas postnatales (P7) del SCG en cultivo. (A) Aspecto de una neurona simpática en contraste de fases. (B, C) Neuronas simpáticas mostrando expresión de $\alpha\text{-SYN}$ (B) y TH (C) por inmunocitoquímica. La glía del cultivo no muestra inmunorreactividad para $\alpha\text{-SYN}$ (flecha en B). (D) Neuronas simpáticas inmunofluorescentes para $\alpha\text{-SYN}$. La barra de escala es de 20 μm (A, C, D) y 50 μm (B).

Se realizaron curvas dosis-respuesta para NGF de neuronas simpáticas de P7 obtenidas de animales $\alpha\text{-syn}^{+/+}$ y $\alpha\text{-syn}^{-/-}$ en cultivos con concentraciones variables de NGF durante 48 h *in vitro*. La respuesta de las neuronas fue equivalente independientemente del genotipo. Las

neuronas de uno y otro genotipo eran incapaces de sobrevivir en ausencia completa de neurotrofina y sobrevivían todas cuando se alcanzaba la concentración de 1 ng/ml. Las curvas siguieron la misma cinética, independientemente de si las neuronas procedían de ratones $\alpha\text{-syn}^{+/+}$ o $\alpha\text{-syn}^{-/-}$ (Figura 27 A). Además del estudio de supervivencia con las diferentes dosis de NGF, se realizó un estudio de supervivencia a lo largo del tiempo en cultivo. Para ello se empleó la concentración máxima de 10 ng/ml de NGF, y se realizaron recuentos neuronales a diferentes tiempos *in vitro* (24, 48 y 72 h) (Figura 27 B). En ninguno de los tiempos estudiados se observaron diferencias significativas entre las neuronas simpáticas postnatales de cada uno de los genotipos. La ausencia de diferencias entre genotipos para estos dos estadios coincide con lo descrito para neuronas simpáticas neonatales (Stefanis *et al.*, 2004).

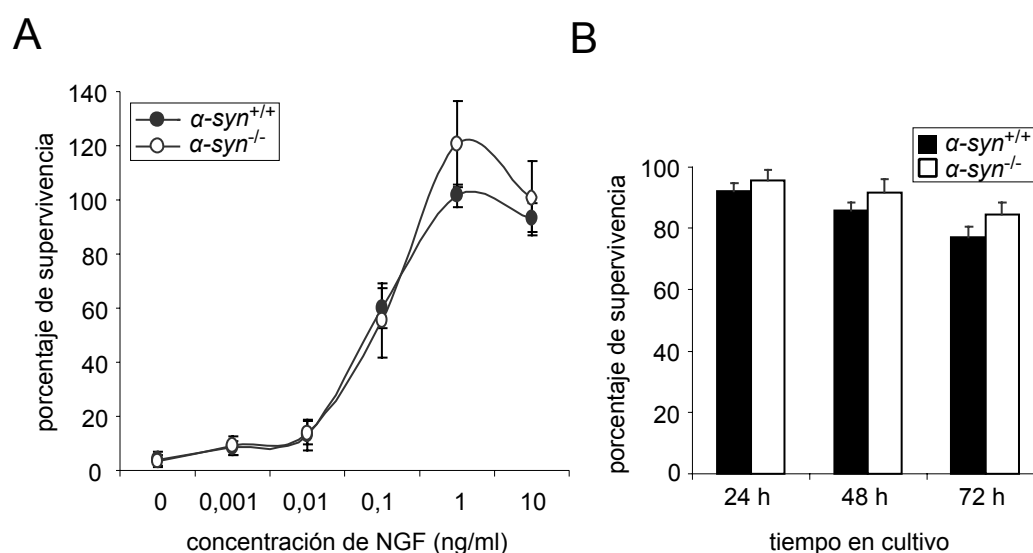


Figura 27. Supervivencia de las neuronas simpáticas postnatales a diferentes concentraciones de NGF y tiempo en cultivo a partir de animales deficientes en $\alpha\text{-SYN}$. (A) Curva dosis-respuesta de la dependencia neurotrófica de las neuronas simpáticas aisladas de animales $\alpha\text{-syn}^{+/+}$ (n = 5) y $\alpha\text{-syn}^{-/-}$ (n = 6) de P7 y cultivados durante 48 h en presencia de distintas concentraciones de NGF. (B) Supervivencia de neuronas de SCG de animales P7 $\alpha\text{-syn}^{+/+}$ (n = 5) y $\alpha\text{-syn}^{-/-}$ (n = 20), durante 24, 48 y 72 horas en 10 ng/ml de NGF. No se encontraron diferencias significativas entre genotipos.

Además de la supervivencia, analizamos la morfología que adoptaban las neuronas en cultivo, igual que hicimos con las neuronas nodosas en el apartado anterior. Se estableció que entre las 24 y 48 h de cultivo era un tiempo óptimo en el que la neurona estaba bien adherida al sustrato y presentaba un crecimiento neurítico óptimo para su estudio. Siguiendo esta pauta, se distinguieron los cuatro morfotipos neuronales observados para las neuronas sensoriales. El porcentaje de cada uno de los fenotipos morfológicos, relativo al total de neuronas presentes, permitió establecer que el fenotipo mayoritario entre las neuronas simpáticas postnatales en cultivo era el multipolar, mientras que el fenotipo mayoritario en las neuronas simpáticas

embrionarias era el unipolar (Figura 28). Cuando se analizó la posible implicación de la α -SYN en el establecimiento de estas morfologías neuronales, se vio que en ninguno de los casos analizados existieron diferencias significativas. En general, las proporciones neuronales de cada uno de los fenotipos morfológicos fueron bastante similares entre genotipos (Figura 28).

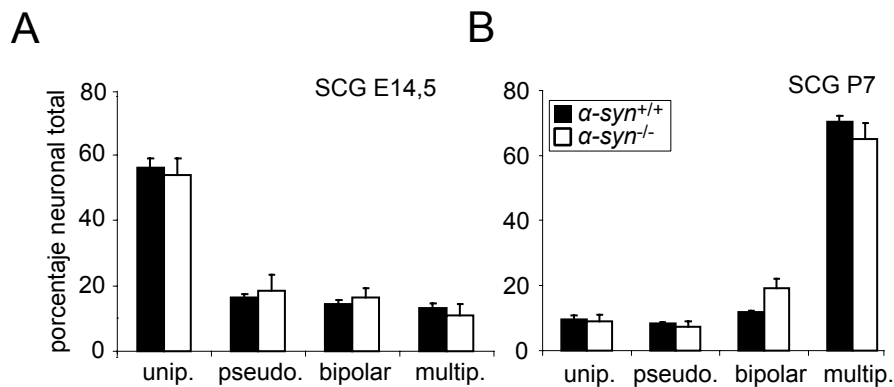


Figura 28. Cuantificación morfológica de las neuronas simpáticas embrionarias y postnatales en cultivo obtenida a partir de animales deficientes en α -SYN. Histograma de las diferentes morfologías adoptadas por las neuronas en cultivo de SCG E14,5 (α -syn^{+/+}, n = 5 y α -syn^{-/-}, n = 2; 24 h) (A) y P7 (α -syn^{+/+}, n = 3 y α -syn^{-/-}, n = 3; 48 h) (B). Como condición neurotrófica 5 ng/ml de NGF más 5 ng/ml de NT-3 para las neuronas embrionarias y 10 ng/ml de NGF para las postnatales. Sin diferencias significativas entre genotipos.

Para estudiar el crecimiento neurítico más temprano se utilizaron las neuronas embrionarias dado su relativo pequeño tamaño. Se realizaron cultivos primarios de neuronas simpáticas a baja densidad para poder distinguir las neuritas pertenecientes a cada neurona en 5 ng/ml de NGF y de NT-3. Se determinó el morfotipo y se midió la longitud de las neuritas a las 2 y 6 h desde el sembrado de las células. Los resultados no mostraron diferencias entre cultivos de distinto genotipo, sugiriendo que la α -SYN no es esencial para el crecimiento neurítico inicial (Figura 29 A). Cuando se restringió el análisis a las neuronas de fenotipo mayoritario, las unipolares, se observó que el crecimiento neurítico también se mantenía equivalente entre las neuronas simpáticas embrionarias α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-} (Figura 29 B). Conociendo el crecimiento neurítico de cada neurona en cada intervalo de tiempo determinamos la velocidad de crecimiento por neurita y por neurona. Vimos que la velocidad de crecimiento neurítico permanecía constante independientemente del número de neuritas por neurona y cuando comparamos dicho parámetro entre neuronas simpáticas embrionarias α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-} no se observaron diferencias significativas (datos no mostrados).

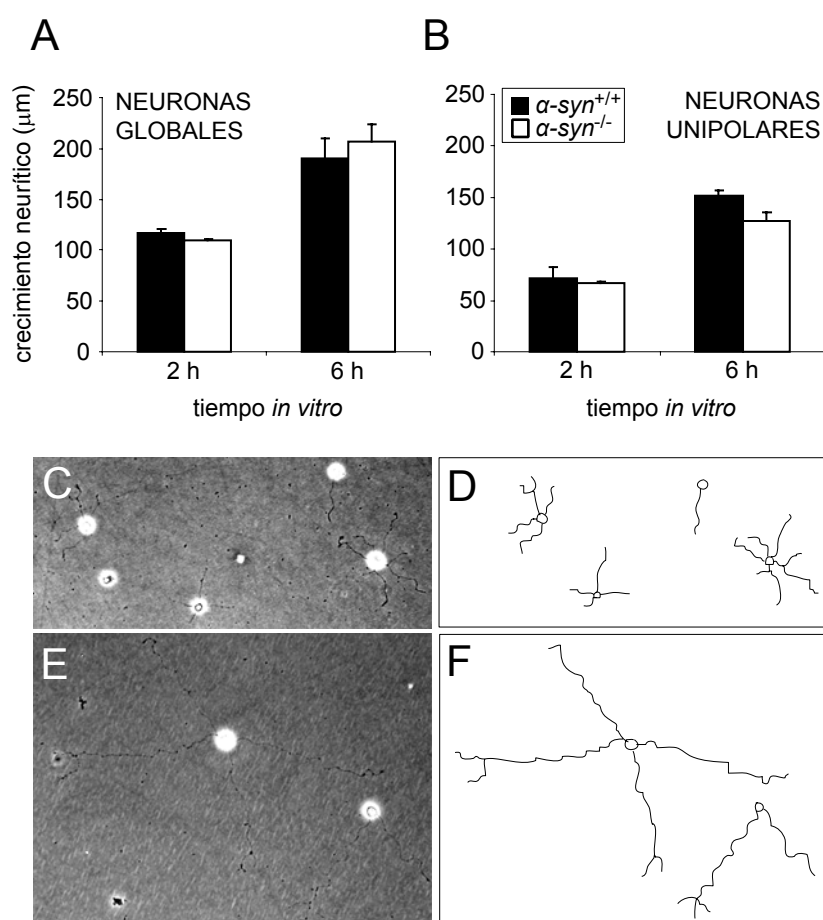


Figura 29. Análisis del crecimiento neurítico de neuronas simpáticas embrionarias en cultivo. Crecimiento neurítico promedio por neurona a las 2 y 6 h desde el sembrado inicial de neuronas simpáticas embrionarias (E14,5) de todos los morfotipos (globales) (A) y de fenotipo unipolar (B). Se ha representado el promedio del crecimiento neurítico de $n = 2$ cultivos independientes en cada caso \pm SEM. No hay diferencias significativas entre genotipos. Fotografías de neuronas simpáticas fijadas a las 2 h (C) y a las 6 h (E) y su correspondiente dibujo (D y F).

4.3.3. La α -SYN modula la vía de supervivencia de las PLC γ 1/PKC δ , pero no la de la PI3K/Akt

La supervivencia neuronal depende de la activación simultánea de diversas vías intracelulares de transducción de la señal. A partir de los receptores Trk para las distintas neurotrofinas se activan la vía de Ras/Raf/MEK/ERK, la vía PI3K/Akt y la vía de la PLC γ 1/PKC δ (Patapoutian y Reichardt, 2001). La α -SYN tiene interacciones con lípidos por lo que decidimos analizar las dos últimas en la condición mutante mediante un abordaje farmacológico, dado que los ensayos bioquímicos en cultivos de tan bajo rendimiento como los primarios de SNP son demasiado costosos.

La vía de señalización PI3K/Akt se ha implicado en supervivencia celular y en muchos sistemas celulares constituye la vía principal activada a partir de la interacción de las neurotrofinas con sus receptores Trk (Crowder y Freeman, 1999; Reichardt, 2006). En nuestros cultivos de neuronas simpáticas se activa la vía PI3K/Akt como puede comprobarse mediante el marcaje inmunofluorescente con anticuerpos que reconocen sustratos celulares fosforilados por el Akt activado (Figuras 30 A-C). Con la idea de investigar si la α -SYN podía jugar algún papel en la supervivencia mediada a través de la ruta PI3K/Akt en neuronas simpáticas utilizamos un inhibidor farmacológico específico de esta enzima, el LY294002. Dicho inhibidor se une reversiblemente a la subunidad catalítica p110 de la PI3K con una IC_{50} de 1,4 μ M inhibiéndola, sin afectar a otras proteínas quinasas como la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP quinasa o MAPK) o la proteína quinasa C (PKC), incluso a dosis más altas. En primer lugar se realizó un estudio de las concentraciones y tiempos efectivos en disminuir la supervivencia de las neuronas simpáticas procedentes de SCGs de E14,5. Así, se añadieron concentraciones de LY294002 de 2, 10, 20 y 50 μ M, a la placa de cultivo 6 h a partir del sembrado de la suspensión celular y se realizaron recuentos del número de neuronas supervivientes tras 24 y 48 h *in vitro*. El estudio se realizó en presencia de 5 ng/ml de NGF y 5 ng/ml de NT-3. El porcentaje de supervivencia en cada caso se refirió a su control interno con sulfóxido de dimetilo (DMSO) que era el vehículo de disolución para el antagonista. Se comprobó que, cuando se añadía solamente el vehículo, éste no producía un efecto significativo sobre la supervivencia de las neuronas ni a las 24 h (control: $95 \pm 3\%$, n = 8, DMSO: $98 \pm 5\%$, n = 8) ni a las 48 h (control: $85 \pm 4\%$, n = 8, DMSO: $87 \pm 6\%$, n = 8). La concentración de 50 μ M de LY294002 fue la única que produjo una disminución significativa, aunque muy moderada, de la supervivencia de las neuronas simpáticas tanto a las 24 como a las 48 h (Figura 30 D). Curiosamente, las neuronas simpáticas embrionarias no parecen ser muy dependientes de la vía PI3K/Akt para su supervivencia en respuesta a NT-3 y NGF. Las neuronas simpáticas postnatales, obtenidas de animales de P7 y mantenidas en 10 ng/ml de NGF, fueron algo más sensibles a la inhibición de esta ruta aunque la vía sólo explique una pequeña parte de la supervivencia total, igual que ocurre en las embrionarias. Al igual que con las neuronas simpáticas embrionarias se comprobó que el uso del vehículo del inhibidor farmacológico en las células postnatales en cultivo no producían efecto significativo sobre la supervivencia neuronal ni a las 24 h (control: $98 \pm 5\%$, n = 3; DMSO: $100 \pm 6\%$, n = 3) ni a las 48 h (control: $94 \pm 5\%$, n = 3; DMSO: $94 \pm 5\%$, n = 3) ni a las 72 h (control: $88 \pm 6\%$, n = 3, DMSO: $88 \pm 6\%$, n = 3) de tiempo de cultivo.

Para comprobar si la α -SYN jugaba algún papel diferencial sobre la supervivencia mediada a través de PI3K, se compararon los efectos del LY294002 entre genotipos. La supervivencia neuronal que se encontró tras el tratamiento con 50 μ M de LY294002 de células simpáticas embrionarias de genotipo salvaje y mutante nulo para α -syn no variaba significativamente entre

genotipos, tal como se muestra para las 48 h de tiempo de cultivo (Figura 30 D). Al igual que para las neuronas embrionarias, a la concentración de 50 μ M, ni a las 48 ni 72 h se detectaron diferencias significativas en la supervivencia de neuronas simpáticas postnatales entre animales de tipo salvaje y mutantes nulos para α -syn (Figura 30 E). Por tanto, la α -SYN no participa en la supervivencia celular mediada a través de la vía PI3K/Akt en las neuronas simpáticas embrionarias ni postnatales en cultivo.

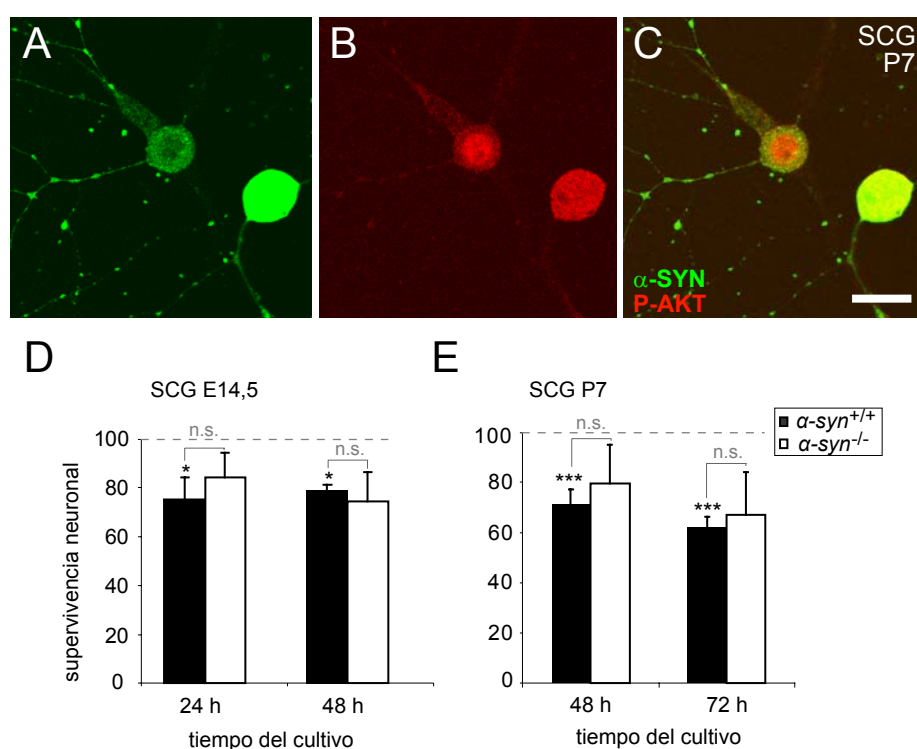


Figura 30. Supervivencia de las neuronas simpáticas a través de la vía PI3K/Akt en presencia y ausencia de α -SYN. Inmunocitoquímica fluorescente confocal para α -SYN (A), sustratos fosforilados de fosfo-Akt (B) y la combinación (C) en neuronas simpáticas postnatales (P7). La barra de escala mide 20 μ m (A-C). (D, E) Supervivencia neuronal en porcentaje tras tratamiento con LY294002 (50 μ M) en neuronas simpáticas embrionarias (D) y postnatales (E). El tratamiento disminuyó significativamente la supervivencia neuronal, * $p < 0,05$ (E14,5) y *** $p < 0,001$ (P7), aunque no se encontraron diferencias significativas entre genotipos (n.s.).

La activación del receptor del NGF, TrkA, conduce también a la activación de la fosfolipasa $C\gamma$ (Patapoutian y Reichardt, 2001) lo que induce la producción de inositol-trifosfato y diacilglicerol que activan a la proteína quinasa C delta (PKC δ), una quinasa del grupo de las PKC noveles (*novel* PKC δ) que ha sido implicada tanto en inducir como en prevenir apoptosis dependiendo del contexto celular (Jackson y Foster, 2004). Además, se ha demostrado que la α -SYN es capaz de inhibir la actividad PKC en la línea celular 293 (Osteroova *et al.*, 1999). La

detección inmunocitoquímica reveló que, en nuestros cultivos de neuronas simpáticas embrionarias, tanto las neuronas (Figuras 31 B-C, E-F) como las células gliales (Figura 32 E) tenían niveles detectables de PKC δ . Subcelularmente, la expresión neuronal de PKC δ se localizó en el citoplasma y a lo largo de las neuritas, de forma muy coincidente con la expresión de α -SYN (Figuras 30 A, C).

Con la idea de investigar si la α -SYN podría jugar algún papel en la supervivencia mediada a través de la PKC δ se utilizó el inhibidor farmacológico rottlerina, que inhibe específicamente la actividad enzimática de la PKC δ a concentraciones de 3 a 6 μ M. Se evaluaron diferentes dosis de rottlerina, 10, 3, 1 y 0,1 μ M, y se determinó la supervivencia en presencia de 5 ng/ml de NGF más 5 ng/ml de NT-3 a dos tiempos en cultivo, 24 y 48 h. Cuando se analizaron las concentraciones que producían un efecto sobre la supervivencia neuronal, se vio que las concentraciones de 1 y 3 μ M de rottlerina disminuían significativamente la supervivencia neuronal tanto a 24 como a 48 h de cultivo siendo, además, los valores de supervivencia en estos dos tiempos bastante similares entre sí, por lo que se muestran sólo los correspondientes a 24 h (Figura 31 G). Cuando se añadió 10 μ M de rottlerina al cultivo se produjo una muerte cuantiosa (no mostrado). También se analizó mediante inmunocitoquímica si la inhibición de esta molécula producía algún cambio sobre su localización subcelular. Sin embargo, cuando se trataron las células en cultivo con rottlerina 1 μ M durante 2 h, y hasta 24 h, no se observó ningún tipo de cambio en la expresión y/o localización de dicha proteína. Como control, la adición durante 2 h del ester de forbol (acetato de forbol miristato o PMA), activador no selectivo de PKC, a 0,1 μ M, indujo una reubicación de la enzima PKC δ a la membrana plasmática (Figuras 31 E-F), como había sido descrito anteriormente (ver revisión de Steinberg *et al.*, 2004).

Dado que la inhibición específica de la PKC δ disminuía la supervivencia neuronal, aunque no producía cambios en la localización de la molécula, se analizó si la α -SYN podía jugar un papel en la respuesta diferencial a la inhibición de PKC δ . Así, se cuantificó la supervivencia de neuronas simpáticas embrionarias en presencia de 0,1, 1 y 3 μ M de rottlerina entre animales α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-} pero no se observaron diferencias significativas entre genotipos a las concentraciones efectivas en disminuir la supervivencia ni a las 24 ni a las 48 h de cultivo. Dado que los recuentos son bastante equivalentes entre estos dos tiempos de cultivo, se muestran aquellos correspondientes a las 24 h de cultivo (Figura 31 G).

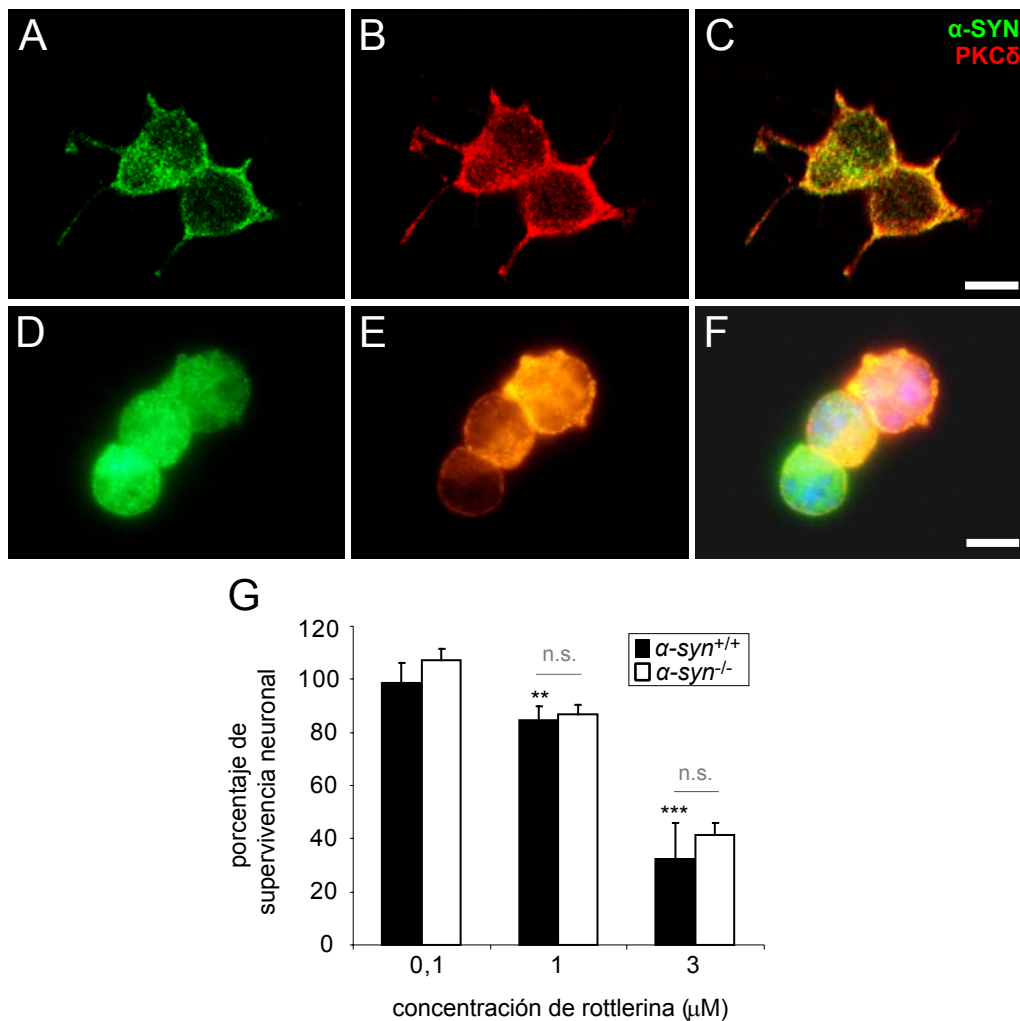


Figura 31. Expresión de PKCδ en neuronas simpáticas embrionarias y supervivencia tras inhibición de PKCδ en animales deficientes en α-SYN. Inmunofluorescencia confocal para α-SYN (A, D), PKCδ (B, E) y combinadas (C, F). (F) Traslocación de PKCδ a membrana plasmática en presencia de PMA (2 h, 0,1 μM). La barra de escala mide 10 μm. (G) Supervivencia *in vitro* de neuronas simpáticas α-syn^{+/+} (n = 6) y α-syn^{-/-} (n = 8) tratadas con distintas concentraciones de rottlerin durante 24 h en presencia de 5 ng/ml de NGF y 5 ng/ml de NT-3. Se ha representado el porcentaje del número de células que han sobrevivido al tratamiento respecto al número de neuronas sin tratar (100%). Sólo las concentraciones de 1 y 3 μM de rottlerin resultaron significativamente diferentes, **p<0,01 (1 μM) y ***p<0,001 (3 μM), a la hora de disminuir la supervivencia neuronal. No hay diferencias significativas (n.s.) entre genotipos.

La expresión de PKCδ en neuronas del SCG postnatal también se observa en citoplasma y neuritas (Figura 32 A-F). Cuando se ensayó la inhibición de PKCδ por rottlerin también en neuronas simpáticas de individuos postnatales se observó un grado similar de afectación de la supervivencia neuronal al observado para los cultivos embrionarios (datos no mostrados). Por ello, se analizó en neuronas de ambos genotipos la respuesta a la concentración de 1 μM de rottlerin. Cuando se comparó la respuesta a esta dosis entre

neuronas de genotipo salvaje y mutante se observó que la ausencia de α -SYN eliminaba el efecto de la rottlerina, sugiriendo que la α -SYN actúa, de alguna forma, sobre el estado de la proteína PKC δ (Figura 32 G).

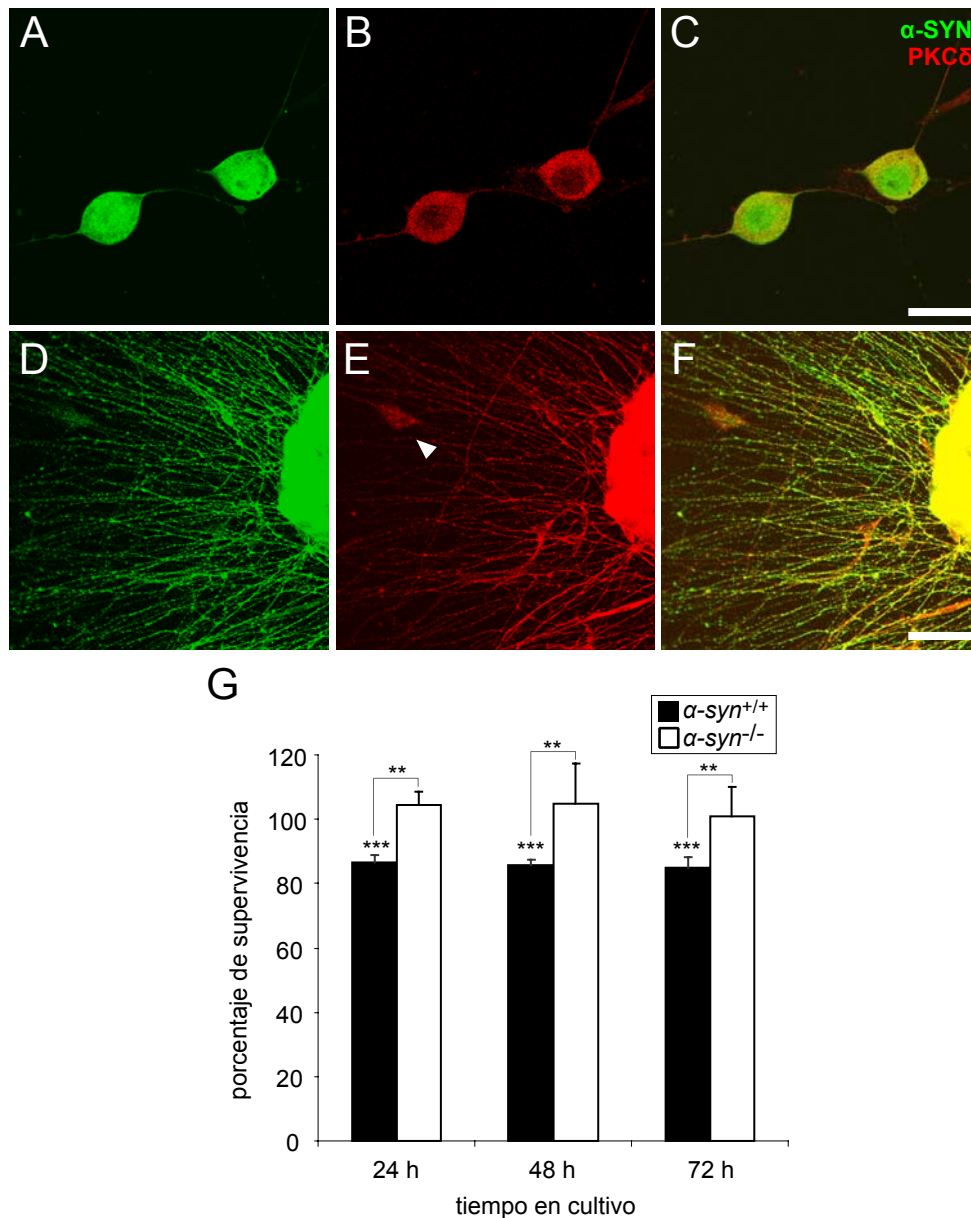


Figura 32. Expresión de PKC δ en neuronas simpáticas postnatales y supervivencia tras inhibición de PKC δ en animales deficientes en α -SYN. Inmunofluorescencia confocal para α -SYN (A, D), PKC δ (B, E) y combinadas (C, F) en neuronas simpáticas disociadas (A-C) y SCG explantados (D-F) mediante microscopía confocal. La glía expresa PKC δ pero no α -SYN (cabeza de flecha en E). La barra de escala mide 20 μ m (A-C) y 60 μ m (D-F). (G) Supervivencia de neuronas simpáticas α -syn^{+/+} (n = 6) y α -syn^{-/-} (n = 5) tratadas con rottlerina (1 μ M) a diferentes tiempos en cultivo. Se utilizó 10 ng/ml de NGF en el cultivo. La supervivencia disminuyó significativamente (***) con el tratamiento. Nótese que la falta de α -SYN protege significativamente de la inhibición de PKC δ .

4.4. Estudio de la implicación de la α -SYN en apoptosis inducida en neuronas simpáticas

4.4.1. La α -SYN no participa en la apoptosis inducida por daño genético

Dado que existen evidencias de que la α -SYN pudiera estar implicada en procesos celulares asociados a la supervivencia neuronal en respuesta al estrés (El Agnaf *et al.*, 1998; da Costa *et al.*, 2000; Saha *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002; Prasad *et al.*, 2004), decidimos estudiar si la ausencia de α -SYN podía causar una respuesta diferencial frente a un daño genotóxico, mediante el tratamiento con drogas que dañan el DNA de neuronas simpáticas de los dos genotipos. Para ello se utilizó el agente citotóxico citosina arabinósido (ara-C). Como el efecto del ara-C es dosis y tiempo dependiente, se estudió el efecto en supervivencia a dos dosis, 0,1 y 1 mM, a las 24 y 48 h *in vitro* para las neuronas embrionarias y 24, 48 y 72 h para las neuronas postnatales. Dichas concentraciones han sido ampliamente utilizadas para producir la muerte de neuronas simpáticas en cultivo (Martin *et al.*, 1990; Tomkins *et al.*, 1994). A las 24 h de tratamiento con el tóxico se observó una reducción dependiente de dosis en el número de neuronas embrionarias simpáticas (Figura 33 C). Además, las neuronas tratadas presentaban un aspecto atrófico y menos refringente, con neuritas fragmentadas, en comparación con las no tratadas (Figuras 33 A, B). A las 48 h la muerte era masiva, quedando muy pocas neuronas vivas en el cultivo. Cuando se analizaron los efectos en neuronas procedentes de embriones de cada uno de los genotipos no se observaron diferencias significativas en la respuesta al estímulo apoptótico (Figura 33 C). Las dos dosis de ara-C utilizadas fueron igualmente efectivas y equivalentes a la hora de disminuir la supervivencia de las neuronas simpáticas postnatales, aunque el efecto deletéreo se obtenía más tarde. Al igual que en el caso de las embrionarias, se comprobó que la falta de α -SYN no cambiaba la supervivencia producida por el daño genotóxico en las neuronas postnatales simpáticas de animales de tipo salvaje y los mutantes nulos para α -syn (Figura 33 D).

La sobreexpresión de α -SYN en líneas celulares reduce la vulnerabilidad celular en respuesta a agentes genotóxicos como el etopósido (da Costa *et al.*, 2000). Sin embargo, neuronas sensoriales de los ganglios trigéminos de ratones neonatos deficientes en α -syn responden frente a etopósido igual que las neuronas de genotipo salvaje (Ninkina *et al.*, 2003). Nosotros hemos utilizado el ara-C también en neuronas sensoriales nodosas en cultivo obteniendo efectos similares a los producidos en las neuronas simpáticas y ninguna diferencia significativa entre genotipos (ver Tabla 15). Por lo tanto, parece que un fondo genético nulo para

α -SYN no parece modular la respuesta apoptótica al daño en el DNA ni en neuronas sensoriales ni en neuronas simpáticas.

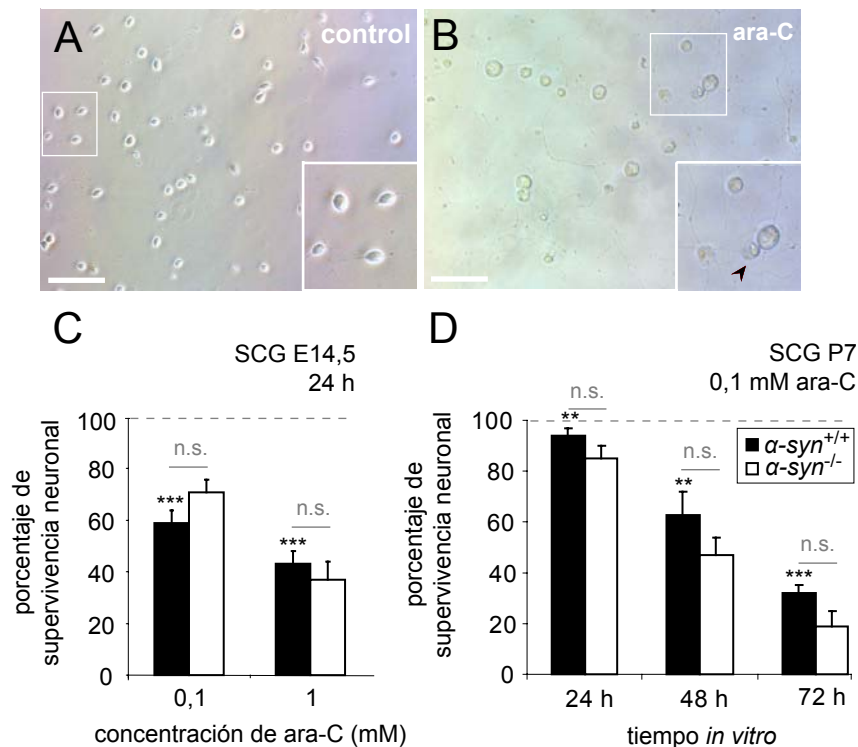


Figura 33. Supervivencia de las neuronas simpáticas en cultivo tras tratamiento con ara-C a partir de animales deficientes en α -SYN. Aspecto de las neuronas simpáticas embrionarias α -syn^{+/+} sin tratamiento (A) y con tratamiento de ara-C (0,1 mM) (B). Nótese la presencia de células apoptóticas (cabeza de flecha en B). La barra de escala es de 100 μ m (A) y 50 μ m (B). (C, D) Supervivencia tras tratamiento con 0,1 y 1 mM de ara-C a las 24 h de neuronas simpáticas embrionarias α -syn^{+/+} (n = 4) y α -syn^{-/-} (n = 4) (C) y tras tratamiento con ara-C (0,1 mM) en neuronas postnatales α -syn^{+/+} (n = 3) y α -syn^{-/-} (n = 3) a distintos tiempos (D). Se ha representado el porcentaje del número de células que han sobrevivido al tratamiento respecto al número de neuronas sin tratar (100%). Se indica el porcentaje de supervivencia neuronal promedio \pm SEM. Los tratados resultaron significativamente diferentes respecto de los controles sin tratar en α -syn^{+/+}, ***p<0,001 y **p<0,01, pero no se detectaron diferencias significativas (n.s.) entre genotipos.

Tabla 15. Recuentos de supervivencia tras tratamiento *in vitro* con diferentes dosis de ara-C de neuronas nodosas de E14,5 durante 24 h

	n	0,1 mM	1 mM
α -syn ^{+/+}	3	42 \pm 1***	27 \pm 2***
α -syn ^{-/-}	3	31 \pm 5***	20 \pm 4***

La supervivencia se ha representado como el porcentaje del número de neuronas vivas a las 24 h respecto al número inicial. La condición neurotrófica utilizada ha sido 10 ng/ml de BDNF. "n" indica el número de cultivos independientes utilizados en el análisis. Existen diferencias significativas en el tratamiento (***p<0,001) pero no entre genotipos.

4.4.2. La ausencia de α -SYN no modifica la muerte inducida por la droga parkinsoniana MPP⁺

Las neuronas simpáticas, al igual que las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, son susceptibles de intoxicación con MPTP/MPP⁺ (Luthman y Jonsson, 1986; Luthman y Sundstrom, 1990; Takatsu *et al.*, 2000). La neurotoxicidad selectiva del MPP⁺ se debe a que utiliza el mecanismo de recaptación de las catecolaminas para su entrada en las neuronas (Javitch *et al.*, 1985). En el caso de las neuronas de la *substantia nigra*, el MPP⁺ entra a través del transportador de dopamina (DAT) y en otras poblaciones neuronales catecolaminérgicas utiliza otros transportadores de catecolaminas como el transportador de noradrenalina (NAT), presente en neuronas simpáticas, o de serotonina (SERT).

Dada la relación entre la α -SYN y el SNP, así como los síntomas autonómicos que se presentan en pacientes con EP, decidimos estudiar si la presencia o ausencia de α -SYN podía afectar la respuesta de las neuronas simpáticas a la intoxicación con la neurotoxina parkinsoniana MPP⁺. Para ello, inicialmente se trataron neuronas simpáticas de genotipo salvaje, tanto embrionarias como postnatales, con distintas concentraciones de MPP⁺ añadido a la placa de cultivo 6 h tras el sembrado inicial y se determinó la supervivencia a distintos tiempos. La respuesta máxima de muerte neuronal, que se observó tanto a las 24 como a las 48 h, se obtenía a una dosis de 1 μ M de MPP⁺ aunque a las 48 h se morían muchas más neuronas (Figura 34 A). Según datos de nuestro propio laboratorio, la dosis que causa un 50% de muerte en cultivos de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo embrionario a las 48 h es de 2 μ M (Miguel Milán y Francisco Pérez Sánchez; comunicación personal). Por tanto, las neuronas del SCG embrionario son notablemente sensibles al MPP⁺. Por lo que respecta a las neuronas simpáticas postnatales se estableció también una curva dosis-respuesta. Todas las concentraciones de MPP⁺ que se ensayaron disminuyeron significativamente la supervivencia a partir de las 48 h de cultivo (Figura 34 B). El aumento de la concentración del tóxico causa un aumento en la muerte producida, que se acentúa con el tiempo de exposición, pero lo más característico de las curvas es que parece haber una población de neuronas resistente al tóxico, sugiriendo que la respuesta al MPP⁺ no es homogénea para todas las neuronas del ganglio.

El aspecto morfológico que presentan las neuronas simpáticas tratadas con MPP⁺ es el típico de una neurona en proceso de apoptosis, con el cuerpo neuronal menos refringente y redondeado, y con neuritas discontinuas, fragmentadas (no mostrado). Más aún, se observa una mayor frecuencia de núcleos condensados y fragmentados en tinciones con DAPI (Figura 35 B, datos no mostrados). La detección inmunocitoquímica de caspasa 3 activada en neuronas simpáticas embrionarias, a las 12 h tras la adición del MPP⁺ (Figura 35 A), sugiere que el

proceso de muerte inducido por el tóxico consiste en una apoptosis dependiente de caspasa 3. Aunque ha sido descrito que la intoxicación con MPTP/MPP⁺ aumenta los niveles de expresión de α -SYN (Vila *et al.*, 2000; Gómez-Santos *et al.*, 2002; Kalivendi *et al.*, 2004), no hemos observado una mayor inmunofluorescencia para α -SYN en los cultivos tratados con el tóxico (no mostrado).

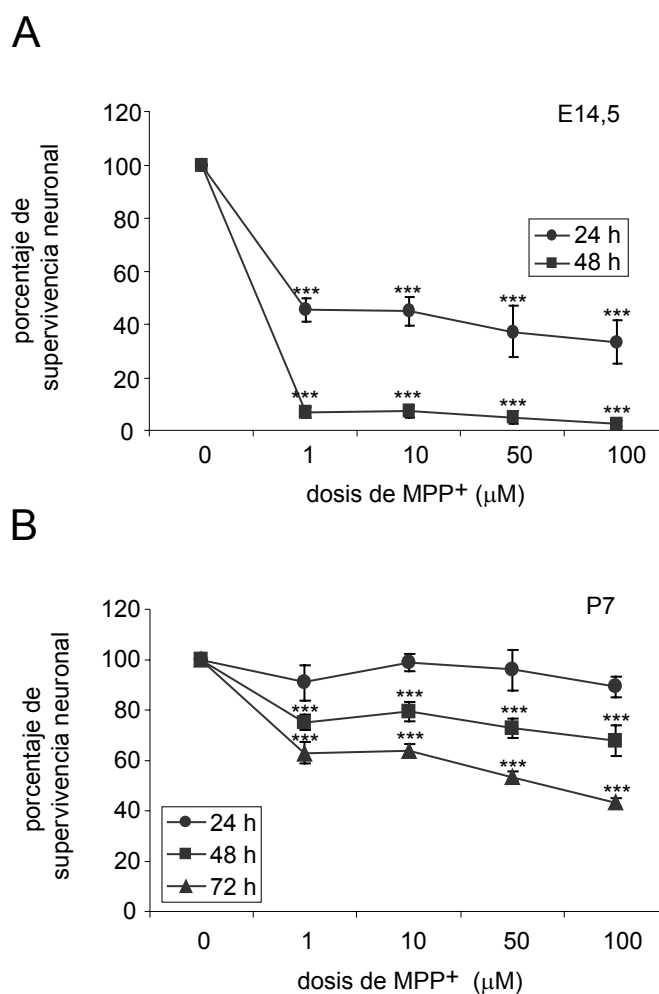


Figura 34. Efecto del MPP⁺ sobre la supervivencia de neuronas simpáticas en cultivo. Porcentaje de supervivencia de neuronas simpáticas embrionarias (A) y postnatales (B) en cultivo a distintos tiempos tras tratamiento respecto a las no tratadas a distintas concentraciones de MPP⁺ (n = 8 en cada caso). El medio de cultivo contenía 5 ng/ml de NGF más 5 ng/ml NT-3 para las neuronas embrionarias y 10 ng/ml de NGF para las postnatales. Los tratamientos resultaron significativamente diferentes respecto de sus controles sin tratar en las neuronas embrionarias (**p<0,001) y las postnatales a partir de las 48 h de cultivo (**p<0,001).

Aunque existen evidencias de que el MPP⁺ es un buen sustrato para los sistemas de captación de catecolaminas (Javitch *et al.*, 1985), se quiso comprobar que, efectivamente, en neuronas simpáticas éste era el modo de entrada del MPP⁺. Para ello, se trataron las neuronas simpáticas embrionarias con desipramina (DMI), un bloqueador farmacológico de

transportadores de catecolaminas, con una K_i de 4 nM para el transportador NAT y de 61 nM para el SERT. Tratamos las neuronas simpáticas embrionarias con dos dosis diferentes de MPP^+ (1 y 10 μM) añadido al medio de cultivo a partir de las 6 h desde el sembrado de las células y se combinaron estos tratamientos con dos estrategias distintas de administración del bloqueante desipramina (Bhave *et al.*, 1996). El tratamiento 1 consistió en tratar las neuronas con una alta concentración de DMI (10 μM) 30 min antes de la aplicación del neurotóxico. El tratamiento 2 consistió en el mismo procedimiento que el tratamiento 1, pero lavando el DMI antes de la aplicación del neurotóxico y añadiendo nuevamente DMI a una concentración baja y constante (4 nM) junto con el MPP^+ y manteniéndolo durante todo el resto del experimento, con la idea de conseguir un bloqueo constante del NAT. El DMI por sí mismo no afectaba la supervivencia de las neuronas simpáticas en cultivo (datos no mostrados). Tanto el tratamiento 1 como el 2 previnieron la muerte inducida por MPP^+ a 1 o 10 μM , tanto a las 24 h (Figura 36) como a las 48 h (datos no mostrados). En neuronas simpáticas postnatales se obtuvo el mismo tipo de resultado. Así, los efectos de la dosis de 1 μM de MPP^+ a las 72 h de cultivo fueron contrarrestados con el tratamiento con el DMI (valores de supervivencia neuronal: 100% en el control sin tratar, $73 \pm 6\%$ MPP^+ ($n = 3$), $100 \pm 8\%$ en el tratamiento 1 ($n = 3$), $100 \pm 0\%$ en el tratamiento 2 ($n = 3$)). Por tanto, el pretratamiento con el bloqueador de la entrada de noradrenalina antagoniza los efectos neurotóxicos del MPP^+ , indicando que el mecanismo de entrada del tóxico es el NAT.

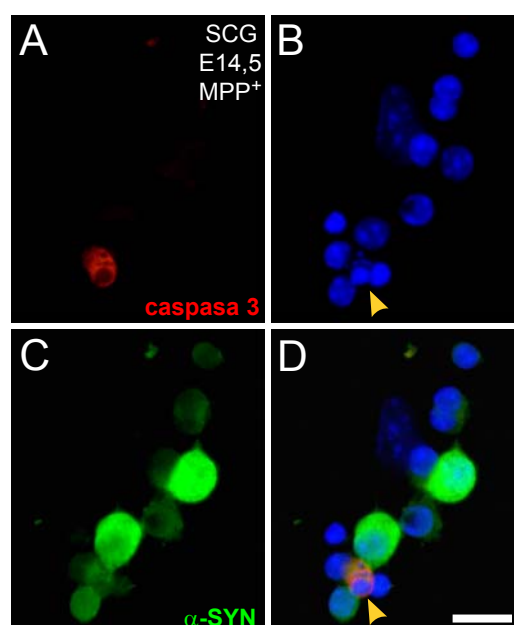


Figura 35. Apoptosis en neuronas simpáticas embrionarias tras tratamiento con MPP^+ (1 μM , 12 h). Inmunofluorescencia para la detección de caspasa 3 activada (A) y α -SYN (C), y combinada (D) en neuronas simpáticas de E14,5. Marcaje nuclear de contraste con DAPI (B). Nótese los cuerpos apoptóticos (cabeza de flecha en D). La barra de escala es de 20 μm (A-D).

Para investigar la relación entre la intoxicación con MPP⁺ y la α -SYN se trataron con el tóxico neuronas simpáticas procedentes de animales α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-}. En el caso de las neuronas embrionarias simpáticas cuando se comparó la supervivencia a las 24 h entre animales de genotipo salvaje y mutante nulo se observó que la muerte neuronal era equivalente entre neuronas de ambos genotipos a todas las concentraciones de MPP⁺ ensayadas (Figura 37 A). Cuando se intoxicaron con MPP⁺ neuronas simpáticas postnatales procedentes de animales α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-}, tampoco se observaron diferencias significativas en la vulnerabilidad neuronal entre genotipos a las 72 h de tratamiento con distintas dosis de MPP⁺ (Figura 37 B). Por tanto, la falta de α -SYN no confiere ninguna alteración en la supervivencia frente a la intoxicación por MPP⁺ en neuronas simpáticas, bien de edad embrionaria bien de edad postnatal, lo que contrasta con la observación de que las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas deficientes en α -SYN presentan una protección, bien total bien parcial frente al tóxico MPP⁺ (Dauer *et al.*, 2002; Schlüter *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2004; Klivenyi *et al.*, 2006; Miguel Milán y Francisco Pérez-Sánchez, comunicación personal).

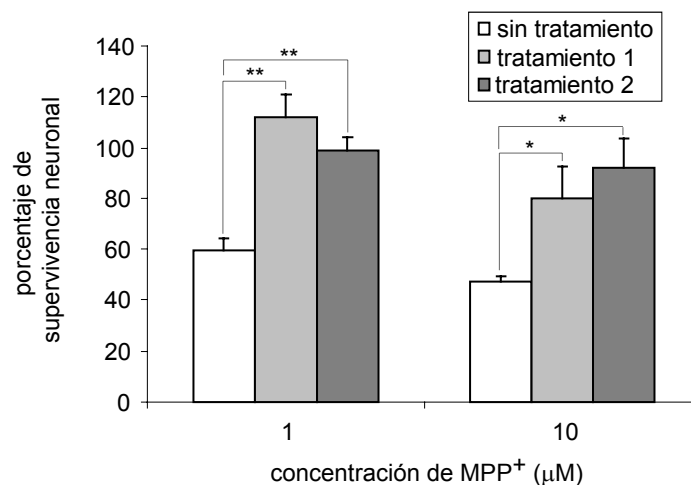


Figura 36. El bloqueo del transportador NAT previene la intoxicación de las neuronas simpáticas embrionarias en cultivo. Cultivo de neuronas simpáticas de E14,5 (n = 3) tratadas con MPP⁺ y uso de dos tratamientos con desipramina significativamente efectivos en evitar la intoxicación (**p<0,01, *p<0,05; ver texto). El cultivo se mantuvo durante 24 h utilizando como condiciones neurotróficas 5 ng/ml de NGF y 5 ng/ml de NT-3.

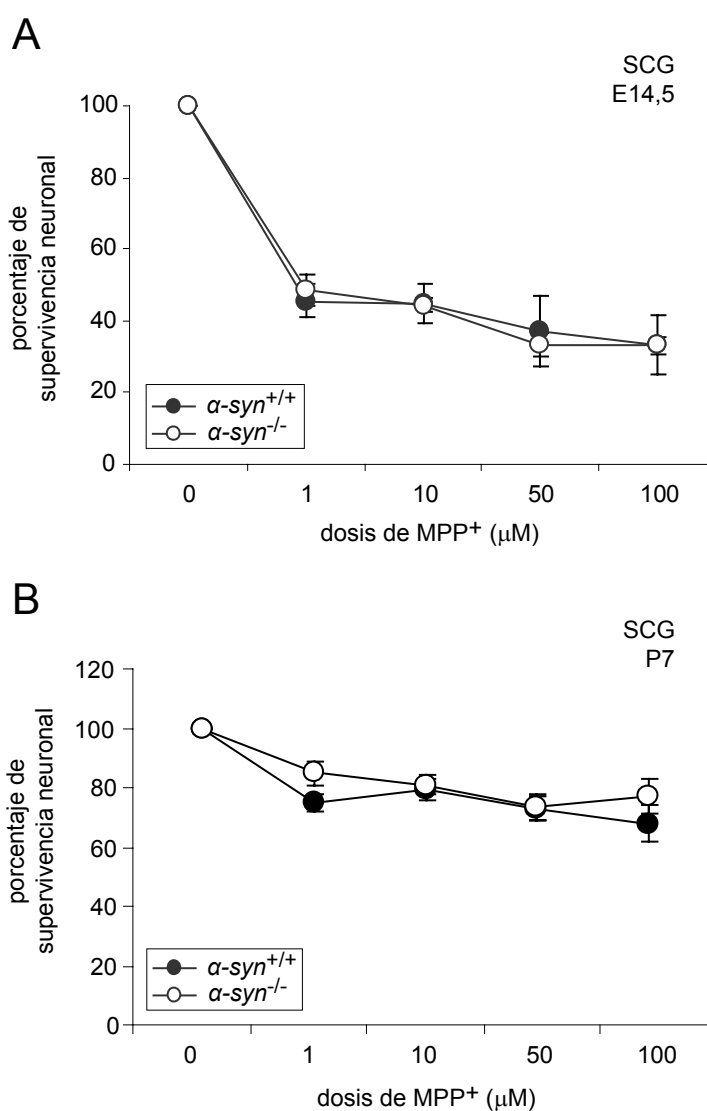


Figura 37. Efecto del MPP⁺ sobre la supervivencia de neuronas simpáticas en cultivo en animales deficientes en α-SYN. Porcentaje de supervivencia neuronal simpática procedente de animales $\alpha\text{-syn}^{+/+}$ y $\alpha\text{-syn}^{-/-}$ de E14,5 a las 24 h de cultivo (A) y de P7 a las 48 h de cultivo (B) tras adición de MPP⁺ al cultivo a las concentraciones indicadas. Porcentaje de supervivencia referido al inicial (% \pm SEM) (n = 8 cultivos independientes para $\alpha\text{-syn}^{+/+}$, embrionario y postnatal, n = 7 $\alpha\text{-syn}^{-/-}$ embrionario y n= 5 $\alpha\text{-syn}^{-/-}$ postnatal). La supervivencia neuronal entre genotipos no resultó significativamente diferente.

4.4.3. La sobreexpresión de α-SYN no modifica la muerte inducida por la droga parkinsoniana MPTP/MPP⁺

Para profundizar un poco más en la interacción entre intoxicación con MPP⁺ y α-SYN, se decidió evaluar la respuesta al tóxico parkinsoniano en neuronas simpáticas embrionarias procedentes de animales que sobreexpresaban la $\alpha\text{-syn}$ humana bajo el promotor del gen *TH*. En esta cepa transgénica (*TH-ha-syn tg* o *tg*⁺), observamos expresión del transgén en todas

aquellas poblaciones neuronales que expresan TH incluyendo las del SNP. Así, la proteína humana, reconocible por anticuerpos específicos que no reconocen la forma murina (Tabla 9) se expresa en el SCG embrionario de los animales transgénicos (tg^+) (Figura 38 G) pero no en neuronas simpáticas procedentes de los animales que no portan el transgén (tg^-) (Figura 38 C). Se realizó la misma caracterización en neuronas simpáticas embrionarias en cultivo (Figuras 38 A-F), observándose que el transgén se expresa en la totalidad de las células con una morfología típica neuronal pero no en la glía (Figuras 38 A-B), como corresponde a la actividad del promotor. Además, se confirmó que las neuronas que expresan el transgén son catecolaminérgicas por detección de la TH mediante inmunocitoquímica (Figuras 38 D-F). La inmunorreactividad para la α -SYN humana se localizó de forma difusa por toda la neurona, tanto en el citoplasma, como en neuritas e incluso en el núcleo (Figuras 38 B, D).

En esta cepa transgénica, el transgén se mantuvo siempre en heterocigosis por lo que en el momento de realizar los cultivos se desconocía el genotipo de los embriones. Esto obligó a que los cultivos se realizasen a partir de un solo embrión, utilizando los dos SCGs de cada uno de ellos, y manteniendo los cultivos de cada embrión por separado hasta conocer el genotipo. Dado el bajo rendimiento de este tipo de cultivos, se ensayó una única dosis de MPP⁺, 1 μ M, y se realizó el recuento correspondiente de supervivencia a las 24 h. A esta concentración, se observó el mismo porcentaje de pérdida neuronal que en los ensayos realizados para valorar la respuesta de los deficientes nulos en α -syn. En este último caso, el fondo genético en el que se encuentra la mutación es mixto entre las cepas 129/SvJ \times C57BL/6J, mientras que la cepa en la que se introdujo el transgén era una C57Bl6 pura, lo que sugiere que las neuronas simpáticas en cultivo son sensibles a la intoxicación con MPP⁺ independientemente del fondo genético. Cuando se analizó la intoxicación entre animales transgénicos (tg^+) y no transgénicos (tg^-) no se observó ninguna diferencia en cuanto a la pérdida neuronal (Figura 38 H). Por tanto, ni la falta de α -SYN ni la sobreexpresión parecen modificar la respuesta de las neuronas simpáticas a la intoxicación por MPP⁺.

Para estudiar si una sobreexpresión más fuerte podía modificar la respuesta a la intoxicación utilizamos células PC12, de una línea de feocromocitoma de rata modificadas adecuadamente. Estas células proceden de la transformación de células cromafines, productoras de adrenalina, que comparten origen embrionario con las neuronas simpáticas y son sensibles a MPP⁺. En el laboratorio del Dr. José González Castaño de la Universidad Autónoma de Madrid se establecieron líneas estables de células PC12 que expresaban o bien el reportero *eyfp* o bien la construcción *α -syn humana-eyfp* (PC12-*h α -syn*) bajo el control del promotor de uno de los genes del virus del citomegalovirus (Figuras 39 A-D). En estas células se ensayó el efecto del tóxico MPP⁺, aunque fue necesario utilizar concentraciones más elevadas de tóxico que en los cultivos primarios, en el rango mM, y alargar los tiempos de intoxicación, a fin de obtener un

porcentaje significativo de pérdida celular. Se utilizaron dosis de 0,2 y 0,5 mM que a las 48 h tras la intoxicación causan, respectivamente, una pérdida celular de aproximadamente un 30 y un 50%, medido por la técnica del MTT de determinación de la viabilidad celular (Figura 39 E). Cuando se ensayaron en estas mismas condiciones de intoxicación las células PC12 transducidas con la construcción para la proteína de fusión o para la proteína EYFP se comprobó que la sobreexpresión de la α -SYN humana no alteraba la respuesta al tóxico (Figura 39 F). Por tanto, la sobreexpresión de la α -SYN no altera la supervivencia tras intoxicación con MPP⁺ ni en neuronas simpáticas ni en células cromafines.

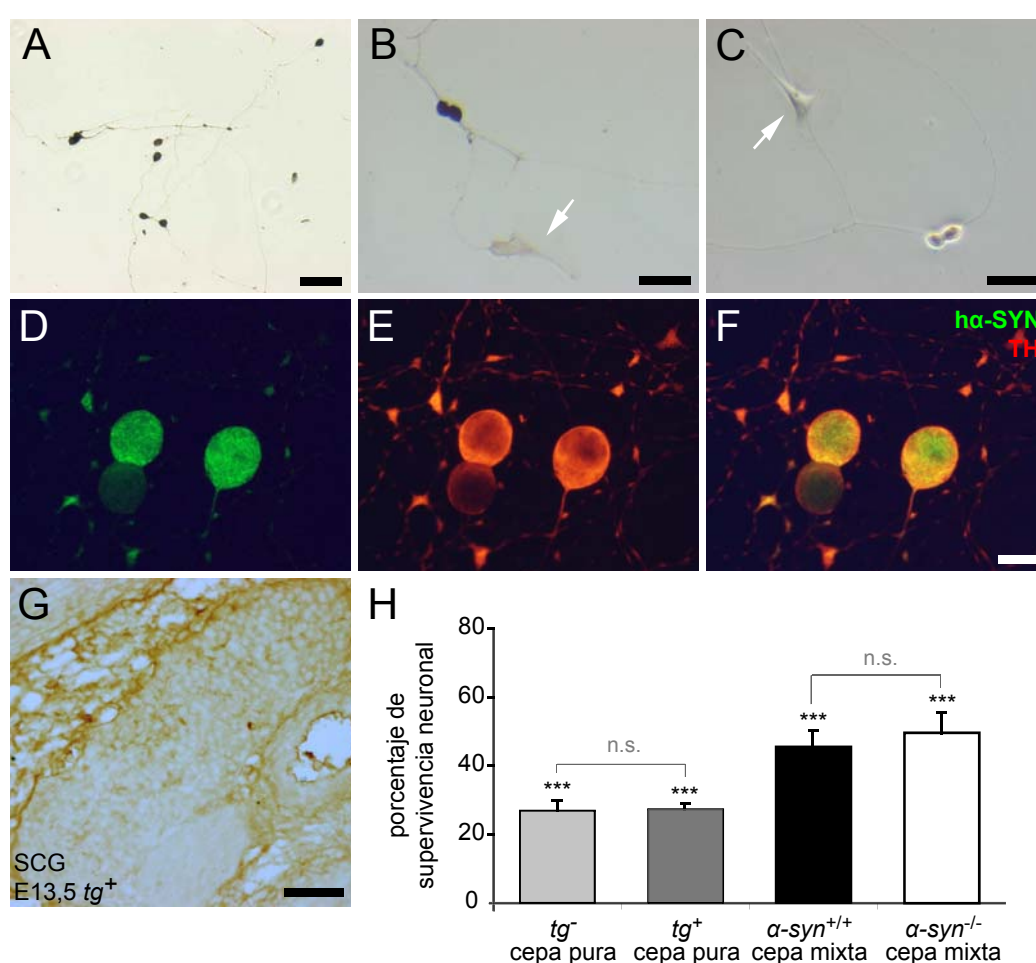


Figura 38. Expresión del transgén de la α -syn humana in vitro e in vivo y supervivencia neuronal tras intoxicación con MPP⁺. Expresión de la α -SYN humana en neuronas simpáticas en cultivo por inmunocitoquímica visible (A-B) y ausencia en células no transgénicas (C) y en glía (flechas en B y C) además de por inmunofluorescencia de α -SYN humana (D) en células embrionarias simpáticas, TH (E) y la imagen combinada (F). Presencia de la α -SYN humana en el SCG (G) de un embrión transgénico de E13,5 por inmunoperoxidasa. La barra de escala es de 50 μ m (A, G), 30 μ m (B, C) y 10 μ m (D-F). (H) Supervivencia neuronal tras intoxicación con MPP⁺ (1 μ M) durante 24 h de neuronas simpáticas E14,5 de animales tg⁻ y tg⁺ y animales α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-}. Se ha representado el porcentaje del número de neuronas vivas tras intoxicación respecto al de no intoxicadas (100%). El MPP⁺ consiguió disminuir significativamente la supervivencia neuronal (***) pero no se encontraron diferencias significativas entre animales de diferente genotipo.

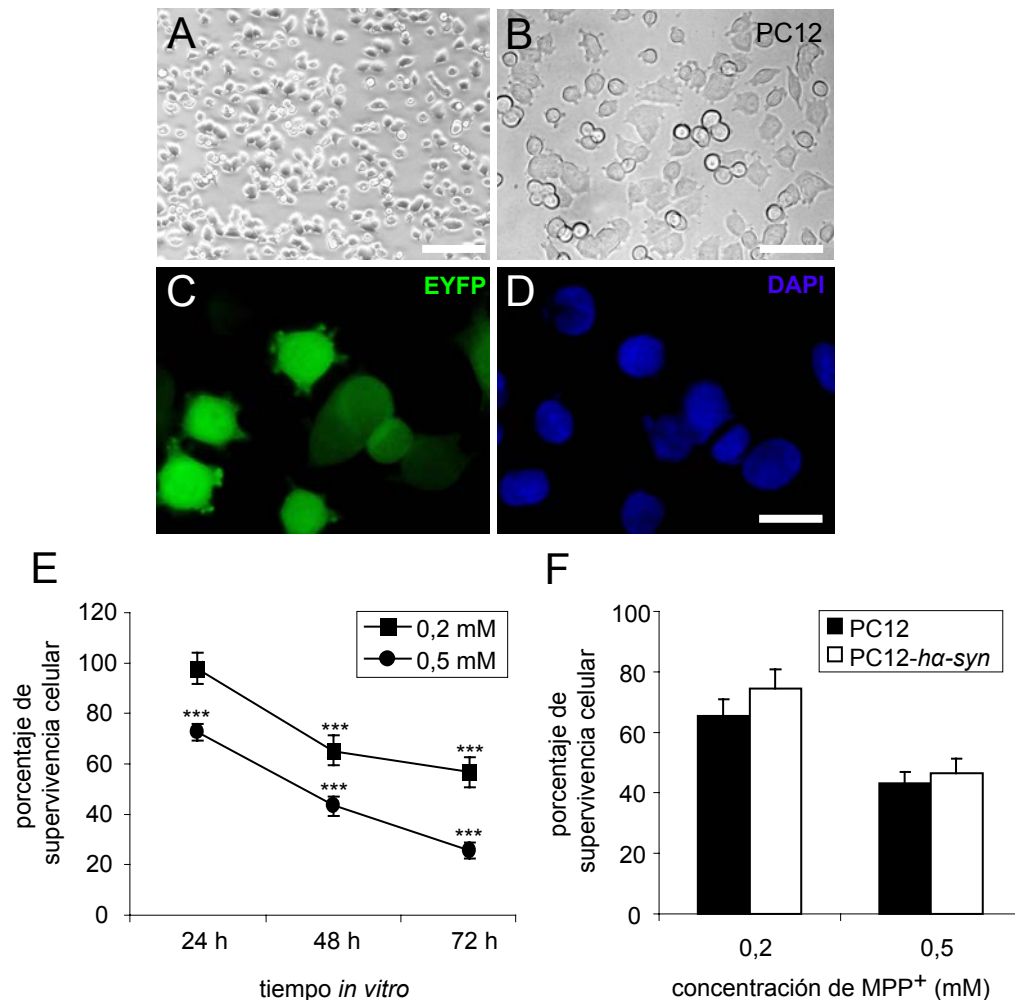


Figura 39. Aspecto de las células PC12 y valores de supervivencia tras tratamiento con MPP⁺. Células PC12 de genotipo salvaje en cultivo por contraste de fases (A, B), con expresión de la proteína EYFP (C) y contraste nuclear con DAPI (D). La barra de escala mide 100 μ m (A), 60 μ m (B) y 20 μ m (C, D). Supervivencia celular tras tratamiento con dos dosis de MPP⁺ a diferentes tiempos en cultivo de PC12 salvajes (E) y a las 48 h entre células PC12 salvajes y PC12 *hα-syn* (F). Todas las condiciones afectaron significativamente la supervivencia celular (***) excepto la dosis de 0,2 mM a las 24 h. No existen diferencias significativas entre las dos cepas de células PC12.

4.4.4. Los niveles de α -SYN no modifican la respuesta del sistema simpático a la intoxicación *in vivo* con MPTP

A fin de analizar si la respuesta del sistema simpático al tóxico MPTP administrado *in vivo* podía estar afectada por la α -SYN se realizó un análisis de inervación simpática cardiaca en animales α -*syn*^{+/+} y α -*syn*^{-/-} tras intoxicación con 200 mg/kg de MPTP (5 dosis de 40 mg/kg, una cada día durante 5 días consecutivos). Esta dosis ya había sido ensayada previamente y se había visto que resultaba eficaz a la hora de afectar los terminales dopaminérgicos en el SNC de estos animales (Miguel Milán, trabajo de tesis doctoral).

Inicialmente se evaluaron diversos parámetros de innervación simpática del corazón de animales de genotipo salvaje expuestos o no al tóxico. Se determinaron los niveles de proteína TH en homogenados de tejido cardíaco mediante *western blot*, normalizados con los valores de la proteína constitutiva GAPDH. Los resultados mostraron que el régimen de intoxicación utilizado no causaba una disminución de los niveles de TH/GAPDH (Figuras 40 A y B). Tampoco los niveles relativos de PGP9.5, como marcador de innervación, se encontraban alterados en los animales intoxicados (datos no mostrados). Consistente con esto, aunque no observamos cambios aparentes en la cantidad de TH (observación cualitativa) en tinciones inmunocitoquímicas de aorta tras intoxicación con MPTP sí que observamos alteraciones en la distribución de la inmunorreactividad para la TH, aunque las observaciones fueron similares entre ambos genotipos (Figura 41).

Como algunos autores mantienen que el tratamiento sistémico con MPTP no produce desinnervación sino tan solo depleción de los niveles de noradrenalina (Kawamura *et al.*, 1999), decidimos evaluar los niveles de noradrenalina cardíaca en los animales intoxicados. La noradrenalina, principal neurotransmisor que emplean las neuronas simpáticas cardíacas (Kaplan *et al.*, 1994), y la determinación de su concentración permitía establecer un índice de la innervación simpática cardíaca. Estos valores de noradrenalina cardíaca fueron medidos mediante HPLC por el Dr. Santiago Ambrosio de la Universidad de Barcelona, a partir de muestras de corazón procedentes de animales inyectados con 200 mg/kg de MPTP o con suero salino, como controles. Los resultados mostraron que la intoxicación con MPTP disminuye significativamente los niveles de noradrenalina cardíaca aunque no cambia los niveles de noradrenalina detectables en la glándula adrenal (Figura 40 C).

Para estudiar la posible implicación de la α -SYN en la respuesta de la noradrenalina cardíaca a la intoxicación se determinaron sus niveles en animales controles e intoxicados de genotipo salvaje y mutante nulo para α -syn. Las determinaciones del nivel de TH en las muestras por *immunoblot*, de nuevo, no reveló cambios detectables entre genotipos ni en los niveles basales de TH ni en los niveles tras intoxicación (Figura 42 A). Cuando se determinaron los niveles de noradrenalina cardíaca se observó que tanto los niveles normales en los animales controles, como los niveles disminuidos por la administración del tóxico, no diferían en los animales de distinto genotipo (Figura 42 B). Para comprobar si la sobreexpresión de α -SYN podía alterar la respuesta, se midió también la noradrenalina cardíaca en animales tg^+ , que sobreexpresaban la α -syn humana bajo el promotor del gen de la TH, y tg^- , sin sobreexpresión del transgén, sin hallarse diferencias significativas entre estos dos genotipos en la respuesta al tóxico (Figura 42 C). Por tanto, estos resultados indican que ni la falta ni la sobreexpresión de α -SYN afectan los niveles de noradrenalina cardíaca tras intoxicación con MPTP.

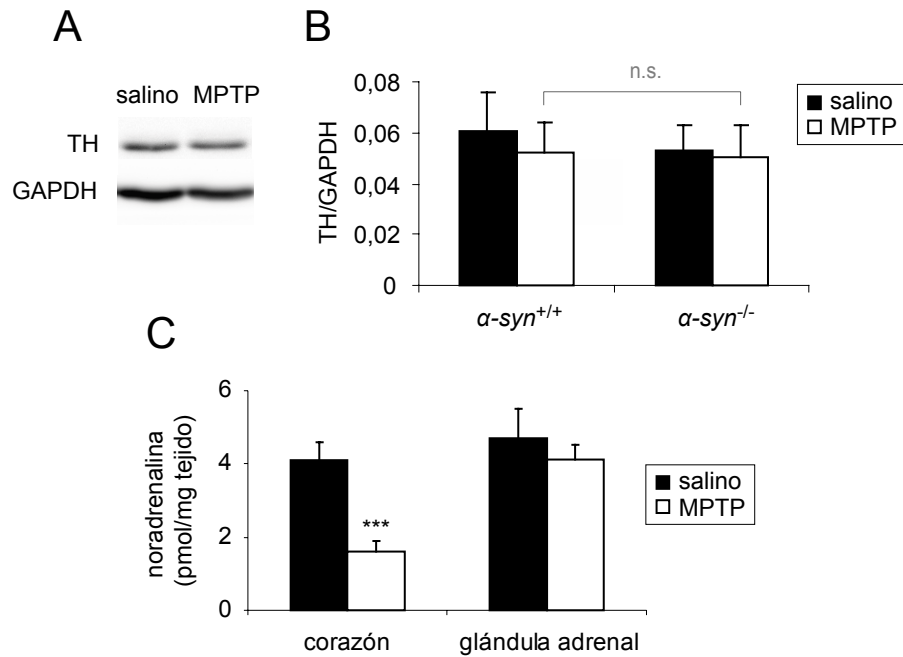


Figura 40. Efectos de la administración de MPTP sobre diferentes tejidos. (A) Detección por *immunoblot* de TH y GAPDH en homogenados de corazón de animales α -syn^{+/+} adultos tras inyección intraperitoneal de 200 mg/kg de MPTP (n = 4) o solución salina (n = 4). (B) Cuantificación de los niveles relativos de proteína TH en animales α -syn^{+/+} (n = 4 salinos, n = 4 MPTP) y α -syn^{-/-} (n = 4 salinos, n = 5 MPTP) salinos e intoxicados sin obtener diferencias significativas (n.s.). (C) Cuantificación de los niveles de noradrenalina expresados en pmol por mg de tejido homogeneizado a partir de corazón o glándula adrenal de animales de genotipo salvaje (n = 3 salinos, n = 6 MPTP). Obsérvese que la noradrenalina cardíaca (***) pero no la cromafín, están afectadas por la intoxicación.

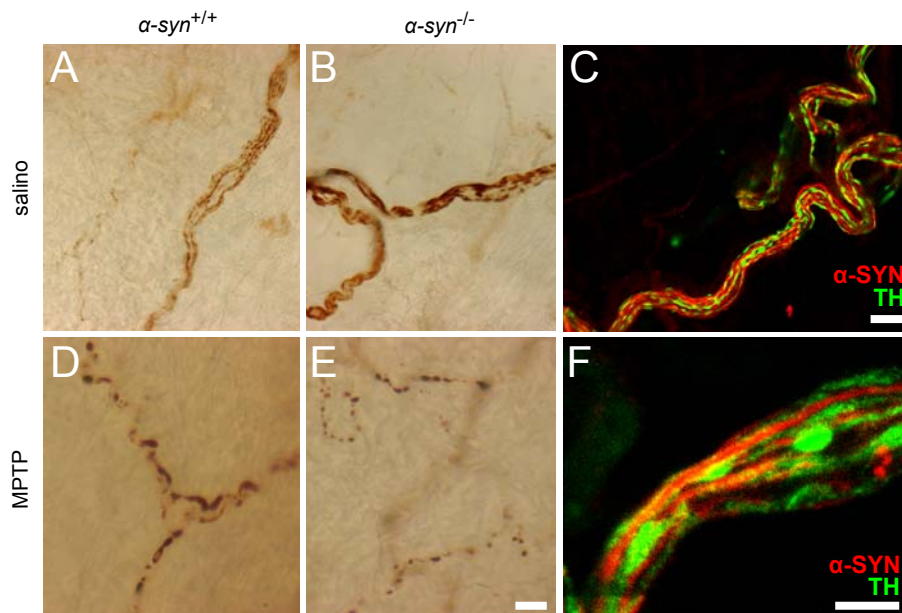


Figura 41. Efecto de la intoxicación con MPTP sobre la inervación simpática de la aorta de ratones adultos. (A, B, D, E) Inmunocitoquímica para TH en aorta de animales α -syn^{+/+} y α -syn^{-/-} controles (salino) y tratados con MPTP. Nótese cómo se altera la distribución de la inmunoreactividad para TH en fibras nerviosas en la condición intoxicada. (C, F) Expresión de α -SYN y TH en nervios simpáticos de la aorta a distintos aumentos obtenida mediante inmunofluorescencia confocal. La barra de escala mide 10 μ m (A-E) y 5 μ m (F).

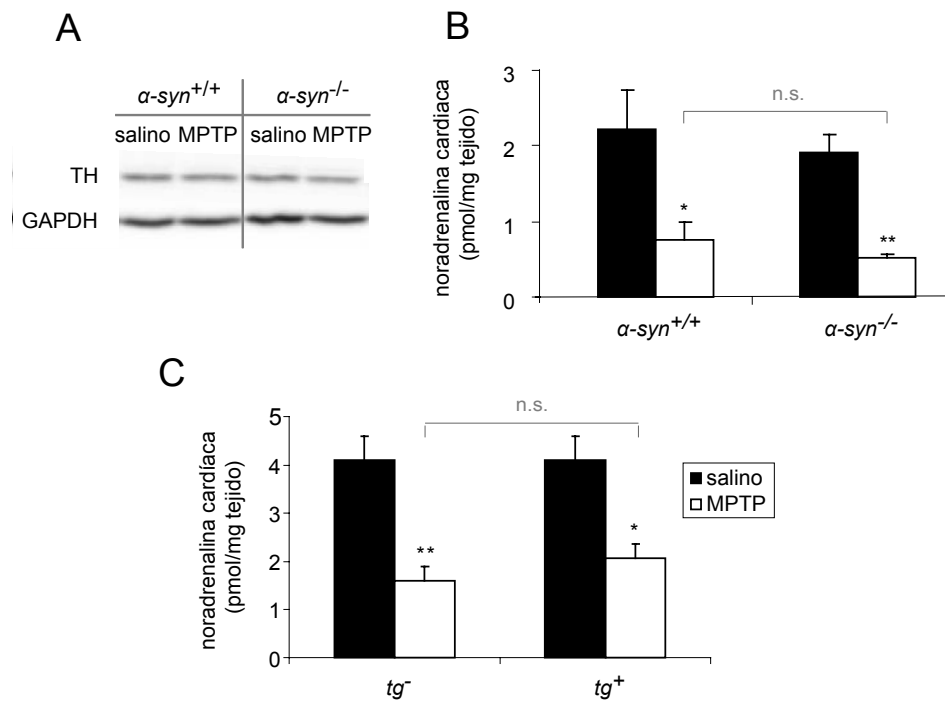


Figura 42. Efecto de la intoxicación con MPTP en innervación y contenido de noradrenalina en corazones de animales de genotipo $\alpha\text{-syn}^{+/+}$, $\alpha\text{-syn}^{-/-}$, tg^{-} y tg^{+} . (A) *Inmunoblot* representativo que muestra los niveles de TH y GAPDH en muestras de corazón de animales $\alpha\text{-syn}^{+/+}$ y $\alpha\text{-syn}^{-/-}$ intoxicados o no con MPTP ($\alpha\text{-syn}^{+/+}$ n = 5 animales salinos, n = 6 MPTP y ($\alpha\text{-syn}^{-/-}$ n = 3 para cada tratamiento), y (B) niveles relativos de noradrenalina cardíaca en ratones adultos de genotipo $\alpha\text{-syn}^{+/+}$ y $\alpha\text{-syn}^{-/-}$ y de (C) animales tg^{-} (n = 3 salinos, n = 6 MPTP) y tg^{+} (n = 3 salinos, n = 4 MPTP) tras administración de 200 mg/kg de MPTP y sus respectivos controles salinos. Los valores de noradrenalina se dan como el promedio obtenido del número de animales indicados \pm SEM. La cantidad de noradrenalina cardíaca resultó significativamente diferente entre condiciones (**p<0,01 y *p<0,05) pero no entre genotipos.

Por tanto, no hemos podido detectar una interacción entre niveles de $\alpha\text{-SYN}$ y respuesta al tóxico parkinsoniano MPP⁺/MPTP en neuronas del sistema simpático, ni en experimentos *in vivo* ni en los ensayos *in vitro*. Estas observaciones contrastan con los efectos beneficiosos que la ausencia de $\alpha\text{-SYN}$ tiene en la respuesta de las neuronas catecolaminérgicas de la *substantia nigra* a MPP⁺/MPTP.

5. DISCUSIÓN

El trabajo de esta tesis partía de la hipótesis de que la α -SYN podría estar implicada en la vulnerabilidad de las neuronas de la subdivisión autonómica del SNP, sobre todo en aquellos paradigmas experimentales que remedan parkinsonismo o que inducen muerte neuronal apoptótica u otras formas de neurodegeneración. Los supuestos en los que se fundamentaba esta hipótesis eran: 1) los paralelismos neuroquímicos de las neuronas simpáticas con otras neuronas catecolaminérgicas, que las hace sensibles a tóxicos como el MPTP/MPP⁺ o la 6-OHDA y 2) las afectaciones autonómicas que se encuentran en enfermos de Parkinson, también en aquellos que muestran alteraciones en α -syn. Nuestro resultado inicial de que, además, la α -syn se expresa abundantemente en estructuras del SNP, desde estadios muy tempranos del desarrollo, contribuyó a reforzar nuestra idea de que esta molécula podría jugar un papel esencial en el SNP, incluso durante la embriogénesis. A pesar de todas las indicaciones previas, los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la eliminación del gen α -syn en ratón no causa ningún fenotipo aparente en el SNP, al menos al nivel de los análisis que hemos realizado. Nuestros mutantes nulos muestran un desarrollo de los ganglios periféricos, de tipo simpático y sensorial, aparentemente normal y las neuronas periféricas aisladas y cultivadas *in vitro* no responden a los factores neurotróficos, ni a la inhibición farmacológica de las rutas de señalización intracelular activadas a partir de sus receptores, de manera distinta a las neuronas competentes para α -syn, ni en cuanto a supervivencia ni en cuanto a crecimiento neurítico. Además, los estímulos que causan apoptosis en estas neuronas, tales como compuestos genotóxicos o tóxicos mitocondriales como el MPP⁺, tampoco parecen causar un efecto distinto, en cuanto a supervivencia, en neuronas que no expresan α -syn frente a sus equivalentes de genotipo salvaje. En este trabajo nos hemos detenido más en el análisis de la respuesta de las neuronas simpáticas al tóxico MPTP/MPP⁺, por los supuestos que antes hemos mencionado. En el caso de este tóxico, hemos estudiado la respuesta *in vitro* de neuronas simpáticas, tanto embrionarias como postnatales, sin encontrar una mayor o menor vulnerabilidad dependiente de genotipo. Dado que las alteraciones en funciones autonómicas que se encuentran en enfermos de Parkinson posiblemente no están causadas por una muerte de las neuronas simpáticas, sino por alteraciones en la inervación, analizamos también si, en ausencia de α -SYN, la inyección *in vivo* de MPTP alteraba de forma diferencial la inervación y los niveles de noradrenalina cardíacos, aunque tampoco encontramos diferencias entre genotipos. Tampoco un aumento de los niveles de α -SYN, como el que se encuentra en neuronas simpáticas obtenidas de nuestros ratones transgénicos para el cDNA de α -syn humana bajo el control del promotor de la TH, supuso ningún cambio en vulnerabilidad frente al MPTP/MPP⁺, ni *in vitro* ni *in vivo*. El único cambio estadísticamente significativo que hemos detectado en este trabajo ha sido una respuesta de supervivencia diferencial de las neuronas deficientes para α -SYN frente al bloqueo farmacológico del enzima PKC δ , aunque el cambio es relativamente pequeño.

Los datos derivados de nuestro estudio de la expresión de la α -syn indican que se trata de una proteína de expresión temprana en el desarrollo embrionario, y que se localiza inicialmente en el citoplasma y el axón de las neuronas jóvenes, mientras están creciendo sus proyecciones. Pero lo que más llamó nuestra atención fue la fuerte expresión en neuronas periféricas, tanto simpáticas como sensoriales, de embriones de ratón sugeriendo de que la α -SYN podría jugar un papel en el desarrollo de estas estructuras (ver, también, Ninkina *et al.*, 2003). Además, poco antes del inicio de esta tesis, se describió que la sobre-expresión de α -syn humana en neuronas nodosas en cultivo, transducidas mediante microinyección, causaba un aumento en la apoptosis, un efecto que no era suprimido por la expresión simultánea de Akt activa, pero sí por Bcl_{X_L}, una molécula pro-supervivencia neuronal de la familia de los Bcl-2 (Saha *et al.*, 2000). A pesar de la abundante expresión de la molécula y del efecto descrito en neuronas nodosas, nuestro análisis histológico de los ganglios SCG y NOD no reveló ninguna diferencia aparente entre animales α -syn^{-/-} y α -syn^{+/+} durante la embriogénesis. Durante la realización de este trabajo, se publicaron dos trabajos sobre descripciones de otras estructuras del SNP en estos y otros mutantes de la familia de las sinucleínas en los que también se describía una ausencia de fenotipo periférico (Ninkina *et al.*, 2003; Papachroni *et al.*, 2005). En la misma cepa de ratones que la nuestra se ha comprobado que no hay déficit en el número de neuronas sensoriales a nivel de los ganglios sensoriales espinales y que neuronas disociadas de ganglio trigémino no muestran diferencias, en cuanto a supervivencia en cultivo, al compararlas con las de genotipo salvaje (Ninkina *et al.*, 2003; Papachroni *et al.*, 2005). En uno de estos estudios también se analizó el posible papel de la γ -SYN (BCSG1/persina) en el desarrollo del SNP. Esta otra sinucleína muestra un grado de similitud aminoacídica con la α -SYN bastante elevado en la región de las repeticiones KTK del extremo N-terminal y propiedades similares a las de la α -SYN en cuanto a presentar un estado conformacional desplegado en soluciones fisiológicas, una unión reversible a vesículas lipídicas y una localización eminentemente presináptica (Buchman *et al.*, 1998; Lavedan *et al.*, 1998; Tiunova *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 2007). En mutantes dobles para estas dos sinucleínas tampoco se encontraron alteraciones en el desarrollo y viabilidad de neuronas periféricas sensoriales (Papachroni *et al.*, 2005). La explicación más sencilla para nuestros resultados y los de otros grupos es que, a pesar de los elevados niveles de expresión en el SNP, la α -SYN no es esencial para el desarrollo y funcionalidad de neuronas sensoriales o simpáticas. Una posibilidad alternativa es que la α -SYN tenga funciones vitales y que, por tanto, se hayan desarrollado mecanismos de protección compensatorios de su posible pérdida. No hay que olvidar que existen tres sinucleínas en vertebrados, que comparten algunas similitudes estructurales y de función (Lavedan *et al.*, 1998), pero que ningún laboratorio ha generado un mutante triple para los tres genes.

A pesar de la falta de fenotipo en condiciones de desarrollo normal, el hecho de que alteraciones en α -SYN puedan conducir a una disfunción de las neuronas simpáticas adultas en humanos nos indujo a evaluar la funcionalidad de las neuronas autonómicas deficientes en α -SYN en condiciones de estrés celular. En este trabajo hemos empleado varias situaciones de estrés celular, inicialmente en cultivo, consistentes en la privación trófica, el empleo de moléculas que causan apoptosis por inducción de daño genotóxico y, por último, el uso de MPP⁺, por razones obvias en el contexto de la EP y porque nos servía como agente que induce daño celular por aumento del estrés oxidativo. Todos estos estímulos pueden evocar apoptosis en neuronas simpáticas aunque las vías apoptóticas activadas en cada caso no son necesariamente las mismas, a pesar de que compartan muchos elementos moleculares comunes (Park *et al.*, 1998). La razón, por tanto, de analizar cada uno de ellos en neuronas deficientes para α -syn era averiguar si alguno de los estímulos apoptóticos específicos ponía de manifiesto la actuación de esta molécula. No hay que olvidar que la α -SYN ha sido implicada en procesos de apoptosis en diversos sistemas celulares experimentales, aunque no está claro si como protectora o facilitadora del proceso de muerte celular. Así, por ejemplo, en algunas líneas celulares la sobreexpresión de α -SYN parece disminuir la respuesta apoptótica dependiente de p53 (da Costa *et al.*, 2002) o protege de estrés oxidativo mediante, por ejemplo, la inactivación de la quinasa JNK o la activación de ruta PI3-quinasa/Akt (Seo *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2002; Manning-Bog *et al.*, 2003) mientras que, en otras, la sobreexpresión de la α -syn humana causa disfunción mitocondrial, aumento del estrés oxidativo y mayor vulnerabilidad celular a la toxicidad por dopamina (Zhang *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 2001; Junn y Mouradian, 2002). En este contexto, se ha observado que la falta de α -SYN en neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral parece proteger a estas neuronas del daño causado por MPTP (Dauer *et al.*, 2002; Schlüter *et al.*, 2003; Drolet *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2004; Klivenyi *et al.* 2006; Miguel Milán, trabajo de tesis doctoral. A pesar de todos estos datos, nosotros no hemos encontrado ninguna diferencia entre genotipos en los paradigmas experimentales de inducción de apoptosis analizados, ni en los cultivos de neuronas simpáticas embrionarias ni en los de postnatales. Dado que las mutaciones en humanos causan la neurodegeneración por una ganancia de función, podría ser que un fondo nulo no alterase necesariamente los procesos de apoptosis. Aun así, tampoco hemos observado afectación diferencial frente al tóxico MPP⁺ en neuronas simpáticas embrionarias transgénicas para el gen de la α -syn humana, si bien es cierto que, en este caso, puede ser que los niveles de expresión no sean suficientes o que fuese necesario sobre-expresar formas mutadas del gen.

Para analizar la respuesta de las neuronas simpáticas a un paradigma de privación trófica cultivamos las neuronas procedentes de SCG embrionarios con NGF y/o NT-3 y las de SCG postnatales con NGF. Los estudios clásicos de dependencia neurotrófica de las neuronas

simpáticas ya habían demostrado hacía tiempo que las neuronas simpáticas obtenidas de neonatos o de animales postnatales tempranos dependían enteramente de NGF para sobrevivir en cultivo (Chun y Patterson, 1977). Diversos trabajos publicados a principios de los 90 habían indicado, además, que los neuroblastos simpáticos eran dependientes de NT-3 para su supervivencia (DiCicco-Bloom y Black, 1988; Dechant *et al.*, 1993; DiCicco-Bloom *et al.*, 1993; Verdi y Anderson, 1994). Esta dependencia neurotrófica de los precursores simpáticos descrita *in vitro* parecía apoyada por los estudios sobre la dinámica en el patrón de expresión de los receptores quinasa para las neurotrofinas (Birren *et al.*, 1993; Wyatt y Davies, 1995). TrkC, principal receptor para NT-3, se expresa en los precursores simpáticos en división y su expresión desciende hasta niveles casi indetectables hacia el nacimiento (Barbacid, 1994; Bothwell, 1995), mientras que el mRNA que codifica para TrkA, principal receptor para NGF, se detecta a partir de E13,5 en el ratón y aumenta hacia el nacimiento (Birren *et al.*, 1993; DiCicco-Bloom *et al.*, 1993; Wyatt y Davies, 1995; Fagan *et al.*, 1996; Wyatt *et al.*, 1997). Así, el modelo que se propuso era que las neuronas simpáticas responderían a NT-3, a través de TrkC, durante las primeras fases de desarrollo de los ganglios, mientras que en etapas posteriores del desarrollo lo harían a NGF a través de TrkA (Birren *et al.*, 1993). El análisis de los mutantes nulos para estas neurotrofinas y sus receptores probó que, efectivamente, ambas neurotrofinas eran esenciales a lo largo del desarrollo para tener un complemento neuronal normal en los ganglios simpáticos pero, contrariamente a lo predicho, no lo eran de forma secuencial. Así, ratones deficientes de *ngf* tienen una reducción del 80% en el volumen del ganglio simpático (Crowley *et al.*, 1994), y la deficiencia en *nt-3* causa una reducción del 50% del número de neuronas en el SCG (Ernfors *et al.*, 1994; Fariñas *et al.*, 1994), pero estas deficiencias se producen de forma casi simultánea (Francis *et al.*, 1999). Para comprender como se produce esta situación es necesario tener en cuenta el fenotipo de los mutantes de los receptores. Así, ratones mutantes nulos para *TrkA* carecen totalmente de neuronas en el ganglio SCG (Smeyne *et al.*, 1994; Fagan *et al.*, 1996) mientras que el número de neuronas no se ve alterado tras la deficiencia en el dominio quinasa del receptor de *TrkC* (Fagan *et al.*, 1996) o de todo el receptor *TrkC* (Tessarollo *et al.*, 1997). Por tanto, NGF y NT-3 son esenciales para mantener la supervivencia de las mismas neuronas actuando sobre el receptor TrkA aunque algunas neuronas simpáticas sólo dependen de NGF (Francis *et al.*, 1999). Se ha demostrado también que la respuesta mediada por TrkA a cada una de las dos neurotrofinas depende de p75 (Brennan *et al.*, 1999). En nuestros experimentos, realizamos cultivos de neuronas simpáticas embrionarias en un momento en el que el ganglio presenta tanto expresión de TrkC como ciertos niveles de TrkA, lo que podría explicar la respuesta similar en supervivencia que observamos tras exposición a NT-3, NGF o ambas. La falta de aditividad de las curvas para cada una de las neurotrofinas sugiere que ambas actúan sobre la misma población de neuronas. En concordancia, además, hemos mostrado que la

supervivencia de una buena parte de las neuronas simpáticas inmaduras o precursores simpáticos en cultivo procedentes de animales E14,5 es independiente de NGF y NT-3.

Nuestros resultados indican que la falta de α -SYN no hace más vulnerables a las neuronas simpáticas frente a un paradigma de privación trófica. El genotipo tampoco modificó la curva de dosis-respuesta de la supervivencia de las neuronas nodosas cultivadas en presencia de distintas concentraciones de BDNF. Resultados similares han sido obtenidos por Stefanis *et al.* (2004). Por otro lado, la inhibición de la vía PI3K/Akt (Patapoutian y Reichardt, 2001) no modificó la supervivencia de las neuronas carentes de α -SYN respecto de las salvajes. Un trabajo reciente ha descrito resultados equivalentes en neuronas sensoriales postnatales aisladas de ratones dobles mutantes nulos α -syn/ γ -syn en las que se observó que la carencia de α -SYN tampoco se traduce en una supervivencia alterada tras inhibición de las vías PI3K/Akt o JNK (Papachroni *et al.*, 2005). Por tanto, la α -SYN no parece ejercer ningún papel ni pro- ni antiapoptótico en la supervivencia de las neuronas simpáticas tras la privación trófica.

Como comentábamos anteriormente, la única diferencia entre neuronas de distinto genotipo para α -syn encontrada fue una respuesta de supervivencia diferencial frente a la inhibición farmacológica de la PKC δ , aunque tan sólo en las neuronas simpáticas maduras. A pesar de que la diferencia entre genotipos era muy moderada, la significación sugiere que, de alguna manera, un fondo nulo para α -syn altera el estado de este enzima. Las proteínas quinasas C de tipo serina/treonina (PKC) regulan distintos procesos celulares, incluidos el crecimiento celular, la neuritogénesis o la apoptosis, tanto como moléculas anti-apoptóticas como pro-apoptóticas (Brodie y Blumberg, 2003; Jackson y Foster, 2004). La familia comprende al menos a 12 isoformas distintas, que comparten un dominio catalítico común pero que difieren en su regulación (Nishizuka, 1992; Dempsey *et al.*, 2000). Según esta regulación, las PKCs se dividen en tres grupos: convencionales, nuevas y atípicas. Las isoformas convencionales (PKC α , β I, β II, γ) son sensibles a Ca^{2+} y diacilglicerol (DAG) mientras que las nuevas (PKC δ , ϵ , η , θ , μ) son independientes de Ca^{2+} pero requieren DAG para su activación. Las isoformas atípicas (PKC λ I, ζ), por su parte, no requieren ni Ca^{2+} ni DAG y son reguladas por proteólisis o fosforilación (Jaken, 1996; Gschwendt, 1999).

La PKC δ pertenece al grupo de las PKCs nuevas y tiene efectos en proliferación, induciendo parada de ciclo al inhibir la expresión de ciertas ciclinas, así como en supervivencia y en crecimiento neurítico (Watanabe *et al.*, 1992; Mischak *et al.*, 1993; Fukumoto *et al.*, 1997; Battaini, 2001). En el caso de la activación de TrkA por NGF, PLC γ se une a la tirosina fosforilada Y785 y se activa, hidrolizando fosfoinositol-4,5-bisfosfato para producir DAG e inositol-3-fosfato que a su vez activan a las PKCs (Loeb *et al.*, 1994; Pierchala *et al.*, 2004). La

activación de PKC δ en este contexto se había asociado clásicamente con la emisión de neuritas por parte de células PC12 en respuesta a NGF (Obermeier *et al.*, 1994; Stephens *et al.*, 1994). La implicación de PKC δ en supervivencia mediada por NGF en neuronas simpáticas se ha descrito recientemente (Pierchala *et al.*, 2004). Así, la activación por ésteres de forbol es capaz de rescatar la muerte de neuronas simpáticas privadas de NGF y parece ser que las PKCs activadas por la acción de la neurotrofina cooperan con la vía PI3K/Akt para promover la supervivencia de las neuronas simpáticas, inhibiendo entre las dos la fosforilación del factor de transcripción pro-apoptótico c-jun (Pierchala *et al.*, 2004). En relación con la α -SYN, se ha descrito que ésta puede inhibir múltiples actividades enzimáticas (Jenco *et al.*, 1998; Iwata *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2002). Se conoce que la α -SYN interacciona con PKC δ y que inhibe su actividad (Ostrerova *et al.*, 1999; Kaul *et al.*, 2005).

A nivel molecular, se piensa que la estimulación de PKC δ , a partir de la acción de PLC γ , modula la supervivencia por su acción sobre la activación de diferentes moléculas corriente arriba de MEK en la vía Ras/Raf/MEK/MAPK. Está descrito que la activación de la vía de las MAPK por parte de PKC δ tiene lugar en diferentes puntos, a) corriente arriba de Ras (Keshamouni *et al.*, 2002), b) corriente abajo de Ras pero corriente arriba de Raf (Ueda *et al.*, 1996), y c) corriente abajo de Raf pero corriente arriba de MEK (Corbit *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2001), aunque se desconocen los mecanismos específicos (ver Jackson y Foster, 2004) y si estas activaciones tendrían lugar en nuestras condiciones y tipos celulares. En el trabajo de Keshamouni *et al.* (2002) se muestra que la activación extracelular por estrógenos en una línea celular se traduce en la activación intracelular de las ERK1/2 mediada por PKC δ que se localizaría corriente arriba de Ras, pero no se menciona si tendría lugar de modo directo o no. Aunque en el trabajo de Ueda *et al.* (1996) se observa que PKC δ está implicada en la señalización con un éster de forbol (TPA) y la consiguiente activación intracelular de Raf/MEK/ERK e independiente de Ras, se desconoce si PKC δ activaría directamente a Raf. En el trabajo de Corbit *et al.* (1999) se muestra que la activación de la vía de supervivencia de las MAPK/ERK tras un estímulo como el factor neurogénico NGF requiere de PKC δ (Corbit *et al.*, 1999; ver Patapoutian y Reichardt, 2001). En este trabajo se observa que la inhibición de PKC δ , con rottlerina u oligonucleótidos, consigue eliminar la activación a MEK (MAPK quinasa) y ERK (o MAPK) inducida por NGF, sin eliminar la activación de ERK por MEK. Sin embargo, no está descrito el mecanismo por el cual PKC δ regularía la activación de MEK. En este mismo trabajo, se barajan posibles mecanismos de activación como la a) fosforilación directa de MEK por PKC δ , b) la fosforilación indirecta a través de un mecanismo como la inactivación de fosfatasa mediada por PKC δ o c) la actuación de PKC δ como proteína de anclaje que condujera a MEK y su activación a la localización celular apropiada. Se ha comprobado también que PKC δ puede activar indirectamente las ERKs, fosforilando a RasGRP3, factor intercambiador de Ras/Rap1

(Brodie *et al.*, 2004), y de ahí que una inhibición de PKC δ podría conducir a una ausencia de activación de la cascada de las ERKs disminuyendo la supervivencia celular. También se ha visto que PKC δ actúa sobre las otras MAPK, inhibiendo a SAP-K/JNK (Morino *et al.*, 2001) y activando a p38 MAPK (Ryer *et al.*, 2005), las cuales forman parte de vías apoptóticas que se activan ante diferentes tipos de estrés. Alternativamente, se podría plantear que PKC δ y α -SYN regularan su acción sobre una misma molécula que a su vez activara la vía Ras/Raf/MEK/MAPK. Este es el posible caso de la fosfolipasa D2 (PLD2), cuya acción es inhibida por la α -SYN (Jenco *et al.*, 1998) y es fosforilada y activada por PKC δ (Lee *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2002). Aplicado a nuestro caso de las neuronas simpáticas salvajes en la situación donde PKC δ está inhibida, ésta no activaría a PLD2 ni esta a su vez a la vía de las MAPK, acción reforzada por la presencia de α -SYN que inhibiría PLD2 y ésta no activaría (tanto) la vía de las MAPK y de ahí el descenso en supervivencia. El rescate en supervivencia visto en las neuronas α -syn^{-/-} con la PKC δ inhibida se explicaría al contrarrestarse las acciones de PKC δ y α -SYN sobre la PLD2 por lo que la PLD2 podría mediar la traslocación de la Raf-1 a la membrana plasmática y activar la vía de las MAPK, tal y como ya ha sido descrito (Rizzo *et al.*, 1999). A pesar de todas estas observaciones, es posible que el efecto diferencial que observamos nosotros no tenga que ver con la activación de la vía MEK/MAPK, ya que el trabajo de Papachroni *et al.* (2005) muestra que neuronas sensoriales postnatales carentes de α -syn/ γ -syn se comportan de manera equivalente a las salvajes tras la inhibición farmacológica de MEK. Aun así, no pueden descartarse diferencias a este nivel en cuanto al tipo celular.

La PKC δ está claramente implicada en el efecto del NGF sobre los procesos de diferenciación de células PC12 (O'Driscoll *et al.*, 1995), así como en el efecto diferenciador pero no mitogénico del FGF en células hipocámpales (Corbit *et al.*, 1999). De forma más específica, la inducción de la neuritogénesis, al menos en células de neuroblastoma, parece ser dependiente de la subunidad reguladora del enzima y no de su actividad quinasa, por su acción negativa sobre RhoA (Ling *et al.*, 2004). Algunos trabajos han indicado, además, que la propia α -SYN podría regular el crecimiento neurítico. Así, células de la línea neuronal de rata B103 transfectadas con α -syn humana muestran una reducción del crecimiento neurítico asociado a alteraciones en adhesión (Takenouchi *et al.*, 2001; Tsuboi *et al.* 2005). Por otro lado, existen numerosos trabajos que sugieren una relación funcional, al menos en cuanto a causas de neurodegeneración, entre α -SYN y la proteína tau de estabilización de microtúbulos, y se ha descrito que la α -SYN estimula la fosforilación de residuos específicos de serina de tau por PKA (Jensen *et al.*, 1999). Además, la γ -SYN es capaz de modular la integridad del citoesqueleto neuronal ya que incrementa la susceptibilidad de ciertas subunidades de neurofilamentos a la proteólisis (Buchman *et al.*, 1998). A nivel subcelular se observa una desestabilización del tráfico dependiente de los microtúbulos (Lee *et al.*, 2006) mientras que a nivel molecular se observa un

aumento de la expresión de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) mediando este crecimiento neurítico alterado (Hashimoto *et al.*, 2003). Todos estos datos nos llevaron a investigar si nuestras neuronas deficientes para α -syn tenían un crecimiento neurítico alterado. Realizamos experimentos de medidas en neuronas fijadas e incluso medidas en neuronas durante las primeras fases de extensión de neuritas mediante video-microscopía y no observamos diferencias en extensión de neuritas entre neuronas de distinto genotipo. También utilizamos el inhibidor de la PKC δ , rottlerina, que tenía un efecto diferencial en la supervivencia de las neuronas simpáticas postnatales, y estudiamos el crecimiento de las neuritas. Aunque observamos una reducción del crecimiento en presencia del inhibidor en un ensayo preliminar (alrededor de un 25% de reducción a las 2 h con 1 μ M rott), esta reducción era la misma independientemente del genotipo de la neurona. Estos datos no han sido mostrados en los *Resultados* de la tesis ya que fueron realizados con neuronas embrionarias, en las que no habíamos detectado efectos en supervivencia mediada por PKC δ , pero sugieren que la falta de α -SYN no modula el papel de PKC δ en neuritogénesis. Este resultado estaría de acuerdo con la observación de que el tratamiento de la línea B103 con el éster de forbol PMA no restaura la extensión neurítica en las células que sobreexpresan α -syn humana (Takenouchi *et al.*, 2001). También utilizamos el inhibidor de la quinasa asociada a Rho (ROCK) con el mismo resultado, esto es, que las células redujeron su crecimiento neurítico en etapas iniciales (13% reducción, 2 h, 1,6 nM) pero sin diferencias entre genotipos. En conclusión, y a pesar de los datos previos en la bibliografía, nosotros no hemos observado ningún efecto de la falta de α -SYN en la morfología, crecimiento o adhesión de nuestras neuronas.

Hemos analizado especialmente el papel de la α -SYN en un modelo donde se afecta la supervivencia de las neuronas catecolaminérgicas tras intoxicación con MPP⁺. Nuestros resultados muestran que este neurotóxico entra selectivamente en la neurona simpática a través del transportador de noradrenalina, como ya había sido descrito en neuronas simpáticas de pollo utilizando una aproximación farmacológica de bloqueo del NAT similar a la nuestra (Bhave *et al.*, 1996) y que las neuronas simpáticas son muy sensibles a este tóxico si se las compara con las clásicas dopaminérgicas de la SN. En nuestros experimentos también hemos comprobado que las neuronas simpáticas embrionarias son mucho más sensibles al MPP⁺ que las postnatales. No está claro a que puede ser debida la diferencia pero en experimentos con MPP⁺ en cultivos de neuronas simpáticas de pollo se comprobó que con el tiempo *in vitro* las neuronas desarrollaban una resistencia al fármaco que, en ese caso, parecía ser debida a un aumento en los niveles de glutatión, aunque también se ha propuesto que neuronas maduras, con mayores niveles de transportadores vesiculares del tipo VMAT2 serían más resistentes a las acciones del MPP⁺ al secuestrar un mayor número de moléculas del neurotóxico al interior de las vesículas sinápticas

y reduciendo así los niveles que alcanzan la mitocondria (Bhave *et al.*, 1996). Es posible que neuronas ontogenéticamente más maduras sean más resistentes por la misma razón.

En nuestro estudio hemos comprobado como la falta o la sobreexpresión de α -SYN en neuronas simpáticas en cultivo no se traduce en una supervivencia neuronal alterada respecto de las neuronas salvajes tras intoxicación con MPP⁺. Esto contrasta con los resultados obtenidos en supervivencia de neuronas del SNC tras intoxicación con MPTP *in vivo* y con MPP⁺ en cultivo. Neuronas dopaminérgicas de la SN de diferentes cepas de ratones de genotipo mutante nulo para α -syn muestran tanto resistencia total (Dauer *et al.*, 2002) como parcial (Schlüter *et al.*, 2003; Drolet *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2004; Klivenyi *et al.* 2006; Miguel Milán, trabajo de tesis doctoral) a la intoxicación con MPTP. Las líneas de ratones transgénicos, sin embargo, han mostrado fenotipos variables. Se ha encontrado tanto una mayor susceptibilidad a la intoxicación con MPTP en ratones que sobreexpresan α -syn en su forma salvaje (Song *et al.*, 2004) o en su forma mutada A30P (Nieto *et al.*, 2006) como un idéntico comportamiento en otros ratones que sobreexpresan la mutación A30P (Rathke-Hartlieb *et al.*, 2001) o la A53T (Dong *et al.*, 2002). Estos resultados tan variables podrían estar relacionados con el nivel de expresión de la α -syn en los animales transgénicos. Así, también en nuestro caso, la observación de que la sobreexpresión de la α -syn humana bajo el control del promotor de la TH no haga más susceptible a la célula simpática se podría explicar porque los niveles sobreexpresados de α -SYN no fueran suficientes.

Se ha visto que ciertas proteínas quinasa podrían jugar un papel importante en los procesos neurodegenerativos (ver trabajo de Gandhi y Wood, 2005), como lo sugieren las mutaciones en el gen *PINK1* y en el gen *LRKK2* en enfermos de EP (Valente *et al.*, 2004; Paisán-Ruiz *et al.*, 2004). PKC δ podría ser un buen candidato implicado en la patología de la EP ya que se expresa abundantemente en cerebro (Leibersperger *et al.*, 1991), particularmente en regiones dopaminérgicas, incluyendo estriado y SNpc (Kanthasamy *et al.*, 2003) y dicha expresión aumenta con la edad (Goldberg y Steinberg, 1996). Diversos estímulos apoptóticos inducen la activación y translocación de PKC δ (Brodie y Blumberg, 2003). De forma más concreta, y con implicaciones para el presente estudio, está el hecho de que diversas toxinas dopaminérgicas, como el MMT, la dieldrina o el MPP⁺ inducen la activación de este enzima por proteólisis (Anantharam *et al.*, 2002; Kaul *et al.*, 2003; Kitazawa *et al.*, 2003). En algunas células en proceso de apoptosis, la PKC δ es hidrolizada por caspasa 3 lo que genera un dominio regulador de 38 kDa (RD) y un fragmento catalítico activo de 40kDa que es capaz de inducir la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la muerte celular (Emoto *et al.*, 1995; 1996; Ghayur *et al.*, 1996). El inhibidor selectivo rottlerina, también utilizado en nuestros experimentos, así como formas dominante/negativas de PKC δ pueden, por el contrario, atenuar

el proceso apoptótico. En estas condiciones se observa además una inhibición de la propia caspasa 3 lo que sugiere la existencia de un bucle regulatorio entre caspasa 3 y PKC δ (Anantharam *et al.*, 2002). En la línea celular dopaminérgica N27, se ha comprobado recientemente que la sobre-expresión de α -syn humana rescata las células de la apoptosis inducida por MPP $^{+}$, atenuando la activación proteolítica de la PKC δ , mientras que la forma mutada A53T aumenta la activación y causa más apoptosis (Kaul *et al.*, 2005). Debido a este contexto, nosotros hemos utilizado el inhibidor rottlerina en combinación con MPP $^{+}$ en nuestros cultivos, aunque los resultados no han sido tampoco incluidos en la sección de *Resultados*, ya que no hemos obtenido ningún cambio significativo. Ni siquiera hemos observado que el tratamiento con rottlerina sea capaz de prevenir la intoxicación de las neuronas simpáticas, como ha sido descrito para líneas celulares dopaminérgicas (Anantharam *et al.*, 2002).

Los enfermos de EP muestran una pérdida de inervación simpática noradrenérgica al corazón detectada mediante ensayos neuroquímicos durante cateterización cardiaca o mediante la visualización de la unión de radioligandos como el ^{123}I -MIBG o la ^{18}F -fluorodopamina. Además, se ha observado una disminución en la inmunorreactividad para TH en muestras de epicardio procedentes de autopsias de enfermos con EP (Orimo *et al.*, 2002; 2003; Goldstein *et al.*, 2003). Los efectos parecen especialmente importantes a nivel del corazón, frente a otros órganos y los cambios en catecolaminas en plasma en pacientes con EP sugieren que en EP con hipotensión ortostática se produce una disfunción de la inervación simpática sin afectación adrenomedular (Goldstein *et al.*, 2003). La misma deficiencia en inervación se ha observado en ratones tratados con MPTP (Takatsu *et al.*, 2000), estudiando el radiomarcage con MIBG, incluso a dosis que no causan parkinsonismo. Otros estudios han mostrado como el MPTP causa una depleción de catecolaminas cardíacas (Wallace *et al.*, 1984; Ambrosio y Mahy, 1989; Fuller *et al.*, 1989). De hecho, tras administración del MPTP, la concentración mayor de MPP $^{+}$ se encuentra en el corazón (Fuller *et al.*, 1988). Esta disfunción causa una reducción en la fuerza y velocidad de la contracción cardíaca (Ren *et al.* 2004). En nuestras intoxicaciones con MPTP no hemos observado cambios en la cantidad total de TH cardíaca aunque sí una redistribución de la misma en las fibras que inervan el corazón y la aorta. En estas mismas condiciones de intoxicación, datos de nuestro laboratorio muestran que tampoco se produce un descenso en los niveles de TH estriatal (Miguel Milán, trabajo de tesis doctoral). Aunque un régimen de intoxicación consistente en la administración de 80 mg/kg en un solo día sí causa disminución de la cantidad total de TH estriatal (Miguel Milán, trabajo de tesis doctoral), este mismo régimen tampoco causa un descenso de TH cardíaca (datos no mostrados). La posibilidad de que la actividad TH esté afectada por el tratamiento con MPTP sin cambios de nivel en la proteína no son descartables y se han descrito en trabajos anteriores, tanto tras el tratamiento con 20 mg/kg de MPTP (Ambrosio y Mahy 1989), como tras tratamiento con 6-OHDA (Kawamura *et al.*, 1999). La

posibilidad alternativa de que la posible desinervación simpática pudiera haberse recuperado tras el régimen tóxico empleado parece descartada, ya que sí que vemos que la cantidad de noradrenalina está disminuida tras la intoxicación. Esto coincide con descripciones previas en ratones adultos en los que la administración de MPTP producía una depleción de noradrenalina y un descenso transitorio en la recaptación del neurotransmisor sin cambios aparentes de inervación (Luthman y Johnson, 1986). En este mismo trabajo se describe como el MPP⁺ sí parece causar una desorganización de las fibras simpáticas que inervan el iris, algo similar a lo que nosotros observamos en el corazón tras la intoxicación con MPTP. En resumen, aunque existe una disfunción en las fibras simpáticas que inervan el corazón no hay cambios aparentes en la cantidad de TH presente en las fibras.

La reducción observada en los niveles de noradrenalina cardiaca en los animales intoxicados puede deberse a una reducción en la síntesis del neurotransmisor o a una liberación/recaptación alterada. Aunque se sabe que el mantenimiento de la noradrenalina en el terminal sináptico se debe principalmente al reciclaje de la noradrenalina liberada más que a la síntesis (ver Eisenhofer *et al.*, 2004), nuestra medida de noradrenalina no permite distinguir entre ellos. Se sabe que el MPP⁺ puede actuar sobre la cadena de transporte electrónico, alterando el equilibrio redox de la célula y consecuentemente el de las enzimas dependientes de este estado. Así por ejemplo, la dopamina- β -hidroxilasa (DBH), enzima tipo oxigenasa que requiere oxígeno molecular y ascorbato como cofactores para catalizar su reacción de dopamina a noradrenalina, podría verse afectada por la intoxicación con el MPP⁺. También una acción que aumentara la actividad de las enzimas que degradan la noradrenalina, como la monoaminaoxidasa B (MAO-B) o la COMT, podría hacer disminuir los niveles de noradrenalina tras la intoxicación. Además de la acción sobre las enzimas de síntesis o de degradación, o indirectamente sobre el estado redox celular, el MPP⁺ podría actuar sobre los sistemas de entrada de la noradrenalina a la célula o de internalización a las vesículas. Así, por ejemplo, Fukumitsu *et al.* (2006) muestran una reducción en noradrenalina cardiaca así como una reducción en la densidad de NAT tras intoxicar roedores con MPTP. También se podría pensar en una entrada de MPP⁺ al terminal sináptico que desplazara la de noradrenalina.

En los últimos años, algunos trabajos han sugerido que alteraciones en el transporte axonal de vesículas sinápticas pueden subyacer a los déficit de diversas enfermedades neurodegenerativas (Mandelkow y Mandelkow, 2002; Hirokawa y Takemura, 2003). La idea es que el bloqueo del transporte axonal sería una causa primaria que iniciaría un proceso degenerativo del axón, distinto al de una apoptosis celular y que, en sus primeras fases causaría disfunción sináptica (Coleman, 2005). En enfermedades neurodegenerativas no son, de hecho, raros los hinchamientos axonales con acúmulos anómalos de moléculas cargo y proteínas del

citoesqueleto, junto con vesículas sinápticas y otros orgánulos. Por ejemplo, ya se ha mostrado para la enfermedad de Alzheimer que estos hinchamientos se encuentran en las fases más iniciales de la enfermedad (Stokin *et al.*, 2005). Este tipo de disfunción axonal privaría a las sinapsis de elementos funcionales y, por tanto, alteraría la fisiología sináptica normal conduciendo, posteriormente, a una degeneración retrógrada del propio axón, en un proceso que recibe el nombre de “*dying back*”, cuyo curso temporal lento encaja con el perfil progresivo de la mayoría de enfermedades neurodegenerativas (Coleman y Perry, 2002; Raff *et al.*, 2002; Mandelkow *et al.*, 2003). En el caso de la EP, se puede observar daño axonal y visualización de neuritas distróficas de Lewy, con acúmulos anormales de α -SYN monomérica o agregada (Duda *et al.*, 2002). También, en el mutante *gad* (*gracile axonal dystrophy*), los axones motores degeneran progresivamente hasta causar una parálisis completa del animal (Mukoyama *et al.*, 1989) y esta mutación espontánea consiste en una delección del gen *UCHL1* (Saigoh *et al.*, 1999), uno de los genes cuyas mutaciones causan EP en humanos. Aunque no existe consenso en cuanto a la secuencia de eventos que conduce a la disfunción neuronal en la EP, los estudios de neuroimagen sugieren que la pérdida de terminales sinápticos precede a la pérdida neuronal en la SN (Bernheimer *et al.*, 1973). En este contexto, podemos reevaluar las acciones del MPTP. Este tóxico, o su metabolito activo MPP^+ , ha sido considerado, clásicamente, como un agente que induce muerte neuronal a través de su acción sobre la mitocondria, lo que conduciría a la producción de especies reactivas de oxígeno que, directa o indirectamente, causarían apoptosis dependiente de caspasas (Viswanath *et al.*, 2001; Kaul *et al.*, 2003). En este modelo tóxico celular se han descrito alteraciones en moléculas relacionadas con el proceso de apoptosis, como Bcl-2, MAP quinasas o PARP (Choi *et al.*, 1999; Mandir *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2001) y, más recientemente, la activación de PKC δ por proteólisis mediada por caspasa 3 (Anantharam *et al.*, 2002; Kaul *et al.*, 2003; Kitazawa *et al.*, 2003). En el contexto de neuronas en cultivo tratadas con MPP^+ éste es, posiblemente, el mecanismo por el cual se produce la muerte de las neuronas afectadas. Ahora bien, en un individuo adulto, el MPTP puede causar efectos en la liberación de neurotransmisores sin aparente afectación del número de neuronas. Muy recientemente se ha comprobado que la inyección directa de MPP^+ en la sinapsis gigante del calamar interfiere con el suministro de vesículas de neurotransmisor a los terminales sinápticos al modificar significativamente el sistema de transporte axonal rápido (Serulle *et al.*, 2007). La desregulación de la movilidad vesicular produce un incremento en el transporte retrógrado y un descenso en el movimiento anterógrado, lo que supone una reducción neta de la disponibilidad vesicular en el terminal sináptico. Curiosamente, los efectos son revertidos cuando el MPP^+ es coinyectado con inhibidores de caspasas o con PKC δ (Morfini *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que la EP también podría producirse por una desregulación del transporte vesicular necesario para el mantenimiento del extremo más distal del axón. En este sentido, hay que recordar que el MPP^+ /MPTP no produce déficit en adrenalina a nivel de la médula cromafín,

como hemos observado también en el presente estudio, a pesar de que estas células también acumulan MPP⁺ (Reinhard y Daniels, 1992). Quizá, porque en estas células la liberación de adrenalina no depende de transporte axonal.

Teniendo en cuenta que el MPP⁺ puede afectar a las vesículas de neurotransmisor y que la α -SYN parece estar íntimamente asociada a ellas (Lotharius y Brundin, 2002), analizamos la cantidad de noradrenalina cardiaca tras intoxicación en animales α -syn^{-/-} y animales tg⁺ para la α -SYN humana y sus respectivos controles de genotipo salvaje. Encontramos que ni la falta ni la sobreexpresión de α -SYN alteran la cantidad de este neurotransmisor en corazón. En contraste, otros trabajos en los que se analiza la cantidad de dopamina estriatal encuentran una reducción tanto en los animales α -syn^{-/-} (Abeliovich *et al.*, 2000; Cabin *et al.*, 2002) como en los ratones que sobreexpresan la forma salvaje de la α -SYN (Masliah *et al.*, 2000; Richfield *et al.*, 2002; Thiruchelvam *et al.*, 2004). Además, tanto la carencia de la α -SYN como la presencia de la mutación A30P causan una reducción en el número de vesículas de reserva en el hipocampo (Murphy *et al.*, 2000; Cabin *et al.*, 2002; Yavich *et al.*, 2006). Por tanto, es posible que estudios morfológicos y funcionales de liberación de noradrenalina presináptica más detallados en el SNP pudieran revelar diferencias entre animales de diferente genotipo y, consecuentemente, la implicación de la α -SYN en estos mecanismos.

En conclusión, a pesar de la abundante expresión de la α -syn en el SNP de roedores y de las claras afectaciones autonómicas en pacientes con EP esporádico y en aquellos con EP familiar causado por mutaciones en α -syn, nuestros análisis en ratones mutantes nulos para α -syn o que sobreexpresan la forma humana salvaje no revelan ningún fenotipo aparente. No puede descartarse, por supuesto, que otros tipos de análisis distintos a los realizados aquí puedan revelar la implicación de esta molécula en la funcionalidad de las neuronas periféricas.

6. CONCLUSIONES

1. La α -SYN se expresa abundantemente en neuronas de los ganglios del sistema nervioso periférico, tanto de modalidad simpática como sensorial, durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano del ratón. La expresión de α -SYN en estas neuronas no se restringe a las de tipo catecolaminérgico.
2. La α -SYN no es esencial para el desarrollo normal, durante la embriogénesis, de neuronas sensoriales primarias, como las del complejo nodoso-petroso. La falta de α -SYN no altera ni la neurogénesis ni la supervivencia neuronal en este complejo. La falta de α -SYN tampoco afecta el establecimiento de la morfología de estas neuronas ni el crecimiento neurítico.
3. La α -SYN no es esencial para el desarrollo normal, durante la embriogénesis, de neuronas autonómicas de tipo simpático, como las del ganglio cervical superior. La falta de α -SYN no altera ni la neurogénesis ni la supervivencia neuronal en este ganglio. La falta α -SYN tampoco parece afectar el establecimiento de la morfología de estas neuronas ni el crecimiento neurítico.
4. Aunque las neuronas del sistema nervioso periférico deficientes en α -SYN muestran, *in vitro*, curvas de supervivencia dependiente de neurotrofinas con una cinética normal, la actividad de la vía PLC γ 1/PKC δ , pero no la PI3K/Akt, está alterada en las neuronas simpáticas carentes de α -SYN.
5. Las neuronas simpáticas son susceptibles de intoxicación con MPP⁺, que entra en las neuronas a través del transportador de noradrenalina y produce muerte apoptótica dependiente de caspasa 3. La α -SYN no participa en la respuesta *in vitro* de las neuronas simpáticas a la droga parkinsoniana MPP⁺, ya que ni la deficiencia ni la sobreexpresión de α -SYN modifican la supervivencia de las neuronas expuestas a la droga.
6. El tóxico parkinsoniano MPTP administrado *in vivo* causa una depleción de los niveles de noradrenalina cardíaca, pero no causa una disminución de los niveles de adrenalina en la glándula adrenal, indicando que las neuronas simpáticas noradrenérgicas, pero no las células cromafines, son susceptibles de intoxicación con el tóxico. La disminución en noradrenalina cardíaca no se acompaña de una disminución en los niveles de TH aunque sí de una redistribución del enzima en las fibras. La respuesta al tóxico no se altera ni en ratones deficientes nulos para α -syn ni en ratones que sobreexpresan la forma salvaje de la α -syn humana.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25: 239-252.
- Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW (2003) The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54: 283-286.
- Airaksinen MS, Saarma M (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3: 383-394.
- Alam M, Schmidt WJ (2002) Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res* 136: 317-324.
- Albers KM, Wright DE, Davis BM (1994) Overexpression of nerve growth factor in epidermis of transgenic mice causes hypertrophy of the peripheral nervous system. *J Neurosci* 14: 1422-1432.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15: 6541-6551.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* 7: 261-269.
- Alkadhi KA, Hogan YH (1992) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on ganglionic transmission. *J Auton Pharmacol* 12: 15-23.
- Altman J, Bayer SA (1982) Development of the cranial nerve ganglia and related nuclei in the rat. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 74: 1-90.
- Alves dC, Paitel E, Vincent B, Checler F (2002) Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. Abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease. *J Biol Chem* 277: 50980-50984.
- Ambrosio S, Blesa R, Mintenig GM, Palacios-Araus L, Mahy N, Gual A (1988) Acute effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on catecholamines in heart, adrenal gland, retina and caudate nucleus of the cat. *Toxicol Lett* 44: 1-6.
- Ambrosio S, Mahy N (1989) Acute peripheral catecholaminergic changes in rat after MPTP and MPP+ treatment. *Rev Esp Fisiol* 45: 157-161.
- Amino T, Orimo S, Itoh Y, Takahashi A, Uchihara T, Mizusawa H (2005) Profound cardiac sympathetic denervation occurs in Parkinson disease. *Brain Pathol* 15: 29-34.
- Anantharam V, Kitazawa M, Wagner J, Kaul S, Kanthasamy AG (2002) Caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase C δ is essential for oxidative stress-mediated dopaminergic cell death after exposure to methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl. *J Neurosci* 22: 1738-1751.
- Anderson DJ (1999) Lineages and transcription factors in the specification of vertebrate primary sensory neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9: 517-524.
- Anderson DJ, Groves A, Lo L, Ma Q, Rao M, Shah NM, Sommer L (1997) Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62: 493-504.
- Andrew R, Watson DG, Best SA, Midgley JM, Wenlong H, Petty RK (1993) The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem Res* 18: 1175-1177.
- Angeletti PU, Levi-Montalcini R (1970) Sympathetic nerve cell destruction in newborn mammals by 6-hydroxydopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65: 114-121.

- Angeletti PU, Levi-Montalcini R (1971) Growth regulation of the sympathetic nervous system: immunosympathectomy and chemical sympathectomy. *Rev Eur Etud Clin Biol* 16: 866-874.
- Arai K, Kato N, Kashiwado K, Hattori T (2000) Pure autonomic failure in association with human alpha-synucleinopathy. *Neurosci Lett* 296: 171-173.
- Arevalo JC, Wu SH (2006) Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci*.
- Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science* 295: 865-868.
- Axelrod J, HERTTING G, PATRICK RW (1961) Inhibition of H3-norepinephrine release by monoamine oxidase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 134: 325-328.
- Baltic S, Perovic M, Mladenovic A, Raicevic N, Ruzdijic S, Rakic L, Kanazir S (2004) Alpha-synuclein is expressed in different tissues during human fetal development. *J Mol Neurosci* 22: 199-204.
- Baluk P (1995) Structure of autonomic ganglia. In: *Autonomic ganglia* (McLachlan E, ed), pp 13-71.
- Bandopadhyay R, Kingsbury AE, Cookson MR, Reid AR, Evans IM, Hope AD, Pittman AM, Lashley T, Canet-Aviles R, Miller DW, McLendon C, Strand C, Leonard AJ, Abou-Sleiman PM, Healy DG, Ariga H, Wood NW, de Silva R, Revesz T, Hardy JA, Lees AJ (2004) The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain* 127: 420-430.
- Banister R, Mathias CJ (1999) Clinical features and evaluation of the primary chronic autonomic failure syndromes. In: *Autonomic failure: A Textbook of Clinical Disorders of the Autonomic Nervous System* pp 307-316. 4th ed. Oxford University Press, New York.
- Barbacid M (1994) The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25: 1386-1403.
- Barbeau A, Dallaire L, Buu NT, Poirier J, Rucinska E (1985) Comparative behavioral, biochemical and pigmentary effects of MPTP, MPP+ and paraquat in *Rana pipiens*. *Life Sci* 37: 1529-1538.
- Bates G (2003) Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet* 361: 1642-1644.
- Battaini F (2001) Protein kinase C isoforms as therapeutic targets in nervous system disease states. *Pharmacol Res* 44: 353-361.
- Benarroch EE (1997) Overview of the organization of the central autonomic network. In: *Central autonomic network: Functional Organization and Clinical Correlations* pp 3-28. Futura Publishing Company, Inc., Armonk, NY.
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20: 415-455.
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT (2002) Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 24: 308-318.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3: 1301-1306.
- Bhave SV, Johannessen JN, Lash LH, Wakade TD, Wakade AR (1996) Age-dependent sensitivity of cultured peripheral sympathetic neurons to 1-methyl-4-phenylpyridinium: role of glutathione. *J Neurochem* 67: 557-565.
- Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14: 2919-2937.

- Bilen J, Bonini NM (2005) *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annu Rev Genet* 39: 153-171.
- Birren SJ, Lo L, Anderson DJ (1993) Sympathetic neuroblasts undergo a developmental switch in trophic dependence. *Development* 119: 597-610.
- Bohlen und HO (2004) Synucleins and their relationship to Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 318: 163-174.
- Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G, Heutink P (2003) DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* 24: 159-160.
- Borchardt RT, Reid JR, Thakker DR (1976) Catechol O-methyltransferase. 9. Mechanism of inactivation by 6-hydroxydopamine. *J Med Chem* 19: 1201-1209.
- Bothwell M (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* 18: 223-253.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318: 121-134.
- Brady R, Zaidi SI, Mayer C, Katz DM (1999) BDNF is a target-derived survival factor for arterial baroreceptor and chemoafferent primary sensory neurons. *J Neurosci* 19: 2131-2142.
- Brennan C, Rivas-Plata K, Landis SC (1999) The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons in vivo. *Nat Neurosci* 2: 699-705.
- Brodie C, Blumberg PM (2003) Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta. *Apoptosis* 8: 19-27.
- Brodie C, Steinhart R, Kazimirsky G, Rubinfeld H, Hyman T, Ayres JN, Hur GM, Toth A, Yang D, Garfield SH, Stone JC, Blumberg PM (2004) PKCdelta associates with and is involved in the phosphorylation of RasGRP3 in response to phorbol esters. *Mol Pharmacol* 66: 76-84.
- Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory-Slechta DA, Federoff HJ (1999) Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res* 823: 1-10.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-868.
- Buchman VL, Adu J, Pinon LG, Ninkina NN, Davies AM (1998) Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity. *Nat Neurosci* 1: 101-103.
- Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL (2002) Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci* 22: 8797-8807.
- Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfenic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9103-9108.
- Causing CG, Gloster A, Aloyz R, Bamji SX, Chang E, Fawcett J, Kuchel G, Miller FD (1997) Synaptic innervation density is regulated by neuron-derived BDNF. *Neuron* 18: 257-267.
- Chandra S, Chen X, Rizo J, Jahn R, Sudhof TC (2003) A broken alpha -helix in folded alpha -Synuclein. *J Biol Chem* 278: 15313-15318.

- Chandra S, Fornai F, Kwon HB, Yazdani U, Atasoy D, Liu X, Hammer RE, Battaglia G, German DC, Castillo PE, Sudhof TC (2004) Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14966-14971.
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364: 1167-1169.
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH (2006) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 5: 235-245.
- Chen X, de Silva HA, Pettenati MJ, Rao PN, George-Hyslop P, Roses AD, Xia Y, Horsburgh K, Ueda K, Saitoh T (1995) The human NACP/alpha-synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and TaqI RFLP analysis. *Genomics* 26: 425-427.
- Chiba K, Trevor A, Castagnoli N, Jr. (1984) Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 574-578.
- Chiba-Falek O, Touchman JW, Nussbaum RL (2003) Functional analysis of intra-allelic variation at NACP-Rep1 in the alpha-synuclein gene. *Hum Genet* 113: 426-431.
- Choi J, Levey AI, Weintraub ST, Rees HD, Gearing M, Chin LS, Li L (2004) Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem* 279: 13256-13264.
- Choi WS, Canzoniero LM, Sensi SL, O'Malley KL, Gwag BJ, Sohn S, Kim JE, Oh TH, Lee EB, Oh YJ (1999) Characterization of MPP(+)-induced cell death in a dopaminergic neuronal cell line: role of macromolecule synthesis, cytosolic calcium, caspase, and Bcl-2-related proteins. *Exp Neurol* 159: 274-282.
- Chun LL, Patterson PH (1977) Role of nerve growth factor in the development of rat sympathetic neurons in vitro. I. Survival, growth, and differentiation of catecholamine production. *J Cell Biol* 75: 694-704.
- Clark DW, Laverty R, Phelan EL (1972) Long-lasting peripheral and central effects of 6-hydroxydopamine in rats. *Br J Pharmacol* 44: 233-243.
- Clayton DF, George JM (1998) The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci* 21: 249-254.
- Cleeter MW, Cooper JM, Schapira AH (1992) Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J Neurochem* 58: 786-789.
- Cohen G (1984) Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 5: 77-82.
- Coleman M (2005) Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 6: 889-898.
- Coleman MP, Perry VH (2002) Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *Trends Neurosci* 25: 532-537.
- Conover JC, Erickson JT, Katz DM, Bianchi LM, Poueymirou WT, McClain J, Pan L, Helgren M, Ip NY, Boland P, . (1995) Neuronal deficits, not involving motor neurons, in mice lacking BDNF and/or NT4. *Nature* 375: 235-238.
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT, Jr. (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 571-576.
- Cookson MR (2005) The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem* 74: 29-52.

Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA, Marsischky G, Kolodner RD, Labaer J, Rochet JC, Bonini NM, Lindquist S (2006) {alpha}-Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models. *Science*.

Corbit KC, Foster DA, Rosner MR (1999) Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* 19: 4209-4218.

Coulom H, Birman S (2004) Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 24: 10993-10998.

Courbon F, Brefel-Courbon C, Thalamas C, Alibelli MJ, Berry I, Montastruc JL, Rascol O, Senard JM (2003) Cardiac MIBG scintigraphy is a sensitive tool for detecting cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease. *Mov Disord* 18: 890-897.

Crowder RJ, Freeman RS (2000) Glycogen synthase kinase-3 beta activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or Akt but not for death caused by nerve growth factor withdrawal. *J Biol Chem* 275: 34266-34271.

Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, McMahon SB, Shelton DL, Levinson AD, . (1994) Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76: 1001-1011.

da Costa CA, Ancolio K, Checler F (2000) Wild-type but not Parkinson's disease-related ala-53 --> Thr mutant alpha -synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli. *J Biol Chem* 275: 24065-24069.

Dahlqvist A, Forsgren S (1992) Expression of catecholamine-synthesizing enzymes in paraganglionic and ganglionic cells in the laryngeal nerves of the rat. *J Neurocytol* 21: 1-6.

Darios F, Corti O, Lucking CB, Hampe C, Muriel MP, Abbas N, Gu WJ, Hirsch EC, Rooney T, Ruberg M, Brice A (2003) Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet* 12: 517-526.

Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME (2000) 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 6: 41-51.

Dauer W, Kholodilov N, Vila M, Trillat AC, Goodchild R, Larsen KE, Staal R, Tieu K, Schmitz Y, Yuan CA, Rocha M, Jackson-Lewis V, Hersch S, Sulzer D, Przedborski S, Burke R, Hen R (2002) Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14524-14529.

Davies AM, Lee KF, Jaenisch R (1993) p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins. *Neuron* 11: 565-574.

Davies AM, Lumsden A (1990) Ontogeny of the somatosensory system: origins and early development of primary sensory neurons. *Annu Rev Neurosci* 13: 61-73.

de Champlain J (1971) Degeneration and regrowth of adrenergic nerve fibers in the rat peripheral tissues after 6-hydroxydopamine. *Can J Physiol Pharmacol* 49: 345-355.

de Lau LM, Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5: 525-535.

Dechant G, Barde YA (2002) The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* 5: 1131-1136.

Dechant G, Rodriguez-Tebar A, Kolbeck R, Barde YA (1993) Specific high-affinity receptors for neurotrophin-3 on sympathetic neurons. *J Neurosci* 13: 2610-2616.

del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Bohl JR, Braak H (2002) Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 413-426.

- Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L429-L438.
- Di Monte DA (2003) The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol* 2: 531-538.
- DiCicco-Bloom E, Black IB (1988) Insulin growth factors regulate the mitotic cycle in cultured rat sympathetic neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4066-4070.
- DiCicco-Bloom E, Friedman WJ, Black IB (1993) NT-3 stimulates sympathetic neuroblast proliferation by promoting precursor survival. *Neuron* 11: 1101-1111.
- Dong Z, Brennan A, Liu N, Yarden Y, Lefkowitz G, Mirsky R, Jessen KR (1995) Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* 15: 585-596.
- Dong Z, Ferger B, Feldon J, Bueler H (2002) Overexpression of Parkinson's disease-associated alpha-synucleinA53T by recombinant adeno-associated virus in mice does not increase the vulnerability of dopaminergic neurons to MPTP. *J Neurobiol* 53: 1-10.
- Doran JF, Jackson P, Kynoch PA, Thompson RJ (1983) Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *J Neurochem* 40: 1542-1547.
- Doupe AJ, Landis SC, Patterson PH (1985) Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. *J Neurosci* 5: 2119-2142.
- Dowell RT (1976) Myocardial contractile function and myofibrillar adenosine triphosphatase activity in chemically sympathectomized rats. *Circ Res* 39: 683-689.
- Drolet RE, Behrouz B, Lookingland KJ, Goudreau JL (2004) Mice lacking alpha-synuclein have an attenuated loss of striatal dopamine following prolonged chronic MPTP administration. *Neurotoxicology* 25: 761-769.
- Duda JE, Giasson BI, Mabon ME, Lee VM, Trojanowski JQ (2002) Novel antibodies to synuclein show abundant striatal pathology in Lewy body diseases. *Ann Neurol* 52: 205-210.
- Duffy PE, Tennyson VM (1965) Microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in substantia nigra and locus ceruleus in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 24: 398-414.
- Dunnett SB, Bjorklund A (1999) Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 399: A32-A39.
- Edgar D, Timpl R, Thoenen H (1984) The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *EMBO J* 3: 1463-1468.
- Egea J, Espinet C, Soler RM, Dolcet X, Yuste VJ, Encinas M, Iglesias M, Rocamora N, Comella JX (2001) Neuronal survival induced by neurotrophins requires calmodulin. *J Cell Biol* 154: 585-597.
- Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS (2004) Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev* 56: 331-349.
- El Agnaf OM, Jakes R, Curran MD, Middleton D, Ingenito R, Bianchi E, Pessi A, Neill D, Wallace A (1998) Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS Lett* 440: 71-75.
- Emoto Y, Kisaki H, Manome Y, Kharbanda S, Kufe D (1996) Activation of protein kinase Cdelta in human myeloid leukemia cells treated with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Blood* 87: 1990-1996.

- Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, Kisaki H, Kharbanda S, Robertson M, Ghayur T, Wong WW, Kamen R, Weichselbaum R, . (1995) Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J* 14: 6148-6156.
- English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, Cobb MH (1999) New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 253: 255-270.
- Erickson JT, Brosenitsch TA, Katz DM (2001) Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *J Neurosci* 21: 581-589.
- Erickson JT, Conover JC, Borday V, Champagnat J, Barbacid M, Yancopoulos G, Katz DM (1996) Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J Neurosci* 16: 5361-5371.
- Ernfors P, Lee KF, Jaenisch R (1994) Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368: 147-150.
- Ernfors P, Lee KF, Kucera J, Jaenisch R (1994) Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 77: 503-512.
- Fagan AM, Zhang H, Landis S, Smeyne RJ, Silos-Santiago I, Barbacid M (1996) TrkA, but not TrkC, receptors are essential for survival of sympathetic neurons in vivo. *J Neurosci* 16: 6208-6218.
- Farinas I, Cano-Jaimez M, Bellmunt E, Soriano M (2002) Regulation of neurogenesis by neurotrophins in developing spinal sensory ganglia. *Brain Res Bull* 57: 809-816.
- Farinas I, Jones KR, Backus C, Wang XY, Reichardt LF (1994) Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature* 369: 658-661.
- Farinas I, Yoshida CK, Backus C, Reichardt LF (1996) Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron* 17: 1065-1078.
- Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, Maraganore D, Gwinn-Hardy K, Wszolek Z, Dickson D, Langston JW (2004) Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol* 55: 174-179.
- Farrer M, Maraganore DM, Lockhart P, Singleton A, Lesnick TG, de Andrade M, West A, de Silva R, Hardy J, Hernandez D (2001) alpha-Synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 10: 1847-1851.
- Feany MB, Bender WW (2000) A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* 404: 394-398.
- Finch L, Haeusler G, Thoenen H (1973) A comparison of the effects of chemical sympathectomy by 6-hydroxydopamine in newborn and adult rats. *Br J Pharmacol* 47: 249-260.
- Fleming SM, Fernagut PO, Chesselet MF (2005) Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx* 2: 495-503.
- Forno LS (1986) Lewy bodies. *N Engl J Med* 314: 122.
- Forno LS, Langston JW, DeLanney LE, Irwin I, Ricaurte GA (1986) Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 20: 449-455.
- Francis N, Farinas I, Brennan C, Rivas-Plata K, Backus C, Reichardt L, Landis S (1999) NT-3, like NGF, is required for survival of sympathetic neurons, but not their precursors. *Dev Biol* 210: 411-427.

- Frech M, Andjelkovic M, Ingley E, Reddy KK, Falck JR, Hemmings BA (1997) High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J Biol Chem* 272: 8474-8481.
- Fukumitsu N, Suzuki M, Fukuda T, Kiyono Y, Kajiyama S, Saji H (2006) Reduced 125I-meta-iodobenzylguanidine uptake and norepinephrine transporter density in the hearts of mice with MPTP-induced parkinsonism. *Nucl Med Biol* 33: 37-42.
- Fukamoto S, Nishizawa Y, Hosoi M, Koyama H, Yamakawa K, Ohno S, Morii H (1997) Protein kinase C delta inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G1 cyclin expression. *J Biol Chem* 272: 13816-13822.
- Fuller RW, Hemrick-Luecke SK, Kindt MV, Heikkila RE (1988) Different effects of monoamine oxidase inhibition on MPTP depletion of heart and brain catecholamines in mice. *Life Sci* 42: 263-271.
- Fuller RW, Hemrick-Luecke SK, Perry KW (1989) Tissue concentrations of MPTP and MPP+ in relation to catecholamine depletion after the oral or subcutaneous administration of MPTP to mice. *Life Sci* 45: 2077-2083.
- Gabella G (1995) Autonomic nervous system. In: *The Rat Nervous System* (Paxinos G, ed), pp 81-103. San Diego.
- Gandhi S, Wood NW (2005) Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14: 2749-2755.
- George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF (1995) Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15: 361-372.
- Gerfen CR (2006) Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 9: 157-158.
- German DC, Nelson EL, Liang CL, Speciale SG, Sinton CM, Sonsalla PK (1996) The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse. *Neurodegeneration* 5: 299-312.
- Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV, Ratnofsky S, Quinlan C, Emoto Y, Pandey P, Datta R, Huang Y, Kharbada S, Allen H, Kamen R, Wong W, Kufe D (1996) Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med* 184: 2399-2404.
- Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM (2000) Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290: 985-989.
- Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM (2002) Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* 34: 521-533.
- Giasson BI, Forman MS, Higuchi M, Golbe LI, Graves CL, Kotzbauer PT, Trojanowski JQ, Lee VM (2003) Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science* 300: 636-640.
- Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 276: 2380-2386.
- Giasson BI, Uryu K, Trojanowski JQ, Lee VM (1999) Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. *J Biol Chem* 274: 7619-7622.
- Gibb WR, Lees AJ (1988) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51: 745-752.

Gispert S, Del Turco D, Garrett L, Chen A, Bernard DJ, Hamm-Clement J, Korf HW, Deller T, Braak H, Auburger G, Nussbaum RL (2003) Transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein show neuronal dysfunction in the absence of aggregate formation. *Mol Cell Neurosci* 24: 419-429.

Goetz CG, Lütge W, Tanner CM (1986) Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurology* 36: 73-75.

Goldberg M, Steinberg SF (1996) Tissue-specific developmental regulation of protein kinase C isoforms. *Biochem Pharmacol* 51: 1089-1093.

Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, Bhatnagar A, Meloni EG, Wu N, Ackerson LC, Klapstein GJ, Gajendiran M, Roth BL, Chesselet MF, Maidment NT, Levine MS, Shen J (2003) Parkinson-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 278: 43628-43635.

Goldberg MS, Pisani A, Haburcak M, Vortherms TA, Kitada T, Costa C, Tong Y, Martella G, Tschertner A, Martins A, Bernardi G, Roth BL, Pothos EN, Calabresi P, Shen J (2005) Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron* 45: 489-496.

Goldstein DS (2003) Dysautonomia in Parkinson's disease: neurocardiological abnormalities. *Lancet Neurol* 2: 669-676.

Goldstein DS (2004) Functional neuroimaging of sympathetic innervation of the heart. *Ann N Y Acad Sci* 1018: 231-243.

Goldstein DS, Li ST, Holmes C, Bankiewicz K (2003) Sympathetic innervation in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine primate model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 855-860.

Goldstein DS, Li ST, Kopin IJ (2001) Sympathetic neurocirculatory failure in Parkinson disease: Evidence for an etiologic role of alpha-synuclein. *Ann Intern Med* 135: 1010-1011.

Goldstein DS, Robertson D, Esler M, Straus SE, Eisenhofer G (2002) Dysautonomias: clinical disorders of the autonomic nervous system. *Ann Intern Med* 137: 753-763.

Gomez-Isla T, Irizarry MC, Mariash A, Cheung B, Soto O, Schrupp S, Sondel J, Kotilinek L, Day J, Schwarzschild MA, Cha JH, Newell K, Miller DW, Ueda K, Young AB, Hyman BT, Ashe KH (2003) Motor dysfunction and gliosis with preserved dopaminergic markers in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiol Aging* 24: 245-258.

Gómez-Santos C, Ferrer I, Reiriz J, Vinals F, Barrachina M, Ambrosio S (2002) MPP+ increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res* 935: 32-39.

Gómez-Santos C, Ferrer I, Santidrian AF, Barrachina M, Gil J, Ambrosio S (2003) Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res* 73: 341-350.

Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV (2001) Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life* 52: 135-141.

Grewal SS, York RD, Stork PJ (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9: 544-553.

Gschwendt M (1999) Protein kinase C delta. *Eur J Biochem* 259: 555-564.

Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75: 463-476.

Hague K, Lento P, Morgello S, Caro S, Kaufmann H (1997) The distribution of Lewy bodies in pure autonomic failure: autopsy findings and review of the literature. *Acta Neuropathol (Berl)* 94: 192-196.

- Hague S, Rogaeva E, Hernandez D, Gulick C, Singleton A, Hanson M, Johnson J, Weiser R, Gallardo M, Ravina B, Gwinn-Hardy K, Crawley A, George-Hyslop PH, Lang AE, Heutink P, Bonifati V, Hardy J, Singleton A (2003) Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Ann Neurol* 54: 271-274.
- Hall AK, Landis SC (1991) Principal neurons and small intensely fluorescent (SIF) cells in the rat superior cervical ganglion have distinct developmental histories. *J Neurosci* 11: 472-484.
- Hall AK, Landis SC (1992) Division and migration of satellite glia in the embryonic rat superior cervical ganglion. *J Neurocytol* 21: 635-647.
- Han JM, Kim JH, Lee BD, Lee SD, Kim Y, Jung YW, Lee S, Cho W, Ohba M, Kuroki T, Suh PG, Ryu SH (2002) Phosphorylation-dependent regulation of phospholipase D2 by protein kinase C delta in rat Pheochromocytoma PC12 cells. *J Biol Chem* 277: 8290-8297.
- Hardy J, Gwinn-Hardy K (1998) Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science* 282: 1075-1079.
- Hartmann A, Hirsch EC (2001) Parkinson's disease. The apoptosis hypothesis revisited. *Adv Neurol* 86: 143-153.
- Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC (2000) Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2875-2880.
- Hartog Jager WA, Bethlem J (1960) The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 23: 283-290.
- Hashimoto M, Hsu LJ, Rockenstein E, Takenouchi T, Mallory M, Masliah E (2002) alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *J Biol Chem* 277: 11465-11472.
- Hashimoto M, Takenouchi T, Rockenstein E, Masliah E (2003) Alpha-synuclein up-regulates expression of caveolin-1 and down-regulates extracellular signal-regulated kinase activity in B103 neuroblastoma cells: role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem* 85: 1468-1479.
- Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Hassin-Baer S, Lu CS, Ng AR, Rosales RL, Shimizu N, Toda T, Mizuno Y, Hattori N (2004) Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56: 424-427.
- Haywood AF, Staveley BE (2004) Parkin counteracts symptoms in a Drosophila model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 5: 14.
- Healy DG, Abou-Sleiman PM, Casas JP, Ahmadi KR, Lynch T, Gandhi S, Muqit MM, Foltynie T, Barker R, Bhatia KP, Quinn NP, Lees AJ, Gibson JM, Holton JL, Revesz T, Goldstein DB, Wood NW (2006) UCHL-1 is not a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 59: 627-633.
- Hedrich K, Marder K, Harris J, Kann M, Lynch T, Meija-Santana H, Pramstaller PP, Schwinger E, Bressman SB, Fahn S, Klein C (2002) Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for Parkin mutations. *Neurology* 58: 1239-1246.
- Heikkila RE, Mytilineou C, Cote L, Cohen G (1973) Evidence for degeneration of sympathetic nerve terminals caused by the ortho- and para-quinones of 6-hydroxydopamine. *J Neurochem* 20: 1345-1350.
- Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z (2000) Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 20: 2567-2574.

- Hilker R, Klein C, Hedrich K, Ozelius LJ, Vieregge P, Herholz K, Pramstaller PP, Heiss WD (2002) The striatal dopaminergic deficit is dependent on the number of mutant alleles in a family with mutations in the parkin gene: evidence for enzymatic parkin function in humans. *Neurosci Lett* 323: 50-54.
- Hiltunen, J. Neurotrophic factors in rodent heart: from development to pathophysiology. 2001. University of Helsinki; Institute of Biotechnology and Department of Biosciences, Division of Animal Physiology, Faculty of Science.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Hippenmeyer S, Kramer I, Arber S (2004) Control of neuronal phenotype: what targets tell the cell bodies. *Trends Neurosci* 27: 482-488.
- Hirokawa N, Takemura R (2003) Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins. *Trends Biochem Sci* 28: 558-565.
- Hirsch EC, Hoglinger G, Rousselet E, Breider T, Parain K, Feger J, Ruberg M, Prigent A, Cohen-Salmon C, Launay JM (2003) Animal models of Parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update. *J Neural Transm Suppl* 89-100.
- Hoglinger GU, Feger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P, Ruberg M, Oertel WH, Hirsch EC (2003) Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem* 84: 491-502.
- Holgado-Madruga M, Emllet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ (1996) A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* 379: 560-564.
- Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emllet DR, Dieterich R, Wong AJ (1997) Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12419-12424.
- Hsu LJ, Mallory M, Xia Y, Veinbergs I, Hashimoto M, Yoshimoto M, Thal LJ, Saitoh T, Masliah E (1998) Expression pattern of synucleins (non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid precursor protein/alpha-synuclein) during murine brain development. *J Neurochem* 71: 338-344.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72: 609-642.
- Huang Y, Cheung L, Rowe D, Halliday G (2004) Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 46: 44-70.
- Ibáñez P, Bonnet AM, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Durr A, Brice A (2004) Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364: 1169-1171.
- Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R (2001) An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105: 891-902.
- Irizarry MC, Kim TW, McNamara M, Tanzi RE, George JM, Clayton DF, Hyman BT (1996) Characterization of the precursor protein of the non-A beta component of senile plaques (NACP) in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 889-895.
- Itier JM, Ibáñez P, Mena MA, Abbas N, Cohen-Salmon C, Bohme GA, Laville M, Pratt J, Corti O, Pradier L, Ret G, Joubert C, Periquet M, Araujo F, Negroni J, Casarejos MJ, Canals S, Solano R, Serrano A, Gallego E, Sanchez M, Deneffe P, Benavides J, Tremp G, Rooney TA, Brice A, Garcia dY (2003) Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet* 12: 2277-2291.

- Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T (1995) The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14: 467-475.
- Iwanaga K, Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tomita I, Satoh H, Takashima H, Satoh A, Seto M, Tsujihata M, Takahashi H (1999) Lewy body-type degeneration in cardiac plexus in Parkinson's and incidental Lewy body diseases. *Neurology* 52: 1269-1271.
- Iwata A, Maruyama M, Kanazawa I, Nukina N (2001) alpha-Synuclein affects the MAPK pathway and accelerates cell death. *J Biol Chem* 276: 45320-45329.
- Jackson DN, Foster DA (2004) The enigmatic protein kinase Cdelta: complex roles in cell proliferation and survival. *FASEB J* 18: 627-636.
- Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S (1995) Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* 4: 257-269.
- Jaim-Etcheverry G, Zieher LM (1971) Permanent depletion of peripheral norepinephrine in rats treated at birth with 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol* 13: 272-276.
- Jaken S (1996) Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol* 8: 168-173.
- Jakes R, Spillantini MG, Goedert M (1994) Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* 345: 27-32.
- Javitch JA, Snyder SH (1984) Uptake of MPP(+) by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur J Pharmacol* 106: 455-456.
- Jellinger KA (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 14: 153-197.
- Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ (1998) Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry* 37: 4901-4909.
- Jensen PH, Hager H, Nielsen MS, Hojrup P, Gliemann J, Jakes R (1999) alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol Chem* 274: 25481-25489.
- Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE (1995) 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* 4: 131-137.
- Johannessen JN, Goldstein DS, Oliver J, Markey SP (1990) Prolonged changes in plasma concentrations of catecholamine metabolites following a single infusion of an MPTP analog. *Life Sci* 47: 1895-1901.
- Jonsson G (1983) Chemical lesioning techniques: monoamine neurotoxins. In: *Handbook of chemical neuroanatomy. Methods in chemical neuroanatomy* (Bjorklund A, Hokfelt T, eds), pp 463-507. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- Jonsson G, Nwanze E, Luthman J, Sundstrom E (1986) Effect of MPTP and its pyridinium metabolites on monoamine uptake and on central catecholamine neurons in mice. *Acta Physiol Scand* 128: 187-194.
- Junn E, Mouradian MM (2002) Human alpha-synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. *Neurosci Lett* 320: 146-150.
- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H, Schindzielorz A, Okochi M, Leimer U, van der PH, Probst A, Kremmer E, Kretschmar HA, Haass C (2000) Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain. *J Neurosci* 20: 6365-6373.

- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H, Spooren W, Fuss B, Mallon B, Macklin WB, Fujiwara H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Kretzschmar HA, Haass C (2002) Hyperphosphorylation and insolubility of alpha-synuclein in transgenic mouse oligodendrocytes. *EMBO Rep* 3: 583-588.
- Kalivendi SV, Cunningham S, Kotamraju S, Joseph J, Hillard CJ, Kalyanaraman B (2004) Alpha-synuclein up-regulation and aggregation during MPP⁺-induced apoptosis in neuroblastoma cells: intermediacy of transferrin receptor iron and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 279: 15240-15247.
- Kanhasamy AG, Kitazawa M, Kanhasamy A, Anantharam V (2003) Role of proteolytic activation of protein kinase Cdelta in oxidative stress-induced apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 5: 609-620.
- Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE (2001) Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 276: 18169-18177.
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10: 381-391.
- Kaplan ML, Cheslow Y, Vikstrom K, Malhotra A, Geenen DL, Nakouzi A, Leinwand LA, Buttrick PM (1994) Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *Am J Physiol* 267: H1167-H1173.
- Kaufmann H, Nahm K, Purohit D, Wolfe D (2004) Autonomic failure as the initial presentation of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 63: 1093-1095.
- Kaul S, Anantharam V, Kanhasamy A, Kanhasamy AG (2005) Wild-type alpha-synuclein interacts with pro-apoptotic proteins PKCdelta and BAD to protect dopaminergic neuronal cells against MPP⁺-induced apoptotic cell death. *Brain Res Mol Brain Res* 139: 137-152.
- Kaul S, Kanhasamy A, Kitazawa M, Anantharam V, Kanhasamy AG (2003) Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C delta mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced apoptotic cell death in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress in dopaminergic degeneration. *Eur J Neurosci* 18: 1387-1401.
- Kawamura M, Schwartz JP, Nomura T, Kopin IJ, Goldstein DS, Huynh TT, Hooper DR, Harvey-White J, Eisenhofer G (1999) Differential effects of chemical sympathectomy on expression and activity of tyrosine hydroxylase and levels of catecholamines and DOPA in peripheral tissues of rats. *Neurochem Res* 24: 25-32.
- Keshamouni VG, Mattingly RR, Reddy KB (2002) Mechanism of 17-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC-delta. *J Biol Chem* 277: 22558-22565.
- Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S, Wakeham A, You T, Kalia SK, Horne P, Westaway D, Lozano AM, Anisman H, Park DS, Mak TW (2005) Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5215-5220.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-608.
- Kitamura Y, Shimohama S, Akaike A, Taniguchi T (2000) The parkinsonian models: invertebrates to mammals. *Jpn J Pharmacol* 84: 237-243.
- Kitazawa M, Anantharam V, Kanhasamy AG (2003) Dieldrin induces apoptosis by promoting caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase Cdelta in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress and dopaminergic degeneration. *Neuroscience* 119: 945-964.
- Klein R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M (1989) trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J* 8: 3701-3709.

- Klivenyi P, Siwek D, Gardian G, Yang L, Starkov A, Cleren C, Ferrante RJ, Kowall NW, Abeliovich A, Beal MF (2006) Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins. *Neurobiol Dis* 21: 541-548.
- Kopito RR (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10: 524-530.
- Korczyn AD (1990) Autonomic nervous system disturbances in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 53: 463-468.
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18: 106-108.
- Kuhn M, Haebig K, Bonin M, Ninkina N, Buchman VL, Poths S, Riess O (2007) Whole genome expression analyses of single- and double-knock-out mice implicate partially overlapping functions of alpha- and gamma-synuclein. *Neurogenetics* 8: 71-81.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M (1991) trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66: 967-979.
- Landis SC, Damboise S (1986) Neuron Birthdays in the Paravertebral Sympathetic Chain of the Rat. *Anatomical Record* 214: A71.
- Landis SC, Patterson PH (1981) Neural Crest Cell Lineages. *Trends in Neurosciences* 4: 172-175.
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339: 1044-1053.
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 339: 1130-1143.
- Langley JN (1921) The autonomic nervous system. Part I.
- Langston JW, Ballard PA, Jr. (1983) Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med* 309: 310.
- Lavedan C (1998) The synuclein family. *Genome Res* 8: 871-880.
- Le Douarin NM, Kalcheim C, Teillet M (1992) The cellular and molecular basis of early sensory ganglion development. In: *Sensory neurons. Diversity, development, and plasticity* (Scott SA, ed), pp 143-170. New York.
- Lee HJ, Choi C, Lee SJ (2002) Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J Biol Chem* 277: 671-678.
- Lee HJ, Khoshaghideh F, Lee S, Lee SJ (2006) Impairment of microtubule-dependent trafficking by overexpression of alpha-synuclein. *Eur J Neurosci* 24: 3153-3162.
- Lee M, Hyun D, Halliwell B, Jenner P (2001) Effect of the overexpression of wild-type or mutant alpha-synuclein on cell susceptibility to insult. *J Neurochem* 76: 998-1009.
- Lee SD, Lee BD, Kim Y, Suh PG, Ryu SH (2000) Bradykinin activates phospholipase D2 via protein kinase cdelta in PC12 cells. *Neurosci Lett* 294: 130-132.
- Leibersperger H, Gschwendt M, Gernold M, Marks F (1991) Immunological demonstration of a calcium-unresponsive protein kinase C of the delta-type in different species and murine tissues. Predominance in epidermis. *J Biol Chem* 266: 14778-14784.
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395: 451-452.

- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154-1162.
- Li YJ, Scott WK, Hedges DJ, Zhang F, Gaskell PC, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R, Stern MB, Hiner BC, Jankovic J, Allen FA, Jr., Goetz CG, Mastaglia F, Stajich JM, Gibson RA, Middleton LT, Saunders AM, Scott BL, Small GW, Nicodemus KK, Reed AD, Schmechel DE, Welsh-Bohmer KA, Conneally PM, Roses AD, Gilbert JR, Vance JM, Haines JL, Pericak-Vance MA (2002) Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled. *Am J Hum Genet* 70: 985-993.
- Ling M, Troller U, Zeidman R, Lundberg C, Larsson C (2004) Induction of neurites by the regulatory domains of PKCdelta and epsilon is counteracted by PKC catalytic activity and by the RhoA pathway. *Exp Cell Res* 292: 135-150.
- Liou HH, Chen RC, Tsai YF, Chen WP, Chang YC, Tsai MC (1996) Effects of paraquat on the substantia nigra of the wistar rats: neurochemical, histological, and behavioral studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 137: 34-41.
- Liu X, Ernfors P, Wu H, Jaenisch R (1995) Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature* 375: 238-241.
- Loeb DM, Stephens RM, Copeland T, Kaplan DR, Greene LA (1994) A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C-gamma 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth. *J Biol Chem* 269: 8901-8910.
- Lotharius J, Brundin P (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci* 3: 932-942.
- Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6: 603-614.
- Lücking CB, Chesneau V, Lohmann E, Verpillat P, Dulac C, Bonnet AM, Gasparini F, Agid Y, Durr A, Brice A (2003) Coding polymorphisms in the parkin gene and susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 60: 1253-1256.
- Lücking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y, Brice A (2000) Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 342: 1560-1567.
- Luthman J, Brodin E, Sundstrom E, Wiehager B (1990) Studies on brain monoamine and neuropeptide systems after neonatal intracerebroventricular 6-hydroxydopamine treatment. *Int J Dev Neurosci* 8: 549-560.
- Luthman J, Fredriksson A, Sundstrom E, Jonsson G, Archer T (1989) Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res* 33: 267-277.
- Luthman J, Jonsson G (1986) Effects of the parkinsonism-inducing neurotoxin MPTP and its metabolite MPP+ on sympathetic adrenergic nerves in mouse iris and atrium. *Med Biol* 64: 95-102.
- Luthman J, Sundstrom E (1990) No apparent difference in the effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the sympathetic system in NMRI and C57 BL/6 mice. *Toxicol Lett* 54: 83-92.
- Ma Q, Fode C, Guillemot F, Anderson DJ (1999) Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev* 13: 1717-1728.
- Madrid LV, Wang CY, Guttridge DC, Schottelius AJ, Baldwin AS, Jr., Mayo MW (2000) Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 20: 1626-1638.
- Mandelkow E, Mandelkow EM (2002) Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol* 12: 585-591.

- Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E (2003) Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging* 24: 1079-1085.
- Mandir AS, Przedborski S, Jackson-Lewis V, Wang ZQ, Simbulan-Rosenthal CM, Smulson ME, Hoffman BE, Guastella DB, Dawson VL, Dawson TM (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase activation mediates 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5774-5779.
- Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 277: 1641-1644.
- Manning-Bog AB, McCormack AL, Purisai MG, Bolin LM, Di Monte DA (2003) Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *J Neurosci* 23: 3095-3099.
- Maraganore DM, Farrer MJ, Hardy JA, Lincoln SJ, McDonnell SK, Rocca WA (1999) Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease. *Neurology* 53: 1858-1860.
- Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin MC, Gasser T, Kruger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JP, de Andrade M, Rocca WA (2004) UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 55: 512-521.
- Marín I (2006) The Parkinson Disease Gene LRRK2: Evolutionary and Structural Insights. *Mol Biol Evol* 23: 2423-2433.
- Marín I, Vallejo J (2005) Parkinson Disease: From Cellular and Animal Models to Genomics. *Current Genomics* 6: 241-250.
- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8: 2804-2815.
- Maroteaux L, Scheller RH (1991) The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. *Brain Res Mol Brain Res* 11: 335-343.
- Marsden CD (1983) Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 19: 121-141.
- Martí MJ, Tolosa E, Campdelacreu J (2003) Clinical overview of the synucleinopathies. *Mov Disord* 18 Suppl 6: S21-S27.
- Martin DP, Wallace TL, Johnson EM, Jr. (1990) Cytosine arabinoside kills postmitotic neurons in a fashion resembling trophic factor deprivation: evidence that a deoxycytidine-dependent process may be required for nerve growth factor signal transduction. *J Neurosci* 10: 184-193.
- Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH, Jr., Goetz CG, Small GW, Masterman D, Mastaglia F, Laing NG, Stajich JM, Ribble RC, Booze MW, Rogala A, Hauser MA, Zhang F, Gibson RA, Middleton LT, Roses AD, Haines JL, Scott BL, Pericak-Vance MA, Vance JM (2001) Association of single-nucleotide polymorphisms of the tau gene with late-onset Parkinson disease. *JAMA* 286: 2245-2250.
- Martin-Zanca D, Oskam R, Mitra G, Copeland T, Barbacid M (1989) Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol* 9: 24-33.
- Marusich MF, Weston JA (1991) Development of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev* 1: 221-229.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287: 1265-1269.

Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, McCormack A, Picciano M, LaFrancois J, Yu X, Dickson D, Langston WJ, McGowan E, Farrer M, Hardy J, Duff K, Przedborski S, Di Monte DA (2001) Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiol Dis* 8: 535-539.

Mayer RA, Kindt MV, Heikkila RE (1986) Prevention of the nigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4-dihydroxyphenylethylamine transport. *J Neurochem* 47: 1073-1079.

McCormack AL, Di Monte DA (2003) Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration. *J Neurochem* 85: 82-86.

McEvelly RJ, Erkman L, Luo L, Sawchenko PE, Ryan AF, Rosenfeld MG (1996) Requirement for Brn-3.0 in differentiation and survival of sensory and motor neurons. *Nature* 384: 574-577.

Meakin SO, MacDonald JI, Gryz EA, Kubu CJ, Verdi JM (1999) The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA. A model for discriminating proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 274: 9861-9870.

Meco G, Pratesi L, Bonifati V (1991) Cardiovascular reflexes and autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurol* 238: 195-199.

Meulener MC, Graves CL, Sampathu DM, Armstrong-Gold CE, Bonini NM, Giasson BI (2005) DJ-1 is present in a large molecular complex in human brain tissue and interacts with alpha-synuclein. *J Neurochem* 93: 1524-1532.

Micieli G, Tosi P, Marcheselli S, Cavallini A (2003) Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurol Sci* 24 Suppl 1: S32-S34.

Miller DW, Hague SM, Clarimon J, Baptista M, Gwinn-Hardy K, Cookson MR, Singleton AB (2004) Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* 62: 1835-1838.

Mischak H, Pierce JH, Goodnight J, Kazanietz MG, Blumberg PM, Mushinski JF (1993) Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C-alpha and -delta and not by protein kinase C-beta II, -epsilon, -zeta, and -eta. *J Biol Chem* 268: 20110-20115.

Mizuno Y, Hattori N, Mori H, Suzuki T, Tanaka K (2001) Parkin and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14: 477-482.

Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM, Dawson VL (2005) Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 14: 71-84.

Morfini G, Pigino G, Opalach K, Serulle Y, Moreira JE, Sugimori M, Llinas RR, Brady ST (2007) 1-Methyl-4-phenylpyridinium affects fast axonal transport by activation of caspase and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2442-2447.

Morin X, Cremer H, Hirsch MR, Kapur RP, Gordinis C, Brunet JF (1997) Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene Phox2a. *Neuron* 18: 411-423.

Morino K, Maegawa H, Fujita T, Takahara N, Egawa K, Kashiwagi A, Kikkawa R (2001) Insulin-induced c-Jun N-terminal kinase activation is negatively regulated by protein kinase C delta. *Endocrinology* 142: 2669-2676.

Mukoyama M, Yamazaki K, Kikuchi T, Tomita T (1989) Neuropathology of gracile axonal dystrophy (GAD) mouse. An animal model of central distal axonopathy in primary sensory neurons. *Acta Neuropathol (Berl)* 79: 294-299.

- Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM (2000) Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* 20: 3214-3220.
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriends S (1964) Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* 239: 2910-2917.
- Nakajo S, Omata K, Aiuchi T, Shibayama T, Okahashi I, Ochiai H, Nakai Y, Nakaya K, Nakamura Y (1990) Purification and characterization of a novel brain-specific 14-kDa protein. *J Neurochem* 55: 2031-2038.
- Nakajo S, Tsukada K, Omata K, Nakamura Y, Nakaya K (1993) A new brain-specific 14-kDa protein is a phosphoprotein. Its complete amino acid sequence and evidence for phosphorylation. *Eur J Biochem* 217: 1057-1063.
- Neumann M, Muller V, Gorner K, Kretzschmar HA, Haass C, Kahle PJ (2004) Pathological properties of the Parkinson's disease-associated protein DJ-1 in alpha-synucleinopathies and tauopathies: relevance for multiple system atrophy and Pick's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 107: 489-496.
- Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE (1987) MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci* 40: 721-729.
- Nieto M, Gil-Bea FJ, Dalfo E, Cuadrado M, Cabodevilla F, Sanchez B, Catena S, Sesma T, Ribe E, Ferrer I, Ramirez MJ, Gomez-Isla T (2006) Increased sensitivity to MPTP in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiol Aging* 27: 848-856.
- Nimnual AS, Yatsula BA, Bar-Sagi D (1998) Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* 279: 560-563.
- Ninkina N, Papachroni K, Robertson DC, Schmidt O, Delaney L, O'Neill F, Court F, Rosenthal A, Fleetwood-Walker SM, Davies AM, Buchman VL (2003) Neurons expressing the highest levels of gamma-synuclein are unaffected by targeted inactivation of the gene. *Mol Cell Biol* 23: 8233-8245.
- Nishie M, Mori F, Fujiwara H, Hasegawa M, Yoshimoto M, Iwatsubo T, Takahashi H, Wakabayashi K (2004) Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in the brain and peripheral ganglia of patients with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 107: 292-298.
- Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.
- Nosaka Y, Arai A, Miyasaka N, Miura O (1999) CrkL mediates Ras-dependent activation of the Raf/ERK pathway through the guanine nucleotide exchange factor C3G in hematopoietic cells stimulated with erythropoietin or interleukin-3. *J Biol Chem* 274: 30154-30162.
- O'Driscoll KR, Teng KK, Fabbro D, Greene LA, Weinstein IB (1995) Selective translocation of protein kinase C-delta in PC12 cells during nerve growth factor-induced neuriteogenesis. *Mol Biol Cell* 6: 449-458.
- Obermeier A, Bradshaw RA, Seedorf K, Choidas A, Schlessinger J, Ullrich A (1994) Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *EMBO J* 13: 1585-1590.
- Olanow CW, Tatton WG (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 22: 123-144.
- Orimo S, Amino T, Itoh Y, Takahashi A, Kojo T, Uchihara T, Tsuchiya K, Mori F, Wakabayashi K, Takahashi H (2005) Cardiac sympathetic denervation precedes neuronal loss in the sympathetic ganglia in Lewy body disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 109: 583-588.
- Orimo S, Amino T, Takahashi A, Kojo T, Uchihara T, Mori F, Wakabayashi K, Takahashi H (2006) Cardiac sympathetic denervation in Lewy body disease. *Parkinsonism Relat Disord*.

Orimo S, Oka T, Miura H, Tsuchiya K, Mori F, Wakabayashi K, Nagao T, Yokochi M (2002) Sympathetic cardiac denervation in Parkinson's disease and pure autonomic failure but not in multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73: 776-777.

Orimo S, Ozawa E, Nakade S, Hattori H, Tsuchiya K, Taki K, Takahashi A (2003) [123I] meta-iodobenzylguanidine myocardial scintigraphy differentiates corticobasal degeneration from Parkinson's disease. *Intern Med* 42: 127-128.

Orimo S, Ozawa E, Oka T, Nakade S, Tsuchiya K, Yoshimoto M, Wakabayashi K, Takahashi H (2001) Different histopathology accounting for a decrease in myocardial MIBG uptake in PD and MSA. *Neurology* 57: 1140-1141.

Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin B (1999) alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci* 19: 5782-5791.

Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der BM, López dM, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martínez JR, Nicholl D, Carrera IM, Peña AS, de Silva R, Lees A, Martí-Massó JF, Pérez-Tur J, Wood NW, Singleton AB (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44: 595-600.

Papachroni K, Ninkina N, Wanless J, Kalofoutis AT, Gnucnev NV, Buchman VL (2005) Peripheral sensory neurons survive in the absence of alpha- and gamma-synucleins. *J Mol Neurosci* 25: 157-164.

Park DS, Morris EJ, Stefanis L, Troy CM, Shelanski ML, Geller HM, Greene LA (1998) Multiple pathways of neuronal death induced by DNA-damaging agents, NGF deprivation, and oxidative stress. *J Neurosci* 18: 830-840.

Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14: 223-236.

Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11: 272-280.

Paterna JC, Leng A, Weber E, Feldon J, Bueler H (2007) DJ-1 and Parkin Modulate Dopamine-dependent Behavior and Inhibit MPTP-induced Nigral Dopamine Neuron Loss in Mice. *Mol Ther*.

Perez FA, Palmiter RD (2005) Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2174-2179.

Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ (2002) A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 22: 3090-3099.

Pérez-Sánchez F, Milán M, Fariñas I (2002) Animals Models of α -Synucleopathies. In: *Neurodegenerative Disorders Associated with α -Synuclein Pathology* pp 23-36. *Ars Medica*.

Petersen K, Olesen OF, Mikkelsen JD (1999) Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neuroscience* 91: 651-659.

Pierchala BA, Ahrens RC, Paden AJ, Johnson EM, Jr. (2004) Nerve growth factor promotes the survival of sympathetic neurons through the cooperative function of the protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *J Biol Chem* 279: 27986-27993.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047.

Porter CC, Stone CA (1967) Biochemical mechanisms of drug action. *Annu Rev Pharmacol* 7: 15-38.

- Porter CC, Totaro JA, Burcin A (1965) The relationship between radioactivity and norepinephrine concentrations in the brains and hearts of mice following administration of labeled methyl dopa or 6-hydroxydopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 150: 17-22.
- Porter CC, Totaro JA, Stone CA (1963) Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther* 140: 308-316.
- Prasad JE, Kumar B, Andreatta C, Nahreini P, Hanson AJ, Yan XD, Prasad KN (2004) Overexpression of alpha-synuclein decreased viability and enhanced sensitivity to prostaglandin E(2), hydrogen peroxide, and a nitric oxide donor in differentiated neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 76: 415-422.
- Price KS, Farley IJ, Hornykiewicz O (1978) Neurochemistry of Parkinson's disease: relation between striatal and limbic dopamine. *Adv Biochem Psychopharmacol* 19: 293-300.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V (1998) Experimental developments in movement disorders: update on proposed free radical mechanisms. *Curr Opin Neurol* 11: 335-339.
- Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila M (2004) MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* 36: 375-379.
- Raff MC, Whitmore AV, Finn JT (2002) Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 296: 868-871.
- Rajput AH, Rozdilsky B (1976) Dysautonomia in Parkinsonism: a clinicopathological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 39: 1092-1100.
- Rajput AH, Rozdilsky B (1976) Postural hypotension in idiopathic Parkinson's disease. *Etiopathology. Neurol Neurocir Psiquiater* 17: 269-284.
- Rathke-Hartlieb S, Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Haid S, Okochi M, Haass C, Schulz JB (2001) Sensitivity to MPTP is not increased in Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein transgenic mice. *J Neurochem* 77: 1181-1184.
- Reichardt LF, Farinas I (1997) Neurotrophic factors and their receptors. Roles in neuronal development and function. In: *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development* (WM Cowan, TM Jessell, SL Zipursky, eds), pp 220-263. New York: Oxford Univ. Press.
- Reinhard JF, Jr., Daniels AJ (1992) Subcellular compartmentation of 2'methyl MPP+ can explain differences in toxicity to adrenal chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci* 648: 323-325.
- Ren J, Porter JE, Wold LE, Aberle NS, Muralikrishnan D, Haselton JR (2004) Depressed contractile function and adrenergic responsiveness of cardiac myocytes in an experimental model of Parkinson disease, the MPTP-treated mouse. *Neurobiol Aging* 25: 131-138.
- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD (1999) Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286: 2358-2361.
- Richfield EK, Thiruchelvam MJ, Cory-Slechta DA, Wuertzer C, Gainetdinov RR, Caron MG, Di Monte DA, Federoff HJ (2002) Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Exp Neurol* 175: 35-48.
- Rizzo MA, Shome K, Vasudevan C, Stolz DB, Sung TC, Frohman MA, Watkins SC, Romero G (1999) Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 274: 1131-1139.
- Rizzo P, Hinkle DA, Zhukareva V, Bonifati V, Severijnen LA, Martinez D, Ravid R, Kamphorst W, Eberwine JH, Lee VM, Trojanowski JQ, Heutink P (2004) DJ-1 colocalizes with tau inclusions: a link between parkinsonism and dementia. *Ann Neurol* 55: 113-118.

- Robertson DC, Schmidt O, Ninkina N, Jones PA, Sharkey J, Buchman VL (2004) Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice. *J Neurochem* 89: 1126-1136.
- Rockenstein E, Mallory M, Hashimoto M, Song D, Shults CW, Lang I, Masliah E (2002) Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J Neurosci Res* 68: 568-578.
- Rordorf-Nikolic T, Van Horn DJ, Chen D, White MF, Backer JM (1995) Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit. *J Biol Chem* 270: 3662-3666.
- Ross CA (1997) Intracellular neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron* 19: 1147-1150.
- Ross OA, Farrer MJ (2005) Pathophysiology, pleiotropy and paradigm shifts: genetic lessons from Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans* 33: 586-590.
- Roux PP, Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67: 203-233.
- Rubin E (1985) Development of the rat superior cervical ganglion: ganglion cell maturation. *J Neurosci* 5: 673-684.
- Ruffy R, Leonard M (1997) Chemical cardiac sympathetic denervation hampers defibrillation in the dog. *J Cardiovasc Electrophysiol* 8: 62-67.
- Ryer EJ, Sakakibara K, Wang C, Sarkar D, Fisher PB, Faries PL, Kent KC, Liu B (2005) Protein kinase C delta induces apoptosis of vascular smooth muscle cells through induction of the tumor suppressor p53 by both p38-dependent and p38-independent mechanisms. *J Biol Chem* 280: 35310-35317.
- Saha AR, Ninkina NN, Hanger DP, Anderton BH, Davies AM, Buchman VL (2000) Induction of neuronal death by alpha-synuclein. *Eur J Neurosci* 12: 3073-3077.
- Saigoh K, Wang YL, Suh JG, Yamanishi T, Sakai Y, Kiyosawa H, Harada T, Ichihara N, Wakana S, Kikuchi T, Wada K (1999) Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat Genet* 23: 47-51.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101.
- Schlossmacher MG, Frosch MP, Gai WP, Medina M, Sharma N, Forno L, Ochiishi T, Shimura H, Sharon R, Hattori N, Langston JW, Mizuno Y, Hyman BT, Selkoe DJ, Kosik KS (2002) Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 160: 1655-1667.
- Schluter OM, Fornai F, Alessandri MG, Takamori S, Geppert M, Jahn R, Sudhof TC (2003) Role of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *Neuroscience* 118: 985-1002.
- Schuler F, Casida JE (2001) The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest Manag Sci* 57: 932-940.
- Seo JH, Rah JC, Choi SH, Shin JK, Min K, Kim HS, Park CH, Kim S, Kim EM, Lee SH, Lee S, Suh SW, Suh YH (2002) Alpha-synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *FASEB J* 16: 1826-1828.

- Serulle Y, Morfini G, Pigino G, Moreira JE, Sugimori M, Brady ST, Llinas RR (2007) 1-Methyl-4-phenylpyridinium induces synaptic dysfunction through a pathway involving caspase and PKCdelta enzymatic activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2437-2441.
- Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A (2004) DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol* 2: e362.
- Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, Cookson MR, Greenamyre JT (2002) An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci* 22: 7006-7015.
- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT (2003) Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 23: 10756-10764.
- Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT (2003) Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol* 179: 9-16.
- Sherman MY, Goldberg AL (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29: 15-32.
- Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, Suno M, Ogawa K, Hayase N, Kimura K, Shiono H (2001) Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res* 906: 135-142.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25: 302-305.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Yoshikawa M, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Minoshima S, Yamamura Y, Shimizu N, Mizuno Y (1999) Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann Neurol* 45: 668-672.
- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ (2001) Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 293: 263-269.
- Shults CW (2006) Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1661-1668.
- Sieber-Blum M (1989) Commitment of neural crest cells to the sensory neuron lineage. *Science* 243: 1608-1611.
- Sieber-Blum M (1989) Inhibition of the adrenergic phenotype in cultured neural crest cells by norepinephrine uptake inhibitors. *Dev Biol* 136: 372-380.
- Silos-Santiago I, Fagan AM, Garber M, Fritsch B, Barbacid M (1997) Severe sensory deficits but normal CNS development in newborn mice lacking TrkB and TrkC tyrosine protein kinase receptors. *Eur J Neurosci* 9: 2045-2056.
- Singleton A, Gwinn-Hardy K, Sharabi Y, Li ST, Holmes C, Dendi R, Hardy J, Singleton A, Crawley A, Goldstein DS (2004) Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication. *Brain* 127: 768-772.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302: 841.

- Skipper L, Farrer M (2002) Parkinson's genetics: molecular insights for the new millennium. *Neurotoxicology* 23: 503-514.
- Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A, Long LK, Bryant S, Lewin A, Lira SA, Barbacid M (1994) Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 368: 246-249.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, Moore DJ, Liang Y, West AB, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (2005) Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18676-18681.
- Soares-da-Silva P (1988) Evidence for dopaminergic co-transmission in dog mesenteric arterial vessels. *Br J Pharmacol* 95: 218-224.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995) *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. San Francisco.
- Solano SM, Miller DW, Augood SJ, Young AB, Penney JB, Jr. (2000) Expression of alpha-synuclein, parkin, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 mRNA in human brain: genes associated with familial Parkinson's disease. *Ann Neurol* 47: 201-210.
- Sone M, Yoshida M, Hashizume Y, Hishikawa N, Sobue G (2005) alpha-Synuclein-immunoreactive structure formation is enhanced in sympathetic ganglia of patients with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 110: 19-26.
- Song DD, Shults CW, Sisk A, Rockenstein E, Masliah E (2004) Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP. *Exp Neurol* 186: 158-172.
- Sonsalla PK, Heikkila RE (1986) The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Eur J Pharmacol* 129: 339-345.
- Specht CG, Schoepfer R (2001) Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci* 2: 11.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6469-6473.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-840.
- Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, Sulzer D, Greene LA (2001) Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci* 21: 9549-9560.
- Stefanis L, Wang Q, Oo T, Lang-Rollin I, Burke RE, Dauer WT (2004) Lack of alpha-synuclein does not alter apoptosis of neonatal catecholaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 20: 1969-1972.
- Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA, Kaplan DR (1994) Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 12: 691-705.
- Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LS (2005) Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307: 1282-1288.
- Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277: 567-570.

- Sundstrom E, Luthman J, Goldstein M, Jonsson G (1988) Time course of MPTP-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system in C57 BL/6 mice. *Brain Res Bull* 21: 257-263.
- Sundstrom E, Samuelsson EB (1997) Comparison of key steps in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in rodents. *Pharmacol Toxicol* 81: 226-231.
- Sundstrom E, Stromberg I, Tsutsumi T, Olson L, Jonsson G (1987) Studies on the effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in C57BL/6 mice. Comparison with three other strains of mice. *Brain Res* 405: 26-38.
- Sveinbjornsdottir S, Hicks AA, Jonsson T, Petursson H, Gugmundsson G, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K (2000) Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 343: 1765-1770.
- Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Arigo SM, Takahashi K, Ariga H (2004) DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 5: 213-218.
- Takatsu H, Nishida H, Matsuo H, Watanabe S, Nagashima K, Wada H, Noda T, Nishigaki K, Fujiwara H (2000) Cardiac sympathetic denervation from the early stage of Parkinson's disease: clinical and experimental studies with radiolabeled MIBG. *J Nucl Med* 41: 71-77.
- Takenouchi T, Hashimoto M, Hsu LJ, Mackowski B, Rockenstein E, Mallory M, Masliah E (2001) Reduced neuritic outgrowth and cell adhesion in neuronal cells transfected with human alpha-synuclein. *Mol Cell Neurosci* 17: 141-150.
- Tanner CM (1992) Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin* 10: 317-329.
- Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R, Langston JW (1999) Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* 281: 341-346.
- Tatton NA, Kish SJ (1997) In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* 77: 1037-1048.
- Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N (2003) Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol* 53 Suppl 3: S61-S70.
- Tellioglu T, Robertson D (2001) Genetic or acquired deficits in the norepinephrine transporter: current understanding of clinical implications. *Expert Rev Mol Med* 2001: 1-10.
- Tessarollo L, Tsoulfas P, Donovan MJ, Palko ME, Blair-Flynn J, Hempstead BL, Parada LF (1997) Targeted deletion of all isoforms of the *trkC* gene suggests the use of alternate receptors by its ligand neurotrophin-3 in neuronal development and implicates *trkC* in normal cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14776-14781.
- Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA (2000) The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci* 20: 9207-9214.
- Thiruchelvam MJ, Powers JM, Cory-Slechta DA, Richfield EK (2004) Risk factors for dopaminergic neuron loss in human alpha-synuclein transgenic mice. *Eur J Neurosci* 19: 845-854.
- Thoenen H, Tranzer JP (1968) Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-Hydroxydopamine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 261: 271-288.
- Tiunova AA, Anokhin KV, Saha AR, Schmidt O, Hanger DP, Anderton BH, Davies AM, Ninkina NN, Buchman VL (2000) Chicken synucleins: cloning and expression in the developing embryo. *Mech Dev* 99: 195-198.

- Tomkins CE, Edwards SN, Tolkovsky AM (1994) Apoptosis is induced in post-mitotic rat sympathetic neurons by arabinosides and topoisomerase II inhibitors in the presence of NGF. *J Cell Sci* 107 (Pt 6): 1499-1507.
- Tsuboi K, Grzesiak JJ, Bouvet M, Hashimoto M, Masliah E, Shults CW (2005) Alpha-synuclein overexpression in oligodendrocytic cells results in impaired adhesion to fibronectin and cell death. *Mol Cell Neurosci* 29: 259-268.
- Uéda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11282-11286.
- Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S (1996) Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* 271: 23512-23519.
- Unoki M, Nakamura Y (2001) Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 20: 4457-4465.
- Uversky VN (2003) A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. *J Biomol Struct Dyn* 21: 211-234.
- Uversky VN, Li J, Fink AL (2001) Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS Lett* 500: 105-108.
- Vaillant AR, Mazzoni I, Tudan C, Boudreau M, Kaplan DR, Miller FD (1999) Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J Cell Biol* 146: 955-966.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304: 1158-1160.
- Valette H, Syrota A, Deleuze P, Crouzel C, Delforge J, Fuseau C, Loisanche D (1995) Late sympathetic reinnervation and normalization of canine myocardial beta-adrenergic receptor density following denervation. *J Nucl Med* 36: 1727.
- van der PH, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S, Kauffmann S, Hofele K, Spooren WP, Ruegg MA, Lin S, Caroni P, Sommer B, Tolnay M, Bilbe G (2000) Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci* 20: 6021-6029.
- van Duijn CM, Dekker MC, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ, Testers L, Breedveld GJ, Horstink M, Sandkuijl LA, van Swieten JC, Oostra BA, Heutink P (2001) Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* 69: 629-634.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70: 535-602.
- Verdi JM, Anderson DJ (1994) Neurotrophins regulate sequential changes in neurotrophin receptor expression by sympathetic neuroblasts. *Neuron* 13: 1359-1372.
- Vetter ML, Martin-Zanca D, Parada LF, Bishop JM, Kaplan DR (1991) Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5650-5654.
- Vila M, Przedborski S (2003) Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 4: 365-375.

- Vila M, Vukosavic S, Jackson-Lewis V, Neystat M, Jakowec M, Przedborski S (2000) Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP. *J Neurochem* 74: 721-729.
- Viswanath V, Wu Y, Boonplueang R, Chen S, Stevenson FF, Yantiri F, Yang L, Beal MF, Andersen JK (2001) Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *J Neurosci* 21: 9519-9528.
- von Coelln R, Thomas B, Savitt JM, Lim KL, Sasaki M, Hess EJ, Dawson VL, Dawson TM (2004) Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10744-10749.
- Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA, Takahashi H (2000) Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 47: 521-523.
- Wakabayashi K, Matsumoto K, Takayama K, Yoshimoto M, Takahashi H (1997) NACP, a presynaptic protein, immunoreactivity in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 239: 45-48.
- Wakabayashi K, Takahashi H (1997) Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 38 Suppl 2: 2-7.
- Wallace RA, Boldry R, Schmittgen T, Miller D, Uretsky N (1984) Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP) on monoamine neurotransmitters in mouse brain & heart. *Life Sci* 35: 285-291.
- Watanabe T, Ono Y, Taniyama Y, Hazama K, Igarashi K, Ogita K, Kikkawa U, Nishizuka Y (1992) Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10159-10163.
- Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT, Jr. (1996) NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35: 13709-13715.
- Whitworth AJ, Wes PD, Pallanck LJ (2006) *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. *Drug Discov Today* 11: 119-126.
- Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J (1989) The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 246: 670-673.
- Wyatt S, Davies AM (1995) Regulation of nerve growth factor receptor gene expression in sympathetic neurons during development. *J Cell Biol* 130: 1435-1446.
- Wyatt S, Pinon LG, Ernfors P, Davies AM (1997) Sympathetic neuron survival and TrkA expression in NT3-deficient mouse embryos. *EMBO J* 16: 3115-3123.
- Xia XG, Harding T, Weller M, Bieneman A, Uney JB, Schulz JB (2001) Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10433-10438.
- Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA, Greenberg ME (1998) Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 18: 1946-1955.
- Yamada M, Ohnishi H, Sano S, Nakatani A, Ikeuchi T, Hatanaka H (1997) Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J Biol Chem* 272: 30334-30339.
- Yamazaki K, Wakasugi N, Tomita T, Kikuchi T, Mukoyama M, Ando K (1988) Gracile axonal dystrophy (GAD), a new neurological mutant in the mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 187: 209-215.

- Yan KS, Kuti M, Yan S, Mujtaba S, Farooq A, Goldfarb MP, Zhou MM (2002) FRS2 PTB domain conformation regulates interactions with divergent neurotrophic receptors. *J Biol Chem* 277: 17088-17094.
- Yavich L, Jakala P, Tanila H (2006) Abnormal compartmentalization of norepinephrine in mouse dentate gyrus in alpha-synuclein knockout and A30P transgenic mice. *J Neurochem*.
- Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H (2003) Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 1342-1348.
- Zarepari S, Camicioli R, Sexton G, Bird T, Swanson P, Kaye J, Nutt J, Payami H (2002) Age at onset of Parkinson disease and apolipoprotein E genotypes. *Am J Med Genet* 107: 156-161.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez TE, Del Ser T, Munoz DG, De Yebenes JG (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55: 164-173.
- Zhang JM, Dix J, Langtimm-Sedlak CJ, Trusk T, Schroeder B, Hoffmann R, Strosberg AD, Winslow JW, Sieber-Blum M (1997) Neurotrophin-3- and norepinephrine-mediated adrenergic differentiation and the inhibitory action of desipramine and cocaine. *J Neurobiol* 32: 262-280.
- Zhang JM, Sieber-Blum M (1992) Characterization of the norepinephrine uptake system and the role of norepinephrine in the expression of the adrenergic phenotype by quail neural crest cells in clonal culture. *Brain Res* 570: 251-258.
- Zhang Y, Dawson VL, Dawson TM (2000) Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 7: 240-250.
- Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM (2000) Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13354-13359.
- Zhou W, Hurlbert MS, Schaack J, Prasad KN, Freed CR (2000) Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in rat primary culture and immortalized mesencephalon-derived cells. *Brain Res* 866: 33-43.
- Zhou W, Schaack J, Zawada WM, Freed CR (2002) Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in primary human mesencephalic culture. *Brain Res* 926: 42-50.
- Zhuo H, Ichikawa H, Helke CJ (1997) Neurochemistry of the nodose ganglion. *Prog Neurobiol* 52: 79-107.
- Zimprich A, Muller-Myhsok B, Farrer M, Leitner P, Sharma M, Hulihan M, Lockhart P, Strongosky A, Kachergus J, Calne DB, Stoessl J, Uitti RJ, Pfeiffer RF, Trenkwalder C, Homann N, Ott E, Wenzel K, Asmus F, Hardy J, Wszolek Z, Gasser T (2004) The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *Am J Hum Genet* 74: 11-19.