



INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS "FEDERICO OLÓRIZ"
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL

AMINOPEPTIDASAS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

RAQUEL DURÁN OGALLA

NOVIEMBRE 2008



INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS "FEDERICO OLÓRIZ"
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**AMINOPEPTIDASAS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

Memoria presentada por

Raquel Durán Ogalla

para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada

Dirigida por los Doctores

Francisco Vives Montero

Francisco Alba Aragüez

Blas Morales Gordo

Noviembre 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Raquel Durán Ogalla
D.L.: GR. 2839-2008
ISBN: 978-84-691-8350-2

FRANCISCO VIVES MONTERO, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Granada, JOSÉ FRANCISCO ALBA ARAGÜEZ, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada y BLAS JESÚS MORALES GORDO, Profesor Asociado de la Universidad de Granada,

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta D^a RAQUEL DURÁN OGALLA para aspirar al Grado de Doctor, titulado “Aminopeptidasas y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas” se ha realizado bajo nuestra dirección y reúne los requisitos académicos, formales y de calidad necesarios como para que pueda ser defendido públicamente ante la Comisión que se constituya al efecto.

Granada, 10 de Octubre de 2008

Índice

ÍNDICE	1
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	9
1.1.1. Epidemiología.....	9
1.1.2. Enfermedad de Parkinson.....	12
1.1.2.1. Antecedentes.....	12
1.1.2.2. Diagnóstico clínico	12
1.1.2.3. Técnicas de neuroimagen	14
1.1.2.4. Análisis bioquímico y diagnóstico genético.....	15
1.1.2.5. Tratamiento	16
1.1.2.6. Tipos de enfermedad de Parkinson.....	22
1.1.2.6.1. Enfermedad de Parkinson familiar	23
1.1.2.6.2. Enfermedad de Parkinson esporádica.....	30
1.1.2.7. Etiología de la enfermedad de Parkinson esporádico.....	30
1.1.2.8. Importancia de los fenómenos de disfunción mitocondrial y estrés oxidativo	37
1.1.2.9. Alteración del metabolismo proteico y agregación proteica	39
1.1.2.10. Características comunes con otras enfermedades neurodegenerativas	40
1.1.3. Enfermedad de Huntington.....	42
1.1.3.1. Antecedentes.....	42
1.1.3.2. Patogénesis de la enfermedad de Huntington.....	43
1.1.3.3. Mecanismos implicados en la neurodegeneración de la EH	45
1.1.4. Enfermedad de Alzheimer	47
1.1.4.1. Antecedentes.....	47
1.1.4.2. Patogénesis de la enfermedad de Alzheimer	49
1.1.4.3. Mecanismos implicados en la neurodegeneración de la EA	55

1.2. ENFERMEDAD NEUROLÓGICA NO DEGENERATIVA	56
1.2.1. Enfermedad cerebrovascular o Ictus.....	56
1.2.1.1. Antecedentes.....	56
1.2.1.2. Etiología de la enfermedad cerebrovascular isquémica	57
1.2.1.3. Daños neurológicos asociados.....	59
1.3. AMINOPEPTIDASAS	61
1.3.1. Clasificación y nomenclatura	61
1.3.2. Localización y distribución	64
1.3.3. Fisiología y fisiopatología de las aminopeptidasas	65
1.3.4. Las aminopeptidasas en las enfermedades neurodegenerativas	74
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	79
2.1. HIPÓTEIS	79
2.2. OBJETIVOS	81
3. MATERIAL Y MÉTODOS	85
3.1. SUJETOS	85
3.2. MATERIAL	94
3.2.1. Equipo de análisis.....	94
3.2.2. Productos químicos	95
3.2.3. Disoluciones	97
3.3. MÉTODOS	100
3.3.1. Obtención de muestras de plasma sanguíneo	100
3.3.2. Método de determinación enzimática de las aminopeptidasas.....	100
3.3.3. Determinación de la concentración de proteínas.....	102
3.3.4. Determinación de la concentración de lípidos en plasma.....	103
3.3.5. Determinación de la concentración de lípidos peroxidados en plasma.....	106
3.3.6. Determinación de la concentración de lactato en plasma.....	107
3.3.7. Determinación de la concentración de α -sinucleína en plasma.....	109

3.3.8. Depleción de albúmina e IgG de plasma sanguíneo.....	110
3.3.9. SDS-PAGE e Inmunoblot de la alanina y la glutamato aminopeptidasas.....	111
3.3.10. PAGE nativa (non denaturing PAGE) de la alanina y la leucina aminopeptidasas	112
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	114
4. RESULTADOS	119
4.1. DESCRIPTIVA DE LOS INDIVIDUOS POR GRUPO.....	119
4.2. DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS POR EDAD, SEXO Y TRATAMIENTO RECIBIDO	120
4.2.1. Edad.....	120
4.2.2. Sexo	121
4.2.3. Tratamiento.....	121
4.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO	123
4.3.1. Actividad alanina aminopeptidasa.....	124
4.3.2. Actividad cistina aminopeptidasa.....	126
4.3.3. Actividad aspartato aminopeptidasa.....	128
4.3.4. Actividad glutamato aminopeptidasa	130
4.3.5. Actividad leucina aminopeptidasa.....	132
4.4. RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN LOS GRUPOS DE EP CON Y SIN TRATAMIENTO Y LOS FÁRMACOS ADMINISTRADOS.....	133
4.4.1. Actividad alanina aminopeptidasa.....	134
4.4.2. Actividad cistina aminopeptidasa.....	135

4.4.3. Actividad aspartato aminopeptidasa.....	136
4.4.4. Actividad glutamato aminopeptidasa	137
4.4.5. Actividad leucina aminopeptidasa.....	138
4.5. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE AMINOPEPTIDASAS POR SDS-PAGE/INMUNOBLOT Y PAGE NATIVA	139
4.5.1. Análisis cualitativo de los inmunoblots de la alanina y la glutamato aminopeptidasas	139
4.5.1.1. Grupos C y EPst	139
4.5.1.2. Grupos C y EH	142
4.5.2. Análisis cualitativo de PAGE-nativa de la alanina y la leucina aminopeptidasas	144
4.5.2.1. Grupos C y EPst	144
4.5.2.2. Grupos C y EH	146
4.6. α-SINUCLÉINA CIRCULANTE EN LOS GRUPOS DE EP Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA PLASMÁTICA	148
4.7. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LÍPIDOS PEROXIDADOS Y ÁCIDO LÁCTICO COMO MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	150
4.7.1. Concentración de lípidos plasmáticos	151
4.7.1.1. Colesterol total.....	151
4.7.1.2. Triglicéridos	153
4.7.1.3. Colesterol HDL	154
4.7.1.4. Colesterol LDL.....	156
4.7.2. Concentración plasmática de lípidos peroxidados	158
4.7.3. Concentración plasmática de ácido láctico.....	160

4.8. RELACIÓN ENTRE EL ESTADO OXIDATIVO EN LOS GRUPOS DE EP CON Y SIN TRATAMIENTO Y LA TERAPIA ANTIPARKINSONIANA	164
4.8.1. Concentración plasmática de lípidos peroxidados	164
4.8.2. Concentración plasmática de ácido láctico.....	165
4.9. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	166
4.9.1. Actividad alanina aminopeptidasa.....	167
4.9.2. Actividad cistina aminopeptidasa.....	168
4.9.3. Actividad aspartato aminopeptidasa.....	168
4.9.4. Actividad glutamato aminopeptidasa	169
4.9.5. Actividad leucina aminopeptidasa.....	170
4.10. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LÍPIDOS PEROXIDADOS Y ÁCIDO LÁCTICO EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	170
4.10.1. Concentración plasmática de lípidos peroxidados.....	171
4.10.2. Concentración plasmática de ácido láctico.....	171
5. DISCUSIÓN	175
5.1. SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO	179
5.2. SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA Y EL TRATAMIENTO ANTIPARKINSONIANO EN EL GRUPO EPct	188
5.3. SOBRE LA α-SINUCLEÍNA CIRCULANTE EN LA EP Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA PLASMÁTICA	189

5.4. SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LÍPIDOS PEROXIDADOS Y LACTATO COMO MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	191
5.5. SOBRE EL ESTADO OXIDATIVO EN LOS GRUPOS EP CON Y SIN TRATAMIENTO Y LA TERAPIA ANTIPARKINSONIANA.....	197
5.6. SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	199
5.7. SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LÍPIDOS PEROXIDADOS Y LACTATO EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	201
6. CONCLUSIONES	205
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	211
8. ABREVIATURAS	243
9. BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY	253

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

1.1.1. Epidemiología

La prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas se está viendo incrementada de manera progresiva con la edad de la población general. El siglo XXI está siendo testigo de un cambio demográfico importante en la población de los países industrializados, seguida por un cambio similar en el aumento de la esperanza de vida de aquellos en vías de desarrollo, de Asia, África y América Central y del Sur. La calidad de vida de la población senil, a grandes rasgos, viene determinada por los procesos normales relacionados con la edad, que ocurren en las neuronas del sistema nervioso central, y especialmente, por el acontecimiento de enfermedades caracterizadas por una pérdida neuronal acelerada, tradicionalmente denominadas como neurodegenerativas. Estas enfermedades son, hasta el momento, de las principales contribuidoras a la discapacidad y a la enfermedad en la población humana.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia, seguida de la enfermedad de Parkinson (EP). Por el contrario, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Huntington (EH) afecta a un número muy reducido de individuos, aunque con consecuencias devastadoras. Además, existen otras enfermedades neurodegenerativas raras que producen efectos muy similares en los pacientes y en las familias que las padecen. En gran medida, el conocimiento sobre estas enfermedades ha sido impulsado por los avances en genética, desde que se supo que algunas mutaciones estaban relacionadas con su aparición. Aquí se incluyen las formas familiares de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la demencia fronto-temporal, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Huntington. Sin embargo, la gran mayoría de los casos de las enfermedades neurodegenerativas más comunes son esporádicos, influenciadas por factores ambientales, aun no bien caracterizados, y una posible predisposición genética (Tang-Wai et al., 2005).

Todos los estudios epidemiológicos actuales sobre la EA se han realizado utilizando criterios clínicos para su diagnóstico. Los criterios clínicos se han modificado

progresivamente y en los últimos estudios los más utilizados han sido el DSM-III-R (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition, Revised), el DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition), el ICD-10 (International Classification of Diseases and Related Health Problems) y los NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association). La incorporación de los nuevos criterios diagnósticos ha mejorado la correlación entre el diagnóstico clínico y el diagnóstico anatomopatológico, pasando de una certeza de un 50% antes de su aplicación, a un 80% de certeza en el momento actual.

Existen un gran número de estudios de prevalencia de la EA, en los que a pesar de la utilización de los mismos criterios diagnósticos, las tasas presentan grandes variaciones que sobretodo dependen de la metodología utilizada para el cribaje y el ajuste en los criterios diagnósticos.

Todos los trabajos señalan un incremento exponencial de la prevalencia con la edad, que se dobla cada 4,5 años a partir de los 65 años. Este incremento también se ha observado en los países en vías de desarrollo, aunque las diferencias son más importantes que en los países desarrollados. Las cifras globales de prevalencia ajustadas por edad oscilan entre el 1,0 y el 1,8%.

La prevalencia de demencia en personas de 65 o más años en el grupo EURODERM, que incluyó 11 estudios realizados en Europa, en la década de los años noventa, mostró que el 53,7% de los casos de demencia correspondían a la EA, lo que supone una prevalencia del 4,4%. En el mismo estudio se observó una correlación entre el incremento de la prevalencia y la edad, con un crecimiento mayor para el sexo femenino. La mayoría de estudios indican mayor prevalencia de la EA en mujeres, y que ésta va aumentando a medida que envejece la población. Diversas hipótesis pretenden explicar las divergencias entre sexos. Por un lado se atribuyen a la diferencia en la tasa de mortalidad y, por otro, al mayor número de mujeres que alcanzan estadios más severos de la enfermedad y a factores endocrinos y/o genéticos.

En cuanto a la incidencia, los datos muestran que la EA aumenta con la edad, y que el número de casos se multiplica por 3 cada 10 años a partir de los 65 años. La tasa de

incidencia total oscila entre un 10,3/1.000 y un 39,1/1.000 casos anuales en mayores de 65 años, dependiendo de la metodología utilizada y la zona geográfica en la que se ha llevado a cabo el estudio (López-Pousa, 2002).

La enfermedad de Parkinson (EP) ocupa el segundo lugar de enfermedades neurodegenerativas con mayor prevalencia, y el primero en desórdenes que afectan al movimiento. Frecuentemente se observa en edades por encima de los 60 años, afectando al 1% de este grupo de edad. Parece predominar en varones, con una modesta relación 1,5:1, aunque depende de los estudios epidemiológicos consultados, y a día de hoy, no se la considera como una enfermedad influenciada por el sexo. La prevalencia global es de 1,6 por cada 100 habitantes. Ésta varía si se fragmenta por edades, afectando a un 0,5-1% de la población entre 65-69 años y a un 3% de personas de más de 79 años. Con la edad aumenta la prevalencia siendo del 3,1% en sujetos entre 75 y 84 años (Goetz et al., 2005).

Numerosos estudios poblacionales han documentado que la EP es más común en los países industrializados, y más frecuente en Europa y América del Norte. Algunos estudios sugieren que un consumo continuo de agua de pozo y una exposición crónica a productos químicos industriales, hidrocarburos, manganeso y pesticidas o herbicidas incrementan el riesgo de desarrollarla. Por el contrario, este riesgo parece disminuir en individuos fumadores y consumidores de café.

La incidencia anual oscila entre los 4,5 y 21 casos por cada 100.000 habitantes, siendo la edad media de inicio de la enfermedad entre los 55 y los 60 años, aunque dos tercios de los pacientes inician los síntomas entre los 50 y 70 años (Jiménez-Jiménez et al., 1998).

Los datos epidemiológicos de la enfermedad de Huntington (EH) se obtienen principalmente a través de los estudios de familias afectadas. Los numerosos estudios de prevalencia efectuados en Europa han llegado a la conclusión de un origen noreuropeo de la mutación que conduce a la EH. La mayoría de los países aportan una prevalencia de entre 3 y 5 casos por 100.000 habitantes.

Desde que se conoce el mecanismo de la mutación de la EH, por expansión del triplete CAG, ha quedado establecido que los casos de EH aparecidos *de novo* se producen a partir de individuos que tienen alelos intermedios entre los normales y los patológicos. En todas las poblaciones existe una pequeña proporción de individuos afectados por esta situación. A partir de estos sujetos y tras varias generaciones y pequeñas expansiones de estos tripletes CAG se alcanzaría así una expansión cuyo tamaño sería ya capaz de producir la enfermedad (Calopa et al., 1998).

1.1.2. Enfermedad de Parkinson

1.1.2.1. Antecedentes

La EP es una alteración neurodegenerativa que afecta al movimiento, con una prevalencia aproximadamente de 1% en la población mayor de 65 años. Clínicamente se caracteriza por presentar una serie de síntomas cardinales como bradiquinesia, temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural. Un gran número de pacientes sufren también de alteraciones autónomas, cognitivas y psiquiátricas (Moore et al., 2005). Los principales síntomas derivan de una pronunciada y selectiva pérdida de neuronas dopaminérgicas (DA) en la parte compacta de la Sustancia Negra (SNpc). Los marcadores patológicos de la enfermedad son unas inclusiones intracitoplasmáticas formadas por agregados de α -sinucleína, llamadas cuerpos de Lewy, y neuritas distróficas que dan lugar a las neuritas de Lewy (Cookson, 2005), que se observan en las neuronas supervivientes.

1.1.2.2. Diagnóstico clínico

El diagnóstico de la EP se efectúa fundamentalmente por la clínica. En general, no presenta demasiadas complicaciones en aquellos pacientes con presencia de los signos cardinales típicos de la enfermedad y con una buena respuesta al tratamiento con levodopa. Sin embargo, el diagnóstico diferencial frente a determinados parkinsonismos puede ser más complejo, sobre todo en los estadios más tempranos de la enfermedad, cuando los signos y síntomas de las diferentes formas de parkinsonismo tienden a superponerse. Se calcula que dentro de los 5 primeros años desde su aparición, el diagnóstico clínico de la enfermedad es correcto en un 65% de los casos. Tras una

duración media de 12 años, el diagnóstico definitivo se confirma por autopsia en un 76% de los casos (Tolosa et al., 2006). Esto indica que hay un número importante de pacientes mal diagnosticados. Aunque la sensibilidad y la especificidad de los criterios de diagnóstico son elevadas, aproximadamente un 15% de los pacientes diagnosticados con EP no cumplen los criterios clínicos de la enfermedad, y alrededor de un 20% de los que han recibido atención médica, no han sido bien diagnosticados. Según estudios clínico-patológicos, los errores de diagnóstico más comunes hacen referencia a otras formas de parkinsonismo degenerativas, como la parálisis supranuclear progresiva, la atrofia multisistémica o la degeneración corticobasal. Otros errores frecuentes son el temblor esencial, el parkinsonismo inducido por fármacos y el parkinsonismo vascular. Además, resulta difícil distinguir entre la enfermedad de Parkinson con demencia y la demencia con cuerpos de Lewy.

Un diagnóstico correcto es un requisito necesario para llevar a cabo una intervención terapéutica y un asesoramiento adecuado en el paciente. Lo más importante es realizar un diagnóstico clínico diferencial, que permita distinguir la enfermedad de Parkinson de otros síndromes parkinsonianos. Para hacer un buen diagnóstico diferencial existen una serie de criterios clínicos. De ellos, los criterios más utilizados son los del “Banco de Cerebros de la Asociación de Enfermedad de Parkinson del Reino Unido (UKPDSBB)” (Gelb et al., 1999; Tapia-Núñez et al., 2004). Se pueden dividir en:

- *Signos motores cardinales*: temblor de reposo distal, rigidez, bradiquinesia, inicio asimétrico del movimiento.
- *Respuesta a la levodopa*. Es un requisito esencial para el diagnóstico diferencial de la EP, pero no exclusivo, ya que a veces puede aparecer en los estadios iniciales de otros parkinsonismos atípicos.
- *Ausencia de síntomas atípicos*: inestabilidad postural precoz, fenómeno de *freezing* precoz, alucinaciones no relacionadas con la farmacoterapia, demencia precoz, parálisis de la mirada vertical, etc.

La combinación de estos parámetros clínicos hace que el diagnóstico sea posible, probable o definitivo. Además del uso de estos criterios, el estudio puede completarse

con otros métodos de diagnóstico secundarios, principalmente diagnóstico por imágenes, y en algunas ocasiones diagnóstico genético. No obstante, el diagnóstico de la EP sigue siendo clínico y se basa fundamentalmente en la exploración neurológica.

Debido al carácter progresivo de la EP, y una vez realizado el diagnóstico, resulta útil identificar y/o hacer un seguimiento del estadio evolutivo del paciente, con el fin de llevar a cabo una mejor atención terapéutica y de vigilancia. Hoehn y Yahr establecieron, en la época previa a la levodopa, cinco estadios evolutivos (Hoehn et al., 1967). En la actualidad, esta clasificación, aunque sigue vigente, se completa con la escala UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale). Es un instrumento de clasificación mucho más preciso y evalúa diferentes aspectos de la enfermedad: 1) Conocimiento, conducta y estado de ánimo; 2) actividades de la vida diaria; y 3) habilidades motoras. Se desarrolla por medio de una entrevista entre el paciente y el facultativo. Cada parámetro recibe una puntuación que suele ir de 0 a 4, aumentando en función del grado de severidad al evaluarlo. La puntuación máxima es de 199 puntos y se corresponde con un grado de incapacidad absoluta.

1.1.2.3. Técnicas de neuroimagen

Hoy día, las técnicas de diagnóstico por imágenes proporcionan una ayuda útil para realizar un diagnóstico definitivo de la enfermedad, aunque no todas comparten la misma sensibilidad. La imagen estructural del cerebro con la tomografía axial computarizada (TAC) suele ser normal en la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, puede ser útil para descartar otras formas de parkinsonismo como el parkinsonismo vascular. La resonancia magnética (RM) tiene un mayor poder de diagnóstico, aunque la sensibilidad de la técnica generalmente no supera el 60-80%. Se puede apreciar un vacío de señal en la sustancia negra de algunos pacientes con EP, pero no constituye un marcador específico. La tomografía computarizada por emisión de fotones (SPECT cerebral) es un método diagnóstico que está adquiriendo una gran difusión. Se usan varios marcadores radiactivos; unos son análogos a la dopamina y se unen al transportador cerebral de este neurotransmisor (DAT). Los dos más usados son el β -CIT y el FP-CIT. Diferentes estudios han mostrado una reducción en la unión de estos marcadores al transportador, sobre todo en estadios muy tempranos de la enfermedad de Parkinson (Tolosa et al., 2006). Por tanto pueden funcionar como un marcador de la

enfermedad, con un potencial diagnóstico diferencial para otros parkinsonismos. Otros marcadores se unen a los distintos tipos de receptores dopaminérgicos. Uno de los primeros utilizados es el IBZM (Iodine-123 labelled 3-yodo-6-methoxybenzamide), que se une al receptor D2. Parece ser que esta unión es más baja en aquellos casos de parkinsonismo con daño estriatal. La tomografía por emisión de positrones (PET cerebral) se considera, dentro de las técnicas de neuroimagen, una de las más fiables, tanto para confirmar la presencia de EP como para hacer una valoración de su evolución (Werner, 2006). El marcador que más se utiliza es el 18F-dopa (fluorine-18-labelled-dopa) y sirve como indicador de la actividad descarboxilasa presente en las terminaciones dopaminérgicas del estriado. La disminución en su captación se relaciona también con la pérdida de neuronas de la sustancia negra, y se observa que los síntomas clínicos de la enfermedad aparecen cuando esta reducción supera el 50% de los valores normales. Esto explica que el 10% de individuos enfermos presenten un PET normal, sobre todo si se realiza en estadios iniciales de la enfermedad. Otro marcador es el FDG (18-fluorodeoxyglucose), capaz de detectar el hipometabolismo estriatal, y permite distinguir la atrofia multisistémica y la parálisis supranuclear progresiva de la EP. Sin embargo, siendo uno de los mejores métodos diferenciales presentes hasta ahora, su disponibilidad está muy restringida debido al alto coste, de ahí que no pueda ser utilizado en la población general y esté limitado solo a aquellos casos en los que hay sospechas de EP familiar.

1.1.2.4. Análisis bioquímico y diagnóstico genético

El avance en las técnicas de neuroimagen no ha ido acompañado de un desarrollo paralelo de pruebas bioquímicas específicas de la EP. Actualmente no hay pruebas séricas o urinarias que permitan confirmar el diagnóstico de la EP, inclusive en pacientes sintomáticos. Sólo el screening genético, en pacientes con EP de aparición temprana, puede confirmar la EP familiar en casos muy concretos en los que las mutaciones son conocidas, pero este grupo solo supone una pequeña proporción. Con el objeto de estudiar a nivel periférico los mecanismos moleculares que ocurren en la EP, algunos autores han caracterizado en sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR) marcadores de estrés oxidativo (Serra et al., 2001; Sohmiya et al., 2004; Prigione et al., 2006) y varias isoformas de la α -sinucleína (El-Agnaf et al., 2006; Lee et al., 2006a), cuyas concentraciones están alteradas con respecto a sujetos sanos. Recientemente,

otros autores han descrito una serie de factores de riesgo para desarrollar EP, basándose en un barrido exhaustivo de cambios en la expresión de genes en sangre de individuos con EP en estadios iniciales (Scherzer et al., 2007; Shaw et al., 2007). Sin embargo, a pesar de la importancia científica, a día de hoy, estos estudios experimentales no tienen utilidad clínica.

El diagnóstico genético es una técnica poco utilizada en la práctica clínica. Aunque para investigación tiene un papel muy importante, ya que permite conocer los mecanismos moleculares responsables de la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Se puede utilizar para detectar mutaciones en el gen *parkin* en aquellos casos en los que la aparición de la enfermedad es muy temprana y los individuos responden a la levodopa. Sin embargo, la probabilidad de identificar mutaciones en el gen *parkin* es menor de un 5% en los casos esporádicos y con un comienzo anterior a los 45 años. Esta probabilidad aumenta cuando la enfermedad aparece antes de los 30 y en individuos con un hermano afectado. La confirmación de esta forma recesiva de la enfermedad podría ser de gran ayuda para proporcionar un asesoramiento genético. Los tests para detectar duplicaciones o triplicaciones en el gen de la α -sinucleína son menos frecuentes, ya que no es una causa común de la enfermedad de Parkinson. Las mutaciones en *LRRK2* se han identificado en un 5-6% de los pacientes con un patrón de herencia autosómico dominante de la enfermedad. Cuando se hace un cribado para estas mutaciones, en una población con aparentemente parkinson esporádico, se obtienen resultados positivos en un 1-6% de los casos. Estos resultados sugieren que un test genético para este gen podría ser importante en el diagnóstico y asesoramiento de los pacientes con enfermedad de Parkinson. Actualmente, la posibilidad de acceder a estas técnicas de diagnóstico para las mutaciones más comunes en los dos genes *parkin* y *LRRK2*, está limitada a centros de investigación y suelen tener un elevado coste (ver descripción detallada más adelante, en el apartado “Enfermedad de Parkinson familiar”).

1.1.2.5. Tratamiento

Las tres principales estrategias que están permitiendo avanzar en el tratamiento médico de la enfermedad de Parkinson se centran en la mejora de terapias dopaminérgicas (incluyendo aquellas que faciliten el control y la prevención de la aparición de complicaciones motoras), la identificación de fármacos no dopaminérgicos que mejoren

la sintomatología y el descubrimiento de compuestos que modifiquen el curso de la enfermedad.

El tratamiento de la EP está orientado a contrarrestar la pérdida de la función de la dopamina en el cerebro, que es primordial. La terapia sustitutiva de dopamina (DA) es el primer tratamiento aplicado desde principios de los años sesenta (Schapira et al., 2006). La levodopa, un precursor de la dopamina, que se administra de forma oral, al llegar al cerebro, por acción de la enzima DDC (dopa-decarboxilasa) se convierte en dopamina. Inicialmente este fármaco es altamente efectivo, revierte los síntomas motores de la enfermedad, y los pacientes pierden la rigidez y recuperan la capacidad normal del movimiento. Sin embargo, hay una elevada proporción de enfermos, que con el tiempo, experimentan una reducción de la mejoría y desarrollan fenómenos de “on-off” (periodos de movilidad seguidos de una repentina pérdida de ella), “go-going” (rápidas oscilaciones o balanceo entre los periodos de movilidad y de disquinesia), distonía matinal y picos de disquinesia (movimientos incontrolados) (Drucker-Colín et al., 2004). Por otra parte, los agonistas dopaminérgicos parecen producir menos efectos a largo plazo. Actualmente, se administran junto con levodopa, en combinación con inhibidores de la COMT (catecol-O-metil transferasa) y de la MAO-B (mono-amino oxidasa B), enzimas implicadas en el metabolismo de la DA.

En los últimos años se ha discutido el papel tóxico de la levodopa y su posible contribución en la patogénesis de la enfermedad (Agid, 1998). La levodopa se metaboliza rápidamente a dopamina en el SNC. Durante este proceso se generan moléculas de peróxido de hidrógeno, las cuales, en presencia de hierro, abundante en las neuronas de la SN, pueden transformarse en radicales hidroxilo. Estas especies reactivas son altamente tóxicas, dañando no solo al ADN, sino también a proteínas y lípidos de membrana. Por tanto, los compuestos peroxidados de los enfermos de Parkinson, podrían verse alterados por el posible efecto oxidante de este tratamiento. La levodopa parece ser tóxica en cultivos de neuronas dopaminérgicas (Mytilineou et al., 1993). Sin embargo, no hay evidencias de estudios *in vivo* que sugieran que este fármaco dañe a las neuronas de la SNpc de enfermos de Parkinson (Olanow, 2004). En un trabajo publicado por nuestro grupo, demostramos un incremento en la concentración de peróxidos lipídicos (LPO), en plasma de enfermos de Parkinson, comparados con un grupo control (Agil et al., 2006). Además, encontramos una correlación negativa, dosis-

dependiente, entre los LPO y la dosis de levodopa administrada a cada individuo. Esto puede indicar que la levodopa actuaría como antioxidante en plasma y de esta forma frenaría la progresión de la enfermedad. Otro trabajo publicado el mismo año encontró resultados similares, otorgándole también una posible función protectora (Prigione, et al., 2006). Sin embargo, los estudios previos no habían descrito correlaciones significativas entre la dosis de levodopa y el estado oxidativo basal, medido como % de coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) en plasma (Sohmiya et al., 2004), malonil-di-aldehído (MDA) en suero (Ihara et al, 1999), radicales hidroxilo en sangre y superóxido dismutasa (SOD) en plasma (Ahlskog et al., 1995). No obstante, se requiere de una investigación más exhaustiva que estudie estos mismos efectos a nivel central y que los evalúe durante la progresión de la enfermedad.

Debido a las complicaciones motoras que aparecen tras un tratamiento prolongado con levodopa, actualmente se consideran otras alternativas como tratamiento inicial. Según los últimos estudios, la elección del tratamiento va a depender del estadio de la enfermedad en la que se encuentre el paciente en el momento del diagnóstico (Schoenfeld et al., 2003). Así, para estadios tempranos (1-2), la monoterapia con agonistas dopaminérgicos ofrece puntuaciones más bajas en la escala UPDRS, comparada con la monoterapia con levodopa y la combinada levodopa/agonistas dopaminérgicos. A partir del estadio 3, estos resultados se invierten, y ofrece mejores resultados la terapia combinada.

Los agonistas dopaminérgicos actúan sobre los receptores dopaminérgicos postsinápticos del estriado. Su efecto sintomático es menor que el de la levodopa, pero tienen una mayor duración de acción. Se ha demostrado que tienen propiedades neuroprotectoras, aunque se desconoce el mecanismo molecular responsable (Schapira et al., 2006). Entre los más utilizados se encuentran los derivados ergóticos bromocriptina, lisurida, pergolida y cabergolina, y los no ergóticos ropinirol y pramipexol.

Este tratamiento se complementa, sobre todo en estadios iniciales, con inhibidores de la MAO-B y de la COMT. La selegilina es uno de los inhibidores de la MAO-B más utilizados. Según diferentes ensayos, su administración puede retrasar el empleo de levodopa hasta 12 meses desde el diagnóstico de la enfermedad. Otro potente inhibidor

es la rasagilina. Ambos parecen tener efectos neuroprotectores, tanto en modelos de EP *in vitro* como *in vivo*, retrasando la progresión de la enfermedad (Schapira et al., 2006). Este papel es independiente de la función inhibidora sobre las enzimas. Como inhibidor de la COMT se suele utilizar el entacapone, que impide la degradación de la dopamina prolongando la duración del efecto de la levodopa.

Debido al carácter neurodegenerativo de la enfermedad, el tratamiento farmacológico tiene una duración limitada. Otra vía alternativa que se ha desarrollado en los últimos años es la terapia celular. Consiste, a grandes rasgos, en introducir injertos celulares que reimplanten la función de las células dopaminérgicas dañadas. Los primeros trasplantes autólogos que se hicieron en enfermos de Parkinson procedían de médula adrenal, pero apenas tuvieron éxito. Posteriormente esta técnica se ha ido perfeccionando, mejorando los síntomas motores como rigidez y aquinesia. Sin embargo, parece que la duración de esta mejoría es limitada, y suele desaparecer tras 1 o 2 años después del trasplante (Drucker-Colín et al., 2004). Otras técnicas de trasplante han utilizado tejido fetal procedente de abortos. Estas células son capaces de madurar y sobrevivir incluso hasta 8 años después de la intervención, ayudando a aliviar la sintomatología motora. Sin embargo plantea fuertes limitaciones, como son la dificultad de obtener tejido humano embrionario, ya que se requieren de 6 a 12 fetos por paciente, y problemas éticos que hacen que, en un gran número de países, estén prohibidas su utilización. Por este motivo, se han considerado otras fuentes celulares alternativas. Una posibilidad sería reparar el daño cerebral utilizando tejido embrionario procedente de otra especie animal. En un experimento pionero se utilizó tejido nervioso de cerdo para implantarlo en ratas con parkinsonismo experimental, dando resultados positivos. Las principales ventajas que ofrece este tipo de donante son un tamaño y desarrollo similar al cerebro humano. Sin embargo, el riesgo de infección o de rechazo inmunológico obliga a tomar precauciones importantes. Por último, una de las terapias más novedosas sería la utilización de células pluripotenciales adultas. Estas células inmaduras tienen la capacidad de diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares. A diferencia de las embrionarias, su utilización no plantearía problemas éticos, y al obtenerse del mismo individuo afectado se evitaría el rechazo inmunitario. Las investigaciones realizadas hasta el momento en modelos animales ofrecen resultados prometedores y abren una nueva ventana en la medicina regenerativa (Drucker-Colín et al., 2004).

A pesar del desarrollo farmacológico y de los avances en terapia celular, estos tratamientos sólo abordan la sintomatología de la EP. Hasta el momento no existe un tratamiento curativo que repare la función dopaminérgica o que detenga la progresión. Para avanzar en este camino habría que conocer todos los mecanismos moleculares que llevan a la muerte celular y la interacción entre ellos. Otra parte de las investigaciones realizadas trata de buscar marcadores moleculares que intenten predecir la aparición de la enfermedad o hacer un diagnóstico precoz. Y otra, desarrollar terapias neuroprotectoras. Éstas últimas se pueden definir como intervenciones clínicas que producen beneficios que perduran en el tiempo, y que previenen o retrasan la aparición de la enfermedad o su progresión (Werner, 2006). En este sentido se han llevado a cabo numerosos estudios, algunos con resultados esperanzadores.

Los factores neurotróficos son indispensables para el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de las neuronas. Tres de ellos, el GDNF (glial-derived nerve growth factor), el IGF (insulin-like growth factor) y el BDNF (brain-derived neurotrophic factor) son esenciales para las neuronas dopaminérgicas, y por ello se han sugerido como posibles agentes con función neuroprotectora (Chen et al., 2006). El GDNF se ha utilizado intraventricularmente en monos lesionados con MPTP (1-Metil 4-fenil 1,2,3,6 tetrahidropiridina), restaurando el sistema nigro-estriatal y mejorando las funciones motoras. Sin embargo no se han obtenido los mismos efectos en pacientes con EP (Gao et al., 2003; Schapira et al., 2006). El IGF prolonga la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas *in vitro*, promueve la recaptación de dopamina y previene la pérdida de células tirosin hidroxilasa (TH) positivas inducidas por 6-OHDA (6-hydroxydopamine) y otras toxinas. El BDNF, en cultivos de neuronas mesencefálicas, aumenta la proporción de células TH-positivas, induciendo la expresión de TH y el contenido en dopamina (Chen et al., 2006).

Dado que la inflamación contribuye en los procesos neurodegenerativos que tienen lugar en la EP, se han propuesto a los agentes anti-inflamatorios como terapia neuroprotectora. En diferentes modelos animales se ha observado que, inhibiendo la respuesta inflamatoria, se puede atenuar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Gao et al., 2003). La dexametasona, un anti-inflamatorio esteroideo, ha mostrado inhibir parcialmente la reacción microglial en cultivos neuronales inducidos

por MPTP y lipopolisacárido (LPS). No obstante, las limitaciones en el uso de esteroides han provocado un cambio hacia los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) en la terapia de la EP. El salicilato sódico (SS), un inhibidor no selectivo de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), parece reducir la degeneración dopaminérgica inducida por MPP⁺ (1-Metil-4-fenil piridina) en estriado. Este tipo de toxicidad es independiente de la prostaglandinas, lo que podría indicar que el SS actúa por un mecanismo diferente, probablemente inactivando radicales hidroxilo. Sin embargo, hasta el momento no hay evidencias sobre la eficacia neuroprotectora de los inhibidores de la COX en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En experimentos *in vitro*, el ibuprofeno protege de la toxicidad del glutamato a neuronas dopaminérgicas TH-positivas (Casper et al., 2000). La naloxona, un antagonista de los receptores opioides, protege a las neuronas dopaminérgicas contra el daño inflamatorio inducido por los lipopolisacáridos, inhibiendo la activación microglial y la producción de radicales superóxido. Otra clase de sustancias con propiedades anti-inflamatorias son los derivados de las tetraciclinas. Su acción anti-inflamatoria es completamente diferente a su acción antimicrobiana. La minociclina parece reducir la formación de interleukina-1 β (IL-1 β), e inhibir las enzimas óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y NADPH oxidasa, tres mediadores neurotóxicos claves derivados de la microglia activa, en neuronas dopaminérgicas tratadas con MPTP o 6-OHDA (Gao et al., 2003). Otras propiedades que la hacen especialmente atractiva en la terapia de la EP, es su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica e interferir en la activación de las enzimas que participan en la apoptosis celular. Hace 2 años se realizó un ensayo clínico en fase II, randomizado y a doble ciego, para comprobar la eficacia de la minociclina en ralentizar la progresión de la enfermedad durante un periodo de 12 meses en individuos con EP en fase temprana. Los resultados indicaron que, aunque era necesario un estudio a más largo plazo, podía ser incluida en un próximo ensayo clínico en fase III (NINDS-NET PD Investigators, 2006). Posteriormente, y siguiendo los criterios anteriores se decidió prolongar el estudio 6 meses más, a los 12 iniciales, para comprobar la seguridad del fármaco y su posible interacción con la terapia antiparkinsoniana. Los resultados demostraron que ni interfería en la respuesta de la terapia tradicional ni incrementaba los efectos adversos. No obstante hay que tener en cuenta su baja tolerabilidad para futuros ensayos (NINDS-NET PD Investigators, 2008).

Otra forma de neuroprotección es impedir los daños ocasionados por los fenómenos de estrés oxidativo, mediante el empleo de agentes antioxidantes. En este sentido se han realizado muchos estudios, algunos con resultados positivos tanto en modelos animales como en la EP. La vitamina E es un potente antioxidante que se ha usado, junto con el tratamiento tradicional, en la EP. El coenzima Q₁₀, otro antioxidante, y cofactor de la cadena de transporte electrónico, parece estabilizar la función mitocondrial. En ratones tratados con MPTP, previene la muerte de neuronas dopaminérgicas en estriado. También se han encontrado resultados beneficiosos en pacientes con EP, en estadios tempranos de la enfermedad (Hung et al., 2007). La creatina es un suplemento dietético que juega un papel muy importante en la producción de ATP mitocondrial. Sólo se ha comprobado su papel neuroprotector en modelos animales de Parkinson. La carnitina y la acetil-L-carnitina son dos compuestos químicos que participan en el metabolismo de los ácidos grasos facilitando su disponibilidad por la mitocondria. En cultivos neuronales sometidos a diferentes toxinas (MPTP y rotenona), retrasan la despolarización mitocondrial y estabilizan el potencial de membrana (Chen et al., 2006).

Aunque la mayoría de los resultados obtenidos con el empleo de una terapia neuroprotectora son experimentales, y están pendientes de una evaluación clínica más exhaustiva, no dejan de representar una esperanza para tratar la enfermedad en un futuro.

1.1.2.6. Tipos de enfermedad de Parkinson

Podemos destacar tres variedades en la enfermedad de Parkinson: esporádica, familiar, y iatrogénica. La variedad esporádica es la más frecuente. Su etiología no se conoce, pero se cree que están implicados tanto factores ambientales como una predisposición genética (Tolosa et al., 2006). Hasta hace una década se pensaba que esta enfermedad no tenía causas genéticas, sin embargo, en los últimos años se han identificado una serie de locus responsables de la forma mendeliana de la EP. La identificación de estos genes ha proporcionado nuevas líneas de investigación y está permitiendo un análisis más profundo de los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de la EP familiar. En ambos casos, el fenotipo específico de la enfermedad es el mismo, lo que lleva a pensar que puede existir un mecanismo molecular común (Gandhi et al., 2005). La tercera variedad, la yatrógena, aparece como un efecto adverso tras la administración

de determinados fármacos, entre los que destacan sulpiride, tiapride, metoclopramide y otros antipsicóticos atípicos. Sin embargo, esta presentación, junto con la familiar apenas suponen un 5 – 10% de los casos, de ahí que las investigaciones actuales se centren en analizar la contribución de los factores ambientales y no los genéticos, en el desarrollo de la forma esporádica del Parkinson.

1.1.2.6.1. Enfermedad de Parkinson familiar

Desde la descripción de la enfermedad en el siglo XIX, varias observaciones han descrito agrupamiento familiar en los pacientes que padecen EP. Una de las primeras observaciones sobre la importancia de los factores genéticos en la enfermedad de Parkinson fue realizada por Gowers, quien reconoció que existía una mayor prevalencia de desarrollar la enfermedad en parientes de enfermos de Parkinson (Schapira, 2006).

Los estudios epidemiológicos que evalúan la prevalencia del Parkinson son difíciles de desarrollar debido a la complejidad de realizar un diagnóstico clínico exacto, a la incapacidad para identificar casos presintomáticos y a la necesidad de una apropiada población control. Estudios con gemelos monocigóticos y dicigóticos demostraron que no existía una concordancia entre los hermanos monocigóticos y la EP, lo que sugiere que la contribución genética a la enfermedad no es importante. Sin embargo, cuando el inicio de la enfermedad era anterior a los 50 años, el índice de concordancia aumentaba, llegando a ser significativo. Otros estudios realizados con fluoro-dopa y PET cerebral, para visualizar la función dopaminérgica en parejas de gemelos afectados y no afectados, encontraron una alta concordancia en gemelos monocigóticos, respaldando la contribución genética en esta enfermedad.

La enfermedad de Parkinson familiar puede seguir un patrón de herencia autosómico dominante o recesivo. Se han identificado una serie de mutaciones genéticas y locus cromosómicos (ver tabla 1). El primer gen identificado en esta forma familiar, fue PARK1/ *α-sinucleína*, donde se observaron dos mutaciones puntuales A50T y A30P. Además de estas mutaciones, también se observaron repeticiones del gen, con triplicación del gen en un grupo de familiares con EP y temblor, y duplicación del gen en uno de cada cuarenta y dos casos con una aparición temprana de la enfermedad. La tercera mutación puntual, E46K, con herencia autosómica dominante, se identificó en

miembros de una familia que sufrían parkinsonismo y demencia de cuerpos de Lewy (Schapira, 2004).

	Inheritance	Locus	Onset	Lewy-bodies	Gene
Park 1	AD	4q21	40s	+	α -synuclein
Park 2	AR	6q25	20s	-	parkin
Park 3	AD	2p13	60s	+	?
Park 4	AD	4q21	30s	+	α -synuclein
Park 5	AD	4p15	50s	+	UCH-L1
Park 6	AR	1p35	30s	?	Pink-1
Park 7	AR	1p36	30s	?	DJ1
Park 8	AD	12p	variable	+/-	LRRK2
Park 9	AR	-	-	?	?
Park 10	AR	1p32	-	?	?
Park 11		2q36-37		?	?

Tabla 1. Locus asociados con la enfermedad de Parkinson familiar (Shapira, 2006).

La α -sinucleína es miembro de una pequeña familia de proteínas con solo tres integrantes más: la β -sinucleína, la γ -sinucleína y la sinoretina. En condiciones normales, la α -sinucleína se expresa en las neuronas, en un número limitado de áreas cerebrales, incluyendo las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Junto con la ubiquitina y la sinfilina-1, la α -sinucleína es el principal componente de los cuerpos de Lewy (Schapira, 2006). Estructuralmente la α -sinucleína humana está formada por una región anfipática N-terminal, que contiene seis repeticiones imperfectas (con el motivo general KTKEGV), una región central hidrofóbica, y una región ácida C-terminal (Moore et al., 2005). Carece de conformación secundaria o terciaria, sin embargo presenta una elevada plasticidad conformacional. Puede permanecer sin estructura, o formar especies monoméricas y oligoméricas, e incluso formar filamentos amiloidogénicos (ver figura 1). Las mutaciones de la α -sinucleína conllevan un incremento en la formación de protofibrillas, la forma más tóxica de la proteína, e inhiben la conversión de protofibrillas a fibrillas, una forma más inerte. Éstas últimas son las formas moleculares más abundantes en los cuerpos de Lewy, de ahí que algunos autores señalen un papel protector de estas inclusiones (Conway et al., 2001).

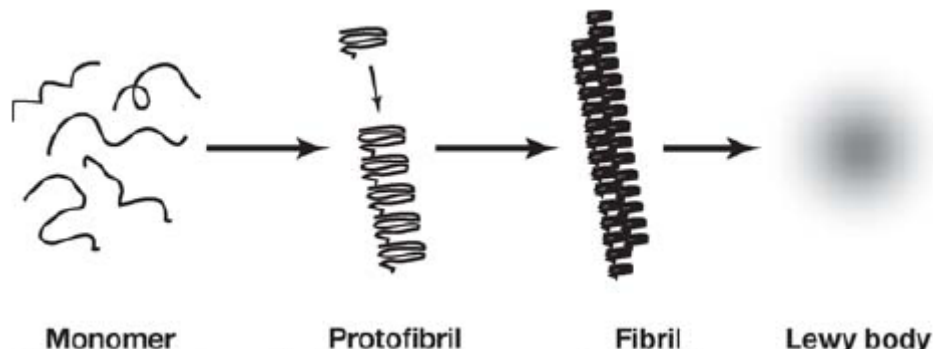


Figura. 1. Esquema de la fibrilogénesis de la α -sinucleína (Moore et al., 2005).

PARK2 codifica *parkin*, que funciona como una ligasa E3, “ubiquitinizando” (marcando) proteínas para su posterior destrucción en el proteosoma. Las primeras mutaciones en este gen se descubrieron en una familia japonesa, con un patrón de herencia autosómico recesivo y una aparición temprana de la enfermedad. Estas mutaciones son bastante frecuentes en la variedad familiar, encontrándose en un 50% de todos los casos, y en un 10% de aquellos donde aparece en edades muy tempranas. Parkin es una proteína de 465 aminoácidos, con una estructura modular, que contiene un dominio UBL N-terminal (N-terminal ubiquitin-like), una región central, y un dominio RING C-terminal. Funciona como una ligasa E3. Estas enzimas son una parte importante de la maquinaria celular que marcan a las proteínas diana con moléculas de ubiquitina (Moore et al., 2005). La ubiquitinización de proteínas es el resultado de tres pasos enzimáticos sucesivos: la activación de la ubiquitina (por enzimas E1), la conjugación (por enzimas E2) y la unión (por ligasas E3). En ciclos posteriores, se van uniendo más moléculas de ubiquitina dando lugar a una cadena de poli-ubiquitina formada por cuatro o más moléculas. Estas cadenas son reconocidas específicamente por la subunidad 26S del proteosoma preparándolas para la degradación. La ubiquitinización de proteínas no sólo es útil en procesos de degradación que van unidos al proteosoma, también tienen lugar en otros procesos celulares. Las mutaciones encontradas en este gen provocan una pérdida de función de parkin, alterando también su interacción con las enzimas E2 o sus sustratos, y reduciendo o incluso suprimiendo su actividad ligasa.

PARK5 codifica la *ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa L1* (UCH-L1). Esta enzima hidroliza las cadenas de ubiquitina generando monómeros libres, que pueden ser

recicladados para eliminar otras proteínas (Schapira, 2006). La primera mutación (I93M), en heterocigosis, fue encontrada en una pareja de hermanos de una familia alemana. Sin embargo estos portadores eran asintomáticos, lo que llevaba a pensar que esa variante no era patogénica o que causaba la enfermedad con una baja penetrancia. Posteriormente se identificó otra mutación (M124L), que tampoco desarrolló la enfermedad. Estudios posteriores han detectado nuevos polimorfismos. Esta gran variabilidad genética en UCH-L1 puede jugar un papel importante en la aparición de la enfermedad en los casos esporádicos. UCH-L1 es una proteína específica de las neuronas, muy abundante, que pertenece a una familia de enzimas desubiquitinizantes. Ocasionalmente puede funcionar como una proteína ligasa, manteniendo la homeostasis de la ubiquitina y promoviendo la estabilidad de los monómeros *in vivo*. La implicación de este gen en la enfermedad no se conoce por completo; parece que hay una reducción parcial de la función. Algunos investigadores han propuesto que UCH-L1 puede reciclar ubiquitina libre a partir de péptidos ubiquitinizados procedentes de la degradación de proteínas por el proteosoma. Una menor actividad podría reducir la disponibilidad de monómeros libres de ubiquitina, promoviendo la acumulación de proteínas dañadas a la espera de ser degradadas.

PARK6 codifica a *PINK1* (PTEN-induced kinase 1). Este gen se transcribe de forma constitutiva y parece codificar una proteína kinasa mitocondrial. Las primeras mutaciones se encontraron en una familia siciliana, responsables de desarrollar una forma recesiva de parkinsonismo de aparición temprana. Sin embargo, son mucho menos frecuentes que las que se dan en *parkin*. PINK1 es una proteína de 581 aminoácidos que contiene en su extremo N-terminal una secuencia que tiene como diana la mitocondria, y un dominio protein-kinasa muy conservado, similar a los de serina/treonina kinasas de la familia Ca^{2+} -calmodulina (Moore et al., 2005). Aunque presenta una localización mitocondrial, se desconoce su papel fisiológico. Estudios preliminares sugieren que PINK1 puede proteger a las células de las condiciones de estrés que afecta al potencial de membrana de la mitocondria. Puede fosforilar a las proteínas mitocondriales, en respuesta a un estrés celular, para prevenir la disfunción mitocondrial. El descubrimiento de estas mutaciones determinó por primera vez la implicación de la mitocondria en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson.

PARK7 codifica a *DJ-1*, una proteína muy conservada evolutivamente que pertenece a la superfamilia DJ-1/ThiJ/PfpI. Las primeras mutaciones dentro de este gen se encontraron en dos familias, una italiana y otra holandesa, con un patrón de herencia autosómico recesivo. Sin embargo, estas mutaciones son bastante raras y apenas suponen un 1% de los casos de la variedad familiar. DJ-1 es muy abundante y se expresa de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos de mamíferos, incluido el cerebro, localizándose tanto en neuronas como en glia. No forma parte de las inclusiones de los cuerpos de Lewy características de la EP, sin embargo se localiza en inclusiones tau-positivas en otros desórdenes con taupatías, lo que sugiere que puede participar, además, en la patogénesis de diferentes enfermedades neurodegenerativas. DJ-1 presenta un plegamiento como la flavodoxina, similar a la proteasa bacteriana PH1704 y a la chaperona molecular Hsp31 de *Escherichia coli* y levaduras. Generalmente se encuentra formando dímeros. Próximo a la zona de conexión entre ellos, se ha localizado un sitio activo con similitudes al sitio activo de las enzimas cistein-proteasas (Cys-His-Asp/Glu). De acuerdo con estas observaciones, DJ-1 podría actuar como una chaperona o tener actividad proteolítica. Sin embargo, hasta el momento no se ha identificado ninguno de sus sustratos. Los estudios *in vitro* parecen indicar que actúa protegiendo del estrés oxidativo, probablemente modulando los cambios en el estado redox de la célula y la expresión génica a nivel transcripcional y post-transcripcional. Las mutaciones en este gen disminuyen estas funciones neuroprotectoras y reducen la dimerización facilitando su degradación por el proteosoma.

PARK8/*LRRK2* se identificó por primera vez en un estudio realizado en una numerosa familia japonesa que presentaba un parkinsonismo autosómico dominante. El gen codifica una proteína quinasa 2 con repeticiones ricas en leucina. Las mutaciones que se han encontrado son de particular interés, debido a que son las más comunes localizadas tanto en los casos familiares como esporádicos del Parkinson. Esta proteína de localización citoplasmática, también llamada *dardarina*, está formada por 2527 aminoácidos, con un peso molecular de 286kDa (Moore et al., 2005). Se expresa ampliamente en cerebro. Por su estructura, parece que puede estar implicada en múltiples funciones. Presenta un dominio Ras/GTPasa que puede ser responsable de la respuesta del citoesqueleto a estímulos externos, tráfico vesicular y de la estimulación de kinasas activadas por estrés. Un motivo rico en leucina, que puede tener gran

variedad de funciones, como facilitar la interacción proteína-proteína, y la unión de sustratos específicos para la ubiquitinización. Un dominio kinasa, que probablemente hace que pertenezca a la familia MAPKKK de las kinasas, con actividad catalítica para residuos ricos en serina/treonina y tirosina. Por último, un dominio WD40, que de nuevo parece estar implicado en el ensamblaje del citoesqueleto y señales de transducción (Schapira, 2006). Es tentador pensar que *LRRK2/dardarina* puede fosforilar las proteínas implicadas en la patogénesis de la EP, como son las proteínas α -sinucleína y tau, alterando su expresión, turnover, procesamiento, conformación, localización celular e interacción con otras proteínas.

Los genes citados anteriormente son los mejor estudiados relacionados con la variedad familiar. Las mutaciones mencionadas son responsables de la EP en un número reducido de pacientes, y probablemente en el futuro, estas causas genéticas sigan siendo minoritarias. Sin embargo, el número global de pacientes de EP es más elevado. Esto hace pensar que la enfermedad puede desarrollarse como resultado de la combinación de factores ambientales e influencias poligénicas. Diferentes estudios de asociación génica han intentado identificar polimorfismos que puedan incrementar o disminuir el riesgo de padecer la enfermedad. Por ejemplo, existen algunas variantes en la región promotora del gen de la α -sinucleína que parecen influir en la predisposición. Estos alelos incrementan la expresión de la α -sinucleína aumentando el riesgo de desarrollar Parkinson, de forma parecida a como ocurre en los casos de duplicación o triplicación del gen, en la variedad familiar. De manera similar ocurre en parkin. En este caso esta variedad alélica disminuye la expresión de parkin, aumentando el riesgo de padecer EP.

Además de estas mutaciones, existen otros locus relacionados con la EP. El locus PARK3 se identificó por primera vez en varias familias de descendencia alemana, con un patrón de herencia autosómico dominante. Los síntomas clínicos en estas familias son similares a los que se dan en la enfermedad de Parkinson típica. Sin embargo, todavía no se ha identificado la mutación responsable. El gen parece codificar una enzima llamada *sepiapterin reductasa*, implicada en la biosíntesis de la dopamina (Pankratz et al., 2007). El locus PARK10 se identificó en otro estudio de asociación génica en la población islandesa. Tampoco se ha identificado ninguna mutación. En ambos casos hacen falta más estudios clínicos para determinar la contribución a la enfermedad.

Otros genes candidatos que aumentan la susceptibilidad génica para la enfermedad de Parkinson son *NR4A2*, *SNCAIP*, *APOE*, *GBA* y *MAPT* (Pankratz et al., 2007). *NR4A2* (Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2), también conocido como *Nurr1*, codifica un miembro de una superfamilia de receptores nucleares, esencial para la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Se ha identificado un polimorfismo en el exon 6 de este gen, bastante frecuente en los casos familiares de EP, y una mutación en el exon 1 en 10 familias con EP. *SNCAIP* (Synuclein alpha interacting protein) codifica la proteína sinfilina-1, muy similar a la α -sinucleína. Junto con ella y parkin, forma parte de los cuerpos de Lewy. Se ha encontrado una única mutación tanto en individuos con la variedad esporádica como familiar. Las variaciones encontradas en el gen *APOE* (Apolipoproteína E) se han asociado con la enfermedad de Alzheimer (EA). Sin embargo, como la demencia es característica fundamental de la EA y también de pacientes con EP, se ha analizado si el genotipo *APOE* es un factor de riesgo para desarrollar EP. Diversos estudios han relacionado el alelo $\epsilon 4$ de *APOE* con esta enfermedad, en algunos casos con un comienzo temprano. *GBA* (Glucosidase beta acid) codifica la enzima *glucocerebrosidasa*. Los individuos que presentan mutaciones en las dos copias del gen desarrollan la enfermedad de Gaucher. Parece ser que una única mutación confiere un mayor riesgo de EP, sobre todo en poblaciones de descendencia judía. Por último, *MAPT* (Microtubule associated protein tau) codifica la proteína tau, que se expresa abundantemente en neuronas y juega un papel importante en la organización y en el mantenimiento de la estructura celular. Se han identificado una gran variedad de mutaciones en este gen que dan lugar a la pérdida de su función. Tau tiende a formar agregados que se consideran marcadores patológicos de un grupo de enfermedades neurodegenerativas conocidas como taupatías, entre las que destacan la enfermedad de Pick y la de Alzheimer. Puede interactuar con la α -sinucleína y se ha asociado con un mayor riesgo para desarrollar EP.

Aparte de estos genes nucleares, otros estudios han descrito deficiencias en la cadena respiratoria ocasionadas por mutaciones del ADN mitocondrial de fibroblastos de individuos con EP (Swerdlow et al., 1996). Trabajos más recientes han demostrado la existencia de una mayor incidencia de deleciones de ADN mitocondrial en neuronas de la SNpc de pacientes con EP comparados con sujetos sanos (Smigrodzki et al., 2004). Todo parece indicar que este tipo de mutaciones están implicadas en las deficiencias encontradas en el funcionamiento de la cadena respiratoria.

1.1.2.6.2. Enfermedad de Parkinson esporádica

Es la variedad más abundante, constituyendo el 95% del total de los casos. Después de la enfermedad de Alzheimer, se considera la enfermedad neurodegenerativa más común, con una prevalencia de un 0,1% de la población global. Afecta al 1-2% de la población mayor de 65 años, y al 4-5% de la población mayor de 85 años. Sin embargo, en un 5-10% de los pacientes puede aparecer por debajo de los 60 años, sin asociarse a una causa genética (Whitton, 2007).

La etiología y los mecanismos patogénicos de la enfermedad de Parkinson siguen siendo desconocidos. Tanto en la variedad familiar como en la esporádica, el fenotipo es el mismo. Las manifestaciones clínicas se hacen evidentes cuando la reducción de la concentración de dopamina en el estriado es del 60-70%. A nivel celular, se caracteriza por la presencia de inclusiones citoplasmáticas llamadas cuerpos de Lewy (LBs), en las neuronas de la SNpc. Estos agregados están presentes en la variedad esporádica y en algunos casos de EP familiar. Están constituidos fundamentalmente por α -sinucleína. Su localización no sólo se limita a neuronas dopaminérgicas de la ruta nigro-estriatal. También pueden aparecer en neuronas no catecolaminérgicas del sistema nervioso central y periférico (Nagatsu et al., 2006). La contribución de estas inclusiones a la muerte neuronal no está clara. Se ha sugerido que la causa de la EP es multifactorial, interviniendo una predisposición genética y factores ambientales. A continuación se presentan los mecanismos patológicos que se han diferenciado a nivel molecular.

1.1.2.7. Etiología de la enfermedad de Parkinson esporádico

La disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo se han propuesto como los mecanismos que tienen un papel más importante en la patogénesis de la forma esporádica de la enfermedad.

La primera vez que se relacionó a la mitocondria con la EP se hizo en 1989, cuando se descubrió una alteración en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria, en la SNpc de enfermos de Parkinson (Shapira et al., 2006). Posteriormente también se han descrito alteraciones en las mitocondrias de músculo esquelético y plaquetas de estos enfermos. La contribución de esta característica a la patogénesis de la variedad

esporádica se comprobó con evidencias genéticas proporcionadas por la observación de un polimorfismo (10398G) en el gen que codifica la enzima NADH deshidrogenasa 3 del complejo I mitocondrial, causando el cambio del aminoácido treonina (hidrofílico) a alanina (hidrofóbico), dando lugar a un importante descenso en el riesgo de padecer Parkinson (Van der Walt et al., 2003).

Otros estudios epidemiológicos han descrito que algunos pesticidas y toxinas ambientales que inhiben el complejo I mitocondrial, también contribuyen en la patogénesis de la enfermedad. Un ejemplo muy conocido es el MPTP. El MPTP se descubrió como un contaminante en la elaboración de opiáceos sintéticos, cuando un grupo de consumidores se inyectaron esta sustancia y desarrollaron un síndrome muy similar a la EP. El MPTP (1-Metil 4-fenil 1,2,3,6 tetrahidropiridina), es un análogo de la meperidina, muy selectivo por neuronas dopaminérgicas. En astrocitos, la monoamino oxidasa B, lo convierte en el metabolito activo, el MPP⁺ (1-Metil-4-fenil piridina), que es captado por las neuronas DA a través del transportador de DA e inhibe al complejo I de la mitocondria, lo que conlleva a la muerte neuronal. En primates no humanos, el MPTP induce la formación de inclusiones formadas por α -sinucleína.

El paraquat es otro inhibidor del complejo I, con una estructura muy parecida al MPP⁺. Cuando se administra en ratones, produce también una degeneración selectiva de neuronas DA y favorece la agregación de la α -sinucleína en la SNpc.

Otro neurotóxico bien estudiado es la rotenona, un insecticida muy común utilizado en la agricultura. Su administración en ratas induce parkinsonismo, con pérdida neuronal y formación de inclusiones filamentosas parecidas a los cuerpos de Lewy, que contienen α -sinucleína y ubiquitina.

La disrupción de la cadena de transporte electrónico en la mitocondria produce un fuerte descenso en la producción de ATP -junto con todos los procesos dependientes de él- y un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que causan estrés oxidativo (Keeney et al., 2006). El término ROS hace referencia a la producción del anión superóxido (O_2^-) que tiene lugar durante la reducción del O_2 a agua en la cadena respiratoria. Éste, de manera espontánea o enzimática, se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En la mitocondria, el peróxido de hidrógeno se

elimina por la glutathion peroxidasa; pero algunas cantidades de H_2O_2 pueden difundir de la mitocondria al citosol. La presencia de concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno, junto con otras especies reactivas del oxígeno daña, además del ADN, a las proteínas y lípidos de membrana, favoreciendo la disgregación de ésta y la muerte celular, fundamentalmente por fenómenos apoptóticos.

Las neuronas dopaminérgicas son especialmente sensibles al estrés oxidativo, debido al metabolismo de la dopamina, que es una sustancia fácilmente oxidable que libera una gran cantidad de radicales citotóxicos. La dopamina puede oxidarse por la acción de la monoamino-oxidasa o incluso por procesos de auto-oxidación, generándose también peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno puede dañar a las neuronas directa o indirectamente, a través de la formación de radicales hidroxilo en presencia de iones ferrosos mediante una reacción de tipo Fenton. No solo la dopamina, también el metabolito de la dopamina, la neuromelanina, presente en las neuronas de la SNpc, favorece la acumulación de hierro ferroso (Fe^{2+}), potenciando la peroxidación lipídica, lo que conduce a la muerte celular. Por estas razones, los radicales libres son uno de los agentes más importantes responsables de la degeneración de las neuronas nigrales (ver figura 2).

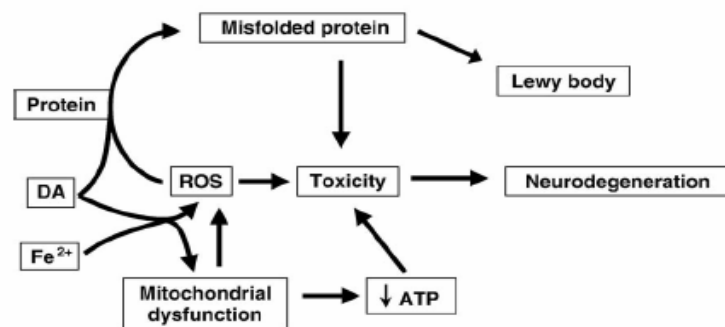


Figura. 2. Mecanismos responsables de la neurodegeneración dopaminérgica: disfunción mitocondrial y estrés oxidativo (Hald et al., 2005).

Recientes investigaciones han destacado la relación entre la mitocondria y la α -sinucleína (Moore et al., 2005). La inhibición del complejo I mitocondrial, tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro*, conduce a la acumulación de inclusiones positivas en α -sinucleína, similares a los cuerpos de Lewy. Esto parece indicar que la agregación de esta proteína es una consecuencia de la disfunción mitocondrial, y por tanto, podría

ser un potente efector de la muerte neuronal. Esta idea se sustenta con experimentos con ratones knockout para la α -sinucleína que presentan una resistencia a los efectos tóxicos del MPTP. Por el contrario, los que llevan el gen transgénico muestran una toxicidad incrementada. La α -sinucleína es una proteína con una gran tendencia a la agregación. Como se ha comentado en el apartado anterior, pertenece a una familia de genes que incluye además la β -sinucleína, la γ -sinucleína y la sinoretina. Todas las sinucleínas presentan una serie de repeticiones con la secuencia KTKEGV, y una cola C-terminal variable, que es especialmente ácida en la α -sinucleína (Cookson, 2005). Pueden ser fosforiladas en residuos de tirosina y serina. Carecen de estructura secundaria en solución, por tanto no están plegadas en su forma nativa. La función de la α -sinucleína no se conoce por completo; por su localización, a nivel de membranas sinápticas, parece que interviene en el tráfico vesicular y en la neurotransmisión. Esta proteína presenta una región hidrofóbica central que favorece la agregación. No está presente, sin embargo, en las otras sinucleínas. El producto final es la formación de unos polímeros insolubles, de alto peso molecular, conocidos como fibrillas. Se piensa que estas fibrillas son el principal componente de los cuerpos de Lewy. Los cuerpos de Lewy pueden contener además muchas otras proteínas, como neurofilamentos y otras proteínas del citoesqueleto. El hecho de que las fibrillas de α -sinucleína puedan formarse *in vitro* hace pensar que esta proteína es suficiente para formar las inclusiones.

Existen otros productos génicos ligados a formas monogénicas de la EP, que también están implicados en la función mitocondrial. Estudios realizados en *Drosophila* y en ratones indican que parkin puede desempeñar un papel importante en la regulación de la función normal de la mitocondria, ligada al sistema ubiquitin proteosoma. La disfunción mitocondrial da lugar a un incremento en el estrés oxidativo y nitrosativo, tal y como se observa en el cerebro de pacientes con EP esporádica. El estrés favorece la S-nitrosilación de parkin dañando su actividad ubiquitin ligasa y su función neuroprotectora (Gandhi et al., 2005). Parece ser que esta S-nitrosilación está ligada de forma dependiente a óxido nítrico (NO), según se ha observado en cerebro de ratones tratados con MPTP, y en pacientes con parkinson esporádico y con demencia asociada a los cuerpos de Lewy (DLB). La inhibición de la actividad ligasa E3 de parkin puede contribuir a la patogénesis de la EP y de otras enfermedades relacionadas con un fallo en la ubiquitinización de sus sustratos. Este paso es esencial para la hidrólisis de

aquellas proteínas desnaturalizadas o mal plegadas que van a ser degradadas por el proteosoma (Barzilai et al., 2003).

El sistema ubiquitin proteosoma (UPS) es un sistema intracelular esencial para la degradación y eliminación no lisosomal de proteínas de vida corta, mal plegadas, mutantes y dañadas, en las células eucariotas. Está formado por una serie de enzimas encargadas de degradar estas proteínas en reacciones dependientes de ATP (Barzilai et al., 2003). Se ha sugerido que un mal funcionamiento de este sistema puede contribuir también a la patogénesis molecular del parkinson familiar y esporádico. En la SNpc de enfermos de parkinson esporádico, se ha observado un déficit estructural y funcional en las subunidades 20/26S del proteosoma que apoyan esta idea. Por otra parte, ratas tratadas de forma crónica con inhibidores del proteosoma, desarrollan un parkinsonismo progresivo, con neurodegeneración de la vía nigro-estriatal y formación de inclusiones citoplasmáticas, similares a los cuerpos de Lewy, que contienen α -sinucleína y ubiquitina.

La acumulación y la agregación de proteínas citotóxicas como la α -sinucleína en las neuronas DA de enfermos de EP, origina un estrés proteolítico que posiblemente conlleve a un fallo en la función UPS (Moore et al., 2005). Una de las evidencias más importantes que implican al UPS en la patogénesis de la EP es la asociación de parkin con las formas familiares o mendelianas de la enfermedad. Determinadas mutaciones en parkin originan fallos en el funcionamiento del UPS, dando lugar a un estrés proteolítico debido a la acumulación de proteínas aberrantes. La α -sinucleína se asocia con la disfunción del UPS a través de su interacción con las subunidades 20/26S del proteosoma, inhibiéndolas, de tal manera que las formas mutadas o agregadas de la proteína pueden también alterar la capacidad degradante del proteosoma, favoreciendo su deterioro funcional.

Estos datos sugieren que hay al menos dos vías relacionados con el origen de la EP: una mitocondrial y otra proteosómica (ver figura 3). Esta hipótesis puede interpretarse de tres maneras: 1) que cada ruta sea suficiente para inducir la muerte celular, e independiente una de otra; 2) que ambas sean necesarias para provocar el daño neuronal, y 3) que en realidad se trate de una única ruta conectada de una manera ordenada.

No obstante, es difícil separar una ruta de otra, ya que se producen interacciones entre las dos, tal y como hemos visto en los párrafos anteriores.

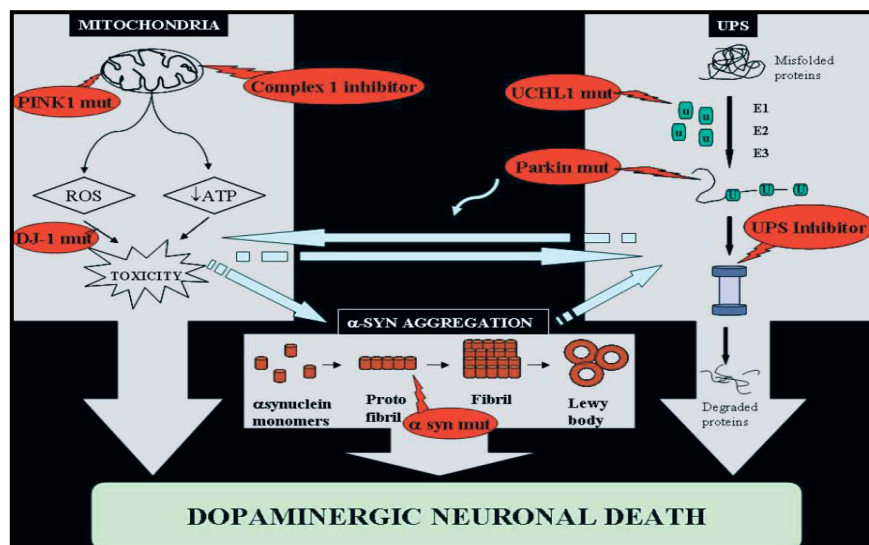


Figura. 3. Mecanismos moleculares que conducen a la muerte celular en la enfermedad de Parkinson (Gandhi et al., 2005).

Además de estos procesos primarios, y como consecuencia directa de ellos, se desencadena un proceso inflamatorio en la SNpc, que contribuye a la progresión de la enfermedad. La muerte neuronal, ya sea por necrosis o por apoptosis, induce la activación de la microglia. Hay evidencias que indican que las especies ROS generadas por la mitocondria también contribuyen a ello (Whitton, 2007). La microglia son células del linaje de los macrófagos derivadas de médula ósea que entran en el cerebro en una etapa temprana de la embriogénesis y se desarrollan en paralelo a la maduración del sistema nervioso. Son células fagocíticas que pueden reaccionar puntualmente frente a incidencias de diversa naturaleza, desde la entrada de patógenos a agregados de proteínas, e incluso, a alteraciones en la homeostasis del hierro en zonas concretas de las células. En cerebros normales la microglia está en estado de reposo; los cuerpos celulares apenas son detectables. Sin embargo, en un proceso patológico, estas células se activan y proliferan rápidamente, incrementando o expresando *de novo* un gran número de marcadores moleculares como el CD11b y antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), adquiriendo una apariencia similar a la del macrófago (Mosley et al., 2006).

La activación de la microglia puede dañar particularmente a las neuronas DA de la SNpc, ya que contiene de cuatro a cinco veces más células microgliales comparadas con otras áreas cerebrales y consecuentemente, son más susceptibles a esta acción inmunológica. Además, las neuronas DA tienen una menor capacidad antioxidante, con bajos niveles intracelulares de glutatión que las hacen más susceptibles al estrés oxidativo. Esta microglia activa produce factores neurotóxicos como son el ácido quinolínico, aniones superóxido, metaloproteinasas (MMP), óxido nítrico, ácido araquidónico, quimoquinas y citoquinas proinflamatorias, y excitotoxinas como el glutamato (Mosley et al., 2006). La combinación de todos estos factores da lugar a una progresiva e irreversible muerte neuronal que contribuye a la progresión de la enfermedad (Whitton, 2007).

La implicación de la inflamación en la patogénesis de la EP fue sugerida inicialmente por McGeer y cols., en 1988 (McGeer et al., 1988). Estos autores describieron la presencia de microglia activa en cerebros de enfermos de Parkinson. En estudios posteriores se encontraron altos niveles de anticuerpos dirigidos frente a proteínas modificadas por los productos de oxidación de la DA (Liu et al., 2003). Otros trabajos demostraron la presencia de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleukina-1b (IL-1b) e interleukina-6 (IL-6) en el líquido cerebroespinal y en el estriado de pacientes con EP. También se detectaron en SN y otras estructuras de los ganglios basales (Whitton, 2007). Estos procesos tienen especial importancia en los estadios iniciales de la enfermedad.

Por último, la combinación de todos estos procesos, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, alteración del metabolismo proteico y fenómenos inflamatorios, parece desencadenar la activación de la apoptosis (Abou-Sleiman et al., 2006). La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso fisiológico que tiene lugar y es crucial durante el desarrollo embrionario, y en la etapa adulta, ayudando a mantener la homeostasis de los tejidos, o en respuesta a células dañadas. Los mediadores claves de la apoptosis son unas enzimas llamadas caspasas. En mamíferos comprenden 15 miembros divididos en caspasas promotoras (procaspasas 2, 8, 9 y 10) y caspasas efectoras (procaspasas 3, 6 y 7). Esta muerte programada se puede ejecutar a través de receptores de muerte celular localizados en la superficie celular, por ello, también se conoce como ruta extrínseca. Uno de ellos es el receptor 1 del factor de necrosis tumoral

(TNFR1). La unión con su ligando, el TNF- α , desencadena una serie de señales intracelulares que culminan en el reclutamiento y activación de la caspasa-8. Esta ruta es activada en aquellas enfermedades con un componente inflamatorio importante. Por otra parte, la apoptosis también se puede desencadenar por una ruta intrínseca o mitocondrial. En ella, estímulos independientes a receptores, provocan la liberación de factores pro-apoptóticos, como el citocromo c o la proteína smac, desde la mitocondria al citosol, que dan lugar, en último término, a la activación de la caspasa-3. Otros factores liberados de la mitocondria son el factor inductor de la apoptosis (AIF) y la endonucleasa G. Estos factores no actúan activando caspasas. En su lugar, se translocan al núcleo donde inducen una fragmentación del ADN a gran escala. Para evaluar la importancia de la apoptosis en la EP, las primeras investigaciones se centraron en modelos animales de experimentación, demostrando la implicación de la ruta apoptótica en la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Estos resultados respaldaron los encontrados en cerebros de enfermos con EP, como un aumento de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-x_L y de las actividades caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9, entre otros (Vila et al., 2003). A pesar de la importancia de este fenómeno, la mayoría de las investigaciones concluyen que es un evento tardío en la patología de la EP, desencadenado por las alteraciones moleculares mencionadas anteriormente.

1.1.2.8. Importancia de los fenómenos de disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

Las mitocondrias desarrollan un papel muy importante a nivel celular, que incluye la producción de ATP y la homeostasis del Ca²⁺. También son responsables de la formación de ROS y de desencadenar la respuesta de la muerte celular programada o apoptosis. Las neuronas, en particular, dependen de las mitocondrias debido a su alta actividad, que precisa un gran aporte de energía. Se localizan mayoritariamente en las terminales presinápticas. Dado que son una fuente intracelular de ATP y de ROS, y que están presentes en áreas de exocitosis y sinapsis, las mitocondrias intervienen en la regulación de la neurotransmisión (Keating, 2008).

Las mitocondrias sufren continuos ciclos de fusión y fisión; el balance de estos procesos opuestos regula la morfología mitocondrial, el número y la función. Por ejemplo, la inhibición de los procesos de fisión da lugar a una reducción en el número de mitocondrias, originando mitocondrias de gran tamaño, con una mayor producción de

ROS, descenso en la fosforilación oxidativa y alteración en su potencial de membrana. Contradictoriamente, los procesos de fragmentación también conllevan a una mayor producción de ROS y a un descenso en la fosforilación oxidativa y producción de ATP. Esto parece indicar que es necesario un balance entre la fusión y la fisión para una óptima actividad de la mitocondria.

Algunos pasos implicados en la exocitosis celular están directamente regulados por los niveles de ATP citosólicos. Los dos pasos más importantes se identificaron hace 20 años. El primero es dependiente de ATP, y consiste en el reclutamiento de vesículas en la región sináptica. Va seguido de un segundo paso, dependiente de Ca^{2+} , que implica la fusión de las vesículas con la membrana plasmática y la liberación de su contenido. El papel del ATP aquí es facilitar la fosforilación de los grupos fosfatidilinositol vía fosfatidilinositol kinasas, localizadas tanto en la membrana de la vesícula como en la membrana plasmática. Dos estudios independientes en mutantes de *Drosophila*, en sinapsis que contenían pocas mitocondrias, demostraron que la producción de ATP mitocondrial es vital para conseguir una transmisión sináptica óptima (Keating, 2008).

Por otra parte, la maquinaria implicada en la fusión sináptica parece estar directamente regulada por el estado redox de la célula. Esto fue recientemente ilustrado en terminaciones nerviosas motoras de rana y ratón, donde la liberación de neurotransmisor debido a potenciales espontáneos y evocados fue menor en presencia de ROS. El uso de ionóforos de Ca^{2+} reveló que el papel de ROS es actuar directamente sobre los mecanismos de fusión vesicular (ver figura 4). Investigaciones posteriores han establecido que algunas proteínas solubles del receptor de anclaje NSF (SNARE), son especialmente sensibles al estrés oxidativo, siendo la proteína SNAP-25 la más sensible de las proteínas estudiadas. Determinados residuos de cisteína de SNAP-25 son necesarios para el desensamblaje de SNARE y la exocitosis. Estos residuos de cisteína son comúnmente afectados por el estado redox, de tal forma, que altos niveles de ROS alteran el funcionamiento de SNARE y reducen la exocitosis (Keating, 2008).

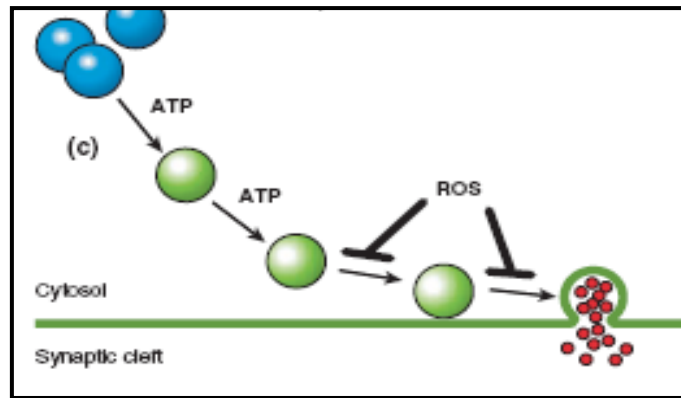


Figura. 4. Esquema representativo de los sitios en los que el ATP y las especies ROS regulan la exocitosis (Keating, 2008).

1.1.2.9. Alteración del metabolismo proteico y agregación proteica

Por otro lado, el mecanismo por el cual los agregados de α -sinucleína ejercen su papel neurotóxico en las formas esporádicas del Parkinson es desconocido. Uno de los mecanismos que se han propuesto es debido a un mal funcionamiento del sistema UPS. Las especies patogénicas de la α -sinucleína son más resistentes a la degradación por el proteosoma, y pueden unirse directamente a las subunidades 20/26S dañando su actividad proteolítica.

Otro mecanismo parece ser la interacción de la α -sinucleína con la membrana mitocondrial interna, induciendo la liberación del citocromo c (Parihar et al., 2008). Se produce una alteración en la homeostasis del calcio, aumentando la concentración intramitocondrial, lo que estimula la actividad de la enzima *óxido nítrico sintasa* (NOS). Ésta favorece el incremento de peroxinitritos, que oxidan y modifican a las proteínas mitocondriales de membrana, y la liberación del citocromo c.

Otros efectos tóxicos de la α -sinucleína parecen ser más selectivos en las neuronas dopaminérgicas, las cuales presentan una producción constante de dopamina endógena mediada por ROS. La α -sinucleína parece interactuar e incrementar la actividad del transportador de dopamina, acelerando, por tanto, el consumo celular de dopamina y promoviendo la apoptosis inducida por dopamina (Moore et al., 2005). Sin embargo, la degeneración que se ha observado en los enfermos de Parkinson, no está limitada a neuronas DA y otras neuronas catecolaminérgicas, sino que es generalizada y puede

afectar a otros sistemas de neurotransmisores. Este efecto tóxico en particular podría ser responsable de la pérdida de neuronas DA en la enfermedad de Parkinson, pero la toxicidad de la α -sinucleína también puede afectar a otras poblaciones neuronales a través de otros mecanismos alternativos, como los mencionados anteriormente.

1.1.2.10. Características comunes con otras enfermedades neurodegenerativas

Los procesos de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, así como los de estrés proteico, que tienen lugar en la enfermedad de Parkinson, y que son responsables de la neurodegeneración, parecen estar también presentes en otras enfermedades neurodegenerativas como son la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Huntington (EH).

En enfermos con EA, se han observado indicios de estrés oxidativo en estadios de la enfermedad anteriores a la aparición de las características placas seniles (Keating, 2008). Es posible que sea la causa de la enfermedad y que induzca la acumulación intracelular de estos agregados. Las placas seniles están formadas principalmente por el péptido β -amiloide. Ocupan el espacio extracelular e interfieren en la trayectoria normal de las neuritas. Éstas, al perder su función, pueden agregarse alrededor de las placas formando neuritas distróficas, que contienen además proteínas sinápticas, del citoesqueleto y relacionadas con la plasticidad y el crecimiento celular.

Por otra parte, y según la hipótesis amiloide, existe otro mecanismo que puede ser responsable de la patogénesis de la enfermedad. Esta hipótesis sostiene que el procesamiento del precursor del péptido β -amiloide (APP) por β y γ secretasas da lugar a la formación de estructuras fibrilares de $A\beta$, llamadas oligómeros, para constituir las placas seniles. En experimentos *in vitro*, estas formas son sinaptotóxicas, ya que elevan la concentración de Ca^{2+} en la terminal postsináptica, conduciendo a la endocitosis de los receptores NMDA y a la reorganización del citoesqueleto. Si en cerebros vivos tuvieran el mismo efecto, podrían ser la causa de la pérdida de sinapsis y de espinas dendríticas que tiene lugar en la enfermedad (Spires et al., 2007). Otros trabajos también han demostrado el potencial neurotóxico de estos agregados, afectando a la memoria y a la potenciación a largo plazo de roedores.

Otros marcadores patogénicos, característicos de la enfermedad, son los ovillos de proteína hiperfosforilada tau, que se forman en el soma de las neuronas. La contribución de estos agregados intracelulares a la neurodegeneración y a la muerte neuronal no está clara; aunque algunos experimentos realizados en modelos animales que sobreexpresan tau demuestran una vinculación directa con la pérdida neuronal, otros le otorgan un papel neuroprotector (Arrasate et al., 2004).

Al igual que en la EA, en la enfermedad de Huntington (EH) están implicados mecanismos moleculares muy similares. Por ejemplo, uno de los marcadores característicos sigue siendo la presencia de agregados intracelulares, en este caso de huntingtina (htt), una proteína que se expresa constitutivamente en una gran variedad de células y cuya función aun queda por determinar (Spires et al., 2007). La causa de la enfermedad es una mutación en esta proteína que da lugar a la expansión del triplete CAG formando una cola de poliglutamina (poli-Q). La longitud de esta cola se correlaciona inversamente con la aparición de los primeros síntomas. La htt mutante es altamente reactiva y tiende a agregarse formando unos depósitos llamados cuerpos de inclusión (IBs). Los intermediarios de la htt tienen un gran poder neurotóxico, reclutando a otras proteínas, como reguladores de la transcripción, y privándolas de su función. Interfieren en el tráfico axonal y procesos de endocitosis, e inhiben la función normal del proteosoma (Valera et al., 2007). También incrementan la transcripción del gen que codifica para la caspasa 1. Ésta puede a su vez activar a la caspasa 3 y desencadenar la apoptosis (Lee et al., 2006b).

Además de estos agregados, en la patogénesis de la EH interviene un componente mitocondrial (Keating, 2008). En neuronas de ratones que contienen la htt mutada se ha observado un descenso en la producción de ATP y respiración mitocondrial, concretamente en las actividades de los complejos I y III. Acompañando a esta disfunción mitocondrial se han detectado daños oxidativos en el ADN y lípidos de membrana en estudios *post mortem* de cerebros humanos (Trushina et al., 2007).

En definitiva, todas estas evidencias demuestran que en las tres enfermedades neurodegenerativas mencionadas, Parkinson, Alzheimer y Huntington, tienen lugar mecanismos moleculares similares, responsables en mayor o menor medida de la

patogénesis, y que se pueden resumir en una alteración mitocondrial, fenómenos de estrés oxidativo y neurotoxicidad por agregados de proteínas.

En los apartados siguientes se describe con detalle los mecanismos moleculares implicados en la patología de las enfermedades de Alzheimer y Huntington. No obstante, en este apartado se ha querido resumir las características más importantes que comparten con la enfermedad de Parkinson. Aunque cada enfermedad tiene un origen diferente, se podría hablar en los tres casos de un proceso neurodegenerativo alentado por los mismos mecanismos moleculares.

1.1.3. Enfermedad de Huntington

1.1.3.1. Antecedentes

La enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo y de carácter hereditario, con un patrón de herencia autosómico dominante (Petrasch-Parwez et al., 2007). Se caracteriza por la aparición de movimientos involuntarios debido a la pérdida progresiva de neuronas espinosas medias del núcleo estriado, acompañados de cambios emocionales, déficit cognitivo y pérdida de peso. El déficit cognitivo se manifiesta por dificultades en la concentración y en la retención de información recién adquirida, deterioro de las habilidades lingüísticas y de la percepción, y lenguaje desorganizado (Spires et al., 2007). En ocasiones, las alteraciones psiquiátricas como la depresión, ansiedad, apatía, irritabilidad, aparecen antes de los síntomas neurológicos clásicos (Li et al., 2006) y a edades medias, entre los 40 y 50 años. La media de supervivencia se estima entre 15 y 20 años desde su diagnóstico (Lee et al., 2006b) y a día de hoy no existe un tratamiento efectivo.

La naturaleza hereditaria de esta corea fue brillantemente descrita en el siglo XIX por el doctor George Huntington, por lo que la enfermedad se designa por su nombre. Con el descubrimiento del gen responsable, las investigaciones se han centrado en encontrar los mecanismos moleculares implicados.

El periodo sano de la enfermedad se superpone con una fase pre-diagnóstica en la que los pacientes comienzan a mostrar pequeños cambios en la personalidad, la cognición y

el control motor. El diagnóstico se realiza cuando estas alteraciones se agudizan y aparece la sintomatología clásica. Aunque el desarrollo de la corea es útil para el diagnóstico, no es un marcador indicativo de la severidad de la enfermedad. Individuos con una edad de comienzo temprana no siempre la desarrollan. Además, en los casos en que aparece, ésta progresa al inicio de la enfermedad, pero luego, con la aparición de la distonía y la rigidez, llega a ser menos prominente (Walker, 2007). Otro síntoma característico es la inconsistencia motora. Los individuos son incapaces de mantener una contracción voluntaria a un nivel constante, por ejemplo, en un simple apretón de manos. Es independiente a la corea y progresa linealmente con la enfermedad, por lo que se puede considerar como un buen marcador del grado de severidad. Cuando el déficit motor y cognitivo llega a ser muy severo, tienen lugar otras complicaciones como consecuencia de caídas, inanición o disfagia, que dan lugar a la muerte del individuo.

1.1.3.2. Patogénesis de la enfermedad de Huntington

El déficit genético responsable de la enfermedad es la expansión del triplete CAG en el gen que codifica para la proteína huntingtina dando lugar a una cola de poliglutamina (poli-Q) en la región N-terminal. Generalmente el número de repeticiones se correlaciona de manera directa con el grado de severidad y de manera inversa con la edad de aparición. En individuos afectados, el número medio de tripletes oscila entre 40 y 50, mientras que más de 70 repeticiones se suelen observar en las formas juveniles de la enfermedad.

La huntingtina (htt) es una proteína soluble de 348 KDa, que se expresa en cantidades moderadas tanto dentro como fuera del Sistema Nervioso Central (SNC) (Cattaneo et al., 2005). Intracelularmente se asocia con varias organelas, incluyendo el núcleo, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. También se ha encontrado en neuritas y en sinapsis, donde aparece junto a estructuras vesiculares, como vesículas cubiertas de clatrina, compartimentos derivados del endosoma o caveolas, y microtúbulos. La estructura de la proteína apenas revela información de su función biológica, y carece de dominios bien definidos. Sin embargo presenta algunas regiones interesantes. De todas ellas destaca la región polyQ, con 11-34 residuos de glutamina. Estas secuencias forman una estructura en forma de cremallera que favorece la unión con otras proteínas que

presentan también la misma homología, como algunos factores de transcripción. A continuación se pueden encontrar repeticiones HEAT (huntingtina, factor de elongación 3, una subunidad de la proteína fosfatasa 2A y TOR1), que son secuencias de aproximadamente 40 aminoácidos que aparecen varias veces dentro de la proteína. La función de estas regiones no está clara, aunque también se han encontrado en otras proteínas implicadas en el transporte intracelular y la segregación cromosómica (Li et al., 2006). Otras secuencias activas en el extremo carboxi (C)-terminal son las llamadas NES (nuclear export signal) y NLS (nuclear localization signal), las cuales podrían estar implicadas en el transporte de moléculas desde el núcleo al citoplasma. Por último, presenta cuatro modificaciones post-transduccionales: sumoilación y ubiquitinación, en varias lisinas a nivel del extremo amino (N)-terminal; forforilación en las serinas 421 y 434; y palmitoilación, aunque se desconoce la posición exacta del aminoácido. Ésta última modificación parece que puede estar implicada en la regulación del tráfico vesicular.

El papel fisiológico de la proteína se ha estudiado en ratones knockout para este gen. La inactivación completa de la huntingtina causa la muerte embrionaria antes del octavo día de gestación, indicando que es esencial para el desarrollo embrionario. Después de la gastrulación, participa en la formación del epiblasto, que posteriormente originará el tubo neural. Por tanto, destaca su papel activo en la formación del SNC (Cattaneo et al., 2005). Estudios recientes le han atribuido otros papeles fisiológicos en la etapa adulta. Su interacción con determinadas proteínas citoplasmáticas hace pensar que está implicada en el tráfico vesicular y en procesos de exocitosis y endocitosis en la terminal sináptica. También promueve la producción del factor neurotrófico BDNF (brain-derived neurotrophic factor), esencial para la supervivencia de las neuronas estriatales. Esta neurotrofina se ha localizado junto con la htt en las neuronas corticales que proyectan al estriado. Mediante un transporte vesicular anterógrado es liberada en los terminales axónicos y capturada por las neuronas estriatales. Por último, estudios *in vitro* le otorgan un papel neuroprotector frente a diversos estímulos apoptóticos.

En enfermos de huntington la htt no es funcional y tiende a formar agregados dentro de las neuronas originando los llamados cuerpos de inclusión. La formación de estas estructuras es dinámica, existiendo una serie de pasos intermedios desde la htt soluble hasta la aparición de las inclusiones maduras (Valera et al., 2007). Las colas de poli-Q

son altamente reactivas favoreciendo la interacción y el secuestro de otras proteínas. Sin embargo, se sabe que son los fragmentos más pequeños de la htt, originados por procesos proteolíticos, los que aumentan la toxicidad (Li et al., 2006). La relación que existe entre estas inclusiones y la neurodegeneración no está clara. Conforme progresa la enfermedad se observa un aumento en el número de IBs, pero esto necesariamente no se correlaciona con la muerte neuronal. De hecho algunos autores señalan un papel protector en ellos, reclutando las proteínas mutantes y los fragmentos pequeños altamente tóxicos (Arrasate et al., 2004).

1.1.3.3. Mecanismos implicados en la neurodegeneración de la EH

A pesar de que los análisis de mutaciones y de modelos de animales transgénicos para la EH han identificado inequívocamente las expansiones poli-Q como responsables de la toxicidad, aun se desconocen los mecanismos exactos por los cuales la htt mutada origina la muerte progresiva de las células neuronales. Estas colas poli-Q se asocian formando cadenas- β que son capaces de ensamblarse en láminas o barriles usando enlaces de hidrógeno y promoviendo la agregación. En las áreas afectadas, corteza y estriado, la técnica de inmunohistoquímica revela que la htt forma complejos de elevado peso molecular y cuerpos de inclusión. De este modo, es muy probable que la alteración y/o el secuestro de otras moléculas por parte de estos agregados sea una de las primeras causas de la muerte neuronal (Trushina et al., 2007).

Esta neurodegeneración es bastante selectiva en los estadios iniciales de la enfermedad, afectando principalmente a las neuronas espinosas del estriado y a capas más profundas de la corteza cerebral. Estas neuronas espinosas son gabérgicas, y constituyen el 95% de todas las neuronas estriatales. Reciben aferencias corticales glutamatérgicas e inervan a neuronas de la Sustancia Negra y del Globo Pálido. Se cree que la muerte neuronal en el estriado puede deberse en parte a la excitotoxicidad del glutamato. Estudios electrofisiológicos han demostrado un aumento en la transmisión sináptica de estas neuronas, con una mayor actividad de los receptores NMDA en modelos de ratón con EH. Existe una interesante relación entre la htt mutada y esta respuesta. Una de las proteínas con las que interacciona la htt es la PSD-95 (postsynaptic density-95 protein). Esta proteína favorece el agrupamiento y la activación de los receptores NMDA y kainato uniéndose a ellos. Su secuestro, por parte de la htt, regula esta actividad. Sin

embargo, en la EH, disminuye la interacción de la htt con PSD-95, lo que se traduce en una hipersensibilización y una sobreactivación de estos receptores (Li et al., 2004; Cattaneo et al., 2005).

Otro rasgo de la enfermedad es la presencia de gliosis en cerebros de enfermos de Huntington, como consecuencia de la muerte neuronal (Li et al., 2004). Se ha podido demostrar astrogliosis y microgliosis en muestras de caudado y de cápsula interna de pacientes con EH pero no en cerebros sanos. Si bien este proceso inflamatorio es una consecuencia del daño neuronal, la patología glial por sí misma también puede mermar la viabilidad de las neuronas.

Al igual que la EP, la EH representa un tipo de enfermedad en la que es característica la formación de inclusiones y en la que el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial parecen causar y/o contribuir a la toxicidad. En neuronas de ratones que expresan la htt mutada se ha observado un descenso en la producción de ATP y en la respiración mitocondrial. También deficiencias severas en los complejos II y III mitocondrial, y a veces en el IV, en tejidos postmortem de pacientes con EH (Trushina et al., 2007). Estos efectos podrían estar causados por una interacción directa de la htt con la membrana mitocondrial. Sin embargo, no se ha resuelto si el daño mitocondrial es un evento primario o secundario en la toxicidad. Sí se conoce que progresa con la neurodegeneración y ha sido demostrado por un descenso en la producción de ATP y un incremento en los niveles de lactato, medidos tanto en tejido humano como en modelos animales. Como consecuencia de esta disfunción, los fenómenos de estrés oxidativo son más abundantes. La mitocondria es una de las principales fuentes productoras de especies ROS, pero también es de las estructuras más afectadas. Su mayor contenido en lípidos de membrana con ácidos grasos poliinsaturados la hace más susceptible a sufrir peroxidación. En ratones transgénicos que expresan la proteína humana mutada htt, se ha observado un aumento en los niveles de peroxidación lipídica (LPO) en el estriado, comparado con otras áreas del cerebro y con camadas no transgénicas. Además, este daño oxidativo es paralelo a la aparición del déficit motor, lo que sugiere que puede ser un factor decisivo en el desarrollo de la enfermedad (Pérez-Severiano et al., 2000). En plasma de enfermos de Huntington y de individuos portadores de la mutación, se han obtenido resultados muy similares, con mayores niveles de LPO en ambos grupos, comparado con sujetos sanos. Además, parece existir una correlación entre la aparición

de síntomas severos y mayores niveles de LPO. Sin embargo, no se observa con el número de repeticiones CAG. Estos resultados podrían indicar que los fenómenos de estrés oxidativo son anteriores a la aparición de los primeros síntomas y que contribuyen en mayor o menor medida en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington (Klepac et al., 2007).

Por otra parte, la presencia de ubiquitina y subunidades del proteosoma en los cuerpos de inclusión de cerebros y de modelos animal y celular, fue la primera prueba que sustenta la implicación del sistema UPS en la enfermedad de Huntington (Valera et al., 2007). La proteólisis de la huntingtina, por diferentes proteasas, genera pequeños fragmentos N-terminal, que serán posteriormente degradados por el proteosoma. Sin embargo, el descenso en las actividades del proteosoma y de las chaperonas moleculares, promueve la acumulación de la huntingtina en neuronas maduras (Li et al., 2006). No obstante, queda por determinar si la inhibición del proteosoma se produce como respuesta de una interacción directa de las formas ubiquitinizadas de los agregados o de la htt monomérica.

Por último, hay que destacar la toxicidad que ejerce la htt mutada en el núcleo, concretamente los fragmentos más pequeños procedentes de los primeros pasos de degradación. Se ha propuesto que la proteólisis mediada por calpaína y caspasa-3 promueve la generación de fragmentos N-terminal que pueden difundir pasivamente a través de la membrana nuclear y depositarse formando agregados dentro del núcleo (Gil et al., 2008). Esto da lugar a la inactivación de factores de transcripción que altera la actividad transcripcional de la célula. De hecho, los primeros cambios que se observaron en la expresión de ARN mensajero, fue en ratones transgénicos de EH, para varios receptores de neurotransmisores. Esta deficiencia transcripcional parece ser un componente clave de la patología de la EH (Kosinski et al., 2005).

1.1.4. Enfermedad de Alzheimer

1.1.4.1. Antecedentes

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo del SNC que se caracteriza clínicamente por una pérdida progresiva de la memoria y otras habilidades

cognitivas, dando como resultado final una demencia severa (Bird, 2008). Frecuentemente, la enfermedad comienza con pequeños lapsos de memoria que avanzan progresivamente hasta la demencia: un deterioro de la memoria, el lenguaje y la mayoría de las funciones mentales. Durante los estadios tempranos de la EA, el examen neurológico es normal, excepto para estas alteraciones cognitivas mencionadas. El declive intelectual se acompaña de una acumulación progresiva de fibras insolubles, extra e intracelulares, que forman las placas seniles y los nudos neurofibrilares (NFTs), respectivamente (Upadhyya et al., 2007).

La EA es la enfermedad neurodegenerativa con más prevalencia y la causa más común de demencia. La variedad familiar es menos frecuente, alrededor de un 25% de los casos, con un patrón de herencia autosómico dominante, y una aparición temprana de los síntomas clínicos. Está causada por mutaciones en el gen de la proteína precursora amiloide (APP) y en el gen de la presenilina (PSEN), ambos relacionados con el metabolismo del péptido β -amiloide ($A\beta$). El péptido $A\beta$ se forma a partir de APP, por una rotura secuencial que implica a la enzima BACE1 (β -site APP cleaving enzyme 1) o β -secretasa y a la γ -secretasa (complejo de la presenilina), siendo liberado al espacio extracelular. La forma esporádica es la variedad más común, y se cree que está causada por una interacción compleja de factores de riesgo ambiental y genético.

Las características patológicas de los dos tipos de EA comprenden la pérdida de neuronas piramidales grandes y medias, la presencia de placas seniles y NFTs (formadas por depósitos de filamentos amiloides y proteína tau hiperfosforilada, respectivamente, y rodeadas de neuritas dañadas y glia reactiva), una degeneración neuronal y pérdida de sinapsis (Butterfield et al., 2007) (ver figura 5).

La formación de estas lesiones neurofibrilares parece conducir a los síntomas de la enfermedad, que resultan probablemente de la degeneración de las células nerviosas en la corteza cerebral y en el hipocampo, seguida de una pérdida de sinapsis. Además este descenso sináptico se correlaciona con el déficit cognitivo en los primeros estadios de la EA. Luego, conforme la enfermedad avanza éste se va acentuando, sin embargo parece que se debe más al desarrollo de la enfermedad que a la presencia de las placas seniles y los NFTs.

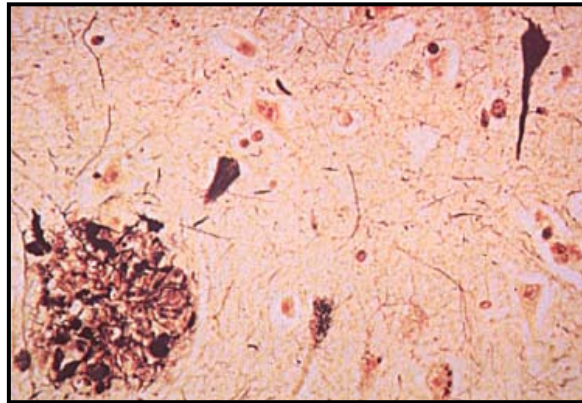


Figura. 5. Neuropatología microscópica de la enfermedad de Alzheimer: placas seniles (esquina inferior izquierda) y NFTs (esquina superior derecha) (Bird, 2008).

El diagnóstico clínico requiere tiempo y una combinación de pruebas psicológicas, de imagen, y exclusión de otras enfermedades neurológicas. Los individuos con EA presintomático o con un deterioro cognitivo moderado (MCI) tienen un riesgo muy elevado de desarrollarla. Se cree que hasta que se diagnostica, la enfermedad ha progresado durante varios años, por eso es crucial hacer un diagnóstico temprano. La duración media es de 8-10 años. La muerte del paciente se produce generalmente por inanición, malnutrición, neumonía y otras complicaciones asociadas. Hasta el momento, y al igual que las otras enfermedades neurodegenerativas mencionadas, no existe un tratamiento curativo. Los fármacos que incrementan la actividad colinérgica mediante la inhibición de la acetil-colinesterasa, pueden proporcionar una relativa mejoría cognitiva y conductual. En estadios más avanzados suelen emplearse antagonistas del receptor NMDA. Y en aquellas ocasiones en las que hay una depresión asociada, suele ser útil el empleo de antidepresivos. Actualmente se están evaluando otros tratamientos como el uso de AINES, estrógenos, factores de crecimiento, inhibidores de BACE y antioxidantes (Bird, 2008).

1.1.4.2. Patogénesis de la enfermedad de Alzheimer

En 1906, Alois Alzheimer describió las placas seniles y los NFTs en el cerebro de una mujer con demencia. Desde entonces se han intentado definir los mecanismos responsables de la patogénesis. Uno de los avances más importantes fue la caracterización bioquímica de los principales componentes de estos agregados, el

péptido A β en las placas seniles, y la proteína tau en los NFTs. Otros descubrimientos claves fueron la clonación del cDNA del gen de la proteína precursora amiloide (APP), en 1987; la detección de una mutación en el gen APP en EA familiar, en 1991; la identificación de la apolipoproteína E4 como factor de riesgo, en 1993; y finalmente el descubrimiento de la presenilina-1 y presenilina-2, en 1995 (Sorrentino et al., 2007).

Las placas seniles o neuríticas consisten en unos depósitos extracelulares de fibrillas amiloides rodeadas de neuritas distróficas, microglia y astrocitos reactivos. El principal componente proteico del núcleo amiloide es un fragmento A β de 40-42 aminoácidos. Este fragmento proteolítico deriva de una proteína transmembrana tipo I, conocida como proteína precursora amiloide (APP), por la acción de un complejo de secretasas. El gen que codifica la proteína APP se localiza en el cromosoma 21. La primera hidrólisis de la APP está mediada por α - o β -secretasas. Éstas últimas también se conocen como complejo BACE. Generan un fragmento C-terminal llamado C99 (ó CTF β) y C89 (ó CTF β ') y un ectodominio APPs- β . Los derivados APP generados por α -secretasas (ó ADAM-10) constituyen un fragmento C83 y un ectodominio APPs- α . Los fragmentos C-terminal originados por ambas secretasas, son sucesivamente degradados por el complejo proteico de las γ -secretasas (ó presenilinas), dando lugar a péptidos de diferente longitud, que incluyen el A β 40, A β 42 y A β 43. Estos péptidos están formados por los 28 aminoácidos del extremo N-terminal anteriores al único dominio transmembrana del precursor, más los primeros 11-14 residuos dentro de la membrana (Sorrentino et al., 2007).

A β 40 es el principal producto del metabolismo de APP. Mientras que A β 42 es la forma más hidrofóbica, con una mayor tendencia a agregarse espontáneamente formando fibrillas amiloides. Se origina por la acción sucesiva de β - y γ -secretasas. Es la forma que predomina en las placas neuríticas, tanto en individuos con demencia como en seniles. Aunque se origina en el cuerpo celular, es transportada dentro de vesículas por el axón y es secretada desde la terminal presináptica a la matriz extracelular donde forma los depósitos fibrilares (Higuchi et al., 2005). En los casos familiares de EA, las mutaciones en el gen APP incrementan la producción total de péptidos A β y/o su especie amiloidogénica A β 42. Sin embargo, en los casos esporádicos de EA, no existe esta sobreproducción. Como las concentraciones normales de A β se mantienen por un balance entre los procesos de síntesis y degradación, es factible pensar que la causa de

la variedad esporádica se deba a un fallo en la eliminación del péptido. Ésta se puede llevar a cabo por una degradación proteolítica de A β o por su transferencia desde el tejido cerebral al líquido cerebroespinal y plasma. La enzima clave responsable de la degradación es una metalo-endopeptidasa conocida como neprilisina. En el cerebro, es relativamente abundante en la ruta nigro-estriatal, donde juega un papel muy importante en la degradación de péptidos opioides. También está presente en el hipocampo, donde actúa como un supresor de la somatostatina. Es una proteína de membrana, con el dominio catalítico orientado hacia la matriz extracelular, lo que posibilita la degradación del péptido A β cuando se libera desde la terminal nerviosa. Esta capacidad catalítica ha sido demostrado en experimentos *in vitro* y en ratones knockout para este gen, donde los niveles A β estaban significativamente aumentados, y eran comparables a los producidos por mutaciones en el gen de la presenilina en la variedad familiar (Higuchi et al., 2005). Estos resultados parecen indicar que una baja actividad de la enzima podría ser suficiente para desencadenar y/o contribuir en la patología de la enfermedad. Además de la neprilisina, existen otras enzimas capaces de degradar el péptido A β y que se han relacionado con la variedad esporádica, como la IDE (insulin-degrading enzyme), la ECE (endothelin-converting enzyme) y la ACE (angiotensin-converting enzyme) (Savaskan, 2005).

Los depósitos NFTs están constituidos por haces fibrilares, intracelulares y no unidos a membrana, organizados en forma de hélices, también llamados PHF (paired helical filaments). El componente principal es la proteína tau hiperfosforilada, asociada a microtúbulos y a otras proteínas estructurales. Aun se desconoce si esta hiperfosforilación favorece o no la agregación y si es anterior al ensamblaje de la proteína o una modificación posterior. En humanos existen seis isoformas de la proteína, resultantes de un único gen por un “splicing” alternativo. La principal función de tau es regular la estabilidad de los microtúbulos, unos componentes estructurales del citoesqueleto de las neuronas, que participan en procesos tan esenciales como el transporte axonal, la elongación, la polaridad y la forma celular. La fosforilación de tau y su capacidad para unirse a los microtúbulos va a depender del equilibrio entre las actividades kinasa/fosfatasa. En EA, la actividad kinasa es mayor y tau se encuentra hiperfosforilada, disminuyendo su afinidad por los microtúbulos y desestabilizando la arquitectura neuronal. La formación de estos agregados se correlaciona con el declive cognitivo y la pérdida neuronal (Spires et al., 2007).

No hay duda que el estudio en la composición de las placas seniles y los depósitos NFTs ha permitido arrojar luz en las bases moleculares y celulares de la EA. No obstante, parece claro que estas lesiones no son las únicas responsables de los procesos neurotóxicos que tienen lugar en las neuronas, y podrían incluso considerarse como un evento posterior a otros fenómenos patológicos.

Diferentes investigaciones han implicado al sistema UPS en la patogénesis de la EA. La formación de agregados proteicos insolubles en células nerviosas es común en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la de Alzheimer. Estas inclusiones muestran inmunoreactividad a la ubiquitina y a otras proteínas. La acumulación de conjugados ubiquitina-proteína, fue primero detectada en NFTs aislados de cerebro humano. Estos conjugados se originan probablemente como consecuencia de un mal funcionamiento o una sobrecarga en el sistema UPS, o por cambios estructurales en sus sustratos proteicos, impidiendo su degradación.

Experimentos *in vitro* han mostrado que los péptidos A β podrían unirse e inhibir al proteosoma, bloqueando la degradación de proteínas conjugadas a ubiquitina. Además, en cultivos neuronales que expresan APP/PSEN1 mutante y que acumulan agregados intracelulares de A β , muestran una inhibición tanto en el proteosoma como en las enzimas desubiquitinizantes. Estos resultados refuerzan la idea de que la toxicidad A β podría originarse por su interferencia con la conjugación de ubiquitina o por su interacción directa con el proteosoma.

También se han propuesto los PHFs de proteína tau como otros candidatos responsables de la inhibición de la función del proteosoma. Estudios en cerebros de pacientes con EA, así como en ensayos *in vitro* usando proteína humana tau recombinante, han mostrado que estos agregados fibrilares inhiben la actividad del proteosoma (Upadhyya et al., 2007).

Las alteraciones cognitivas que aparecen en las fases tempranas, tanto en enfermos de EA como en modelos animales, junto con las alteraciones en el funcionamiento del sistema UPS, apoyan el papel que ejerce los fallos en los fenómenos de proteólisis sobre la disfunción sináptica. La presencia de ubiquitina y su asociación con tau en los NFTs y con el péptido A β en las placas seniles, es común en todos los casos de EA. Los

depósitos de ubiquitina también están presentes en los cuerpos de Lewy, otros agregados que aparecen en algunas formas de la enfermedad y en la enfermedad de Parkinson. En todos los casos, no se conoce el papel que ejercen estas inclusiones en la patogénesis. Aun queda por determinar si los fallos en la proteólisis son causantes o son secundarios en el desarrollo de la enfermedad.

Hace 15 años, diferentes estudios epidemiológicos mostraron una asociación entre elevadas concentraciones de colesterol y una mayor susceptibilidad en desarrollar la EA. Uno de los genes asociados al metabolismo del colesterol es APOE. APOE se localiza en el cromosoma 19 y codifica una proteína de 299 aminoácidos con tres isoformas. APOE $\epsilon 4$ difiere respectivamente de APOE $\epsilon 3$ y APOE $\epsilon 2$ por poseer residuos de arginina en lugar de cisteína en las posiciones 112 y 158. Estas sustituciones tienen un papel crítico en la determinación de la estructura tridimensional de APOE, que da lugar a cambios en su afinidad para unirse a otras moléculas. En general, la isoforma $\epsilon 2$ está asociada con concentraciones plasmáticas bajas de colesterol, mientras que el alelo $\epsilon 4$ se asocia con concentraciones mayores de colesterol total y colesterol LDL (Light density lipoprotein), así como un mayor riesgo de aterosclerosis. La herencia del alelo $\epsilon 4$ es un importante factor de riesgo para desarrollar EA. El genotipo $\epsilon 4$ reduce la edad de aparición de la demencia de manera dosis-dependiente, hasta 7-9 años por alelo. En la mayoría de los estudios, el 40-50% de los pacientes con EA tienen al menos un alelo $\epsilon 4$, comparado con un 10-15% de los sujetos sanos (Shobab et al., 2005).

El colesterol incide en la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de la proteína APP y en la producción de $A\beta$. Como se ha mencionado anteriormente, la proteólisis de APP por β - y γ -secretasas origina fragmentos amiloidogénicos que se agregan formando las placas extracelulares; mientras que las α - y γ -secretasas dan lugar a formas más solubles. El mecanismo por el cual el colesterol afecta a la producción de $A\beta$ es desconocido, pero según las investigaciones en curso, parece que interfiere en la actividad de las secretasas modificando las propiedades físico-químicas de la membrana. La mayor concentración de colesterol en determinadas regiones de la bicapa lipídica, facilitaría el reclutamiento de las β - y γ -secretasas y de sus sustratos, en una configuración óptima, promoviendo la degradación de la APP en sus especies patogénicas.

Su influencia también se extiende a los agregados de proteína tau. La fibrillogénesis y la formación de A β 42, favorecida por un exceso de colesterol en la membrana, promovería de manera indirecta la hiperfosforilación de tau y la producción de NFTs, resultando en una pérdida de la plasticidad sináptica (Michikawa, 2003).

Por otra parte, los radicales libres producidos durante los procesos de estrés oxidativo, juegan un papel muy importante en la patología de la enfermedad de Alzheimer. En las últimas décadas, una gran variedad de estudios han demostrado la existencia de oxidación en lípidos cerebrales, carbohidratos, proteínas y ADN; y marcadores oxidativos en los NFTs y las placas seniles. Algunos resultados parecen indicar que estos fenómenos se dan en estadios muy tempranos, contribuyendo a la patogénesis, incluso antes que los característicos agregados amiloides (Zhu et al., 2004).

Una de las principales fuentes de estrés oxidativo es la mitocondria. En la EA parece existir una actividad reducida de las principales enzimas mitocondriales, que favorecería la producción de especies ROS. Algunos autores han descrito un descenso en la actividad del complejo IV de la cadena de transporte electrónico, en cerebros de enfermos de Alzheimer. También se ha descrito que hay una menor expresión de la enzima citocromo oxidasa en hipocampo. Esta reducción podría deprimir la síntesis de ATP y desviar los electrones de su ruta normal a la producción de radicales superóxido (O $_2^{\cdot-}$) (Markesbery et al., 1999).

Otra fuente de especies ROS es el péptido A β . La estructura secundaria de A β 42, de forma helicoidal, como un pequeño oligómero en la bicapa lipídica de la membrana, induce la peroxidación, dando lugar a la producción de aldehídos reactivos capaces de modificar las proteínas de membrana y sus funciones, favoreciendo la muerte celular (Butterfield et al., 2007).

La inflamación, al igual que en la enfermedad de Parkinson, también se ha relacionado con la etiología del Alzheimer. La hipótesis actual considera que el daño neuronal puede activar la producción de citoquinas inflamatorias por parte de astrocitos y microglia. Estas citoquinas, particularmente IL-1 β , TNF- α y IL-6, podrían afectar al funcionamiento normal de las neuronas. Sin embargo, aun se desconoce el papel exacto que juegan en la neurodegeneración. En diversos estudios se ha demostrado que pueden

inducir la síntesis de APP y otras proteínas similares. Por otra parte, el péptido A β por sí mismo, puede también inducir la expresión de estas citoquinas en cultivos celulares. La IL-6 se ha localizado en las primeras etapas de formación de las placas seniles. Además, se ha documentado un aumento de su secreción en mononucleares sanguíneos periféricos de enfermos de EA comparados con individuos sanos. Otra citoquina, la IL-1 β , induce la actividad iNOS (inducible nitric oxide syntase) en neuronas del hipocampo, con la producción de NO que daría lugar a radicales OONO⁻, altamente reactivos (Rojo et al., 2008).

Aunque se desconoce el inicio exacto de todos estos procesos, formación de placas seniles y NFTs, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y fenómenos inflamatorios, no hay duda de que están implicados en la cascada patogénica que lleva a la muerte neuronal y a la neurodegeneración en la EA.

1.1.4.3. Mecanismos implicados en la neurodegeneración de la EA

Como ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas, el resultado final de los procesos fisiopatológicos de la EA es la muerte neuronal. En la EA hay una intensa pérdida neuronal en la formación hipocampal y en la corteza entorrinal y de asociación, que desestabiliza los circuitos relacionados con la memoria (ver figura 6). La muerte celular contribuye a la pérdida de sinapsis debido a una desaferenciación en las áreas implicadas. Sin embargo, a esta disfunción sináptica también contribuye la formación de los depósitos amiloides. Los péptidos A β que se liberan desde la terminal sináptica, se ensamblan para formar dímeros en la vecindad de la hendidura sináptica, que parecen alterar la homeostais del calcio, elevando la concentración en la neurona postsináptica, y dando lugar a la endocitosis del receptor NMDA y a la reorganización del citoesqueleto (Higuchi et al., 2005). Además, estas placas seniles, son lesiones que ocupan el espacio interneuronal e interrumpen la trayectoria normal de las neuritas. Esto se traduce en un retraso en la transmisión sináptica de varios milisegundos, que podría alterar el tiempo exacto de descarga de los circuitos neuronales, contribuyendo a la demencia (Knowles et al., 1999).



Figura. 6. Cerebro adulto con EA, en el que se aprecia una marcada atrofia cortical y dilatación ventricular (Bird, 2008).

Por otra parte, también se ha propuesto la apoptosis como responsable de la muerte neuronal en la EA. Esta cascada molecular parece desencadenarse por la presencia de los agregados proteicos A β y tau (Cotman et al., 2005). Aunque el péptido A β se genera en la membrana plasmática, desde donde se libera al espacio extracelular, se puede confinar por un proceso de recaptación en vesículas y almacenarse en el retículo endoplásmico. Estos agregados generan un estrés celular que induce la activación de las caspasas a través de mecanismos intracelulares. Una de las consecuencias de la activación de las caspasas es la degradación de la proteína tau en fragmentos más pequeños (Δ Tau) capaces de acelerar la acumulación de los filamentos tau y la formación de los TNFs (Sorrentino et al., 2007).

1.2. ENFERMEDAD NEUROLÓGICA NO DEGENERATIVA

1.2.1. Enfermedad cerebrovascular o Ictus

1.2.1.1. Antecedentes

Las enfermedades cerebrovasculares o ictus están causados por un trastorno circulatorio cerebral que altera transitoria o definitivamente el funcionamiento de una o varias partes del encéfalo. Existen diversos tipos de ictus, según la naturaleza de la lesión producida en la isquemia cerebral y la hemorragia cerebral. Sin embargo, debido a la presencia de diferentes enfermedades o subtipos de ictus, el perfil evolutivo, las características de neuroimagen, la naturaleza, el tamaño y la topografía de la lesión, el mecanismo de

producción y la etiología, se utilizan numerosos términos para describir las enfermedades cerebrovasculares. Es importante conocer el mecanismo causante de esta enfermedad para poder efectuar un adecuado tratamiento y una eficaz prevención secundaria (Arboix et al., 2004).

La diagnosis del ictus diferencia la isquemia de la hemorragia. Ésta última se puede formar por una oclusión arterial o estenosis, que luego dará lugar a la rotura de la arteria. Las imágenes por tomografía computarizada (TAC) y resonancia magnética (MR) muestran que esta diferenciación básica no se puede realizar únicamente desde la historia clínica y el examen médico. Cuando la TAC y la MR no son útiles para el diagnóstico, la punción medular da un resultado positivo sólo cuando el aneurisma o la malformación arteriovenosa se rompe dentro del espacio subaracnoideo; los resultados son normales cuando la hemorragia ocurre en el parénquima. Para algunas terapias, especialmente con agentes neuroprotectores, los beneficios que ofrece en la isquemia no parecen ser compensados en el caso de la hemorragia. Sin embargo, sea cual sea la opción del tratamiento, agentes fibrinolíticos, antitrombóticos o cirugía, la precisión en el diagnóstico es esencial para evitar más daños en el paciente (Mohr et al., 1997).

Las enfermedades cerebrovasculares constituyen una de las principales causas de morbilidad en los países desarrollados. Es la tercera causa de mortalidad, por detrás de las enfermedades cardiovasculares y neoplásicas, en la población adulta de los países occidentales. En España se producen cada año alrededor de 100.000 casos nuevos, con una incidencia de 200 casos nuevos por cada 100.000 habitantes/año. Se esperan que estas cifras sigan aumentando debido al envejecimiento de la población por el aumento de la esperanza de vida. No obstante, los avances conseguidos en identificar las numerosas causas etiológicas proporcionan buenas terapias preventivas.

Todos los pacientes utilizados en este trabajo se seleccionaron tras sufrir ictus no hemorrágicos, por lo que en adelante, solo nos referiremos a este tipo.

1.2.1.2. Etiología de la enfermedad cerebrovascular isquémica

La isquemia cerebral incluye a todas las alteraciones del encéfalo secundarias a un trastorno del aporte circulatorio, ya sea cualitativo o cuantitativo. Hablamos así de

isquemia cerebral focal cuando se afecta sólo una zona del encéfalo y de isquemia cerebral global cuando resulta afectado todo el encéfalo. Se consideran dos tipos de isquemia cerebral focal: el ataque isquémico transitorio y el infarto cerebral. El infarto cerebral o ictus isquémico está ocasionado por la alteración del aporte circulatorio a un territorio encefálico, lo cual produce un déficit neurológico durante más de 24 horas y, consecuentemente, indica la presencia de una necrosis tisular (Arboix et al., 2004). Según su etiología se pueden distinguir los siguientes subtipos:

- Infarto aterotrombótico (aterosclerosis de arteria grande). Es un infarto de tamaño medio o grande, de topografía cortical o subcortical y localización carotídea o vertebrobasilar, en un paciente con uno o varios factores de riesgo vascular cerebral. Es imprescindible la presencia de aterosclerosis clínicamente generalizada o la demostración mediante técnicas invasivas (angiografía) o no invasivas (Doppler) de oclusión o estenosis de las arterias cerebrales, correspondiente con la clínica del paciente.
- Infarto cardioembólico. Infarto generalmente de tamaño medio (1,5 a 3 cm) o grande (> 3 cm), de topografía cortical, con inicio de los síntomas en vigilia, presentación instantánea (en minutos) o aguda (en horas) de la focalidad neurológica y máximo déficit neurológico en las primeras fases de la enfermedad. Es imprescindible la presencia de una cardiopatía emboligénica demostrada y la ausencia de oclusión o estenosis arterial significativa de forma concomitante.
- Enfermedad oclusiva de pequeño vaso arterial (infarto lacunar). Infarto de pequeño tamaño, menor de 1,5 cm de diámetro, en el territorio de una arteria perforante cerebral, que suele ocasionar clínicamente un síndrome lacunar en un paciente con antecedente personal de hipertensión arterial u otros factores de riesgo vascular cerebral, en ausencia de otra etiología.
- Infarto cerebral de causa rara. Infarto de tamaño pequeño, mediano o grande, de localización cortical o subcortical, en el territorio carotídeo o vertebrobasilar en un paciente en el que se ha descartado el origen aterotrombótico, cardioembólico o lacunar. Se suele producir por trastornos sistémicos (conectivopatía, infección,

neoplasia, síndrome mieloproliferativo, alteraciones metabólicas, de la coagulación, etc.) o por otras enfermedades, como disección arterial, displasia fibromuscular, aneurisma sacular, malformación arteriovenosa, trombosis venosa cerebral, angeítis, migraña, etc.

- Infarto cerebral de origen indeterminado. Infarto de tamaño medio o grande, de localización cortical o subcortical, en el territorio carotídeo o vertebrobasilar, en el cual, tras un exhaustivo estudio diagnóstico, se descartan los subtipos anteriores. Dentro de esta etiología indeterminada se pueden incluir los casos en los que coexisten dos o más posibles etiologías, los de causa desconocida o criptogénicos y los derivados de un estudio incompleto o insuficiente.

1.2.1.3. Daños neurológicos asociados

Durante muchos años se ha considerado que los daños ocasionados en la isquemia cerebral, eran simplemente un resultado pasivo de un aporte reducido de oxígeno en las neuronas y otras poblaciones celulares, por debajo del umbral necesario para una producción adecuada de energía que permita la supervivencia celular. Sin embargo, hoy día, existen evidencias experimentales que indican que parte de estos daños están mediados por procesos activos, muchos de los cuales conducen a la producción de radicales libres y otras especies altamente reactivas.

Una de estas especies es el óxido nítrico (NO). Se produce por acción de las diversas isoformas de la NOS. Dos de ellas, la nNOS y la eNOS se activan únicamente cuando las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} son elevadas, en situaciones muy concretas. La tercera, la iNOS, requiere para su activación de concentraciones más bajas, por lo que siempre permanece activa. Las tres isoformas están presentes en el sistema nervioso central, en neuronas y astrocitos; la nNOS además en oligodendrocitos y microglia. Se ha visto que tras un proceso isquémico aumenta la actividad de las tres. Cuando esta actividad no va acoplada a la donación de dos electrones por parte de NADPH, la síntesis de NO va acompañada de la producción de iones superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas moléculas pueden reaccionar entre sí formando radicales hidroxilo, mucho más reactivos. Otra fuente de iones superóxido es la cadena de transporte electrónico de la mitocondria, particularmente en condiciones de isquemia

cerebral. Una de las principales consecuencias de la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno es el daño al ADN nuclear. Pero también se pueden modificar otras macromoléculas, como la citocromo oxidasa, implicada en la respiración mitocondrial, y lípidos y proteínas de membrana (Love, 1999).

El glutamato también juega un papel importante en la isquemia cerebral. Bajo condiciones normales, la acción de este neurotransmisor que se libera en la sinapsis, finaliza cuando es recaptado del espacio extracelular por una familia de proteínas transportadoras de glutamato. La energía que permite este proceso proviene del transporte de Na^+ y K^+ a favor de sus gradientes electroquímicos, el Na^+ es co-transportado con glutamato hacia el interior de la célula y el K^+ al exterior. Sin embargo, tras un episodio de isquemia, el metabolismo anaerobio conduce a una disminución en la producción de ATP, y consecuentemente un fallo en el funcionamiento de la bomba Na^+/K^+ . El resultado es el movimiento de iones solo a favor de gradiente, que lleva a la despolarización de la membrana. Este cambio de polaridad hace que las proteínas que transportan glutamato reviertan su dirección, acumulándose en el espacio extracelular hasta alcanzar niveles neurotóxicos. Una de las consecuencias directas es el aumento intracelular de Ca^{2+} por activación de receptores NMDA.

Por último, aunque en la isquemia la mayoría de las células dañadas mueren por necrosis, se ha evidenciado apoptosis en neuronas y glia de muchos modelos animales. Se ha comprobado que la expresión de caspasa-3 aumenta considerablemente durante las primeras horas después de una isquemia transitoria. La importancia de este hallazgo y de todos los anteriores radica en la posible aplicación terapéutica a fin de minimizar el área de lesión afectada (Love, 1999).

El grupo de pacientes que ha sufrido ictus no hemorrágico, se ha utilizado como control de enfermedad neurológica no degenerativa y aguda. Este grupo nos puede dar información de qué parámetros se modifican en las enfermedades degenerativas progresivas (EP, EH, EA) frente a un accidente cerebrovascular isquémico, en principio, no neurodegenerativo y agudo.

1.3. AMINOPEPTIDASAS

1.3.1. Clasificación y nomenclatura

Las aminopeptidasas (APs) constituyen un grupo de enzimas muy heterogéneo, con una amplia distribución tanto en el reino animal como vegetal. Se localizan principalmente unidas a la membrana plasmática externa (ectoenzimas), pero también las hay solubles en plasma y otros fluidos, citosólicas y en diferentes organelas celulares (Gil et al., 2001).

La clasificación de este grupo es bastante compleja debido a la gran heterogeneidad de sus integrantes. Por su actividad hidrolítica pertenecen a la clase 3, según la clasificación de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), y a la subclase 3.4 porque engloba a todas las hidrolasas de péptidos. Como su nombre indica, llevan a cabo la hidrólisis de aminoácidos concretos del extremo amino terminal de proteínas y sustratos peptídicos. La gran mayoría presentan la nomenclatura EC 3.4.11 y 3.4.14. Sin embargo existen otras clasificaciones, y según la bibliografía consultada una misma enzima puede presentar diferentes nombres. Se pueden clasificar por el número de aminoácidos que eliminan del extremo amino terminal de sus sustratos (dipeptidasas, tripeptidasas...); por la especificidad de los residuos (alanina aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa...); por la localización (soluble, de membrana, citosólica...); por su susceptibilidad a la inhibición por bestatina u otros inhibidores; por su ión metal y/o residuos que se unen al metal de la enzima (metaloenzimas de zinc) y por el pH en el que desarrollan su actividad máxima (Taylor, 1993).

La siguiente tabla muestra las aminopeptidasas más importantes en mamíferos (ver tabla 2). Se ha elaborado, en su mayor parte, según la información recogida en la base de datos BRENDA (www.brenda-enzymes.info). Esta base, específica para enzimas, fue creada en 1987 por el Centro Alemán de Investigación Nacional para Biotecnología, en Braunschweig, y actualmente continúa su mantenimiento y actualización el Instituto de Bioquímica de la Universidad de Colonia. La información que facilita se obtiene a partir de la bibliografía publicada tras una exhaustiva revisión por científicos de gran prestigio. Algunos datos de terminología y localización celular se han conseguido a partir del Comité de Nomenclatura de Bioquímica (CBN). Este comité fue creado por la

Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) y por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC). Nació con el objetivo de dar a conocer a la comunidad científica una terminología bioquímica unificada y comprensible, lejos de los diferentes sistemas de clasificación utilizados hasta entonces (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/).

	Número EC	Nombre (AP = aminopeptidasa)	Nombres alternativos	Clase de proteinasa	Localización celular	Presente en cerebro
1	3.4.11.1	Leucina AP citosólica	Citosol AP, catepsina III	Metalo (Zn ²⁺)	Citosol	Si
2	3.4.11.2	Alanina AP de membrana	APN, APM, CD13	Metalo (Zn ²⁺)	Membrana	Si
3	3.4.11.3	Cistina AP	Oxitocinasa, vasopresinasa, P-LAP, IRAP, receptor de Ang IV	Metalo (Zn ²⁺)	Membrana	Si
4	3.4.11.4	Tripéptido AP	Tripeptidasa, enzima que degrada CCK	Metalo (Zn ²⁺)	Citosol	Si
5	3.4.11.5	Prolina AP		Activada por Mn ²⁺	Citosol	Si
6	3.4.11.6	Arginina AP	APB	Activada por tiol, Cl ⁻	Citosol, membrana	Si
7	3.4.11.7	Glutamato AP	APA, angiotensinasa A	Metalo (Zn ²⁺) Activada por Ca ²⁺	Membrana	Si
8	3.4.11.9	Xaa-Pro AP	APP	Activada por Mn ²⁺	Citosol, membrana	Si

9	3.4.11.14	Alanina AP citosólica	Aminopeptidasa III, PSA	Metalo (Zn ²⁺) Activada por Co ²⁺	Citosol	Si
10	3.4.11.16	Xaa-Trp AP	APW	Metalo (Zn ²⁺)	Membrana	Si
11	3.4.11.18	Metionina AP			Membrana	No
12	3.4.11.21	Aspartato AP	APX	Metalo (Zn ²⁺)	Citosol, membrana	Si
13	3.4.14.1	Dipeptidil peptidasa I	Catepsina C o J		Lisosoma, membrana	Si
14	3.4.14.2	Dipeptidil peptidasa II	Dipeptidil AP II		Lisosoma	Si
15	3.4.14.4	Dipeptidil peptidasa III	Dipeptidil AP III, encefalina B		Citosol, membrana	Si
16	3.4.14.5	Dipeptidil peptidasa IV	Dipeptidil AP IV	Serina	Membrana	Si
17	3.4.14.9	Tripeptidil peptidasa I	Tripeptidil AP		Lisosoma	Si
18	3.4.14.10	Tripeptidil peptidasa II	Tripeptidil AP II		Citosol	Si
19	3.3.2.6	Leucotrieno-A4 hidrolasa	LTA4 hidrolasa		Citosol	Si
20		APO			Nucleolo, citosol	No
21		APQ	Laeverina		Membrana	Si
22		Leucina AP derivada de adipocito	A-LAP/PILSAP	Metalo (Zn ²⁺)	Citosol, retículo endoplásmico	Si
23		AP derivada de leucocito	L-RAP	Activada por tiol, Cl ⁻	Retículo endoplásmico	Si
24		Ectoenzima que degrada TRH	TRH-DE	Metalo (Zn ²⁺)	Membrana	Si

Tabla 2. Clasificación de las principales aminopeptidasas en mamíferos

1.3.2. Localización y distribución

Antes de continuar hay que destacar que, como la nomenclatura de estas enzimas es muy variada y no está del todo normalizada, con el fin de evitar confusiones, en este texto se va a seguir la nomenclatura que identifica a las aminopeptidasas por el aminoácido N-terminal que hidrolizan preferentemente.

Como se puede apreciar en la tabla 2, a nivel celular, la gran mayoría son proteínas de membrana. Su localización es muy amplia, encontrándose en el SNC y en tejidos y órganos periféricos, principalmente en riñón, intestino, hígado, pulmón, placenta, corazón y sangre. También las hay solubles, en citosol, o segregadas al líquido cefalorraquídeo y plasma. Son en su mayoría metaloenzimas dependientes de Zinc. En los párrafos siguientes se resume la distribución de aquellas aminopeptidasas que van a ser objeto de estudio en este trabajo de investigación.

La enzima cistina aminopeptidasa fue aislada, en un principio, como proteína soluble en plasma de mujeres embarazadas, liberada desde placenta, incrementándose notablemente durante el primer trimestre del embarazo (Matsumoto et al., 2001). Experimentos posteriores determinaron que es una proteína de membrana, localizada en vesículas intracelulares junto al transportador de glucosa GLUT4, principalmente en adipocitos y células de músculo esquelético. En respuesta a insulina, estas vesículas migran y se fusionan con la membrana plasmática, quedando las dos proteínas localizadas en la cara externa (Tsujimoto et al., 2005).

La alanina aminopeptidasa es una proteína integral de membrana tipo II, localizada en la membrana celular como ectoenzima, en las células de bordes en cepillo de riñón, células de la mucosa intestinal e hígado. También se distribuye en el SNC, en cerebro y médula espinal. Está presente en células endoteliales, membranas sinápticas, astrocitos y pericitos (Luan et al., 2007).

La glutamato aminopeptidasa, al igual que la anterior, es otra proteína integral de membrana tipo II. Se expresa en pericitos vasculares y en el glomérulo y túbulo proximales del riñón (Suganuma et al., 2004). Como la cistina aminopeptidasa, se aisló

por primera vez en placenta, aumentando también su concentración plasmática en mujeres embarazadas (Hariyama et al., 2000).

Las enzimas leucina aminopeptidasa citosólica y arginina aminopeptidasa son proteínas solubles. Ambas se localizan en células endoteliales y en las proximidades del Retículo endoplasmático (RE) (Tsujimoto et al., 2005).

Las enzimas piroglutamil aminopeptidasa II y aspartato aminopeptidasa son también proteínas solubles, localizadas en el citosol. Se han identificado en cerebro, principalmente en la fracción sinaptosomal (Gil et al., 2001).

1.3.3. Fisiología y fisiopatología de las aminopeptidasas

Por su amplia distribución estas enzimas cumplen funciones muy diversas. A grandes rasgos podemos dividir las en cuatro grupos:

- Las implicadas en la regulación de la presión sanguínea (Sistema Renina-Angiotensina).
- Las implicadas en la memoria y aprendizaje.
- Las implicadas en la regulación neuroendocrina de hormonas, neurotransmisores peptídicos y neuromoduladores.
- Otras funciones.

El Sistema Renina-Angiotensina (RAS) comprende un conjunto de enzimas y péptidos biológicamente muy activos. Sus principales componentes son la Ang II y la Ang IV. Todos sus miembros se localizan a nivel periférico. Sin embargo, recientemente se comprobó la existencia de miembros del Sistema Renina-Angiotensina en el Sistema Nervioso Central. El hecho de que la Ang II no pueda atravesar la barrera hematoencefálica demuestra la existencia de un sistema RAS completamente diferente al periférico (Bohlen et al., 2006). La Ang II es el metabolito más activo. Se forma a partir del angiotensinógeno por acción de la renina, que lo convierte en Ang I, y por la acción de la enzima que convierte angiotensina (ACE), ésta pasa a Ang II. Su función biológica se desarrolla tras su unión a receptores AT₁ y AT₂. Así se le atribuyen funciones en el control de la tensión arterial (TA), balance de sal y agua y secreción de

vasopresina entre otras (Mitsui et al., 2004). Por último, la glutamato aminopeptidasa convierte la Ang II en Ang III, y la alanina aminopeptidasa en Ang IV.

Está demostrado que el sistema RAS es un importante regulador de la tensión arterial, de tal forma que una actividad mayor da lugar al desarrollo de hipertensión en diferentes tipos de modelos animales experimentales. La Ang II, como se ha mencionado anteriormente, se ha considerado el péptido clave para la regulación de la tensión arterial. Sin embargo, actualmente se ha documentado que algunos metabolitos, como la Ang III y Ang IV, juegan también un papel importante en la regulación de la TA. El grupo de Llorens-Cortes, demostró que la Ang III es el principal efector en la regulación de la TA y liberación de vasopresina del sistema RAS central. Es necesario, por tanto, la conversión de la Ang II en Ang III por la glutamato aminopeptidasa. Luego, la Ang III puede ser degradada a Ang IV por la alanina aminopeptidasa, aunque otras enzimas también pueden contribuir al metabolismo de las angiotensinas (Tsujimoto et al., 2008).

La importancia de las aminopeptidasas en la regulación de la TA quedó confirmada tras una serie de inyecciones intracerebroventriculares (i.c.v.) de estas enzimas en ratas hipertensas SHR. Mientras que la inyección de glutamato aminopeptidasa daba lugar a un incremento en la TA, la de alanina aminopeptidasa originaba lo contrario (Wright et al., 1990). Posteriormente, el grupo de Llorens-Cortes demostró que la inyección i.c.v. de un inhibidor selectivo de la glutamato aminopeptidasa bloqueaba el aumento de la TA mediado por la Ang II, sugiriendo que la conversión de Ang II a Ang III se requería para incrementar la TA. Por otra parte, la inyección i.c.v. de un inhibidor selectivo de la alanina aminopeptidasa incrementaba la TA. Estos resultados daban consistencia a la hipótesis de la Ang III como principal efector del sistema RAS central.

Recientemente se detectó un polimorfismo en la región promotora del gen de la alanina aminopeptidasa que afectaba la expresión de la enzima, de tal forma que una baja concentración de la enzima se asociaba con hipertensión en ratas Dahl sensibles a sal, demostrando una vez más la importancia de esta aminopeptidasa en el control de la TA (Kotlo et al., 2007).

La glutamato aminopeptidasa es una zinc-metalopeptidasa que hidroliza, preferentemente, aminoácidos del extremo N-terminal de sustratos como la Ang II y la colecistokinina-8 (CCK8). Es una proteína integral de membrana tipo II. Aunque la enzima forma un dímero a través de un enlace disulfídico, este enlace no es esencial para la actividad enzimática de la proteína. Durante la gestación, la enzima también existe como forma soluble en el suero retroplacentar. Su pH óptimo es 7.0 medido con Glu-4-metilcoumaril-7-amida (Glu-MCA) como sustrato.

El dominio extracelular de la glutamato aminopeptidasa se divide en dos subdominios, un dominio catalítico de 107 kDa, que contiene un motivo HEXXH, y un dominio C-terminal de 45 kDa. Éste último se requiere para la dimerización de la enzima y actúa como una chaperona intramolecular necesaria para el correcto plegamiento, tráfico intracelular y actividad de la enzima.

Se ha comprobado que el Ca^{2+} modula positiva o negativamente la actividad de la enzima, dependiendo de los sustratos ensayados. Es la única enzima de su familia cuya actividad es regulada por este catión. Los péptidos que tienen aminoácidos ácidos en su extremo N-terminal, tales como la Ang II, la CCK8 y la neurokinina B, son hidrolizados eficazmente por la enzima en presencia pero no en ausencia de Ca^{2+} . En contraste, la kalidina (ó Lys-bradikinina) se hidroliza eficazmente solo en ausencia de Ca^{2+} . El Ca^{2+} por tanto, puede modular positivamente la actividad enzimática de la glutamato aminopeptidasa sobre los péptidos implicados en la regulación de la TA. Además, se ha demostrado que la Ang IV inhibe la actividad enzimática de la enzima. Esto podría tener una importancia patológica al reducir la cantidad de Ang III generada en sistema RAS central (Tjusimoto et al., 2008).

Otra enzima que integra el sistema RAS es la alanina aminopeptidasa. Al igual que la anterior, es una zinc-metalopeptidasa y una proteína integral de membrana tipo II, localizada en la membrana celular como ectoenzima, ligada a través de su extremo N-terminal. Su peso molecular es de 140-150 kDa, aunque puede variar dependiendo de su grado de glicosilación. Generalmente se encuentra en forma dimérica a través de un enlace no covalente. Esta enzima es sensible a proteólisis y puede ser degradada en dos partes con un peso molecular de 90 y 45 kDa aproximadamente. Esto hace que se pueda hablar de dos formas de la enzima, una anclada a membrana y otra soluble.

En cuanto a su estructura cabe destacar la existencia de 7 dominios, comúnmente llamados dominios I-VII. El dominio I comprende la parte citosólica de la enzima, su extremo N-terminal, aunque también favorece el anclaje de la célula. El dominio II constituye el dominio de anclaje, con una estructura α -hélice muy conservada. El dominio III es ya extracelular, donde forma un tallo que da soporte a la parte catalítica de la enzima. El dominio IV comprende los aminoácidos 70-252; no constituye un dominio importante en la actividad enzimática. Los dominios V y VI comprenden los aminoácidos 253-580; albergan el sitio catalítico de la alanina aminopeptidasa, donde es necesaria la unión del ión zinc. El dominio VII incluye los aminoácidos 581-967, y forma el extremo C-terminal; a través de este dominio, por un enlace no covalente, se puede constituir el dímero (Luan et al., 2007).

Entre los sustratos característicos de la alanina aminopeptidasa, además de la Ang III, cabe destacar las encefalinas. Es interesante destacar la acción depresora de estos péptidos sobre la TA en el SNC. Otro sustrato es la neurokinina A, también con acción depresora en el cerebro (Speth et al., 2008).

Ambas enzimas, la glutamato aminopeptidasa y la alanina aminopeptidasa, constituyen dos aminopeptidasas claves en la regulación de la TA, siendo responsables de las concentraciones y disponibilidad de Ang II y Ang III, y por tanto de sus efectos fisiológicos.

Estas angiotensinas (Ang II y Ang III) ejercen su acción biológica uniéndose a receptores AT₁ (ATR1) y AT₂ (ATR2). La afinidad de la Ang II por estos receptores y el mecanismo de acción están bien documentados. La identificación de AT₁ y AT₂ como receptores acoplados a proteínas G data de los primeros años de la década de los 90, con la clonación de ambos tipos. AT₁ es el subtipo más abundante y media todos los efectos fisiológicos y fisiopatológicos de las angiotensinas. Se localiza principalmente en la membrana plasmática externa, sin embargo también se ha documentado una distribución nuclear, perinuclear y perimitocondrial. Esta localización intranuclear podría tener una función intracrina, en cualquier caso secundaria a su activación inicial en la membrana plasmática. Aunque desde siempre se ha conocido su expresión en neuronas, hay que destacar su presencia en células gliales, endotelio vascular y fibroblastos (Speth et al., 2008). AT₂, que comparte un 32-34% de homología con AT₁,

parece estar implicado en el desarrollo cerebral y apoptosis (Bohlen et al., 2006). Durante los primeros años desde la identificación de estos receptores, se pensaba que la inactivación de la Ang II tenía lugar con la hidrólisis de los dos últimos aminoácidos y la conversión en Ang III, desapareciendo la capacidad para activar a AT₁ y AT₂. Sin embargo, se demostró que la Ang III era capaz de causar los mismos efectos que la Ang II y unirse a ambos receptores con una afinidad muy similar. Hoy día se acepta que la Ang III es un péptido activo del sistema RAS, capaz de ejercer una acción tónica en la TA. Existe una gran controversia sobre el liderazgo de la Ang III en el sistema RAS, en lo que se conoce como “hipótesis de la Ang III”. Si es cierto que diferentes experimentos han documentado la necesidad de conversión de la Ang II a Ang III para ejercer su papel fisiológico sobre los receptores (Song et al., 1997; Reaux et al., 2001), no puede recaer todo el peso de la regulación de la TA en esta angiotensina. Hay que tener en cuenta que, aunque se ha destacado la glutamato- y la alanina aminopeptidasas como las dos aminopeptidasas claves en el metabolismo de las angiotensinas, existen otras aminopeptidasas alternativas que utilizan los mismos sustratos y originan los mismos metabolitos. Por tanto, sin desestimar la importancia de estas dos enzimas sobre la disponibilidad de Ang II y Ang III en el sistema RAS, hay que considerar todos los componentes perfectamente integrados en un funcionamiento global y no aislado. Por último, en una revisión reciente publicada por miembros de nuestro grupo (Ramírez et al., 2008), se ha descrito la importancia de otros factores en las actividades aminopeptidasas implicadas en el control de la TA. Habría que considerar cómo influye la distribución asimétrica de determinadas aminopeptidasas sobre los péptidos susceptibles de ser degradados, además del ambiente bioquímico que las rodea. Los autores insinúan una regulación de estas enzimas por la concentración de colesterol y esteroides, especialmente de testosterona. Esto podría explicar la dislipemia asociada con la hipertensión arterial y algunas enfermedades cardíacas.

A diferencia de la Ang III, la afinidad de la Ang IV por los receptores AT₁ y AT₂ es muy baja. Sin embargo, muestra una alta afinidad por el receptor AT₄. La clonación de este receptor en el año 2001 determinó una estructura diferente a los dos receptores clásicos, y se identificó por su homología con la enzima cistina aminopeptidasa, también llamada IRAP (Insulin-regulated aminopeptidase) (Albiston et al., 2001). Esta enzima pertenece al grupo de las metalopeptidasas dependientes de zinc. Muy similar a la alanina aminopeptidasa, es una proteína integral de membrana tipo II. Posee dos

motivos característicos en su dominio C-terminal, el cual es extracelular cuando la proteína se encuentra en la membrana plasmática: un motivo muy conservado de unión al zinc, HEXXH-X-E, y el motivo GXMEN, que se cree importante para su actividad exopeptidasa. La forma soluble de la enzima se conoce como oxitocinasa o leucina aminopeptidasa placentar (P-LAP), por estar presente en suero de mujeres embarazadas y ser responsable de la hidrólisis de la oxitocina. También se expresa en cerebro, pero sólo en células neuronales. Otros sustratos de la enzima son vasopresina, lisina-bradikinina, Ang III, met-enkefalinas, dinorfina A, neurokinina A, neuromedina B, somatostatina y colecistokinina-8 (Chai et al., 2004). En adipocitos y células del músculo esquelético se co-localiza con el transportador de glucosa 4 (GLUT4) en vesículas intracelulares. La insulina induce la translocación de GLUT4 y de la cistina aminopeptidasa desde las vesículas a la membrana plasmática, de ahí que se conozca también con el nombre de IRAP. Se ha descrito que defectos en el tráfico intracelular de la cistina aminopeptidasa pueden estar relacionados con el desarrollo de diabetes tipo II. Por otra parte, en células renales, es la vasopresina la que induce la translocación de la enzima, facilitando la degradación de la hormona cuando está en exceso. Podría actuar, por tanto, como un regulador negativo de la propia hormona. Como receptor de la Ang IV, una hormona vasodilatadora, está implicado en la regulación de la TA. Siendo uno de sus sustratos la Ang III, se piensa que el receptor, a través de su actividad catalítica intrínseca, puede generar su propio ligando Ang IV para activar diferentes moléculas efectoras como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y la enzima NOS. Además, es posible que otro efecto de la Ang IV sea inhibir la función enzimática de AT₄ prolongando la vida media de diversos péptidos activos, algunos con funciones cognitivas como la vasopresina, la sustancia P y la somatostatina, y otros implicados en la regulación del tráfico vesicular de GLUT4 (Albiston et al., 2001; Albiston et al., 2003; Tsujimoto et al., 2008).

La Ang IV también promueve la liberación de dopamina en estriado (Stragier et al., 2007) y de otros neurotransmisores. La unión del ligando a su receptor, AT₄, potencia la liberación de acetilcolina en hipocampo sugiriendo que los agonistas del receptor pueden estar mediados en la potenciación de la neurotransmisión colinérgica (Mustafa et al., 2001).

Las encefalinas, endorfinas, dinorfinas y orfaninas endógenas pertenecen a la familia de péptidos opiodes relacionados con las vías de transmisión del dolor. Funcionan como neurotransmisores y hormonas en el sistema nervioso y endocrino. Estos péptidos tienen una estrecha relación estructural y comparten con los opiáceos su acción en la analgesia (Hui, 2007). Los opioides tienen una secuencia N-terminal común necesaria para poder realizar su función. Esta secuencia es susceptible de ser degradada por aminopeptidasas. Aunque todavía no se ha identificado una “encefalinasasa” específica, el estudio con inhibidores como bestatina y puromicina potencian el efecto analgésico, destacando su alto valor terapéutico. Las dos aminopeptidasas propuestas hasta el momento son la alanina aminopeptidasa y la aminopeptidasa sensible a puromicina (ó PSA) (Luan et al., 2007).

Por otra parte se han relacionado con la génesis de tumores y sus concentraciones se alteran en diferentes tipos de tumores. El cáncer de pulmón es un problema de salud cada vez más común en el mundo, donde la variedad de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) comprende el 75% del 80% de los casos. La gran rapidez de metástasis es el principal problema a la hora de abordar el pronóstico de estos pacientes. Debido a que el tratamiento estándar con quimioterapia es relativamente inefectivo, es necesario el desarrollo de nuevas terapias anticancerígenas. Las aminopeptidasas juegan un papel clave en el control del crecimiento celular, diferenciación y transducción de señales de muchos sistemas celulares, modulando la actividad de pequeños péptidos bioactivos. Un cambio en el patrón de expresión y de su función catalítica puede contribuir al desarrollo de diversas enfermedades, incluida la transformación neoplásica y la progresión del tumor (Larrinaga et al., 2007). Se ha documentado que la alanina aminopeptidasa se sobreexpresa en células tumorales y juega un papel crítico en la angiogénesis y la metástasis del tumor (Luan et al., 2007). Se considera una molécula de adhesión auxiliar localizada en la zona de contacto célula-célula en colonias celulares de melanoma, y se asocia muy estrechamente con componentes de la matriz extracelular. Condiciones de hipoxia, y factores de crecimiento angiogénicos como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), aumentan la expresión endógena de la alanina aminopeptidasa (Tokuhara et al., 2006). En la variedad NSCLC la concentración es elevada, y se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad, como estadio avanzado o respuesta pobre a quimioterapia. Aunque no tiene el valor de marcador tumoral, su concentración se correlaciona con la

progresión del tumor (Murakami et al., 2005). La expresión de la glutamato aminopeptidasa se ha detectado en células de carcinoma de cuello de útero. Como ocurre en otros muchos tumores, la interacción celular entre las células neoplásicas y las adyacentes es esencial para la progresión del tumor. En este sentido, la liberación del VEGF por parte de las células estromales que rodean a la masa tumoral favorece la expresión de esta aminopeptidasa (Suganuma et al., 2004). La importancia funcional de este enzima en la progresión del tumor no es del todo conocida. Como se ha mencionado en párrafos anteriores, la glutamato aminopeptidasa degrada enzimáticamente la Ang II en Ang III, dentro de la ruta catabólica del sistema renina-angiotensina. Recientes estudios han demostrado que la Ang II no sólo actúa como un vasoconstrictor, sino además como un factor de crecimiento. Por otro lado, estimula la migración celular y favorece el crecimiento del coriocarcinoma estimulando la invasión celular. Estos datos sugieren que la glutamato aminopeptidasa podría actuar como regulador negativo del crecimiento tumoral mediado por Ang II, posiblemente inactivando la Ang II producida localmente (Ino et al., 2000; Suganuma et al., 2004). Otro tipo de tumor frecuente es el carcinoma de células renales (RCC), que afecta aproximadamente al 3% de individuos adultos. La variedad de células claras (CCRCC) es el subtipo histológico mayoritario, comprendiendo el 70% de los casos. El resto corresponde al de células papilares (PRCC) y células cromóforas (ChRCC), con una incidencia del 10% y del 5% respectivamente. El riñón es uno de los principales tejidos donde se expresa la enzima cistina aminopeptidasa. Esta enzima juega funciones muy importantes en las células renales, tales como regulación del transporte de sodio y degradación del exceso de vasopresina. Según el trabajo de Larrinaga y cols. (2007), la actividad de la cistina aminopeptidasa descende en los tres subtipos de carcinomas renales, siendo más acusada en la fracción unida a membrana. Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros autores en carcinoma de endometrio. Actualmente se sabe que la oxitocina y la vasopresina, dos de los principales sustratos de esta enzima, pueden actuar como potentes activadores o inhibidores del crecimiento celular, dependiendo del tipo de tumor. En este caso, como la vasopresina favorece la proliferación celular en el carcinoma renal, la baja actividad de la cistina aminopeptidasa aseguraría una concentración adecuada del péptido. Otro tumor relacionado con esta aminopeptidasa es el carcinoma de endometrio. Se puede considerar como el cáncer ginecológico más común en Estados Unidos. Se ha demostrado que la cistina aminopeptidasa está presente en células y tejidos de

adenocarcinoma endometrial, actuando como un regulador del crecimiento celular. Esta proliferación está mediada por insulina, desencadenando el aumento de la expresión y la translocación del transportador de glucosa GLUT4 y de la cistina aminopeptidasa desde las vesículas citosólicas a la membrana plasmática. La elevada expresión de la enzima junto con una mayor disponibilidad de glucosa favorece el crecimiento celular. Estos casos se han relacionado con un peor pronóstico de la enfermedad (Shibata et al., 2007). La metionina aminopeptidasa, como su nombre indica, degrada principalmente metionina del extremo N-terminal de péptidos y proteínas. Esta eliminación es esencial para que se lleven a cabo otras modificaciones posteriores, como acetilación y miristoilación. Recientemente se le ha otorgado un papel importante a esta última modificación por estar presente en muchas proteínas implicadas en la regulación del crecimiento celular y/o transducción de señales. Se ha documentado una mayor expresión de metionina aminopeptidasa en tejidos de adenocarcinoma colorectal comparados con tejidos sanos adyacentes al tumor. Este aumento de expresión coincide con una sobreproducción de oncoproteínas específicas miristoiladas en su extremo N-terminal. Estos resultados demuestran la implicación de esta aminopeptidasa en el desarrollo del tumor y lo señalan como un nuevo biomarcador útil para una detección temprana del adenocarcinoma colorectal (Selvakumar et al., 2006).

Destaca también la posible implicación de estas enzimas en enfermedades metabólicas como la diabetes tipo II. Como ya se ha mencionado la cistina aminopeptidasa/IRAP se localiza en vesículas intracitoplasmáticas junto con el transportador de glucosa GLUT4, principalmente en células de músculo esquelético y adipocitos (Tsujimoto et al., 2005). En respuesta a la insulina, estas vesículas se fusionan con la membrana plasmática quedando las dos proteínas en la cara externa. Sólo así IRAP puede llevar a cabo su función. Uno de sus sustratos específicos es la vasopresina, también conocida como hormona antidiurética. Esta hormona posee residuos ricos en cisteína en su extremo amino terminal y que al ser hidrolizados la inactiva. Se ha observado en adipocitos aislados que en presencia de insulina esta hidrólisis de vasopresina se incrementa hasta tres veces (Keller, 2004). Por tanto, la insulina podría promover la inactivación de la hormona y controlar su acción. La diabetes tipo II se caracteriza por la resistencia a la insulina y una de sus principales consecuencias es la reducción en el transporte y la fusión de las vesículas que contienen el transportador GLUT4 y la enzima IRAP con la membrana, además de un descenso en la expresión del transportador GLUT 4. Esto se

traduce en una hiperglucemia con todas sus complicaciones (Keller, 2004). Cabría esperar además una disminución en la hidrólisis y por tanto una alteración en la función biológica de aquellas hormonas que son susceptibles a IRAP. Sin embargo, queda por determinar si esta enzima contribuye o no a las complicaciones de la enfermedad, a pesar de que las conexiones son evidentes.

Otro papel fisiológico a destacar sería la participación de la alanina aminopeptidasa en la utilización por parte de las neuronas del precursor exógeno del glutatión “Cys-Gly” (Dringen et al., 2001). Hidroliza el dipéptido, permitiendo la entrada de los dos aminoácidos por separado en la neurona. Esta enzima, por tanto, es esencial en la colaboración metabólica entre la astrogliá y las neuronas en el metabolismo del glutatión en el cerebro.

También cumplen funciones relacionadas con el Sistema Inmune. La leucina aminopeptidasa citosólica y la arginina aminopeptidasa, participan en la preparación de los péptidos antigénicos en el Retículo Endoplásmico (RE) que luego serán presentados a las moléculas MHC de clase I (Tsujimoto et al., 2005). Juegan así un papel muy importante en la eliminación de células transformadas e infectadas por virus. Otra aminopeptidasa, sin embargo, parece actuar como receptor de virus de la familia Coronavirus. Estos virus son responsables de infecciones respiratorias del tracto superior en niños, jóvenes y adultos. La alanina aminopeptidasa se ha identificado como un receptor celular para el coronavirus humano donde el grado de glicosilación de los aminoácidos de la enzima puede afectar a la interacción entre el virus y el receptor (Luan et al., 2007).

1.3.4. Las aminopeptidasas en las enfermedades neurodegenerativas

Por último, para cerrar este apartado y dar pie a uno de los objetivos principales de esta tesis, hay que mencionar la conexión existente entre las aminopeptidasas y las enfermedades neurodegenerativas. Recientemente, miembros de nuestro grupo demostraron su implicación en la enfermedad de Parkinson. Los enfermos de Parkinson y los animales con parkinsonismo experimental no solo presentan alteraciones motoras, también desarrollan alteraciones autónomas y neuroendocrinas. En el estriado, neuropéptidos como la colecistocininas, la angiotensinas y las encefalinas, coexisten

junto con la dopamina (DA). El papel que desarrollan en el estriado y en la patofisiología de las enfermedades neurodegenerativas que afectan al sistema nigroestriatal es desconocido. Por otra parte, existen un gran número de fibras estriatales que contienen colecistokinina, que se originan en áreas corticales prefrontales, que también modulan funciones autónomas y neuroendocrinas. Estos neuropéptidos, después de ser liberados en la terminal sináptica para activar a sus receptores correspondientes, son hidrolizados principalmente por peptidasas unidas a membrana. Entre ellas destacan las aminopeptidasas. Son las enzimas proteolíticas más abundantes en el cerebro, y juegan un papel fundamental en el control de la función de pequeños péptidos bioactivos. De ahí que resulte interesante estudiar la actividad de estas enzimas en la EP y analizar su contribución al desarrollo de la enfermedad. Banegas y cols. (2005), demostraron un marcado descenso de la actividad de estas neuropeptidasas en algunas estructuras cerebrales (estriado, sustancia negra y corteza prefrontal) de ratas lesionadas unilateralmente en el estriado con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Posteriormente, y apoyándose en estos resultados, analizaron la actividades alanina-, cistina-, aspartato- y glutamato-aminopeptidasa (APs) en plasma de enfermos de EP, encontrando un descenso significativo en todas las actividades con excepción de la alanina (Banegas et al., 2006a). Resultados similares se obtuvieron en cerebro humano (Mantle et al., 1995). Sin embargo, no pudieron compararse con los obtenidos en plasma de ratas lesionadas, donde las actividades variaban en función del hemisferio lesionado (Banegas et al., 2004). No obstante, estos resultados en modelos experimentales tienen que tratarse con precaución, ya que la lesión producida con la neurotoxina 6-OHDA da origen a una patología aguda y no crónica como ocurre en humanos. En resumen, el descenso de las actividades APs en cerebro y plasma de enfermos de Parkinson podría estar relacionado con la reducción de la inervación simpática y la disfunción autónoma asociada a la EP.

Además de estas funciones, el descenso de la actividades APs se ha relacionado con una disminución de los procesos catalíticos descritos en las enfermedades neurodegenerativas, y que dan lugar a la formación de agregados de proteínas (cuerpos de Lewy, cuerpos de inclusión, placas seniles, etc.). En la enfermedad de Alzheimer (EA), estas aminopeptidasas tienen una implicación directa en el catabolismo del péptido A β . Recientemente se demostró que estos depósitos no son consecuencia de una sobreproducción sino más bien de una disminución en los procesos de degradación

(Saïdo, 1998). La posibilidad de que estas enzimas puedan participar en el catabolismo de los péptidos A β quedó respaldada analizando la estructura de estos depósitos amiloides, donde se observó una mayor heterogeneidad en los extremos amino-terminal, consecuencia de la actuación de las aminopeptidasas (Kuda et al., 1997; Saïdo, 1998). De todas ellas, la glutamato aminopeptidasa (GluAP) parece ser la enzima candidata, observándose una actividad baja en plasma de enfermos de EA, favoreciendo la acumulación de estructuras insolubles y patogénicas (Kuda et al., 1997). Sin embargo, la acción de las aminopeptidasas no excluye la participación de otras endopeptidasas o carboxipeptidasas en el catabolismo A β . De hecho, la degradación proteolítica por la endopeptidasa neprilisina se considera la principal vía de eliminación del péptido A β . Otra vía alternativa es la mencionada anteriormente por la carboxipeptidasa ACE, del sistema RAS. También están implicadas otras proteasas como las calpains y las caspasas, activadas por la neurotoxicidad inducida por los depósitos amiloides (Higuchi et al., 2005).

Otra aminopeptidasa relacionada con la EA es la alanina aminopeptidasa citosólica, comúnmente conocida como aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA). En corteza cerebral e hipocampo de enfermos de Alzheimer, se ha visto que co-inmunoprecipita con la proteína precursora amiloide (APP), y que se localiza alrededor de las placas seniles. Sin embargo, la enzima no afecta directamente a la concentración de APP, sino que parece estar implicada en la degradación de tau. Por tanto puede jugar un papel preventivo importante en la neurodegeneración inducida por tau (Hui, 2007). Aparte también se ha relacionado con la enfermedad de Huntington por su capacidad para degradar péptidos de mayor tamaño procedentes del proteosoma, frente a otras aminopeptidasas, y por su amplia distribución en el cerebro. En un estudio realizado por Bhutani y cols. (2007), se demostró la preferencia de la PSA por las secuencias de poliglutamina (poli-Q), frente a otras aminopeptidasas citosólicas como la leucina aminopeptidasa y la endopeptidasa bleomicina hidrolasa, también llamada aminopeptidasa C por presentar actividad aminopeptidasa. Aunque existen otros mecanismos de degradación independientes al proteosoma, como las hidrolasas lisosomales ligadas a procesos de autofagia, se ha considerado a la PSA como una de las principales vías de eliminación de colas poli-Q previa a la formación de los agregados intracelulares.

Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

A pesar de no conocerse la etiología de las enfermedades neurodegenerativas, está bien establecido que la alteración de los procesos oxidativos y del metabolismo de las proteínas están íntimamente relacionados con este tipo de enfermedades. Los datos sobre los mecanismos moleculares implicados, como son la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y alteración del metabolismo proteico, son cada vez más completos. Las causas de este tipo de enfermedades, cada vez más frecuentes, se desconocen en su mayor parte, por lo que profundizar en su conocimiento permitirá avanzar en estrategias encaminadas a normalizar estos procesos e impedir, o al menos frenar, el avance de estas patologías.

En nuestro laboratorio hemos realizado estudios experimentales y clínicos en relación a un grupo de enzimas proteolíticas, las aminopeptidasas. En ambos estudios hemos encontrado cambios significativos en la actividad de las APs en plasma de animales de experimentación y pacientes con EP (Banegas et al., 2004; Banegas et al., 2006a). La amplia distribución de las aminopeptidasas en el SNC y su papel en el control de péptidos bioactivos con funciones neuromoduladoras y neuroendocrinas, hace pensar que la actividad de las APs puede alterarse en las enfermedades neurodegenerativas, como la EP, y modificarse con la progresión de la enfermedad y el tratamiento específico. Como se ha comentado en la Introducción, muchos sustratos de las aminopeptidasas (colecistokininas, angiotensinas y encefalinas) coexisten con la DA en la terminal sináptica de las neuronas dopaminérgicas. Este hecho sugiere que la alteración de las catecolaminas puede ir acompañada de cambios en la liberación de péptidos o incluso, de sus enzimas metabólicas. Si la muerte de las neuronas dopaminérgicas es la patología fundamental en la EP, la desaparición de los péptidos acompañantes puede llevar a la pérdida del equilibrio existente en condiciones normales, viéndose afectadas las APs. Es posible, por tanto, que puedan existir diferencias en la actividad de las APs a medida que progresa la enfermedad. Estas diferencias pueden ser útiles para evaluar la enfermedad y el estadio evolutivo del paciente. Además, puede ocurrir que las APs se vean afectadas por el tratamiento antiparkinsoniano que reciben los enfermos, y en ese caso, habría que analizar si las

diferencias encontradas son debidas a la progresión en sí de la enfermedad o a los fármacos administrados.

Por otra parte, una de las características de la EP y en general de las enfermedades neurodegenerativas, es una alteración del catabolismo de péptidos y proteínas que desemboca en la formación de los agregados proteicos característicos (cuerpos de Lewy, placas seniles, cuerpos de inclusión, etc.). Existe un gran número de enzimas ligadas al metabolismo proteico, siendo las APs uno de los grupos de proteasas más abundantes en el SNC, siendo responsables de muchos procesos proteolíticos. Por ejemplo, se han relacionado con la degradación del péptido A β (Kuda et al., 1997), proteína tau (Hui, 2007) y proteína htt (Bhutani et al., 2007) y es posible que también estén implicadas en la degradación de la α -sinucleína. La alteración de la actividad de las APs puede ser parte de la patología característica de la EP, con un papel importante en la formación de cuerpos de Lewy y otros aspectos fisiopatológicos.

La disfunción mitocondrial junto con otros procesos acompañantes, como la alteración en la síntesis de radicales libres y cadena respiratoria, son responsables de la que se ha dado en llamar estrés oxidativo. Estos fenómenos ocurren gradualmente y se van agravando paralelamente a la progresión de la enfermedad. La evolución del estrés oxidativo puede ayudar a conocer su implicación en los procesos neurodegenerativos. Por otro lado, existe una gran controversia con respecto al papel del tratamiento antiparkinsoniano en la progresión y agravamiento progresivo de la enfermedad, especialmente en lo referente a la levodopa. En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, demostramos el papel antioxidante y protector de la levodopa (Agil et al., 2006), datos que fueron corroborados en trabajos posteriores (Prigione et al., 2006). Sin embargo en ningún caso se analizó el estado redox de los enfermos de Parkinson antes de iniciar el tratamiento. Este análisis va a permitir por un lado, comprobar si los fenómenos de estrés oxidativo se acentúan con la evolución de la enfermedad, y por otro, si la levodopa modifica las condiciones oxidativas basales del enfermo una vez que éste inicia el tratamiento.

Por último, si comparamos la EP con otras enfermedades neurodegenerativas como la EA y la EH, se puede apreciar que las tres comparten similares mecanismos moleculares relacionados con su la patogénesis (ver apartado 1.1.2.10). Por este motivo, nos

planteamos que la actividad de las APs también puede verse alterada en la EA y EH, incluso que puede existir un patrón de comportamiento similar de estas enzimas en las enfermedades neurodegenerativas, diferente al de sujetos sanos u otras enfermedades neurológicas no degenerativas, pudiendo alcanzar un valor pronóstico o servir como futuras dianas terapéuticas.

2.2. OBJETIVOS

Como se ha planteado en la hipótesis, nuestros dos grandes objetivos son estudiar la contribución del estrés proteico y del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. Nos proponemos evaluar el papel de las APs en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson esporádico y en otras enfermedades. También nos proponemos conocer la evolución de los fenómenos de estrés oxidativo que acompañan a la progresión de este tipo de enfermedades. Estos datos pueden aportar información sobre la patología y estadio evolutivo del paciente con vista a un mejor abordaje clínico, así como conocer mejor las alteraciones moleculares que ocurren en este grupo de enfermedades.

A continuación desglosamos los objetivos concretos que nos hemos propuesto desarrollar en este trabajo:

- I. Estudiar los cambios en la actividad de las aminopeptidasas en los grupos de sujetos sanos o grupo control (C), enfermos de Parkinson (EP), enfermos de Huntington (EH), enfermos de Alzheimer (EA) y enfermos de ictus isquémico (Ic), así como sus diferencias.
- II. Estudiar si existen diferencias en la actividad de las APs entre los enfermos de Parkinson que reciben tratamiento (EPct) y los recién diagnosticados, sin tratamiento (EPst), y si esas diferencias se deben a la evolución de la enfermedad o a los fármacos administrados.
- III. Estudiar si las APs están implicadas en las alteraciones del metabolismo proteico característico de las enfermedades neurodegenerativas.

- IV. Estudiar y comparar el estrés oxidativo en los grupos de sujetos sanos (C), enfermos de Parkinson (EP), enfermos de Huntington (EH), enfermos de Alzheimer (EA) y enfermos de ictus isquémico (Ic), y sus diferencias.

- V. Estudiar si existen diferencias en el estado oxidativo entre los enfermos de Parkinson que reciben tratamiento (EPct) y los recién diagnosticados, sin tratamiento (EPst), y si estas diferencias pueden deberse a la terapia con levodopa.

- VI. Por último, estudiar si existe un patrón similar en los cambios de actividad de las APs circulantes y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas (EP, EH y EA) con respecto a sujetos sanos o sujetos con enfermedad neurológica no degenerativa, como el Ic.

Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SUJETOS

En el estudio han participado 258 sujetos, que han sido distribuidos en los siguientes grupos:

- 1) Grupo compuesto por 60 sujetos sanos, pertenecientes al área geográfica de Granada, apareados por edad y sexo con el resto de grupos, sin signos ni síntomas de enfermedad neurológica alguna y sin antecedentes familiares de enfermedad de Parkinson, Alzheimer o Huntington.
- 2) Grupo de 42 sujetos con enfermedad de Parkinson esporádica, diagnosticados como tales y que cumplían los siguientes criterios de inclusión. Los criterios seguidos fueron los del “Banco de Cerebros de la Asociación de Enfermedad de Parkinson del Reino Unido (UKPDSBB)” (Gelb et al., 1999):
 1. Evidencia de acinesia a juicio de al menos dos neurólogos.
 2. Evidencia de al menos uno o más de los tres síntomas cardinales (temblor, rigidez, alteración de reflejos posturales).
 3. Ausencia de datos y signos incompatibles con el diagnóstico de enfermedad de Parkinson (signos cerebelosos, corticoespinales, demencia grave previa al desarrollo de síndrome acinético rígido, atrofia óptica, retinitis pigmentosa, neuropatía, parkinsonismo vascular, etc).
 4. Ausencia de datos históricos sugestivos de síndrome rígido-acinético secundario (antecedentes de drogas, tóxicos, traumatismos, infecciones, etc).
 5. Normalidad de las pruebas de laboratorio que incluyen como mínimo:
 - TAC craneal.
 - Estudio del metabolismo del cobre.
 - Acantocitos basales y tras incubación.
 - Analítica de rutina.
 6. Respuesta inequívoca a la levodopa (al menos mejoría del 50% en las puntuaciones de la escala unificada durante 6 meses o mejoría tras administración subcutánea o intranasal de apomorfina).

7. Una puntuación directa al menos de 25 en la prueba de MMS (Minimal State de Folstein, para descartar demencia).
8. Ningún antecedente familiar de enfermedad de Parkinson, ni de otros trastornos susceptibles de diagnóstico diferencial con la misma.

El diagnóstico se apoyó por pruebas de neuroimagen, realizando a cada sujeto un SPECT de los ganglios basales (escáner de transporte activo de dopamina ó DAT-SCAN). Todos los sujetos estaban recibiendo tratamiento antiparkinsoniano en el momento de la extracción de sangre.

- 3) Grupo de 54 sujetos con enfermedad de parkinson esporádica, diagnosticados como tales, siguiendo los criterios de inclusión anteriores y sin recibir tratamiento antiparkinsoniano antes de la extracción de sangre.
- 4) Grupo de 28 sujetos con enfermedad de Alzheimer, diagnosticados como tales y que cumplían los siguientes criterios de inclusión. Los criterios seguidos fueron los del NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association) (McKhann et al., 1984) y los del DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition) (American Psychiatric Association, 1994):

Criterios NINCDS-ADRDA:

1. Criterios para el diagnóstico clínico de enfermedad de Alzheimer **probable:**
 - Demencia, diagnosticada mediante examen clínico y documentada con el MMS de Folstein, la escala de demencia de Blessed, u otras similares, y confirmada con tests neuropsicológicos.
 - Deficiencias en dos o más áreas cognitivas.
 - Empeoramiento progresivo de la memoria y de otras funciones cognitivas.
 - No alteración del nivel de conciencia.
 - Comienzo entre los 40 y los 90 años, con mayor frecuencia después de los 65.

- Ausencia de alteraciones sistémicas u otras enfermedades cerebrales que pudieran producir el deterioro progresivo observado de la memoria y de las otras funciones cognitivas.
2. Apoyan el diagnóstico de “enfermedad de Alzheimer probable”:
- Deterioro progresivo de alguna función cognitiva específica (afasia, apraxia, agnosia).
 - Alteraciones conductuales y en la realización de las actividades diarias habituales.
 - Antecedentes familiares de trastorno similar, especialmente si obtuvo confirmación anatomopatológica.
 - Pruebas complementarias:
 - Líquido cefalorraquídeo normal, en las determinaciones estándar.
 - Electroencefalograma (EEG) normal, o con alteraciones inespecíficas como incremento de la actividad de ondas lentas.
 - Atrofia cerebral en TAC, objetivándose progresión de la misma en observación seriada.
3. Aspectos clínicos compatibles con el diagnóstico de “enfermedad de Alzheimer probable”, tras excluir otras causas de demencia:
- Mesetas en la progresión de la enfermedad.
 - Síntomas asociados de depresión, insomnio, incontinencia, ideas delirantes, ilusiones, alucinaciones, accesos emocionales, físicos o verbales, alteraciones de la conducta sexual, pérdida de peso.
 - Otras alteraciones neurológicas en algunos pacientes, especialmente en los que se hallan en fase avanzada, como hipertonía, mioclonías o alteración de la marcha.
 - Convulsiones, en fase avanzada de la enfermedad.
 - TAC cerebral normal para la edad del paciente.
4. Aspectos que convierten el diagnóstico de “enfermedad de Alzheimer probable” en **incierto** o **improbable**:
- Instauración brusca o muy rápida.
 - Manifestaciones neurológicas focales como hemiparesia, alteración de la sensibilidad o de los campos visuales, o incoordinación en fases tempranas de la evolución.

- Convulsiones o alteraciones de la marcha al inicio o en fases muy iniciales de la enfermedad.
5. Diagnóstico clínico de enfermedad de Alzheimer **posible**:
- Demencia, con ausencia de otras alteraciones sistémicas, psiquiátricas y neurológicas que puedan causar esa demencia, pero con una instauración, manifestaciones o patrón evolutivo que difieren de lo expuesto para el diagnóstico de “enfermedad de Alzheimer probable”.
 - Presencia de una segunda alteración, cerebral o sistémica, que podría producir demencia pero que no es considerada por el clínico como la causa de esta demencia.
 - En investigación, cuando se produce deterioro gradual e intenso de una única función cognitiva, en ausencia de otra causa identificable.
6. Criterios para el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer **definitiva**:
- Criterios clínicos de “enfermedad de Alzheimer probable”.
 - Comprobación histopatológica, obtenida a través de biopsia o autopsia.

En la práctica clínica no existe un diagnóstico definitivo de enfermedad de Alzheimer. Los neurólogos se apoyan en la combinación de los criterios para un diagnóstico probable y posible, para ofrecer un diagnóstico de alta fiabilidad. Los criterios DSM-IV que a continuación se presentan, se pueden considerar un resumen de los anteriores y facilitan el diagnóstico clínico.

Criterios DSM-IV:

1. Desarrollo de deficiencia cognitiva múltiple, manifestada por:
 - Alteración de memoria (aprender nueva información y evocar la ya aprendida).
 - Una o más de las siguientes alteraciones cognitivas:
 - Afasia
 - Apraxia
 - Agnosia
 - Alteración de funciones ejecutivas

2. Las alteraciones previas representan un deterioro con respecto a las capacidades previas del paciente, y producen dificultades significativas en las funciones ocupacional y social.
3. La evolución se caracteriza por instauración gradual y deterioro cognitivo continuo.
4. Las alteraciones expresadas en el apartado “1” no se deben a lo siguiente:
 - Otros trastornos del sistema nervioso central que puedan ocasionar deterioro progresivo de la memoria y de otras funciones cognitivas (por ej. enfermedad cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, hematoma subdural, hidrocefalia de presión normal, tumor cerebral).
 - Trastornos sistémicos que pueden ocasionar demencia (por ej. hipotiroidismo, deficiencia de vitamina B12, ácido fólico, niacina, hipercalcemia, neurosífilis, SIDA).
 - Intoxicaciones.
5. Las alteraciones no ocurren únicamente durante un síndrome confusional agudo.
6. El trastorno no es atribuible a una alteración psiquiátrica que pudiera justificar las manifestaciones, como por ejemplo una depresión mayor o una esquizofrenia.

El diagnóstico se completó realizando a cada sujeto una analítica general, incluyendo vitamina B12, ácido fólico, TSH (hormona estimulante del tiroides) y LUES (serología de la sífilis), para descartar otros orígenes de la demencia, y se apoyó con las pruebas de neuroimagen TAC y RM (análisis estructural) y SPECT cerebral (análisis funcional).

- 5) Grupo de 34 sujetos con enfermedad de Huntington, diagnosticados como tales y con antecedentes familiares de EH en primer grado (madre o padre). Los criterios para el diagnóstico fueron los siguientes:
 1. Diagnóstico clínico en base a la sintomatología:
 - Movimientos coreico-distónicos
 - Alteraciones psiquiátricas
 - Demencia

2. Historia familiar.
 3. Confirmación por diagnóstico molecular (pruebas genéticas).
- 6) Grupo de 40 sujetos con infarto cerebral o ictus isquémico, diagnosticados como tales, y que cumplieran los siguientes criterios de inclusión. Los criterios para el diagnóstico se obtuvieron del Laussane Stroke Registry (Bogousslavsky, 1997) y del comité *ad hoc* del Grupo de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN (Arboix et al., 1998) (Arboix et al., 2002). Se incluyeron en este estudio únicamente los subtipos etiológicos aterotrombótico y cardioembólico:

Criterios para el infarto cerebral aterotrombótico.

1. Infarto de tamaño medio o grande, de topografía cortical o subcortical y localización carotídea o vertebrobasilar, en el que se cumplen alguno de los dos criterios siguientes:
 - Aterosclerosis con estenosis > 50% del diámetro luminal u oclusión de la arteria extracraneal correspondiente o de la arteria intracraneal de gran calibre, en ausencia de otra etiología.
 - Aterosclerosis sin estenosis con presencia de placas o con estenosis < 50% en la arteria cerebral media, cerebral posterior o basilar, en ausencia de otra etiología y en presencia de más de dos de los siguientes factores de riesgo vascular cerebral:
 - Edad > 50 años.
 - Hipertensión arterial.
 - Diabetes mellitus.
 - Tabaquismo.
 - Hipercolesterolemia.

Criterios para el infarto cerebral cardioembólico:

1. Infarto de tamaño medio o grande, de topografía cortical, en el que se evidencia, en ausencia de otra etiología, alguna de las siguientes cardiopatías emboligénicas:
 - Trombo o tumor intracardiaco.
 - Estenosis mitral reumática.
 - Prótesis aórtica o mitral.
 - Endocarditis.

- Fibrilación auricular.
- Enfermedad del nodo sinusal.
- Aneurisma ventricular izquierdo o acinesia después de un infarto agudo de miocardio.
- Infarto agudo de miocardio (menos de tres meses) o hipocinesia cardiaca global o discinesia.

El diagnóstico se confirmó en todos los casos realizando las pruebas de neuroimagen TAC craneal, RM, Eco-doppler y ecocardiografía.

Todos los participantes fueron informados del estudio y aceptaron ser incluidos en él, obteniendo su consentimiento informado, según el modelo de formulario que a continuación se presenta. El estudio fue aprobado por el comité ético para investigación humana del hospital universitario de Granada.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ha invitado a participar en un estudio sobre las modificaciones de algunas sustancias que hay en sangre en la enfermedad de Parkinson. Antes de que acepte participar en este estudio, es importante que comprenda por qué se va a realizar esta investigación y en qué consistirá. Por favor, lea esta información con detenimiento y coméntela con sus amigos, sus familiares y su médico si así lo desea. Puede preguntar todo lo que no entienda y solicitar más información. Tómese su tiempo para decidir si desea o no participar. Su decisión no afectará a la atención médica que reciba ni al tratamiento que pueda necesitar. Si desea participar, su médico le pedirá que confirme por escrito que ha leído y comprendido la información contenida en este documento, que todas sus dudas han quedado resueltas y que acepta que sus datos sean recogidos. Se le entregará una copia de este documento por si desea volver a consultarlo.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

El principal objetivo de este estudio es describir en pacientes con enfermedad de Parkinson o que puedan tenerla, los posibles cambios de unas sustancias que hay en la

sangre, llamadas aminopeptidasas. Queremos saber si los cambios de estas sustancias pueden ayudar a conocer si los pacientes tienen o no enfermedad de Parkinson. Se trata de un estudio muy amplio en que participarán pacientes de diferentes centros asistenciales de Granada.

¿Estoy obligado a participar?

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Puede negarse a participar en el mismo, sin tener que dar explicaciones y sin que ello tenga consecuencias sobre su tratamiento ni la calidad de la asistencia que seguirá recibiendo de su médico. Si accede a tomar parte en el estudio, se le entregará este documento informativo para que lo guarde y se le pedirá que firme un formulario de consentimiento. Esta decisión no afectará a los cuidados que reciba ni a su tratamiento.

¿Qué sucederá si participo?

En el estudio se recogerán algunos datos de su historia clínica, a la vez que se le entregarán unos cuestionarios muy sencillos para rellenar los datos del estudio que se recogerán durante una única visita.

¿Qué tengo que hacer?

Se trata sólo de un estudio, por lo que no deberá hacer nada que no forme parte del tratamiento normal que recibiría si no participara. No obstante, quizá se le soliciten algunos datos adicionales.

¿Cuáles son los inconvenientes y los riesgos de participar?

Su médico no cambiará la atención ni el tratamiento que recibe; no corre ningún riesgo al participar en este estudio.

¿Cuáles son las ventajas de participar?

No existe ninguna ventaja inmediata, pero esperamos que la información obtenida ayude a mejorar los conocimientos científicos sobre la enfermedad de Parkinson y permita mejorar la atención y el tratamiento de pacientes como usted en el futuro. Por participar en este estudio no recibirá usted ningún tipo de compensación económica.

¿Será confidencial mi participación en este estudio?

Si acepta formar parte del estudio, se mantendrá su anonimato. Sólo conocerán su nombre el médico y el personal que depende de él. Los técnicos estadísticos implicados en el estudio tendrán acceso a sus datos, pero no relacionados con su nombre. Si es necesario referirse a usted, se utilizarán códigos numéricos que no permitan su identificación. En caso necesario, las empresas auditoras externas, los comités de ética independientes o los inspectores de los organismos públicos de control tendrán acceso directo a sus registros médicos únicamente para comprobar la veracidad de la información del estudio. Se seguirá asimismo lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de "Protección de Datos de Carácter Personal".

¿Quién organiza la investigación?

El estudio lo realizará un grupo de médicos del Hospital Clínico San Cecilio y profesores de la Facultad de Medicina de Granada.

Si en algún momento desea comentar con detalle este estudio, puede dirigirse a su médico Dr./Draen el teléfono.....

Gracias por su atención. Si accede a participar en este estudio, su médico le entregará una copia de esta hoja de información para el paciente y una copia firmada del formulario de consentimiento.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estudio clínico:

Yo,..... (Nombre completo del paciente)

1. Confirmando que he leído y comprendido la hoja informativa del estudio con fecha/...../.....
2. Se me ha entregado una copia de este formulario de consentimiento y la hoja de información para el paciente. Se me ha concedido tiempo y la oportunidad de formular preguntas sobre el estudio y todas ellas han quedado contestadas.

3. Comprendo que mi participación es voluntaria y que soy libre de retirar el consentimiento en cualquier momento, sin necesidad de ofrecer ninguna razón y sin que ello afecte a mis derechos legales ni a mi tratamiento médico en el futuro.
4. Soy consciente de que, al participar en el estudio, se recogerán y procesarán datos personales confidenciales. Se me ha informado con detalle de los motivos por los que se recogen y procesan estos datos y de quién tendrá acceso a estos datos y se me ha explicado que tengo derecho a acceder a esta información y a rectificarla.
5. Comprendo que mis ficheros médicos podrán ser revisados por el personal médico/investigador si ello es importante para la investigación. Concedo permiso a estas personas para acceder a estos ficheros, en los que siempre se respetará la confidencialidad.
6. Accedo a participar en el estudio mencionado y autorizo la recogida, procesamiento y transferencia de mis datos personales.

Fecha ____/____/____
 día mes año

Fecha ____/____/____
 día mes año

Firma del participante/Familiar responsable

Firma del investigador

3.2. MATERIAL

3.2.1. Equipo de análisis

- Agitador de balanceo (Swing; OVAN)
- Agitador magnético (Raypa AG-2)
- Balanza (Sauter)
- Balanza de precisión (Boeco, BBI-32)

- Baño seco (D1200; Labnet international)
- Centrifugadora (Hettich, Universal 32R)
- Espectrofluorímetro (Tecan, Genios Plus)
- Espectrofotómetro (Boeco, S-22 UV/VIS)
- Estufa (P-Selecta, 207A)
- pHmetro (CyberScan pH/ION 510)
- Sistema de electroforesis vertical (Mini-Protean® 3 Cell; Bio-Rad)
- Sistema de revelado (CURIX 60; AGFA)
- Sistema de transferencia semiseca (Bio-Rad)
- Ultracentrifugadora (Beckman Coulter, Optima Max-E)

3.2.2. Productos químicos

- Acetato sódico (Merck)
- Ácido acético (Panreac)
- Ácido clorhídrico (Panreac)
- Ácido ortofosfórico (Panreac)
- Ácido perclórico (Panreac)
- L-Alanil- β -naftilamida (Sigma)
- Alanina aminopeptidasa de membrana (CD13) (Sigma)
- Albúmina bovina (Sigma)
- Anticuerpo frente a glutamato aminopeptidasa (anti-APA) (Santa Cruz)
- Anticuerpo frente a alanina aminopeptidasa de membrana (anti-CD13) (Santa Cruz)
- Anticuerpo frente a IgG de cabra marcado con peroxidasa (Santa Cruz)
- Anticuerpo frente a IgG de conejo marcado con peroxidasa (Amersham)
- L-Aspartil- β -naftilamida (Sigma)
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Cloruro de calcio anhídrido (Sigma)
- Cloruro de magnesio tetrahidratado (Sigma)
- Coomassie azul brillante G (Sigma)
- L-Cistinil-di- β -naftilamida (Fluka)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (Panreac)
- D-L-Ditiotreitol (DTT) (Sigma)

- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma)
- Etanol absoluto (Panreac)
- Fosfato sódico dibásico (Fluka)
- Fosfato sódico monobásico (Merck)
- Glicerol (Panreac)
- Glicina (Sigma)
- Glutamato aminopeptidasa (aminopeptidasa A/APA) (R&D System)
- L-Glutamil- β -naftilamida (Bachem)
- Hidróxido de sodio (Sigma)
- Kit de depleción de albúmina e inmunoglobulina G (IgG) (Sigma)
- Kit de determinación de ácido láctico (Roche)
- Kit de determinación de peróxidos lipídicos (Sigma)
- Kit de determinación de α -sinucleína (Biosource, Invitrogen corporation)
- Leche desnatada en polvo (Nestle)
- L-Leucinil- β -naftilamida (Sigma)
- Marcador de peso molecular para SDS-PAGE (Bio-Rad)
- Membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) para inmuno-blot (Bio-Rad)
- 2-Mercaptoetanol (Sigma)
- Metanol (Panreac)
- Metionina (Merck)
- 2-Naftilamina (Sigma)
- Naranja de metilo (Sigma)
- Papel para inmuno-blot (Bio-Rad)
- Película de revelado (Medical X-ray film) (AGFA)
- PBS en pastillas (Phosphate buffer solution) (Gibco, invitrogen corporation)
- Persulfato amónico (Sigma)
- Sal Fast Black K (FBK) (Sigma)
- Solución de Bis-acrilamida (30% Acrylamide/Bis; 29:1) (Bio-Rad)
- Solución de revelado por quimioluminiscencia ECL-plus (Amersham)
- Temed (Merck)
- Trizma base (Sigma)
- Tween 20 (Sigma)

3.2.3. Disoluciones

- Tampones:

a) Tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4

Para su preparación se pesan 24,22 g de trizma base, se disuelven en agua destilada y se lleva hasta un volumen de 1.000 ml. Con este se consigue una concentración de 0,2 M. De esta disolución se toman 250 ml, se ajusta a pH 7.4 con HCl y se completa con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1.000 ml para obtener una concentración 50 mM.

b) Tampón Tris-HCl 50 mM pH 6.0

Se toman 24,22 g de trizma base, se disuelven en agua destilada y se lleva a un volumen de 1.000 ml. Con esto se consigue una concentración de 0,2 M. De esta disolución se toman 250 ml, se ajusta a pH 6.0 con HCl y se completa con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1.000 ml para obtener una concentración 50 mM.

c) Tampón fosfato 0,1 M pH 6.1 y 50 mM pH 7.4

Solución A: Fosfato sódico monobásico 0,2 M. Se toman 27,6 g de fosfato monobásico monohidratado y se disuelven en 1.000 ml de agua destilada.

Solución B: Fosfato sódico dibásico 0,2 M. Se toman 35,6 g de fosfato dibásico dihidratado y se disuelven en 1.000 ml de agua destilada.

Para obtener la solución de trabajo se mezclan 425 ml de la solución A con 75 ml de la solución B, se añade agua destilada, se ajusta el pH a 6.1 con HCl y se completa con agua destilada hasta un volumen de 1.000 ml. Con esto se consigue una concentración de 0,1 M.

Para la concentración de 50 mM y pH 7.4, se mezclan 95 ml de la solución A con 405 ml de la solución B y se completa con agua destilada hasta 1.000 ml. De esta solución se toman 500 ml, se añade agua destilada, se ajusta el pH a 7.4 con HCl y se completa con agua destilada hasta un volumen de 1.000 ml.

d) Tampón acetato 0,1 M pH 4.2

Solución A: Ácido acético 0,2 M. Se toman 11,55 ml de ácido acético glacial y se disuelven en 1.000 ml de agua destilada.

Solución B: Acetato sódico 0,2 M. Se toman 16,4 g de acetato sódico y se disuelven en 1.000 ml de agua destilada.

Para la preparación de la solución de trabajo se mezclan 368 ml de solución A con 132 ml de solución B, se añade agua, se ajusta el pH 4.2 con HCL y se afora hasta 1.000 ml.

- Solución patrón de albúmina sérica bovina (1mg/ml)
Se pesan 100 mg de albúmina sérica bovina y se disuelven en 100 ml de agua destilada.

- Solución de Bradford
Se prepara una solución concentrada:
 - Coomassie azul brillante G 100 mg
 - Etanol absoluto 50 ml
 - Ácido ortofosfórico 100 ml
 - Agua destilada 50 mlFiltramos la solución concentrada y posteriormente se diluye cinco veces para obtener la solución de trabajo.

- Solución de naranja de metilo 0,05% (w/v)
Se pesan 0,05 g de naranja de metilo y se disuelven en 100 ml agua destilada.

- Ácido perclórico 0,6 M
Se toman 65,66 ml de ácido perclórico (riqueza 60%) y se llevan a 1.000 ml de agua destilada.

- Hidróxido potásico 3 M
Se pesan 168,33 g de hidróxido potásico y se disuelven en 1.000 ml de agua destilada.

- SDS 20%
Se pesan 20 g de SDS y se disuelven en 100 ml de agua destilada.

- Buffer Tris-HCl 1,5 M pH 8.8 para gel de electroforesis (Lower 4x)
Se toman 18,17 g de trizma base y se disuelven en agua destilada. Se añade 2ml de SDS 20%, se ajusta el pH a 8.8 con HCl y se completa con agua destilada hasta 100 ml.

- Buffer Tris-HCl 0,5 M pH 6.8 para gel de electroforesis (Upper 4x)
Se toman 6,06 g de trizma base y se disuelven en agua destilada. Se añade 2ml de SDS 20%, se ajusta el pH a 6.8 con HCl y se completa con agua destilada hasta 100 ml.

- Tampón de carga para SDS-PAGE (6x)
Para un volumen final de 10 ml:
 - 1,15 ml de agua
 - 3,75 ml de Tris-HCl 1 M pH 6.8
 - 1,2 g de SDS
 - 3 ml de 2-mercaptoetanol
 - 2 ml de glicerol

- Tampón de migración SDS-PAGE (5x)
Se pesan 9 g de trizma base, 43,2 g de glicina y 3 g de SDS, y se disuelven en 600 ml de agua destilada. Posteriormente se diluye cinco veces para obtener la solución de trabajo.

- Tampón de transferencia semiseca
Se pesan 5,8 g de trizma base y 2,9 g de glicina, y se disuelven en agua destilada. Se añade 200 ml de metanol y 1,75 ml de SDS 20%. Se completa hasta 1.000 ml con agua destilada.

- Tampón de carga para PAGE nativa (2x)
Para un volumen final de 100 ml:
 - 25 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6.8
 - 20 ml de glicerol
 - 1 mg de azul de bromofenol

- 55 ml de agua destilada

- Buffer fosfato 0,4 M pH 7.4 para gel de electroforesis nativa (4x)
Se pesan 55,2 g de fosfato monobásico monohidratado y se disuelven en agua destilada. Se ajusta el pH a 7.4 con NaOH y se afora con agua destilada a un volumen final de 1.000 ml.

- Tampón de migración PAGE nativa
Se pesan 3,02 g de trizma base y 14,4 g de glicina, se disuelven en agua destilada y se afora a un volumen final de 1.000 ml.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Obtención de muestras de plasma sanguíneo

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción en la vena cubital, realizada por un facultativo especialista, en el hospital de día del servicio de Neurología y en el servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico “San Cecilio” de Granada. Fueron recolectadas en tubos con EDTA donde, tras 20 minutos de reposo en posición vertical y a temperatura ambiente, se centrifugaron a 3000 r.p.m. y 4 °C durante 15 minutos para la obtención del plasma. Las muestras de plasma se conservaron en un ultracongelador a – 80 °C hasta su análisis.

3.3.2. Método de determinación enzimática de las aminopeptidasas

El método se basa en la capacidad hidrolítica de las aminopeptidasas (APs) sobre los sustratos L-aminoacil- β -naftilamidas (arilamidas). De esta manera, la enzima reconoce el terminal amino libre de la arilamida y separa, mediante hidrólisis, la β -naftilamina adyacente (ver figura 7).

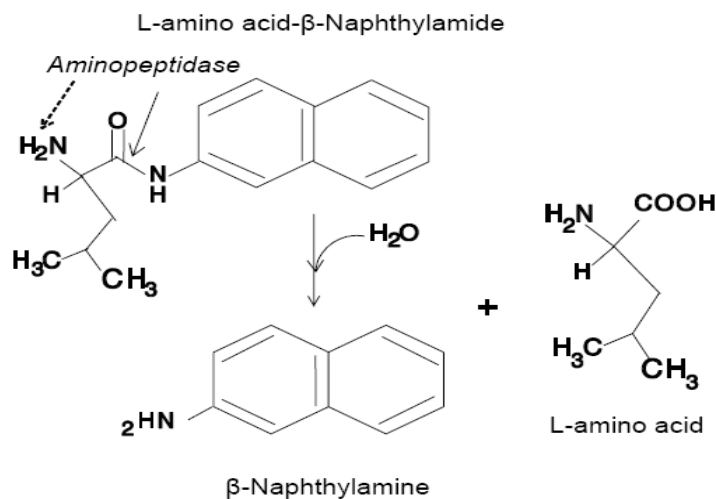


Figura. 7. Reacción entre la AP y el sustrato artificial utilizado. La enzima reconoce el terminal amino libre de la aminoacil- β -naftilamida y separa, mediante hidrólisis, el aminoácido de la β -naftilamina que se puede medir fluorimétricamente a una determinada longitud de onda.

Las actividades enzimáticas AlaAP, CysAP, AspAP, GluAP y LeuAP del plasma, se midieron fluorimétricamente utilizando como sustratos L-Ala- β -naftilamida (L-Ala- β -Na), L-Cys-di- β -naftilamida (L-Cys-di- β -Na), L-Asp- β -naftilamida (L-Asp- β -Na), L-Glu- β -naftilamida (L-Glu- β -Na) y L-Leu- β -naftilamida (L-Leu- β -Na), de acuerdo con el método de Greenberg (1962), modificado por Ramírez y cols. (1997) para la AlaAP y la CysAP y los métodos modificados por Tobe y cols (1980) para la GluAP y de Cheung y Cushman (1971) para la AspAP. La sensibilidad del método permite determinaciones de actividad aminopeptidasa en el orden picomolar.

Se utilizaron placas negras de 96 pocillos y en cada pocillo se pipeteó 50 μ l de plasma. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C en 100 μ l de solución sustrato (ver tabla 3). A los 30 min. de incubación, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 100 μ l de tampón acetato 0,1 M, pH 4.2. La β -naftilamina liberada como resultado de la actividad enzimática se cuantificó fluorimétricamente a 412 nm de emisión, con una excitación de 345 nm.

Los valores de fluorescencia obtenidos fueron transformados en pmoles de β -naftilamina liberada, mediante la extrapolación a una recta patrón previamente obtenida

tras la determinación de concentraciones decrecientes de β -naftilamina en un medio de solución igual al de la solución sustrato más 100 μ l de tampón acetato 0,1 M pH 4.2.

	COMPONENTES	TAMPÓN
AlaAP	Ala- β -Na 2,14 mg/100 ml Albúmina bovina 10 mg/100 ml DTT 10 mg/100 ml	Fosfato 50 mM pH 7.4
CysAP	Cys- β -Na 5,63 mg/100 ml Albúmina bovina 10 mg/100 ml DTT 10 mg/100 ml	Tris-Cl 50 mM pH 6.0
AspAP	Asp- β -Na 2,58 mg/100 ml Albúmina bovina 10 mg/100 ml MnCl ₂ 39,4 mg/100 ml	Tris-Cl 50 mM pH 7.4
GluAP	Glu- β -Na 2,72 mg/100 ml Albúmina bovina 10 mg/100 ml DTT 10 mg/100 ml CaCl ₂ 55,5 mg/100 ml	Tris-Cl 50 mM pH 7.4
LeuAP	Leu- β -Na 2,92 mg/100 ml Albúmina bovina 10 mg/100 ml DTT 10 mg/100 ml Metionina 298 mg/100 ml	Fosfato 50 mM pH 7.4

Tabla 3. Composición de las soluciones sustrato utilizadas para las determinaciones enzimáticas.

3.3.3. Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas se siguió el método de Bradford (Bradford, 1976), basado en la afinidad de un colorante, Coomassie azul brillante G, por las proteínas. La unión del colorante a las proteínas produce un cambio en la longitud de onda de absorción de éste, que se puede medir espectrofotométricamente a 595 nm. De esta manera, a cada tubo que contenía 2 ml de colorante, se añadió 10 μ l de la muestra de plasma y se midió en el espectrofotómetro.

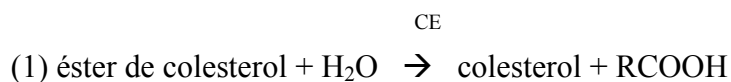
Los valores de absorbancia obtenidos fueron transformados en mg de proteína, mediante la extrapolación a una curva patrón de albúmina sérica bovina.

Las actividades se expresaron como pmoles de L-aa-β-Na hidrolizados por min. de incubación y por mg de proteína contenida en la muestra.

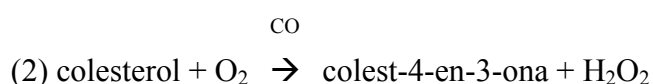
3.3.4. Determinación de la concentración de lípidos en plasma

Las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos, colesterol-HDL y colesterol-LDL, se determinaron en el servicio de Análisis Clínicos del hospital clínico “San Cecilio” de Granada, por un facultativo especialista. Para cada determinación se utilizó un kit de Roche, excepto para el colesterol-LDL, que se calculó aplicando la fórmula de Friedewald. A continuación se detalla la metodología seguida en cada test.

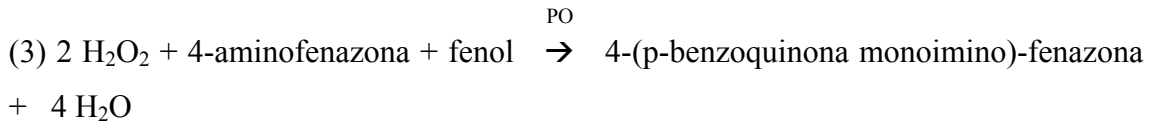
La concentración de colesterol total se calculó utilizando el kit de Roche “Colesterol CHOD-PAP” (ref. 1489232) adecuado para el analizador automático de química clínica Roche/Hitachi. El método se basa en un test colorimétrico, donde el colesterol de la muestra se determina enzimáticamente por las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa presentes en el reactivo R1 (composición del reactivo: tampón PIPES 75 mM pH 6.8; Mg^{2+} 10 mM; colato sódico 0,2 mM; 4-aminofenazona \geq 0,15 mM; fenol \geq 4,2 mM; éter poliglicólico de alcohol graso 1%; colesterol esterasa \geq 0,5 U/ml; colesterol oxidasa \geq 0,15 U/ml; peroxidasa \geq 0,25 U/ml; estabilizadores, conservante). Se mezcla un volumen de plasma con un volumen de reactivo R1, comenzando la reacción:



Los ésteres de colesterol se desdoblan, por acción de la colesterol esterasa (CE), a colesterol libre y ácidos grasos.

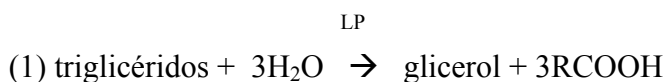


La colesterol oxidasa (CO) cataliza luego la oxidación del colesterol a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno.

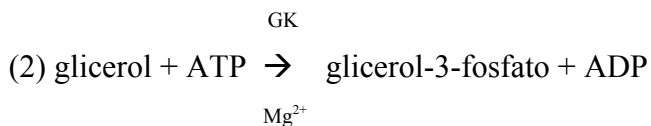


Bajo la acción catalítica de la peroxidasa (PO), el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-aminofenazona y el fenol para formar un colorante rojo cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de colesterol, que se puede medir fotométricamente. El analizador calcula automáticamente la concentración del analito en cada muestra (mg/dl).

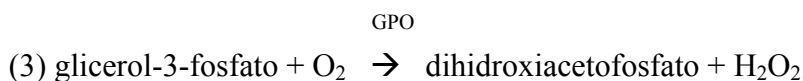
La concentración de triglicéridos se calculó utilizando el kit de Roche “Triglicéridos GPO-PAP” (ref. 1488872) adecuado para el analizador automático de química clínica Roche/Hitachi. El método se basa en un test colorimétrico, donde los triglicéridos de la muestra se determinan enzimáticamente por las enzimas lipasa lipoproteica, glicerol kinasa y glicerol fosfato oxidasa, presentes en el reactivo R1 (composición del reactivo: tampón PIPES 50 mM pH 6.8; Mg^{2+} 40 mM; colato sódico 0,20 mM; $\text{ATP} \geq 1,4$ mM; 4-aminofenazona $\geq 0,13$ mM; 4-clorofenol 4,7 mM; hexacianoferrato de potasio II 1 μM ; éter poliglicólico de alcohol graso 0,65 %; lipasa lipoproteica $\geq 5,0$ U/ml; glicerol kinasa $\geq 0,19$ U/ml; glicerol fosfato oxidasa $\geq 2,5$ U/ml; peroxidasa $\geq 0,10$ U/ml; conservante). Se mezcla un volumen de plasma con un volumen de reactivo R1, comenzando la reacción:



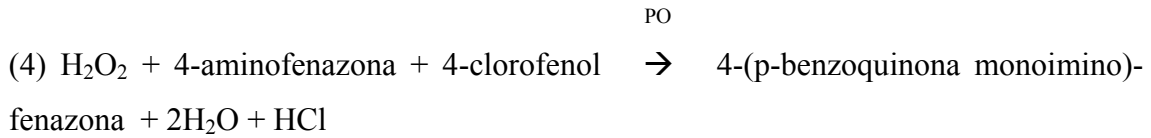
Los triglicéridos se desdoblan, por la acción de la lipasa (LP), a glicerol y ácidos grasos.



En presencia de magnesio, el glicerol libre se fosforila por la glicerol kinasa (GK) a glicerol-3-fosfato, originando el sustrato de la siguiente reacción.

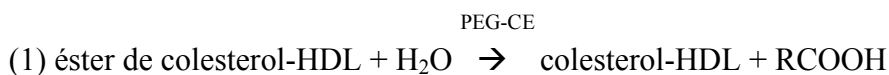


En presencia de oxígeno, el glicerol-3-fosfato se oxida por la glicerol fosfato oxidasa (GPO) a dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno.



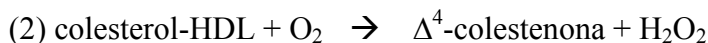
Bajo la acción catalítica de la peroxidasa (PO), el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-aminofenazona y el 4-clorofenol para formar un colorante rojo cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos, que se puede medir fotométricamente. El analizador calcula automáticamente la concentración del analito en cada muestra (mg/dl).

La concentración de colesterol-HDL se calculó utilizando el kit de Roche “HDL-C plus 2nd generation” (ref. 03030024) adecuado para el analizador automático de química clínica Roche/Hitachi. El método se basa en un test colorimétrico, donde el colesterol-HDL de la muestra se determina enzimáticamente por las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa acopladas con polietilenglicol (PEG) a los grupos amínicos. En un primer paso se mezcla un volumen de plasma con un volumen de reactivo R1 (composición del reactivo: tampón MOPS 19,1 mM pH 7.0; sulfato de dextrano 0,5 g/l; sulfato heptahidratado de magnesio \geq 8,11 mM; HSDA 0,96 mM; ascorbato oxidasa \geq 50 μ kat/l; peroxidasa \geq 167 μ kat/l; conservante). En presencia del sulfato de magnesio, el sulfato de dextrano forma complejos solubles en agua con las partículas HDL, VLDL y quilomicrones (selectivamente en ese orden) otorgándoles una mayor reactividad frente a las enzimas modificadas por PEG. En un segundo paso se añade el reactivo R2 (composición del reactivo: tampón PIPES 9,9 mM pH 7.0; PEG-colesterol esterasa \geq 3,33 μ kat/l; PEG-colesterol oxidasa \geq 127 μ kat/l; peroxidasa \geq 333 μ kat/l; 4-aminoantipirina 2,46 mM; conservante), comenzando la reacción:



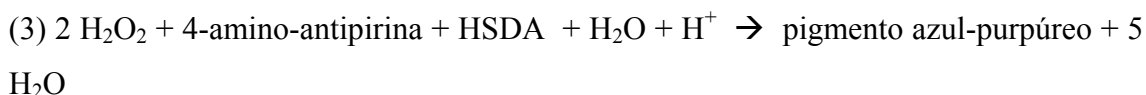
La PEG-colesterol esterasa (PEG-CE) provoca el desdoblamiento de los ésteres de colesterol-HDL a colesterol-HDL libre y ácidos grasos.

PEG-CO



En presencia de oxígeno, el colesterol-HDL se oxida por la PEG-colesterol oxidasa (PEG-CO) a Δ^4 -colesteno y peróxido de hidrógeno.

PO



Bajo la acción catalítica de la peroxidasa (PO), el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-amino-antipirina y el HSDA para formar un colorante azul-purpúreo. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de colesterol-HDL, que se puede medir fotométricamente. El analizador calcula automáticamente la concentración del analito en cada muestra (mg/dl).

Por último, la concentración de colesterol-LDL se calculó aplicando la fórmula de Friedewald:

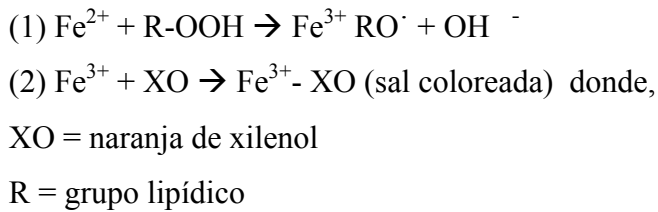
$$LDL = \text{Colesterol total} - HDL - \frac{\text{Triglicéridos}}{5}$$

Esta fórmula es válida siempre que los valores de triglicéridos no superen los 400 mg/dl. En este estudio ninguna muestra de plasma alcanzó el valor máximo.

3.3.5. Determinación de la concentración de lípidos peroxidados en plasma

Para la determinación de lípidos peroxidados (LPO) se utilizó el kit “PeroxiDetect” de Sigma (ref. PD1). El método se basa en la oxidación, por parte de compuestos peroxidados presentes en el plasma, del ión ferroso (Fe^{2+}) a ión férrico (Fe^{3+}), en condiciones ácidas, utilizando una solución de trabajo proporcionada por el kit que contiene naranja de xilenol (125 μM), hidroxitolueno butilado (BHT) (4 mM) y sulfato amónico ferroso (25 mM). El BHT es un antioxidante que se utiliza para prevenir el exceso de peroxidación en la muestra de estudio. El ión férrico forma una sal coloreada con el naranja de xilenol (XO), que se puede leer a 560 nm. El producto resultante es

estable durante varias horas desde la aparición del color, tras 30 minutos de incubación. Se puede resumir en las siguientes reacciones:

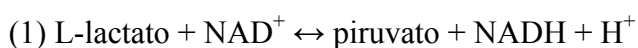


100 μl de plasma (dilución 1:30) fueron incubados con 1 ml de la solución de trabajo durante 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, el compuesto resultante se cuantificó espectrofotométricamente a 560 nm. La concentración de este producto final es proporcional a la concentración de lípidos peroxidados presentes en el plasma. Los valores de absorbancia fueron transformados en nmoles/ml de LPO mediante la extrapolación a una recta obtenida tras la determinación de concentraciones decrecientes conocidas de tert-butil-hidroperóxido (t-BuOOH), también proporcionado por el kit, en un medio similar.

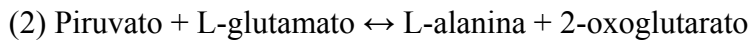
3.3.6. Determinación de la concentración de lactato en plasma

Para la determinación de lactato se utilizó el kit de Roche “L-Lactic acid Enzymatic BioAnalysis” (ref. 10139084035). Previo al ensayo enzimático, se procedió a la desproteinización de la muestra de plasma, según indicaciones del kit. Para ello se mezclaron volúmenes iguales (300 μl) de plasma sanguíneo y ácido perclórico 0,6 M, dejándolo enfriar en un baño con hielo durante 10 min. Después se centrifugó a 8000xg durante 5 min, separando 400 μl del sobrenadante. A éste se le añadió 10 μl del colorante naranja de metilo 0,05% y se neutralizó el pH ácido con 17 μl de hidróxido potásico 3M. La mezcla se dejó enfriar durante 15 min para luego filtrarla, quedando lista para la cuantificación de lactato.

El método de cuantificación de lactato se basa en la oxidación del ácido L-láctico (L-lactato) a piruvato en presencia del cofactor nicotinamida adenina dinucleótico (NAD) y la enzima L-lactato deshidrogenasa (L-LDH), como indica la siguiente reacción:



El equilibrio de esta reacción está desplazado hacia la formación de lactato. Sin embargo, mediante el secuestro de piruvato, en una reacción posterior catalizada por la enzima glutamato-piruvato transaminasa (GPT) y en presencia de L-glutamato, el equilibrio se puede desplazar a favor de la formación de piruvato y NADH:



La cantidad de NADH formada en la primera reacción es estequiométricamente igual a la cantidad de L-lactato presente en la muestra. Este incremento se puede cuantificar espectrofotométricamente a 340 nm.

Para este ensayo, se pipeteó dentro de cada cubeta, 500 μl de buffer glicilglicina (conteniendo L-glutamato 14,6 mg/ml), 100 μl de NAD^+ (35 mg/ml), 10 μl de GPT (1,5 mU/ml), 50 μl de plasma desproteínizado y 450 μl de agua bidestilada. Tras 5 min. de incubación, se leyó la absorbancia A_1 a 340 nm. Después, se añadió 10 μl de L-LDH (5,4 mU/ml), se dejó incubar 30 min. a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia A_2 . El mismo protocolo se llevó a cabo para el blanco, sustituyendo el volumen de plasma por agua bidestilada. A continuación, se determinó la diferencia de absorbancia ($A_1 - A_2$) para ambas muestras, y se sustrajo la diferencia de absorbancia del blanco de la diferencia de absorbancia del plasma:

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{plasma}} - (A_1 - A_2)_{\text{blanco}}$$

La concentración de lactato se calculó de acuerdo con la ecuación:

$$C = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \quad [\text{g/l}] \quad \text{donde,}$$

V = volumen final

v = volumen de muestra (ml)

MW = peso molecular L-lactato

d = trayectoria de luz (cm)

ε = coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm

3.3.7. Determinación de la concentración de α -sinucleína en plasma

Para la determinación de α -sinucleína se utilizó el kit de Invitrogen “Human α -Synuclein Immunoassay kit” (ref. #KHB0061). El método se basa en un ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay), donde el anticuerpo monoclonal frente a la proteína α -sinucleína está adherido a los pocillos de la placa proporcionada por el kit. Dentro de cada pocillo, se pipeteó 100 μ l de plasma, se tapó la placa, se agitó y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Durante esta primera incubación, los antígenos α -sinucleína de la muestra, se unen al anticuerpo de captura inmovilizado. A continuación se aspiró la solución de los pocillos y se añadió 400 μ l de buffer de lavado (1x), se dejó empapar 15-30 segundos y se decantó. Para asegurar un correcto lavado, este proceso se repitió 4 veces. Después del lavado, se añadió 100 μ l de anticuerpo de detección (anti-synuclein antibody), se tapó la placa, se agitó y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. En la segunda incubación, el anticuerpo se une a la α -sinucleína atrapada por el anticuerpo de captura. Después de aspirar la solución de anticuerpo, se añadió 400 μ l de buffer de lavado (1x), siguiendo el protocolo de lavado anterior. Posteriormente, se añadió 100 μ l de solución de trabajo, conteniendo anticuerpo anti-IgG unido a peroxidasa (anti-rabbit IgG-HRP), se tapó la placa, se agitó y se incubó 30 min. a temperatura ambiente. En la tercera incubación el anticuerpo anti-IgG reconoce y se une al anticuerpo de detección. Después de aspirar la solución de anticuerpo, se añadió 400 μ l de buffer de lavado (1x), siguiendo el protocolo de lavado anterior. Tras el lavado, se añadió 100 μ l de solución cromógena (tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno), se tapó la placa, se agitó y se incubó en oscuridad 30 min. a temperatura ambiente. Durante esta incubación, la enzima peroxidasa unida al anticuerpo degrada el peróxido de hidrógeno provocando un cambio de color en la solución que vira a azul. Por último, se añadió 100 μ l de solución stop, se tapó la placa y se agitó, virando la solución de azul a amarillo. La intensidad de color resultante es directamente proporcional a la concentración de α -sinucleína presente en la muestra. Se leyó la absorbancia de cada pocillo a 450 nm, frente a la de un blanco cromógeno compuesto de 100 μ l de solución cromógena y 100 μ l solución stop. Los valores de absorbancia de las muestras de plasma, fueron transformados en ng/ml de α -sinucleína mediante la extrapolación a una recta obtenida tras la determinación de concentraciones decrecientes conocidas de α -sinucleína, también proporcionada por el kit, siguiendo un protocolo similar. El ensayo se resume en el siguiente esquema (ver figura 8):

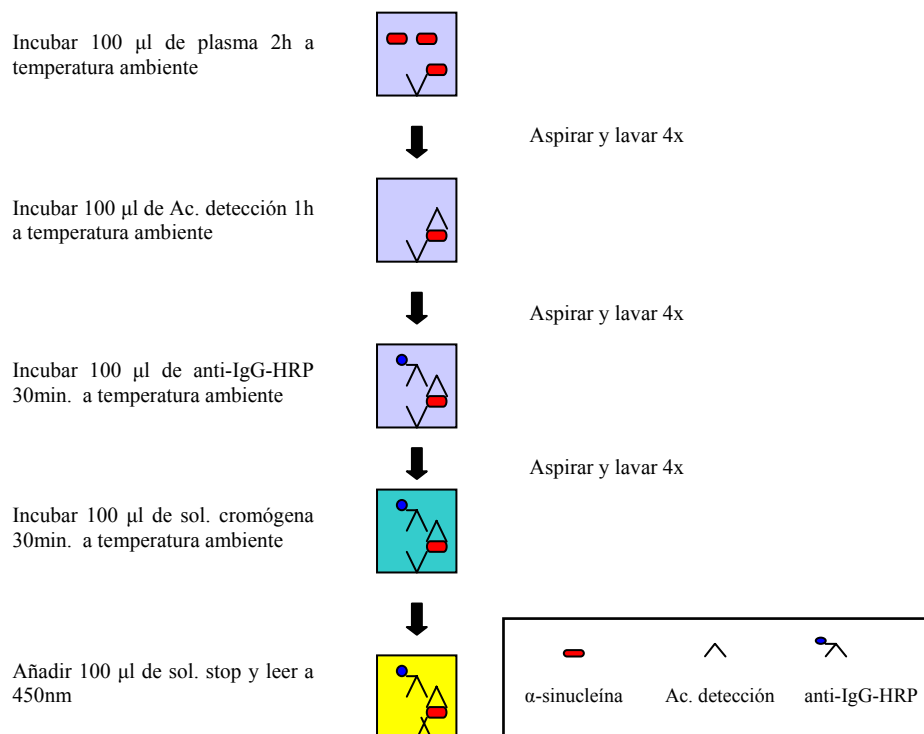


Figura. 8. Resumen del protocolo de detección de α -sinucleína por ELISA

3.3.8. Depleción de albúmina e IgG de plasma sanguíneo

Las APs se encuentran en sangre a concentraciones muy bajas, por lo que al analizarlas se producen fuertes interferencias con las proteínas mayoritarias en sangre, la albúmina y la inmunoglobulina G. Para purificar el plasma y eliminar posibles reacciones cruzadas con los anticuerpos empleados en western-blot, el primer paso fue eliminar la albúmina y la IgG, utilizando el kit “ProteoPrep® “Immunoaffinity albumin and IgG depletion” de Sigma (ref. PROTIA-1KT). Las columnas de afinidad empleadas se equilibraron con un tampón proporcionado por el kit, para después, por medio de una centrifugación a 5000xg durante 5-10 segundos, eliminar la solución de almacenamiento. Este proceso se repitió dos veces. A continuación se añadió a la columna 150 µl de plasma diluido 1:2 y se incubó durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 8000xg durante 60 segundos y se recogió el plasma en un tubo colector. Este proceso se repitió dos veces para asegurar una correcta purificación, entre el 95 y 98% de proteínas mayoritarias eliminadas. Finalmente se le

añadió la solución de la última etapa de lavado de la columna. Se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización.

3.3.9. SDS-PAGE e Inmunoblot de la alanina y la glutamato aminopeptidasas

4 μl de marcador de peso molecular y 24 μl de muestra en tampón de carga 1x, conteniendo 90 y 75 μg de proteína total, según el método de Bradford, se sometieron a separación electroforética en un gel de poliacrilamida al 12%, con 1mm de grosor. La preparación del gel se detalla en la tabla 4 (ver tabla 4). Las condiciones eléctricas fueron un voltaje constante de 110 v y un amperaje de 100 mA, durante 90 min. Se utilizó tampón de migración para SDS-PAGE 1x (ver composición en el apartado “disoluciones”).

A continuación, las proteínas separadas en el gel, se transfirieron a una membrana de PVDF (tamaño 6 x 9 cm), previamente activada, utilizando un sistema de transferencia semiseca. La activación de la membrana se llevó a cabo sumergiéndola durante varios segundos en tres cubetas consecutivas que contenían metanol, agua destilada y tampón de transferencia (ver composición en el apartado “disoluciones”). Posteriormente, la membrana se colocó en el sistema de transferencia sobre papel para inmuno-blot, del mismo tamaño, y sobre ella el gel de electroforesis, evitando la formación de burbujas. Se cubrió con otra hoja de papel para inmuno-blot y se humedeció todo el conjunto con tampón de transferencia. Las condiciones eléctricas fueron un amperaje constante de 100 mA y un voltaje de 20 v, durante 30 min.

COMPONENTES	gel lower 12 %	gel upper
Bis-acrilamida(30% Acrylamide/Bis; 29:1)	3,2 ml	0,64 ml
Agua bidestilada	2,8 ml	3,05 ml
Buffer Tris-Cl 1,5 M pH 8.8	2 ml	-
Buffer Tris-Cl 0,5 M pH 6.8	-	1,25 ml
APS 10%	40 μl	25 μl
Temed	4 μl	5 μl

Tabla 4. Composición del gel para SDS-PAGE. Para la preparación de cada gel se utilizó un tubo de cristal de 10 ml, pipeteándose en él las cantidades arriba indicadas,

manteniendo el mismo orden. Tras añadir el temed (agente polimerizante) y agitar, se vertió el contenido en el molde fijado por los cristales.

Tras la transferencia, la membrana fue bloqueada toda la noche en una solución de PBS-tween al 0,1 % con leche en polvo al 5%, en agitación y a 4°C. Después de tres lavados de 5 min. cada uno con PBS-Tween al 0,1%, se incubó con el anticuerpo primario correspondiente, a dilución 1:1000 (anti-APA o anti-CD13) en 10 ml de solución de PBS-tween al 0,1% y leche en polvo al 0,5 %, durante 60 min, en agitación suave y a temperatura ambiente. Se volvió a lavar para eliminar los restos de anticuerpos no unidos al antígeno, y se incubó con el anticuerpo secundario a dilución 1:5000 (Ac. IgG de cabra marcado con peroxidasa) o 1:2000 (Ac. IgG de conejo marcado con peroxidasa), en las mismas condiciones. Finalmente, se volvió a lavar y se procedió al revelado utilizando la solución ECL-plus, según las indicaciones del fabricante, y el sistema revelador Curix 60 (AGFA).

3.3.10. PAGE nativa (non denaturing PAGE) de la alanina y la leucina aminopeptidasas

La prueba para comprobar la actividad enzimática de las aminopeptidasas se intentó realizar en todas las enzimas relacionadas anteriormente. Sin embargo, debido a la baja concentración de estas enzimas en sangre y a la falta de bibliografía que explicara las condiciones de análisis, esta prueba solo pudo realizarse para la alanina-AP y leucina-AP. 20 µl de muestra en tampón de carga 1x, conteniendo 400 y 200 µg de proteína total, según el método de Bradford, fueron sometidos a separación electroforética en condiciones no desnaturalizantes, en un gel de poliacrilamida al 10%, con 1mm de grosor. La preparación del gel se detalla en la tabla 5 (ver tabla 5). Las condiciones eléctricas fueron un amperaje constante de 30 mA durante 120 min. Se utilizó tampón de migración para PAGE nativa (ver composición en apartado “disoluciones”).

COMPONENTES	gel 10%
Bis-acrilamida(30% Acrylamide/Bis; 29:1)	2,66 ml
Buffer fosfato 0,4 M pH 7.4	2 ml
Agua bidestilada	3,29 ml
APS 10%	40 μ l
Temed	4 μ l

Tabla 5. Composición del gel para PAGE nativa. Para la preparación del gel se utilizó un tubo de cristal de 10 ml, pipeteándose en él las cantidades arriba indicadas, manteniendo el mismo orden. Tras añadir el temed (agente polimerizante) y agitar, se vertió el contenido en el molde fijado por los cristales.

Después de la separación electroforética, el gel fue incubado con el sustrato específico de cada enzima (aminoacil- β -naftilamida) en una solución de tampón fosfato 0,1M pH 6.1, que contenía la sal de acoplamiento FBK (ver tabla 6), en un baño a 37° C durante 30 min. La aminopeptidasa, al metabolizar el sustrato, libera β -naftilamina que reacciona con la sal FBK formando un precipitado de color rosado. Para eliminar las uniones no específicas de la sal, el gel se lavó con ácido acético al 25% durante 30-40 min. Las bandas coloreadas que aparecen indican la posición de la aminopeptidasa y la intensidad de color se corresponde con su actividad enzimática.

	COMPONENTES	TAMPÓN
AlaAP	Ala- β -Na 2 mg/20 ml	Fosfato 0,1 M pH 6.1
	Sal FBK 3 mg/20 ml	
LeuAP	Leu- β -Na 2 mg/20 ml	Fosfato 0,1 M pH 6.1
	Sal FBK 3 mg/20 ml	

Tabla 6. Composición de las soluciones sustrato utilizadas para las determinaciones enzimáticas.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con objeto de alcanzar los objetivos de la tesis se llevó a cabo el análisis que enumeramos a continuación:

- 1) Se hizo una descriptiva de las diferentes variables para cada uno de los grupos, empleándose las medidas básicas de resumen (media, desviación típica, percentiles, etc...) en el caso de las variables numéricas y la distribución de frecuencias en el caso de las variables cualitativas.
- 2) En un segundo paso se comparó la edad por grupos empleando el análisis de la varianza de una vía y las posteriores comparaciones por parejas siguiendo la penalización de Bonferroni. Para el caso de la comparación de la distribución del sexo en los diferentes grupos se empleó, para la tabla de contingencia correspondiente, la generalización del test exacto de Fisher para la comparación de proporciones ya que puede aplicarse en todas las situaciones. También se compararon los individuos que tomaban una medicación y que los que no tomaban una medicación empleando el test de comparación de medias con muestras independientes suponiendo varianzas diferentes, es decir el test de Welch.
- 3) La relación entre las diferentes variables dependientes y la edad se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el test para ver que era significativamente distinto de cero, previa nube de puntos para descartar relaciones no lineales.
- 4) Para estudiar las diferencias entre grupos para cada una de las variables de respuesta se llevó a cabo un análisis de la varianza de una vía, que en el caso que dio significativo nos llevó a buscar las causas de la significación empleando la metodología de las comparaciones por parejas con la penalización de Bonferroni y usando el método de Newman-Keuls. No obstante esta metodología no era del todo apropiada puesto que se encontró que los grupos diferían en sexo y en edad, por lo que se empleó el análisis de covarianza para cada una de las variables dependientes controlando por sexo y edad; análogamente a como se hizo en el

caso del análisis de la varianza de una vía se realizaron las comparaciones por parejas con la penalización de Bonferroni siguiendo el método de Newman-Keuls. Con objeto de conseguir que las varianzas fueran homogéneas se emplearon transformaciones para cada una de las variables dependientes, siendo la preferida la transformación del logaritmo neperiano.

El paquete estadístico empleado fue STATA 10.1 y los contrastes se dieron significativos, sin penalización o con ella, a un nivel del 5%.

Resultados

4. RESULTADOS

Los resultados que a continuación se presentan proceden de un estudio observacional, de carácter prospectivo, de una muestra poblacional del área geográfica de Granada.

4.1. DESCRIPTIVA DE LOS INDIVIDUOS POR GRUPO

Como se ha especificado en el apartado material y métodos, para este estudio se han incluido un grupo de sujetos sanos (C) como grupo control y cinco grupos de pacientes: pacientes con EP sometidos a tratamiento específico por lo menos durante un año (EPct), pacientes recién diagnosticados de EP, sin recibir tratamiento específico en el momento de la primera extracción de sangre (EPst), pacientes con EA (EA), pacientes con EH (EH) y pacientes que han sufrido un ictus isquémico (Ic). La distribución de individuos por grupo se muestra en la tabla 7:

GRUPO	n	%
C	60	23,26
EPct	42	16,28
EPst	54	20,93
EA	28	10,85
EH	34	13,18
Ic	40	15,50
Total	258	100,00

Tabla 7. Distribución de individuos por grupo.

Como se observa, los tamaños de muestra son diferentes, siendo mayores los grupos C y EPst. El fuerte desequilibrio entre los tamaños muestrales proviene de la forma de elección de las muestras y de la propia enfermedad, ya que en el caso del grupo EH, la recogida de muestras ha supuesto un esfuerzo importante debido a la baja incidencia de la enfermedad. En los apartados siguientes se van a estudiar las diferencias entre los

grupos EP (EPct y EPst) y C, así como con el resto de grupos de pacientes (EA, EH e Ic). Este desequilibrio entre los tamaños muestrales puede influir en la potencia del análisis estadístico a la hora de marcar algunas diferencias.

4.2. DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS POR EDAD, SEXO Y TRATAMIENTO RECIBIDO

4.2.1. Edad

La distribución de edad por grupos figura en la tabla 8:

GRUPO	n	MEDIA	DES. TÍP.
C	60	48,02	18,41
EPct	42	65,36	8,99
EPst	50	64,26	11,27
EA	28	75,71	5,04
EH	34	46,35	12,94
Ic	40	76,10	11,08
Total	254	61,33	17,15

Tabla 8. Distribución por edad en los diferentes grupos.

La diferencia entre medias es significativa, con una $F_{\text{exp}} = 41,46$ (5; 248) g.l., $p < 0,001$. Cuando se hicieron las comparaciones por parejas, se detectaron tres grupos de edades significativamente diferentes: 1) grupo de edad media inferior, formado por los grupos C y EH; 2) grupo de edad intermedia, formado por los grupos EPct y EPst; y 3) grupo de mayor edad, formado por los grupos EA e Ic. Estas diferencias pueden deberse a la combinación de los siguientes efectos: a) la propia enfermedad, que se presenta a diferentes edades; b) la accesibilidad de los pacientes; y c) la elección del grupo C, con mayor dificultad para acceder a personas sanas de edad avanzada. Así mismo, las varianzas son diferentes, siendo mayor la del grupo C. Esto fue debido al amplio rango

de edad del grupo C, en el que intentó abarcar todos los grupos de estudio. Todo ello obligó a incluir la edad como variable en los estudios posteriores.

4.2.2. Sexo

La distribución de sexo por grupos se muestra en la tabla 9:

GRUPO	VARÓN	MUJER	TOTAL
C	30	30	60
%	50,00	50,00	100,00
EPct	28	14	42
%	66,67	33,33	100,00
EPst	28	25	53
%	52,83	47,17	100,00
EA	11	17	28
%	39,29	60,71	100,00
EH	14	20	34
%	41,18	58,82	100,00
Ic	27	13	40
%	67,50	32,50	100,00
TOTAL	138	119	257
%	53,70	46,30	100,00

Tabla 9. Distribución por sexo en los diferentes grupos.

Como se observa en la tabla 9, no existen diferencias de sexo entre los grupos, con un valor $p = 0,057$. No obstante, al igual que con la edad, se controla la variable sexo en los análisis estadísticos posteriores.

4.2.3. Tratamiento

En el caso del grupo EPct se analizó como variable el tratamiento de cada paciente. La distribución del consumo de fármacos figura en la tabla 10:

FÁRMACOS	n	% CASOS
Levodopa/carbidopa	17	47,22
Pramipexol	17	47,22
Levodopa/carbidopa retard	13	36,11
Entacapone	7	19,44
Cabergolina	6	16,67
Rasagilina	5	13,89
Selegilina	5	13,89
Levodopa/carbidopa/entacapone	5	13,89
Pergolida	3	8,33
Levodopa/bensaracida	3	8,33
Ácido acetil salicílico	3	8,33
Propranolol	2	5,56
Amilriptilina	2	5,56
Olanzapina	2	5,56
Furosamida	2	5,56
Biperideno	1	2,78
Clonazepan	1	2,78
Quetiapina	1	2,78
Clorazepato dipotásico	1	2,78
Tertensif retard	1	2,78
Alprazolam	1	2,78
Aldactone	1	2,78
Ibesartan	1	2,78
Carvedilol	1	2,78
Omeprazol	1	2,78
Nitroglicerina	1	2,78
Enoxaparina	1	2,78
Rotigotina	1	2,78
Captoprilo	1	2,78
Lorazepan	1	2,78
Mianserina	1	2,78

Tabla 10. Distribución del consumo de fármacos en el grupo EPct.

La tabla 10 está basada en 36 de los 42 pacientes del grupo EPct. Con objeto de analizar la posible influencia del tratamiento en estudios posteriores, únicamente se tuvieron en cuenta aquellos fármacos de mayor consumo ($n \geq 5$ pacientes). La nueva distribución se presenta a continuación:

FÁRMACOS	n	% CASOS
Levodopa	26	72,22
Carbidopa	26	72,22
Pramipexol	17	47,22
Entacapone	12	33,33
Cabergolina	6	16,67
Rasagilina	5	13,89
Selegilina	5	13,89

Tabla 11. Distribución del consumo de fármacos en el grupo EPct.

Como se observa en la tabla 11, el 72% de los pacientes del grupo EPct consumen levodopa. Los mismos individuos, y por tanto el mismo porcentaje, consumen carbidopa, con lo que el posible efecto de ambos fármacos aparecerá conjunto. Las comparaciones posteriores de los principios activos se han realizado solo con los fármacos indicados en esta tabla.

4.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

En las páginas siguientes se muestran los resultados (media \pm error típico) de las actividades de las cinco aminopeptidasas estudiadas y las comparaciones entre grupos, ajustados por edad y sexo.

4.3.1. Actividad alanina aminopeptidasa

La actividad plasmática de la AlaAP de cada grupo se muestra en la tabla 12:

GRUPO	n	MEDIA	DESV. TIP.	ERROR TÍPICO
C	60	165,761	43,5671	5,6244
EPct	41	156,751	53,3376	8,3299
EPst	53	195,992	59,0660	8,1133
EA	28	184,0754	74,0147	13,9874
EH	34	142,1003	36,4908	6,2581
Ic	40	158,960	50,5535	7,9932

Tabla 12. Actividad plasmática de la AlaAP (expresada en pmol/min/mg de proteína).

Ajustando por edad y sexo, existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{exp} = 4,51$ (5,244) g.l., $p < 0,0006$. Las comparaciones por parejas figuran en la tabla 13:

GRUPOS		F_{exp}	gl	p
C	EPct	4,81	250	0,4392
	EPst	1,24	250	1,0000
	EA	0,98	250	1,0000
	EH	4,69	250	0,4687
	Ic	4,01	250	0,6967
EPct	EPst	11,36	250	0,0131
	EA	0,75	250	1,0000
	EH	0	250	1,0000
	Ic	0	250	1,0000
EPst	EA	4,15	250	0,6412
	EH	8,45	250	0,0598
	Ic	10,78	250	0,0176
EA	EH	0,47	250	1,0000
	Ic	0,86	250	1,0000
EH	Ic	0,01	250	1,0000
EH+EPct+Ic+C	EA+EPst	3,04	250	0,0026

Tabla 13. Comparaciones por parejas de la actividad plasmática de la AlaAP.

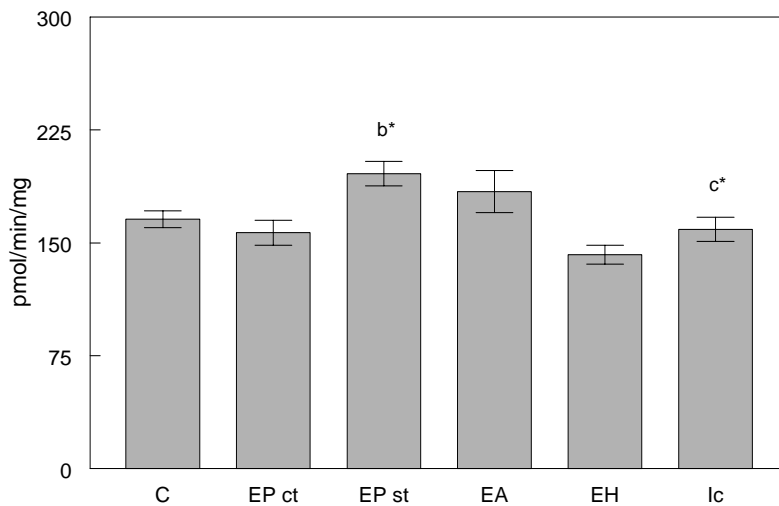


Figura 9. Actividad plasmática de la AlaAP; **b**: diferencias respecto a EPct; **c**: diferencias respecto a EPst; * $p < 0,05$.

Como se observa en la figura 9, la actividad plasmática de la AlaAP fue similar en todos los grupos de estudio, excepto en los grupos EPst y EA donde fue más elevada. Sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el grupo C. Dentro de los grupos de pacientes se encontraron diferencias significativas entre los grupos EPct y EPst, y los grupos EPst e Ic.

También se analizó si la actividad plasmática de la AlaAP está relacionada con la edad y el sexo. Los resultados indican que no hay diferencias entre hombres y mujeres, con una $F_{\text{exp}} = 2,37$ (1, 244) g.l., $p = 0,1247$. Sin embargo, si está relacionada con la edad de manera positiva, con una $F_{\text{exp}} = 2,37$ (1, 244) g.l., $p = 0,0030$.

4.3.2. Actividad cistina aminopeptidasa

La actividad plasmática de la CysAP de cada grupo se muestra en la tabla 14:

GRUPO	n	MEDIA	DESV. TIP.	ERROR TÍPICO
C	60	24,885	10,0020	1,2912
EPct	41	21,463	15,1739	2,3697
EPst	53	34,697	33,5414	4,6072
EA	28	34,571	30,5739	5,7779
EH	34	22,8841	9,6289	1,6513
Ic	40	19,4923	7,7826	1,2305

Tabla 14. Actividad plasmática de la CysAP (expresada en pmol/min/mg de proteína).

Ajustando por edad y sexo, existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{exp} = 3,97$ (5,244) g.l., $p < 0,0017$. Las comparaciones por parejas figuran en la tabla 15:

GRUPOS		F_{exp}	gl	p
C	EPct	9,11	244	0,0421
	EPst	0,30	244	1,0000
	EA	0,00	244	1,0000
	EH	0,76	244	1,0000
	Ic	11,18	244	0,0144
EPct	EPst	13,46	244	0,0045
	EA	7,24	244	0,1142
	EH	3,60	244	0,8827
	Ic	0,50	244	1,0000
EPst	EA	0,16	244	1,0000
	EH	1,58	244	1,0000
	Ic	18,03	244	0,0005
EA	EH	0,48	244	1,0000
	Ic	11,48	244	0,0123
EH	Ic	2,33	244	0,3278
EH+EPct+Ic+C	EA+EPst	3,31	244	0,0011

Tabla 15. Comparaciones por parejas de la actividad plasmática de la CysAP.

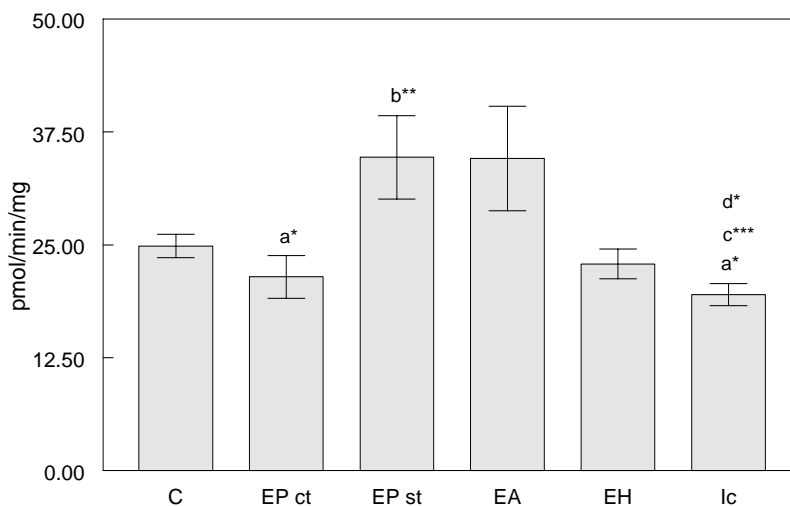


Figura 10. Actividad plasmática de la CysAP; **a:** diferencias respecto a C; **b:** diferencias respecto a EPct; **c:** diferencias respecto a EPst; **d:** diferencias respecto a EA; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como se observa en la figura 10, la actividad plasmática de la CysAP fue más elevada en los grupos EPst y EA, pero las diferencias no fueron significativas con el grupo C. Por el contrario, en los grupos EPct e Ic la actividad CysAP fue más baja, encontrándose diferencias estadísticamente significativas de ambos grupos con el grupo C. Dentro de los grupos de pacientes se encontraron diferencias significativas entre los grupos EPct y EPst, los grupos EPst e Ic y los grupos EA e Ic.

También se analizó si la actividad plasmática de la CysAP está relacionada con la edad y el sexo. Los resultados indican que no hay diferencias entre hombres y mujeres, con una $F_{\text{exp}} = 0,57$ (1, 244) g.l., $p = 0,4481$. Tampoco existe asociación con la edad, con una $F_{\text{exp}} = 0,57$ (1, 244) g.l., $p = 0,0529$.

4.3.3. Actividad aspartato aminopeptidasa

La actividad plasmática de la AspAP de cada grupo se muestra en la tabla 16:

GRUPO	n	MEDIA	DESV. TIP.	ERROR TÍPICO
C	60	3,435	2,8709	0,3706
EPct	41	3,586	13,9980	2,1861
EPst	53	12,747	31,0421	4,2639
EA	28	15,113	27,8278	5,2589
EH	34	1,523	1,2004	0,2058
Ic	40	1,323	1,8609	0,2942

Tabla 16. Actividad plasmática de la AspAP (expresada en pmol/min/mg de proteína).

Ajustando por edad y sexo, existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{exp} = 3,66$ (5,250) g.l., $p < 0,0033$. Las comparaciones por parejas figuran en la tabla 17:

GRUPOS		F_{exp}	gl	p
C	EPct	5,6	250	0,2828
	EPst	7,4	250	0,1063
	EA	8,63	250	0,0554
	EH	9,8	250	0,0299
	Ic	12,3	250	0,0084
EPct	EPst	24,28	250	0,0000
	EA	25,19	250	0,0000
	EH	0,16	250	1,0000
	Ic	1,8	250	1,0000
EPst	EA	0,81	250	1,0000
	EH	26,99	250	0,0000
	Ic	40,12	250	0,0000
EA	EH	25,25	250	0,0000
	Ic	42,4	250	0,0123
EH	Ic	0,74	250	1,0000

Tabla 17. Comparaciones por parejas de la actividad plasmática de la AspAP.

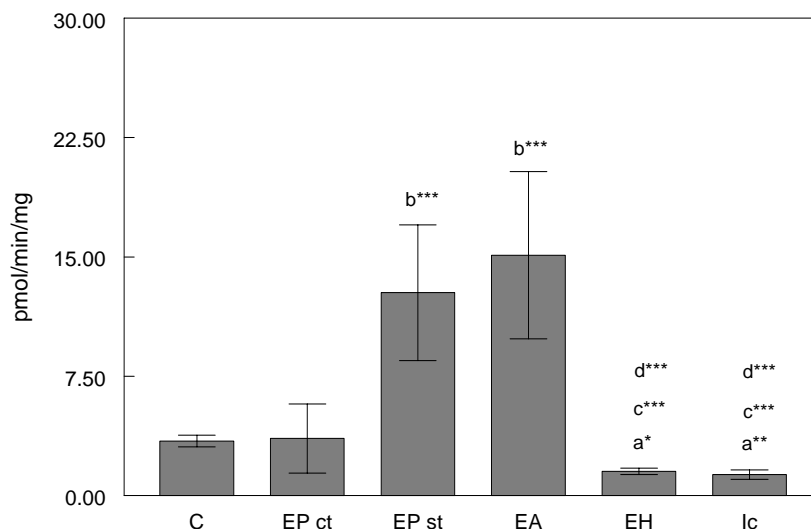


Figura 11. Actividad plasmática de la AspAP; **a:** diferencias respecto a C; **b:** diferencias respecto a EPct; **c:** diferencias respecto a EPst; **d:** diferencias respecto a EA; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como se observa en la figura 11, la actividad plasmática de la AspAP fue más elevada en los grupos EPst y EA, pero las diferencias no fueron significativas con el grupo C. Por el contrario, la actividad más baja se registró en los grupos EH e Ic, encontrándose diferencias estadísticamente significativas de ambos grupos con el grupo C. Dentro de los grupos de pacientes se encontraron diferencias significativas entre el grupo EPct y los grupos EPst y EA; el grupo EPst y los grupos EH e Ic; y el grupo EA y los grupos EH e Ic.

También se analizó si la actividad plasmática de la AspAP está relacionada con la edad y el sexo. Los resultados indican que no hay diferencias entre hombres y mujeres, con una $F_{\text{exp}} = 0,68$ (1, 244) g.l., $p = 0,4092$. Tampoco existe asociación con la edad, con una $F_{\text{exp}} = 0,68$ (1, 244) g.l., $p = 0,2132$.

4.3.4. Actividad glutamato aminopeptidasa

La actividad plasmática de la GluAP de cada grupo se muestra en la tabla 18:

GRUPO	n	MEDIA	DESV. TIP.	ERROR TÍPICO
C	60	13,881	8,6218	1,1130
EPct	41	16,109	18,9280	2,9560
EPst	53	24,459	31,5755	4,3387
EA	28	26,105	27,9855	5,2887
EH	34	8,157	6,0147	1,0315
Ic	40	21,938	19,2670	3,0463

Tabla 18. Actividad plasmática de la GluAP (expresada en pmol/min/mg de proteína).

Ajustando por edad y sexo, existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{exp} = 6,22$ (5,244) g.l., $p < 0,0000$. Las comparaciones por parejas figuran en la tabla 19:

GRUPOS		F_{exp}	gl	p
C	EPct	0,87	244	1,0000
	EPst	3,34	244	1,0000
	EA	3,27	244	1,0000
	EH	13,69	244	0,0040
	Ic	0,11	244	1,0000
EPct	EPst	7,61	244	0,0934
	EA	7,41	244	0,1042
	EH	5,57	244	0,2581
	Ic	1,59	244	1,0000
EPst	EA	0,18	244	1,0000
	EH	23,96	244	0,0000
	Ic	1,80	244	1,0000
EA	EH	19,03	244	0,0003
	Ic	2,59	244	1,0000
EH	Ic	10,12	244	0,0249

Tabla 19. Comparaciones por parejas de la actividad plasmática de la GluAP.

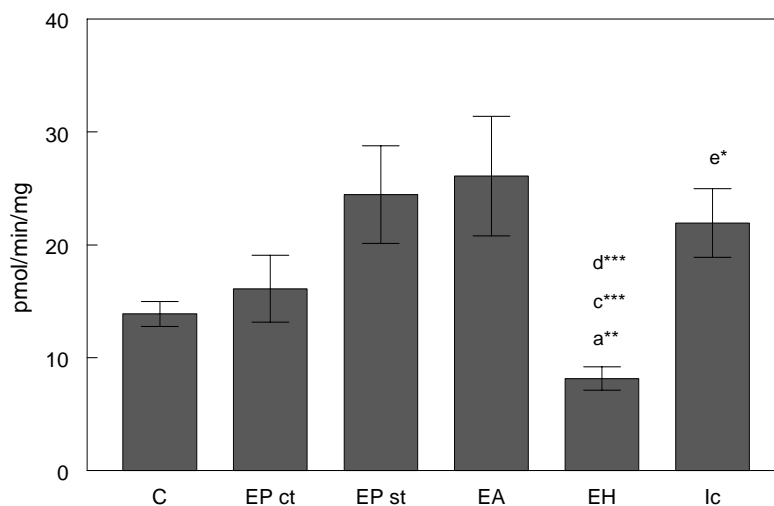


Figura 12. Actividad plasmática de la GluAP; **a:** diferencias respecto a C; **c:** diferencias respecto a EPst; **d:** diferencias respecto a EA; **e:** diferencias respecto a EH; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como se observa en la figura 12, la actividad plasmática de la GluAP fue más elevada en los grupos EPst, EA e Ic, pero las diferencias no fueron significativas con el grupo C. Por el contrario, la actividad más baja se registró en el grupo EH, encontrándose diferencias estadísticamente significativas con el grupo C. Dentro de los grupos de pacientes se encontraron diferencias significativas entre los grupos EPst y EH, los grupos EA y EH y los grupos EH e Ic.

También se analizó si la actividad plasmática de la GluAP está relacionada con la edad y el sexo. Los resultados indican que no hay diferencias entre hombres y mujeres, con una $F_{exp} = 0,68$ (1, 244) g.l., $p = 0,4089$. Sin embargo, si está relacionada con la edad de manera positiva, con una $F_{exp} = 0,68$ (1, 244) g.l., $p = 0,0500$.

4.3. 5. Actividad leucina aminopeptidasa

La actividad plasmática de la LeuAP de cada grupo se muestra en la tabla 20:

GRUPO	n	MEDIA	DESV. TIP.	ERROR TÍPICO
C	60	12,556	13,8784	1,7917
EPct	41	10,475	22,1812	3,4641
EPst	53	18,643	29,1796	4,0081
EA	28	21,621	29,5245	5,5796
EH	34	7,429	3,0016	0,5147
Ic	40	6,901	4,5181	0,7143

Tabla 20. Actividad plasmática de la LeuAP (expresad en pmol/min/mg de proteína).

Ajustando por edad y sexo, existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{exp} = 2,89 (5,244)$ g.l., $p < 0,0148$. Las comparaciones por parejas figuran en la tabla 21:

GRUPOS		F_{exp}	gl	p
C	EPct	4,08	244	0,6678
	EPst	3,35	244	1,0000
	EA	4,31	244	0,5836
	EH	4,33	244	0,5776
	Ic	6,89	244	0,1379
EPct	EPst	15,15	244	0,0019
	EA	15,64	244	0,0015
	EH	0,00	244	1,0000
	Ic	0,80	244	1,0000
EPst	EA	0,51	244	1,0000
	EH	11,91	244	0,0099
	Ic	21,65	244	0,0001
EA	EH	11,65	244	0,0113
	Ic	23,47	244	0,0000
EH	Ic	0,54	244	1,0000

Tabla 21. Comparaciones por parejas de la actividad plasmática de la LeuAP.

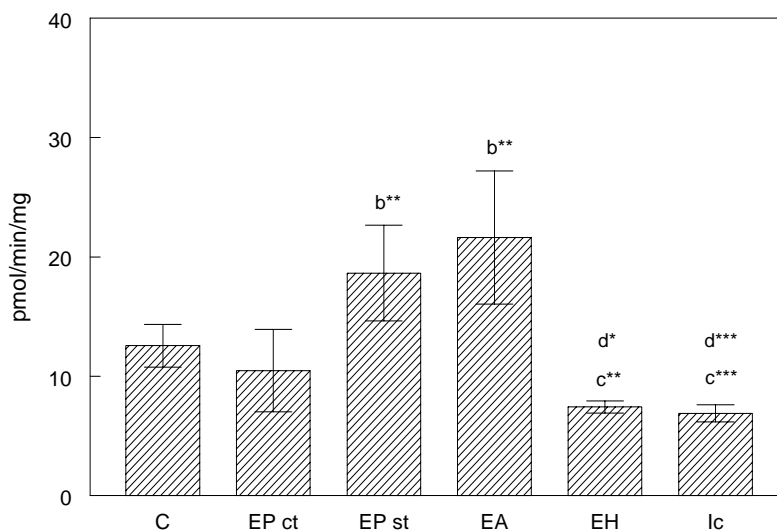


Figura 13. Actividad plasmática de la LeuAP; **b**: diferencias respecto a EPct; **c**: diferencias respecto a EPst; **d**: diferencias respecto a EA; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como se observa en la figura 13, la actividad plasmática de la LeuAP fue más elevada en los grupos EPst y EA, pero las diferencias no fueron significativas con el grupo C. La actividad más baja se registró en los grupos EH e Ic, sin encontrarse tampoco diferencias significativas con el grupo C. Dentro de los grupos de pacientes se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo EPct y los grupos EPst y EA; el grupo EPst y los grupos EH e Ic; y el grupo EA y los grupos EH e Ic.

También se analizó si la actividad plasmática de la LeuAP está relacionada con la edad y el sexo. Los resultados indican que no hay diferencias entre hombres y mujeres, con una $F_{exp} = 1,20$ (1, 244) g.l., $p = 0,2729$. Tampoco existe asociación con la edad, con una $F_{exp} = 1,20$ (1, 244) g.l., $p = 0,6096$.

4.4. RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN LOS GRUPOS DE EP CON Y SIN TRATAMIENTO Y LOS FÁRMACOS ADMINISTRADOS

Como se observa en las figuras 9, 10, 11, 12 y 13, existe una mayor actividad plasmática de la Ala-, Cys-, Asp-, Glu- y LeuAP en el grupo EPst comparado con el grupo EPct, encontrándose en todas las actividades, a excepción de la GluAP,

diferencias estadísticamente significativas. Para comprobar si esas diferencias son una característica de la evolución de la enfermedad, o por el contrario son consecuencia del tratamiento antiparkinsoniano que ha recibido el grupo EPct, se ha analizado cada actividad AP bajo la influencia de los fármacos de mayor consumo resumidos en la tabla 11.

4.4.1. Actividad alanina aminopeptidasa

La actividad plasmática de la AlaAP (expresada en pmol/min/mg de proteína) de cada subgrupo (T: toma; NT: no toma) y para cada fármaco se muestra en la tabla 22:

FÁRMACO	GRUPO	n	MEDIA	DESV. TÍP.	ERROR TÍPICO	P
Levodopa	NT	69	185,023	59,5281	7,1663	0,0970
	T	25	161,910	57,7502	11,5500	
Carbidopa	NT	69	185,023	59,5281	7,1663	0,0970
	T	25	161,910	57,7502	11,5500	
Pramipexol	NT	78	181,974	61,5982	6,9746	0,2685
	T	16	178,876	47,7836	11,9459	
Entacapone	NT	83	181,076	60,9336	6,6883	0,3286
	T	11	162,278	47,8747	14,4347	
Cabergolina	NT	88	181,105	59,6396	6,3576	0,1665
	T	6	146,193	53,8798	21,9963	
Rasagilina	NT	90	180,322	60,0809	6,3330	0,2671
	T	4	146,340	41,3225	20,6612	
Selegilina	NT	89	180,333	59,9108	6,3505	0,3201
	T	5	152,936	53,3798	23,8721	

Tabla 22. Análisis estadístico de la actividad plasmática de la AlaAP en el grupo EPct. Comparación entre los individuos que toman (T) y no toman (NT) el fármaco.

Como se observa en la tabla 22, no existen diferencias significativas en la actividad de la AlaAP entre los subgrupos NT y T para cada fármaco.

4.4.2. Actividad cistina aminopeptidasa

La actividad plasmática de la CysAP (expresada en pmol/min/mg de proteína) de cada subgrupo (T: toma; NT: no toma) y para cada fármaco se muestra en la tabla 23:

FÁRMACO	GRUPO	n	MEDIA	DESV. TÍP.	ERROR TÍPICO	P
Levodopa	NT	69	30,998	30,2355	3,6399	0,1406
	T	25	23,202	18,7968	3,7593	
Carbidopa	NT	69	30,998	30,2355	3,6399	0,1406
	C	25	23,202	18,7968	3,7593	
Pramipexol	NT	78	29,921	28,8945	3,2716	0,4452
	T	16	24,063	21,6289	5,4072	
Entacapone	NT	83	29,345	28,1296	3,0876	0,6887
	T	11	25,748	25,9800	7,8332	
Cabergolina	NT	88	29,518	28,5436	3,0427	0,06491
	T	6	20,218	8,8533	3,6143	
Rasagilina	NT	90	29,401	28,2605	2,9789	0,0512
	T	4	18,192	8,1265	4,0632	
Selegilina	NT	89	29,392	28,4344	3,0140	0,0751
	T	5	20,596	7,8115	3,4934	

Tabla 23. Análisis estadístico de la actividad plasmática de la CysAP en el grupo EPct. Comparación entre los individuos que toman (T) y no toman (NT) el fármaco.

Como se observa en la tabla 23, no existen diferencias significativas en la actividad de la CysAP entre los subgrupos NT y T para cada fármaco.

4.4.3. Actividad aspartato aminopeptidasa

La actividad plasmática de la AspAP (expresada en pmol/min/mg de proteína) de cada subgrupo (T: toma; NT: no toma) y para cada fármaco se muestra en la tabla 24:

FÁRMACO	GRUPO	n	MEDIA	DESV. TÍP.	ERROR TÍPICO	P
Levodopa	NT	69	10,306	27,5363	3,3149	0,1176
	T	25	4,460	17,9088	3,5817	
Carbidopa	NT	69	10,306	27,5263	3,3149	0,1176
	T	25	4,460	17,9088	3,5817	
Pramipexol	NT	78	9,127	26,0743	2,9523	0,7533
	T	16	6,921	22,3172	5,5793	
Entacapone	NT	83	8,674	25,3415	2,7815	0,9362
	T	11	9,330	26,8730	8,1025	
Cabergolina	NT	88	9,256	26,1562	2,7882	0,0069
	T	6	1,345	1,60401	0,6548	
Rasagilina	NT	90	9,099	25,8837	2,7283	0,0041
	T	4	0,932	1,0408	0,5204	
Selegilina	NT	89	3,101	26,0402	2,7602	0,0233
	T	5	2,520	1,4350	0,6417	

Tabla 24. Análisis estadístico de la actividad plasmática de la AspAP en el grupo EPct. Comparación entre los individuos que toman (T) y no toman (NT) el fármaco.

Como se observa en la tabla 24, no existen diferencias significativas en la actividad de la AspAP entre los subgrupos NT y T para los fármacos levodopa, carbidopa, pramipexol y entacapone. Sin embargo si existen diferencias significativas para los fármacos cabergolina, rasagilina y selegilina.

4.4.4. Actividad glutamato aminopeptidasa

La actividad plasmática de la GluAP (expresada en pmol/min/mg de proteína) de cada subgrupo (T: toma; NT: no toma) y para cada fármaco se muestra en la tabla 25:

FÁRMACO	GRUPO	n	MEDIA	DESV. TÍP.	ERROR TÍPICO	P
Levodopa	NT	69	22,277	28,2007	3,3949	0,3865
	T	25	16,786	23,4118	4,6823	
Carbidopa	NT	69	22,277	28,2007	3,3949	0,3865
	C	25	16,786	23,4118	4,6823	
Pramipexol	NT	78	21,254	26,6945	3,0225	0,7307
	T	16	18,685	29,2456	7,3114	
Entacapone	NT	83	20,314	26,1130	2,8662	0,6228
	T	11	24,607	34,1951	10,3102	
Cabergolina	NT	88	21,014	27,7189	2,9548	0,7879
	T	6	17,926	13,3285	5,4413	
Rasagilina	NT	90	21,390	27,4539	2,8939	0,0000
	T	4	7,925	1,9749	0,9874	
Selegilina	NT	89	20,671	27,4587	2,9106	0,8269
	T	5	23,406	18,7182	8,3710	

Tabla 25. Análisis estadístico de la actividad plasmática de la GluAP en el grupo EPct. Comparación entre los individuos que toman (T) y no toman (NT) el fármaco.

Como se observa en la tabla 25, no existen diferencias significativas en la actividad de la GluAP entre los subgrupos NT y T para cada fármaco, a excepción de la rasagilina donde si hay diferencias significativas.

4.4.5. Actividad leucina aminopeptidasa

La actividad plasmática de la LeuAP (expresada en pmol/min/mg de proteína) de cada subgrupo (T: toma; NT: no toma) y para cada fármaco se muestra en la tabla 26:

FÁRMACO	GRUPO	n	MEDIA	DESV. TÍP.	ERROR TÍPICO	P
Levodopa	NT	69	16,308	25,9988	3,1298	0,4590
	T	25	11,692	28,2422	5,6484	
Carbidopa	NT	69	16,308	25,9988	3,1298	0,4590
	T	25	11,692	28,2422	5,6484	
Pramipexol	NT	78	14,766	24,6914	2,7957	0,8433
	T	16	16,613	35,1269	8,7817	
Entacapone	NT	83	14,616	23,9988	2,6342	0,7675
	T	11	18,586	42,5659	12,8338	
Cabergolina	NT	88	15,609	27,3537	2,9159	0,0072
	T	6	7,331	1,8661	0,7618	
Rasagilina	NT	90	15,491	27,0469	2,8510	0,0054
	T	4	5,840	3,3923	1,6961	
Selegilina	NT	89	15,4818	27,2206	2,8853	0,0168
	T	5	7,948	2,4891	1,1131	

Tabla 26. Análisis estadístico de la actividad plasmática de la LeuAP en el grupo EPct. Comparación entre los individuos que toman (T) y no toman (NT) el fármaco.

Como se observa en la tabla 26, no existen diferencias significativas en la actividad de la LeuAP entre los subgrupos NT y T para los fármacos levodopa, carbidopa, pramipexol y entacapone. Sin embargo si existen diferencias significativas para los fármacos cabergolina, rasagilina y selegilina.

4.5. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE AMINOPEPTIDASAS POR SDS-PAGE /INMUNOBLOT Y PAGE NATIVA

Como se discutirá en el apartado correspondiente, se pusieron a punto las técnicas de Western blotting y Page nativa para el análisis de APs plasmáticas. Debido a la baja concentración de APs en plasma, no fue posible cuantificarlas ni hacer un estudio comparativo entre algunos grupos (C, EP y EH). Únicamente se pudo hacer un análisis cualitativo de algunas de estas enzimas. El procedimiento fue lento debido a las complicaciones que fueron apareciendo al trabajar con plasma sanguíneo. Es un tipo de muestra que contiene gran cantidad de proteínas, resultando difícil aislar las APs, teniendo en cuenta que se encuentran en concentraciones muy bajas, por lo que quedan enmascaradas con las proteínas mayoritarias, entre ellas albúmina e inmunoglobulinas, que pueden alcanzar el 80% de las proteínas totales (Travis et al., 1976). Para solucionar este problema, se sometió la muestra a una extracción de albúmina e IgG mediante columnas de inmunoafinidad (ver apartado 3.3.8). Además se consiguió eliminar la reacción cruzada que aparecía en el inmunoblot al reaccionar el anticuerpo secundario de manera inespecífica con las inmunoglobulinas plasmáticas.

4.5.1. Análisis cualitativo de los inmunoblots de la alanina y la glutamato aminopeptidasas

Las aminopeptidasas constituyen un grupo muy heterogéneo de enzimas. No solo se encuentran altamente glicosiladas (O'Connell et al., 1991), sino que además cada tipo presenta varias isoenzimas que se van a diferenciar en el peso molecular y en el grado de glicosilación (Herzig et al., 1992) (Kawai et al., 2003). Por otra parte, al estar tan poco estudiadas, resulta difícil encontrar anticuerpos específicos comerciales que sean efectivos para su detección. Por estas razones, en este estudio se analizaron únicamente la alanina y la glutamato aminopeptidasas, por ser de las más conocidas y abundantes en plasma. En cada inmunoblot se utilizó plasma sanguíneo de diferentes sujetos.

4.5.1.1. Grupos C y EPst

La figura 14 muestra un inmunoblot de la AlaAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst. La primera banda (de izquierda a derecha) corresponde a 50 ng de

la enzima AlaAP comercial purificada, con un peso molecular aproximado del monómero de 140 kDa. Las dos bandas siguientes corresponden a la enzima AlaAP presente en 90 y 75 μg , respectivamente, de proteínas plasmáticas de un sujeto del grupo C; y las dos últimas corresponden a la AlaAP de un sujeto del grupo EPst, en las mismas cantidades de muestra. Como se puede apreciar, la concentración de AlaAP fue más baja en el sujeto EPst. Sin embargo, el análisis de la actividad AP de ambas muestras no se correspondió con la intensidad de las bandas.



Figura 14. Inmunoblot de la AlaAP de dos sujetos de los grupos C y EPst.

La figura 15 muestra otro inmunoblot de la AlaAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst. Las dos primeras bandas (de izquierda a derecha) corresponden a 75 y 50 ng, respectivamente, de la enzima AlaAP comercial purificada, con un peso molecular del monómero de 140 kDa. Las dos bandas siguientes corresponden a la enzima AlaAP presente en 90 y 75 μg de proteínas plasmáticas de un sujeto del grupo C; y las dos últimas corresponden a la AlaAP de un sujeto del grupo EPst, en las mismas cantidades de muestra. En este caso la concentración de AlaAP fue más elevada en el sujeto EPst. Cuando se analizó la actividad AP de ambas tampoco se correspondió con la intensidad de las bandas.

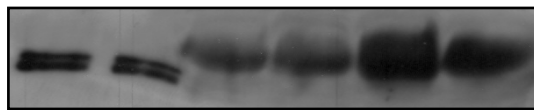


Figura 15. Inmunoblot de la AlaAP de dos sujetos de los grupos C y EPst.

La figura 16 muestra un inmunoblot de la GluAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst. Aunque 170 ng de la enzima GluAP purificada se sometieron a electroforesis al mismo tiempo que las muestras de plasma, no se distingue la banda correspondiente probablemente debido a la baja reactividad del anticuerpo primario por la enzima comercial. Por tanto, las dos primeras bandas (de izquierda a derecha) corresponden a la enzima GluAP presente en 80 y 65 μg , respectivamente, de proteínas

plasmáticas de un sujeto del grupo C; las dos bandas siguientes corresponden a la GluAP de un sujeto del grupo EPst, en las mismas cantidades de muestra. El peso molecular aproximado de la enzima es de 130 kDa. Como se puede apreciar, la concentración de GluAP fue más elevada en el sujeto EPst. Cuando se analizó la actividad AP de ambas muestras los resultados fueron similares.

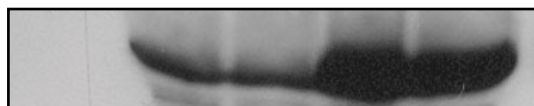


Figura 16. Inmunoblot de la GluAP de dos sujetos de los grupos C y EPst.

La figura 17 muestra otro inmunoblot de la GluAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst. El orden de las muestras y las cantidades utilizadas fueron similares al ejemplo anterior. Como se puede apreciar, la concentración de GluAP fue más baja en el sujeto EPst. En este caso tampoco hubo correspondencia entre la intensidad de las bandas y la actividad AP.

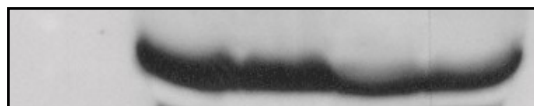


Figura 17. Inmunoblot de la GluAP de dos sujetos de los grupos C y EPst.

Por último, la figura 18 muestra un tercer inmunoblot de la GluAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst. El orden de las muestras y las cantidades utilizadas fueron similares a los dos ejemplos anteriores. Como se puede apreciar, la concentración de GluAP fue más baja en el sujeto EPst. Cuando se analizó la actividad AP de ambas muestras tampoco hubo correspondencia con la intensidad de las bandas.



Figura 18. Inmunoblot de la GluAP de dos sujetos de los grupos C y EPst.

En resumen, se puede observar que las diferencias en la concentración de ambas aminopeptidasas (AlaAP y GluAP) en los grupos C y EPst no se corresponden con los resultados de actividad enzimática. Queda por realizar un análisis más exhaustivo y con un mayor número de muestras.

4.5.1.2. Grupos C y EH

La figura 19 muestra un inmunoblot de la AlaAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH. Las dos primeras bandas (de izquierda a derecha) corresponden a 150 y 100 ng, respectivamente, de la enzima AlaAP comercial purificada, con un peso molecular aproximado del monómero de 140 kDa. Las dos bandas siguientes corresponden a la enzima AlaAP presente en 90 y 75 μ g de proteínas plasmáticas de un sujeto del grupo C; y las dos últimas corresponden a la AlaAP de un sujeto del grupo EH, en las mismas cantidades de muestra. Como se puede apreciar, la concentración de AlaAP fue más elevada en el sujeto EH. En este caso, tampoco hubo correspondencia entre la intensidad de las bandas y la actividad AP.

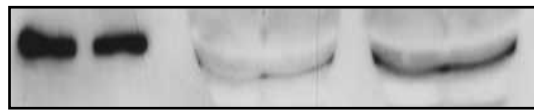


Figura 19. Inmunoblot de la AlaAP de dos sujetos de los grupos C y EH.

La figura 20 muestra otro inmunoblot de la AlaAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH. El orden de las muestras y las cantidades utilizadas fueron similares al ejemplo anterior. Como se puede apreciar, la concentración de la AlaAP fue más baja en el sujeto EH. Cuando se analizó la actividad AP de ambas muestras, los resultados fueron paralelos, registrándose también menor actividad en el sujeto EH.



Figura 20. Inmunoblot de la AlaAP de dos sujetos de los grupos C y EH.

La figura 21 muestra un inmunoblot de la GluAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH. Al igual que en la figura 16, no se observa la banda correspondiente a 170 ng de GluAP purificada. Las dos primeras bandas (de izquierda a derecha) corresponden a la enzima GluAP presente en 90 y 75 μ g de proteínas plasmáticas de un sujeto del grupo C; y las dos siguientes corresponden a la GluAP de un sujeto del grupo EH, en las mismas cantidades de muestra. Como se puede apreciar, la concentración de GluAP fue más elevada en el sujeto EH. Sin embargo, no hubo correspondencia entre la actividad AP y la intensidad de las bandas.

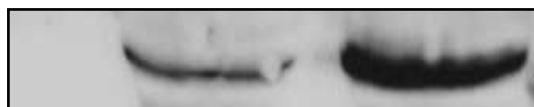


Figura 21. Inmunoblot de la GluAP de dos sujetos de los grupos C y EH.

La figura 22 muestra otro inmunoblot de la GluAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH. El orden de las muestras y las cantidades utilizadas fueron similares al ejemplo anterior. Como se puede apreciar, la concentración de GluAP fue más baja en el sujeto EH. Cuando se analizó la actividad AP de ambas muestras los resultados fueron paralelos, registrándose también menor actividad en el sujeto del grupo EH.



Figura 22. Inmunoblot de la GluAP de dos sujetos de los grupos C y EH.

Por último, la figura 23 muestra un tercer inmunoblot de la GluAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH. El orden de las muestras y las cantidades utilizadas fueron similares a los dos ejemplos anteriores. Como se observa, la concentración de GluAP fue más elevada en el sujeto del grupo EH. Sin embargo, cuando se analizó la actividad AP no hubo correspondencia con la intensidad de las bandas.



Figura 23. Inmunoblot de la GluAP de dos sujetos de los grupos C y EH.

4.5.2. Análisis cualitativo de PAGE-nativa de la alanina y la leucina aminopeptidasas

La técnica de PAGE-nativa permite la separación electroforética de la proteína de interés en base a su peso molecular y a su punto isoeléctrico (pI), en condiciones no desnaturizantes. El pI de ambas enzimas oscila entre 4,9 y 5,3. Como el gel de electroforesis se preparó a pH 7.4 (ver apartado 3.2.3), las enzimas adquieren una carga neta negativa que las hace desplazarse al polo positivo o ánodo, en condiciones similares a un SDS-PAGE estándar.

Los resultados que se presentan en este apartado son de la alanina y la leucina aminopeptidasas. La mayor actividad de estas enzimas permite que puedan ser detectadas tras su separación por PAGE-nativa.

4.5.2.1. Grupos C y EPst

La figura 24 muestra un blot de la AlaAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst. Las cuatro primeras bandas (de izquierda a derecha) corresponden a la enzima AlaAP presente en 400 y 200 μ g (por duplicado) de proteínas plasmáticas de un sujeto del grupo C; las cuatro siguientes corresponden a la AlaAP de un sujeto del grupo EPst, en las mismas cantidades de muestra. Como se puede observar, la actividad AlaAP fue más elevada en el sujeto EPst. Estos resultados se correspondieron con la actividad AP de ambas muestras medida fluorimétricamente según el protocolo detallado en el apartado 3.3.2.

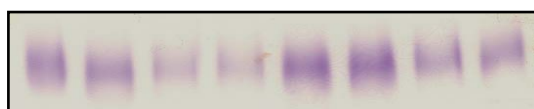


Figura 24. Blot de la AlaAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst.

La figura 25 muestra otro blot de la AlaAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst. El orden de las muestras y las cantidades utilizadas fueron similares al ejemplo anterior. En este caso, la actividad AlaAP fue más baja en el sujeto EPst. Estos resultados también se correspondieron con la actividad AP de ambas muestras medida fluorimétricamente.

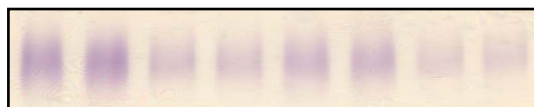


Figura 25. Blot de la AlaAPA en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst.

La figura 26 muestra un blot de la LeuAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst. Las cuatro primeras bandas (de izquierda a derecha) corresponden a la enzima LeuAP presente en 400 y 200 μ g (por duplicado) de proteínas plasmáticas de un sujeto del grupo C; las cuatro siguientes corresponden a la LeuAP de un sujeto del grupo EPst, en las mismas cantidades de muestra. Como se puede observar, la actividad LeuAP fue más elevada en el sujeto EPst. Estos resultados se correspondieron con la actividad AP de ambas muestras medida fluorimétricamente según el protocolo detallado en el apartado 3.3.2.



Figura 26. Blot de la LeuAPA en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst.

La figura 27 muestra otro blot de la LeuAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst. El orden de las muestras y las cantidades utilizadas fueron similares al ejemplo anterior. En este caso, la actividad LeuAP fue más baja en el sujeto EPst. Estos resultados también se correspondieron con la actividad AP de ambas muestras medida fluorimétricamente.



Figura 27. Blot de la LeuAPA en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EPst.

En resumen, podemos decir que en todos los casos analizados existe una relación directa entre la actividad AP obtenida tras PAGE-nativa y la actividad AP determinada fluorimétricamente.

4.5.2.2. Grupos C y EH

La figura 28 muestra un blot de la AlaAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH. Las cuatro primeras bandas (de izquierda a derecha) corresponden a la enzima AlaAP presente en 400 y 200 μg (por duplicado) de proteínas plasmáticas de un sujeto del grupo C; las cuatro siguientes corresponden a la AlaAP de un sujeto del grupo EH, en las mismas cantidades de muestra. Como se puede observar, la actividad AlaAP fue más baja en el sujeto EH. Estos resultados se correspondieron con la actividad AP de ambas muestras medida fluorimétricamente según el protocolo detallado en el apartado 3.3.2.

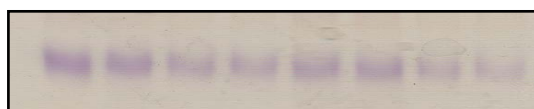


Figura 28. Blot de la AlaAPA en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH.

La figura 29 muestra otro blot de la AlaAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH. El orden de las muestras y las cantidades utilizadas fueron similares al ejemplo anterior. En este caso la actividad AlaAP fue también más baja en el sujeto EH. Del mismo modo estos resultados se correspondieron con la actividad AP de ambas muestras medida fluorimétricamente.

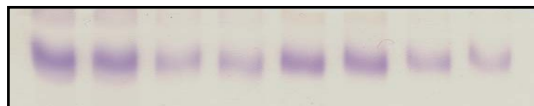


Figura 29. Blot de la AlaAPA en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH.

La figura 30 muestra un blot de la LeuAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH. Las tres primeras bandas (de izquierda a derecha) corresponden a la enzima LeuAP presente en 400 μg (por duplicado) y 200 μg de proteínas plasmáticas de un sujeto del grupo C; las tres siguientes corresponden a la LeuAP de un sujeto del grupo EH, en las mismas cantidades de muestra. Como se puede observar, la actividad LeuAP fue más baja en el sujeto EH. Estos resultados se correspondieron con la actividad AP de ambas muestras medida fluorimétricamente según el protocolo detallado en el apartado 3.3.2.

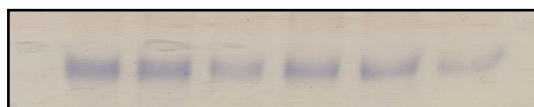


Figura 30. Blot de la LeuAPA en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH.

La figura 31 muestra otro blot de la LeuAP en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH. El orden de las muestras y las cantidades utilizadas fueron similares al ejemplo anterior. Como en el caso anterior, la actividad LeuAP fue más baja en el sujeto EH. Estos resultados también se correspondieron con la actividad AP de ambas muestras medida fluorimétricamente.

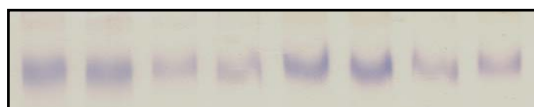


Figura 31. Blot de la LeuAPA en plasma sanguíneo de dos sujetos de los grupos C y EH.

Al igual que en el apartado anterior se puede observar una relación directa entre la actividad AP obtenida tras PAGE-nativa y la actividad AP determinada fluorimétricamente.

4.6. α -SINUCLÉINA CIRCULANTE EN LOS GRUPOS DE EP Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA PLASMÁTICA

Uno de los marcadores característicos de alteración del metabolismo proteico en la EP es la α -sinucleína. La tabla 27 muestra la concentración plasmática de α -sinucleína (expresada en ng/ml) en los grupos C, EPct y EPst:

	GRUPO	n	MEDIA	DESV. TÍP.	ERROR TÍPICO
α -Syn	C	46	11,798	5,9422	0,8761
	EPct	41	16,233	8,4342	1,3172
	EPst	53	16,774	10,5821	1,4535

Tabla 27. Concentración plasmática de α -sinucleína.

Ajustando por edad y sexo, existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{\text{exp}} = 4,52$ (2,132) g.l., $p < 0,0125$. Las comparaciones por parejas figuran en la tabla 28:

GRUPOS		F_{exp}	gl	P
C	EPct	5,06	244	0,0350
	EPst	3,15	244	0,0500
EPct	EPst	0,42	244	1,0000

Tabla 28. Comparaciones por parejas de la concentración plasmática de α -sinucleína.

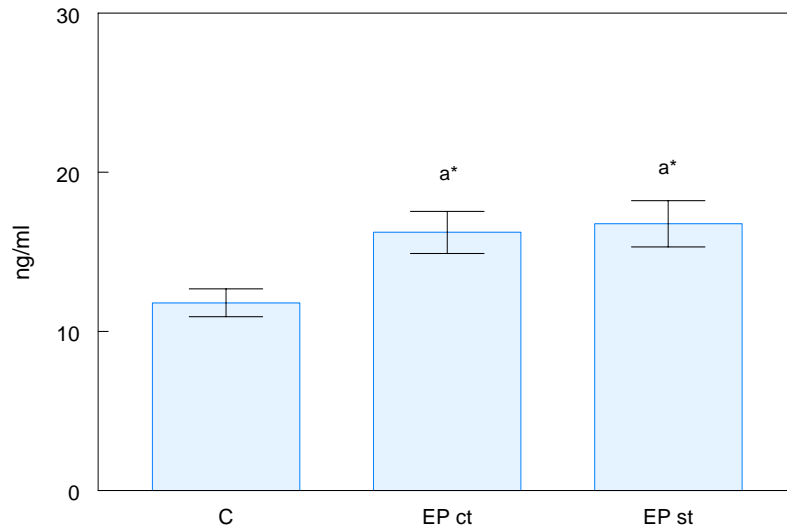


Figura 32. Concentración plasmática de α -sinucleína; **a**: diferencias respecto a C; * $P < 0,05$.

Como se observa en la figura 32, la concentración plasmática de α -sinucleína fue mayor en ambos grupos de EP, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo C y los grupos EPct y EPst. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la concentración de α -sinucleína de los dos grupos de EP.

Se analizó si la concentración de α -sinucleína está relacionada con la edad y el sexo. Los resultados indican que no hay diferencias entre hombres y mujeres, con una $F_{\text{exp}} = 0,49$ (1,132) g.l., $p = 0,4826$. Tampoco existe asociación con la edad, con una $F_{\text{exp}} = 0,49$ (1, 132) g.l., $p = 0,3460$.

Dado que las aminopeptidasas son de las enzimas proteolíticas más abundantes y los resultados expuestos en el apartado 4.3 demuestran que sus actividades están alteradas en la EP, se ha analizado si existe correlación entre la actividad de estas enzimas y la concentración de α -sinucleína en los grupos C, EPct y EPst. Los resultados se muestran en la tabla 29:

GRUPO		AlaAP	CysAP	AspAP	GluAP	LeuAP
C	r	-0,0198	0,0826	-0,1578	0,0210	-0,1733
	P	0,8962	0,5852	0,2949	0,8900	0,2493
EPct	r	-0,1765	0,0329	0,1378	0,1918	0,1611
	P	0,2761	0,8403	0,3963	0,2358	0,3206
EPst	r	0,0352	-0,0717	-0,0704	-0,0544	-0,0799
	P	0,8041	0,6135	0,6200	0,7019	0,5733

Tabla 29. Análisis de la posible correlación entre la concentración de α -sinucleína y la actividad AP en plasma.

Como se observa en la tabla 29, no hubo correlación alguna entre la concentración de α -sinucleína y la actividad AP en cada uno de los grupos estudiados.

4.7. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LÍPIDOS PEROXIDADOS Y ÁCIDO LÁCTICO COMO MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

La producción de lípidos peroxidados y ácido láctico indica la existencia de disfunción mitocondrial, uno de los procesos fisiopatológicos responsable de la muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas mencionadas anteriormente. La disfunción mitocondrial conlleva la formación de radicales libres capaces de oxidar a macromoléculas, entre ellas lípidos de la membrana plasmática; además de la producción de ácido láctico en condiciones de anaerobiosis. Ambas especies son consideradas como dos potentes marcadores de estrés oxidativo.

En este apartado se presentan los resultados (media \pm error típico) de la concentración plasmática de lípidos, lípidos peroxidados y ácido láctico de los 6 grupos estudiados, y las comparaciones entre sí.

4.7.1. Concentración de lípidos plasmáticos

La formación de lípidos peroxidados (LPO) puede verse favorecida si las concentraciones basales de lípidos plasmáticos están incrementadas. Por esta razón no debe determinarse la concentración de LPO sin conocer previamente las concentraciones de lípidos plasmáticos totales. Se han determinado las concentraciones de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL y colesterol LDL de cada individuo.

4.7.1.1. Colesterol total

La concentración plasmática de colesterol total (expresado en mg/dl) de cada grupo se muestra en la tabla 30:

GRUPO	n	MEDIA	DESV. TIP.	ERROR TÍPICO
C	51	191,039	32,2707	4,5188
EPct	42	177,810	30,5568	4,7150
EPst	54	183,833	35,8786	4,8824
EA	28	202,357	44,8447	8,4748
EH	34	182,394	31,9559	5,5628
Ic	40	153,65	37,3215	5,9010

Tabla 30. Concentración plasmática de colesterol total en los grupos del estudio.

Ajustando por edad y sexo, existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{\text{exp}} = 6,30$ (5,236) g.l., $p < 0,0000$. Las comparaciones por parejas figuran en la tabla 31:

GRUPOS		F _{exp}	gl	p
C	EPct	0,51	244	1,0000
	EPst	0,30	244	1,0000
	EA	2,93	244	1,0000
	EH	1,79	244	1,0000
	Ic	11,52	244	0,0121
EPct	EPst	0,04	244	1,0000
	EA	6,04	244	0,2206
	EH	0,31	244	1,0000
	Ic	9,11	244	0,0423
EPst	EA	5,50	244	0,2822
	EH	0,58	244	1,0000
	Ic	10,89	244	0,0167
EA	EH	6,53	244	0,1684
	Ic	27,57	244	0,0000
EH	Ic	3,75	244	0,8105

Tabla 31. Comparaciones por parejas de la concentración plasmática de colesterol total.

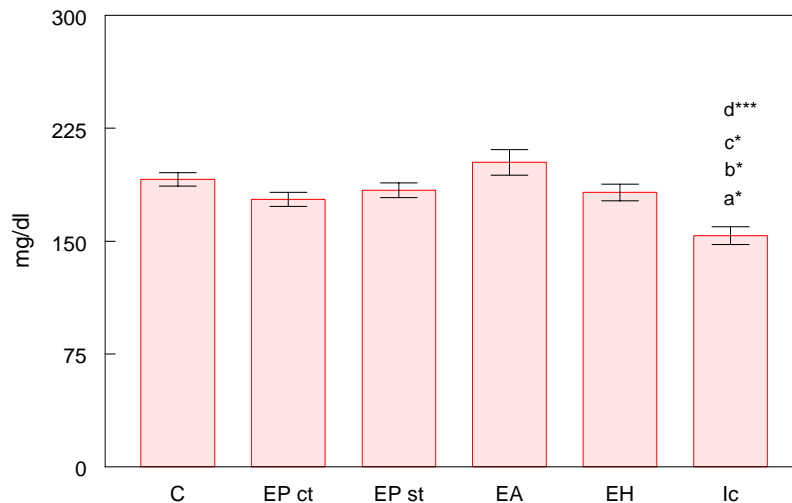


Figura 33. Concentración plasmática de colesterol total; **a:** diferencias respecto a C; **b:** diferencias respecto a EPct; **c:** diferencias respecto a EPst; **d:** diferencias respecto a EA; **e:** diferencias respecto a EH; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Como se observa en la figura 33, la concentración plasmática de colesterol total fue similar en todos los grupos de estudio, excepto en el grupo Ic en el que el colesterol fue significativamente más bajo que en el grupo C. Dentro de los grupos de pacientes, también se encontraron diferencias significativas entre el grupo Ic y los grupos EPct, EPst y EA.

Se analizó si la concentración plasmática de colesterol está relacionada con la edad y el sexo. Los resultados indican que no hay diferencias entre hombres y mujeres, con una $F_{\text{exp}} = 3,47$ (1, 236) g.l., $p = 0,0635$. Tampoco existe asociación con la edad, con una $F_{\text{exp}} = 3,47$ (1, 236) g.l., $p = 0,0682$.

4.7.1.2. Triglicéridos

La concentración plasmática de triglicéridos (expresada en mg/dl) de cada grupo se muestra en la tabla 32:

GRUPO	n	MEDIA	DESV. TIP.	ERROR TÍPICO
C	51	109,902	59,8188	8,3763
EPct	42	129,310	64,8895	10,0126
EPst	54	122,815	54,4499	7,4097
EA	28	140,821	102,6136	19,3921
EH	34	122,333	69,9779	12,1816
Ic	40	134,525	75,4891	11,9358

Tabla 32. Concentración plasmática de triglicéridos en los grupos de estudio.

Ajustando por edad y sexo, no existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{\text{exp}} = 0,95$ (5,236) g.l., $p < 0,4440$.

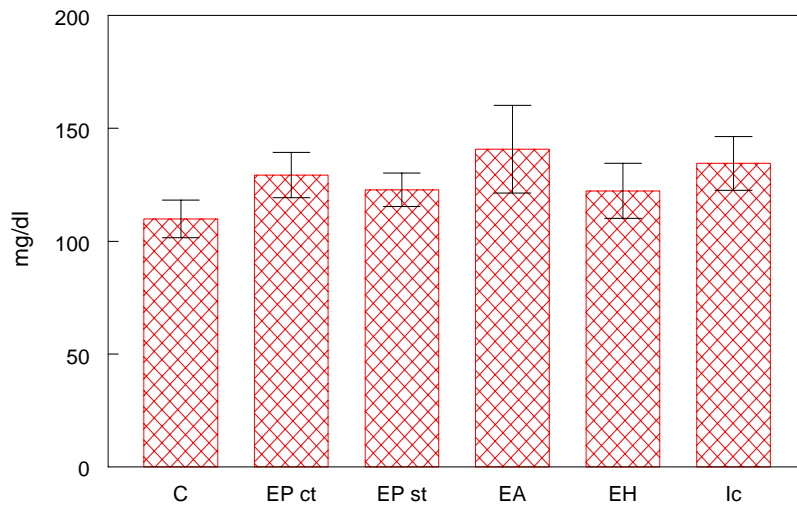


Figura 34. Concentración plasmática de triglicéridos.

Como se observa en la figura 34, la concentración plasmática de triglicéridos fue similar en todos los grupos de estudio, y no se encontraron diferencias significativas ni respecto al grupo C, ni entre los grupos de pacientes.

También se analizó si la concentración plasmática de triglicéridos está relacionada con la edad y el sexo. Los resultados indican que no hay diferencias entre hombres y mujeres, con una $F_{\text{exp}} = 1,66$ (1, 236) g.l., $p = 0,1978$. Tampoco existe asociación con la edad, con una $F_{\text{exp}} = 1,66$ (1, 236) g.l., $p = 0,5744$.

4.7.1.3. Colesterol HDL

La concentración plasmática de colesterol HDL (expresado en mg/dl) de cada grupo se muestra en la tabla 33:

GRUPO	n	MEDIA	DESV. TIP.	ERROR TÍPICO
C	51	55,872	16,2598	2,2768
EPct	42	50,554	13,5071	2,0842
EPst	54	51,464	16,8442	2,2922
EA	28	53,296	20,8603	3,9422
EH	34	50,939	16,8302	2,9297
Ic	40	35,620	12,1253	1,9171

Tabla 33. Concentración plasmática de colesterol HDL en los grupos de estudio.

Ajustando por edad y sexo, existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{exp} = 5,17 (5,236) \text{ g.l.}$, $p < 0,0002$. Las comparaciones por parejas figuran en la tabla 34:

GRUPOS		F_{exp}	gl	p
C	EPct	0,05	244	1,0000
	EPst	0,17	244	1,0000
	EA	0,01	244	1,0000
	EH	3,21	244	1,0000
	Ic	19,26	244	0,0003
EPct	EPst	0,03	244	1,0000
	EA	0,01	244	1,0000
	EH	1,94	244	1,0000
	Ic	21,08	244	0,0001
EPst	EA	0,07	244	1,0000
	EH	1,68	244	1,0000
	Ic	20,68	244	0,0001
EA	EH	1,62	244	1,0000
	Ic	18,51	244	0,0004
EH	Ic	6,03	244	0,2220

Tabla 34. Comparaciones por parejas de la concentración plasmática de colesterol HDL.

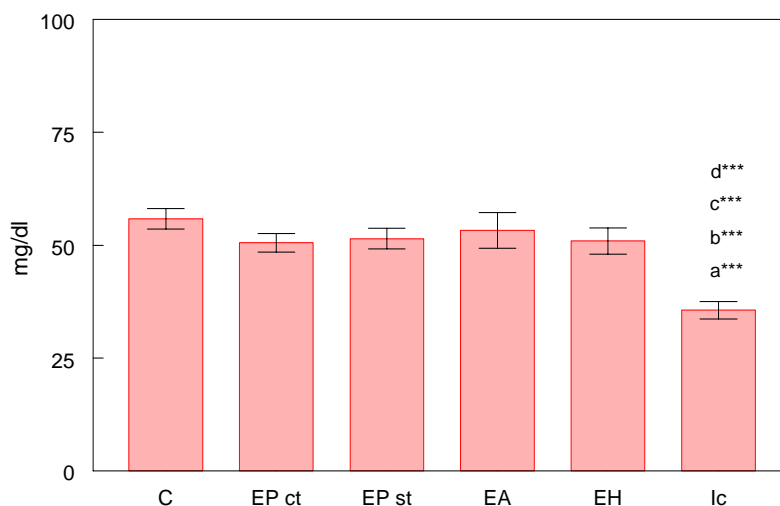


Figura 35. Concentración plasmática de colesterol HDL; **a:** diferencias respecto a C; **b:** diferencias respecto a EPct; **c:** diferencias respecto a EPst; **d:** diferencias respecto a EA; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como se observa en la figura 35, la concentración plasmática de colesterol HDL fue similar en todos los grupos de estudio, excepto en el grupo Ic que mostró una concentración plasmática más baja, existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo C y todos los demás grupos de pacientes, con excepción del grupo EH.

También se analizó si la concentración plasmática de colesterol HDL está relacionada con la edad y el sexo. Los resultados indican que hay diferencias entre hombres y mujeres, siendo mayor en mujeres, con una $F_{\text{exp}} = 15,17$ (1, 236) g.l., $p = 0,0001$. Además está relacionado con la edad de manera positiva, con una $F_{\text{exp}} = 15,17$ (1, 236) g.l., $p = 0,0226$.

4.7.1.4. Colesterol LDL

La concentración plasmática de colesterol LDL (expresado en mg/dl) de cada grupo se muestra en la tabla 35:

GRUPO	n	MEDIA	DESV. TIP.	ERROR TÍPICO
C	51	114,747	29,2881	4,1011
EPct	42	106,081	27,4642	4,2378
EPst	54	112,769	31,7204	4,3166
EA	28	111,361	24,5965	4,6483
EH	34	114,070	24,0670	4,1895
Ic	40	87,532	29,7727	4,7074

Tabla 35. Concentración plasmática de colesterol LDL en los grupos de estudio.

Ajustando por edad y sexo, existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{\text{exp}} = 3,45$ (5,236) g.l., $p < 0,0049$. Las comparaciones por parejas figuran en la tabla 36:

GRUPOS		F _{exp}	gl	p
C	EPct	0,64	244	1,0000
	EPst	0,10	244	1,0000
	EA	0,01	244	1,0000
	EH	0,01	244	1,0000
	Ic	12,66	244	0,0068
EPct	EPst	0,27	244	1,0000
	EA	0,37	244	1,0000
	EH	0,37	244	1,0000
	Ic	9,72	244	0,0308
EPst	EA	0,03	244	1,0000
	EH	0,03	244	1,0000
	Ic	13,70	244	0,0040
EA	EH	0,00	244	1,0000
	Ic	12,04	244	0,0093
EH	Ic	9,38	244	0,0366

Tabla 36. Comparaciones por parejas de la concentración plasmática de colesterol LDL.

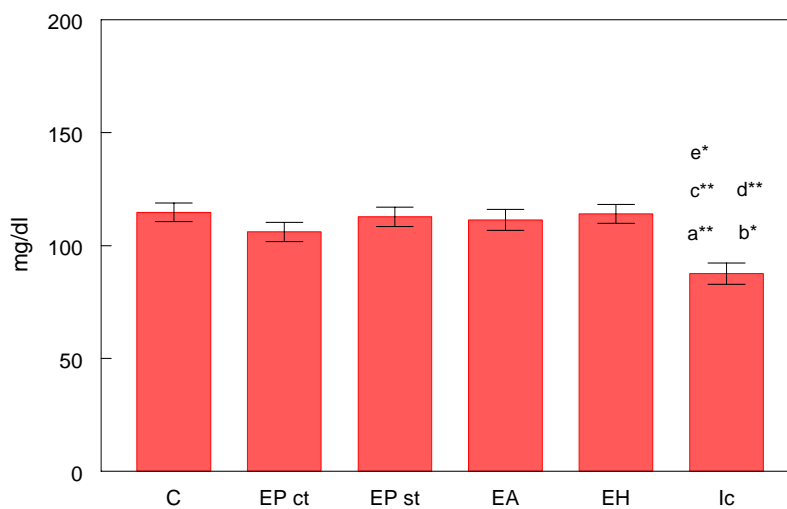


Figura 36. Concentración plasmática de colesterol LDL; **a:** diferencias respecto a C; **b:** diferencias respecto a EPct; **c:** diferencias respecto a EPst; **d:** diferencias respecto a EA; **e:** diferencias respecto a EH; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como se observa en la figura 36, la concentración plasmática de colesterol LDL fue similar en todos los grupos de estudio, excepto en el grupo Ic en el que se encontraron valores significativamente más bajos respecto a los demás grupos de estudio.

También se analizó si la concentración plasmática de colesterol LDL está relacionada con la edad y el sexo. Los resultados indican que no hay diferencias entre hombres y mujeres, con una $F_{\text{exp}} = 1,79$ (1, 236) g.l., $p = 0,1815$. Tampoco existe asociación con la edad, con una $F_{\text{exp}} = 1,79$ (1, 236) g.l., $p = 0,5201$.

En general, se puede hablar de una homogeneidad en las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos, colesterol HDL y colesterol LDL en todos los grupos analizados, excepto en el grupo Ic. Este último dato resulta llamativo dado que la mayoría de los casos son de origen aterotrombótico. Cuando se analizan los fármacos que consumen los individuos en el momento de extracción de la muestra, se observa que un 30 % consumen estatinas. Esto podría explicar la reducción de las concentraciones plasmáticas de colesterol (total, HDL y LDL). La siguiente tabla muestra la distribución del consumo de estatinas en el grupo Ic:

GRUPO	n	FÁRMACO	FREC.	% CASOS
NT	28	-	28	70
T	12	Atorvastatina	6	15
		Simvastatina	6	15

Tabla 37. Distribución del consumo de estatinas en el grupo Ic; NT: no toma; T: toma.

4.7.2. Concentración plasmática de lípidos peroxidados

La concentración plasmática de lípidos peroxidados (LPO) (expresados en nmol/ml) de cada grupo se muestra en la tabla 38:

LPO	GRUPO	n	MEDIA	DESV. TÍP.	ERROR TÍPICO
	C	47	266,378	179,0714	26,1202
	EPct	40	387,464	112,1262	17,7287
	EPst	53	367,261	121,2757	16,6584
	EA	28	132,792	52,5279	9,9268
	EH	32	414,818	196,8832	34,8040
	Ic	40	376,701	248,4190	39,2784

Tabla 38. Concentración plasmática de LPO en los grupos de estudio.

Ajustando por edad y sexo, existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{exp} = 12,59$ (5,229) g.l., $p < 0,0000$. Las comparaciones por parejas figuran en la tabla 39:

GRUPOS		F_{exp}	gl	p
C	EPct	25,57	244	0,0000
	EPst	21,58	244	0,0001
	EA	5,22	244	0,3491
	EH	15,36	244	0,0018
	Ic	12,12	244	0,0089
EPct	EPst	0,57	244	1,0000
	EA	49,43	244	0,0000
	EH	1,04	244	1,0000
	Ic	1,42	244	1,0000
EPst	EA	44,80	244	0,0000
	EH	0,18	244	1,0000
	Ic	0,26	244	1,0000
EA	EH	25,83	244	0,0000
	Ic	37,24	244	0,0000
EH	Ic	0,00	244	1,0000

Tabla 39. Comparaciones por parejas de la concentración plasmática de LPO.

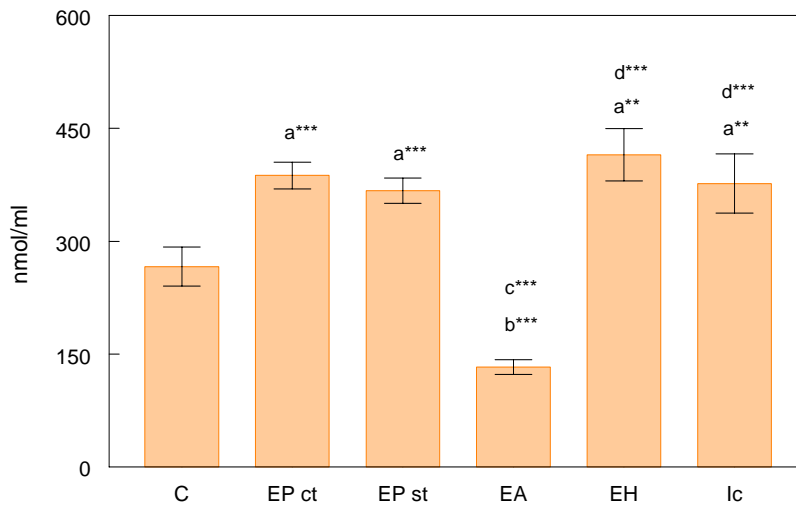


Figura 37. Concentración plasmática de LPO; **a:** diferencias respecto a C; **b:** diferencias respecto a EPct; **c:** diferencias respecto a EPst; **d:** diferencias respecto a EA; **e:** diferencias respecto a EH; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como se observa en la figura 37, la concentración plasmática de LPO fue más elevada en los grupos EPct, EPst, EH e Ic, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos anteriores y el grupo C. La concentración más baja se registró en el grupo EA, aunque las diferencias no fueron significativas respecto al grupo C. Dentro de los grupos de pacientes se encontraron diferencias significativas entre el grupo EA y los demás grupos de pacientes (EPct, EPst, EH e Ic).

Se analizó si la concentración plasmática de LPO está relacionada con la edad y el sexo. Los resultados indican que no hay diferencias entre hombres y mujeres, con una $F_{\text{exp}} = 0,25$ (1, 229) g.l., $p = 0,6164$. Tampoco existe asociación con la edad, con una $F_{\text{exp}} = 0,25$ (1, 229) g.l., $p = 0,0826$.

4.7.3. Concentración plasmática de ácido láctico

La concentración plasmática de ácido láctico (AL) (expresada en g/l) de cada grupo se muestra en la tabla 40:

	GRUPO	n	MEDIA	DESV. TÍP.	ERROR TÍPICO
AL	C	42	0,152	0,0570	0,0088
	EPct	39	0,222	0,0943	0,0151
	EPst	52	0,210	0,0768	0,0106
	EA	28	0,212	0,0813	0,0153
	EH	29	0,184	0,0554	0,0103
	Ic	40	0,255	0,1040	0,0164

Tabla 40. Concentración plasmática de AL en los grupos de estudio.

Ajustando por edad y sexo, existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{exp} = 3,88$ (5,219) g.l., $p < 0,0021$. Las comparaciones por parejas se muestran en la tabla 41:

GRUPOS		F_{exp}	gl	p
C	EPct	12,02	244	0,0095
	EPst	8,13	244	0,0715
	EA	5,64	244	0,2761
	EH	6,50	244	0,1722
	Ic	17,82	244	0,0005
EPct	EPst	0,78	244	1,0000
	EA	0,38	244	1,0000
	EH	0,66	244	1,0000
	Ic	1,64	244	1,0000
EPst	EA	0,02	244	1,0000
	EH	0,01	244	1,0000
	Ic	4,76	244	0,4540
EA	EH	0,04	244	1,0000
	Ic	3,34	244	1,0000
EH	Ic	3,02	244	1,0000

Tabla 41. Comparaciones por parejas de la concentración plasmática de AL.

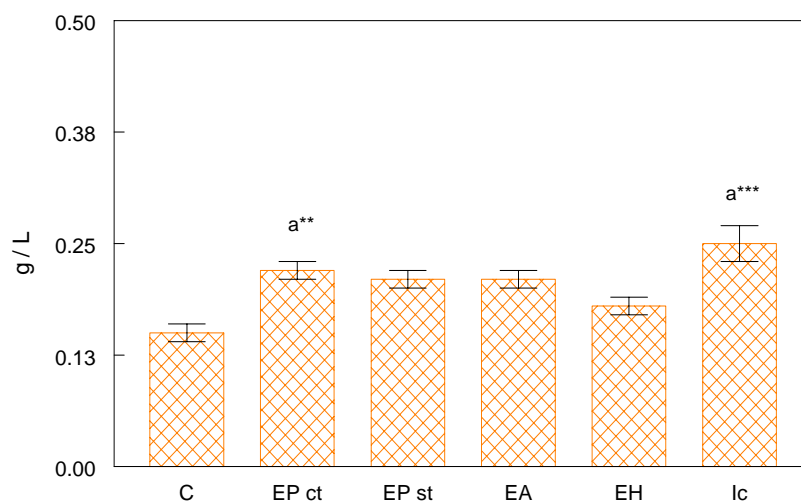


Figura 38. Concentración plasmática de AL; **a**: diferencias respecto a C; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como se aprecia en la figura 38 la concentración plasmática de AL fue más elevada en los grupos EPct e Ic respecto al grupo C, existiendo diferencias estadísticamente significativas. Entre los grupos de pacientes no se encontraron diferencias significativas. Se analizó si la concentración plasmática de AL está relacionada con la edad y el sexo. Los resultados indican que no hay diferencias entre hombres y mujeres, con una $F_{\text{exp}} = 1,30 (1, 219) \text{ g.l.}, p = 0,2550$. Tampoco existe asociación con la edad, con una $F_{\text{exp}} = 1,30 (1, 219) \text{ g.l.}, p = 0,2724$.

En general, las concentraciones plasmáticas de LPO y AL son mayores en todos los grupos de pacientes, excepto en el grupo EA, donde la concentración de LPO es menor que la del grupo C. La formación de LPO debería ser paralela a la formación de AL, reflejo de la disfunción mitocondrial; por tanto, el índice LPO/AL debería ser constante. Esto indicaría que la formación de LPO ocurre como consecuencia de un fallo mitocondrial. En la tabla 42 se muestra la relación LPO/AL de cada grupo:

LPO/AL	GRUPO	n	MEDIA	DESV. TÍP.	ERROR TÍPICO
	C	42	1906,091	1536,3580	252,5756
	EPct	39	2054,494	1000,1850	164,4293
	EPst	52	1995,926	947,2827	132,6461
	EA	28	719,855	400,8807	77,1495
	EH	29	2260,835	1031,0670	194,8533
	Ic	40	1784,178	1481,7000	237,261

Tabla 42. Índice LPO/AL en los grupos de estudio.

Ajustando por edad y sexo, existen diferencias significativas entre grupos, con una $F_{exp} = 4,80$ (5,218) g.l., $p < 0,0003$. Las comparaciones por parejas se muestran en la tabla 43:

GRUPOS		F_{exp}	gl	p
C	EPct	6,71	218	0,1538
	EPst	7,13	218	0,1224
	EA	8,42	218	0,0613
	EH	3,86	218	0,7619
	Ic	0,75	218	1,0000
EPct	EPst	0,01	218	1,0000
	EA	32,00	218	0,0000
	EH	0,31	218	1,0000
	Ic	2,86	218	1,0000
EPst	EA	34,21	218	0,0000
	EH	0,26	218	1,0000
	Ic	2,77	218	1,0000
EA	EH	17,67	218	0,0006
	Ic	28,23	218	0,0004
EH	Ic	0,67	218	1,0000

Tabla 43. Comparaciones por parejas del índice LPO/AL.

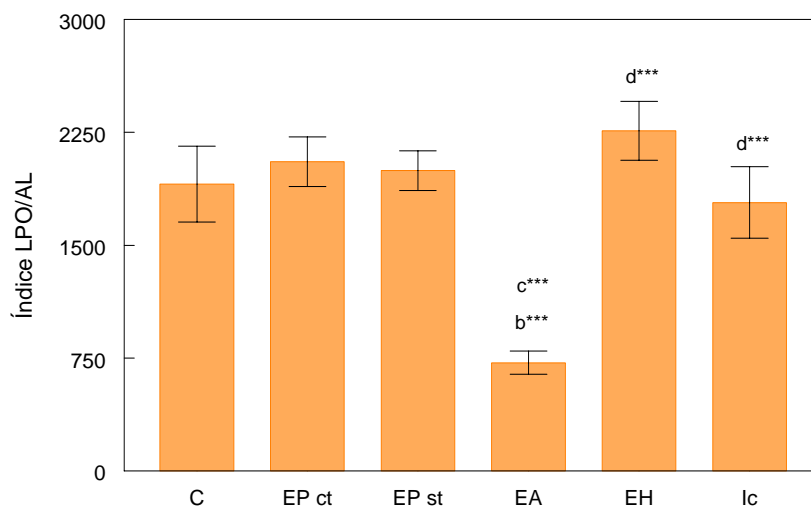


Figura 38. Índice LPO/AL; **b**: diferencias respecto a EPct; **c**: diferencias respecto a EPst; **d**: diferencias respecto a EA; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como se observa en la figura 38, el índice LPO/AL es similar en todos los grupos, excepto en el grupo EA donde es menor. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas respecto al grupo C. Dentro de los grupos de pacientes se encontraron diferencias significativas entre el grupo EA y todos los grupos.

4.8. RELACIÓN ENTRE EL ESTADO OXIDATIVO EN LOS GRUPOS EP CON Y SIN TRATAMIENTO Y LA TERAPIA ANTIPARKINSONIANA

Como se observa en las figuras 37 y 38, las concentraciones plasmáticas de LPO y AL son similares en los dos grupos de EP, EPct y EPst. A priori, el estado oxidativo de estos pacientes no se modifica por la terapia antiparkinsoniana, principalmente levodopa y carbidopa. No obstante, se ha analizado las concentraciones plasmáticas de LPO y AL bajo la influencia de los fármacos antiparkinsonianos de mayor consumo resumidos en la tabla 11.

4.8.1. Concentración plasmática de lípidos peroxidados

La concentración plasmática de lípidos peroxidados (LPO) (expresado en nmol/ml) de cada subgrupo (T: toma; NT: no toma) y para cada fármaco se muestra en la tabla 44:

FÁRMACO	GRUPO	n	MEDIA	DESV. TÍP.	ERROR TÍPICO	P
Levodopa	NT	68	384,679	117,5625	14,2565	0,2384
	T	25	352,210	115,3174	23,0634	
Carbidopa	NT	68	384,679	117,5625	14,2565	0,2384
	T	25	352,210	115,3174	23,0634	
Pramipexol	NT	78	382,763	116,9478	13,2417	0,2030
	T	15	340,528	116,1511	29,9900	
Entacapone	NT	82	380,930	114,0053	12,6008	0,2657
	T	11	338,834	138,7874	41,8459	
Cabergolina	NT	87	370,787	117,1537	12,5602	0,1061
	T	6	450,830	98,0993	40,0488	
Rasagilina	NT	89	378,0357	110,0355	11,6637	0,7261
	T	4	329,5675	251,8137	125,8137	
Selegilina	NT	88	373,425	118,2238	12,6037	0,3863
	T	5	420,398	97,2069	43,4722	

Tabla 44. Análisis estadístico de la concentración plasmática de LPO en el grupo EPct. Comparación entre los individuos que toman (T) y no toman (NT) el fármaco.

Como se observa en la tabla 44, no existen diferencias significativas en la concentración plasmática de LPO entre los subgrupos NT y T para cada fármaco.

4.8.2. Concentración plasmática de ácido láctico

La concentración plasmática de ácido láctico (AL) (expresado en g/l) de cada subgrupo (T: toma; NT: no toma) y para cada fármaco se muestra en la tabla 45:

FÁRMACO	GRUPO	n	MEDIA	DES. TÍP.	ERROR TÍPICO	P
Levodopa	NT	65	0,211	0,0757	0,0093	0,4856
	T	25	0,226	0,1042	0,0204	
Carbidopa	NT	65	0,211	0,0757	0,0093	0,4856
	T	25	0,226	0,1042	0,0204	
Pramipexol	NT	7	0,214	0,0866	0,0098	0,8605
	T	14	0,219	0,0747	0,0199	
Entacapone	NT	79	0,213	0,0820	0,0092	0,4605
	T	12	0,232	0,1017	0,0293	
Cabergolina	NT	85	0,212	0,0819	0,0088	0,8899
	T	6	0,256	0,1169	0,0477	
Rasagilina	NT	89	0,212	0,0855	0,0090	0,1397
	T	4	0,270	0,0751	0,0336	
Selegilina	NT	86	0,218	0,0855	0,0092	0,1456
	T	5	0,162	0,0402	0,0402	

Tabla 45. Análisis estadístico de la concentración plasmática de AL en el grupo EPct. Comparación entre los individuos que toman (T) y no toman (NT) el fármaco.

Como se observa en la tabla 45, no existen diferencias significativas en la concentración plasmática de AL entre los subgrupos NT y T para cada fármaco.

4.9. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

En este apartado se analiza la actividad AP en cada una de las enfermedades neurodegenerativas frente a los grupos C e Ic. Estos dos grupos se han utilizado como dos controles de estudio; el primero formado por individuos sanos y el segundo por individuos con enfermedad neurológica de carácter aguda y no degenerativa.

La media y error de las actividades AP de cada grupo y las diferencias entre medias son las mismas expuestas en el apartado 4.3. Por esta razón, en las siguientes tablas solo se muestran las comparaciones por parejas, ajustadas por edad y sexo.

4.9.1. Actividad alanina aminopeptidasa

GRUPOS		F_{exp}	gl	P
C	EPct	4,81	250	0,2635
	EPst	1,24	250	1,0000
	EA	0,98	250	1,0000
	EH	4,69	250	0,2812
	Ic	4,01	250	0,4180
Ic	EPct	0,00	250	1,0000
	EPst	10,78	250	0,0106
	EA	0,86	250	1,0000
	EH	0,01	250	1,0000

Tabla 46. Comparaciones por parejas de la actividad plasmática de la AlaAP entre los grupos C e Ic frente a las enfermedades neurodegenerativas.

Como se observa en la tabla 46, no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo C y los grupos de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, si existen diferencias significativas entre los grupos Ic y EPst.

4.9.2. Actividad cistina aminopeptidasa

GRUPOS		F_{exp}	gl	P
C	EPct	9,11	250	0,0253
	EPst	0,30	250	1,0000
	EA	0,00	250	1,0000
	EH	0,76	250	1,0000
	Ic	11,18	250	0,0086
Ic	EPct	0,50	250	1,0000
	EPst	18,03	250	0,0003
	EA	14,48	250	0,0074
	EH	5,33	250	0,1967

Tabla 47. Comparaciones por parejas de la actividad plasmática de la CysAP entre los grupos C e Ic frente a las enfermedades neurodegenerativas.

Como se observa en la tabla 47, existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo C y los grupos EPct e Ic. Además existen diferencias significativas entre el grupo Ic y los grupos EPst y EA.

4.9.3 Actividad aspartato aminopeptidasa

GRUPOS		F_{exp}	gl	P
C	EPct	5,60	250	0,1697
	EPst	7,40	250	0,0638
	EA	8,63	250	0,0332
	EH	9,80	250	0,0180
	Ic	12,30	250	0,0050
Ic	EPct	1,80	250	1,0000
	EPst	40,12	250	0,0000
	EA	42,40	250	0,0000
	EH	0,74	250	1,0000

Tabla 48. Comparaciones por parejas de la actividad plasmática de la AspAP entre los grupos C e Ic frente a las enfermedades neurodegenerativas.

Como se observa en la tabla 48, existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo C y los grupos EA, EH e Ic. Además existen diferencias significativas entre el grupo Ic y los grupos EPst y EA.

4.9.4. Actividad glutamato aminopeptidasa

GRUPOS		F _{exp}	gl	P
C	EPct	0,87	250	1,0000
	EPst	3,34	250	0,6207
	EA	3,27	250	0,6458
	EH	13,69	250	0,0024
	Ic	0,11	250	1,0000
Ic	EPct	1,59	250	1,0000
	EPst	1,80	250	1,0000
	EA	2,59	250	0,9783
	EH	10,12	250	0,0149

Tabla 49. Comparaciones por parejas de la actividad plasmática de la GluAP entre los grupos C e Ic frente a las enfermedades neurodegenerativas.

Como se observa en la tabla 49, existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos C y EH. Además existen diferencias significativas entre los grupos Ic y EH.

4.9.5. Actividad leucina aminopeptidasa

GRUPOS		F _{exp}	gl	P
C	EPct	4,08	250	0,4007
	EPst	3,35	250	0,6171
	EA	4,31	250	0,3502
	EH	4,33	250	0,3465
	Ic	6,89	250	0,0827
Ic	EPct	0,80	250	1,0000
	EPst	21,65	250	0,0000
	EA	23,47	250	0,0000
	EH	0,54	250	1,0000

Tabla 50. Comparaciones por parejas de la actividad plasmática de la LeuAP entre los grupos C e Ic frente a las enfermedades neurodegenerativas.

Como se observa en la tabla 50, no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo C y los grupos de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, existen diferencias significativas entre el grupo Ic y los grupos EPst y EA.

4.10. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LÍPIDOS PEROXIDADOS Y ÁCIDO LÁCTICO EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

En este apartado se analiza la concentración plasmática de lípidos peroxidados (LPO) y ácido láctico (AL) en cada una de las enfermedades neurodegenerativas frente a los grupos C e Ic.

La media y error de la concentración plasmática de LPO y AL de cada grupo y las diferencias entre medias son las mismas expuestas en el apartado 4.6. Por esta razón, en las siguientes tablas solo se muestran las comparaciones por parejas, ajustadas por edad y sexo.

4.10.1. Concentración plasmática de lípidos peroxidados

GRUPOS		F _{exp}	gl	P
C	EPct	25,57	250	0,0000
	EPst	21,58	250	0,0001
	EA	5,22	250	0,2094
	EH	15,36	250	0,0011
	Ic	12,12	250	0,0054
Ic	EPct	1,42	250	1,0000
	EPst	0,26	250	1,0000
	EA	37,24	250	0,0000
	EH	0,00	250	1,0000

Tabla 51. Comparaciones por parejas de la concentración plasmática de LPO entre los grupos C e Ic frente a las enfermedades neurodegenerativas.

Como se observa en la tabla 51, existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo C y los grupos EPct, EPst, EH e Ic. Además existen diferencias significativas entre los grupos Ic y EA.

4.10.2. Concentración plasmática de ácido láctico

GRUPOS		F _{exp}	gl	P
C	EPct	12,02	250	0,0057
	EPst	8,13	250	0,0429
	EA	5,64	250	0,1657
	EH	6,50	250	0,1033
	Ic	17,82	250	0,0003
Ic	EPct	1,64	250	1,0000
	EPst	4,76	250	0,2724
	EA	3,34	250	0,6213
	EH	3,02	250	0,7547

Tabla 52. Comparaciones por parejas de la concentración plasmática de AL entre los grupos C e Ic frente a las enfermedades neurodegenerativas.

Como se observa en la tabla 52, existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo C y los grupos EPct y EPst. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre el grupo Ic y los grupos de enfermedades neurodegenerativas.

Discusión

5. DISCUSIÓN

Antes de analizar los resultados obtenidos y dar respuesta a los objetivos principales planteados en esta tesis, es importante explicar las diferencias encontradas en los tamaños de muestra y distribución en edad y sexo de los grupos de estudio empleados.

La forma de elección de muestra de los grupos EP, EA, e Ic, fue en todo momento aleatoria, sin selección previa de los individuos, comprobando únicamente que cumplieran los criterios de inclusión propuestos en el apartado 3.1. Cada individuo acudió al hospital a causa de su patología, y fue derivado a la unidad de Neurología de Hospital Clínico “San Cecilio”. Una vez allí se le ofreció participar de forma voluntaria en el presente estudio. Tras obtener su consentimiento informado, se le tomó una muestra de sangre y se recopiló la información necesaria de su historia clínica. Por la baja frecuencia y la condición hereditaria de la enfermedad, la elección de muestra en el grupo EH se realizó por entrevista entre el neurólogo y el paciente, tras la localización de las familias afectadas en el área geográfica de Granada. Por último, el grupo C se recopiló con muestras de individuos sanos recogidos al azar.

El tamaño muestral en cada grupo ha venido condicionado principalmente por la forma de elección de muestra. La mayor frecuencia de consultas médicas o de ingresos hospitalarios en los grupos EP e Ic ha permitido obtener un número mayor de individuos. El grupo EH incluye prácticamente a todos los individuos afectados de la provincia de Granada. El grupo EA es el de menor tamaño, debido a que estos pacientes cuando llegan al hospital lo hacen por sufrir otras patologías no relacionadas con la enfermedad (enfermedades pulmonares, diabetes, etc.) con un tratamiento médico complejo, por lo que se descartaron del estudio.

La distribución en edad y sexo mostrada en el apartado 4.2 señala diferencias significativas solo para la variable edad. Sin embargo, aunque no se encontraron diferencias de sexo entre grupos, se puede observar tres grupos con porcentajes diferentes de mujeres: 1) grupos Ic y EPct, con un porcentaje de mujeres en torno al 33%; 2) grupos C y EPst, con un porcentaje en torno al 50%; y grupos EA y EH, con un porcentaje en torno al 60%. Los estudios epidemiológicos no indican predisposición ligada al sexo para la EP y la EH (Jiménez-Jiménez et al., 1998; Calopa et al., 1998).

Para la EA, si se ha observado una mayor incidencia en mujeres (López-Pousa, 2002), y de hombres en el caso de Ic, aunque este dato se invierte a partir de los 80 años a favor de las mujeres (Barrero et al., 2001). En cuanto a la edad, las diferencias encontradas quedan justificadas por la edad de inicio propia de cada enfermedad. Se distinguen igualmente tres grupos: 1) grupo de edad media inferior, formado además del grupo C por el EH; 2) grupo de edad intermedia, formado por los grupos EPct y EPst; y 3) grupo de mayor edad, formado por los grupos EA e Ic. La EP es una enfermedad que suele aparecer en la sexta década de la vida (Jiménez-Jiménez et al., 1998). La edad media de aparición de la EA en los casos esporádicos es más elevada, superior a los 65 años (López-Pousa, 2002). Lo mismo ocurre para el grupo Ic, que se estima alrededor de los 70 años (Barrero et al., 2001). La EH, sin embargo, suele aparecer antes de los 50 años, e incluso entre los 20-30 años en los casos juveniles de la enfermedad (Calopa et al., 1998). Por tanto, la edad media en todos los grupos de pacientes se corresponden con los valores esperados. El grupo C muestra una media de edad más baja y un valor de varianza más elevado. Ambos resultados derivan del método de elección de individuos. Con el paso del tiempo, las enfermedades crónicas se hacen más frecuentes, por lo que es difícil encontrar personas de edad avanzada que no estén tomando antihipertensivos, antidiabéticos, analgésicos, etc. Además, se ha querido incluir en el grupo una muestra de individuos que abarcara el rango de edades descrito para las enfermedades citadas, que da como resultado una mayor varianza.

A continuación, se presenta un breve análisis de los resultados más importantes de esta tesis, centrándose en principio en la EP.

En relación a uno de nuestros objetivos principales, analizamos la importancia de las actividades AP en la fisiopatología de la EP. En el grupo EPct, la actividad AP fue similar a los controles, solo se encontró una disminución significativa en la actividad CysAP ($P < 0,05$). La penalización en el estudio estadístico por las diferencias muestrales, y el control en edad y sexo, ha podido rebajar la significación de estos resultados, lo que es manifiesto en las comparaciones del grupo C y EPct con otros grupos. Así por ejemplo, el grupo EPst presentó diferencias significativas respecto al grupo EPct y no frente al grupo C, a pesar de que las medias de estos dos últimos grupos fueron muy parecidas. Banegas y cols. (2006a), describieron también un descenso de la actividad plasmática de la CysAP, aunque también en la AspAP y GluAP

en pacientes con EPct. Las diferencias entre este estudio y el nuestro pueden deberse en parte al diferente tratamiento de los pacientes. Pero sin duda, los resultados más llamativos fueron los encontrados en el grupo EPst, con mayor actividad en cuatro de las cinco APs analizadas comparado con el grupo EPct, existiendo diferencias significativas en todas ellas a excepción de la GluAP, y demostrando así que sus actividades se modifican con el tratamiento.

Otro marcador de estrés proteico de la EP son los agregados de α -sinucleína. Esta α -sinucleína se metaboliza parcialmente, pasa a líquido cefalorraquídeo y después a la sangre. Cuando se analizó la concentración plasmática en los grupos EPct, EPst y C, se encontraron concentraciones mayores en los dos grupos de EP comparados con el grupo C, con diferencias significativas ($P < 0,05$ para ambos grupos). Estos resultados fueron similares a los encontrados por El-Agnaf y cols. (2006) y Lee y cols. (2006a) en plasma de pacientes con EP; sin embargo, hasta el momento no se había analizado la concentración de estos agregados en enfermos recién diagnosticados, sin tratamiento. Esta observación sugiere que la α -sinucleína puede utilizarse para el diagnóstico de la EP. Por otro lado, no encontramos diferencias en la concentración de α -sinucleína entre el grupo EPst con el grupo EPct. Nuestros resultados sugieren que la alteración del metabolismo de la α -sinucleína no se modifica por el tratamiento antiparkinsoniano. La concentración de α -sinucleína en plasma tampoco varía con la progresión de la EP. En los últimos años se ha propuesto un fallo en los procesos de degradación como responsable del estrés proteolítico característico de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas (Saïdo, 1998). En este sentido, los cuerpos de Lewy se consideran como los marcadores intracelulares patológicos característicos de la enfermedad. Sin embargo, recientemente se les está otorgando un papel protector, almacenando las especies oligoméricas de la α -sinucleína más citotóxicas y resistentes a la degradación (Lee et al., 2006c). Esta idea también se traslada a los agregados de otras enfermedades neurodegenerativas, como los cuerpos de inclusión en la EH (Arrasate et al., 2004). Por tanto, más que hablar de un mecanismo patogénico común se podría hablar de una estrategia general adoptada por las neuronas para aumentar la supervivencia celular.

Debido a que la α -sinucleína podría ser metabolizada por las APs, se analizó la correlación entre las actividades APs y la concentración de α -sinucleína plasmática, pero no se observó ninguna correlación.

En la actualidad no existe tratamiento curativo de la EP, solo paliativo. El tratamiento es en gran parte sintomático, mejorando la sintomatología motora característica de estos pacientes. Probablemente, un tratamiento curativo de la EP debería incluir también fármacos que mejoraran el metabolismo proteico, especialmente en lo referente a la α -sinucleína.

Por último, analizamos la importancia de los fenómenos de disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en la EP. En un trabajo previo publicado por nuestro grupo, demostramos la existencia de estrés oxidativo en la EP, medido como concentración plasmática de LPO, siendo mayor en los pacientes con EP comparados con el grupo C (Agil et al., 2006). Como se muestra la Figura 37, la concentración de LPO es superior en el grupo EPst, respecto al grupo C ($P < 0,001$). En el grupo EPct la concentración plasmática de LPO también fue mayor que en el grupo C, siendo la diferencia fuertemente significativa ($P < 0,001$). Sin embargo, los valores de LPO fueron muy similares en los dos grupos de EP. Estos resultados sugieren que el daño oxidativo es importante desde un estadio temprano de la enfermedad y que el tratamiento que actualmente se aplica en los pacientes con EP no mejora el estrés oxidativo, siendo esta una de las posibles causas de porqué la enfermedad progresa a pesar de la medicación. Nuestros resultados coinciden en este punto con los de la mayoría de los autores. Dexter y cols. (1994) encontraron una menor concentración de glutatión reducido en la SNpc de pacientes asintomáticos con EP comparados con sujetos sanos, proponiendo que el daño oxidativo era anterior a la pérdida neuronal. Por otro lado, la similitud en la concentración de LPO en ambos grupos de EP, indicaría que la terapia antiparkinsoniana, principalmente levodopa, no incrementa la formación de radicales libres, resultados similares a los encontrados por Prigione y cols. (2006).

Además de la LPO, también se determinó la concentración de lactato (AL) como marcador de disfunción mitocondrial. Diferentes trabajos han relacionado la producción de AL con disfunción mitocondrial en enfermedades neurodegenerativas. Martin y cols., (2007) detectaron concentraciones elevadas de AL en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EH, asociado a un déficit energético ocasionado por un fallo mitocondrial. Cuando se analizó la concentración de AL en los grupos EPst y EPct, se observaron concentraciones más elevadas en ambos grupos respecto al grupo C, aunque solo hubo

diferencias significativas en el grupo EPct ($P < 0,01$). Tanto la producción de LA como los LPO son índices de un malfuncionamiento mitocondrial, por lo que ambos valores deberían modificarse en paralelo. Para comprobar si nuestros valores eran correctos, se calculó el cociente LPO/AL y se obtuvo un valor prácticamente constante en los tres grupos (C, EPct y EPst), como muestra la Figura 38. Estos resultados corroboran aún más el daño mitocondrial que subyace en la EP.

5.1. SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO

Cuando se analizó la actividad plasmática de la AlaAP en el grupo C respecto a los grupos de pacientes, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo es interesante destacar la diferencia de actividad entre los dos grupos de EP, con un descenso significativo en el grupo EPct ($P < 0,05$). También se observó un descenso de actividad en el grupo Ic, con diferencias significativas respecto al grupo EPst ($P < 0,05$). De manera general se puede distinguir dos grandes grupos, uno de mayor actividad formado a su vez por los grupos EPst y EA, y otro de menor actividad formado por los grupos C, EPct, EH e Ic, con diferencias significativas entre ellos ($P < 0,01$).

Para la CysAP, la actividad más baja se detectó en los grupos EPct e Ic, encontrándose diferencias significativas respecto al grupo C ($P < 0,05$, para ambos grupos). Dentro de los grupos de pacientes las actividades más elevadas se encontraron en los grupos EPst y EA. Como en la AP anterior, destaca la diferencia de actividad entre los dos grupos de EP, con un descenso significativo en el grupo EPct ($P < 0,01$). También se encontraron diferencias entre los grupos EPst e Ic ($P < 0,001$) y los grupos EA e Ic ($P < 0,05$). Al igual que con la AP anterior se puede distinguir dos grandes grupos, uno de mayor actividad formado a su vez por los grupos EPst y EA, y otro de menor actividad formado por los grupos C, EPct, EH e Ic, con diferencias significativas entre ellos ($P < 0,01$).

Cuando se analizó la actividad plasmática de la AspAP, las actividades más bajas se encontraron en los grupos EH e Ic, con diferencias significativas respecto al grupo C ($P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente). Dentro de los grupos de pacientes, las actividades más elevadas se encontraron en los grupos EPst y EA. Destaca la diferencia de actividad

entre los dos grupos de EP, con un descenso significativo en el grupo EPct ($P < 0,001$). También se encontraron diferencias entre los grupos EPct y EA ($P < 0,001$); el grupo EPst y los grupos EH e Ic ($P < 0,001$ para ambos grupos); y el grupo EA y los grupos EH e Ic ($P < 0,001$ y $P < 0,05$, respectivamente).

Para la GluAP, la actividad más baja se detectó en el grupo EH, encontrándose diferencias significativas respecto a grupo C ($P < 0,01$). Dentro de los grupos de pacientes, las actividades más elevadas se volvieron a encontrar en los grupos EPst y EA. Aunque también se detectó una menor actividad en el grupo EPct respecto al grupo EPst, las diferencias no fueron significativas. Sí se encontraron diferencias significativas entre los grupos EPst y EH ($P < 0,001$), los grupos EA y EH ($P < 0,001$) y los grupos EH e Ic ($P < 0,05$).

Por último, cuando se analizó la actividad plasmática de la LeuAP en el grupo C respecto a los grupos de pacientes, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, dentro de los grupos de pacientes, destaca la diferencia de actividad entre los grupos de EP, con un descenso significativo en el grupo EPct ($P < 0,01$). La actividad más elevada se detectó en el grupo EA, con diferencias significativas respecto al grupo EPct ($P < 0,01$). Las actividades más bajas correspondieron a los grupos EH e Ic, con diferencias significativas respecto a los grupos EPst ($P < 0,01$ y $P < 0,001$, respectivamente) y EA ($P < 0,05$ y $P < 0,001$, respectivamente).

Primero, el grupo de EA tuvo un incremento en la actividad de todas las APs analizadas respecto al grupo EPct, si bien estos incrementos fueron significativos solo en la AspAP y Leu AP. Creemos que no hubo diferencias significativas respecto al grupo control (con medias muy parecidas al grupo EPct) debido a que el grupo control estaba formado por sujetos de edad muy variable, lo que penalizó fuertemente la significación. Es interesante observar que las actividades de las APs fueron similares en los grupos EA y EPst, es decir, que estas dos enfermedades neurodegenerativas sin tratamiento específico, tuvieron actividad de las APs es similar. En el grupo de EH, la actividad de las APs disminuyó respecto a los controles, siendo este descenso muy destacado y significativo en los casos de la Asp- y GluAP. En el grupo EH, el patrón de actividades fue muy diferente a las anteriores (EA y EPst), siendo sin embargo parecido al EPct, con el que en ningún caso tuvo diferencias significativas. En el grupo Ic el patrón de

actividad fue diferente a los demás, y se encontró un descenso de actividad en la Cys- y AspAP respecto al grupo control. Las mayores diferencias se encontraron al comparar el grupo Ic respecto a los grupos EA y EPst. De manera general se puede distinguir dos grandes grupos, uno de mayor actividad formado a su vez por los grupos EPst y EA, y otro de menor actividad formado por los grupos C, EPct, EH e Ic, con diferencias significativas entre ellos ($P < 0,01$). El ictus se utilizó como un segundo control, ya que es una enfermedad aguda no degenerativa.

En relación a nuestro objetivo, analizamos la importancia de las actividades de las APs en la fisiopatología de la EP. Sin duda, los resultados más llamativos fueron los encontrados en el grupo EPst, con mayor actividad en las cinco APs analizadas comparado con el grupo EPct, existiendo diferencias significativas en todas ellas a excepción de la GluAP, demostrando así que sus actividades se modifican con la enfermedad. Por el contrario, dentro del grupo EPct, la actividad AP fue similar a la del grupo C. Sólo se encontró una disminución significativa en la actividad CysAP ($P < 0,05$). Como se observa en las figuras 9, 10, 11, 12 y 13, el tratamiento específico que se administró a los pacientes con EP normalizó los valores de las distintas actividades de APs, a excepción de la ya citada CysAP. En otras palabras -y este ha sido uno de los hallazgos más interesantes del trabajo- la EP produce un incremento en la actividad de las APs, probablemente a consecuencia del estrés proteico característico de esta enfermedad. La medicación antiparkinsoniana no solo mejoró la sintomatología motora de los pacientes, sino que también normalizó la actividad de las APs. Banegas y cols. (2006a), describieron también un descenso de la actividad plasmática de la CysAP, además de la AspAP y GluAP en pacientes que equivaldrían al EPct. Parece que la actividad CysAP es más sensible al tratamiento que las demás enzimas, y las diferencias entre nuestros resultados y los de estos autores pueden deberse a que el tratamiento antiparkinsoniano fuera diferente, por lo que los resultados no son totalmente comparables.

De estos resultados se puede deducir que las actividades APs varían en las distintas enfermedades neurodegenerativas estudiadas y en el ictus isquémico respecto a individuos sanos. Hasta el momento, en nuestro grupo, habíamos demostrado la alteración de las APs en la EP, tanto en modelos experimentales de Parkinson, como en plasma de pacientes. Banegas y cols. (2005) detectaron menor actividad AP en estriado,

SN y corteza prefrontal de ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA. Posteriormente, encontraron resultados similares en plasma de pacientes con EP (Banegas et al., 2006a). Sin embargo, aunque los resultados de esta tesis mostraron menor actividad en el grupo EPct respecto al grupo C en tres de las cinco actividades APs analizadas, solo se encontraron diferencias significativas para la actividad de la CysAP. No obstante, lo más significativo del estudio es la diferencia de actividad AP encontrada entre los dos grupos de EP, con menor actividad en el grupo EPct. Este descenso de actividad podría deberse a lo que se ha explicado anteriormente, que el tratamiento mejora la sintomatología motora y también normaliza la actividad de las APs. Pero también podría estar relacionado con la depleción dopaminérgica que va agravándose con la progresión de la enfermedad. La DA coexiste con algunos péptidos que son también sustratos de las APs como son las colecistocininas, las angiotensinas y las encefalinas en las terminales sinápticas de las neuronas DA. Aunque se desconoce la importancia funcional de estos neuropéptidos en la neurotransmisión, parece que son necesarios para que se lleve a cabo correctamente. Recientemente, Cicin-Sain y cols. (2008) señalaron la importancia de las APs en la interacción entre determinados neuropéptidos y el neurotransmisor serotonina en las sinapsis serotoninérgicas en cerebro de rata, encontrando una relación inversa entre los animales que sobre expresaban serotonina y la actividad de las APs citosólicas, principalmente la de la AlaAP. La detección de una mayor actividad serotoninérgica en individuos que padecen autismo, junto con un aumento en la concentración de péptidos opioides, probablemente debido a un descenso de las actividades peptidasas, relaciona las APs con la fisiopatología de una enfermedad neurológica en la que también existe alteración de un neurotransmisor (Shattock et al., 2002).

La muerte de las neuronas dopaminérgicas no solo conlleva la disfunción motora característica de la EP. También es frecuente la aparición de alteraciones autónomas, especialmente relacionadas con el sistema nervioso simpático, y alteraciones neuroendocrinas. Verbaan y cols. (2007) evaluaron los síntomas y signos no motores de la enfermedad en pacientes con EP, destacando las alteraciones gastrointestinales, sialorrea, estreñimiento, y problemas relacionados con la deglución como las más frecuentes, seguidas de alteraciones urinarias como incontinencia urinaria o nicturia, alteraciones cardiovasculares o problemas en la termorregulación. Por otra parte, Li y cols. (2002a) determinaron una disminución progresiva de la inervación simpática

cardiaca en pacientes con EP. Estos resultados sugieren que en la EP la neurodegeneración no se limita al sistema nigroestriatal, sino que además se extiende al sistema autónomo. El descenso de actividad AP en el grupo EPct podría estar relacionado con esta reducción de la actividad simpática, ya que muchos neuropéptidos, sustratos de las APs, coexisten también con la DA y la acetilcolina (ACh) en las terminales nerviosas y ganglios autónomos.

Además de las alteraciones en el sistema autónomo, también se han detectado alteraciones neuroendocrinas. La reducción de DA en el hipotálamo de pacientes con EP hizo pensar en una afectación del eje hipotalámico-hipofisario. Muchos estudios han demostrado irregularidades en la secreción de hormonas en la EP, entre ellas, reducciones de la secreción de somatostatina y β -endorfinas en líquido cefalorraquídeo, Met-enkefalinas en mesencéfalo, putamen y globo pálido, y Leu-enkefalinas en estriado de pacientes con EP (Sandyk et al., 1987). Thannickal y cols. (2007) describieron reducciones del 23-62% en el número de neuronas secretoras de hipocretina u orexina (Hcr) y del 12-74% en el número de neuronas secretoras de hormona concentrada de melanina (MCH), en las regiones dorsomedial y perifornical del hipotálamo en pacientes con EP. Además, comprobaron que las reducciones incrementaban con la progresión de la enfermedad y propusieron esta muerte neuronal como una posible causa de las alteraciones del sueño asociadas con la EP. Por otra parte, Schaefer y cols. (2008) demostraron que la terapia dopaminérgica en pacientes con EP podía afectar la función hipofisaria, concretamente disminuyendo la secreción de prolactina y aumentando la de hormona del crecimiento (GH). Estas concentraciones, sin embargo, no se veían alteradas en pacientes *de novo*. Como se ha dicho, muchas de estas hormonas peptídicas son sustratos de las APs (Hui, 2007). Las enkefalinas son inactivadas rápidamente tras su unión a los receptores opioides por hidrólisis de su extremo NH₂-terminal. Por su amplia distribución tanto en SNC como periférico, la alanina aminopeptidasa citosólica (también llamada aminopeptidasa sensible a puromicina o PSA) parece ser la enzima candidata. También está implicada en la inactivación de dinorfinas, colecistokininas, y somatostatina (Hui, 2007). Las APs juegan además un papel importante en la regulación de algunas hormonas circulantes relacionadas con el control de la presión arterial y la función renal como son la Ang II, la Ang IV, la oxitocina y la vasopresina (Banegas et al., 2006b; Speth et al., 2008). En los últimos años, se le han atribuido otras funciones en el SNC. La Ang IV promueve la

liberación de DA en el estriado de ratas, probablemente a través de su unión al receptor IRAP (Stragier et al., 2007). También potencia la transmisión colinérgica en hipocampo y otras áreas relacionadas con la memoria y funciones cognitivas (Albiston et al., 2003; Albiston et al., 2004). Recientemente, Rodríguez-Pallares y cols. (2008) sugirieron la implicación del sistema RAS en la degeneración de las neuronas DA y en la progresión de la EP. La Ang II, vía receptores AT1, actuaría como una molécula pro-inflamatoria estimulando la producción de ROS a través de la activación de la enzima mitocondrial NADPH oxidasa y la liberación de citoquinas y quemoquinas que contribuirían a la migración de células inflamatorias al lugar de lesión. Otros autores le han otorgado un papel protector disminuyendo la citotoxicidad de la α -sinucleína y la agregación *in vitro*. Sin embargo, este papel parece no estar mediado por receptores AT1 y AT2, ya que se mantenía el efecto, e incluso aumentaba, cuando se empleaban antagonistas de ambos receptores (Grammatopoulos et al., 2007).

Todos estos datos apoyan la implicación de las APs en la fisiopatología de la EP. El descenso de actividad que experimenta el grupo EPct puede ser responsable de las alteraciones del sistema autónomo y neuroendocrino que tiene lugar con la progresión de la enfermedad, pudiendo tener valor diagnóstico. Además de los análisis de actividad plasmática, la identificación y el aislamiento de cada AP por técnicas electroforéticas completan el estudio. Aunque es necesario aumentar el número de muestras analizadas y completar los grupos, los resultados de PAGE nativa refuerzan los obtenidos en plasma por técnicas fluorimétricas. La técnica es válida para el análisis de APs plasmáticas con la ventaja adicional de poder identificar la isoenzima específica responsable de la actividad. Sin embargo, mediante SDS-PAGE/Inmunoblot solo se consigue un análisis cualitativo del enzima.

La EH y a la EA, aunque tienen una etiología diferente, presentan alteraciones bioquímicas similares a la EP. Este hecho nos llevó a analizar el papel de las APs en otras enfermedades neurodegenerativas. Para la EH se observó también un descenso general de la actividad AP. Esta reducción podría ser indicativa de la muerte neuronal progresiva en el estriado, sin embargo no hemos analizado las posibles diferencias respecto a pacientes *de novo*. También, como en el caso de la EP, en la EH puede haber alteraciones en el sistema nervioso periférico y en el autónomo que sean la causa de las alteraciones en la actividad de las APs plasmáticas. Al igual que en la EP, también

ocurren alteraciones hipotalámicas y neuroendocrinas. Diferentes estudios neuropatológicos han descrito atrofia hipotalámica en estadios tempranos de la enfermedad, con pérdidas en el número de neuronas que contienen somatostatina y orexina. También se han descrito concentraciones más bajas de prolactina y testosterona en pacientes con EH (Petersén et al., 2006). Es posible, por tanto, que como las APs participan en el metabolismo de muchas de estas hormonas peptídicas, estén implicadas en la fisiopatología de la enfermedad. Por otra parte, la formación de los IBs en las neuronas estriatales se ha relacionado con una disminución de los procesos catabólicos en lo que se conoce como estrés proteolítico. Las proteínas son degradadas inicialmente por el proteosoma. Sin embargo la htt mutada ofrece una alta resistencia a su degradación, dando lugar a fragmentos de mayor tamaño que han de ser hidrolizados posteriormente por peptidasas lisosomales y citosólicas (Kim et al., 2006). Muchos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la toxicidad de la htt tiene lugar por pequeños fragmentos procedentes del extremo N-terminal que no son degradados e interfieren en la función de otras proteínas (Hook, 2006). Recientemente, Bhutani y cols. (2007) identificaron a la alanina aminopeptidasa como la principal peptidasa citosólica responsable de degradar las secuencias poli-Q procedentes del proteosoma, confiriéndole un papel protector en la neurodegeneración. La menor actividad AP encontrada en el grupo EH podría responder al estrés proteolítico que caracteriza a la enfermedad y colaborar con la neurotoxicidad ocasionada por los fragmentos de la htt. Aunque hay que realizar un análisis más exhaustivo, la importancia de estos resultados señala a las APs como futuras dianas terapéuticas.

En cuanto al grupo EA, se observó un aumento global de la actividad AP, aunque sin diferencias significativas respecto al grupo C. Estos resultados contrastan con los obtenidos para los grupos EPct y EH, donde las actividades fueron menores. Sin embargo se asemejan a los del grupo EPst. No obstante hay que considerar que son individuos con varios años de evolución de la enfermedad; que están sometidos a tratamientos muy variados; y sobre todo que son el grupo de edad más avanzada. Cuando se analizó si existía asociación entre la edad y la actividad AP, se encontró que era positiva para la AlaAP ($P < 0,01$) y la GluAP ($P < 0,05$). Esta relación podría ser responsable en parte de la elevada actividad AP en el grupo EA, aunque deberían considerarse otras variables como el tratamiento, la duración de la enfermedad o el grado de demencia. En los últimos años, diferentes trabajos han relacionado la

formación de los agregados amiloideos y de proteína tau con una reducción en el catabolismo proteico, en los casos esporádicos de la EA. Saido y cols. (1995) analizaron *in vitro* las secuencias terminales del péptido A β en las placas seniles, y determinaron la participación de dos grupos de enzimas en su proteolisis: por un lado la mediada por endopeptidasas, y por otro la de carboxi- y aminopeptidasas. En estudios posteriores, encontraron una gran heterogeneidad en las secuencias N-terminal de los péptidos A β sometidos a proteolisis, y propusieron a las APs como enzimas claves en la degradación y limitantes de la formación de los agregados proteicos (Saido et al., 1996). Un año más tarde, Kuda y cols. (1997) detectaron una actividad reducida de la GluAP frente a otras APs analizadas, en plasma de pacientes con EA. Además, encontraron una relación inversa entre la concentración del péptido A β_{42} , una de las especies más patogénicas, y la actividad de esta enzima en corteza cerebral de individuos seniles sin demencia. Recientemente, además del péptido A β , se ha identificado la proteína tau como otro sustrato de las APs. Sengupta y cols. (2006) demostraron la degradación *in vitro* de tau por la alanina aminopeptidasa citosólica o PSA. En el mismo año, Karsten y cols. (2006) determinaron una mayor expresión de esta enzima en cerebelo de ratones transgénicos que expresaban el gen humano mutante tau^{P301L}. Cuando analizaron otras zonas cerebrales como corteza prefrontal la expresión era más baja, y coincidía con un aumento en la inmunoreactividad por tau. Estos resultados también lo obtuvieron en tejido cortical de pacientes con EA y demencia frontotemporal (FTD), coincidiendo las zonas de mayor expresión de la enzima con las áreas menos afectadas, y al contrario, las de menor expresión con las áreas más afectadas. En base a estos descubrimientos, propusieron que la mayor expresión de la PSA en determinadas áreas cerebrales podía ser un mecanismo compensatorio adoptado por las neuronas supervivientes tras un periodo largo de la enfermedad, destacando su papel protector en la neurodegeneración. Es posible que la elevada actividad AP encontrada en la EA, en la que todos los individuos llevan varios años de evolución, se deba a este hecho, y que la diferencia de actividad encontrada en este grupo frente a la obtenida en la EPct y la EH, que a priori las hemos considerado a nivel molecular como similares, sea producto de la duración de la enfermedad hasta el momento de la toma de muestras.

Por otra parte, con la identificación del receptor de la Ang IV como la CysAP (Albiston et al., 2001) y su papel en áreas cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria, se comenzó a relacionar las APs con aquellas enfermedades en las que había deterioro

cognitivo, entre ellas la EA. La CysAP (o receptor AT₄) se expresa con intensidad en las regiones CA1-CA3 del hipocampo, que comprenden neuronas colinérgicas y sus proyecciones (Albisoton et al., 2003). Como se ha descrito en el apartado 1.3.3, la Ang IV al unirse a la CysAP bloquea el sitio activo de la enzima e inhibe su actividad catalítica, impidiendo así la degradación de neuropéptidos que potencian la memoria, como la vasopresina, la oxitocina y la colecistokinina-8. Además, puede hidrolizar la Ang IV regulando la disponibilidad de su propio ligando. Aunque se desconoce la función exacta de estos neuropéptidos, parece que son necesarios en varias sinapsis, incluyendo las colinérgicas. En relación a este papel regulador, la mayor actividad AP encontrada en la EA podría estar implicada en el desarrollo del déficit cognitivo y la demencia que la caracteriza, afectando a la concentración final de Ang IV, vasopresina, oxitocina y colecistokinina-8. Sin embargo, a pesar de la importancia potencial de estos resultados a nivel terapéutico, en este aspecto este estudio está en fase inicial, por lo que ha de ser completado.

Por último, el grupo Ic mostró mayor heterogeneidad en las distintas actividades AP estudiadas con respecto al grupo C. La actividad de la AlaAP fue similar en ambos grupos; la de la GluAP mayor en el grupo Ic, pero sin diferencias significativas; y las de la LeuAP, CysAP y AspAP menor en el grupo Ic, con diferencias significativas en las dos últimas. Estos resultados no muestran un patrón común de actividad AP como los observados para las tres enfermedades neurodegenerativas analizadas en los párrafos anteriores. Esta diferencia podrían deberse a las características propias de la enfermedad. Cuando tiene lugar el episodio isquémico, las neuronas afectadas mueren principalmente por necrosis. La magnitud del daño neuronal que se ocasiona va a depender de la duración y de la región afectada. Si bien los individuos que forman el grupo Ic pertenecen a dos únicas variedades de ictus de topografía cortical o subcortical (origen aterotrombótico y cardioembólico), las regiones afectadas pueden variar de unos sujetos a otros. Sin embargo, esto no ocurre en las enfermedades neurodegenerativas, donde en todos los pacientes el área afectada es similar (SN y estriado en la EP; estriado en la EH; y corteza e hipocampo en la EA). Es posible que las actividades AP encontradas en Ic respondan a esta variabilidad o bien a otras lesiones que acompañan al ictus.

5.2. SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA Y EL TRATAMIENTO ANTIPARKINSONIANO EN EL GRUPO EPct

El análisis de la actividad AP en los grupos EPst y EPct nos ha permitido evaluar el estado de estas enzimas en un estadio temprano de la enfermedad y después de más de un año de evolución. El descenso de actividad AP encontrado en el grupo EPct podría estar relacionado con la depleción dopaminérgica que tiene lugar con la progresión de la enfermedad, junto con la reducción de la actividad simpática y la disfunción neuroendocrina. Por otra parte, es posible también que el tratamiento antiparkinsoniano actúe normalizando el incremento de la actividad AP encontrado en los pacientes *de novo*. Analizando individualmente la influencia de cada fármaco dentro del grupo EPct, la actividad AP no fue modificada por el tratamiento con levodopa y carbidopa. Tampoco por el agonista dopaminérgico pramipexol y el inhibidor de la COMT entacapone. Sin embargo, si se vio afectada por los inhibidores de la MAO-B selegilina y rasagilina, concretamente las actividades de la AspAP y LeuAP para el primero, y las de la AspAP, GluAP y LeuAP para el segundo, y por el agonista dopaminérgico cabergolina en las actividades de la AspAP y LeuAP. En todos los casos, las actividades fueron significativamente más bajas en los individuos que consumieron el fármaco, aproximando los valores de los pacientes con EP a valores similares a los del grupo control. Diferentes trabajos han documentado la modulación que ejerce algunos inhibidores de la MAO-B sobre el metabolismo peptídico en el sistema nigroestriatal e hipotálamo. Ukponmwan y cols. (1986) demostraron que el l-deprenilo (o selegilina) potenciaba la actividad analgésica de las encefalinas endógenas en ratas, producida por el fosforamidón, un inhibidor de encefalinasas. Por otra parte, Sivam (1993) determinó un aumento en la concentración de dinorfina en el estriado y sustancia negra de ratas tras la administración reiterada de l-deprenilo. Posteriormente, Eliash y cols. (2005) encontraron un efecto neuroprotector de la rasagilina atenuando la muerte celular de las neuronas secretoras de vasopresina en ratas hipertensas SHR e incrementando la concentración de vasopresina en el núcleo parvoventricular (PVN) del hipotálamo. Además de estos agentes, los agonistas dopaminérgicos también interfieren en la concentración de los neuropéptidos que coexisten con la DA en la terminal sináptica. Waters y cols. (1995) mostraron un incremento en la degradación de sustancia P (SP) y un descenso en la degradación de CCK en el núcleo accumbens y corteza frontal de rodajas de cerebro de rata, respectivamente, tras la administración durante siete días de

apomorfina. Dos años más tarde, analizaron tanto la expresión del ARNm como la actividad enzimática de las neuropeptidasas responsables de la degradación de estos neuropéptidos, entre ellas la alanina aminopeptidasa de membrana o APN, después de la administración subcrónica de apomorfina, encontrando un aumento de la expresión del 50% y de la actividad del 70% en caudado-putamen de rata (Waters et al., 1997). Estos resultados demuestran que los fármacos que actúan a nivel del sistema dopaminérgico pueden modificar la concentración de los neuropéptidos que regulan la neurotransmisión a través de las peptidasas responsables de su degradación. A pesar del bajo número de individuos que tomaban selegilina, rasagilina y cabergolina en el grupo EPct, la actividad de las APs descendió en todo el grupo, por lo que parece más probable que más que a una acción individual se deba a una acción conjunta del tratamiento.

5.3. SOBRE LA α -SINUCLEÍNA CIRCULANTE EN LA EP Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA PLASMÁTICA

Dentro del estrés proteolítico que tiene lugar en las enfermedades neurodegenerativas, la α -sinucleína se ha considerado como el marcador molecular característico de la EP. Esta proteína, junto con la ubiquitina son los principales componentes de los cuerpos de Lewy (Cookson, 2005). La identificación de estos agregados intracelulares en las neuronas nigrales supervivientes, junto con la pérdida de neuronas dopaminérgicas, son necesarios para confirmar la enfermedad a nivel patológico. Spillantini y cols. (1998) detectaron una mayor inmunoafinidad por anticuerpos dirigidos frente a α -sinucleína que por los dirigidos frente a ubiquitina en los cuerpos de Lewy y neuritas distróficas de tejido cerebral de pacientes con EP y demencia con cuerpos de Lewy (DLB). Además, determinaron que las estructuras fibrilares que se originaban estaban constituidas exclusivamente por moléculas de α -sinucleína. La importancia diagnóstica que alcanzó la proteína llevó a los investigadores a identificarla en fluidos biológicos y tejidos periféricos. Borghi y cols. (2000) detectaron la molécula completa de α -sinucleína en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EP y sujetos sanos, sugiriendo que la proteína era secretada por las neuronas como parte de su procesamiento celular y en los casos de degeneración y muerte neuronal. Posteriormente El-Agnaf y cols. (2003) la detectaron también en plasma de pacientes con EP y sujetos sanos, y propusieron el mismo origen que los autores anteriores. Aunque la α -sinucleína carece de secuencia señal para el

retículo endoplásmico (RE), presenta dos motivos ácidos Asp-X-Glu en el extremo C-terminal que tienden a interactuar con él. Además, posee una región anfipática en el extremo N-terminal que le permite unirse a lípidos y posiblemente atravesar la membrana del RE siguiendo el curso normal de secreción. Ambas estructuras no están presentes en el resto de sinucleínas, que no se detectaron en líquido cefalorraquídeo, lo que sugiere que esta vía podría ser la responsable de la localización extracelular de la α -sinucleína. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que pueda ser secretada por otros mecanismos como vesículas endosomales. Por otra parte, la α -sinucleína también se expresa en tejido periférico, como fibroblastos de la piel y células sanguíneas. Li y cols. (2002b) determinaron la concentración de la proteína por análisis de western-blot en plaquetas de pacientes con EP y sujetos sanos, sin encontrar diferencias significativas. Además, demostraron que la α -sinucleína no era secretada por la activación plaquetaria. Por el contrario, Kim y cols. (2004) detectaron una mayor expresión de la proteína en células mononucleares sanguíneas periféricas de pacientes con EP frente a controles sanos. No obstante, debido a la variabilidad en los resultados publicados, existe gran controversia sobre la utilidad de las células periféricas como modelos para el estudio de la patología del SNC en las enfermedades neurodegenerativas.

El análisis de α -sinucleína en plasma es una medida directa de la proteína neuronal secretada por células sanas o liberada cuando son dañadas. Al analizar la concentración plasmática de α -sinucleína, ésta fue mayor en los dos grupos de EP comparados con el grupo C, con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$ para ambos grupos). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por El-Agnaf y cols. (2006) y Lee y cols. (2006a) en plasma de pacientes con EP. En este último trabajo, además, se determinó que no existía correlación entre la concentración plasmática de α -sinucleína y la duración y evolución de la enfermedad, según la escala de Hoehn y Yahr. Sin embargo, hasta el momento no se había analizado la concentración de estos agregados en enfermos recién diagnosticados que permitiera evaluar el papel de la α -sinucleína en la neurodegeneración. Dentro de la EP no existen diferencias en la concentración de α -sinucleína entre el grupo EPst y el grupo EPct. Estos datos sugieren que la neurotoxicidad asociada a los agregados de α -sinucleína es importante desde fases tempranas de la EP, ya que la concentración de proteína no se ve incrementada con la evolución de la enfermedad. En este sentido, existe una gran controversia sobre el papel

de los agregados de α -sinucleína en la neurodegeneración. En los últimos años están surgiendo nuevas líneas de investigación que le otorgan incluso un papel neuroprotector, limitando la citotoxicidad solo a los intermediarios oligoméricos de α -sinucleína que se originan previos a la formación de fibrillas en los LB (Sidhu et al., 2004). La neuroprotección podría consistir en la formación de estos agregados como una respuesta reguladora frente a estímulos tóxicos, como proteínas oxidadas o mutadas, facilitando su secuestro y posterior degradación (Lee et al., 2006c; Wakabayashi et al., 2007).

Por otra parte, se analizó si el descenso de actividad AP del grupo EPct respecto al grupo EPst podía estar relacionado con el estrés proteico que caracteriza a la EP y en general a todas las enfermedades neurodegenerativas y que conlleva la formación de agregados intracelulares (Saido, 1998). En relación a la EA y la EH sí se ha evidenciado un papel directo de la GluAP en la degradación del péptido A β y la AlaAP en la degradación de las proteínas htt y tau, como se ha comentado en el apartado 5.1. Sin embargo, en la EP, nuestros resultados no mostraron correlación entre cada una de las actividades AP estudiadas y la concentración de α -sinucleína.

5.4. SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LÍPIDOS PEROXIDADOS Y LACTATO COMO MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Existen numerosas evidencias que relacionan los fenómenos de estrés oxidativo con la patología de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas (Trushina et al., 2007; Oyango, 2008). Sin embargo, aun se desconoce el papel que juega en la neurodegeneración, bien como evento primario que actúa desencadenando el proceso de muerte neuronal o bien como una consecuencia de la interacción de otros procesos moleculares. Lo que parece claro es que participa en la propagación del daño neuronal, oxidando a proteínas e impidiendo su degradación normal por los proteosomas; promoviendo la activación glial y por tanto los fenómenos inflamatorios; y activando rutas de señalización intracelular que conducen a la apoptosis (Andersen, 2004).

Dentro de los fenómenos de estrés oxidativo, uno de los más significativos es la peroxidación lipídica. Las neuronas son especialmente vulnerables a este fenómeno por

varias razones. En primer lugar poseen una mayor tasa de consumo de oxígeno, que incrementa la respiración mitocondrial. En segundo lugar, registran niveles más bajos de defensas antioxidantes. Y por último, contienen en sus membranas una mayor concentración de lípidos poliinsaturados y colesterol, que son macromoléculas con mayor predisposición a oxidarse (Reynolds et al., 2007). Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc tienen además esta susceptibilidad aumentada. Como ya se ha comentado, durante el metabolismo de la DA, sea de forma enzimática o por autooxidación, se libera grandes cantidades de peróxido de hidrógeno, que en presencia de hierro y mediado por una reacción de tipo Fenton, se convierte en radicales hidroxilo, muchos más reactivos, potenciando la peroxidación lipídica en la membrana celular (Sayre et al., 2008).

En los últimos años el metabolismo de lípidos y colesterol está adquiriendo un gran interés en su asociación con la predisposición a enfermedades neurodegenerativas. El colesterol en las neuronas, no es solo un componente estructural de las membranas celulares y de la mielina, sino que también es esencial en muchas otras funciones celulares. Define así las propiedades físicas de la membrana celular, como la permeabilidad; define las propiedades funcionales de las proteínas integradas en la membrana, como canales iónicos y receptores de neurotransmisores; juega un papel clave en la sinaptogénesis y es esencial en la liberación del neurotransmisor (Valenza et al., 2006). La pérdida de muchas de estas funciones en las enfermedades neurodegenerativas ha conducido a estudiar el metabolismo del colesterol en este tipo de desórdenes. Las primeras evidencias relacionaron el genotipo $\epsilon 4$ del gen *APOE* con una mayor predisposición a desarrollar EA (Gaskell et al., 1993; Bignall, 1993). Diferentes estudios epidemiológicos encontraron una relación directa entre la concentración de colesterol total en plasma y el riesgo de desarrollar EA u otras formas de demencia, principalmente aquellas con un componente vascular (Michikawa, 2003; Shobab et al., 2005). En cuanto a la EP, también se ha relacionado su predisposición con un metabolismo lipídico alterado. Algunos estudios han determinado una asociación inversa entre la concentración de colesterol total sérico y el riesgo de padecer la enfermedad (Lau et al., 2006). Además se ha asociado una menor concentración de colesterol LDL con una mayor predisposición a desarrollarla (Huang et al., 2007). En la EH existe también una alteración en la homeostasis del colesterol, aunque los estudios epidemiológicos son más reducidos (Valenza et al., 2006). En un trabajo reciente, se

documentó una menor concentración de colesterol total en plasma de pacientes con EH frente a sujetos sanos (Markianos et al., 2008). Existen, por tanto, un gran número de evidencias que relacionan fallos en el metabolismo del colesterol y lípidos con enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, a excepción de los casos asociados a la variabilidad alélica de APOE, no hay estudios consistentes que determinen una mayor o menor predisposición a padecer una enfermedad neurodegenerativa en base a un perfil lipídico determinado.

En este trabajo determinamos la concentración de colesterol total, colesterol HDL y LDL, y triglicéridos en cada grupo de estudio. Todos ellos fueron normolipémicos a excepción del grupo Ic que mostró concentraciones más bajas de colesterol total y colesterol HDL y LDL. Sin embargo, estos valores quedaron justificados al comprobar que el 30% de los individuos del grupo estaban consumiendo estatinas en el momento de la extracción de sangre. No encontramos ninguna diferencia en el perfil lipídico de los grupos de pacientes con enfermedades neurodegenerativas frente al grupo de individuos sanos. Además, estos resultados nos confirmaron que la concentración plasmática de lípidos peroxidados (LPO) como marcador de estrés oxidativo no estaba influenciada por los niveles basales de lípidos plasmáticos.

Una de las principales fuentes de radicales libres es la mitocondria. Como se ha detallado en la introducción, la disfunción mitocondrial forma parte de los factores etiológicos propuestos en las distintas enfermedades neurodegenerativas mencionadas (Dexter et al., 1994; Keeney et al., 2006; Chen et al., 2007; Oyango, 2008). Cuando se desacopla el transporte electrónico en la cadena respiratoria, la producción de ATP disminuye y con él las defensas antioxidantes, aumentando la concentración de radicales libres (Schapira, 2008). La disrupción del metabolismo aeróbico promueve la formación de lactato fuera de la mitocondria, a partir de piruvato, reduciendo el aporte energético (Martin et al., 2005). En base a ello, la determinación plasmática de lactato se ha considerado como un marcador útil de disfunción mitocondrial tanto en modelos animales como en pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Schulz et al., 1997; Finsterer, 2005).

Para conocer la importancia del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas y en el ictus isquémico,

analizamos la concentración plasmática de LPO y AL. Comenzando por la EP, encontramos un incremento significativo en la concentración plasmática de LPO en los dos grupos de EP ($P < 0,001$) respecto al grupo C. Estos resultados fueron similares a los que obtuvimos en un trabajo previo en pacientes con EP tratados, en el que se determinó la concentración plasmática de LPO (Agil et al., 2006). En este trabajo observamos que no solo la concentración de LPO está elevada en las personas que sufren EP, sino que además los componentes plasmáticos tienen mayor disposición a peroxidarse que los controles. Esto puede deberse a una disminución de las defensas antioxidantes en los grupos EP. Otros trabajos también han evaluado la importancia de los fenómenos de estrés oxidativo en la EP. Ihara y cols. (1999) encontraron un incremento en la concentración de radicales hidroxilo en plasma de pacientes con EP. Buhmann y cols. (2004) describieron una mayor concentración de lipoproteínas oxidadas en plasma y líquido cefalorraquídeo de pacientes con EP tratados frente a sujetos sanos. Recientemente, Sharma y cols. (2008) detectaron un incremento en la concentración de malonil-di-aldehído (MDA), un producto de peroxidación lipídica, y una disminución en la concentración de glutathion reducido en plasma de de pacientes con EP. Sin embargo, hasta nuestro estudio no se había analizado el estado oxidativo de pacientes con EP recién diagnosticados. Para los dos grupos de EP, EPct y EPst, la concentración de LPO fue muy similar. Estos datos sugieren por un lado que los fenómenos de estrés oxidativo suceden y son importantes desde estadios iniciales de la enfermedad, y por otro lado que la terapia antiparkinsoniana no modifica el estado oxidativo de los pacientes con EP. Es sorprendente que a pesar de la sólida base existente que relaciona las enfermedades neurodegenerativas con el estrés oxidativo, aún no haya una terapia antioxidante eficaz.

Además del incremento de LPO, también encontramos un aumento en la concentración plasmática de AL en los dos grupos de EP, aunque solo el grupo EPct mostró diferencias significativas respecto al grupo C ($P < 0,01$). En ambos grupos de EP la concentración plasmática de AL fue similar. Estos datos sugieren un déficit energético asociado a la disfunción mitocondrial que caracteriza la EP. Apenas hay bibliografía referente a lactato y EP. Nakagawa-Hattori y cols. (1992) analizaron la concentración de AL y el índice de AL/Piruvato en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EP. Aunque ambos parámetros estaban incrementados respecto al grupo C, las diferencias que encontraron no fueron significativas en ningún caso.

Por tanto, el aumento de la concentración plasmática de LPO y AL en los pacientes con EP apoya la hipótesis de que el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial son factores etiológicos de la EP. Además, el estado oxidativo a nivel plasmático fue similar en los dos grupos de pacientes. Sin embargo, no podemos determinar qué papel desempeñan en la neurodegeneración, bien como factores desencadenantes o activados por otros procesos. Dexter y cols. (1994) detectaron concentraciones más bajas de glutathion reducido (GSH) en la SNpc de pacientes con EP asintomáticos frente a sujetos sanos, y propusieron que los fenómenos de estrés oxidativo eran previos a la muerte neuronal. En cualquier caso, lo más probable es que formen parte de una cadena de cambios moleculares (disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, alteración del metabolismo proteico, inflamación, inducción de la apoptosis) perfectamente entrelazada, que conduzca a la neurodegeneración, y donde la propia muerte neuronal actúa a su vez retroalimentando el ciclo (Andersen, 2004).

En cuanto a la EH, también encontramos un incremento significativo en la concentración plasmática de LPO ($P < 0,01$) respecto al grupo C, sugiriendo, al igual que en la EP, la contribución del estrés oxidativo en la fisiopatología de la enfermedad. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Klepac y cols. (2007), y Chen y cols. (2007) que detectaron un aumento del estrés oxidativo en plasma de pacientes con EH, medido como LPO, GSH y MDA. Todos los marcadores se correlacionaron positivamente con la severidad de la enfermedad. Además, la concentración plasmática de LPO fue mayor en pacientes asintomáticos portadores del gen mutado que en pacientes con EH, sugiriendo que los fenómenos de estrés oxidativo podían preceder a los síntomas clínicos. Por otra parte, la concentración plasmática de AL no mostró diferencias significativas respecto al grupo C. Sin embargo, otros autores si encontraron concentraciones elevadas de AL en tejido cerebral de modelos animales y en pacientes con EH (Schulz et al., 1997; Trushina et al., 2007). Recientemente, Martin y cols. (2007) detectaron un aumento significativo del índice AL/NAA (ácido láctico/N-acetil-aspartato) en la región parieto-occipital y en cerebelo de pacientes con EH frente a sujetos sanos, usando resonancia magnética espectroscópica, siendo la primera referencia que relaciona el déficit energético con la EH en individuos vivos.

Por el contrario, encontramos una disminución de la concentración plasmática de LPO cuando se compara la EA con el grupo C, aunque la diferencia no fue significativa.

Estos resultados contrastan con la mayoría de los estudios en los que se evidencia un aumento del estrés oxidativo en la EA (Andersen, 2004; Butterfield et al., 2007). Galbusera y cols. (2004) detectaron mayores concentraciones de LPO en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA frente a individuos sanos. Sin embargo, cuando analizaron la concentración en función del grado de demencia, observaron que era más elevada en individuos con demencia ligera, y disminuía con la progresión de la enfermedad, sugiriendo que el estrés oxidativo era un evento temprano en la EA. Por otra parte, Zhu y cols. (2004) propusieron que la activación de enzimas antioxidantes detectadas en la EA, junto con la hiperfosforilación de tau y la formación de los NFT, podían ser un mecanismo compensatorio adoptado por las neuronas para hacer frente al aumento de radicales libres, asegurando así la supervivencia celular. Es posible que la baja concentración de LPO en el grupo EA se deba a la propia evolución de la enfermedad, en la que bien por activación de los procesos anteriores, o bien por una acusada muerte neuronal, se produzca un descenso del estrés oxidativo. No obstante, es necesario hacer un análisis más exhaustivo que incluya un mayor número de pacientes en distintos estadios de la enfermedad. Además del estrés oxidativo, evaluamos la concentración plasmática de AL, pero no encontramos diferencias significativas respecto al grupo C. Sin embargo, Redjems-Bennani y cols. (1998) detectaron mayores concentraciones de AL en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA frente a sujetos sanos, proponiendo la disfunción mitocondrial como la responsable de este incremento. El estudio de los pacientes de EA es muy complejo, por la elevada edad de los pacientes y sobre todo, por la elevada incidencia de otras enfermedades crónicas y el tratamiento correspondiente que ocurre en esta patología.

Por último, en el grupo Ic encontramos un aumento significativo en la concentración plasmática de LPO ($P < 0,01$) y AL ($P < 0,001$) respecto al grupo C. Estos resultados responden a la patología de la enfermedad, en la que tras el accidente isquémico, se generan importantes cantidades de radicales libres, que dañan al ADN, lípidos y proteínas de membrana, desencadenando la muerte neuronal principalmente por necrosis (Love, 1999). En el estriado dorsolateral y corteza frontal de ratas infartadas, se detectó una pérdida de actividad del complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa, dando lugar a una reducción del metabolismo energético y a un aumento de la concentración de AL (Martin et al., 2005).

Como se ha discutido en este apartado, nuestros resultados prueban la implicación del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas y en el ictus isquémico como enfermedad neurológica aguda. En todas las enfermedades analizadas, a excepción de la EA, el aumento de la concentración de LPO se acompañó de un aumento en la concentración de AL, aunque en ocasiones esas diferencias no resultaron significativas respecto al grupo C. Para comprobar que el aumento del estrés oxidativo, evaluado en este trabajo como concentración plasmática de LPO, puede ser una consecuencia de la disfunción mitocondrial, determinamos también la concentración plasmática de AL y calculamos el índice LPO/AL. La obtención de un índice LPO/AL constante en todos los grupos de estudio, indicaría una relación directa entre ambos parámetros. Como se observa en la figura 38 el índice LPO/AL fue similar en todos los grupos analizados, excepto en el grupo EA donde fue menor, presentando diferencias significativas con el resto de grupos de pacientes. La reducción del índice LPO/AL en el grupo EA se debió a la baja concentración plasmática de LPO detectada. No obstante, estos resultados confirmarían que la disfunción mitocondrial es una de las principales fuentes de estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas y en el ictus isquémico.

5.5. SOBRE EL ESTADO OXIDATIVO EN LOS GRUPOS EP CON Y SIN TRATAMIENTO Y LA TERAPIA ANTIPARKINSONIANA

Fundamentalmente, la terapia antiparkinsoniana consiste en la administración de levodopa, como precursor de la DA, junto con carbidopa, un inhibidor de la enzima dopamina decarboxilasa periférica. El efecto de estos fármacos es contrarrestar en parte el déficit de DA endógena, restaurando la función dopaminérgica. Sin embargo, este tratamiento podría modificar el estado oxidativo de los pacientes con EP, contribuyendo a la formación de radicales libres asociados al metabolismo de la DA.

Aunque no encontramos diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de LPO y AL en los grupos EPct y EPst, analizamos los dos marcadores de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial bajo la influencia de los fármacos de mayor consumo resumidos en la tabla 11. Los resultados no mostraron cambios en las concentraciones de LPO y AL entre los individuos que consumieron cada uno de los fármacos frente a aquellos que no lo consumieron.

Existen numerosos estudios que consideran la levodopa como un fármaco pro-oxidante tanto en cultivos celulares como en modelos animales *in vivo* (Mytilineou et al., 1993; Olanow et al., 2004). Por el contrario, los estudios sobre su papel neurotóxico en pacientes con EP son más escasos, y a día de hoy no hay resultados que prueben que el tratamiento con levodopa dañe las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Algunos trabajos han documentado un aumento en la concentración de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con EP tratados con levodopa frente a pacientes tratados con otros fármacos antiparkinsonianos (Martignoni et al., 1999; Buhmann et al., 2004). Sin embargo, en nuestro laboratorio encontramos una relación inversa entre la concentración plasmática de LPO en pacientes con EP y la dosis de levodopa consumida ($P < 0,01$), sugiriendo un papel antioxidante en plasma sanguíneo (Agil et al., 2006). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Prigione y cols. (2006) que detectaron también una correlación inversa entre la concentración de especies ROS en células mononucleares sanguíneas de pacientes con EP y la dosis de levodopa consumida. Recientemente, Cornetta y cols. (2008) encontraron una menor fragmentación del ADN nuclear en linfocitos sanguíneos de pacientes con EP después del consumo de levodopa, proponiendo un efecto protector del fármaco a largo plazo contra el estrés oxidativo. No obstante, es una evaluación del papel de la levodopa como posible agente antioxidante periférico, que no puede extrapolarse al SNC.

Además de la levodopa, a los inhibidores de la MAO-B selegilina y rasagilina se le han atribuido propiedades neuroprotectoras, mediadas probablemente por mecanismos diferentes a su acción inhibidora enzimática. Kushleika y cols. (1996) detectaron un aumento significativo en la expresión de la enzima Zn-SOD en linfocitos de pacientes con EP que consumieron selegilina frente a aquellos que no la consumieron, sugiriendo un papel neuroprotector frente al estrés oxidativo. Por otra parte, en modelos de parkinson experimental disminuyen la producción de radicales hidroxilo inducidos por los neurotóxicos MPTP y 6-OHDA, e inhiben la recaptación de DA en la hendidura sináptica bloqueando el transportador de DA (DAT) (Chen et al., 2006).

Por último, este efecto neuroprotector también se ha detectado en algunos agonistas dopaminérgicos. El pramipexol inhibe la disfunción mitocondrial ocasionada por la toxicidad del MPTP, 6-OHDA o rotenona, y la síntesis y liberación de DA, reduciendo

el daño neuronal provocado por la autooxidación del neurotransmisor (Chen et al., 2006).

En resumen, la terapia antiparkinsoniana no modifica el estado oxidativo de los pacientes con EP. A nivel individual, y en base a estas observaciones, es posible que estos fármacos puedan contribuir a reducir el estrés oxidativo. Sin embargo, debido al escaso número de pacientes que tomaban pramipexol, selegilina y rasagilina, no pudimos, como lo hicieramos en el estudio con la levodopa, evaluar la relación entre la concentración plasmática de LPO y la dosis empleada.

5.6. SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

En el primer apartado analizamos la actividad AP en cuatro grupos de pacientes con enfermedades neurodegenerativas frente a individuos sanos y a pacientes que habían sufrido un ictus isquémico. El patrón de actividad AP observado en los grupos de pacientes con enfermedades neurodegenerativas fue diferente al observado en el grupo Ic. Esta diferencia podría responder a las características propias de cada enfermedad. Mientras que en las enfermedades neurodegenerativas el daño neuronal es progresivo, en las no neurodegenerativas, como el Ic, el daño es agudo.

Para determinar si el patrón de los cambios en la actividad AP observados en los grupos de enfermedades neurodegenerativas son específicos o no, comparamos la actividad AP en los grupos EPct, EPst, EA y EH frente a los dos grupos control: grupo C, y grupo Ic. Estos dos grupos se han utilizado como dos controles de estudio; el primero formado por individuos sanos y el segundo por individuos con enfermedad neurológica de carácter aguda y no degenerativa. En este caso, el análisis estadístico es diferente al comentado anteriormente: no se comparan todos los grupos entre ellos (15 parejas en el ANOVA), sino por un lado las neurodegenerativas frente a C y a Ic (9 parejas en el ANOVA). Al ser el tratamiento estadístico diferente, los resultados también pueden ser diferentes.

Comenzando por la AlaAP, no encontramos diferencias significativas de la actividad en los grupos de enfermedades neurodegenerativas comparados con el grupo C. Sin

embargo, si encontramos un aumento significativo de la actividad en el grupo EPst comparado con el grupo Ic ($P < 0,05$). Para la CysAP, encontramos un descenso significativo de la actividad en el grupo EPct comparado con el grupo C ($P < 0,05$). Además, encontramos un aumento significativo de la actividad en los grupos EPst ($P < 0,001$) y EA ($P < 0,01$) comparados con el grupo Ic. Para la AspAP, encontramos un aumento significativo de la actividad en el grupo EA ($P < 0,05$) y un descenso significativo en el grupo EH ($P < 0,05$) comparados con el grupo C. Además, encontramos un aumento significativo de la actividad en los grupos EPst ($P < 0,001$) y EA ($P < 0,001$) comparados con el grupo Ic. Para la GluAP, encontramos un descenso significativo de la actividad en el grupo EH comparado tanto con el grupo C ($P < 0,01$) como con el grupo Ic ($P < 0,05$). Por último, para la LeuAP, no encontramos diferencias significativas de la actividad en los grupos de enfermedades neurodegenerativas comparados con el grupo C. Sin embargo, si encontramos un aumento significativo de la actividad en los grupos EPst ($P < 0,001$) y EA ($P < 0,001$) comparados con el grupo Ic.

Al utilizar los grupos C e Ic como grupos control, presuponemos que si la alteración de la actividad AP viene determinada por el carácter crónico y progresivo de las enfermedades neurodegenerativas, las diferencias, si las hay, pueden ser parecidas al compararlas frente a los dos grupos control.

Según nuestros resultados, en el grupo EPct la actividad AP fue similar a la de los grupos C e Ic, a excepción de la CysAP que fue más baja comparada con el grupo C. Por el contrario, en el grupo EPst la actividad AP, a excepción de la GluAP, fue significativamente más elevada que en el grupo Ic. Sin embargo, no mostró diferencias comparada con el grupo C. En el grupo EA, la actividades CysAP, AspAP y LeuAP fueron significativamente más elevadas que en el grupo Ic. En cambio, solo la AspAP fue más elevada comparada con el grupo C. Por último, en el grupo EH, la actividad AP fue similar a la de ambos grupos, excepto la de la GluAP que fue significativamente más baja comparada con ambos grupos, C e Ic, y la de la AspAP, que fue significativamente menor que en el grupo C.

En resumen, los cambios en la actividad AP tienen lugar tanto en las enfermedades neurológicas degenerativas estudiadas como en la no degenerativa Ic. Por tanto, el Ic no

es un control útil para analizar la importancia de la actividad AP en la neurodegeneración. Es posible que las diferencias encontradas en la actividad AP de ambos grupos de enfermedades sea una consecuencia del daño neuronal, independientemente de carácter crónico o agudo de la misma.

5.7. SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LÍPIDOS PEROXIDADOS Y LACTATO EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Siguiendo el mismo planteamiento que en el apartado anterior, analizamos la importancia del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial bajo la influencia de la condición crónica de las enfermedades neurodegenerativas, utilizando como controles los grupos C e Ic.

Para la concentración plasmática de LPO, encontramos un aumento significativo en los grupos EPct ($P < 0,001$), EPst ($P < 0,001$) y EH ($P < 0,01$) comparados con el grupo C. Sin embargo, encontramos un descenso significativo en el grupo EA respecto al grupo Ic ($P < 0,001$). Para la concentración plasmática de AL, encontramos un aumento significativo en los grupos EPct ($P < 0,01$) y EPst ($p < 0,05$) comparados con el grupo C. Por el contrario, no encontramos diferencias significativas respecto al grupo Ic.

Según nuestros resultados, en los grupos EPct y EPst las concentraciones plasmáticas de LPO y AL fueron significativamente más elevadas que en el grupo C, pero no mostraron diferencias respecto al grupo Ic. En el grupo EA, la concentración plasmática de LPO fue significativamente más baja que en el grupo Ic. Por el contrario, la concentración de AL no mostró diferencias comparada con ambos grupos. Por último, en el grupo EH, la concentración plasmática de LPO fue significativamente más elevada que en el grupo C, pero no mostró diferencias respecto al grupo Ic. Sin embargo, la concentración de AL no mostró diferencias al compararla frente a ambos grupos.

En resumen, los fenómenos de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial tienen lugar tanto en las enfermedades neurológicas degenerativas estudiadas como en la no degenerativa Ic. Por tanto, el Ic no es un control útil para analizar la importancia de los fenómenos mencionados en la neurodegeneración. Es posible que las diferencias

encontradas en la concentración plasmática de LPO y AL en ambos tipos de enfermedades sea una consecuencia del daño neuronal, independientemente del carácter crónico o agudo de la misma.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

- 1) La actividad de las aminopeptidasas plasmáticas es mayor en los pacientes con enfermedad de Parkinson antes de iniciar el tratamiento que después de estar sometidos a él. La medicación antiparkinsoniana revierte la actividad enzimática, mostrando el grupo de enfermos tratados unos valores similares a los del grupo control, salvo en el caso de la cistina aminopeptidasa.
- 2) Las otras enfermedades neurodegenerativas estudiadas, enfermedad de Huntington y de Alzheimer, también causan cambios significativos en la actividad plasmática de las aminopeptidasas. Destaca el fuerte descenso de actividad encontrado en el grupo de pacientes con enfermedad de Huntington respecto al grupo de sujetos sanos.
- 3) La actividad plasmática de las aminopeptidasas también se modifica en el ictus isquémico, aunque sea una enfermedad neurológica no degenerativa. Este grupo no es útil como control de las aminopeptidasas.
- 4) La concentración de α -sinucleína en plasma es mayor en los grupos de pacientes con enfermedad de Parkinson, independientemente de que estén o no sometidos a tratamiento antiparkinsoniano. En este caso, la medicación no tuvo ningún efecto significativo.
- 5) La concentración de α -sinucleína circulante no está relacionada ni con el tratamiento ni con la edad. Nuestros datos sugieren que es una manifestación de la enfermedad, probablemente debida a la alteración del metabolismo proteico, que no está relacionada con la progresión de la patología ni con el tiempo transcurrido desde su inicio.
- 6) Los pacientes con enfermedad de Parkinson tienen aumentada la concentración plasmática de lípidos peroxidados y lactato, a pesar de no tener alteraciones significativas en los lípidos circulantes. En este caso, el tratamiento antiparkinsoniano no tuvo ningún efecto.

- 7) Los pacientes con enfermedad de Huntington tienen aumentada la concentración plasmática de lípidos peroxidados, sin tener cambios significativos en los lípidos circulantes.
- 8) Los pacientes con ictus isquémico tiene elevados los lípidos peroxidados y el lactato.
- 9) El aumento en la concentración de lípidos peroxidados circulantes es un denominador común en todas las enfermedades estudiadas, salvo en los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Esta excepción puede deberse al tratamiento variado que reciben los pacientes de este grupo, ya que todos ellos padecen otras patologías acompañantes, debido a la avanzada edad media del grupo.
- 10) Como conclusión general en el caso de la enfermedad de Parkinson, decir que nuestros resultados muestran que hay cambios significativos en los indicadores del estrés proteico, indicadores del estrés oxidativo y actividad enzimática de las aminopeptidasas. El tratamiento específico solo normaliza los valores de la actividad enzimática, sin mejorar los otros índices. Sugerimos que cuando se consiga una medicación capaz de mejorar el estrés oxidativo y proteico se producirá un gran avance en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Esta sugerencia es extensible a la enfermedad de Huntington.

*Summary and
Conclusions*

Aminopeptidases and oxidative stress in neurodegenerative diseases

Summary of Raquel Duran Ogalla's PhD thesis

Supervisor:

Francisco Vives
Professor of Physiology
University of Granada

Granada, Spain

INTRODUCTION

Aging presents an increasing challenge for developed societies. Diseases associated to aging are on the rise, and neurodegenerative diseases are among the most important. They produce a progressive disability, a remarkable social and economical problem of our society.

The most frequent neurodegenerative diseases are Alzheimer disease (AD) and Parkinson's disease (PD). This study was focused mainly on PD. PD is a progressive movement disorder characterized pathologically by the selective loss of dopamine (DA) neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and the presence of prominent cytoplasmic inclusions, called Lewy bodies (LB). PD prevalence increases from 1 percent at the age of 65 to 5 percent at 85, making age the main risk factor for this disease. Most of PD patients are thought to be sporadic; however, in a 5 to 10% of cases, PD is believed to have a genetic origin, showing both recessive and dominant modes of inheritance (Onyango, 2008).

Although the mechanisms responsible for neurodegeneration in PD are largely unknown, mitochondrial dysfunction, oxidative stress and impairment in protein metabolism have been proposed as the three more important pathogenic factors. These three etiological factors are shared with AD and HD.

The first study relating mitochondria and PD was published in 1989, when a deficiency in electron transport chain protein complex I was identified in SNpc neurons taken from PD patients (Shapira et al., 2006). Afterwards, epidemiological studies proved the existence of inhibitors from mitochondrial complex I that cause experimental parkinsonism. The best known neurotoxic was MPTP (1-Methyl 4-phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine). MPTP is a meperidine analog highly selective for DA neurons. In astrocytes, MPTP is transformed by the enzyme monoamine oxidase B (MAO-B) in its active metabolite, MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridium ions), which is uptaken by DA transporter and inhibits mitochondrial chain complex I, producing neuronal death. In non human primates, MPTP also produced the formation of α -synuclein aggregates LB like.

The impairment of the electron transport chain in mitochondria originates an important decrease in the production of ATP – and in all biological mechanisms depending on energy production. One main effect of this cellular energy decrease is the increase in reactive oxygen species (ROS) production, leading to oxidative damage (Keeney et al., 2006). The term ROS usually refers to the generation of superoxide anion (O_2^-) which is produced during the reduction of water (H_2O) in the electron transport chain. O_2^- is enzymatically or spontaneously converted to hydrogen peroxide (H_2O_2) at rapid rates. In the mitochondria, H_2O_2 is removed by glutathione peroxidase; however, significant amounts of H_2O_2 are still able to diffuse from the mitochondria to cytosol. The existence of high levels of H_2O_2 together with other ROS may also damage DNA, proteins and membrane lipids, leading to cellular death, mainly for apoptosis.

Due to the high rate of metabolism and the special DA metabolism that produces high amount of ROS, dopaminergic neurons are highly susceptible to oxidative stress. DA is inactivated by the enzyme MAO in a reaction that yields significant amounts of H_2O_2 . DA may also suffer autooxidation processes leading to the formation of quinones and semiquinones, which are toxic *per se*, and may lead to ROS generation. Furthermore, SNpc contains high iron concentrations, which binds DA and neuromelanin. Iron also reacts with lipids and by the Fenton reaction produces peroxidate lipids (LPO). For this reason, free radicals are considered the main cause of nigral degeneration (Koutsiliere et al., 2002).

The impairment in protein metabolism produces neuronal damage as well. A feature of PD is the generation of α -synuclein aggregates. α -Synuclein is part of a gene family that includes β - and γ -synucleins and synoretin. Although the function of α -synuclein is not well understood, this protein is located in the synaptic terminal, and it appears to have a role in vesicular traffic and neurotransmission. It has little or no detectable secondary structure, and hence α -synuclein is referred to natively unfolded. α -Synuclein is one of several proteins associated with neurodegenerative diseases . It presents a high tendency towards aggregation due to characteristics of the central hydrophobic region of α -synuclein, which tends to self-associate. This central region is different from that of synucleins other than α . The end product of α -synuclein aggregation is the formation of heavily insoluble polymers of proteins known as fibrils. It is thought that the fibrils of

α -synuclein are the building block of LB; however, LB contains proteins other than α -synuclein, including neurofilaments and other cytoskeletal proteins (Cookson, 2005).

Other dysfunction in protein metabolism is the ubiquitin-proteasome system (UPS). The UPS is an intracellular system necessary for non lysosomal degradation of short life, misfolded, mutant, and oxidatively damaged proteins. Proteins to be degraded are first marked by covalent attachment of a polyubiquitin chain to a lysine residue of the substrate. The polyubiquitinated protein is then degraded by a large proteolytic complex, the 26S proteasome, in ATP-dependent reactions (Barzilai et al., 2003). Selective impairment of proteasomal activity and reduced expression of proteasomal subunits have been reported in nigral postmortem tissue from sporadic PD patients. Because of this, the existence of a direct impairment of UPS by α -synuclein was proposed. Pathogenic species of α -synuclein can directly bind to 20/26S proteasomal subunit, impairing proteolytic activity (Moore et al., 2005). These findings suggest that a dysfunctional UPS may underlay vulnerability and degeneration of nigral DA neurons in sporadic PD.

In addition to the above cited pathogenic factors, there are other secondary mechanisms involved in the pathogenesis of PD. One of them is the microglial activation. Inflammatory events that may initiate or aggravate neuronal damage have been reported in striatum, SNpc and other brain structures of PD patients (McGeer et al., 1988; Liu et al., 2003). Microglia contributes to the neurodegenerative process through the release of a variety of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6, interferon- γ (INF- γ), as well as the upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2). These factors exacerbate the degeneration of neurons (Whitton, 2007).

Likewise, Alzheimer's (AD) and Huntington's (HD) disease are two chronic, progressive and degenerative diseases. AD is considered the more prevalent of neurodegenerative diseases, with a frequency of 4.4 percent of affected people in the global population. The frequency increases with aging – hence age is considered the main risk factor. Most of cases are thought to be sporadic. AD is clinically characterized by the progressive loss of memory and other cognitive skills, finally leading to acute dementia (Bird, 2008). Pathologically, there is a selective loss of medium and large

pyramidal neurons, along with the formation of extracellular deposits termed senile plaques, composed mainly of β -amyloid fibrils, and intracellular deposits termed neurofibrillary tangles, composed of microtubule-associated protein tau in its hyperphosphorylated form (Upadhyaya et al., 2007).

The last neurodegenerative disease analyzed in this study was HD. HD is a genetic disease, showing dominant mode of inheritance (Petrasch-Parwez et al., 2007). It shows a low prevalence, between 5-10 cases per 100,000. HD is characterized by involuntary movements (chorea), due to a prominent cell loss of striatal medium spiny neurons. It is also accompanied of personality changes, dementia and weight loss. The defective gene in HD contains a repeat expansion of trinucleotide CAG within its coding region that express a polyglutamine repeat in the protein huntingtin (htt). In general, the number of CAG repeats is correlated to severity of the disease and indirectly with aging. HD patients show a number of CAG repeats of about 40-50, while more of 70 are observed in early-onset or juvenile forms. The mutant htt tends to aggregate, originating insoluble polymers known as inclusion bodies (IB). These aggregates interfere with normal proteins by recruiting some of them into its matrix, affecting to cell processes (Valera et al., 2007).

The pathogenesis of AD and HD shows similarities to those described in PD: mitochondrial dysfunction and oxidative stress (Zhu et al., 2004; Trushina et al., 2007; Klepac et al., 2007), protein aggregation (Higuchi et al., 2005; Spires et al., 2007; Valera et al., 2007), inflammatory phenomena (Li et al., 2004; Rojo et al., 2008) and apoptosis (Gil et al., 2008). However, it may be suggested that these disorders, PD, AD and HD, although with different etiology and clinic, share at least part of pathological mechanisms that lead to selective neuronal loss and neurodegeneration.

These diseases are progressive, and an early diagnosis is a desideratum. Thus, many researchers are looking for biomarkers that could predict the disease before the symptoms appear. In PD, this effort has been directed to search for oxidative stress, because it is one of the main mechanisms implicated in its pathogenesis (Serra et al., 2001; Sohmiya et al., 2004; Prigione et al., 2006), together with the analysis of α -synuclein concentration (El-Agnaf et al., 2006; Lee et al., 2006a).

A common feature of neurodegenerative diseases is the impairment of protein metabolism. In the brain, there is an abundant group of enzymes related to protein and peptide metabolism known as aminopeptidases (APs). Previous research showed that patients suffering from PD and animal models with induced experimental parkinsonism presented significant changes in AP activities (Banegas et al., 2005, 2006a). In the striatum, neuropeptides such as cholecystokinins, angiotensins, and enkephalins coexist together with DA. The role that APs play in the striatum and in the physiopathology of the neurodegenerative diseases that affect the nigrostriatal system is largely unknown. Besides, there are a large number of striatal fibers that contain cholecystokinin, which come from prefrontal cortical areas and modulate autonomic and endocrine functions. Once they are released to synaptic terminal and activate their respective receptors, these neuropeptides are hydrolyzed mainly by membrane-binding peptidases. Here we focus on the group of the APs, which are the most abundant proteolytic enzymes in the brain, and play a key role in controlling small bioactive peptides functions. Hence, it is highly relevant to study the enzymatic activities of APs in PD and to analyze their contribution to the onset and progression of the disease.

Banegas et al. (2005) observed a marked decrease in these aminopeptidase activities in some brain areas (striatum, substantia nigra, and prefrontal cortex) in unilaterally-lesion rats with neurotoxic 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Later, and on the basis of these results, they analyzed alanine-, cystine-, aspartate-, and glutamate-aminopeptidase activities (aaAPs) in plasma from PD patients. They found a significant decrease in all AP activities except for Ala-AP (Banegas et al., 2006a). Similar results were found in human brain (Mantle et al., 1995), even though these could not be compared with those obtained from plasma of lesion rats, in which the activities changed depending on the hemisphere where the lesion was performed (Banegas et al., 2004). Nevertheless, these results found in experimental animal models produce an acute pathology different to PD in human patients.

In addition to these functions, the decrease in the AP activities has been related with a decrease in the catalytic processes described in the neurodegenerative diseases, which lead to the formation of protein aggregated (LB, inclusion bodies, senile plates, etc.). In AD, the APs have a direct implication in the catabolism of peptide A β . Recently, it has been demonstrated that these deposits are not the consequence of an overproduction but

rather to a reduction in the degradation processes (Saido, 1998). The possibility that these enzymes may participate in the peptide A β catabolism was supported by the structural analysis of the amyloid deposits, finding a higher heterogeneity in the amino-terminal ends as a consequence of the AP activity (Kuda et al., 1997; Saido, 1998). The candidate enzyme seems to be glutamate aminopeptidase (GluAP), showing the lowest activity in plasma from AD patients, stimulating the accumulation on insoluble and pathogenic structures (Kuda et al., 1997). However, the action of the APs does not exclude the participation of other peptidases and proteases in the catabolism of A β .

This evidence has led us to evaluate the role of the APs in the neurodegenerative diseases, mainly in PD. However, it is also interesting to analyze if a similar pattern exists in AD and HD, which could be expected due to the parallelism observed in the molecular mechanisms responsible of the pathogenesis. Given that in the three previously mentioned diseases both the neuronal death and the insoluble aggregates formation are progressive, it is possible that the APs activities were modified during the progression of the disease. Therefore, this analysis may also provide useful information about the stage of the disease in the patient.

We have also evaluated the importance of the oxidative stress phenomena on the neurodegeneration. Mitochondrial dysfunction and electron transport chain impairment are the main responsible mechanisms of ROS production (Trushina et al., 2007; Sayre et al., 2008). An analysis of oxidative stress evolution may provide a better understanding of its implication in neurodegenerative processes. Furthermore, there is great controversy about antiparkinsonian treatment both in the progression and aggravation of PD, specially referring to the role of levodopa. We previously reported the antioxidant and protective roles of levodopa against lipid peroxides formation in blood plasma of PD patients (Agil et al., 2006), which was subsequently confirmed by other researchers (Prigione et al., 2006). However, the redox status of PD patients prior to the treatment was not analyzed in any case. Besides, this study may allow us to test, on the one hand, whether oxidative stress is aggravated with PD progression and, on the other, if levodopa modifies the basal oxidative status after specific PD treatment.

Thus, this study has two main goals: i) to study the possible implication of APs in the pathology of PD, AD, HD; ii) to analyze the relationship between oxidative stress and

neurodegenerative diseases; and, iii) to investigate if specific treatment changes APs activities and oxidative stress in the case of PD patients.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Subjects in this study were divided in six different groups. First, we formed a control group that consisted of a randomized group of sixty healthy subjects (C group). Second, there were forty two patients who were diagnosed of sporadic Parkinson's disease, all of them under treatment for at least one year before collection of blood samples (PDt group). Third, we grouped fifty three patients who were also diagnosed of sporadic PD but started specific treatment after the collection of blood samples for this study (PDnt group). In a fourth group there were twenty eight patients diagnosed of Alzheimer's disease (AD group). Fifth, we formed a group with thirty four patients were diagnosed of Huntington's disease (HD group). A final group was composed of forty patients with ischemic ictus disease (Ic group). All patients were diagnosed by at least two neurologists in the Neurology Unit of the University Hospital of Granada, following the suitable criteria in every case. This study was approved by the Ethical Committee for Human Research from the same hospital.

Material

Aminopeptidase enzymatic assays

Alanyl-, aspartyl- and leuciny-2-naphthylamide substrates, 2-naphthylamide, bovine serum albumin, dithiothreitol (DTT), manganese chloride, brilliant blue G and trizma base were obtained from SIGMA. Cystinyl-di-2-naphthylamide substrate and di-sodium hydrogen phosphate dihydrate were obtained from FLUKA. Glutamyl-2-naphthylamide substrate was obtained from BACHEM. Dimethyl sulfoxide (DMSO), hydrochloric acid, acetic acid, sodium acetate, ortho-phosphoric acid, ethanol absolute were obtained from PANREAC. Finally, methionin, calcium chloride, sodium dihydrogen phosphate were obtained from MERCK.

Non-denaturing electrophoresis and SDS-PAGE/Immunoblotting

Proteo Prep immunoaffinity columns, leucine aminopeptidase (CD13), sodium dodecyl sulfate, Fast black K salt (FBK), tween 20, bovine serum albumin and bradford reagent

were obtained from SIGMA. Rabbit policlonal IgG CD13 antibody, goat aminopeptidase A antibody, donkey anti-goat IgG-HRP antibody were obtained from Santa Cruz Technologies. Aminopeptidase A/ENPEP recombinant human protein was obtained from R&D System. Anti-rabbit IgG-HRP antibody and ECL-plus western blotting detection system were obtained from Amersham. Prestained SDS-PAGE standard broad range, bis-acrylamide solution (30% Acrylamide/Bis, solution 29:1), immuno-blot PVDF membrane, mini-protean III system and trans-blot semi dry transfer cell were obtained from Bio-Rad. Tetramethyl ethylendiamin (TEMED) was obtained from MERCK. Medical X-ray film and developing system CURIX 60 were obtained from AGFA.

Determination of plasma lipid profile

Cholesterol CHOD-PAP, Triglycerides GPO-PAP and HDL-cholesterol plus 2nd generation kits were obtained from ROCHE.

Determination of plasma lipid peroxides and lactic acid levels

PeroxiDetect and L-lactic acid Enzymatic Bioanalysis kits were obtained from SIGMA and ROCHE, respectively.

Determination of plasma α -synuclein level

Human α -synuclein Immunoassay kit was obtained from Invitrogen.

Methods

Collection of blood plasma

Blood samples were extracted in the cubital vein, in tubes containing EDTA as anticoagulant. Plasma was isolated by centrifugation for 15 min at 3,000 r.p.m. and stored at -80 °C until analysis.

Aminopeptidase enzymatic assay

Alanyl- (AlaAP), cystinyl- (CysAP), aspartyl- (AspAPA), glutamyl- (GluAP) and leuciny- (LeuAP) aminopeptidase activities in plasma were measured fluorometrically in duplicate using L-Ala- β -naphtylamide (L-AlaNNap), L-Cys-di- β -naphtylamide (L-CysNNap), L-Asp- β -naphtylamide (L-AspNNap), L-Glu- β -naphtylamide (L-GluNNap) and L-Leu- β -naphtylamide (L-LeuNNap), respectively as substrates in agreement with

Greenberg (1962), modified by Ramírez et al. (1997) for AlaAP, Tobe et al. (1980) for GluaAP and Cheung and Cushman (1971) for AspAP. All the reactions were stopped by adding 0.1 ml of 0.1 mol/l of acetate buffer, pH 4.2. The amount of β -naphthylamine released as a result of the aminopeptidase activity was measured fluorometrically at 410 nm emission wavelength with an excitation wavelength of 340 nm. The sensitivity of the method allows to measurements of AP in the pmol range. Proteins were quantified in duplicate by the method of Bradford, using BSA as standard. Specific aminopeptidase activities were expressed as pmol of AlaNNap, CysNNap, AspNNap, GluNNap and LeuNNap hydrolyzed per min per mg of protein. Fluorogenic assays were linear with respect to time of hydrolysis and protein content.

SDS-PAGE and Immunoblotting of alanine and glutamate aminopeptidases

Previous to SDS-PAGE and Immunoblotting, plasma samples were subjected to depletion of the albumin and IgG proteins by immunoaffinity columns, according to the protocol supplied in the kit.

Afterwards, 20 μ l of plasma containing 90 and 75 μ g of total proteins by Bradford method were subjected to 12% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred from gel to a PVDF membrane in a buffer containing 25 mM Tris, 190 mM glycine, and 20% methanol, using a semidry system of transference, at 100 mA, 20 V for 30 min. Blotting of the membrane was performed after blocking non specific binding with 5% free fat milk and 0.1% Tween 20 in Phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.5 overnight. After three washings with PBS-Tween at 0.1%, the blot was incubated with the specific primary antibody at dilution 1:1000 in PBS containing 0.5% milk, at 4°C for 60 min. After several washings with PBS-Tween at 0.1%, the blot was incubated for 1 hour with anti-goat or anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated antibodies, diluted 1:5000 or 1:2000, respectively. Finally, after three washings, the blot was visualized using enhanced chemiluminescence detection system according to the supplier's instructions and CURIX 60 developing system.

Non denaturing PAGE from alanine and leucine aminopeptidases

In order to detect the enzymatic activities from isolated aminopeptidases, 20 μ l of plasma containing 400 and 200 μ g of total proteins by Bradford method, were subjected to 10% non-denaturing PAGE. After electrophoresis, gel was incubated with the

specific substrate of the enzyme (aminoacyl- β -naphthylamide) in phosphate buffer 0.1 M pH 6.1 containing 0.15 % Fast Black K salt (FBK salt) at 37° C for 30 min. The enzyme, after breaking down the specific substrate, liberates β -naphthylamide which reacts with the salt originating a purple dye. After, gel was washed for 30-40 minutes using 25 % acetic acid, so that dyed strips correspond with the sites where enzyme is located and the colour intensity is proportional to enzymatic activity.

Determination of plasma lipid profile

Total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol levels were measured according to the protocols supplied in each kit, in a Roche/Hitachi automatic analyzer of clinical chemistry from the unit of Clinical Analysis of the University Hospital of Granada. LDL cholesterol level was calculated by the formula of Friedewald. Alls levels were expressed as mg/dl.

Determination of plasma lipid peroxides and lactate

Plasma lipid peroxides and lactate were measured in duplicate according to the protocols supplied in each kit. The levels were expressed as nmol/ml and g/l, respectively.

Determination of plasma α -synuclein

Plasma α -synuclein level was measured in duplicate according to the protocol supplied in the kit. The level was expressed as ng/ml.

Statistical methods

To reach different targets of the theses a statistical analysis was carried out in the following steps:

- I. Descriptive statistics for all variables of the study using summary measures (mean, standard deviation, percentiles, etc...) when variables are quantitative and frequency distribution when categorical variables.
- II. One way analysis of variance was used to study differences among groups by age and pairwise comparisons with Bonferroni's penalization if that was significant. Fisher exact test extension to rxc tables was used to study

association between group and gender of the patient. Finally association between pairs of quantitative variables was studied using a scatter plot to discard nonlinear association and Pearson's correlation coefficient.

- III. One way analysis of variance was carried out to detect differences among groups for each variable of the study, and when significant pairwise comparisons with Bonferroni's penalization using Newman-Keuls method was used. Nevertheless this was not an appropriate method because groups were different by age and gender of patients; so analysis of covariance was used to study differences among groups adjusted by age and sex; when analysis of covariance was significant pairwise comparisons were carried as previously said. To reach homogeneity of variances neperian logarithm transformations was applied.

STATA 10.1 was used for computations. A signification of 0.05 was selected for all significance tests (without or with penalization).

RESULTS

Table 1 shows the distribution of the subjects by age and sex. There were significant differences in age between groups ($P < 0.001$), probably due to the different onset of each disease. Also, it was not possible to select aged people that not were under treatment (antidiabetics, antihypertensives, etc.). After statistical analysis controlling the possible differences due to age and sex among the subjects for this study, no difference was found between groups. Table 2 shows medication regime of PDt group. In this group, all patients were under treatment with L-dopa plus carbidopa. Plasma lipids of all subjects were analyzed, and Table 3 shows total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol and LDL cholesterol. All groups were normolipemic, except Ic group that showed total cholesterol, HDL and LDL cholesterol significantly lower than others groups. This difference may be due to the fact that a 30 percent of Ic group was under treatment with statines.

GROUP	n	AGE	SEX	
C	60	48.02 ± 2.38	Male	30
			Female	30
PDt	42	65.36 ± 1.39	Male	28
			Female	14
PDnt	53	64.26 ± 1.59	Male	28
			Female	25
AD	28	75.71 ± 0.95	Male	11
			Female	17
HD	34	46.35 ± 2.22	Male	14
			Female	20
Ic	40	76.10 ± 1.75	Male	27
			Female	13
TOTAL	257	61.33 ± 1.08	Male	138
			Female	119

Table 1. Distribution by age and sex of groups used in this study. Mean ± SEM.

DRUG	n	% CASES
Levodopa	26	72,22
Carbidopa	26	72,22
Pramipexole	17	47,22
Entacapone	12	33,33
Cabergoline	6	16,67
Rasagiline	5	13,89
Selegiline	5	13,89

Table 2. Medication regime of PDt group: distribution of drugs with major consumption. Values represent frequency and percentage of cases.

GROUP	n	TOTAL CHOL.	TRIGLYCERIDES	HDL CHOL.	LDL CHOL.
C	51	191.039 ± 4.5188	109.902 ± 8.3763	55.872 ± 2.2768	114.747 ± 4.1011
PDt	42	177.810 ± 4.7150	129.310 ± 10.0126	50.554 ± 2.0842	106.081 ± 4.2378
PDnt	54	183.833 ± 4.8824	122.815 ± 7.4097	51.464 ± 2.2922	112.769 ± 4.3166
AD	28	202.357 ± 8.4748	140.821 ± 19.3921	53.296 ± 3.9497	111.361 ± 4.6483
HD	34	182.394 ± 8.5628	122.333 ± 12.1816	50.939 ± 2.9297	114.070 ± 4.1895
Ic	40	153.650 ± 5.9010	134.525 ± 11.9358	35.620 ± 2.9171	87.532 ± 4.7074

Table 3. Plasma levels of total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol and LDL cholesterol (mg/100mL). Mean ± SEM.

Plasma aminopeptidase activities

Figure 1 shows aminopeptidase plasma activity for each group. There were no differences between control and patient groups in AlaAP plasma activity. However, AlaAP activity was higher in PDnt group, compared to PDt and Ic group ($P < 0.05$) (Fig. 1A). CysAP plasma activity was lower in PDt and Ic groups, compared to C group ($P < 0.05$). The comparison between PD groups showed a significant higher CysAP

activity in PDnt respect to PDt group ($P < 0.01$). Also, CysAP activity was lower in Ic group than in PDnt ($P < 0.001$) and AD groups ($P < 0.05$) (Fig. 1B). AspAP plasma activity was lower in HD and Ic groups compared to C group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). AspAP plasma activity was higher in PDnt and AD groups than in PDt group ($P < 0.001$). AspAP activity was also higher in PDnt group than HD and Ic groups ($P < 0.001$ for both groups) and higher in AD group respect to HD ($P < 0.001$) and Ic ($P < 0.05$) groups (Fig. 1C). GluAP plasma activity was significantly lower in HD group compared to C group ($P < 0.01$), PDnt group ($P < 0.001$), AD group ($P < 0.001$) and Ic group ($P < 0.05$) (Fig. 1D). Finally, LeuAP plasma activity was higher in PDnt and AD groups respect to PDt ($P < 0.01$ for both groups). On the contrary, LeuAP activity was lower in HD and Ic groups respect to PDnt group ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively) and also respect to AD group ($P < 0.05$ and $P < 0.001$ respectively) (Fig. 1E).

Plasma aminopeptidase activities related to medication regime in Parkinson's disease

AlaAP, CysAP, AspAP and LeuAP plasma activities were significantly lower in PDt group than in PDnt group. To test if these differences were due to antiparkinsonian treatment and test the possible influence of drugs showed in Table 2, aminopeptidase activities were analyzed statistically. The enzymatic activity of AlaAP and CysAP was similar in patients with and without medication. AspAP activity was not dependent on medication, except in those under treatment with cabergoline ($P < 0.01$), rasagiline ($P < 0.01$) and selegiline ($P < 0.05$), among which activity was lower. GluAP activity also remained stable regardless of treatment, except for rasagiline ($P < 0.001$), which was related to lower activity. Finally, LeuAP activity did not change significantly in relation to medication either, except in the case of those treated with cabergoline ($P < 0.01$), rasagiline ($P < 0.01$) and selegiline ($P < 0.05$) for whom activity was lower.

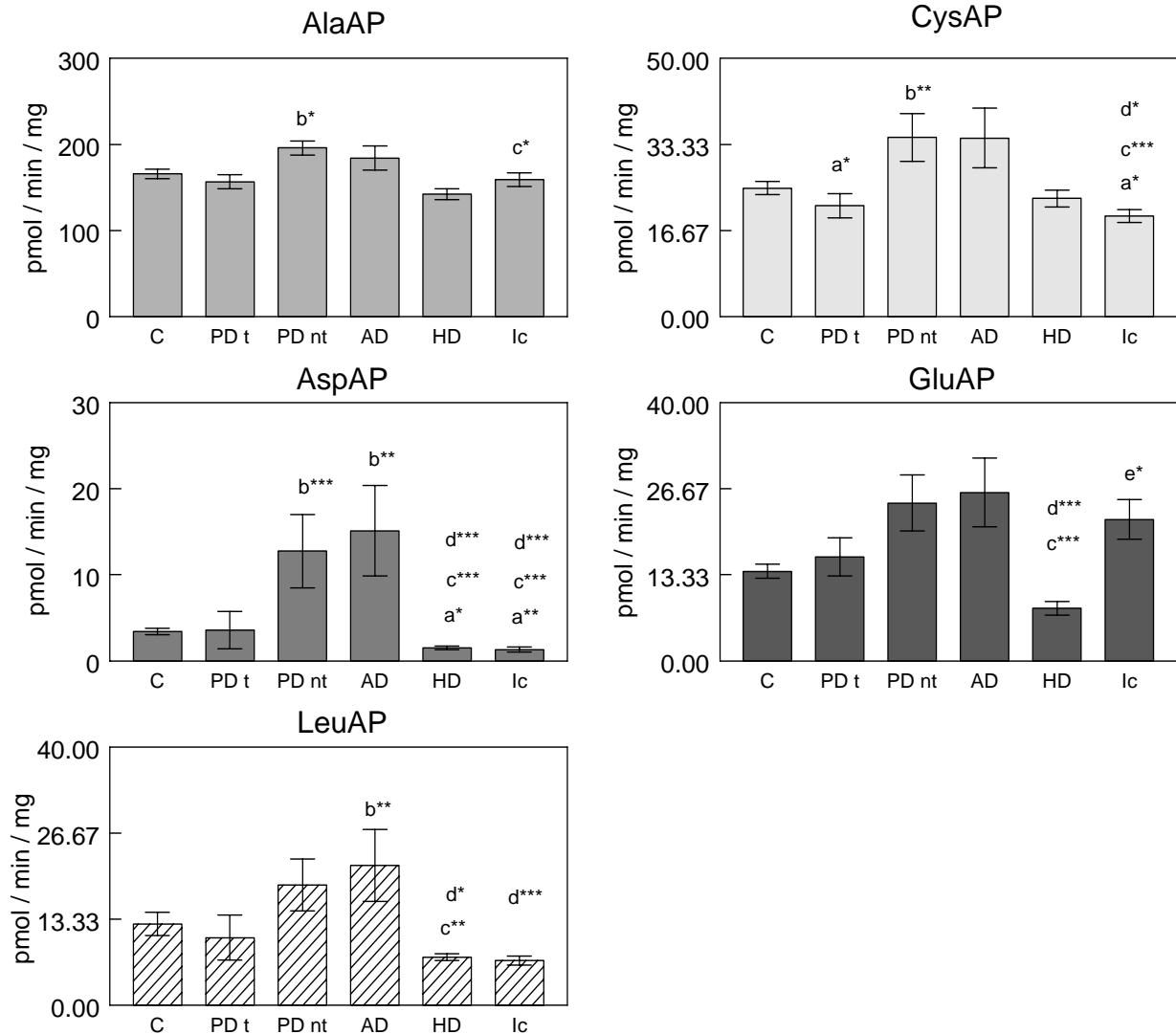


Figure 1. Plasma activity of AlaAP, CysAP, AspAP, GluAP and LeuAP, in picomoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per minute per milligram of protein. Values are mean \pm SEM. **a:** significance respect to C group; **b:** significance respect to PDt group; **c:** significance respect to PDnt group; **d:** significance respect to AD group; **e:** significance respect to HD group.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Isolation and detection of plasma aminopeptidases by SDS-PAGE/Immunoblotting and non denaturing PAGE

The results showed in this part correspond to qualitative analysis of aminopeptidases best recognized. Blood plasma contains very low levels of these proteins and thus it is very difficult to detect them. To avoid cross reactions between aminopeptidases and plasma proteins, the most abundant proteins, albumin and immunoglobulins, were extracted by immunaffinity columns. Plasma samples of next assays were taken from different subjects.

An example of Western blot of AlaAP from plasma of subjects belonging to groups C and PDnt is shown in Fig. 2. From left to right, the first two strips correspond to 75 and 50 nanograms, respectively, of commercial AlaAP with 140 kDa of molecular weight. The next two strips are AlaAP contained in 90 and 75 micrograms of plasma proteins, respectively, of a subject of C group. The last two strips are AlaAP in similar samples of a PDnt subject. AlaAP concentration in the PDnt patient was higher than in the C subject.

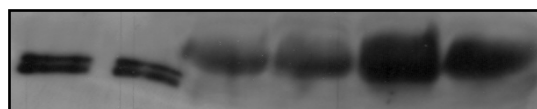


Figure 2. Western blot of AlaAP from blood plasma of C and PDnt subjects.

GluAP Western blot from blood plasma of C and PDnt subjects is shown in Figure 3. 170 nanograms of commercial GluAP were used to electrophoresis together with blood plasma samples, but it could not be detected in the respective strip. From left to right, the first two lines correspond to GluAP contained in 90 and 75 micrograms, respectively, of plasma proteins of a C subject. The last two strips are the GluAP contained in similar amounts of a PDnt subject. Molecular weight of GluAP is approximately 130 kDa. GluAP concentration was higher in PDnt patient than in C subject.

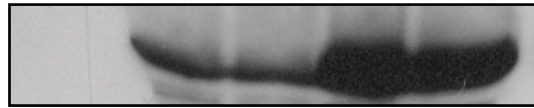


Figure 3. Western blot of GluAP from plasma of C and PDnt subjects.

Figure 4 shows a Western blot of AlaAP from plasma of C and HD subjects. From left to right, the first two strips correspond to 150 and 100 nanograms, respectively, of commercial AlaAP, with a molecular weight of 140 kDa. The next two strips are AlaAP contained in 90 and 75 micrograms, respectively, from plasma proteins of a C subject. The last two strips correspond to AlaAP contained in similar amounts of a HD subject. AlaAP concentration was lower in HD subject than in C subject.



Figure 4. Western blot of AlaAP from plasma of C and HD subjects.

Western blot of plasma GluAP from C and HD subjects is shown in Figure 5. As in Figure 3, the strip with commercial GluAP could not be revealed. From left to right, the first two lines are GluAP restrained in 90 and 75 micrograms, respectively, of plasma proteins of a C subject. The last two strips correspond to GluAP restrained in similar sample amounts of a HD subject. The approximate molecular weight of GluAP is 130 kDa. GluAP concentration was lower in HD subject than in C subject.



Figure 5. Western blot of GluAP from plasma of C and HD group subjects.

Figure 6 shows a blot of AlaAP from plasma of C and PDnt subjects, using non denaturing gel electrophoresis. Band intensity is proportional to enzymatic activity. From left to right, the first four strips correspond to AlaAP activity displayed by 400 and 200 micrograms (both in duplicate) of plasma proteins of a C subject. The next four

bands show AlaAP activity of similar sample amounts (in duplicate) taken from a PDnt subject. AlaAP activity was higher in PDnt subject than in C subject.

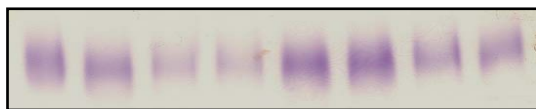


Figure 6. Non denaturing gel electrophoresis from plasma of C and PDnt subjects incubated with specific substrate of AlaAP.

Figure 7 shows a blot of LeuAP from plasma of C and PDnt subjects, using non denaturing gel electrophoresis. Band intensity is proportional to enzymatic activity. The first four bands are, left to right, LeuAP activity displayed by 400 and 200 micrograms (both amounts in duplicate) from plasma proteins of a C subject. The following four bands correspond to LeuAP activity displayed in similar amounts of a PDnt subject. LeuAP activity was higher in PDnt subject than in C subject.



Figure 7. Non denaturing gel electrophoresis from plasma of C and PDnt subjects incubated with specific LeuAP substrate.

Figure 8 shows a blot of AlaAP from plasma of C and HD subjects in non denaturing gel electrophoresis. Band intensity is proportional to enzymatic activity. From left to right, first four lines are AlaAP activity displayed in 400 and 200 micrograms sample (both amounts in duplicate) from plasma proteins of a C subject. The next four lines are AlaAP activity displayed in similar sample amounts of a HD subject. AlaAP activity was higher in C subject than in HD subject.

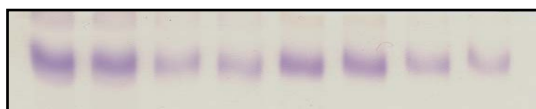


Figure 8. Non denaturing gel electrophoresis of plasma of C and HD subjects incubated with specific AlaAP substrate.

Figure 9 shows a blot of LeuAP from plasma of C and HD subjects. Band intensity is proportional to enzymatic activity. From left to right, the first three lines are LeuAP activity displayed in 400 (in duplicate) and 200 micrograms, respectively, from plasma proteins of a C subject. The next three lines are LeuAP activity displayed in similar amounts of a HD subject. LeuAP activity was higher in C subject than in HD subject.

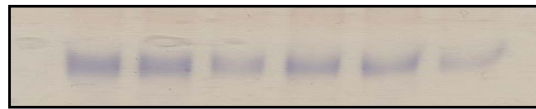


Figure 9. Non denaturing gel electrophoresis from plasma of C and HD subjects incubated with specific LeuAP substrate.

Lipid peroxides and lactate concentration in plasma

Plasma lipid peroxides (LPO) and lactate (LA) concentrations in control and patients groups are shown in Figure 10. We observed that **A.** Lipid peroxides were significantly lower in C group than in PDt ($P < 0.001$), PDnt ($P < 0.001$), HD ($P < 0.01$) and Ic ($P < 0.01$) groups. The lowest concentration was found in AD group, although there was not significant difference compared to C group. In patient groups, lipid peroxides were lower in AD than in PDt, PDnt, HD and Ic groups ($P < 0.001$). **B.** Plasma lactate was also lower in C group than in PDt ($P < 0.01$) and Ic ($P < 0.001$) groups. There were not significant differences among patient groups.

Plasma α -synuclein concentration in PD groups and its correlation with plasma aminopeptidase activities

Figure 11 shows plasma α -synuclein concentration in groups C, PDt and PDnt. Plasma α -synuclein was higher in PDt and PDnt groups than in C group ($P < 0.05$).

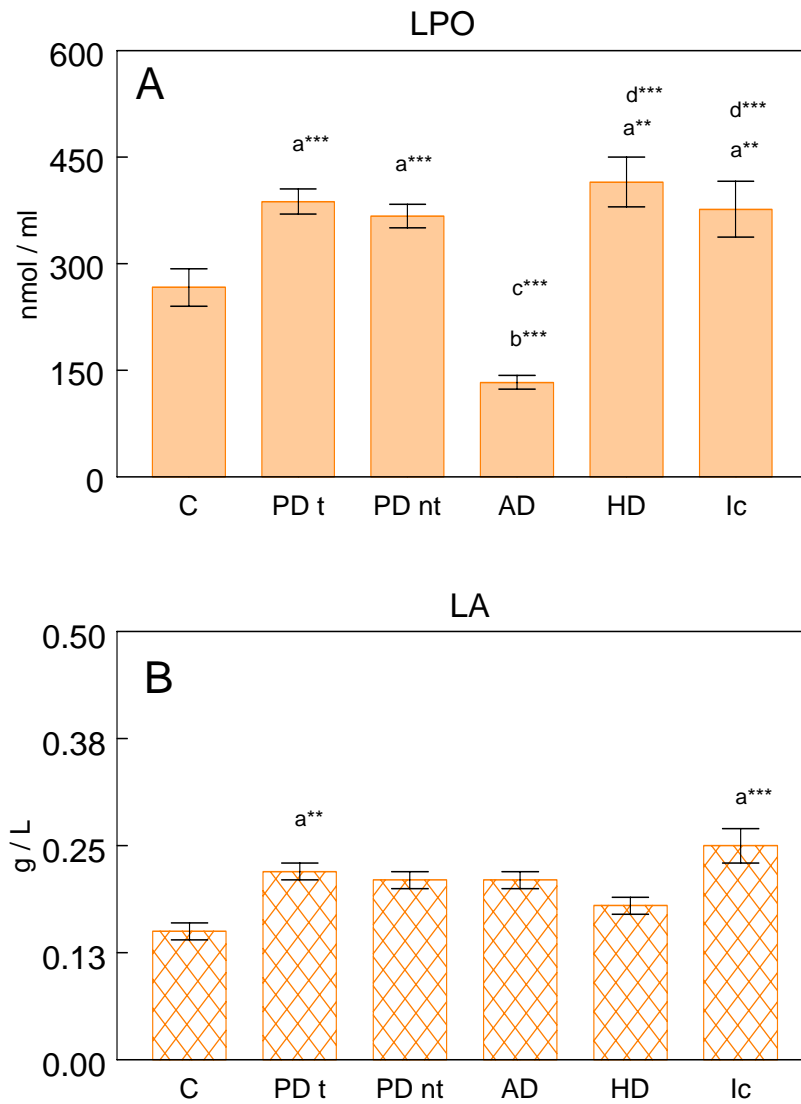


Figure 10. Plasma lipid peroxides and lactate concentrations of control and patients groups. Plasma lipid peroxides in nmol/mL and lactate in g/L. **a:** differences respect to C group; **b:** differences respect to PDt group; **c:** differences respect to PDnt group; **d:** differences respect to AD group. Mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

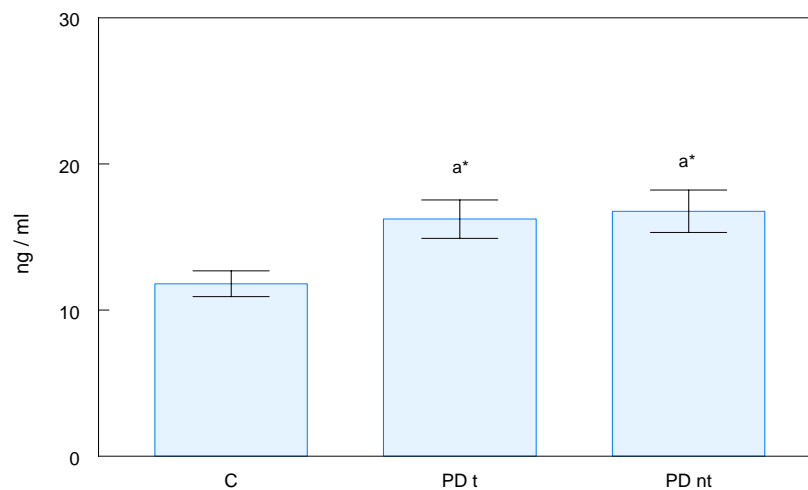


Figure 11. Plasma α -synuclein in groups C, PDt and PDnt. Concentration in ng/mL. **a:** difference respect to C group. Mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

It is possible that α -synuclein was hydrolyzed by aminopeptidases. If this was the case, it would be interesting to study the correlation between aminopeptidases and plasma α -synuclein. However, in this study we did not find any correlation between them (Table 4).

GROUP		AlaAP	CysAP	AspAP	GluAP	LeuAP
C	r	-0,0198	0,0826	-0,1578	0,0210	-0,1733
	P	0,8962	0,5852	0,2949	0,8900	0,2493
PDt	r	-0,1765	0,0329	0,1378	0,1918	0,1611
	P	0,2761	0,8403	0,3963	0,2358	0,3206
PDnt	r	0,0352	-0,0717	-0,0704	-0,0544	-0,0799
	P	0,8041	0,6135	0,6200	0,7019	0,5733

Table 4. Study of the possible correlation between plasma α -synuclein concentration and plasma AP activity in C, PDt and PDnt groups. r: coefficient of correlation.

P: significance.

DISCUSSION

One main feature of neurodegenerative diseases (PD, AD, HD) is a severe alteration in protein metabolism. Aminopeptidases constitute an important group of enzymes related to peptide and protein metabolism; for this reason, it is relevant to study their changes in activity in neurodegenerative diseases. Of these diseases, the only that has specific treatment is PD. Thus, we divided PD patients in two groups, without and with treatment, to assess if medication changes aminopeptidases activity. Our results showed that PDnt group presented a higher AP activity in plasma than PDt and this group showed, in general, similar activity than controls (lower activity in the case of CysAP). This suggests that PD cause an increase plasma AP activity and PD medication normalize the activity of these enzymes. Banegas et al. (2006a) found similar results CysAP activity in treated PD patients although this is the first time that AP activity is studied in early diagnosed PD patients without treatment. The influence of medication among subjects in the PDt group on AP activity was also individually analyzed. After comparing subjects in the PDnt group for major consumption drugs as levodopa, carbidopa, pramipexol and entacapone, we did not find significant differences. However, we found a decrease in AspAP and LeuAP activities in PDt patients taking cabergoline, rasagiline and selegiline, and a lower GluAP activity in PDt under treatment with rasagiline compared to non-taking patients. We conclude that, altogether, antiparkinsonian drugs contribute to normalize APs activity, as it has been explained above.

Dopaminergic synaptic terminals of basal ganglia release DA together with several peptides, all these being potential substrates of APs such as cholecystokinins, angiotensins and enkephalins (Waters et al., 1995). Although the role of these peptides in neurotransmission is poorly understood, it appears that they act as neuromodulators and are necessary for the correct functioning of the basal ganglia circuits. It has been reported that other monoaminergic transmitter system, serotonin, APs is important in the interaction with several peptides in serotonergic synapsis. Low AP activity has been observed in animals that up-express serotonin in rat brain (Cicin-Sain et al., 2008).

Besides characteristic motor symptoms, PD patients also have a high prevalence of autonomic dysfunctions, specially a decreased sympathetic innervation (Li et al.,

2002a), indicating that neurodegeneration also affect autonomic system neurons. In synapses of autonomic ganglia, many substrates of APs coexist with acetylcholine (ACh). Changes in AP activity may alter metabolism of the peptides released together with Ach. Also, changes in plasma AP activities may be related with autonomic alterations that occur in PD. In addition to autonomic dysfunction, changes in the hypothalamus-pituitary axis have been reported in PD. Thus, many studies have shown disturbances in the hormonal secretion from PD patients, such as reduction of somatostatin and β -endorphin in cerebrospinal fluid, Met-enkephalin in mesencephalon, putamen and pallidum, and Leu-enkephalin in striatum (Sandyk et al., 1987). Moreover, a substantial loss of orexin and melanin-concentrating hormone cells was detected in dorsomedial and perifornical hypothalamic regions from PD patients (Thannickal et al., 2007). Moreover, it was reported that DA therapy may affect the pituitary function through a decrease in prolactin secretion and an increase in growth hormone secretion (Schaefer et al., 2008). Several APs were identified in the CNS that inactive endogenous opioid peptides (Hui, 2007). APs was also reported to play a main role in the regulation of circulating hormones such as angiotensins and others blood pressure-controlling hormones and renal function (Banegas et al., 2006b; Speth et al., 2008). Recently, it was proposed other functions for angiotensins that may be regulated by APs. Ang IV promotes DA liberation in striatum (Stragier et al., 2007) and improves cholinergic transmission in rat hippocampus and other regions related to memory and cognitive functions (Albiston et al., 2003; Albiston et al., 2004). Ang II may stimulate the generation of ROS activating the mitochondrial enzyme NADPH oxidase, and liberating inflammatory cytokines and chemokines (Rodríguez-Pallares et al., 2008). These findings point to an involvement of APs in the physiopathology of PD. The decrease of APs activity may be responsible of autonomic and neuroendocrine dysfunctions. Potentially, APs would be used as biomarkers of PD and would provide information about progression of the disease.

We also isolated and characterized main plasma APs by electrophoretical techniques. Western blotting of denaturing AP allowed checking the existence of APs in plasma, although this technique was not suitable for enzymatic activity quantification. Also, results from non denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) revealed activity in the same direction (increase or decrease) to those obtained by fluorimetric assay, although it was not possible to quantify spectroscopically.

Furthermore, the LBs formation in dopaminergic neurons is related to the decreased protein degradation. α -Synuclein and ubiquitin are the main components in LBs (Cookson, 2005). The identification of these intracellular aggregates in living nigral neurons and the loss of dopaminergic neurons are both necessary to confirm the disease from the pathological point of view. Many studies have reported the detection of α -synuclein in biological fluids such as cerebrospinal fluid and plasma of PD patients (Borghi et al., 2000; El-Agnaf et al., 2003). It is a matter of debate if plasma α -synuclein is a protein secreted by normal neurons or released by damaged neurons. Our results showed significantly higher concentrations of plasma α -synuclein in both PD groups, PDt and PDnt respect to control group. Similar results were reported by El-Agnaf et al., (2006) and Lee et al., (2006a). However, so far, this is the first paper reporting changes in α -synuclein in early diagnosed patients without treatment. The increased concentration of α -synuclein found in PDt and PDnt suggest that LBs are associated to neurodegeneration and that this is an early event in PD.

We analyzed statistically the possible correlation between plasma AP activities and α -synuclein levels, but data did not show any correlation. That is, the release of α -synuclein and aminopeptidases are independent, but increased levels of APs in plasma of PD patients would suggest an attempt of the organism to metabolize higher concentrations of circulating α -synuclein fragments.

We also analyzed changes in AP activity in other neurodegenerative disorders such as HD and AD to assess the specificity of changes in APs activity. We found a general decrease in AP activity in HD. This suggested that the decrease may be related to a progressive neuronal death in striatum, and it is probably also due to hypothalamic and neuroendocrine changes showed by HD patients (Petersén et al., 2006). Other HD feature is huntingtin (htt) aggregates. Many studies *in vitro* have shown that htt toxicity is occasioned by small fragments proceeding from the N-terminal degradation in the proteasome (Hook, 2006). Buthani et al. (2007) identified the cytosolic AlaAP as the main enzyme able to degrade these poli-Q sequences. It is possible that the decrease in the AP activity may be related to the characteristic proteolytic stress in HD, collaborating with htt toxicity by decreasing its metabolism.

Although APs activities in AD patients tended to increase, we did not find significant changes compared to controls. These data were different to those obtained in PDt and HD groups. Nevertheless, the time course of AD, the different treatments, and the remarkable aging must be considered and analyzed (there were significant differences between C and AD groups in age; $P < 0.01$). Statistical analysis showed a positive relationship between Ala- and GluAP activities and age ($P < 0.01$; $P < 0.05$; respectively). Thus, this factor could be responsible of the higher AP activity found in AD. As in PD and HD, the formation of protein aggregates is other pathologic feature of AD, i.e. A β peptide and protein tau. Different studies reported a high heterogeneity in the N-terminal ends of A β peptide (Saido et al., 1995; Saido et al., 1996), suggesting APs as key enzymes in its degradation. Kuda et al. (1997) reported a lower GluAP activity in plasma from AD patients, founding an opposite relation between A β_{42} peptide concentration and GluAP activity in brain cortex of senile patients without dementia. Besides A β peptide, protein tau was proposed as a substrate for APs. Segunpta et al. (2006) showed tau protein degradation *in vitro* by cytosolic AlaAP. Also, a higher expression of cytosolic AlaAP was reported in transgenic mice cerebellum expressing human mutant tau and the lower expression regions of AlaAP coincided with higher aggregation of tau protein. In addition, these data were observed in brain cortex of AD and frontotemoral dementia (FTD) patients. This suggests that the higher expression of AlaAP in specific regions may be a compensatory mechanisms adopted by living neurons after a long time progression to reduce tau-induced neurodegeneration (Karsten et al., 2006). In summary, APs activity may have a crucial role in brain metabolism of pathological proteins.

We also assayed AP activity in patients with a non degenerative, acute, neurological disease such as ischemic ictus (Ic). Our results showed that AlaAP, LeuAP, and GluAP activities did not change in Ic group compared to C group. However, CysAP and AspAP activities were lower in Ic group than in C group. Therefore, changes in the pattern of AP activity are different to those observed in neurodegenerative diseases. These differences on AP activity may be due to the localization, extension of damaged regions and the duration of ischemic ictus. These factors are different to neurodegenerative diseases, with similar affected regions in each group and being both chronic and progressive diseases.

The second main objective was to analyze the relationship between oxidative stress and neurodegenerative diseases. Focusing on PD, in a previous work we found higher endogenous plasma LPO concentrations in PD patients under treatment, suggesting that they are chronically under systemic oxidative stress (Agil et al., 2006). These findings are in agreement with present data that show significantly higher plasma LPO concentrations in PDt (see figure 10A). Moreover, we assayed plasma LPO concentration in *de novo* patients, PDnt group, and we found significantly higher LPO concentration in this group. However, there were not significant differences between both PD groups. These results suggest that although medication was able to normalize APs activities, it did not improve oxidative stress. Dexter et al. (1994) reported a lower reduced glutathione concentration in SN of asymptomatic PD patients than in healthy subjects, proposing that oxidative stress phenomena are previous to neuronal loss. Furthermore, we analyzed plasma LA concentration as other index of mitochondrial dysfunction. Data showed significantly higher plasma LA concentration in PDt. These data, together with those obtained in measure of LPO, suggest a direct relationship between mitochondrial dysfunction and free radicals production. Also, the fact that antiparkinsonian medication does not improve oxidative stress suggests that oxidative processes pursue damaging basal ganglia, and thus, despite treatment PD is progressing.

Plasma LPO and LA concentrations were analyzed in the others neurodegenerative diseases. Significantly higher plasma LPO concentration was found in HD group. Impaired metabolism and oxidative stress have been demonstrated in brain tissue for human and rodent model of HD (Browne et al., 1999). Although impaired metabolism and mitochondrial abnormalities have also been found in peripheral tissues, direct evidence of increased oxidative stress was rarely studied in peripheral blood of HD patients. Our findings are in agreement with other studies in HD, showing increases in plasma oxidative stress measured as malondialdehyde (MDA) (Chen et al., 2007), LPO and GSH (Klepac et al., 2007). Moreover, these studies reported a significant positive correlation between plasma MDA or LPO and disease severity, suggesting that an increase in oxidative stress takes place before clinical symptoms of HD. On the other hand, plasma LPO concentration showed an important decrease in AD. These data are the opposite of those obtained in previous studies, showing that oxidative stress phenomena are increased in AD (Andersen, 2004; Butterfield et al., 2007). These works suggest that oxidative stress is an early event in AD (Galbusera et al., 2004) and

compensatory responses such as induction anti-oxidant enzymes, tau phosphorylation and NFT formation are activated in response to ROS production. Thus, the decrease in LPO concentration may be a compensatory response, and may provide some protective mechanisms to ensure neuronal survival (Zhu et al., 2004). Other alternative explanation is that the low LPO concentration found in AD group was a consequence of the long time course AD, and the activation of the compensatory responses or the prominent neuronal death produced a decrease in oxidative stress. It will be necessary to include a higher number of patients and to do an exhaustive analysis of plasma LPO concentration among AD patients to reach definite conclusions in this issue.

LPO and AL concentrations were also analyzed in Ic group. Our data showed a significant increase of LPO and AL concentrations in Ic. These findings are in agreement with the pathology of the disease, in which a complex cascade of metabolic events is initiated after brain ischemia and conclude with the ROS generation and reduced ATP production (Love, 1999; Martin et al., 2005). It is remarkable that in an acute disease as Ic, plasma LPO was elevated whereas in a long lasting progressive neurodegenerative disease as is AD, this oxidative stress marker was lower than in the control group.

In conclusion, APs activities change significantly in PD and others neurodegenerative diseases. Furthermore, specific treatment of PD leads not only to an improvement in motor symptoms, but also to normalization in plasma activities of APs. The others diseases showed a different pattern, with a tendency to an increase in AD, a decrease in HD, and a fluctuating pattern in the other group used as control of degenerative disease, Ic. Oxidative stress increase is a common feature of all neurodegenerative diseases as well as Ic, with the only exception of AD. If we take PD as a model, effective treatment of HD and AD must normalize APs activities and we believe that antioxidant protection treatment would be beneficial in all neurodegenerative diseases.

CONCLUSIONS

- 1) Plasma aminopeptidase activities are higher in patients suffering Parkinson's disease before starting treatment than after. Antiparkinsonian medication returns enzymatic activity to control values, except for cystine aminopeptidase.
- 2) The others neurodegenerative disorders studied, Huntington's disease and Alzheimer's disease, also cause significant changes in plasma aminopeptidase activities. It is remarkable the strong decrease found in Huntington's disease group.
- 3) Plasma aminopeptidase activities also suffer changes in ischemic ictus, despite it is a non neurodegenerative, non chronic, disease.
- 4) Plasma α -synuclein is higher in Parkinson's disease groups, regardless of they are with antiparkinsonian treatment or not. In this case, medication had not any effect.
- 5) Plasma α -synuclein concentration is not related to either treatment or aging. Our data suggest that is a clinical manifestation of the disease, probably due to an alteration of protein metabolism, and it is not related to the progression of the disease or the time lapse since it started.
- 6) Parkinson's disease patients have plasma lipid peroxides and lactate increased, although they had normal lipid concentrations. In this case, antiparkinsonian medication had not any effect.
- 7) Huntington's disease patients have plasma lipid peroxides increased, although they had normal lipid concentrations.

- 8) Ischemic ictus patients have plasma lipid peroxides increased, although they had normal lipid concentrations.

- 9) All neurodegenerative diseases have as common denominator increased concentrations of plasma lipid peroxides, except Alzheimer disease. This may be due to all of them have other pathologies accompanying to the disease, with a changeable treatment and a remarkable aging.

- 10) As general conclusion in Parkinson disease groups, we want to emphasize that our results show significant changes in markers of proteinic stress, oxidative stress and enzymatic activity of aminopeptidases. Specific treatment only returns aminopeptidase activities to control values, without change the others markers. We suggest that it will be a breakthrough when the antiparkinsonian medication achieved to improve oxidative and proteinic stress. This suggestion is extensive to Huntington's disease.

Abreviaturas

8. ABREVIATURAS

ACE	Enzima convertidora de Angiotensina (del inglés Angiotensin converting enzyme)
ACh	Acetilcolina (del inglés Acetylcholine)
ADAM	A desintegrin and metalloproteinase protein
ADRDA	Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
AIF	Factor inductor de la apoptosis (del inglés Apoptosis inducing factor)
AINESs	Anti-inflamatorios no esteroideos
AL	Ácido láctico (lactato)
AlaAP	Alanina aminopeptidasa
Ang	Angiotensina
APA	Aminopeptidasa A
APOE	Apolipoproteína E (del inglés Apolipoprotein E)
APP	Proteína precursora amiloide (del inglés amyloid precursor protein)
APs	Aminopeptidasas
APS	Persulfato amónico (del inglés Ammonium persulphate)
AspAP	Aspartato aminopeptidasa
ATP	Adenosin trifosfato (del inglés Adenosine-5'-triphosphate)
ATR	Receptor de angiotensina (del inglés Angiotensin receptor)
A β	Péptido β -amiloide (del inglés amyloid beta peptide)
BACE1	β -site APP cleaving enzyme 1
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro (del inglés Brain-derived neurotrophic factor)
BHT	Hidroxitolueno butilado (del inglés Butyled hydroxytoluene)
C	Control
CBN	Comité de Nomenclatura de Bioquímica (del inglés Commission on Biochemical Nomenclatura)
CCK	Colecistokinina (del inglés Cholecystokinin)
CCRCC	Carcinoma de células renales, variedad células claras (del inglés Clear-cell renal-cell carcinoma)
CE	Colesterol esterasa

ChRCC	Carcinoma de células renales cromóforas (del inglés Chromophobe renal cell carcinoma)
β-CIT	(Iodine-123)-β -carbomethoxy-4-iodophenyltropane
CO	Colesterol oxidasa
COMT	Catecol-O-metil transferasa (del inglés Catechol-O-methyl transpherase)
CoQ ₁₀	Coenzima Q ₁₀
COX-2	Ciclooxigenasa-2 (del inglés Cyclooxygenase-2)
CTFβ	Carboxy Terminal fragment of β-amyloid precursor protein
CysAP	Cistina aminopeptidasa
DA	Dopamina
DAT	Tranportador de dopamina (del inglés Dopamine transporter)
DAT-SCAN	Escáner de transporte activo de dopamina (del inglés Dopamine active transport scanner)
DDC	Dopa-d Descarboxilasa
DLB	Demencia asociada a los cuerpos de Lewy (del inglés Dementia with Lewy bodies)
DMSO	Dimetil sulfóxido (del inglés Dimethyl sulphoxide)
DSM-III-R	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition, Revised
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition
DTT	D-L-Ditiotreitol (del inglés Dithiothreitol)
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECE	Enzima convertidora de endotelina (del inglés endothelin converting enzyme)
ECL	Quimioluminiscencia acentuada (del inglés Enhanced chemiluminiscence)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEG	Electroencefalograma
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ELISA	Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial (del inglés endothelial nitric oxide synthase)

EP	Enfermedad de Parkinson
EPct	Enfermos de Parkinson con tratamiento
EPst	Enfermos de Parkinson sin tratamiento
FBK	Fast Black K salt
FDG	(Fluorine-18)-deoxyglucose
18F-dopa	(Fluorine-18)-dopa
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés Fibroblast growth factor)
FP-CIT	(Iodine-123)-fluoropropyl-carbomethoxy-4-iodophenyltropane
FTD	Demencia frontotemporal (del inglés Frontotemporal demetia)
g.l.	Grados de libertad
GBA	Glucosidase beta acid
GDNF	Factor neurotrófico derivado de células gliales (del inglés Glial cell-derived neurotrophic factor)
GK	Glicerol kinasa
GluAP	Glutamato-aminopeptidasa
Glu-MCA	Glu-4-metilcoumaril-7-amida (del inglés Glu-4-methylcoumaryl-7-amide)
GLUT	Transportador de glucosa (del inglés Glucose transporter)
GPO	Glicerol fosfato oxidasa
GPT	Glutamato-piruvato transaminasa
GSH	Glutation reducido (del inglés Glutathione)
Hcrt	Hipocretina (del inglés Hypocretin)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (del inglés High density lipoprotein)
HEAT	Huntingtina, factor de elongación 3, proteína fosfatasa 2A, TOR1 (del inglés Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A, TOR1)
HSDA	N-2-hydroxy-3-sulfopropyl-3,5-dimethoxyaniline
htt	Huntingtina (del inglés huntingtin)
IBs	Cuerpos de inclusión (del inglés Inclusion bodies)
IBZM	(Iodine-123)- 3-iodo-6-methoxybezamide
Ic	Ictus isquémico

ICD-10	International Classification of Diseases and Related Health Problems
icv	Intracerebroventricular
IDE	Enzima que degrada insulina (del inglés Insulin-degrading enzyme)
IGF	Factor de crecimiento de tipo insulina (del inglés Insulin-like growth factor)
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1 β	Interleukina-1 β (del inglés Interleukin-1 β)
IL-6	Interleukina-6 (del inglés Interleukin-6)
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés inducible nitric oxide synthase)
IRAP	Aminopeptidasa regulada por insulina (del inglés Insulin-regulated aminopeptidase)
IUBMB	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (del inglés International Union of Biochemistry and Molecular Biology)
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (del inglés International Union of Pure and Applied Chemistry)
LBs	Cuerpos de Lewy (del inglés Lewy bodies)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (del inglés Light density lipoprotein)
LeuAP	Leucina aminopeptidasa
L-LDH	L-lactato deshidrogenasa
LP	Lipasa
LPO	Peróxidos lipídicos (del inglés Lipid peroxides)
LPS	Lipopolisacárido
MAO-B	Mono-amino oxidasa B (del inglés Monoamine oxidase B)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPT	Proteína tau asociada a microtúbulos (del inglés Microtubule-associated protein <i>tau</i>)
MCH	Hormona concentrada de melanina (del inglés Melanin-concentrating hormone)

MCI	Deterioro cognitivo moderado (del inglés Mild cognitive impairment)
MDA	Malonil-di-aldehído (del inglés Malonyl-di-aldehyde)
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad (del inglés Major Histocompatibility)
MMP	Metaloproteinasas (del inglés Metaloproteinase)
MMS	Estado mental mini (del inglés Mini mental state)
MOPS	3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid
MPP ⁺	1-Metil-4-fenil piridina (del inglés 1-methyl-4-phenylpyridinium)
MPTP	1-Metil 4-fenil 1,2,3,6 tetrahidropiridina (del inglés 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)
β-NA	β-naftilamida (del inglés β-naphthylamide)
NAA	N-acetil-aspartato (del inglés N-acetyl aspartate)
NAD ⁺	Nicotinamida-adenina dinucleótico (del inglés Nicotinamide adenine dinucleotide)
NADH	Nicotinamida-adenina dinucleótido en su forma reducida
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NES	Señal de exportación nuclear (del inglés Nuclear export signal)
NFκB	Factor nuclear kappa B (del inglés Nuclear factor kappa B)
NFTs	Nudos neurofibrilares (del inglés neurofibrillary tangles)
NINCDS	National Institute of Neurological and Communication Disorders and Stroke
NLS	Señal de localización nuclear (del inglés Nuclear localization signal)
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico (del inglés N-methyl-D-aspartic acid)
NO	Óxido nítrico (del inglés Nitric oxide)
NOS	Óxido nítrico sintasa (del inglés Nitric oxide synthase)
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal (del inglés neuronal nitric oxide synthase)
NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (del inglés Non small cell lung cancer)

6-OHDA	6-hidroxidopamina (del inglés 6-Hydroxydopamine)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	Solución buffer fosfato (del inglés Phosphate buffer solution)
PEG	Polietilenglicol
PEG-CE	Polietilenglicol colesterol esterasa
PEG-CO	Polietilenglicol colesterol oxidasa
PET	Tomografía por emisión de positrones (del inglés Positron Emission Tomography)
PHF	Filamentos helicoidales pareados (del inglés Paired helical filaments)
pI	Punto isoeléctrico
PINK1	PTEN-induced kinase 1
PIPES	Piperazine-1,4-bis-(2-ethanesulfonic acid)
P-LAP	Leucina aminopeptidasa placentar (del inglés placental-leucine aminopeptidase)
PO	Peroxidasa
Poli-Q	Poliglutamina (del inglés Polyglutamine)
PRCC	Carcinoma de células renales papilares (del inglés Papillary renal cell carcinoma)
PSA	Aminopeptidasa sensible a puromicina (del inglés Puromycin sensitive aminopeptidase)
PSD-95	Postsynaptic density-95 protein
PSEN	Presenilina (del inglés Preseniline)
PVDF	Fluoruro de polivinilideno (del inglés Polyvinylidene fluoride)
PVN	Núcleo parvoventricular (del inglés Parvoventricular nucleus)
RAS	Sistema Renina-Angiotensina (del inglés Renin-angiotensin system)
RCC	Carcinoma de células renales (del inglés Renal cell carcinoma)
RE	Retículo endoplásmico
RM	Resonancia magnética
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés Reactive Oxygen Species)
SDS	Dodecil sulfato sódico (del inglés sodium dodecyl sulfate)

SEN	Sociedad Española de Neurología
SHR	Rata hipertensa de manera espontánea (del inglés Spontaneously hypertensive rat)
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNARE	Soluble NSF attachment receptor
SNC	Sistema nervioso central
SNCAIP	Synuclein alpha interacting protein
SNpc	Sustancia negra pars compacta
SOD	Superóxido dismutasa (del inglés superoxyde dysmutase)
SP	Sustancia P (del inglés Substance P)
SPECT	Tomografía computerizada por emisión de fotones (del inglés Single Photon Emission Computed Tomography)
SS	Salicilato sódico (del inglés Sodium salicylate)
TA	Tensión arterial
TAC	Tomografía axial computerizada
t-BuOOH	tert-butil-hidroperóxido
TH	Tirosin hidroxilasa (del inglés Tyrosine hydroxylase)
TNFR1	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (del inglés Tumor necrosis factor receptor type 1)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α (del inglés Tumoral necrosis factor alpha)
TSH	Hormona estimulante del tiroides (del inglés thyroid - stimulating hormone)
UBL-N	Ubiquitin like N-terminal
UCH-L1	Ubiquitin carboxi-terminal hidrolasa L1 (del inglés Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1)
UKPDSBB	Banco de erebros de la Asociación de Enfermedad de Parkinson de Reunio Unido (del inglés United Kingdom Parkinson's disease Society Brain Bank)
UPDRS	Ecala unificada para la valoración de la enfermedad de Parkinson (del ingles Unified Parkinson's Disease Rating Scale)
UPS	Sistema ubiquitin proteosoma (del inglés ubiquitin proteasome system)

VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor)
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
XO	Naranja de xilenol (del inglés Xylenol orange)

Bibliografía/Bibliography

9. BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2006; 7: 207-219.

Agid Y. Levodopa: is toxicity a myth? *Neurology* 1998; 50: 858-863.

Agil A, Durán R, Barrero F, Morales B, Araúzo M, Alba F, Miranda MT, Prieto I, Ramírez M, Vives F. Plasma lipid peroxidation in sporadic Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 2006; 240: 31-36.

Ahlskog JE, Uitti RJ, Lw PA, Tyce GM, Nickander KK, Petersen RC, et al. No evidence for systemic oxidant stress in Parkinson's or Alzheimer's disease. *Movement Disorders* 1995; 10: 566– 573.

Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FAO, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY. Evidence than angiotensin IV (AT₄) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 48623-626.

Albiston AL, Mustafa T, McDowall SG, Mendelsohn FAO, Lee J, Chai SY. AT₄ receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: potential mechanisms of memory enhancement. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2003; 14: 72-77.

Albiston AL, Fernando R, Ye S, Peck GR, Chai SY. Alzheimer's, angiotensin IV and an aminopeptidase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2004; 27: 765-767.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 4th edition*. APA: Washington DC, 1994.

Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Reviews Neuroscience* 2004; 5: S18-S25.

Arboix A, Alvarez-Sabín J, Soler L. Ictus. Clasificación y criterios diagnósticos. *Neurología* 1998; 13: 3-10.

Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Alvarez-Sabín J. Ictus. Tipos etiológicos y criterios diagnósticos. *Neurología* 2002; 17: 3-12.

Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Alvarez-Sabín J. Ictus. Tipos etiológicos y criterios diagnósticos. En: Díez Tejedor, E (Eds.) *Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus de la Sociedad Española de Neurología*. Barcelona: Prous Science, 2004.

Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 2004; 431: 805-810.

Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, Durán R, Segarra AB, de Gasparo M, Ramírez M. Plasma aminopeptidase activities in rats after left and right intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine. *Neuroendocrinology* 2004; 80: 219-224.

Banegas I, Ramírez M, Vives F, Alba F, Segarra AB, Durán R, de Gasparo M, Prieto I. Aminopeptidase activity in the nigrostriatal system and prefrontal cortex of rats with experimental hemiparkinsonism. *Hormone and Metabolic Research* 2005; 37: 1-3.

Banegas I, Barrero H, Durán R, Morales B, Luna JD, Prieto I, Ramírez M, Alba F, Vives F. Plasma aminopeptidase activities in Parkinson's disease. *Hormone and Metabolic Research* 2006a; 38: 758-760.

Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Segarra AB, Hermoso F, Durán R, Ramírez M. Brain aminopeptidases and Hypertension. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2006b; 7: 129-134.

Barrero FJ, Gómez MJ, Gutiérrez J, López MI, Casado A. Descriptive analysis of patients admitted to hospital for acute cerebrovascular disease. *Revista de Neurología* 2001; 32: 511-519.

Barzilai A, Melamed E. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine* 2003; 9: 126-132.

Bhutani N, Venkatraman P, Goldberg AL. Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasomes during protein degradation. *The EMBO Journal* 2007. 26: 1385-1396.

Bignall J. APOE gene dose in Alzheimer's disease. *Lancet* 1993; 342: 426.

Bird TD. Genetic aspects of Alzheimer's disease. *Genetics in Medicine* 2008; 10: 231-239.

Bogousslavsky J. Antithrombotic agents and cerebrovascular prevention: what is new? *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 1997; 127: 1941-1944.

Bohlen OV, Albrecht HD. The CNS renin-angiotensin system. *Cell and Tissue Research* 2006; 326: 599-616.

Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, Abbruzzese G, Tabaton M. Full length α -synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neuroscience Letters* 2000; 287: 65-67.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254.

Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF. Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathology* 1999; 9: 147-163.

Buhmann C, Arlt S, Kontush A, Möller-Bertram T, Sperber S, Oechsner M, Stverenburg HJ, Beisiegel U. Plasma and CSF markers of oxidative stress are increased in Parkinson's disease and influenced by antiparkinsonian medication. *Neurobiology of Disease* 2004; 15: 160-170.

Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology and Medicine* 2007; 43: 658-677.

Calopa M, Genís D, Sánchez A. Enfermedad de Huntington. En: Jiménez-Jiménez FJ, Luquin MR, Molina JA (Eds.). *Tratado de los trastornos del movimiento*. Madrid: IM&C, 1998.

Casper D, Yaparpalvi U, Rempel N, Werner P. Ibuprofen protects dopaminergic neurons against glutamate toxicity in vitro. *Neuroscience Letters* 2000; 289:201-4.

Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2005; 6: 919-930.

Chai SY, Fernando R, Peck GR, Ye S, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. The angiotensin IV/AT₄ receptor. *Cellular and Molecular Life Science* 2004; 61: 2728-2737.

Chen CM, Wu YR, Cheng ML, Liu JL, Lee YM, Le PW, Soong BW, Chiu DTY. Increased oxidative damage and mitochondrial abnormalities in the peripheral blood of Huntington's disease patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 359: 335-340.

Chen S, Le W. Neuroprotective therapy in Parkinson's disease. *American Journal of Therapeutics* 2006; 13: 445-457.

Cheung HS, Cushman DW. A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. *Biochimica et Biophysica Acta* 1971; 242: 190-193.

Cicin-Sain L, Simaga S, Froebe A, Abramié M. Central aminopeptidase and serotonin system activities: Possible relationship. *Neuropeptides* 2008; 42: 435-440.

Conway K, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT. Kinetic stabilization of the α -synuclein protofibril by a dopamine- α -synuclein adduct. *Science* 2001; 294: 1346-1349.

Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annual Review of Biochemistry* 2005; 74:29-52.

Cornetta T, Palma S, Aprile I, Padua L, Tonali P, Testa A, Cozzi R. Levodopa therapy reduces DNA damage in peripheral blood cells of patients with Parkinson's disease. *Cell Biology and Toxicology* 2008; DOI 10.1007/s10565-008-9086-6

Cotman CW, Poon WW, Rissman RA, Blurton-Jones M. The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer's disease neuropathology. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2005; 64: 104-112.

Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Schapira AH, Jenner P, Marsden CD. Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Annals of Neurology* 1994; 35: 33-44.

Dringen R, Mirko J, Gros C, Hirrlinger J. Aminopeptidase N mediates the utilization of the GSH precursor CysGly by cultured neurons. *Journal of Neuroscience Research* 2001; 66: 1003-1008.

Drucker-Colín R, Verdugo-Díaz L. Cell Transplantation for Parkinson's disease: present status. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2004; 24: 301-316.

El-Agnaf OMA, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DMA, Ikeda S, Cookson MR, Hardy J, Allsop D. α -Synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *The FASEB Journal* 2003; 17: 1945-1947.

El-Agnaf OMA, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court JA, Schlossmacher MG, Allsop D. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *The FASEB Journal* 2006; 20: 419-425.

Eliash S, Shteter N and Eilam R. Neuroprotective effect of rasagiline, a monoamine oxidase-B inhibitor, on spontaneous cell degeneration in a rat model. *Journal of Neural Transmission* 2005; 112: 991-1003.

Finsterer J. Lactate stress testing in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Neuroscience* 2005; 115: 583-591.

Galbusera C, Facheris M, Magni F, Galimberti G, Sala G, Tremolada L, Isella V, Guerini FR, Apollonio I, Gall-Kienle M, Ferrarese C. Increased susceptibility to plasma lipid peroxidation in Alzheimer disease patients. *Current Alzheimer Research* 2004; 1: 103-109.

Gandhi S, Wood NW. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics* 2005; 14: 2749-2755.

Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 2003; 24: 395-401.

Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921-923.

Gelb D, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Archives of Neurology* 1999; 56: 33-39.

Gil J, Larrinaga G, Meana J, Rodríguez-Puertas R, Irazusta J, Casis L. Regional and subcellular distribution of soluble aminopeptidase in the human and the rat brain: a comparative study. *Neuropeptides* 2001; 35: 276-284.

Gil JM, Rego AC. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *The European Journal of Neuroscience* 2008; 27: 2803-2820.

Goetz CG, Kompoliti K. Parkinson's disease. In: Beal MF, Lang AE, Ludolph A (Eds.) *Neurodegenerative diseases. Neurobiology pathogenesis and therapeutics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

Grammatopoulos TN, Outeiro TF, Hyman BT, Standaert DG. Angiotensin II protects against α -synuclein toxicity and reduces protein aggregation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 363: 846-851.

Greenberg LJ. Fluorometric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10⁻¹⁴ mole. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1962; 9: 430-435.

Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Experimental Neurology* 2005; 193: 279-290.

Hariyama Y, Itakura A, Okamura M et al. Placental aminopeptidase A as a possible barrier of angiotensin II between mother and fetus. *Placenta* 2000; 21: 621-627.

Herzig CM., Schoeppe W, Scherberich JE. Angiotensinase A (aminopeptidase A): properties of chromatographically purified isoforms from human kidney. *Journal of Chromatography* 1992; 625: 73-82.

Higuchi M, Iwata N, Saido TC. Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1751: 60-67.

Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967; 17: 427-442.

Hook VYH. Protease pathways in peptide neurotransmission and neurodegenerative disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2006; 26: 449-468.

Hui KS. Brain-Specific Aminopeptidase: from enkephalinase to protector against neurodegeneration. *Neurochemical Research* 2007; 32: 2062-2071.

Huang X, Chen H, Miller WC, Mailman RB, Woodard JL, Chen PC, Xiang D, Murrow RW, Wang YZ, Poole C. Lower low density lipoprotein cholesterol levels are associated with Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2007; 22: 377-381.

Hung AY, Schwarschild MA. Clinical trials for neuroprotection in Parkinson's disease: overcoming angst and futility? *Current Opinion in Neurology* 2007; 20: 477-483.

Ihara Y, Chuda M, Kuroda S, Hayabara T. Hydroxyl radical and superoxide dismutase in blood of patients with Parkinson's disease: relationship to clinical data. *Journal of Neurological Sciences* 1999; 170: 90–95.

Ino K, Nagasaka T, Okamoto T, Uehara C, Nakazato N, Mizutani S. Expression of aminopeptidase A in human gestational choriocarcinoma cell lines and tissues. *Placenta* 2000; 21: 63-72.

Jiménez-Jiménez FJ, Ortí-Pareja M, Gasalla-González T. Epidemiología, etiología y patogenia de la enfermedad de Parkinson. En: Jiménez-Jiménez FJ, Luquin MR, Molina JA (Eds.). *Tratado de los trastornos del movimiento*. Madrid: IM&C, 1998.

Karsten S, Sang TK, Gehman LT, Chatterjee S, Liu J, Lawless GM, Sengupta S, Berry RW, Pomakian J, Oh HS, Schutz C, Hui KS, Wiedau-Pazos M, Vinters HV, Binder LI, Geschwind DH, Jackson GR. A genomic screen for modifiers of tauopathy identifies puromycin-sensitive aminopeptidase as an inhibitor of tau-induced neurodegeneration. *Neuron* 2006; 51: 549-560.

Kawai M, Otake Y, Hara Y. High-molecular-mass isoform of aminopeptidase N/CD13 in serum from cholestatic patients. *Clinica Chimica Acta* 2003; 330: 141-149.

Keating DJ. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry* 2008; 104: 298-305.

Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *The Journal of Neuroscience* 2006; 26: 5256-5264.

Keller SR. Role of the insulin-regulated aminopeptidase IRAP in insulin action and diabetes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2004; 27: 761-764.

Kim S, Seo JH, Suh YH. α -Synuclein, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 2004; 10: S9-S13.

Kim YJ, Sapp E, Cuiffo BG, Sabin L, Yoder J, Kegel KB, Qin ZH, Detloff P, Aronin N, Difiglia M. Lysosomal proteases are involved in generation of N-terminal huntingtin fragments. *Neurobiology of disease* 2006; 22: 346-356.

Klepac N, Relja M, Klepac R, Hecimovic S, Babic T, Trkulja V. Oxidative stress parameters in plasma of Huntington's disease patients, asymptomatic Huntington's disease gene carriers and healthy subjects. *Journal of Neurology* 2007; 254: 1676-1683.

Knowles RB, Wyart C, Buldyrev SV, Cruz I, Urbanc B, Hasselmo ME, Stanley HE, Hyman BT. Plaque induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96: 5274-5279.

Kosinski CM, Landwehrmeyer B. Huntington's disease. In: Beal MF, Lang AE, Ludolph A (Eds.) *Neurodegenerative diseases. Neurobiology pathogenesis and therapeutics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

Kotlo K, Hughes DE, Herrera VLM, Ruiz-Opazo N, Costa RH, Robey RB, Danziger RS. Functional polymorphism of the Anpep gene increases promoter activity in the dahl salt-resistant rat. *Hypertension* 2007; 49: 467-472.

Kuda T, Shoji M, Arai H, Kawashima S, Saido TC. Reduction of plasma glutamyl aminopeptidase activity in sporadic Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 231: 526-530.

Kushleika J, Checkoway H, Woods JS, Moon JD, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD. Selegiline and lymphocyte superoxide dismutase activities in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 1996; 39: 378-381.

Larrinaga G, López JI, Casis L, Blanco L, Gil J, Agirregoitia E, Varona A. Cystinyl aminopeptidase activity is decreased in renal cell carcinomas. *Regulatory Peptides* 2007; 144: 56-61.

Lau LML, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MMB. Serum cholesterol levels and the risk of Parkinson's disease. *American Journal of Epidemiology* 2006; 164: 998-1002.

Lee H, Zhu X, Takeda A, Perry G, Smith MA. Emerging evidence for the neuroprotective role of α -synuclein. *Experimental Neurology* 2006c; 200: 1-7.

Lee PH, Lee G, Park HJ, Bang OY, Joo IS, Huh K. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Journal of Neural Transmission* 2006a; 113: 1435-1439.

Lee ST, Kim M. Aging and neurodegeneration. Molecular mechanisms of neuronal loss in Huntington's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* 2006b; 127: 432-435.

Li QX, Campbell CV, McLean CA, Thyagarajan D, Gai WP, Kapsa RM, Beyreuther K, Masters CL, Culvenor JG. Platelet α - and γ -synucleins in Parkinson's disease and normal control subjects. *Journal of Alzheimer's Disease* 2002b; 4: 309-315.

Li SH, Li XJ. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends in Genetics* 2004; 20: 146-154.

Li SH, Li XJ. Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington's disease. *Molecular Neurodegeneration* 2006; 1:19-29.

Li ST, Dendi R, Holmes C, Goldstein DS. Progressive loss of cardiac sympathetic innervation in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 2002a; 52: 220-223.

Liu B, Hong JS. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 304: 1-7.

López-Pousa S. Definición y epidemiología de la enfermedad de Alzheimer. En: Alberca R, López-Pousa R (Eds.) *Enfermedad de Alzheimer y otras demencias*. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2002.

Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathology* 1999; 9: 119-131.

Luan Y, Xu W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Current Medicinal Chemistry* 2007; 14: 639-647.

Mantle D, Falkous G, Ishiura S, Perry RH, Perry EK. Comparison of cathepsin protease activities in brain tissue from normal cases and cases with Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Parkinson's disease and Huntington's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 1995; 131: 65-70.

McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brain. *Neurology* 1988; 38: 1285-1291.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984; 34: 939-944.

Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathology* 1999; 9: 133-146.

Markianos M, Panas M, Kalfakis N, Vassilopoulos D. Low plasma total cholesterol in patients with Huntington's disease and first-degree relatives. *Molecular Genetics and Metabolism* 2008; 93: 341-346.

Martignoni E, Blandini F, Godi L, Desideris S, Pacchetti C, Mancini F, Nappi G. Peripheral markers of oxidative stress in Parkinson's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 1999; 27: 428-437.

Martin E, Rosenthal RE, Fiskum G. Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research* 2005; 79: 240-247.

Martin WR, Wieler M, Hanstock CC. Is brain lactate increased in Huntington's disease? *Journal of Neurological Sciences* 2007; 263: 70-74.

Matsumoto H, Nagasaka T, Hattori A, Rogi T, Tsuruoka N, Mizutani S, Tsujimoto M. Expression of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides. *European Journal of Biochemistry* 2001; 268: 3259-3266.

Michikawa M. Cholesterol Paradox: Is high total or low HDL cholesterol level a risk for Alzheimer's disease? *Journal of Neuroscience Research* 2003; 72: 141-146.

Mitsui T, Nombra S, Itakura A, Mizutani S. Role of Aminopeptidases in the Blood Pressure Regulation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2004; 27: 768-771.

Mohr JP, Albers GW, Amarenco P, Babikian VL, Biller J, Brey RL, Coull B, Easton JD, Gomez CR, Helgason CM, Kase CS, Pullicino PM, Turpie AG. Etiology of stroke. *Stroke* 1997; 28: 1501-1506.

Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annual Review of Neuroscience* 2005; 28: 57-87.

Mosley RL, Benner EJ, Kadiu I, Thomas M, Boska MD, Hasan K, Laurie C, Gendelman HE. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clinical Neuroscience Research* 2006; 6: 261-281.

Murakami H, Yokoyama A, Kondo K, Nakanishi S, Kohno N, Miyake M. Circulating aminopeptidase N/CD13 is an independent prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 8674-8679.

Mustafa T, Chai SY, Mendelsohn FAO, Moeller I, Albiston AL. Characterization of the AT₄ receptor in a human neuroblastoma cell line (SK-N-MC). *Journal of Neurochemistry* 2001; 76: 1679-1687.

Mytilineou C, Han SK, Cohen G. Toxic and protective effects of l-DOPA on mesencephalic cell cultures. *Journal of Neurochemistry* 1993; 61: 1470– 1478.

Nagatsu T, Sawada M. Cellular and molecular mechanisms of Parkinson's disease: neurotoxins, causative genes and inflammatory cytokines. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2006; 26: 781- 802.

Nakagawa-Hattori Y, Yoshino H, Kondo T, Mizuno Y, Herai S. Is Parkinson's disease a mitochondrial disorder? *Journal of the Neurological Sciences* 1992; 107: 29-33.

NINDS-NET PD Investigators. A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson's disease. *Neurology* 2006; 66: 664-671.

NINDS-NET PD Investigators. A pilot clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson's disease: 18-month results. *Clinical Neuropharmacology* 2008; 31: 141-150.

O'Connell PJ, Gerkis V, D'Apice AJF. Variable O-Glycosilation of CD13 (Aminopeptidase N). *The Journal of Biological Chemistry* 1991; 266: 4593- 4597.

Olanow CW. The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease. *Annual Review of Medicine* 2004; 55: 41-60.

Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonucelli U, Damier P, De Yebenes J, Gershanik O, Guttman M, Grandes F, Hallett M, Hornykiewicz O, Jenner P, Katzenschlager R, Langston WJ, LeWitt P, Melamed E, Mena MA, Michel PP, Mytilineou C, Obeso JA, Poewe W, Quinn N, Raisman-Vorazi R, Rajput AH, Rascol O, Sampaio C, Stocchi F. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Movement Disorders* 2004; 19: 997-1005.

Onyango, IG. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochemical Research* 2008; 33:589-597.

Pankratz N, Foroud T. Genetics of Parkinson's disease. *Genetics in Medicine* 2007; 9: 801-811.

Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P. Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2008; 65: 1272-1284.

Pérez-Severiano F, José-Segovia CR. Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Research* 2000; 862: 234-237.

Petersén A, Björkqvist M. Hypothalamic-endocrine aspects in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience* 2006; 24: 961-967.

Petrasch-Parwez E, Nguyen H, Löbbecke-Schumacher M, Habbes HW, Wiczorek S, Riess O, Andres KH, Dermietzel R, Von Hörsten S. Cellular and subcellular localization of huntington aggregates in the brain of a rat transgenic for Huntington's disease. *The Journal of Comparative Neurology* 2007; 501: 716-730.

Prigione A, Begni B, Galbusera A, Beretta S, Brighina L, Garofalo R, Andreoni S, Piolti R, Ferrarese C. Oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease: negative correlation with levodopa dosage. *Neurobiology of Disease* 2006; 23: 36-43.

Ramírez M, Prieto I, Martínez JM, Vargas F, Alba F. Renal aminopeptidase activities in animal models of hypertension. *Regulatory Peptides* 1997; 72: 155-159.

Ramírez M, Prieto I, Alba F, Vives F, Banegas I, de Gasparo M. Role of central and peripheral aminopeptidase activities in the control of blood pressure: a working hypothesis. *Heart Failure Reviews* 2008; 13: 339-353.

Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortés C. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2001; 12: 157-162.

Redjems-Bennani N, Jeandel C, Lefebvre E, Blain H, Vidailhet M, Guéant JL. Abnormal substrate level that depend upon mitochondrial function in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. *Gerontology* 1998; 44: 300-304.

Reynolds A, Laurie C, Mosley RL, Gendelman HE. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *International Review of Neurobiology* 2007; 82: 297-325.

Rodríguez-Pallares J, Rey P, Parga JA, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira- García JL. Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death by via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiology of Disease* 2008; 31: 58-73.

Rojo LE, Fernández JA, Maccioni AA, Jimenez JM, Maccioni RB. Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Archives of Medical Research* 2008; 39: 1-16.

Saido TC, Iwatsubo T, Mann DMA, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S. Dominant and differential deposition of distinct β -amyloid peptide species, $A\beta_{N3(pE)}$, in senile plaques. *Neuron* 1995; 14: 457-466.

Saido TC, Yamao-Harigaya W, Iwatsubo T, Kawashima S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of β -amyloid peptides deposited in human brain. *Neuroscience Letters* 1996; 215: 173-176.

Saido TC. Alzheimer's Disease as Proteolytic Disorders: Anabolism and catabolism of β -amyloid. *Neurobiology of Aging* 1998; 19: S69-S75.

Sandyk R, Iacono RP, Bamford CR. The hypothalamus in Parkinson disease. *Italian Journal of Neurological Science* 1987; 8: 227-234.

Savaskan E. The role of the brain renin-angiotensin system in neurodegenerative disorders. *Current Alzheimer Research* 2005; 2: 29-35.

Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology* 2008; 21: 172-188.

Schaefer S, Vogt T, Nowak T, Kann PH. Pituitary function and the somatotrophic system in patients with idiopathic Parkinson's disease under chronic dopaminergic therapy. *Journal of Neuroendocrinology* 2008; 20: 104-109.

Schapira A. Disease modification in Parkinson's disease. *Lancet Neurology* 2004; 3: 362-368.

Schapira A. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology* 2006; 66: S10-S23.

Schapira A, Bezard E, Brotchie J, Calon F, Collingridge G, Ferrer B, Hengerer B, Hirsch E, Jenner P, Le Novère N, Obeso JA, Schwarzschild MA, Spampinato U, Daviai G. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 2006; 5: 845-854.

Schapira A. Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurology* 2008; 7: 97-109.

Scherzer CR, Eklund AC, Morse LJ, Liao Z, Locascio JJ, Fefer D, Schwarzschild MA, Schlossmacher MG, Hauser MA, Vance JM, Sudarsky LR, Standaert DG, Growdon JH, Jensen RV, Gullans SR. Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104: 955-960.

Schoenfeld MA, Pantelie CM, Schwartz B. Clinical criteria for the switch of treatment strategies in Parkinson's disease. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2003; 105: 241-244.

Schulz JB, Matthews RT, Klockgether T, Dichgans J, Beal F. The role of mitochondrial dysfunction and neural nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1997; 174: 193-197.

Selvakumar P, Lakshmikuttyamma A, Dimmock JR, Sharma RK. Methionine aminopeptidase 2 and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1765:148-154.

Sengupta S, Horowitz PM, Karsten SL, Jackson GR, Geschwind DH, Fu Y, Berry RW, Binder LI. Degradation of tau protein by puromycin-sensitive aminopeptidase in vitro. *Biochemistry* 2006; 45: 15111-15119.

Serra JA, Dominguez RO, de Lustig ES, Guareschi EM, Famulari AL, Bartolomé EL, Marschoff ER. Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients. *Journal of Neural Transmission* 2001; 108: 1135-1148.

Sharma A, Kaur P, Kumar B, Prabhakar S, Gill KD. Plasma lipid peroxidation and antioxidant status of Parkinson's disease patients in the Indian population. *Parkinsonism and Related Disorders* 2008; 14: 52-57.

Shattock P, Whiteley P. Biochemical aspects in autism spectrum disorders: updating the opioid-excess theory and presenting new opportunities for biochemical intervention. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2002; 6: 175-183.

Shaw LM, Korecka M, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ. Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007; 6: 295-302.

Shibata K, Kajiyama H, Ino K, Nawa A, Nombra S, Mizutani S, Kikkawa F. P-LAP/IRAP-induced cell proliferation and glucose uptake in endometrial carcinoma cells via insulin receptor signaling. *BMC Cancer* 2007; 7: 15-21.

Shobab LA, Hsiung GR, Feldman HH. Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurology* 2005; 4: 841-852.

Sidhu A, Wersinger C, Moussa CEH, Vernier P. The role of α -synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004; 1035: 250-270.

Sivam SP. Influence of monoamine oxidase inhibitors on striatonigral dynorphin system: a study with deprenyl and clorgyline. *Neuropeptides* 1993; 25: 35-45.

Smigrodzki R, Parks J, Parker WD. High frequency of mitochondrial complex I mutations in Parkinson's disease and aging. *Neurobiology of Aging* 2004; 25: 1273-281.

Sohmiya M, Tanaka M, Wei Tak N, Yanagisawa M, Tanino Y, Suzuki Y, Okamoto K, Yamamoto Y. Redox status of plasma coenzyme Q10 indicates elevated systemic oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 2004; 223: 161-166.

Song L, Wilk S, Healy SP. Aminopeptidase A antiserum inhibits intracerebroventricular angiotensin II-induced dipsogenic and pressor responses. *Brain Research* 1997; 744: 1-6.

Sorrentino G, Bonavita V. Neurodegeneration and Alzheimer's disease: the lesson from taupathies. *Neurological Sciences* 2007; 28: 63-71.

Speth R, Karamyan V. The significance of brain aminopeptidases in the regulation of the actions of angiotensin peptides in the brain. *Heart Failure Reviews* 2008; 13: 299-309.

Spillantini MG, Crowther RA, Jacks R, Hasegawa M, Goedert M. Alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 1998; 95: 6469-6473.

Spires TL, Hannan AJ. Molecular mechanisms mediating pathological plasticity in Huntington's disease and Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 2007; 100: 874-882.

Stragier B, Demaegdt H, De Bundel D, Smolders I, Sarre S, Vauquelin G, Ebinger G, Micote Y, Vanderheyden P. Involvement of insulin-regulated aminopeptidase and/or aminopeptidase N in the angiotensin IV-induced effect on dopamine release in the striatum of the rat. *Brain Research* 2007; 1131: 97-105.

Suganuma T, Ino K, Shibata K, Nomura S, Kajiyama H, Kikkawa F, Tsuruoka N, Mizutani S. Regulation of aminopeptidase A expression in cervical carcinoma: role of tumor-stromal interaction and vascular endothelial growth factor. *Laboratory Investigation* 2004; 84: 639-648.

Swerdlow RH, Parks JK, Miller SW, Tuttle JB, Trimmer PA, Sheehan JP, Bennett JP, Davis RE, Parker WD. Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 1996; 40: 664-671.

Tang-Wai D, Josephs KA, Petersen RC. Alzheimer's disease-overview. In: Beal MF, Lang AE, Ludolph A (Eds.) *Neurodegenerative diseases. Neurobiology pathogenesis and therapeutics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

Thannickal TC, Lai YY, Siegel JM. Hypocretin (orexin) and melanin concentrating hormone loss and the symptoms of Parkinson's disease. *Brain* 2007; 130: 1586-1595.

Tapia-Núñez J, Chaná-Cuevas P. Diagnóstico de la enfermedad de Parkinson. *Revista de Neurología* 2004; 38: 61-67.

Taylor A. Aminopeptidases: structure and function. *The FASEB Journal* 1993; 7: 290-298.

Tobe H, Kojima F, Aoyagi T, Umezawa H. Purification by affinity chromatography using amastatin and properties of aminopeptidase A from pig kidney. *Biochimica et Biophysica Acta* 1980; 613: 459-68.

Tokuhara T, Hattori N, Ishida H, Iría T, Higashiyama M, Kodama K, Miyake M. Clinical significance of aminopeptidase N in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2006; 12: 3971-3978.

Tolosa E, Wenning G, Poewe W. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurology* 2006; 5: 75-86.

Travis J, Bowen J, Tewksbury D, Johnson D, Pannell R. Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. *The Biochemical Journal* 1976; 157: 301-306.

Trushina E, McMurray CT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 2007; 145: 1233-1248.

Tsujimoto M, Hattori A. The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1751: 9-18.

Tsujimoto M, Goto Y, Maruyama M, Hattori A. Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure. *Heart Failure Reviews* 2008; 13: 285-291.

Ukponmwan OE, Ruprecht J, Dzoljic M. An analgesic effect on enkephalinase inhibition is modulated by monoamine oxidase-B and REM sleep deprivations. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1986; 332 (4): 376-379.

Upadhyya SC, Hegde AN. Role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease. *BMC Biochemistry* 2007; 8: S12-S19.

Valenza M, Cattaneo E. Cholesterol dysfunction in neurodegenerative diseases: Is Huntington's disease in the list? *Progress in Neurobiology* 2006; 80: 165-176.

Valera AG, Díaz-Hernández M, Hernández F, Lucas JJ. Testing the possible inhibition of proteasome by direct interaction with ubiquitylated and aggregated huntingtin. *Brain Research Bulletin* 2007; 72: 121-123.

Van der Walt J, Nicodemus KK, Martin ER, Scout WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons L, Pahwa R, Stern M B, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, McLaurin AC, Middleton LT, Scout BL, Schemechel DE, Perick-Vance MA, Vance JM. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson's disease. *American Journal of Human Genetics* 2003; 72: 804-811.

Verbaan D, Marinus J, Visser M, van Rooden SM, Stiggelbout AM, van Hilten JJ. Patient-reported autonomic symptoms in Parkinson's disease. *Neurology* 2007; 69: 333-341.

Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* 2003; 4: 1-11.

Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. The lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of α -synuclein aggregates. *Neuropathology* 2007; 27: 494-506.

Walker FO. Huntington's disease. *Lancet* 2007; 369: 218-228.

Waters SM, Konkoy CS, Davis TP. Neuropeptide metabolism in intact, regional brain slices: effect of dopamine agents on substance P, cholecystokinin and met-enkephalin degradation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1995; 274: 783-789.

Waters SM, Rounseville MP, Davis TP. Effect of dopaminergic drugs on processing and degradative neuropeptidase mRNA in rat frontal cortex and caudate-putamen. *Brain Research* 1997; 754: 28-34.

Werner P. The need for neuroprotective therapies in Parkinson's disease. A clinical perspective. *Neurology* 2006; 66: S2-S9.

Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the etiology of Parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology* 2007; 150: 963-976.

Wright JW, Mizutari S, Murray CE, Amir HZ, Harding JW. Aminopeptidase-induced elevations and reductions in blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension* 1990; 8: 969-974.

Zhu X, Raina AK, Lee H, Casadesus G, Smith MA, Perry G. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Research* 2004; 1000: 32-39.

