LIDIA MITIKO YSHII

**EFEITOS DA ALFA-SINUCLÉINA NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE
DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KB EM CÉLULAS SH-SY5Y**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

LIDIA MITIKO YSHII

**EFEITOS DA ALFA-SINUCLEÍNA NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE
DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KB EM CÉLULAS SH-SY5Y**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: **Farmacologia**

Orientador: **Prof. Dr. Cristoforo Scavone**

Versão Original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Yshii, Lidia Mitiko.

Efeitos da alfa-sinucleína na modulação da atividade do fator de transcrição nuclear kB em células SH-SY5Y / Lidia Mitiko Yshii. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Cristoforo Scavone.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Neuroinflamação e doenças neurodegenerativas.

Versão do título para o inglês: Activation of NFkB induced by alpha-synuclein in SH-SY5Y cells.

Descritores: 1. Doença de Parkinson 2. Biologia molecular 3. Alfa-sinucleína 4. Dopamina 5. Neurodegeneração I. Scavone, Cristoforo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0120/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Lidia Mitiko Yshii.

Título de Dissertação: Efeitos da alfa-sinucleína na modulação da atividade do fator de transcrição nuclear kB em células SH-SY5Y.

Orientador (a): Cristoforo Scavone.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a//, considerou

() **Aprovado (a)**

() **Reprovado (a)**

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **96** nas fls. **73** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Cristoforo Scavone, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeitos da α -sinucleína na modulação da atividade do fator de transcrição NF-kappa B em células SH-SY5Y** do qual participou(aram) o(s) alunos **Lídia Mitiko Yshii, Lucas A M Franco, Sabrina Degaspari, Andréa Vasconcelos, Paula Kinoshita e os pesquisadores Carolina Dermarchi Munhoz, Elisa M.Kawamoto, Mark Mattson**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **17.09.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 17 de setembro de 2009.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CERTIFICADO

Certificamos, nos termos do artigo 74, parágrafo único, inciso 5, alínea "b", do Estatuto da Universidade de São Paulo, que **LIDIA MITIKO YSHII**

portador da identidade: **30.513.375-5**

concluiu o curso de Extensão Universitária na modalidade de **ATUALIZAÇÃO**: "Curso de Proteção Radiológica".

sob a responsabilidade **do Instituto de Ciências Biomédicas.**

São Paulo, 17 de Fevereiro de 2005.

Prof. Dr. Henrique Krieger
Diretor da Unidade

Prof. Dr. José Maria Alvarez Mosig

Presidente da Comissão de Cultura e Extensão Universitária

PRÓ-REITORIA DE
CULTURA E EXTENSÃO
UNIVERSITÁRIA

Para meus pais, e Alexandre

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Cristoforo Scavone, por me aceitar em seu laboratório, pelas diversas oportunidades oferecidas e pela confiança depositada em mim. Muito obrigada pelo seu incentivo, paciência e ensinamentos, que contribuíram para o meu crescimento profissional.

Agradeço à Profa. Dra. Carolina Munhoz, pelo estímulo, confiança e contribuição durante o desenvolvimento da minha tese; e à Profa. Dra. Christina Avellar (INFAR, Unifesp), pela importante colaboração e discussões científicas.

Gostaria de agradecer a todos os colegas do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular e Laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação, pela convivência agradável e troca de experiências. Agradeço especialmente às pessoas que me ajudaram a tornar este trabalho uma realidade: Andrea Vasconcelos, Ana Maria Orellana, Camila Matsubara, Diana Andreotti e Paula Kinoshita; muito obrigada pelo auxílio nos protocolos experimentais e troca de idéias construtivas, além da amizade que nasceu entre nós.

À Larissa Lima, um exemplo de excelência profissional, sou mais do que grata pelo apoio técnico e burocrático; e pelo carinho e paciência que me foram dispensados.

Gostaria de agradecer aos amigos e colegas Carolina Bueno, Felipe Sampaio, Dra. Juliana Gregório, Mari Kussuki, Patrícia Duarte e Roberta Ferrari, pela ajuda e apoio que recebi durante o primeiro ano do meu doutorado.

Agradeço a todos que me cederam equipamentos, reagentes ou tempo para ensinar técnicas: professores doutores Carlos Menck, Emer Ferro, Eugenia Strauss, Irene Yan, Lucia Lopes, Luiz Britto, Marcelo Muscara, Mari Sogayar, Mark Mattson, Pamela McLean, Regina Markus, Robert Sapolsky, Rosana Camarini, Rui Curi; doutores Elisa Kawamoto, Jean Schatzmann, Lilian Russo, Lucilia Lepsch, Marcos Demasi, Simone Teixeira; Adilson Alves, Antonio Turri, Daniela Soltys, Dayson Friaça, Felipe Viecelli, Juliana Florenzano, Leandro Mantovani, Sabrina Soares e Thais Martins.

À Selma Rigonatti e Camila Trindade, secretárias da Pós-graduação do Departamento de Farmacologia, por todo apoio burocrático e pronto atendimento; à Monica Amaral, bibliotecária do ICB, pelo trabalho de revisão e normalização da tese.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Grazia Spillantini, que me deu a oportunidade de trabalhar em seu laboratório em Brain Research Centre (Universidade de Cambridge, Reino Unido). Obrigada pelos ensinamentos e discussões, que me foram essenciais para uma visão mais crítica da ciência. Agradeço aos colegas do grupo, Kristine Westmore, Manuela Mellone, Romina Vuono, Salvatore Valenti e Dra. Sujeong Yang, pela convivência amigável e pela troca de experiências. Gostaria de agradecer em especial os doutores Aviva Tolkovsky e Oleg Anichtchik, que tiveram paciência comigo e me proporcionaram um aprendizado científico incrível durante o meu doutorado sanduíche. Ainda, agradeço aos professores e colegas do BRC pelo convívio e discussões científicas nos seminários semanais. Sou igualmente grata às técnicas e secretárias do BRC, Helen Gossage, Maria Cassiano, Dra. Nathalie Bull e Trish Jansen por me ensinar a utilizar os equipamentos, e pelo apoio burocrático e administrativo.

À minha família, pelo apoio incondicional que recebi.

Gostaria de agradecer a Alexandre Denadai Souza — meu porto seguro e colaborador constante — “Obrigada” me parece muito pouco, mas espero que você aceite.

Finalmente, a Deus, por acolher os humildes de espírito.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo no país e no exterior e apoio financeiro.

À agência de fomento científico europeu Parkinson’s Disease Society (Reino Unido).

“O comandante olhou Fermina Daza e viu em suas pestanas os primeiros lampejos de um orvalho de inverno. Depois olhou Florentino Ariza, seu domínio invencível, seu amor impávido, e se assustou com a suspeita tardia de que é a vida, mais que a morte, a que não tem limites.

— E até quando acredita o senhor que podemos continuar neste ir e vir do caralho? — perguntou.

Florentino Ariza tinha a resposta preparada havia cinquenta e três anos, sete meses e onze dias com as respectivas noites.

— Toda a vida — disse.”

Gabriel Garcia Marquez, “O amor nos tempos do cólera”

RESUMO

Yshii LM. Efeitos da alfa-sinucleína na modulação da atividade do fator de transcrição nuclear κ B em células SH-SY5Y [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A Doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo. Suas características e seus sintomas neuropatológicos são bem definidos, mas sua etiologia ainda continua desconhecida. A DP esporádica é caracterizada anatomo-patologicamente pela presença de Corpos de Lewy, que são agregados lipoproteicos que se encontram no interior do neurônio. A α -sinucleína é uma proteína solúvel presente nos terminais pré-sinápticos de vários sistemas de transmissão. Evidências sugerem que esta proteína é um componente fundamental dos Corpos de Lewy localizados nos neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal de pacientes portadores de DP. Postula-se que a α -sinucleína possui uma função fundamental na patogênese da DP, pois pode afetar a homeostase de neurônios dopaminérgicos, levando ao aumento da dopamina no citosol e consequente estresse oxidativo. O fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) participa da regulação de respostas imunes, inflamatórias e morte celular. No sistema nervoso central este fator está presente em diversos tipos de células nervosas e seu papel é paradoxal, ora apontado como neurotóxico, ora como neuroprotetor. O NF κ B pode ser estimulado por vários fatores entre eles neurotransmissores (por exemplo: dopamina e glutamato), estresse e proteína β -amilóide. Neste trabalho, pretendemos estudar as modificações moleculares nas células SH-SY5Y transduzidas com a α -sinucleína na sua forma selvagem (WT), mutante (A30P) e truncada (1-120) e tratadas com meio condicionado (CM) (proveniente do tratamento da glia com LPS) ou TNF. Analisamos a modulação da atividade do NF- κ B, onde observamos o aumento da atividade quando as células foram tratadas com TNF mas não com CM. Ainda, observamos que ocorre diminuição da fosforilação da proteína MAPK42/44 durante o mesmo tratamento, e que esta diminuição pode estar ligada ao aumento da morte celular.

Palavras-chave: Alfa-sinucleína. Doença de Parkinson. Dopamina. Neurodegeneração.

ABSTRACT

Yshii LM. Activation of transcription factor κ B induced by alpha-synuclein in SH-SY5Y cells [Ph.D. thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Parkinson's Disease (PD) is a neurodegenerative disease. The characteristics and symptoms are well defined; nevertheless its etiology remains unknown. The sporadic PD is characterized by the presence of Lewy Body (aggregate of proteins) inside the neurons. Alpha-synuclein is a soluble protein present in the pre synaptic terminal of neurons. Evidences suggest that this protein is a fundamental component of Lewy bodies localized in the dopaminergic neurons of PD patients. It is already known that alpha-synuclein has a fundamental role in pathogenesis of PD, because it can affect the homeostasis of dopaminergic neurons, leading to increase of dopamine in the cytosol and consequent oxidative stress. The nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) regulates the immune, inflammatory and cell death responses. In the central nervous system, this factor is present in several types of cells and its role is paradoxal, since it can be neurotoxic or can be protective. The NF κ B can be stimulated by several factors, including dopamine, glutamate, stress and β -amyloid protein. In this work, we observed the molecular modification in SH-SY5Y cells transduced with alpha-synuclein (wild-type, A30P and truncated 1-120) and treated with conditioned medium (CM) (from primary culture of glia treated with LPS) or TNF. We analyzed the modulation of NF- κ B activity, in which was observed that the activity was increased when the cells were treated with TNF but not with CM. Moreover, we show that there is a decrease of MAPK42/44 phosphorylation during the treatment, and this decrease is linked to the increase of cell death of these cells overexpressing alpha-synuclein.

Key words: Alpha-synuclein. Parkinson's Disease. Dopamine. Neurodegeneration.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

κ B - Kappa B

μ m - micrômetro

μ g - micrograma

μ L - microlitro

A30P - Alanina30Prolina

α - Alfa

AMC - Autofagia Mediada pela Chaperona

β - Beta

BSA - albumina de soro bovino

$^{\circ}$ C - Grau Celsius

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

cDNA - DNA complementar

Ci - Curie

CO₂ - Dióxido de carbono

DAPI - *4'-6-Diamidino-2-phenylindole*

DMEM - *Dulbecco's modified Eagles medium*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DO - Densidade óptica

DOPA - L-dihidroxifenilalanina

DP - Doença de Parkinson

DTT - Dithiothreitol

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

eGFP - *enhanced Green Fluorescent Protein*

fmol - Fentomol

g - RCF (*relative centrifugal force*)

GFAP - Glial fibrilar ácida da proteína

HCL - Cloreto de hidrogênio

HEK - *Human embryonic Kidney*

HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

I κ B - Proteína inibitória κ B

IKK - complexo de quinases C

IL-1 β -interleucina 1 β

IL-6 - -interleucina 6

iNOS - Óxido Nítrico Sintase induzível

IRES - *Internal Ribosome Entry Site*

KCL - Cloreto de Potássio

kDa - Quilodalton

KH₂PO₄ - Fosfato de potássio

ANOVA - análise de variância

L - litro

LDH - Lactato desidrogenase

LPS - Lipopolissacarídeo bacteriano

M - Molar

mA - Miliamperes

Meio LB - Meio de Luria-Bertani

mg - miligrama

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

MgSO₄ - Sulfato de magnésio

Min. - minutos

mL - Mililitro

mM - milimolar

mmol - milimol

MOPS - *3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*

MSNs - Neurônios espinhosos médios

Na₂HPO₄ - Fosfato de hidrogênio dissódico

NAC - componente não amilóide

NaCl - cloreto de sódio

NaF - Fluoreto de Sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NEMO - NF-κB *essential modifier*

NF-κB - fator de transcrição nuclear kappa B

ng - nanograma

NGF - *Nerve Growth Factor*

nm - nanômetro

NP-40 - Phenoxyethoxyethanol Nonil (Tergitol do tipo NP-40)

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR - Reação em cadeia de polimerase

PFA - paraformaldeído

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol - Picomol

PMSF - *phenylmethanesulfonylfluoride*

q.s.p. - quantidade suficiente para

RNA - ácido ribonucleico

RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro

RNase - Ribonuclease

RPM - rotações por minuto

RPMI - Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

SBF - Soro bovino fetal

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*

SNARE - *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*

SNCA - gene que codifica a α -sinucleína humana

SNpc - Substância Negra *pars compacta*

TE - Tris-EDTA

TH - Tirosina hidroxilase

TNF - Fator de necrose tumoral

TNFR1 -Receptor 1 de fator de necrose tumoral

TU - Unidade de Transdução

U - Unidade

UPS - sistema ubiquitina proteassoma

UV - ultra violeta

V - Volts

v/v - volume/volume

VMAT2 - Transportador Vesicular de monoamina 2

VTA - área tegmental ventral

WT - selvagem (*Wild Type*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 α -Sinucleína e Doença de Parkinson.....	19
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Estratégica de construção dos vetores lentivirais pHRWT α -sinIG, pHRA30Pa- sinIG e pHR(1-120) α -sinIG	25
3.1.1 Reação de PCR para amplificação da região codificadora da α - sinucleína WT, A30P ou 1-120.....	27
3.1.2 Extração e purificação do DNA do gel de agarose	27
3.1.3 Digestão e precipitação da região codificadora da α -sinucleína WT, A30P ou 1-120	28
3.1.4 Preparo do vetor pHRIG para subclonagem do inserto WT α -sin, A30Pa-sin e 1-120 α -sin	28
3.1.5 Subclonagem dos insertos WT α -sin, A30Pa-sin e 1-120 α -sin no vetor pHRIG	29
3.2 Preparação de bactérias quimiocompetentes	30
3.3 Transformação das bactérias com plasmídeos	30
3.4 Verificação de clones positivos	31
3.5 Sequenciamento	31
3.6 Extração de DNA plasmideal em pequena escala (miniprep)	32
3.7 Preparação de DNA plasmideal em grande escala (Maxiprep)	33
3.8 Células SH-Y5Y e HEK293T	33
3.9 Produção do lentivírus.....	34
3.10 Titulação viral	35
3.11 Transdução das células SH-SY5Y com o lentivírus.....	36
3.12 Cultura primária de glia	36
3.13 Ensaio de viabilidade celular: liberação de lactato desidrogenase (LDH) ..	37
3.14 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (<i>Gel shift</i>) para o NF- κ B.....	37
3.15 Ensaio de Western Blot	38

3.16 Imunofluorescência	39
3.17 Medida da concentração de citocinas	40
3.18 Imunohistoquímica	40
3.19 Transferência da α -sinucleína	41
3.20 Análise de resultados	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Caracterização da cultura mista de glia	43
4.2 Caracterização das células SH-SY5Y transduzidas com lentivírus pHRWT α -sinIG, pHRA30P α -sinIG e pHR(1-120) α -sinIG	45
4.3 Células tratadas com CM liberam LDH de forma dose-dependente	47
4.4 As células SH-SY5Y possuem expressão constitutiva do receptor TNFR1	49
4.5 Tratamento das células com o inibidor de NFkB salicilato de sódio	51
4.6 Efeito do tratamento do inibidor de MAPK PD98059 sobre a liberação de LDH das células	53
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP), descrita pela primeira vez em 1817 pelo médico britânico James Parkinson como “paralisia agitante”, é a mais comum das doenças neurodegenerativas do movimento (Lees et al., 2009), afetando aproximadamente 2% da população mundial acima de 60 anos (Samii et al., 2004; Wood-Kaczmar et al., 2006). As características clínicas cardinais da DP compreendem a bradicinesia, rigidez muscular, tremor incontrolável e equilíbrio e coordenação debilitados (Lang e Lozano, 1998).

A DP é crônica e implacavelmente progressiva, e suas principais características patológicas são a perda pronunciada dos neurônios dopaminérgicos presentes na substância negra pars compacta (SNpc), que promovem a inervação dopaminérgica para o estriado (caudado e putamen) (Dauer e Przedborski, 2003), e o surgimento de inclusões intracelulares conhecidas como Corpos de Lewy (Gibb, 1992; Fearnley e Lees, 1994). Outras vias neuronais são afetadas, incluindo os núcleos catecolaminérgicos, porém com menor grau de severidade (Lotharius e Brundin, 2002).

A dopamina, uma catecolamina, é um modulador crucial no processamento estriatal de sinais de origens cortical e talâmico transmitidos por sinapses glutamatérgicas nos principais neurônios do estriado - neurônios espinhosos médios (MSNs) (Wickens et al., 2003). A dopamina é sintetizada a partir da tirosina nos terminais dos neurônios dopaminérgicos. Este processo depende da etapa limitante da conversão da tirosina em L-dihidroxifenilalanina (DOPA) pela tirosina hidroxilase (TH) fosforilada (Sidhu et al., 2004; Perez e Hastings, 2004).

As funções motoras da dopamina são acompanhadas da modulação de sinal glutamatérgico cortical e talâmico via MSN do estriado. Muitos estudos evidenciam que o receptor D1 para dopamina, quando estimulado, aumenta a excitabilidade dendrítica e sinalização glutamatérgica em MSNs estriatonigrais, enquanto que o receptor D2 sinaliza o efeito oposto em MSNs estriatopálidais (Surmeier et al., 2007).

A dopamina é um neurotransmissor potencialmente crítico, pois é facilmente oxidado e forma espécies reativas de oxigênio e quinonas reativas no citoplasma dos neurônios. Normalmente estas espécies reativas são sequestradas rapidamente

em vesículas por meio da ação do transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT2). Um defeito na formação ou função de vesículas sinápticas poderia levar a danos observados na DP, devido ao acúmulo excessivo da dopamina citoplasmática (Fornstedt e Carlsson, 1989).

Os neurônios do mesencéfalo possuem diversas propriedades que podem ser fatores para susceptibilidade à neurodegeneração. Os neurônios dopaminérgicos possuem uma demanda metabólica extraordinária, que poderia assim ajudar a explicar a elevada sensibilidade destes neurônios a estresse oxidativo (Oorschot, 1996; Matsuda et al., 2009). Outros avanços recentes têm demonstrado que as células dopaminérgicas que são mais susceptíveis a DP têm mecanismos moleculares distintos em comparação com outras células dopaminérgicas. Por exemplo, os neurônios dopaminérgicos da SNpc têm sua atividade de marcapasso dirigida pelo canal de cálcio tipo L CaV1.3, em contraste com os neurônios da área tegmental ventral (VTA) (Chan et al., 2007), o que poderia colocar os neurônios da SNpc em maior risco devido a processos de neurotoxicidade dependentes de cálcio (Surmeier, 2007).

1.1 α -sinucleína e Doença de Parkinson

A α -sinucleína é uma proteína de 140 aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 19 kDa. Ela contém uma região N-terminal em α -hélice, um componente hidrofóbico central que inclui a região NAC (componente não amilóide), e uma região acídica C-terminal. Ela está presente nos neurônios de todo o sistema nervoso central (Irizarry et al., 1996), e é encontrada na maioria dos compartimentos celulares, porém em maior quantidade nos terminais pré-sinápticos (Jakes et al., 1994).

A função fisiológica da α -sinucleína ainda não foi totalmente compreendida; porém evidências cada vez mais concretas demonstram seu papel na liberação vesicular de neurotransmissores, incluindo dopamina (Jo et al., 2000; Perez et al., 2002; Fortin et al., 2004; Madine et al., 2008; Ben Gedalya et al., 2009; Fortin et al., 2010; Scott et al., 2010). Em terminais pré sinápticos, a liberação de neurotransmissores requer uma coordenação precisa da maquinaria de fusão de

membrana na qual o componente central é o complexo SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) (Martens et al., 2008; Wickner et al., 2008; Sudhof et al., 2009). Em 2010, Burrè et al. mostraram que a α -sinucleína promove a estruturação do complexo SNARE por meio de um mecanismo não enzimático que envolve uma ligação simultânea da α -sinucleína em fosfolipídios por meio do seu N-terminal e à sinaptobrevina-2 (uma das proteínas do complexo SNARE) via seu C-terminal.

Além disso, a α -sinucleína tem sido apontada como responsável pela regulação fisiológica da produção de dopamina por meio da sua interação com TH (Perez et al., 2002; Liu et al., 2008). O aumento de expressão da α -sinucleína reduz a atividade do promotor de TH (Gao et al., 2007), levando a níveis reduzidos do RNA mensageiro de TH e consequentemente da expressão desta proteína nos neurônios (Baptista et al., 2003; Yu et al., 2004). Ainda, a α -sinucleína se liga a TH, prevenindo a sua fosforilação, e desta forma regulando a sua atividade enzimática (Perez et al., 2002; Peng et al., 2005).

Outros estudos envolvendo a α -sinucleína apontam sua função fisiológica no transporte axonal (Chung et al., 2009) e mecanismos de autofagia (Martinez-Vicente et al., 2008; Xilouri et al., 2009; Crews et al., 2010; Winslow et al., 2010). O processo de reconhecimento por chaperonas hsc70 e degradação seletiva por lisossomos de proteínas citosólicas é conhecido como Autofagia Mediada pela Chaperona (AMC) (Cuervo et al., 2004). A α -sinucleína é reconhecida por uma chaperona citosólica e se liga à membrana do lisossomo (Cuervo e Dice, 1996); após cruzar a membrana lisossomal, a α -sinucleína é rapidamente degradada por proteases (Majeski e Dice, 2004).

As primeiras evidências do envolvimento da α -sinucleína na DP foram observadas por meio da identificação de três mutações (A30P, E46K e A53T) no gene SNCA, o gene que codifica a α -sinucleína humana nas DP familiares (Polymeropoulos et al., 1997; Krüger et al., 1998; Zarranz et al., 2004). Duplicações e triplicações no locus do SNCA selvagem também têm sido associadas com DP autossômico dominante (Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004; Ibanez et al., 2004; Farrer et al., 2004). Além disso, a α -sinucleína é o maior componente do Corpo de Lewy (Spillantini et al., 1997), estando presente nos

neurônios dopaminérgicos nigrais dos cérebros de pacientes portadores de DP familiar ou esporádica (Spillantini et al., 1997; Conway et al., 2001).

Postula-se ainda que a dopamina quando oxidada reage com a α -sinucleína, promovendo seu acúmulo e agregação (Wegener et al., 2006). Assim, uma vez que a α -sinucleína é modificada pela dopamina, ela é capaz de bloquear a própria degradação pela AMC (Martinez-Vicente et al., 2008). Somente a α -sinucleína modificada pela dopamina é capaz de interferir com a atividade da AMC, podendo assim explicar a perda preferencial dos neurônios da SN na DP. O bloqueio da AMC (Massey et al., 2006) ou do sistema ubiquitina proteassoma (UPS) (Iwata et al., 2005), ambos observados nos cérebros de pacientes portadores de DP, induz ao aumento da atividade da autofagia, pois os agregados de α -sinucleína podem ser degradados em lisossomos pela macroautofagia (Webb et al., 2003), uma via autofágica de maior capacidade (Klionsky, 2005).

Diversas evidências apontam para o terminal pré sináptico como o sítio de iniciação para neurodegeneração (Chandra et al., 2005; Kramer et al., 2007; Scheff et al., 2007; Gray et al., 2009). A α -sinucleína pode modificar a liberação de neurotransmissores (Liu et al., 2004; Nemani et al., 2010). Camundongos transgênicos com aumento de expressão de α -sinucleína foram utilizados recentemente para demonstrar a disfunção da exocitose de vesículas sinápticas nos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo. O aumento de expressão da α -sinucleína afetou a captação das vesículas sinápticas após a exocitose, causando a redução da quantidade de vesículas recicladas (Nemani et al., 2010).

A α -sinucleína pode assumir diversas conformações - de monômero a oligômero, da forma fibrilar à forma de placa β -pregueada e formação de filamentos amilóides que culminam na formação de Corpos de Lewy (Maries et al., 2003). Sabe-se que os oligômeros são as formas mais tóxicas para as células (Conway et al., 2000). Estes interagem com lipídeos, rompendo membranas celulares (Conway et al., 1998) e causam a morte celular *in vitro* (Caughey e Lansbury, 2003; Danzer et al., 2007). Recentemente, o trabalho de Winner et al. (2011) mostrou pela primeira vez *in vivo* a toxicidade da forma oligomérica da α -sinucleína, porém não da forma fibrilar, concluindo que as inclusões proteicas não seriam diretamente tóxicas para as células. Assim, a α -sinucleína possui diversas funções fisiológicas importantes, porém na vigência do seu excesso e

oligomerização ela se torna tóxica para os neurônios, levando à morte destes e consequente progressão da DP.

Apesar de o mecanismo pelo qual a DP é iniciada ser pouco compreendido, estudos recentes mostram que a inflamação possui um papel fundamental na degeneração nigroestriatal nesta doença (Gao et al., 2003). Uma ativação significativa de microglia (macrófagos residentes do sistema nervoso central) ocorre nas proximidades de neurônios dopaminérgicos danificados (McGeer et al., 1988; Langston et al., 1999; Imamura et al., 2003), e a concentração de nitrito, um metabólito de óxido nítrico, está aumentada em fluido cerebrospinal de pacientes com DP (Qureshi et al., 1995). A infusão intracranial de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), um ligante para receptor *Toll-like* 4 e potente ativador da microglia, foi suficiente para induzir a perda de neurônios tirosina-hidroxilase positivos em roedores (Meredith et al., 2008). A inflamação induzida pelo LPS pode ainda agir de modo sinérgico com a α -sinucleína, potencializando a perda de neurônios dopaminérgicos em modelos animais (Frank-Cannon et al., 2008; Gao et al., 2008). Ainda, foi mostrado que diversas células da substância negra de pacientes *post-mortem* com DP apresentam um aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), em comparação com os pacientes controle da mesma idade (Hunot et al., 1996). Por fim, uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 1 β (IL-1 β), IL-6, eicosanóides e outras neurotoxinas, foram observadas no fluido cerebrospinal de pacientes com DP e em áreas do cérebro afetadas por esta doença (Nagatsu et al., 2000).

É bem estabelecido que o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) regula a expressão de genes que controlam a morte celular programada, adesão celular, proliferação, inflamação e remodelamento tecidual (Gerondakis et al., 1999; Pahl, 1999; Hayden e Ghosh, 2004; Bonizzi e Karin, 2004; Pasparakis et al., 2006) induzindo ou reprimindo a expressão gênica através da ligação a pequenas sequências de DNA chamados elementos κ B. A ativação da via canônica do NF- κ B requer a ativação do complexo de quinases I κ B (IKK) formado pelas subunidades catalíticas IKK α , IKK β e a proteína regulatória NEMO (NF- κ B *essential modifier*). A proteína inibitória I κ B é fosforilada pelo complexo IKK, que resulta na degradação

da I κ B pelo sistema ubiquitina-proteassoma, liberando o dímero NF- κ B, permitindo sua consequente translocação para o núcleo (Perkins, 2007).

Embora existam várias evidências da participação do NF- κ B nos processos de neurotoxicidade, o seu envolvimento nas alterações tóxicas induzidas pela α -sinucleína não está muito claro. Fatores de transcrição como NF- κ B poderiam estar envolvidos nos efeitos mediados pela α -sinucleína; assim, neste trabalho pretendemos estudar as modificações moleculares induzidas por um estímulo inflamatório em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) com aumento de expressão de α -sinucleína.

Estudos genéticos e bioquímicos moleculares têm sido realizados com o objetivo de desenvolver uma maneira de retardar, conter ou evitar a degeneração dos neurônios dopaminérgicos, ou até mesmo revertê-los. Porém, a dificuldade em se obter abordagens terapêuticas mais eficientes para o tratamento e prevenção da DP ocorre devido à falta de conhecimento sobre as bases moleculares associadas a sua etiologia. Dados do nosso laboratório demonstraram que a cocaína (bloqueador da recaptação de DA) aumenta a atividade do NF- κ B e causa diminuição da viabilidade celular em células PC12 (Lepsch et al., 2011), sugerindo uma modulação pela DA neste fator de transcrição.

Os resultados deste trabalho poderão contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares regulados pela α -sinucleína e desenvolvimento de novas terapias que possam retardar ou até mesmo impedir o desencadeamento dos processos neurodegenerativos.

2 OBJETIVOS

- a. Avaliar a influência de fatores inflamatórios (meio condicionado) provenientes de células da glia ativadas por LPS na atividade de NF- κ B em células SH-SY5Y com aumento de expressão de α -sinucleína (WT ou A30P);
- b. Observar se a modulação de NF- κ B possui papel protetor ou citotóxico para estas células;
- c. Avaliar os mecanismos moleculares pelos quais a α -sinucleína exerce seus efeitos, além de compreender melhor os mecanismos moleculares regulados pela α -sinucleína.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estratégica de construção dos vetores lentivirais pHRWT α -sinIG, pHRA30P α -sinIG e pHR(1-120) α -sinIG

A construção dos vetores lentivirais foi realizada a partir dos plasmídeos pSIWT α -sin e pSIA30P α -sin, cedidos gentilmente pela profa. Dra. Pamela McLean (Harvard University, EUA), nos quais já encontravam-se clonados o cDNA da α -sinucleína selvagem (WT) ou mutante (A30P). Esses vetores foram utilizados como *template* para a subclonagem da α -sinucleína no vetor lentiviral pHRIG (pHR'tripCMV-IRES-eGFP-sin), gentilmente doado pelo Prof. Dr. Robert Sapolsky (Stanford University, Stanford, CA, EUA), como ilustrado na figura 1.

Brevemente, a região codificadora da proteína α -sinucleína foi amplificada por PCR, utilizando-se como *template* os plasmídeos pSIWT α -sin (para os insertos WT α -sin e 1-120 α -sin) ou pSIA30P α -sin (para o inserto A30P α -sin), e *primers* específicos desenhados para esse propósito, contendo sequências de reconhecimento para as endonucleases de restrição PstI e Sall (tabela 1), compatíveis com o sítio de clonagem múltipla do vetor lentiviral pHRIG. Para o inserto 1-120 α -sin, foi deletada a região codificadora do C-terminal da proteína (ANEXO C), referente aos 60 nucleotídeos finais da região codificadora da α -sinucleína. Após a obtenção dos produtos de PCR de interesse, os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, purificados e submetidos a uma digestão enzimática dupla utilizando-se as endonucleases PstI e Sall. O vetor lentiviral pHRIG, de maneira similar, foi submetido a uma dupla digestão enzimática, desfosforilado e purificado após eletroforese em gel de agarose. As sequências de DNA de interesse foram então inseridas, através de clonagem direcional, no vetor linearizado utilizando-se a enzima T4 DNA ligase.

Figura 1. Caracterização das construções dos vetores lentivirais pHRT α -sinIG, pHRA30P α -sinIG e pHR(1-120) α -sinIG. Mapas simplificados do plasmídeo pSIWT α -sin ou pSIA30P α -sin, utilizado como template para a geração de insertos WT α -sin, A30P α -sin e 1-120 α -sin por meio de PCR; mapa simplificado do vetor lentiviral pHRIg. Os insertos foram clonados nos sítios de clonagem PstI e SalI.

Tabela 1 - *Primers* utilizados para reação de PCR, para amplificação da região codificadora da α -sinucleína WT, A30P ou 1-120. As sequências de reconhecimento para as endonucleases PstI (*primer forward*) e Sall (*primer reverse*) encontram-se sublinhadas.

WT α -sin	Forward 5'ACACTGCAGTAGCCATGGATGTA 3'
	Reverse 5'CTTGGA ^{CTTCGGATT} CAGCTGACA 3'
A30P α -sin	Forward 5'ACACTGCAGTAGCCATGGATGTA 3'
	Reverse 5'CTTGGA ^{CTTCGGATT} CAGCTGACA 3'
1-120 α -sin	Forward 5'ACACTGCAGTAGCCATGGATGTA 3'
	Reverse 5'GGACACCTAGGAATT ^{CAGCTGAA} 3'

3.1.1 Reação de PCR para amplificação da região codificadora da α -sinucleína WT, A30P ou 1-120

Para a reação de PCR, foram adicionados em um tubo 1 μ L (50 ng/ μ L) de DNA (pSIWTasin ou pSIA30Pasin), 1X Pfx Amp buffer, 1,5 mM MgSO₄, 0,2 mM dNTP, 10 μ M do *primer forward*, 10 μ M do *primer reverse*, 1 U de taq Pfx Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e água milliQ suficiente para 25 μ L. As condições de reação no termociclador PTC-100 (MJ Research, Waltham, MA, EUA) foram: 94 °C por 2 minutos para desnaturação inicial, 94 °C por 1 minuto para desnaturação, 60 °C por 1 minuto para o anelamento dos *primers* e repetição deste ciclo por 30 vezes, seguido de um período de 90 segundos a 72 °C para a extensão e 72 °C por 2 minutos para a extensão final. O produto foi analisado por meio da eletroforese (1 h, 70 V) em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídeo (1 μ g/mL) e visualizado com transiluminador UV.

3.1.2 Extração e purificação do DNA do gel de agarose

Os fragmentos correspondentes a WT α -sin, A30P α -sin ou 1-120 α -sin foram purificados a partir do gel de agarose do item anterior (3.1.1), utilizando o kit

QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Alemanha). De forma resumida, o fragmento do DNA foi recortado do gel de agarose com bisturi estéril, e foi adicionado 300 µL do tampão QG para cada 100 mg de gel. Em seguida, foi incubado a 50 °C durante 10 minutos. Para ajudar a dissolver o gel, o tubo foi agitado a cada 2 - 3 minutos durante a incubação. Após a solubilização completa do gel, foi adicionado isopropanol na quantidade de 1:1 e a mistura foi colocada na coluna QIAquick, e centrifugada por 1 minuto. A coluna foi lavada com tampão PE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 80% etanol) e em seguida, o DNA foi eluído em TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA).

3.1.3 Digestão e precipitação da região codificadora da α -sinucleína WT, A30P ou 1-120

Os DNAs purificados do item 3.1.2 foram digeridos utilizando as endonucleases de restrição PstI e Sall (Invitrogen). Para a reação, foram utilizados 20 µL de DNA, 1x MultiCore Buffer (Promega, Madison, MI, EUA), 10 U de Sall, 10 U de PstI e água q.s.p. 50 µL, e a reação ocorreu a 37 °C *overnight*.

Os fragmentos digeridos foram então precipitados em etanol. Brevemente, a reação de digestão foi transferida para um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, adicionados 5 µL NaOAc 3 M pH 4,6 e 125 µL de etanol absoluto e incubada a -80 °C por 1 hora. As reações foram centrifugadas a 13,200 x g por 30 minutos a 4 °C, e o *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol 75%. Em seguida, foi centrifugado novamente a 13,200 x g por 3 minutos a 4 °C. O *pellet* de DNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µL de água milliQ.

3.1.4 Preparo do vetor pHRIG para subclonagem do inserto WT α -sin, A30P α -sin e 1-120 α -sin

O vetor lentiviral pHRIG sofreu dupla digestão utilizando-se as endonucleases de restrição PstI e Sall, seguida de precipitação em etanol. O vetor foi desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina intestinal de bezerro (Invitrogen). A

reação, contendo 5 U da fosfatase, 1X tampão de desfosforilação e água q.s.p. para 50 μ L, foi incubada a 37 °C durante 1 hora. Os produtos da reação de desfosforilação foram fracionados por meio de eletroforese (70V, 4 h) em gel de agarose 0,8% para separar o vetor pHRIG linearizado (Figura 1). O vetor linearizado foi extraído do gel utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction, como descrito anteriormente.

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose revelando o vetor lentiviral pHRIG. O vetor pHRIG (9,7 kb) foi linearizado com dupla digestão utilizando endonucleases de restrição PstI e Sall. Para referência do tamanho do vetor foi utilizado o *DNA ladder* de 1 Kb (Invitrogen).

3.1.5 Subclonagem dos insertos WT α -sin, A30P α -sin e 1-120 α -sin no vetor pHRIG

Os insertos foram subclonados no vetor pHRIG utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) utilizando uma relação estequiométrica de 1:6 molécula de vetor para moléculas de inserto (figura 1). A composição das reações de ligação são mostradas na tabela 2. As reações foram incubadas a 14 °C durante 16 h. Em seguida, 4 μ L da reação de ligação foi utilizada para transformação de bactérias *Escherischia coli* XL1-blue (Invitrogen).

Tabela 2 - Composição da reação de ligação dos respectivos insertos com o vetor pHRIG.

	WT α -sin	A30P α -sin	1-120 α -sin
Inserto	36 fmol (1 μ L)	36 fmol (1 μ L)	36 fmol (1 μ L)
5x T4 ligase buffer	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Vetor pHRIG	6 fmol (6 μ L)	6 fmol (6 μ L)	6 fmol (6 μ L)
T4 DNA ligase (5 U/ μ L)	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Volume Final	10 μ L	10 μ L	10 μ L

3.2 Preparação de bactérias quimiocompetentes

As bactérias *Escherichia coli* XL1-blue foram preparadas de acordo com o protocolo descrito pelo Sambrook *et al.* (1989). Resumidamente, as bactérias XL1blue foram colocadas no meio LB (Meio de Luria-Bertani: 10 g/L triptona; 6 g/L extrato de levedura; 10 g/L NaCl; pH 7,5), e incubadas a 37 °C x 250 rpm, até que a absorbância do meio (Densidade ótica = 600 nm) atingisse 0,6. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 2500 rpm por 20 minutos a 4 °C. O *pellet* bacteriano foi ressuspenso gentilmente em 50 mM CaCl₂. As bactérias estavam aptas para serem transformadas com DNA plasmideal com eficiência de 10⁶ colônias/ μ g de DNA.

3.3 Transformação das bactérias com plasmídeos

Os plasmídeos virais (4 μ L da reação de ligação) foram adicionados a uma alíquota de 50 μ L de bactérias competentes, e incubados em gelo por 20 min. Após esse tempo, as bactérias foram expostas a um choque térmico (42 °C, 2 min) para possibilitar a entrada dos plasmídeos e então retornadas ao gelo por mais 1 min. Adicionou-se 1 mL/tubo de meio LB sem antibióticos, seguido de incubação durante 1h a 37 °C sob agitação (250 rpm). Em seguida, plaqueou-se 300 μ L dessa mistura em placas de agar LB-ampicilina (ampicilina 100 μ g/mL). As placas foram então

incubadas *overnight* a 37 °C. No próximo dia, 5 colônias foram selecionadas e repicadas com um palito de madeira estéril em uma placa mestre com quadrantes delimitados e enumerados. A extremidade do palito contendo bactérias foi então inoculado rapidamente em um tubo Eppendorf contendo 20 µL de água estéril.

3.4 Verificação de clones positivos

A determinação prévia de quais clones foram efetivamente transformados com o vetor lentiviral contendo o inserto de interesse foi realizada por meio de uma reação de PCR de colônia utilizando os *primers* de sequenciamento, transpondo a região de clonagem múltipla (descrito em detalhe no item a seguir, item 3.5). Colônias transformadas com o vetor vazio geram um produto de PCR com 213 bp, enquanto clones positivos apresentam produtos de PCR com tamanho equivalente ao vetor vazio, acrescido do tamanho do inserto de interesse. A reação de PCR consistiu de 16 µL de água onde foi inoculada a colônia de bactérias, 1X PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,8 µM do *primer forward*, 0,8 µM do *primer reverse*, 1 U de taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) totalizando um volume final de 20 µL. As condições de reação no termociclador PTC-100 (MJ Research) foram: 94 °C por 2 minutos para desnaturação inicial, 94 °C por 1 minuto para desnaturação, 60 °C por 1 minuto para o anelamento dos *primers*, 72 °C por 1^{1/2} para extensão da dupla fita de DNA e repetição deste ciclo por 40 vezes, seguido de um período de 2 min a 72 °C para a extensão final. O produto foi analisado por meio da eletroforese (1 h, 70 V) em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídeo (1 µg/mL) e visualizado com trasniluminador UV.

3.5 Sequenciamento

Os clones positivos para cada construção de vetor lentiviral, determinada através de PCR de colônia, foram submetidos a uma reação de sequenciamento para confirmar a estrutura e sequência dos insertos. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit

(Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram o *forward* 5' GTACGGTGGGAGGTCTATAT 3', que se anela na região do promotor de citomegalovírus humano do vetor pHRIG; ou o *reverse*, 5' TTCCAAGCGGCTTCGGCCAG 3', que se anela no início da região IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) do vetor pHRIG. Brevemente, a reação de sequenciamento consistiu de 1 µL do produto de PCR de colônia como *template*, 2 µL de tampão de sequenciamento (2,5X), 1 µM do *primer forward* ou 1 µM do *primer reverse* e 2 µL de BigDye, totalizando um volume final de 10 µL. As condições de reação no termociclador PTC-100 (MJ Research, Waltham, MA, EUA) foram: 95 °C por 20 segundos para desnaturação, 50 °C por 15 segundos para o anelamento do *primer*, 60 °C por 1 min para a extensão da fita complementar e repetição deste ciclo por 35 vezes. A reação de sequenciamento foi precipitada em etanol, seca a 60°C durante 10 min e mantida a -20°C até a análise em sequenciador ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems), disponível no setor de multiusuários do Instituto Nacional de Farmacologia e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).

3.6 Extração de DNA plasmideal em pequena escala (miniprep)

Clones previamente selecionados por meio do PCR de colônia e sequenciamento foram amplificados e o DNA plasmideal extraído utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). O volume de 5 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) foi inoculado com bactérias da placa mestre e incubada a 37 °C a 200 rpm durante 14 h. Em seguida, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 10,000 x g. As bactérias foram ressuspensas com solução de ressuspensão (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A) seguido da adição de solução de lise (0,2 M NaOH; 1% SDS) e 10 µL da solução de protease alcalina. Foi adicionada uma solução de neutralização (4,09 M hidrocloreto de guanidina; 0,759 M acetato de potássio; 2,12 M ácido acético glacial) e a mistura foi centrifugada por 14,000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma coluna e centrifugado por 16,000 x g por 5 minutos. Adicionou-se 750 µL da solução de lavagem (60 mM acetato de potássio; 8,3 mM

Tris-HCl; 0,04 mM EDTA; etanol 60%) e a coluna foi novamente centrifugada por 16,000 x g a 5 minutos. O DNA plasmideal foi eluído em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA). O DNA resultante desta preparação foi novamente analisado através de sequenciamento, como descrito anteriormente, para confirmação das sequências dos insertos de interesse.

3.7 Preparação de DNA plasmideal em grande escala (Maxiprep)

Uma colônia de bactérias isolada da placa mestre, cuja transformação com o vetor de interesse foi previamente confirmada pelos meios descritos nos itens antecessores, foi inoculada em 5 ml de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubada sob agitação de 250 rpm, a 37 °C por 6 horas. Este inóculo foi então diluído em 100 mL de LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubado a 250 rpm, 37 °C por 16 horas. Para a preparação de DNA foi utilizado o kit *Plasmid Plus Maxi* (Qiagen). O inóculo de bactérias foi centrifugado a 3200 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado no tampão de ressuspensão (50 mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A). Em seguida, foi adicionado a solução de lise (200 mM NaOH; 1% SDS) e incubado durante 3 minutos na temperatura ambiente; a seguir, adicionou-se o tampão de neutralização (3 M acetato de potássio pH 5,5). O lisado foi então transferido para o filtro QIAfilter, incubado por 10 minutos e filtrado. O lisado filtrado foi transferido para uma coluna e a solução foi filtrada utilizando uma fonte de vácuo de aproximadamente 300 mbar. O DNA foi lavado em tampão ETR (750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH7,0; 15% isopropanol; 0,15% Triton X-100) e em seguida em tampão PE (1 M NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15% isopropanol) e por fim eluído em 500 µL de solução TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA).

3.8 Células SH-SY5Y e HEK 293T

As células SH-SY5Y (SH) (CRL-2266; ATCC, Manassas, VA, EUA) originárias de neuroblastoma humano, foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Mark Mattson

(National Institute on Aging, Baltimore, MD, EUA). As células HEK 293T (CRL-11268; ATCC), doadas pelo Prof. Dr. Carlos Menck (ICB-USP) são derivadas da linhagem celular HEK 293 (estas originárias do rim humano) com a diferença de que o gene *Simian virus 40* foi inserido para obtenção de uma linhagem capaz de produzir lentivírus. Ambas foram mantidas em meio de cultura DMEM “*Dulbecco’s modified Eagles medium*” (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Vitrocell), 4 mM de L-glutamina (Invitrogen), 25 mM glicose (Sigma, St Louis, MO, EUA), 8,4 mM de HEPES (Sigma), 17,8 mM de NaHCO₃ (Sigma), 100 unidades/mL de penicilina e 100 µL/mL estreptomicina a 37 °C em 5% CO₂.

3.9 Produção do lentivirus

Para a produção do lentivirus, foi utilizado o método de Tiscornia et al. (2006) com pequenas modificações.

As células produtoras de vírus HEK 293T foram plaqueadas (2×10^6 células) em placas de 60 mm, e incubadas *overnight* a 37 °C em 5% CO₂. Após a incubação, o meio DMEM foi substituído por 2 mL de meio Opti-MEM (Invitrogen) durante 24 h. Em um tubo, 3,36 µg do DNA plasmideal de interesse (pHRWTasin, pHRA30Pasin, pHR1-120asin ou pHRIG) foram misturados com seguintes quantidades dos vetores estruturais (Invitrogen): 2,18 µg do pLP1 (pMDL); 1,83 µg do pVSVG e 0,84 µg do pLP2 (pREV) (Figura 3). Nesta mistura de DNA foi adicionado 300 µL de Opti-MEM. Num outro tubo, 20,52 µL de Lipofectamine 2000 (proporção 1:2,5 em relação ao mix de DNA) (Invitrogen) foi diluído com 300 µL de Opti-MEM. Após 5 minutos, misturou-se o conteúdo dos dois tubos e a mistura foi incubada durante 15 minutos. Em seguida, a mistura lipossomo + DNA foi adicionado às células HEK 293T. Após 4 horas de incubação, o meio foi substituído por 2 mL de DMEM + 10% SBF HyClone (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) e incubado a 37 °C em 5% CO₂ *overnight*. 24 horas após a transfecção, o meio foi substituído por 2 mL de DMEM + 2% SBF Hyclone. Em seguida, foi feita a coleta do sobrenadante após 48h, onde estão presentes partículas lentivirais. O sobrenadante viral foi centrifugado a 1000 x g por 5 minutos para a retirada de restos de células, e em seguida, congelados a -80 °C.

Figura 3. Vetores estruturais do lentivírus pHRIg. A. Da esquerda para direita, pLP1 (pMDL), pLP2 (pREV) e pVSVG. B. Eletroforese em gel de agarose revelando os vetores estruturais linearizados por meio da digestão no sítio de restrição PstI (pVSVG [2] e pLP1 [2]) ou BamHI (pLP2 [3]).

3.10 Titulação viral

O título do vírus foi obtido a partir da transdução das células SH-SY5Y com o lentivírus pHRIg. Resumidamente, as células SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 24 poços na quantidade de 1×10^5 células/poço e 20 μ L de vírus em diversas concentrações foram adicionados em cada poço. Após 6 horas de incubação com o vírus, o meio foi substituído por DMEM + 10% SBF. As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C em 5% CO₂. Em seguida, as células fluorescentes (eGFP positivas) foram retiradas da placa com tripsina 0,1%, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspensas em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄).

As células foram contadas por meio da citometria de fluxo FACSCanto (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), disponível no Departamento de Imunologia (ICB-USP). Foram adquiridos 20 mil eventos no filtro FL1, (530/630nm) e analisados por meio

do *software* FlowJo (Ashland, OR, EUA). O título biológico (Unidade de Transdução (TU)/ μL) obtido foi de 10^4 TU/ μL . A titulação foi calculada a partir da equação $\text{TU}/\mu\text{L} = (P \times N / 100 \times V) \times 1/\text{DF}$, onde P = % células GFP⁺, N = número de células no momento da transdução, V = volume da diluição adicionado a cada poço e DF = fator de diluição.

3.11 Transdução das células SH-SY5Y com o lentivírus

Foram plaqueadas $7,5 \times 10^5$ células SH-SY5Y/poço em placas de 6 poços e incubadas overnight em meio DMEM + 10% SBF. O meio de cultura foi retirado e substituído pelo sobrenadante viral diluído na proporção de 1:3 no meio DMEM contendo 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de polibreno (Sigma). Após 6 horas de incubação, o meio foi substituído por DMEM + 10% SBF. Após 48 horas, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em frascos de 75 cm^2 e mantidas durante 7 dias.

3.12 Cultura primária de glia

A cultura primária mista de glia foi preparada a partir do córtex de cérebro de ratos Wistar neonatos de 1 a 3 dias, como descrito em Ballas *et al.* (2009). Os tecidos corticais livres de meninges foram dissociados em DMEM contendo 0,01% de tripsina (Vitrocell) e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNase I (Sigma), ressuspensos em DMEM suplementado com 10% de SBF e 2 mM de glutamina e plaqueados (1×10^6 células) em frascos de 75 cm^2 . Após 15 dias de cultivo, com troca de meio a cada 3 dias, o meio foi trocado pelo meio DMEM sem soro e as células foram tratadas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS (Sigma) ou PBS. Após 24h, os meios condicionados foram coletados, centrifugados a $1000 \times g$ por 5 minutos para retirada de debris celulares, aliquotados e estocados a -80°C . Para experimentos de imunofluorescência, as células aderentes cultivadas durante 2 semanas foram dissociadas com tripsina 0,1% e plaqueadas na densidade de 1×10^4 células/poço na placa de 24 poços com lâminulas de borosilicato (Thermo Fisher Scientific) durante 24 h.

3.13 Ensaio de viabilidade celular: liberação de lactato desidrogenase (LDH)

A atividade da LDH foi medida pelo kit de detecção de citotoxicidade CytoTox 96 (Promega). Este ensaio consiste na conversão do sal cloreto de iodofenil-nitrofenil tetrazólio em formazan. A reação é catalisada pelo LDH liberado do citosol pelas células danificadas com a diaforase, um substrato presente no kit. 50 μ L da mistura de reação (diaforase/NAD⁺, iodototetrazolium de cloro e lactato de sódio) foram adicionados a 50 μ L do sobrenadante das células. A solução resultante foi então incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e em seguida foi realizado a leitura em 490 nm.

3.14 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (*Gel shift*) para o NF- κ B

Para a extração de proteínas nucleares, o método que utilizamos foi baseado no trabalho de Rong e Baudry (1996). As células foram coletadas em PBS e centrifugadas a 12,000 x g por 3 minutos a 4 °C e o *pellet* foi ressuspenso em tampão de lise (10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 2 μ g/mL leupeptina; 2 μ g/mL antipaína; 0,5 mM PMSF; 0,1 mM EDTA; 30 mM NaF; 3 mM ortovonadato; 0,5 mM DTT; 2 mM pirofosfato) e incubado em gelo durante 15 minutos. Foi adicionado em seguida NP-40 0,5% com agitação vigorosa, centrifugando-se a 13.000 x g por 30 segundos a 4 °C e o sobrenadante foi mantido para ser utilizado no ensaio de Western Blot. O *pellet* foi ressuspenso em tampão de extração (20 mM HEPES; 1,5 mM MgCl₂; 300 mM NaCl; 0,25 mM EDTA; 2 μ g/mL leupeptina; 2 μ g/mL antipaína; 0,5 mM PMSF; 30 mM NaF; 3 mM ortovonadato; 0,5 mM DTT; 2 mM pirofosfato) e incubado 20 minutos em gelo, seguido de centrifugação a 13,000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteínas determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

O oligonucleotídeo de DNA contendo a sequência (5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C - 3') foi marcado com a adição de γ -³²P ATP (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA) numa solução contendo Tampão T₄ quinase, T₄ quinase e

água; nas concentrações de: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1U/ μ L de T₄ quinase, 1 μ L de ³²P ATP (3Ci/mmol), 1 μ L de tampão T₄ Kinase (10 X) (Promega) em 10 μ L de volume de reação. Após incubação à 37 °C por 10 minutos, o excesso de ³²P ATP foi retirado com resina sephadex G-25. Foram colocadas colunas (Microspin G-25) (GE Healthcare) em um tubo de microcentrifuga, centrifugando-se por 1 minuto a 3.000 rpm. A coluna foi transferida para um novo tubo aplicando-se a sonda marcada no centro da resina. Após centrifugação o eluato foi recolhido, e no dia do ensaio a atividade da sonda foi determinada em cintilador beta Tri-carb (Perkin-Elmer), usando no ensaio aproximadamente 30,000 cpm/ μ L.

O ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética para NF- κ B foi realizado de acordo com Munhoz *et al.* (2006). Brevemente, a sonda - o oligonucleotídeo consenso de dupla fita de NF- κ B marcado com ³²P (30,000 cpm) - e o extrato nuclear (2,5 μ g), o oligo frio em excesso ou o anticorpo específico para subunidades (p65, p50, cRel) foram aplicados no gel de poliacrilamida 5,5% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)]. Para a eletroforese foi usado o tampão TBE (45 mM Tris, 45 mM Ácido Bórico, 0,5 mM EDTA). O gel foi submetido à eletroforese por 2 horas a 150 V. Após a corrida o gel foi secado e analisado por autoradiografia. Para o ensaio de “Super-shift” do gel de retardo adicionou-se anticorpos específicos às subunidades que compõe o complexo NF- κ B durante a incubação do extrato nuclear com o oligonucleotídeo contendo a sequência específica para o NF- κ B. Foram utilizados anticorpos (1 μ L) contra as subunidades p50, p65 e cRel (Millipore, Temecula, CA, EUA).

3.15 Ensaio de Western Blot

A preparação das células foi descrita no item 3.12. As proteínas foram ajustadas na concentração adequada com o tampão de amostra (0,125 M tris-HCl; 4% SDS; 20% v/v glicerol; 0,2 M DTT; 0,02% azul de bromofenol; pH 6,8) e aquecidas por 5 minutos a 95 °C. As proteínas foram aplicadas no gel de SDS-PAGE 7 a 15%. Para a eletroforese (90 V) foi usado um tampão de corrida Tris-Glicina (25 mM tris-base; 0,192 M glicina; 0,1% SDS). As proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF (Bio-Rad,

Hercules, CA, EUA) por 1 h a 400 mA utilizando tampão de transferência (25 mM tris-base; 192 mM glicina; 20% (v/v) metanol). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com 1% BSA durante 1h. Os anticorpos primários utilizados foram o anti- α -sinucleína 1:1000 (Cell Signaling, Danvers, MA, EUA), anti-pMAPK42/44 1:1500 (Cell Signaling) e anti-ERK2 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os anticorpos secundários utilizados foram anti-mouse 1:5000 (Sigma) ou anti-rabbit 1:10,000. A revelação foi feita por meio de kit de quimioluminescência ECL Immobilon (Millipore).

3.16 Imunofluorescência

Para a imunofluorescência, as células foram fixadas com metanol 100%. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com Triton X-100 0,01% em PBS, e lavadas com PBS. A seguir, foram incubadas com soro de bloqueio (5% de soro de burro + 0,01% Triton X-100 em PBS). Seguiu-se lavagem em PBS e incubação *overnight* com anticorpo primário contra GFAP (1:1000) (Sigma), CD68 (1:200) (Abcam, Cambridge, MA, EUA), TNFR1 (1:200) (Abcam) ou α -sinucleína (1:500) (Cell Signaling) diluído no soro de bloqueio. A seguir, foram incubadas durante 1 hora com anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo AlexaFluor 594 ou 488 1:1000 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, EUA). Finalmente, as lâminas com células foram lavadas com PBS, incubadas com DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole; Sigma) (1:50,000, diluído no Triton X-100 0,01% em PBS) por 5 minutos, lavadas novamente e montadas na lâmina com ProLong Gold Antifade (Invitrogen) e seladas com esmalte incolor. As células foram observadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon, Toquio, Japão) que possui o sistema de captura de imagem Nikon Digital Camera DXM 1200C; ou no microscópio confocal LSM510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) (disponível no setor de multiusuários do Instituto Nacional de Farmacologia e Biologia Molecular da Unifesp). e analisadas com software de Imagem *NIS-Elements Advanced Research 2.30* (Nikon) ou ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA).

3.17 Medida da concentração de citocinas

A concentração de TNF α , IL-1 β e IL-10 foi medida em amostras do meio condicionado por meio do ensaio de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina como descrito (Junqueira *et al.*, 2007). As placas foram incubadas por 18 h a 4 °C, e lavadas com PBST (0,05% Tween 20 em PBS). Em seguida, as placas foram bloqueadas com 200 μ L/poço de gelatina a 3% em PBST a 37 °C x 3 h. Logo depois, as placas foram lavadas com PBST e 100 μ L das amostras ou dos padrões das citocinas recombinantes foram adicionados. As placas foram incubadas por mais 18 h a 4 °C. Após lavagem, 100 μ L dos respectivos anticorpos biotinilados específicos para cada citocina foram acrescentados por 1h a temperatura ambiente. Após lavagem das placas, 100 μ L de estreptavidina-peroxidase foram adicionados por 30 minutos. As reações foram reveladas pela adição de 50 μ L de ácido cítrico 0,2 M por poço. A leitura da reação foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro Spectra Max plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes.

3.18 Imunohistoquímica

Os camundongos transgênicos para α -sinucleína (1-120) humano foram produzidos nos camundongos C57BL/6S, no laboratório da Profa. Dra. Maria Grazia Spillantini (Universidade de Cambridge, Reino Unido). Os animais com 6 meses de idade foram anestesiados profundamente com pentobarbital e perfundido com pafaformaldeído (PFA) 4% em 0,1 M PBS pH 7,4. Os cérebros foram removidos e pós-fixados *overnight*, seguido de crioproteção em PBS 30% sucrose contendo azida sódica a 0,02%. Cortes seriados de 14 μ m foram seccionados em criostato Leica CM3050 (Leica, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio 3% e metanol 20% em PBST (0,03% Tween 20) por 1h, bloqueados com

soro normal de cabra 5% em PBST durante 2 h, e incubados *overnight* com anticorpo alfa-sinucleína 1:500 (BD) e Tirosina Hidroxilase 1:1500 (Millipore) a 4°C. Após a incubação por 2 horas com anticorpo secundário biotilado (1:700) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), a coloração foi observada utilizando o kit ABC elite (Vector Laboratories), e 3,3'-Diaminobenzidina (Vector Laboratories) como cromógeno. Os cortes foram então desidratados e analisados utilizando o microscópio Leica Leitz DMRB (Leica). As células TH positivas foram contadas na região da substância negra dos cortes utilizando o programa Neurolucida 9 (Williston, VT, EUA).

Para imunofluorescência, os cortes foram bloqueados com soro normal de cabra ou cavalo, incubados com anticorpo primário *overnight* 4°C, e incubados com o anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 488, 568 ou 647 (Molecular Probes, Invitrogen). O núcleo foi visualizado com Hoechst 1:10,000 (Sigma). Os cortes foram montados com Permafluor (Thermo Fisher Scientific) e analisados com microscópio confocal Leica TCS SPE (Leica).

3.19 Transferência da alfa-sinucleína

A linhagem celular PC12 (derivada do feocromocitoma da medula adrenal de rato) (CRL-1721; ATCC) foi mantida em meio de cultura RPMI (Sigma) suplementado com 10% de soro de cavalo (Invitrogen) e 5% de SBF (Biosera, East Sussex, Reino Unido), 100 unidades/mL de penicilina e 100 µL/mL estreptomicina, 2 mM de L-Glutamina (Sigma) a 37 °C em 7% CO₂. Quando necessário a diferenciação das células, estas foram tratadas com NGF (*Nerve Growth Factor*) 50 ng/mL (Sigma). As células foram transfectadas com o plasmídeo p α -sin(1-120)IRESeGFP ou p α -sinWTIRESeGFP utilizando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Como controle as células PC12 foram transfectadas com o plasmídeo sem o inserto (pIRESeGFP). Após 48 h, 400 µg/mL de G418 (Invitrogen) foram adicionadas no meio de cultura para geração de linhagens estáveis. Um milhão de células controle foram marcadas com CellTracker CM-Dil (1 µM) (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante e estas foram então misturadas com as células PC12 transfectadas com p α -sin(1-120)IRESeGFP ou p α -sinWTIRESeGFP (5x10⁵ células). Após 48 h, as células

misturadas foram plaqueadas em placas de 24 poços (5×10^4 células/poço), e deixadas *overnight* a 37 °C em 7% CO₂. As células foram então lavadas com meio HBSS (*Hank's balanced salt solution*), fixado com PFA 4% durante 15 min a temperatura ambiente e permeabilizado com metanol 100% por 10 min a 4°C. O anticorpo anti- α -sinucleína Syn204 (1:20) (Cell Signaling) que reconhece somente o N-terminal da α -sinucleína humana foi adicionado e incubado *overnight* a 4 °C. As células foram então lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 647 (Invitrogen) 1:1000 durante 1h. O núcleo foi corado com Hoechst 1:10,000 (Sigma). As lamínulas foram então preparadas para análise na microscopia confocal Leica TCS SPE.

3.20 Análise de resultados

Os dados decorrentes do ensaio de gel de retardo e de Western Blot foram analisados quantitativamente através da análise de densidade ótica utilizando sistema de detecção *Gel Documentation System Doc-Print* (Vilber Lourmart; Marne-la-Vallée Cedex, França) e o software ImageJ.

Os dados receberam tratamento estatístico no programa GraphPad Prism v. 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), pelo teste ANOVA (*Analysis of Variance*) de uma via ou duas vias seguido do pós-teste Bonferroni, onde as diferenças foram consideradas significantes para o valor $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da cultura mista de glia

Primeiramente nós caracterizamos a cultura de glia por meio do ensaio de imunofluorescência, onde foi utilizado os anticorpos anti-GFAP (proteína acídica fibrilar da glia), um marcador de astrócito, anti- CD68 para marcação da microglia e anti-MAP2 para marcação de neurônios. Podemos observar na figura 4 a imunorreatividade para GFAP e CD68, porém não para MAP2, mostrando a ausência de neurônios na cultura glial.

Após 15 dias de cultivo, a cultura de glia foi tratada com LPS (1 µg/mL) na ausência de soro bovino fetal (SBF) durante 24 horas. O meio foi coletado e denominado de meio condicionado (CM). Foi realizada dosagem de TNF e IL-1β no CM, por meio do ensaio de ELISA (figura 5). As citocinas dosadas não foram detectadas no meio retirado das células tratadas com PBS.

Figura 4. Fotomicrografias de microscopia confocal a laser da cultura primária de glia submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti-MAP2 e anti-CD68 e marcador nuclear DAPI. A e D. Padrão de imunorreatividade ao GFAP, marcador de astrócito. B. Ausência de neurônios na cultura de glia. C. Imagens sobrepostas de A e B, evidenciando a presença de astrócitos na cultura de glia. E. A imunorreatividade ao CD68 está presente na cultura de glia. F. Imagens sobrepostas de D e E, onde podemos observar uma amostra da população glial, caracterizada pela presença de astrócitos e microglia.

Figura 5. Produção de citocinas inflamatórias presentes no CM da cultura de glia tratado com LPS durante 24 horas. Os valores do eixo Y representam pg de citocina TNF ou IL-1 β detectados no meio condicionado. Os dados apresentados representam as médias $\pm$ EPM de n= 6.

4.2 Caracterização das células SH-SY5Y transduzidas com lentivírus pHRWT α -sinIG, pHRA30P α -sinIG e pHR(1-120) α -sinIG

Conforme descrito no item xx do capítulo 3 (Material e Métodos), as células SH-SY5Y foram transduzidas com os lentivírus pHRWT α -sinIG, pHRA30P α -sinIG ou pHR(1-120) α -sinIG.

Em seguida, foi confirmada a expressão da proteína transgênica α -sinucleína WT e A30P nas células transduzidas, por meio do ensaio de Western Blot. Como controle foi utilizado a proteína B-actina (figura 6A). Nossos resultados demonstram que as células SH-SY5Y transduzidas, chamadas a partir de agora de WTasyn, A30Pasyn ou 1-120asyn, expressam de forma significativa a proteína α -sinucleína, quando comparadas às células não transduzidas (Controle) ou células transduzidas com o lentivírus pHRIG que não possui a α -sinucleína clonada (pHRIG).

A expressão do transgene α -sinucleína 1-120 (a parte C-terminal da proteína foi deletada) foi observada por meio da imunofluorescência, onde utilizamos o anticorpo anti- α -sinucleína204, que reconhece a porção N-terminal da proteína (figura 6B).

Figura 6. Padrão de imunorreatividade à α -sinucleína nas células SH-SY5Y transduzidas com o lentivírus pHRWT α -sinIG, pHRA30P α -sinIG e pHR(1-120) α -sinIG. **A.** Ensaio de *Western Blot* para detecção da α -sinucleína. 1 - Células controle (não transduzidas); 2 - transduzidas com pHRIG; 3 - transduzidas com pHRWT α -sinIG; 4 - transduzidas com pHRA30P α -sinIG. A β -actina foi utilizado como controle da quantidade de proteína carregada no ensaio (5 μ g/poço). **B.** Fotomicrografias das células SH-SY5Y submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-Syn204 e marcador nuclear DAPI. Podemos observar a ausência da marcação para Syn204 nas células controle, ao contrário das células que foram transduzidas com o lentivírus pHR(1-120) α -sinIG.

4.3 Células tratadas com CM liberam LDH de forma dose-dependente

A dosagem de LDH, que catalisa a oxidação reversível do lactato para piruvato com o cofator NAD, liberada no meio de cultivo pela lise celular, é um dos métodos frequentemente utilizados para avaliação da viabilidade celular por citotoxicidade. Nós observamos um aumento da LDH nas células SH-SY5Y controle quando tratadas com quantidades crescentes de CM (10 - 3000 μ L) durante 24 horas (figura 7). A partir de 30 μ L podemos observar significância em relação às células não tratadas com CM. Nós decidimos por usar a quantidade de 320 μ L de CM (EC50) para cada 5×10^4 células.

Figura 7. A. Liberação de LDH no meio de incubação das células SH-SY5Y controle tratadas 24h com CM. Observe o aumento dose-dependente na liberação do LDH após o tratamento das células com o CM. Os valores do eixo Y representam a porcentagem de LDH liberada pelas células SH-controle quando tratadas com MC. A linha tracejada representa as células tratadas com PBS ($19,45\% \pm 0,98$). A leitura do valor absoluto de LDH foi realizada com absorbância em 490 nm. Os dados representam as médias $\pm$ EPM de 5 experimentos diferentes. * $P < 0,05$ ou *** $P < 0,001$ vs SH-SY5Y controle tratadas com PBS.

4.4 As células SH-SY5Y possuem expressão constitutiva do receptor TNFR1

A expressão de TNFR1 (receptor de TNF) nas células (controle, pHRIg, WTasyn, A30Pasyn e 1-120asyn) foi observada por imunofluorescência. Observamos imunorreatividade para o TNFR1 em todos os grupos (figura 8).

Em seguida, tratamos as células com TNF (0,3 a 300 ng/mL) durante 24 horas. Podemos observar que com 0,3 e 10 ng/mL de TNF há liberação significativa do LDH das células em relação às células não tratadas (figura 9). Para experimentos subsequentes, utilizamos a concentração de 10 ng/mL para tratamento das células.

Figura 8. Fotomicrografias de microscopia confocal a laser das células SH-SY5Y submetidas à imunofluorescência com anticorpo anti-TNFR1 e marcador nuclear DAPI. A - E. Padrão de imunorreatividade ao TNFR1.

Figura 9. A. Liberação de LDH no meio de incubação das células SH-SY5Y controle tratadas 24h com TNF. Observe o aumento na liberação do LDH após o tratamento das células com o TNF 0,3 ng/mL ou 10 ng/mL. A barra aberta representa as células tratadas com PBS. A leitura do valor absoluto de LDH foi realizada com absorbância em 490 nm. Os dados representam as médias $\pm$ EPM de 6 experimentos diferentes. *P< 0,05 vs SH-SY5Y controle tratadas com PBS.

4.5 Tratamento das células com o inibidor de NFkB Salicilato de Sódio

O salicilato de Sódio (NaSal) é um inibidor do NF- κ B, pois impede a fosforilação da proteína I κ B. As células foram tratadas com CM (320 μ L) ou TNF (10 ng/mL) e NaSal na concentração de 10 mM (Grilli et al., 1996) por 4, 8 e 24 horas. Podemos observar a liberação crescente e significativa (24 h) do LDH no grupo A0Pasyn e 1-120asyn, quando tratadas com TNF e NaSal (figura 10A), em comparação com o grupo controle (células não transduzidas). Entretanto, as células tratadas com CM mostram um perfil de liberação do LDH distinto; observamos uma diminuição da liberação dos grupos A30Pasyn e 1-120asyn, com ou sem tratamento com NaSal, em relação ao controle (figura 10B).

Figura 9. Curso temporal da liberação de LDH após tratamento com TNF, CM NaSal. **A.** Tratamento das células com TNF (10 ng/mL), seguido da incubação com NaSal (10 mM). **B.** Células tratadas com CM, seguido da incubação com NaSal (10 mM). A linha vermelha representa as células controle (não transduzidas). A leitura do valor absoluto de LDH foi realizada com absorbância em 490 nm. Os dados representam as médias $\pm$ EPM de 5 experimentos diferentes. * $P < 0,05$ vs SH-SY5Y controle.

4.6 Efeito do tratamento do inibidor de MAPK PD98059 sobre a liberação do LDH nas células

Em seguida, nós tratamos os grupos com o inibidor PD98089. O inibidor foi colocado nas células 20 minutos antes dos tratamentos com CM, TNF e NaSal, com subsequente incubação por 24 horas. Podemos observar que ocorre uma diminuição da liberação de LDH quando as células (controle, pHRIG e WTasyn) são pré-tratadas com PD98059 e em seguida com CM. Além disso, as células A30Pasyn e 1-120asyn tem morte celular significativamente menor em relação a células controle, pHRIG ou WTasyn quando tratadas com CM ou com CM e NaSal (figura 9).

Figura 9. Curso temporal da liberação de LDH após tratamento com TNF, CM NaSal. **A.** Tratamento das células com TNF (10 ng/mL), seguido da incubação com NaSal (10 mM). **B.** Células tratadas com CM, seguido da incubação com NaSal (10 mM). A linha vermelha representa as células controle (não transduzidas). A leitura do valor absoluto de LDH foi realizada com absorbância em 490 nm. Os dados representam as médias $\pm$ EPM de 5 experimentos diferentes. *P < 0,05 vs SH-SY5Y controle.

5 DISCUSSÃO

Um modelo celular usado com frequência em estudos de doenças neurodegenerativas é a linhagem celular catecolaminérgica de neuroblastoma humano SH-SY5Y (SH). Estas células expressam o transportador e receptores de dopamina e são capazes de formar vesículas de armazenamento (Colapinto et al., 2006), além de expressar α -sinucleína endógena.

Os retrovírus são ferramentas atraentes para terapia gênica, pois estes podem se integrar estavelmente nos cromossomos dos seus alvos. Além do mais, eles não transferem genes virais, evitando que células transduzidas não sejam destruídas por células T citotóxicas específicas para vírus.

Os lentivírus, da família dos retrovírus, oferecem uma grande vantagem quando comparados com outros retrovírus: eles podem infectar células que não estão em divisão, um detalhe crucial para alvos como o cérebro, músculo, fígado, pulmão, e o sistema hematopoiético. Ilustrando estas propriedades, vetores derivados do vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1) permitem uma eficiente entrega de genes *in vivo*, integração e expressão estável de transgenes em células como neurônios, hepatócitos e miócitos (Naldini et al., 1996a; Naldini et al., 1996b; Blömer et al., 1997; Kafri et al., 1997). Porém, o uso de vetores HIV-1 levantou preocupações em relação a sua segurança. No nosso trabalho, utilizamos o vetor lentiviral *self-inactivating* (SIN) de terceira geração, derivado de HIV-1 com deleção de 400 nucleotídeos no 3' LTR (*long terminal repeat*). Esta deleção, que inclui o TATA Box, aboliu o promotor LTR, mas não afetou os títulos virais ou a expressão do transgene, pois o vetor lentiviral SIN transduziu neurônios *in vivo* com alta eficiência, semelhante a um vetor que possui o LTR completo (Zufferey et al., 1998). Essa inativação é interessante devido à biossegurança, pois diminui consideravelmente os retrovírus competentes de replicação. Ainda, o desempenho é maior do que os lentivírus de primeira e segunda geração, pois se removeu as sequências de LTR previamente associadas com a interferência transcricional e supressão *in vivo*. Nós utilizamos o vetor lentiviral SIN-W-PGK que continha o transgene α -sinucleína na sua forma selvagem (WT) ou mutante (A30P), e simultaneamente utilizamos o vetor lentiviral pHRIG também de terceira geração e sem carregar nenhum transgene, como controle tanto da titulação viral, como dos

experimentos realizados pois este vetor possui como marcador, o gene reporter GFP (*Green fluorescent protein*).

O aumento da produção da proteína α -sinucleína na sua forma selvagem ou mutante em diversos modelos tanto *in vivo* quanto *in vitro* resulta na neurodegeneração e formação de inclusões (Maries et al., 2003). No nosso trabalho, transduzimos os transgenes α -sinucleína WT ou A30P por meio de um sistema lentiviral nas células SH, e observamos que houve um aumento na expressão protéica da α -sinucleína, tanto pelo método de western blot como de imunofluorescência, onde em ambos os ensaios pudemos observar um aumento de imunorreatividade ao anticorpo anti- α -sinucleína.

A microglia é derivada das células mielóides, e monitoram o cérebro (Nimmerjahn et al., 2005; Davalos et al., 2005). Em resposta a estímulos, como injúria ou estímulo imunológico, a microglia é ativada rapidamente. Essa ativação é essencial para sobrevivência do neurônio (Streit, 2002; Harry et al., 2004), pois é fundamental para a manutenção da célula e resposta imune inata, além de facilitar o reparo por meio da migração guiada de células-tronco no sítio da inflamação, e pode estar envolvida na neurogênese (Walton et al., 2006; Polazzi e Constestabile, 2002; Ziv et al., 2006a; Ziv et al., 2006b). Porém, em certas circunstâncias, a microglia pode se tornar extremamente ativada, produzindo em excesso fatores citotóxicos como superóxidos (Colton et al., 1987), óxido nítrico (Moss e Bates, 2001) e TNF α (Sawada et al., 1989; Lee et al., 1993). Na DP, um grande número de microglia ativada está presente nas vizinhanças do neurônio degenerado na substância negra (McGeer et al., 1988; Langston et al., 1999; Imamura et al., 2003). A neurotoxicidade mediada pela microglia tende a ser progressiva (Huh et al., 2003; McGeer et al., 2003; Gao et al., 2003), o que pode contribuir para a natureza gradual de diversas doenças neurodegenerativas. No nosso trabalho, nós desafiamos a cultura mista de glia com 1 μ g/mL de LPS, coletamos o sobrenadante (MC), e tratamos as células transduzidas que tinham aumento de expressão da α -sinucleína e observamos que sua expressão protéica aumentou ainda mais em relação às células com aumento de expressão da α -sinucleína porém tratadas com PBS sugerindo que as células transduzidas com α -sinucleína, na vigência de um estímulo inflamatório, ficam mais responsivas, alterando a expressão da proteína e

provável aumento de agregação da mesma. Na nossa cultura, nós observamos imunorreatividade para GFAP em 85% das células e o restante para CD68.

Estudos mostram que a inflamação possui um papel crítico da inflamação na DP. Por exemplo, as concentrações de IL-1 β e IL-6 na substância negra estão significativamente mais altas na DP em comparação com indivíduos saudáveis (Mogi et al., 1994). Ainda, foi mostrado que a secreção de IL-1 β , IL-6 e TNF α estão significativamente aumentadas nas células mononucleares do sangue dos pacientes com DP em comparação com os controles (Bessler et al., 1999). No MC coletado no nosso trabalho na vigência de um estímulo inflamatório, foi observada a presença de TNF α e IL-1 β , quando comparado com o meio obtido das células não estimuladas. É sabido que no MC se encontram diversos mediadores inflamatórios, como as citocinas como TNF α , quemoquinas, assim como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e fatores tróficos (Dong e Benveniste, 2001; Pekny e Nilsson, 2005). Nos experimentos deste trabalho, utilizamos o MC, porém é do nosso conhecimento que não somente TNF α , mas outros componentes têm participação na morte celular induzida pelo MC; assim, nós realizamos um experimento paralelo utilizando a citocina TNF α , e observamos que houve aumento significativo da morte celular quando as células SH-controle foram tratadas com TNF α com 0,3 e 10 pg/mL, corroborando com a literatura (Legarda-Addison et al., 2009). Desde sua descoberta, há duas décadas (Singh et al., 1986; Sen e Baltimore, 1986), tem sido atribuído ao NF- κ B um papel fundamental em diversos processos biológicos, incluindo inflamação, imunidade e sobrevivência da célula. A família do NF- κ B consiste em 5 membros: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105) e NF- κ B2 (p52/p100), e diferentes complexos de NF- κ B são formados como homo- ou hetero-dímeros. Todas as subunidades contêm um domínio de homologia Rel que é responsável pela ligação, dimerização, translocação para o núcleo e ligação ao I κ B. Além disso, RelA (p65), c-Rel e RelB contêm um domínio de transativação (TAD) que é requerido para a ativação gênica. Ambas as subunidades, p50 e p52, são processados pelos seus precursores, p105 e p100, respectivamente, e necessitam dimerizar com uma subunidade que contenha o TAD para ativar a transcrição de genes associados à resposta pró e anti-inflamatória e de apoptose (Bhoj e Chen, 2009).

Estudos recentes mostraram ativação do NF- κ B na substância negra de pacientes com DP e em camundongos que foram tratados com MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), cujo metabólito MPP⁺ (1-metil-4-penilpiridínio) interfere no complexo I da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, e que a inibição deste fator de transcrição preveniu a morte das células dopaminérgicas nigroestriatais induzida pela administração desta toxina (MPTP) (Gosh et al., 2007). Por outro lado, em 2008, Yuan et al. observaram que o aumento da expressão de α -sinucleína nas células SH-SY5Y e subsequente tratamento destas com MPTP diminuiu a ativação do NF- κ B, o que levou à diminuição da expressão do Bcl-2.

No nosso estudo, observamos uma tendência ao aumento na ativação do NF- κ B nas células transduzidas que apresentam um aumento na expressão da α -sinucleína. Nossos dados mostraram ainda aumento neste fator de transcrição quando as células SH-WT ou SH-A30P foram tratadas com TNF, quando comparadas com o SH-controle tratadas com PBS. Regiões promotoras de moléculas pró-inflamatórias produzidas na microglia contêm sítio de ligação para NF- κ B (Hayden e Ghosh, 2004). Assim, o NF- κ B estaria mais ativado na presença de TNF. Ainda, a regulação do NF- κ B pode estar aumentada apenas pelo aumento da expressão da α -sinucleína. De acordo com a literatura (Yuan et al., 2008), esta proteína pode regular o NF- κ B de uma forma fisiológica ou patológica e durante este processo, a α -sinucleína estaria interagindo com um ou mais moléculas que são cruciais para a via de transdução do sinal mediada pelo NF- κ B.

A apoptose, ou morte celular programada, é um dos fenômenos mais estudados no sistema nervoso central, e é um processo regulado por proteases cisteínicas chamadas caspases. As caspases efetoras clivam uma grande variedade de substratos de proteína com finalidade de causar degradação e morte celular (Stroh e Schulze-Osthoff, 1998). Existem duas vias bem caracterizadas pela qual é iniciada a ativação de caspases em células de mamíferos. Na via intrínseca, a ativação da caspase é iniciada pela liberação de citocromo c da mitocôndria no citosol, onde possui um papel essencial na formação do complexo multimérico de ativação da caspase chamado apoptossomo (Li et al., 1997; Zou et al., 1999). Assim, o citocromo c citosólico interage com a proteína Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*), o qual, na presença de dATP, leva à ativação da caspase iniciadora 9 (Zou et al., 1997). A caspase 9 ativa causa a clivagem e

ativação de caspases efetoras, como a caspase 3. Na via extrínseca, os ligantes que se ligam aos receptores de morte (por exemplo, receptor de TNF) produzem trimerização destes receptores e formação de complexo multiprotéico intracelular. As caspases iniciadoras 8 ou 10 são auto-ativadas e levam à apoptose (Schulze-Osthoff et al., 1998).

Evidências da participação de apoptose na DP foram demonstradas na literatura. Assim, Hassouna et al. (1996), por exemplo, observaram que os níveis de Bax estavam elevados em neurônios dopaminérgicos da substância negra dos camundongos tratados com MPTP. Por outro lado, os neurônios dopaminérgicos dos camundongos transgênicos com aumento de expressão de Bcl-2 (Offen et al., 1998) exibiram resistência à morte celular induzida pelo MPTP. O aumento de expressão da α -sinucleína em camundongos mostrou que ocorre degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos com ativação da caspase 9 (Mochizuki et al., 2006). No nosso trabalho, mostramos que as células transduzidas tratadas com CM ou com TNF levam ao aumento da liberação de LDH, e que isto estaria relacionado à diminuição da ativação da proteína MAPK42/44.

6 CONCLUSÃO

Em resumo, no presente trabalho observamos que as células transduzidas com lentivírus que carrega o transgene α -sinucleína WT, A30P ou 1-120 apresentam aumento de expressão protéica de α -sinucleína. Além disso, observamos o aumento de morte celular quando as células foram tratadas com CM ou TNF, com menor aumento nas células A30P e 1-120 e que isto estaria relacionado à diminuição da ativação da MAPK42/44. Ainda, observamos que existe um aumento do NF- κ B nestas células quando tratadas com TNF, porém não com CM.

REFERÊNCIAS*

- Ballas N, Lioy DT, Grunseich C, Mandel G. Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology. *Nat Neurosci.* 2009;12:311-17.
- Baptista MJ, O'Farrell C, Daya S, Ahmad R, Miller DW, Hardy J, Farrer MJ, Cookson MR. Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by alpha-synuclein in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem.* 2003;85(4):957-68.
- Ben Gedalya T, Loeb V, Israeli E, Altschuler Y, Selkoe DJ, Sharon R. Alpha-synuclein and polyunsaturated fatty acids promote clathrin-mediated endocytosis and synaptic vesicle recycling. *Traffic.* 2009;10:218-34.
- Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25:280-8.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science.* 2010;329:1663-7.
- Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature.* 2007;447:1081-6.
- Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell.* 2005;123(3):383-96.
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destée A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet.* 2004;364:1167-9.
- Caughey B, Lansbury PT. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci.* 2003;26:267-98.
- Chung CY, Koprach JB, Siddiqi H, Isacson O. Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy. *J Neurosci.* 2009;29:3365.
- Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med.* 1998 Nov;4(11):1318-20.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2011 Jun 22].

Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Harper JD, Williamson RE, Lansbury PT Jr. Accelerated oligomerization by Parkinson's disease linked alpha-synuclein mutants. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;920:42-5.

Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT Jr. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science.* 2001 Nov 9;294(5545):1346-9.

Crews L, Spencer B, Desplats P, Patrick C, Paulino A, Rockenstein E, Hansen L, Adame A, Galasko D, Masliah E. Selective Molecular Alterations in the Autophagy Pathway in Patients with Lewy Body Disease and in Models of α -Synucleinopathy. *PLoS One.* 2010;5:e9313.

Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science.* 1996;273:501-503.

Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science.* 2004;305:1292-5.

Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, Kretschmar H, Hengerer B, Kostka M. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci.* 2007;27(34):9220-32.

Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003;39:889-909.

Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, Maraganore D, Gwinn-Hardy K, Wszolek Z, Dickson D, Langston JW. Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol.* 2004;55:174-9.

Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 1991;114:2283-301.

Fornstedt B, Carlsson A. A marked rise in 5-S-cysteinyl-dopamine levels in guinea-pig striatum following reserpine treatment. *J Neural Transm.* 1989;76:155-61.

Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S-i, Anthony MD, Edwards RH. Lipid Rafts Mediate the Synaptic Localization of α -Synuclein. *J Neurosci.* 2004;24:6715.

Fortin DL, Nemani VM, Nakamura K, Edwards RH. The behavior of alpha-synuclein in neurons. *Mov Disord.* 2010;25(Suppl 1):S21-6.

Frank-Cannon TC, Tran T, Ruhn KA, Martinez TN, Hong J, Marvin M, Hartley M, Treviño I, O'Brien DE, Casey B, Goldberg MS, Tansey MG. Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration. *J Neurosci.* 2008;28:10825-34.

Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *Faseb J.* 2003;17:1954-6.

Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:395-401.

Gao N, Li YH, Li X, Yu S, Fu GL, Chen B. Effect of alpha-synuclein on the promoter activity of tyrosine hydroxylase gene. *Neurosci Bull.* 2007;23:53-7.

Gao HM, Kotzbauer PT, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *J Neurosci*. 2008;28:7687-98.

Gerondakis S, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Grumont R. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene*. 1999;18:6888-95.

Gibb WR. Melanin, tyrosine hydroxylase, calbindin and substance P in the human midbrain and substantia nigra in relation to nigrostriatal projections and differential neuronal susceptibility in Parkinson's disease. *Brain Res*. 1992;581:283-91.

Gray BC, Siskova Z, Perry VH, O'Connor V. Selective presynaptic degeneration in the synaptopathy associated with ME7-induced hippocampal pathology. *Neurobiol Dis*. 2009;35:63-74.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004;18:2195-224.

Hunot S, Boissière F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 1996;72:355-63.

Ibáñez P, Bonnet AM, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Dürr A, Brice A. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet*. 2004;364:1169-71.

Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol*. 2003;106:518-26.

Irizarry MC, Kim TW, McNamara M, Tanzi RE, George JM, Clayton DF, Hyman BT. Characterization of the precursor protein of the non-A beta component of senile plaques (NACP) in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996;55:889-95.

Iwata J, Ezaki J, Komatsu M, Yokota S, Ueno T, Tanida I, Chiba T, Tanaka K, Kominami E. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J Biol Chem*. 2006;281(7):4035-41.

Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett*. 1994;345:27-32.

Jo E, McLaurin J, Yip CM, St. George-Hyslop P, Fraser PE. α -Synuclein Membrane interactions and lipid specificity. *J Biol Chem*. 2000;275:34328-34.

Junqueira ME, Grund LZ, Orie NM, Saraiva TC, de Magalhaes Lopes CA, Lima C, Lopes-Ferreira M. Analysis of the inflammatory reaction induced by the catfish (*Cathrops spixii*) venoms. *Toxicon*. 2007; 49:909-19.

Klionsky DJ. Autophagy. *Curr Biol*. 2005;15(8):R282-3.

Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*. 1998;18:106-8.

Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*. 1998;339:1044-53.

Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*. 1998; 339:1130-43.

Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*. 1999;46:598-605.

Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet*. 2009;373:2055-66.

Lepsch LB, Munhoz CD, Kawamoto EM, Yshii LM, Lima LS, Curi-Boaventura MF, Salgado TM, Curi R, Planeta CS, Scavone C. Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-b in pc12 cells. *Mol Brain*. 2009;1;2-6.

Liu S, Ninan I, Antonova I, Battaglia F, Trinchese F, Narasanna A, Kolodilov N, Dauer W, Hawkins RD, Arancio O. alpha-Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release. *EMBO J*. 2004;23(22):4506-16.

Liu D, Jin L, Wang H, Zhao H, Zhao C, Duan C, Lu L, Wu B, Yu S, Chan P, Li Y, Yang H. Silencing alpha-synuclein gene expression enhances tyrosine hydroxylase activity in MN9D cells. *Neurochem Res*. 2008;33(7):1401-9.

Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Dec;3(12):932-42.

Madine J, Hughes E, Doig AJ, Middleton DA. The effects of alpha-synuclein on phospholipid vesicle integrity: a study using ³¹P NMR and electron microscopy. *Mol Membr Biol*. 2008;25:518.

Majeski A, Dice J. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2004;36:2435-2444.

Maries E, Dass B, Collier TJ, Kordower JH, Steece-Collier K. The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Sep;4(9):727-38.

Martens S, McMahon HT. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9:543-56.

Martinez-Vicente M, Tallozy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, Mosharov EV, Hodara R, Fredenburg R, Wu DC, Follenzi A, Dauer W, Przedborski S, Ischiropoulos H, Lansbury PT, Sulzer D, Cuervo AM. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest*. 2008;118:777-88.

Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T. Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci*. 2009;29:444-53.

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 brains. *Neurology*. 1988;38:1285-91. Meredith GE, Sonsalla PK, Chesselet MF. Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol*. 2008;115:385-98.

Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, Sapolsky RM, Scavone C. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci*. 2006;26:3813-20.

Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2000;60:277-90.

Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron.* 2010;65(1):66-79.

Oorschot DE. Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J Comp Neurol.* 1996;366:580-99.

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999;18:6853-66.

Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ.* 2006;13:861-72.

Peng X, Tehranian R, Dietrich P, Stefanis L, Perez RG. Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 15):3523-30.

Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci.* 2002;20:9142.

Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A Role for alpha -Synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis. *J Neurosci.* 2002;22:3090.

Perez RG, Hastings TG. Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J Neurochem.* 2004 Jun;89(6):1318-24.

Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:49-62.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 1997;276:2045-7.

Qureshi GA, Baig S, Bednar I, Södersten P, Forsberg G, Siden A. Increased cerebrospinal fluid concentration of nitrite in Parkinson's disease. *Neuroreport.* 1995;6:1642-4.

Rong Y, Baudry M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. *J Neurochem.* 1996;67:662-8.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p. 1.82-1.83: capítulo 3.

Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet.* 2004;363:1783-93.

Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology.* 2007;68:1501-8.

Scott DA, Tabarean I, Tang Y, Cartier A, Masliah E, Roy S. A Pathologic Cascade Leading to Synaptic Dysfunction in α -Synuclein-Induced Neurodegeneration. *J Neurosci*. 2010;30:8083.

Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 2003;302(5646):841.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388:839-40.

Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*. 2009;323:474-7.

Surmeier DJ. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2007;6:933-8.

Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*. 2007;30:228-35.

Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc*. 2006;1:241-5.

Wegener E, Oeckinghaus A, Papadopoulou N, Lavitas L, Schmidt-Supprian M, Ferch U, Mak TW, Ruland J, Heissmeyer V, Krappmann D. Essential role for IkappaB kinase beta in remodeling Carma1-Bcl10-Malt1 complexes upon T cell activation. *Mol Cell*. 2006;23:13-23.

Wickens JR, Reynolds JN, Hyland BI. Neural mechanisms of reward-related motor learning. *Curr Opin Neurobiol*. 2003;13:685-90.

Wickner W, Schekman R. Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15:658-64.

Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S, Tzitzilonis C, Soragni A, Jessberger S, Mira H, Consiglio A, Pham E, Masliah E, Gage FH, Riek R. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 8;108(10):4194-9. Epub 2011 Feb 15.

Winslow AR, Chen C-W, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA, Lichtenberg M, Menzies FM, Ravikumar B, Imarisio S, Brown S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *The Journal of Cell Biology*. 2010;190:1023.

Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood NW. Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends Mol Med*. 2006;12:521-8.

Xilouri M, Vogiatzi T, Vekrellis K, Park D, Stefanis L. Abberant α -Synuclein Confers Toxicity to Neurons in Part through Inhibition of Chaperone-Mediated Autophagy. *PLoS One*. 2009;4:e5515.

Yu S, Zuo X, Li Y, Zhang C, Zhou M, Zhang YA, Uéda K, Chan P. Inhibition of tyrosine hydroxylase expression in alpha-synuclein-transfected dopaminergic neuronal cells. *Neurosci Lett*. 2004;367:34-9.

Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Muñoz DG, de Yebenes JG. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* 2004;55:164-73.