

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

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 conseqüente estresse oxidativo. O fator de transcrição nuclear kappa 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.

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-dihidroxfenilalanina (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 conseqüentemente 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 o 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 cérebrospinal 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 recaptção 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.

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, Liou 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. Coordinate 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, Orii 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;26:38L13-20.

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, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. alpha-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 I κ B 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.