ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Lucía
Lage Pita

Tesis doctoral

Interacción entre el sistema renina-angiotensina y los procesos de agregación y difusión de α-sinucleína

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Neurociencia y Psicología Clínica

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA Y LOS PROCESOS DE AGREGACIÓN Y DIFUSIÓN DE α-SINUCLEÍNA

LUCÍA LAGE PITA

Directores: José Luis Labandeira García y Antonio Domínguez Meijide

Tutor: José Luis Labandeira García

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIA Y PSICOLOGÍA CLÍNICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS I
RESUMEN VI
ABSTRACT VIII
ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS X
ABREVIATURAS XI
1. INTRODUCCIÓN 1
1.1. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON 1
1.1.1. Epidemiología y sintomatología de la Enfermedad de Parkinson 1
1.1.2. Etiología de la Enfermedad de Parkinson 3
1.1.3. Mecanismos patológicos de la Enfermedad de Parkinson 3
1.1.3.1. Estrés oxidativo 4
1.1.3.2. Disfunción mitocondrial 4
1.1.3.3. Excitotoxicidad 5
1.1.3.4. Neuroinflamación 6
1.1.3.5. Fallos en la proteostasis de la α-sinucleína 6
1.1.3.6. Vulnerabilidad dopaminérgica 7
1.1.4. Modelos de Enfermedad de Parkinson 8
1.1.4.1. Modelos neurotóxicos 8
1.1.4.2. Modelos genéticos 10
1.1.5. Tratamientos de la Enfermedad de Parkinson 11
1.1.5.1. Tratamientos farmacológicos 12
1.1.5.2. Tratamientos no farmacológicos 13
1.2. α-SINUCLEÍNA 14
1.2.1. Tipos de sinucleína 15
1.2.2. Posibles funciones de α-sinucleína 16
1.2.3. Estructura de α-sinucleína 17
1.2.4. Agregación de α-sinucleína 18
1.2.5. Toxicidad de α-sinucleína 20
1.2.6. Transmisión de α-sinucleína 24
1.2.7. Posibles mecanismos de transmisión célula a célula de α-sinucleína 26
1.2.8. Papel de los astrocitos en la transmisión y toxicidad de α-sinucleína 28
1.2.9. Papel de la microglía en la transmisión y toxicidad de α-sinucleína 30
1.3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA) 33
1.3.1. SRA locales 34

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.2. SRA cerebral 34
1.3.3. Influencia del SRA en la Enfermedad de Parkinson 39
1.3.4. Autoanticuerpos agonistas del SRA 41
1.3.5. Tratamientos moduladores del SRA y sus receptores 44
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 47
3. MATERIAL Y MÉTODOS 50
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL 50
3.1.1. Experimentos *in vitro* 50
3.1.2. Experimentos *in vivo* 55
3.2. PURIFICACIÓN DE AUTOANTICUERPOS AGONISTAS DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1 55
3.3. CULTIVOS CELULARES Y TRANSFECCIÓN 56
3.4. TRATAMIENTOS CELULARES 57
3.5. INMUNOFLUORESCENCIA DE CULTIVOS CELULARES PARA CARACTERIZACIÓN, CUANTIFICACIÓN Y TAMAÑO DE LAS INCLUSIONES 60
3.6. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES 61
3.7. INMUNOHISTOQUÍMICA EN RATÓN 63
3.8. CUANTIFICACIÓN POR MICROSCOPÍA 63
3.9. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT 64
3.10. SOLUBILIDAD EN TRITON-X Y SDS 67
3.11. PREPARACIÓN DE FIBRILLAS PREFORMADAS 69
3.12. CONVERSIÓN INDUCIDA POR AGITACIÓN EN TIEMPO REAL (RT-QuIC) 70
3.13. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN (^{1}H-RMN) 70
3.14. DIFUSIÓN DE α-SINUCLEÍNA Y TRATAMIENTOS CELULARES 70
3.15. CITOMETRÍA DE FLUJO 71
3.16. TRANSFECCIÓN Y TRATAMIENTOS DE ARN PEQUEÑO DE INTERFERENCIA (siRNA) 72
3.17. MEDICIONES DE ACTIVIDAD NADPH-OXIDASA 72
3.18. ACTIVIDAD Rho QUINASA 72
3.19. MEDICIONES DE NIVELES DE CALCIO 73
3.20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 73
4. RESULTADOS 75
4.1. LA AGREGACIÓN Y TRANSMISIÓN DE α-SINUCLEÍNA NEURONAL Y GLIAL ESTÁ MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1 75
4.1.1. Validación de modelos *in vitro*: presencia de estructuras similares a agregados en células neuronales, microgliales y astrogliales 75

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.2. Efectos del tratamiento con angiotensina II en el porcentaje de células con inclusiones y en el tamaño medio de las inclusiones en células neuronales y microgliales 79

4.1.3. Papel de angiotensina II y de losartán en los niveles de expresión, fosforilación o transfección de α-sinucleína en los modelos *in vitro* 82

4.1.4. Papel de la activación de NADPH-oxidasa y del aumento del calcio intracelular, inducidos por el eje AngII/AT1, en el aumento de la agregación de α-sinucleína 84

4.1.5. Validación de un modelo *in vivo*: estudio de la agregación de α-sinucleína en ratones tratados con MPTP 86

4.1.6. Efectos de la modulación de SRA en la agregación de α-sinucleína en ratones tratados con MPTP 87

4.1.7. Liberación y captación de α-sinucleína entre diferentes líneas celulares 89

4.1.8. Efectos de angiotensina II sobre la liberación y captación de α-sinucleína entre diferentes líneas celulares 92

4.2. ROCK MEDIA LA AGREGACIÓN DE α-SINUCLEÍNA 94

4.2.1. Efectos del tratamiento con el inhibidor de ROCK fasudil en el aumento de la agregación de α-sinucleína mediado por angiotensina II 94

4.2.2. Papel de angiotensina II y fasudil en la expresión de la proteína α-sinucleína y en su fosforilación 97

4.2.3. Agregación de α-sinucleína tras la interacción directa entre fasudil y α-sinucleína 98

4.2.4. Efecto de la amplificación RT-QuIC sobre la degradación de fasudil 101

4.2.5. Fasudil inhibe la agregación de α-sinucleína inducida por fibrillas preformadas *in cellulo*…… 103

4.2.6. Efectos de fasudil sobre la agregación de α-sinucleína a través de la inhibición de ROCK..... 104

4.2.7. Efectos del tratamiento temprano con fasudil sobre la transfección 106

4.2.8. Papel de fasudil en la endocitosis de α-sinucleína en la microglía 107

4.2.9. Inhibición del aumento de la actividad de la NADPH-oxidasa inducido por la activación del eje AngII/AT1 y la acumulación de α-sinucleína mediado por fasudil 109

4.2.10. Efecto de fasudil en el incremento intraneuronal del calcio 110

4.2.11. Efecto de fasudil en la autofagia 111

4.3. AUTOANTICUERPOS AGONISTAS DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1 PROMUEVEN LA AGREGACIÓN DE α-SINUCLEÍNA EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS 113

4.3.1. Efecto de los autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina II tipo 1 en la agregación de α-sinucleína 113

4.3.2. Papel del aumento del calcio intracelular en el aumento de la agregación de α-sinucleína inducida por autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina II tipo 1 116

4.3.3. Papel del aumento de la activación de la NADPH-oxidasa en el aumento de la agregación de α-sinucleína inducida por autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina II tipo 1 117

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. DISCUSIÓN.....119

5.1. LA AGREGACIÓN Y TRANSMISIÓN DE α-SINUCLEÍNA NEURONAL Y GLIAL ESTÁ MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1 119

5.1.1. El tratamiento con angiotensina II aumenta el porcentaje de células con inclusiones y el tamaño medio de las inclusiones en células neuronales y microgliales.....119

5.1.2. La activación de la NADPH-oxidasa y el aumento del calcio intracelular, median el aumento inducido por el eje AngII/AT1 en la agregación de α-sinucleína 120

5.1.3. Presencia de agregados de α-sinucleína en el modelo murino de parkinsonismo por MPTP y efectos de la modulación de SRA en estos agregados 121

5.1.4. Efectos de angiotensina II sobre la liberación y captación de α-sinucleína entre diferentes líneas celulares 122

5.2. FASUDIL INHIBE LA AGREGACIÓN DE α-SINUCLEÍNA A TRAVÉS DE MECANISMOS MEDIADOS POR LA INHIBICIÓN DE ROCK.....127

5.2.1. Fasudil inhibe el aumento de la agregación de α-sinucleína mediado por angiotensina II......127

5.2.2. La inhibición de ROCK media los efectos de fasudil sobre la agregación de α-sinucleína.....127

5.2.3. La inhibición de ROCK bloquea la endocitosis de α-sinucleína en la microglía 128

5.2.4. Fasudil inhibe el aumento de la actividad NADPH-oxidasa y el influjo de calcio inducido por la activación del eje AngII/AT1 y la acumulación de α-sinucleína.....129

5.2.5. Fasudil aumenta la autofagia 130

5.3. AUTOANTICUERPOS AGONISTAS DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1 PROMUEVEN LA AGREGACIÓN DE α-SINUCLEÍNA EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS 132

6. CONCLUSIONES.....135

7. CONCLUSIONS 137

8. BIBLIOGRAFÍA.....140

ANEXO I.....195

ANEXO II 213

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS:

Primeramente, quería agradecer a todos los miembros de mi laboratorio por haber hecho posible esta tesis y por enseñarme lo que realmente es la ciencia:

Al Profesor **José Luis Labandeira García**, por su dedicación constante, que ha permitido que cada uno de los miembros del laboratorio avancemos en nuestra carrera investigadora. Gracias por brindarme la oportunidad de realizar la tesis y por todo el esfuerzo invertido para que mi trabajo saliera adelante.

A la Profesora **María José Guerra Seijas**, por su amabilidad y sus siempre buenas palabras. Gracias por haber sido mi mentora durante las prácticas de medicina y por todos los consejos que me has dado para mejorar como docente.

A **Ana Isabel**, por ser una trabajadora incansable que siempre está dispuesta a ayudar a los demás. Gracias por hacer que el laboratorio funcione y vaya adelante.

A **Antonio**, por ser el tutor más hablador y contador de anécdotas que existe. A pesar de las múltiples riñas y discusiones, te agradezco lo que me has enseñado durante todos estos años.

A **Pablo Garrido**, con quien he tenido la suerte de colaborar y trabajar en este laboratorio. Gracias por tu amabilidad y por ser la primera persona que me ha enseñado a desenvolverme laboratorio.

A **Alicia**, por haber sido mi gran apoyo durante mi estancia en Londres. Gracias por hacerla tan agradable y por integrarme en un grupo tan maravilloso y divertido como el de Mitolab.

A **Carmen Díaz**, por ser alguien que te impulsa a replantearte el trabajo con una nueva perspectiva. Gracias por tu constante disposición a ayudar y por tu buen corazón.

A **Begoña Villar**, por ser una persona a la que considero muy inteligente y que siempre está dispuesta a echar una mano. Gracias por tu generosidad y por aportar buen humor al laboratorio.

A **Rita**, por siempre estar dispuesta a ayudar y brindar tu apoyo.

A **Andrea**, por tu alegría, bondad y apoyo constante. Gracias por estar siempre con una sonrisa y por la generosidad con la que afrontas la vida. Agradezco profundamente que siempre me hayas brindado tu apoyo de manera incondicional, especialmente en esta última etapa de la tesis, la verdad es que tu disposición para ayudar a los demás siempre me ha emocionado. Eres una persona que irradia alegría y buena vibra allá donde vas, transformando el ambiente y contagiando felicidad a quienes te rodean. Ojalá hubiera más personas como tú, y espero poder aprender de ti a afrontar la vida siempre con una sonrisa. Tu calidez y amabilidad hacen que le alegres el día a las personas que te rodean, espero que nunca cambies eso de ti porque creo que es un don muy valioso.

A **Ana Muñoz**, por tu templanza, amabilidad, profesionalidad y por siempre estar dispuesta a ayudar a los demás.

A **María**, por ser una persona con personalidad y con muy buena vibra. Gracias por haberme ayudado durante los años que coincidimos en la tesis y por las conversaciones tan amenas y entretenidas que hemos tenido.

A **Mary**, por la ayuda que me has proporcionado siempre que la he necesitado y por ser una trabajadora excepcional.

A **Juan**, porque su trabajo es primordial en este laboratorio. Gracias por ser una persona siempre dispuesta ayudar y por llevar tan bien la carga que es la realización de pedidos, no todo el mundo podría llevarlo con una sonrisa siempre en la cara.

A **Jannette**, gracias por brindarme siempre tu ayuda con todas las gestiones del doctorado y por ser una trabajadora tan profesional y rigurosa. Gracias a tu dedicación, el laboratorio no solo funciona, sino que avanza de manera organizada y eficiente.

A **Iría**, por ser una persona tan rigurosa y profesional en el trabajo que hace, estricta, pero con buen corazón.

A **Laura**, **Lucía** y **Mateo**, las nuevas incorporaciones. Gracias por aportar frescura y dinamismo al laboratorio, que hace que los días sean más amenos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A partir de aquí, va a haber muchos "te quiero" en estos agradecimientos, pero eso sólo refleja la persona que soy y lo agradecida que estoy de tener a toda la gente que me rodea.

A **Cris**, qué puedo decir de ti, has sido mi madre, mi mentora, mi compañera de risas y de poyata y, sobre todo, mi amiga. Estos cinco años de tesis se han hecho mucho más amenos y divertidos gracias a ti. Muchas gracias por la alegría que transmites, por las innumerables historias que nos hemos contado y, sobre todo, gracias por enseñarme a sonreír a pesar de que la vida pueda ser a veces difícil. Eres la persona que más admiro del laboratorio, por tu dedicación, tu resiliencia, tu constancia, tu esfuerzo, tu empeño y tu saber. Espero que nunca pierdas esa sonrisa tuya, que contagia de alegría a las personas que te rodean. No sabes lo feliz que me hace escuchar cuando llegas al lab. Vales muchísimo y se lo demuestras al mundo cada día. Te quiero.

A **Pili**, una persona con la que me identifico mucho. Ir de 0 a 100 es mi pasión y, desde que te conocí me gusta todavía más, ya que pensaba que eso sólo me pasaba a mí. Gracias por tu ayuda siempre que la he necesitado y por las largas charlas mientras trabajamos, que hacen que las horas en el laboratorio sean más amenas y entretenidas. Vales muchísimo, nunca dejes que te digan lo contrario. Sin ti el laboratorio no sería el mismo, ya que tienes el don de convertir todos los lugares en los que estás en sitios mucho más agradables, divertidos y cómodos para la gente que te rodea. Gracias por la confianza que me has dado siempre y por la comodidad que me haces sentir al estar contigo. Te quiero.

A **Aloia**, mi "partner in crime". Aunque en un inicio no encajábamos del todo, poco a poco fuimos forjando una relación que va mucho más allá de ser compañeras de laboratorio. Hoy en día puedo decir que eres una de las personas más cercanas e importantes que tengo, una amiga muy especial para mí. Ha sido toda una aventura y un inmenso placer haber vivido estos años a tu lado, creo que no hay otra persona con la que pudiera haber llevado esto mejor. Gracias por escucharme siempre que lo he necesitado, tanto laboral como personalmente, eres una persona que sabe apoyar a sus amigos y eso es de valorar mucho. Me alegra poder decir que en todo momento nos hemos entendido muy bien, que siempre hemos sabido darnos apoyo mutuo y que, aunque las cosas en algunos momentos no nos fueran como quisiéramos, siempre hemos sabido como actuar para que la otra estuviera bien. Quiero que sepas que muy pocas amigas aguantan 6 años juntas trabajando en un mismo sitio y salen bien paradas, creo que hemos superado esa fase de la amistad y de la vida con creces. Gracias por estos años, sin duda has hecho que la tesis fuera mucho más bonita. Sin embargo, aunque ahora dejemos de ser compañeras, todavía nos quedan muchos festivales, fiestas, viajes y aventuras que vivir juntas, ya que no sólo me llevo una tesis después de estos años, sino que me llevo a una gran amiga. Te quiero.

A los amigos que he hecho estos años de tesis en el CIMUS.

A **María**, la forastera que sentaron a mi lado en el laboratorio, cuando yo apenas tenía amigos en el CIMUS. Tenía muchas ganas de conocerte y por eso, al segundo, sin dudar, te pregunté: ¿quieres ser mi amiga?, como si tuviera 5 años, y tú sin dudarlo me dijiste que sí. Desde entonces no sé cuántos planes y aventuras hemos vivido en estos años de tesis, pero han sido un gusto enorme haberlos compartido contigo. Ha sido una experiencia muy dura pero también divertida y me alegro mucho de haberla vivido a tu lado, espero poder seguir compartiendo esos momentos de locura contigo. Gracias por todo el apoyo que me has bridado, por tu amabilidad, por tu buena vibra, tu alegría, tus bromas, tu "María de fiesta y no de fiesta" y por demostrar, cada día, tu amistad. Sin duda, te has convertido en un pilar fundamental en mi vida. Te quiero.

A **Antía**, la niña mayor del P2L8. Con 23 años cuando empezaste la tesis y nosotras con 26 ya eras la cabeza más razonable del grupo. Gracias por toda la alegría que transmites, por tu sonrisa de pícara cuando hacemos alguna maldad y por ser la DJ personalizada del laboratorio, pero, sobre todo, gracias por los ánimos y el abrazo tan reconfortante ese día y todos los demás. Tienes un corazón enorme, y aunque expresar tus sentimientos no te es nada fácil, sabemos cuánto nos quieres. Me alegra mucho saber que siempre voy a poder contar contigo, y ten por seguro que yo también estaré siempre para apoyarte. Sin duda, sin ti el grupo no sería lo mismo y nuestro laboratorio estaría muy vacío. Eres una gran persona y amiga, y agradezco mucho haber estado contigo estos años y los que vendrán. Te quiero.

A **Marco**, el adulto pequeño del P2L8. Tu estancia con nosotras fue corta pero muy intensa. Llegaste para quedarte y para hacernos reír a todos cada día. Creo que en mi vida me había pasado de hacerme tan amiga de alguien tan rápido como contigo y eso demuestra mucho de ti. Te tengo que agradecer tanto por todo el apoyo que me has brindado en estos años de tesis, que espero poder hacer lo mismo ahora que tú comienzas la tuya. De nuevo, gracias por todas las risas, fiestas, aventuras y locuras juntos, para mí siempre serás parte del P2L8. Te quiero.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A **Iara**, una amiga a la que conocía desde hace tantos años y que ahora se ha vuelto indispensable. Haber podido superar el reto de la tesis a tu lado ha sido un enorme placer. A donde quiera que vayas transmites una alegría con tu sonrisa contagiosa que hace alegrar el día a los demás, y, a mí, sin duda me ha alegrado en los momentos más difíciles de este camino. Gracias por siempre ser la alegría del grupo y por siempre apuntarte a un bombardeo, siempre nos haces estar más contentas cuando nos haces visitas al laboratorio contando tus historias sobe tus dramas y tus aventuras. Gracias por dejarme conocerte más en estos años y por poderte llamar amiga. Vales muchísimo, te quiero.

A **Andrea**, una persona a la que en muy muy poco tiempo le he cogido un cariño inmenso. Una persona que siempre está feliz y que siempre está dispuesta a apuntarse a un "Coreano". Gracias por las charlas tan largas que nos has dado y por siempre decir que sí a nuestros planes de ir a por churros, salir, comer, viajar, entre muchos otros. Eres increíble, siempre te lo he dicho y siempre te lo diré, has hecho que la tesis fuera infinitamente más llevadera y divertida. Te estoy muy agradecida por todo el apoyo que siempre me has dado y por haberte quedado a nuestro lado siempre, no sabes lo feliz que me hace eso. Espero poder seguir compartiendo más momentos contigo y acompañarte en las siguientes etapas de tu vida. Te quiero.

A **Pablo** estancia o pequeño, la revolución del laboratorio. Gracias por habernos hecho uno de los 3 meses más felices de la tesis. Rebosas felicidad allí por donde vas y siempre era un gusto y una alegría tus vistas al laboratorio entre tratamiento y tratamiento. Ojalá haber podido vivir más cosas contigo codo con codo en el laboratorio, espero que algún día nos podamos volver a ver en esa situación. Sin embargo, hasta entonces, quedará ir a verte a Málaga las veces que haga falta mientras nos enseñas como allí sí que hace siempre bueno. Gracias por todo tu apoyo y por tu ayuda con todo, has dado mucha felicidad a este laboratorio.

A **Alba** y a **Diego**, que, aunque fue sobre todo este último año cuando hemos estado más juntos, siempre habéis estado dispuestos a ayudar y a dar ánimos cuando lo necesité. En concreto a ti Alba, que siempre tienes una sonrisa que ofrecer y desde el primer momento que he empezado la tesis has estado ahí para ofrecer tu apoyo y tu ayuda. Gracias a ambos por los buenos momentos.

A **María Silveira**, agradezco profundamente el apoyo que me brindaste durante los últimos años de mi tesis. Ha sido un verdadero placer conocerte, y tu valentía siempre ha sido una fuente de inspiración para mí.

A **Víctor**, que, aunque lleve poco tiempo en el laboratorio, ha entrado muy rápido y fácil en nuestras vidas. Gracias por aportar frescura y alegría al grupo (y por aguantar todas nuestras tonterías).

A mis amigas de Cariño, en especial a **Noe**, **Marta** y **Tamara**, la gente que ha estado conmigo literalmente desde la guardería. Gracias por hacer que la vuelta a casa siempre sea un gusto, lleno de alegría, de historias y de bromas que hacen que pueda desconectar de mi vida cotidiana. Os quiero a todas. Más concretamente me gustaría agradecerte a ti, Noe, la persona a la que le he dado la tabarra durante largas horas sobre mi tesis dando vueltas por Cariño en el coche. Una persona a la que siempre he admirado. Has sido un apoyo muy grande para mí con tus siempre buenas y alentadoras palabras. Gracias por confiar en mí como nadie y por todo el apoyo que me has brindado a lo largo de estos años.

A mis **Estróbilos**, cada uno de vosotros habéis formado parte de esta aventura de alguna forma u otra, no sólo en la tesis, sino desde el inicio de mi carrera en el mundo de la ciencia, en donde, con 17 años y siendo todavía una niña, tuve la suerte de conoceros y de dejar que me enseñarais lo que es el apoyo y el esfuerzo tanto a nivel profesional como a nivel personal. Gracias por darme unos de los mejores años de mi vida y por continuar apoyándome en todo. Os quiero a todos. En especial, me gustaría agradecer individualmente a los que siento que más habéis estado conmigo durante estos últimos años: **Sabela**, **Alba**, **Tere**, **Belén**, **Julia**, **Dani L., Flo y…**

A **María**, una de mis mejores amigas de la vida, la que ha estado literalmente ahí desde el principio y la que me ha apoyado como la que más en mis mejores y peores momentos. Gracias por ser una persona que sabe escuchar, por ser tan atenta y empática con la gente, por no rendirte nunca con nada y, sobre todo, por ser mi amiga. Siempre me has bridado la ayuda que necesitaba en cada instante y siempre has sabido cómo reconfortarme cuando no estaba en mi mejor momento durante estos años. Han sido años muy duros para ambas, pero me alegra saber que siempre hemos estado ahí la una para la otra y sé que seguirá así por mucho tiempo más. Sé que estás orgullosa de mi al igual que sabes lo muy orgullosa que estoy yo de ti, y no sabes lo feliz que me hace eso. Estoy muy contenta de lo que hemos construido durante estos años y de haber crecido y madurado juntas, ya que creo que eso hará que nuestra amistad sea para siempre. Vales muchísimo. Te quiero.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A **Cris**, una de mis mejores amigas y mi modelo a seguir. Siempre te he admirado mucho, por tu constancia y dedicación en todos los retos que se te han presentado en la vida. Me hace muy feliz que sigas a mi lado a pesar de la distancia, y quiero que sepas que siempre vas a tener una amiga aquí, que te espera con mucha ilusión y con los brazos muy abiertos en tu regreso a casa. No sabes lo contenta que me pone saber que siempre que llegas a Santiago van a ser unos días de mucha felicidad, desconexión y de largas anécdotas que me hacen volver a esos momentos de hace unos años en donde pasábamos día sí y día también juntas. Gracias por todo el apoyo y los ánimos que me has brindado a lo largo de toda mi carrera y a lo largo de mi vida, sin ti no hubiese sido lo mismo. Te estoy muy agradecida por eso y por siempre transmitir alegría y muy buena vibra al grupo, eres, sin duda, una persona imprescindible para mí. Te quiero.

A **Patri**, la persona de estróbilos que ha vivido esta aventura a la par que yo. Gracias por todas las cañas después de trabajar y por los viajes a la nieve, Valencia, Barcelona y Sevilla que hemos hecho estos años, y que, sin duda, seguiremos haciendo. Ha sido siempre un respiro y un placer hacer estos planes contigo, ya que has hecho que pudiera alejarme un poco de mi rutina. También te agradezco mucho que siempre cuentes conmigo para hacer algún plan con tu grupo amigos y que siempre me hayas incluido como una más. Eres una persona que pone mucho empeño y dedicación en su trabajo y que siempre está con una sonrisa a pesar de las dificultades. Gracias por transmitir siempre tanta alegría y apoyo, haces que sea todo mucho más fácil y llevadero. Estoy muy feliz de tenerte y de saber que seguiremos como hasta ahora muchos años más. Te quiero.

A **Borja**, uno de mis mejores amigos que siempre me ha apoyado y escuchado cuando más lo necesitaba. Gracias por estar a mi lado durante todos estos años y por brindarme tu ayuda cada vez que la he necesitado. Me hace muy feliz que, después de tanto tiempo juntos, podamos seguir disfrutando el uno del otro y podamos seguir apoyándonos en cada paso de nuestra vida. Estoy muy orgullosa de ti y de la gran persona que eres, creo que conozco muy pocas personas como tú, tan atentas, espabiladas, graciosas, generosas y, sobre todo, con tan buen corazón. Eres un pilar fundamental en mi vida. Te quiero.

A **Pablo**, una persona muy especial para mí. Eres el amigo que siempre tiene una sonrisa para ofrecer y alguna frase que te hace reír en los momentos que más hacen falta. Gracias por siempre estar dispuesto a cualquier plan y por acogernos en Barcelona o en Heidelberg para vivir otra aventura más, siempre haces que sean momentos de felicidad y desconexión para mí. Me alegra mucho haber podido comenzar y terminar esta aventura que es la tesis a la vez para apoyarnos mutuamente, aunque fuese en la distancia, así que gracias por ello también. Te quiero.

A mi **familia**, a todos, a absolutamente todos mis tíos, primos, sobrinos y demás. Todos ellos me han dado siempre la fuerza y la alegría que necesitaba para continuar mi carrera. Las largas horas en mi habitación trabajando siempre se han llevado mucho mejor cuando sabía que tenía comida familiar, que iba a haber baile, karaoke, juegos y muchas, muchas risas. Tengo una suerte inmensa de tener una familia tan numerosa y cariñosa, y estoy muy orgullosa de verme reflejados en ellos, mi alegría, mis bromas y mis expresiones tan diferentes al resto de los demás, sin duda, os lo debo a vosotros. Os quiero mucho.

A mis padres, **Juan** y **Eli**, sin duda los mejores padres que una puede tener. Siempre os voy a agradecer todo lo que habéis hecho por mí y por mis hermanos, habéis dado todo lo que tenéis y más para que saliéramos adelante. No lo habéis tenido nada fácil en la vida y no habéis podido tener las oportunidades que han tenido otros padres y, a pesar de ello, habéis conseguido lo que muchos otros no han podido hacer, criar a 3 hijos que os adoran y que están muy orgullosos de vosotros. Sois un ejemplo a seguir para muchos, ya que siempre habéis trabajado día tras día para darnos lo mejor y para que podamos cumplir nuestros sueños. Habéis hipotecado vuestra vida por mí, por mis hermanos, y siempre lo voy a tener muy presente. A vosotros es a quien más os agradezco todo, me habéis dado la mejor familia y la mejor educación, llena de risas, alegrías, riñas, locuras y, sobre todo, amor. No os hacéis una idea de lo orgullosa que estoy de vosotros, porque estos logros son vuestros. Gracias por todo vuestro apoyo durante estos años y durante toda mi vida, sin duda, sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. Os quiero muchísimo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A mi hermana, **Isa**, la persona que más admiro. Gracias por apoyarme desde el primer momento que empecé esta carrera y de mostrar tanto interés por lo que hago, a pesar de que tú hayas elegido un camino tan distinto. Eres una persona que, por muy lejos que esté, siempre me ha brindado todo su apoyo y cariño, y siempre te voy a estar agradecida por ello. Siempre me ha asombrado lo inteligente, capaz y valiente que eres, no sabes lo que me enorgullece decir que tengo una hermana que ha volado hasta Japón para vivir ella sola a pesar de todas las dificultades. Eres, sin duda, digna de admirar. Y, no sólo te admiro por eso, sino también por tus capacidades artísticas y tu talento a la hora de hacer cualquier cosa, eres increíble. Eres una persona que transmite mucha alegría a la gente y, al igual que el resto de la familia, siempre sabes cuando hacer bromas y hacer reír, e Isa, eso vale mucho. Puede que cuando fuéramos pequeñas nuestra relación no fuera muy cercana, sin embargo, me siento muy feliz de saber que ahora podemos contar la una con la otra siempre que lo necesitemos. Gracias por ser la mejor hermana mayor que una puede tener, eres mi mayor ejemplo a seguir y cada año que pasa me siento más reflejada en ti. Te quiero muchísimo.

A mi hermano, **Juan**, a quien, a pesar de todas las riñas, quiero con locura. Siempre me has mostrado todo tu cariño y apoyo a lo largo de estos años y siempre te voy a estar muy agradecida por ello. Quizás yo te debería haber mostrado más apoyo, pero a veces me cuesta ya que, seamos sinceros, me encanta guerrearte como buena hermana mayor que soy. Sin embargo, quería que supieras que estoy muy orgullosa de ti al igual que sé que tú lo estás de mí. También te agradezco que, en mi ausencia, cuides tan bien de Kira. Te quiero muchísimo.

A mi abuela, **Coralia**, una persona sin duda muy especial para mí. Cada año que pasa me siento más reflejada en ti. Eres una abuela muy especial, admiro tu mente tan abierta, a pesar de tu edad, y tu generosidad con todo el mundo. He conocido a lo largo de mi vida a mucha gente mayor y, te aseguro, que nunca conocí a nadie como tú. Estoy muy orgullosa. Gracias por el apoyo y la dedicación que ofreces a toda la familia. Te quiero muchísimo.

A **Kira**, cómo no te iba a agradecer a ti, un miembro imprescindible de mi familia, que siempre me ha brindado la compañía que necesitaba en mis momentos de aislamiento escribiendo la tesis. Gracias por darme siempre tanta alegría y cariño y por los largos paseos por la playa o haciendo rutas juntas, he de decir que son de los momentos más felices de mi vida. Tú eres, sin duda, la que más calma y tranquilidad me ha aportado. Te quiero muchísimo.

Finalmente, gracias a ti, **Mateo**, mi compañero de vida. Gracias por todo tu apoyo durante estos años, sin duda hacer la tesis a la par que tu pareja no es fácil, pero pienso que hemos superado esta fase juntos con creces. Ha habido momentos muy duros para ambos en el trabajo, pero estoy muy orgullosa y feliz de que los hayamos podido superar juntos y de haber podido apoyarnos mutuamente cada día. Eres una persona a la que admiro muchísimo y, aunque antes eso me hacía sentir pequeñita, ha hecho que quiera aprender y descubrir de la vida mucho más. Siempre te voy a estar inmensamente agradecida por todo lo que has hecho por mí. Gracias por brindarme siempre buenas palabras, has hecho que vea la vida de otra manera y gracias a ti ha habido un cambio muy grande en mi personalidad y en cómo me tomo las cosas. Ahora sé afrontar y enfrentar mejor los obstáculos que se me presentan, has logrado en mí un gran crecimiento personal. Además, agradezco tu capacidad para saber tranquilizarme cuando estoy llegando al límite, tu calma y templanza me han ayudado a poder continuar y, el saber que al llegar a casa estarías tú, hacía que los días en el laboratorio fuesen más amenos. Gracias por haberme hecho este viaje más llevadero y fácil, ha sido un placer haber llevado esta etapa de nuestras vidas de la mano y, sin duda, sin ti no hubiera sido lo mismo. Sé que estás orgulloso de mí y yo también estoy muy orgullosa de ti. Ahora toca comenzar una nueva etapa, y me alegra mucho poder comenzarla contigo. Te amo.

…

Por último, quiero agradecerme a mí misma y dedicarme unas palabras, para recordarme que soy capaz de lograr todo lo que me proponga, y esta tesis es una gran prueba de ello. Sin duda, nada de esto hubiera sido posible sin mi propio esfuerzo, y es fundamental aprender a valorar lo que hacemos y reconocer nuestros propios logros. A veces es fácil caer en la autocrítica y la autodestrucción, diciéndonos que no somos suficientes o que no estamos a la altura. Sin embargo, olvidamos que gran parte de donde estamos se debe a nuestro esfuerzo, perseverancia y dedicación. Por eso, con estas palabras, quiero recordarme cada día que soy capaz de superar cualquier desafío y que, aunque el camino sea difícil, con pasión, dedicación y ganas, siempre se puede salir adelante.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer (EA), y su prevalencia está en aumento debido al envejecimiento de la población y otros factores. La EP es un trastorno neurodegenerativo crónico y progresivo, caracterizado principalmente por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) y la acumulación de α-sinucleína (α-syn) que da lugar a agregados en unas estructuras proteicas denominadas cuerpos de Lewy (LB). Estos agregados juegan un papel crucial en la patogénesis de la EP, contribuyendo tanto a la disfunción neuronal como a la propagación de la patología a lo largo del sistema nervioso. Si bien los mecanismos exactos que subyacen a la agregación y transmisión de α-syn aún no están completamente esclarecidos, se cree que su diseminación entre diferentes tipos celulares, incluidos neuronas, microglía y astrocitos, es clave para la progresión de la enfermedad. La α-syn, que en su estado fisiológico tiene una estructura intrínsecamente desordenada, puede sufrir cambios conformacionales que favorecen su agregación en forma de oligómeros tóxicos y de fibrillas. Estos agregados no sólo se forman y acumulan en las neuronas dopaminérgicas, sino que también pueden ser liberados al espacio extracelular y captados por células vecinas, contribuyendo a la propagación celular de la patología. Diversos estudios sugieren que los astrocitos y la microglía, tipos celulares esenciales en el mantenimiento del ambiente neuronal, pueden fagocitar y liberar α-syn agregada, contribuyendo también a la expansión de la neurodegeneración. El sistema renina-angiotensina (SRA) ha surgido como un elemento de interés en neurociencia debido a su implicación en varios procesos neurodegenerativos. Este sistema, mejor conocido por su papel en la regulación de la presión arterial, también está presente en el cerebro, donde la activación del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1) por la angiotensina II (AngII) ha sido relacionada con un incremento del estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la neuroinflamación, mecanismos involucrados en la patogenia de la EP. Además, el SRA cerebral puede modular directamente la actividad de células gliales y neuronales, lo que sugiere un vínculo entre la activación del eje AngII/AT1 y la agregación de α-syn. Recientemente varios estudios han observado el papel de los procesos autoinmunes en la neurodegeneración, incluida en la EP. Se ha sugerido que los autoanticuerpos contra el receptor AT1 (AT1-AA) actúan como agonistas de estos receptores y que estos autoanticuerpos están aumentados en el suero y en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EP. Sin embargo, hasta ahora, no se ha estudiado el posible efecto de los AT1-AA sobre la agregación de α-syn. Por tanto, en la presente tesis estudiamos la interacción entre el SRA y los procesos de agregación y transmisión de α-syn, centrándonos específicamente en el impacto de la activación del receptor AT1 por AngII en la acumulación de α-syn en modelos *in vitro* e *in vivo* de EP. Evaluamos los efectos de la activación e inhibición del eje AngII/AT1 sobre la agregación y propagación de α-syn mediante el empleo de cultivos celulares de neuronas, microglía y astrocitos, así como modelos murinos tratados con MPTP, una neurotoxina que reproduce la degeneración dopaminérgica característica de la EP. Además, también investigamos la relación entre los efectos de la vía AngII/AT1 en la agregación de la α-syn y la posible implicación de la vía RhoA/ROCK sobre esta agregación utilizando los mismos modelos *in vitro* e *in vivo* de EP. Los resultados obtenidos revelaron que la activación del receptor AT1 mediante AngII induce un aumento significativo en la agregación de α-syn, tanto en células neuronales como en microglía. Además, la inhibición del receptor AT1, disminuye la formación de agregados de α-syn tanto en modelos celulares como murinos. Estos resultados sugieren que el eje AngII/AT1 juega un papel relevante en la patogénesis de la EP. A nivel mecanístico, se observó que la activación de la NADPH-oxidasa y el aumento del calcio intracelular, inducidos por AngII,

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

promueven la agregación de α-syn, lo que sugiere que el estrés oxidativo y la disfunción del metabolismo del calcio son vías importantes a través de las cuales el SRA puede influir en la progresión de la EP. Otro aspecto fundamental del estudio es la transmisión intercelular de α-syn. Nuestros resultados muestran una transferencia notablemente mayor de α-syn entre las neuronas dopaminérgicas en comparación con la microglía y los astrocitos. Además, indican que la captación de la α-syn liberada por las neuronas es captada por parte de astrocitos y microglía, pero especialmente por los astrocitos. Por otro lado, observamos que el tratamiento con AngII aumenta la captación de α-syn por parte de las células microgliales, incrementando la capacidad de estas para captar la α-syn liberada por neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, comprobamos también como el tratamiento con AngII no provoca cambios significativos en la tasa de transferencia de α-syn de las neuronas a las células gliales, lo que indica que la acumulación de agregados podría aumentar en las neuronas tras la activación del eje AngII/AT1. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la microglía y los astrocitos no solo participan en la captación de α-syn extracelular, sino que también facilitan su liberación y transferencia a otras células, lo que incrementa la diseminación de la patología. Este hallazgo resalta la importancia de las células gliales en la expansión de la neurodegeneración en la EP, más allá de su papel tradicional como células de soporte neuronal. Asimismo, observamos que los AT1-AA, que se encuentran en pacientes con hipertensión arterial y otras enfermedades cardiovasculares, también promueven la agregación de α-syn en neuronas dopaminérgicas, al promover la activación del eje AngII/AT1. El presente estudio demuestra que los AT1-AA no sólo incrementan la formación de agregados de α-syn, sino que también exacerban el estrés oxidativo y el desequilibrio del calcio intracelular, contribuyendo a la neurodegeneración. Finalmente, estudiamos el potencial terapéutico de la inhibición de la vía RhoA/ROCK como una estrategia para reducir la agregación de α-syn inducida por la AngII. Los resultados indican que la inhibición de la vía RhoA/ROCK disminuye significativamente la formación de agregados de α-syn inducidos por AngII, en modelos celulares microgliales y neuronales. Además, el bloqueo de esta vía también redujo la agregación de α-syn en modelos murinos tratados con MPTP. Por otro lado, nuestros resultados revelan que en células microgliales, la inhibición de la vía RhoA/ROCK también promueve la autofagia, facilitando la eliminación de los agregados de α-syn. Además, también estudiamos los efectos de la inhibición de la vía RhoA/ROCK sobre la activación de la NADPH-oxidasa y el aumento del calcio intracelular inducidos por el tratamiento con AngII y la agregación de la α-syn. Por tanto, esta vía parece ser un mediador crucial de los efectos neurotóxicos del SRA en la EP, lo que sugiere que su inhibición podría tener beneficios terapéuticos en la ralentización de la progresión de la enfermedad. En conclusión, nuestros resultados proporcionan evidencia clara de que el sistema SRA, especialmente el eje AngII/AT1 y la vía RhoA/ROCK, desempeñan un papel fundamental en la agregación y transmisión de α-syn, procesos clave en la patogenia de la EP. Además, el hallazgo de que los AT1-AA promueven la neurodegeneración a través del eje AngII/AT1 abre nuevas vías de investigación sobre la relación entre enfermedades periféricas y la EP. Por lo tanto, la modulación del eje AngII/AT1 y de la vía RhoA/ROCK podría representar una estrategia prometedora para el desarrollo de nuevas terapias que frenen la progresión de la EP, al reducir tanto la formación de agregados de α-syn como su diseminación entre diferentes tipos celulares.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease, and its prevalence is increasing due to population aging and other factors. PD is a chronic and progressive neurodegenerative disorder primarily characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and the accumulation of α-synuclein (α-syn), which aggregates into protein structures called Lewy bodies (LB). These aggregates play a crucial role in PD pathogenesis, contributing to both neuronal dysfunction and the spread of pathology throughout the nervous system. Although the exact mechanisms underlying α-syn aggregation and transmission remain unclear, its dissemination between different cell types, including neurons, microglia, and astrocytes, is thought to be key to disease progression. In its physiological state, α-syn has an intrinsically disordered structure but can undergo conformational changes that promote its aggregation into toxic oligomers and fibrils. These aggregates do not only form and accumulate in dopaminergic neurons but can also be released into the extracellular space and taken up by neighboring cells, contributing to the cell-to-cell spread of pathology. Various studies suggest that astrocytes and microglia, which are essential for maintaining the neuronal environment, can phagocytose and release aggregated α-syn, further contributing to the spread of neurodegeneration. The renin-angiotensin system (RAS) has emerged as a topic of interest in neuroscience due to its involvement in various neurodegenerative processes. While traditionally known for its role in blood pressure regulation, RAS is also present in the brain, where activation of the angiotensin II type 1 receptor (AT1) by angiotensin II (AngII) has been associated with increased oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and neuroinflammation, all mechanisms involved in PD pathogenesis. Furthermore, the cerebral RAS can directly modulate the activity of glial and neuronal cells, suggesting a link between the activation of the AngII/AT1 axis and α-syn aggregation. Recent studies have highlighted the role of autoimmune processes in neurodegeneration, including PD. It has been suggested that autoantibodies against AT1 receptors (AT1-AA) act as agonists for these receptors and are elevated in the serum and cerebrospinal fluid of PD patients. However, the potential effect of AT1-AA on α-syn aggregation has not yet been studied. Therefore, this thesis investigates the interaction between RAS and the processes of α-syn aggregation and transmission, focusing specifically on the impact of AT1 receptor activation by AngII on α-syn accumulation in *in vitro* and *in vivo* PD models. We assessed the effects of AngII/AT1 axis activation and inhibition on α-syn aggregation and propagation using cell cultures of neurons, microglia, and astrocytes, as well as murine models treated with MPTP, a neurotoxin that mimics the dopaminergic degeneration characteristic of PD. Additionally, we explored the relationship between the effects of the AngII/AT1 pathway on α-syn aggregation and the potential involvement of the RhoA/ROCK pathway on α-syn aggregation using the same *in vitro* and *in vivo* PD models. The results revealed that AT1 receptor activation by AngII significantly increases α-syn aggregation in both neuronal and microglial cells. Moreover, AT1 receptor inhibition reduces α-syn aggregate formation in both cellular and murine models. These findings suggest that the AngII/AT1 axis plays a significant role in PD pathogenesis. Mechanistically, AngII-induced activation of NADPH oxidase and increased intracellular calcium levels promote α-syn aggregation, indicating that oxidative stress and calcium metabolism dysfunction are key pathways through which RAS influences PD progression. An essential aspect of this study is the intercellular transmission of α-syn. Our results show a significantly higher transfer of α-syn between dopaminergic neurons compared to microglia and astrocytes. Additionally, our results indicate that α-syn released by neurons is taken up primarily by astrocytes and microglia, with astrocytes

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

showing the highest uptake. Interestingly, AngII treatment increases α-syn uptake by microglial cells, enhancing their ability to capture neuron-released α-syn. However, AngII treatment does not significantly affect the transfer rate of α-syn from neurons to glial cells, suggesting that aggregate accumulation may increase in neurons following AngII/AT1 axis activation. Thus, our findings suggest that microglia and astrocytes not only participate in the uptake of extracellular α-syn but also facilitate its release and transfer to other cells, thereby increasing the spread of pathology. This highlights the importance of glial cells in the expansion of neurodegeneration in PD, beyond their traditional role as neuronal support cells. Furthermore, we observed that AT1-AA, which are found in patients with hypertension and other cardiovascular diseases, also promote α-syn aggregation in dopaminergic neurons by activating the AngII/AT1 axis. This study demonstrates that AT1-AA not only increase α-syn aggregate formation but also exacerbate oxidative stress and intracellular calcium imbalance, contributing to neurodegeneration. Finally, we investigated the therapeutic potential of RhoA/ROCK pathway inhibition as a strategy to reduce AngII-induced α-syn aggregation. The results indicate that RhoA/ROCK pathway inhibition significantly decreases AngII-induced α-syn aggregate formation in both microglial and neuronal cell models. Moreover, blocking this pathway also reduced α-syn aggregation in MPTP-treated murine models. In microglial cells, RhoA/ROCK pathway inhibition promotes autophagy, facilitating the clearance of α-syn aggregates. Additionally, we examined the effects of RhoA/ROCK pathway inhibition on AngII-induced NADPH oxidase activation and intracellular calcium increase, which are linked to α-syn aggregation. In conclusion, our findings provide clear evidence that RAS, particularly the AngII/AT1 axis and the RhoA/ROCK pathway, play a critical role in α-syn aggregation and transmission, key processes in PD pathogenesis. Moreover, the discovery that AT1-AA promote neurodegeneration through the AngII/AT1 axis opens new research avenues into the relationship between peripheral diseases and PD. Thus, modulation of the AngII/AT1 axis and the RhoA/ROCK pathway could represent a promising strategy for developing therapies that slow PD progression by reducing both α-syn aggregate formation and its dissemination across different cell types.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

Lage, L., Rodriguez-Perez, A. I., Villar-Cheda, B., Labandeira-Garcia, J. L., & Dominguez-Meijide, A. (2024). Angiotensin type 1 receptor activation promotes neuronal and glial α-synuclein aggregation and transmission. *NPJ Parkinson's disease*, *10*(1), 37. https://doi.org/10.1038/s41531-024-00650-0. ISSN 2373-8057. **Posición 26/310 en la categoría Neurosciences Decil 1 (D1).** Contribución específica en la publicación: Realización de la parte experimental, adquisición de los datos, análisis parcial de los mismos y participación en la redacción del manuscrito.

Lage, L., Rodríguez-Perez, A. I., Labandeira-Garcia, J. L., & Dominguez-Meijide, A. (2024). Angiotensin type-1 receptor autoantibodies promote α-synuclein aggregation in dopaminergic neurons. *Frontiers in immunology*, *15*, 1457459. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1457459. ISSN 1664-3224. **Posición 37/181 en la categoría Immunology Quartil 1 (Q1).** Contribución específica en la publicación: Realización de la parte experimental, adquisición de los datos, análisis parcial de los mismos y participación en la redacción del manuscrito.

Lage L., Rodriguez-Perez AI, Labandeira-Garcia JL, Dominguez-Meijide A. Fasudil inhibits α-synuclein aggregation through ROCK-inhibition-mediated mechanisms. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. **Under review.** ISSN 1933-7213**. Posición 28/280 en la categoría Clinical Neurology Decil 1 (D1).** Contribución específica en la publicación: Realización de la parte experimental, adquisición de los datos, análisis parcial de los mismos y participación en la redacción del manuscrito.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

2-APB: 2-aminoetil difenilborinato
6-OHDA: 6-hidroxidopamina
α-syn: α-sinucleína, del inglés *α-synuclein*
AA: Autoanticuerpos
ECA: Enzima convertidora de angiotensina I
ECA2: Enzima convertidora de angiotensina II
IECAs: Inhibidores de ECA
AMS: Atrofia multisistémica
AngI: Angiotensina I
Ang(1-7): Angiotensina 1-7
Ang(1-9): Angiotensina 1-9
AngII: Angiotensina II
AngIII: Angiotensina III
AngIV: Angiotensina IV
ARAII: Antagonistas del receptor AT1
AT1-AA: Autoanticuerpos del receptor de angiotensina II tipo 1
AT1: Receptor de angiotensina II tipo 2
AT2: Receptor de angiotensina II tipo 2
AT4: AngIV
ATP: Adenosín trifosfato
BHE: Barrera hematoencefálica
BiFC: Complementación Fluorescente Bimolecular, del inglés *Bimolecular Fluorescence Complementation*
BSA: Albúmina de suero bovino ultrapura, del inglés *Bovine Serum Albumin*
CE: Cuerpo estriado
CMV: Cuerpos multivesiculares
C-terminal: Carboxi terminal
DAG: diacilglicerol
DAT: Transportador de dopamina
DCL: Demencia de Cuerpos de Lewy
DJ-1: Proteína desglicasa-1
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS: Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, del inglés *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
EA: Enfermedad de Alzheimer
EGFP: Proteína Verde Fluorescente Mejorada, del inglés *Enhanced Green Protein Fluorescent*
EP: Enfermedad de Parkinson
FBSa: Suero fetal bovino activado, del inglés *Fetal Bovine Serum activated*
GABA: Ácido γ-aminobutírico
GB: Ganglios basales
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial, del inglés *Green fibrillary acidic protein*
GFP: Proteína Verde Fluorescente, del inglés *Green Protein Fluorescent*
GPi: Globo pálido interno
HRP: Peroxidasa de rábano
HSPG: Proteoglicanos de heparán sulfato, del inglés *heparan sulfate proteoglycan*
IBA-1: molécula adaptadora de unión al calcio ionizada 1
IF: Inmunofluorescencia
IgG: Inmunoglobulina G
IL-1β: Interleucina-1β
IL-6: Interleucina-6
IP3: trifosfato de inositol
KO AT1: Ratones *knock-out* para los receptores AT1
KPBS: solución salina tamponada con fosfato y potasio
LB: Cuerpos de Lewy, del inglés *Lewy Bodies*
LCR: Líquido cefaloraquídeo
LN: Neuritas de Lewy, del inglés *Lewy Neurites*
LPS: Lipopolisacárido
LRRK2: Quinasa de repetición rica en leucina 2, del inglés *leucine rich repeat kinase 2*
MAO-B: Monoaminooxidasa-B
MasR: Receptor Mas, del inglés *Mas receptor*
mitoKATP: canales de potasio sensibles al ATP mitocondrial
MPP^+: 1-metil-4-fenilpiridinio, del inglés *1-methyl-4-phenylpyridinium*
MPTP: 1,2,3,6-metil-fenil-tetrahidropiridina, del inglés *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*
MrgDs: Receptores acoplados a proteínas G asociados a MasR, del inglés *mas-related G-protein coupled receptors, subtype D*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NAC: Componente β no amiloide, del inglés *non-Amyloid Component*
NADPH-oxidasa: oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*
NDS: Suero de burro normal, del inglés *Normal Donkey Serum*
NMDA: N-metil-D-aspartato
NST: Núcleo subtalámico de Luys
N-terminal: Amino terminal
PBS: Solución salina tamponada con fosfato
PFA: Paraformaldehído
PFFs: Fibrillas preformadas de α-syn, del inglés *preformed fibrils*
PINK1: Quinasa 1 inducida por PTEN, del inglés *PTEN-induced kinase 1*
pK: Proteinasa K
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR-γ: Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas, del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
pS129: Fosforilación en la serina 129
SRA: Sistema renina-angiotensina, del inglés *Renin-angiotensin system*
RhoA/ROCK: Vía de señalización RhoA/Rho quinasa
RIPA: Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación, del inglés *radioimmunoprecipitation assay buffer*
ROI: Regiones de interés, del inglés *Regions of Interest*
ROS: Especies reactivas de oxígeno, del inglés *reactive oxygen species*
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
RT-QuIC: Conversión inducida por agitación en tiempo real, del inglés *Real-Time Quaking-Induced Conversion*
SDD-tricina: Gel de electroforesis de tricina semidesnaturalizante, del inglés *Semi-Denaturing Detergent-Tricine Gel Electrophoresis*
SDS: Dodecil sulfato de sodio, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*
siRNA: ARN pequeño de interferencia, del inglés, *RNA small interfering*
SN: Sustancia Negra
SNC: Sistema Nervioso Central
SNpc: Sustancia Negra *pars compacta*
SNpr: Sustancia Negra *pars reticulata*
***SNCA*:** Gen codificador de α-syn
Sph1: Sinfilina-1
SphVN: Sinfilina-1 marcada con el fragmento Venus N-terminal
SynT: Sinucleína marcada con una forma truncada de GFP
SynVC: Sinucleína marcada con el fragmento Venus C-terminal
TBS: Solución salina tamponada con Tris
TG2: Transglutaminasa tisular 2
TH: Tirosina hidroxilasa
ThS: Tioflavina S
ThT: Tioflavina T
TLR: Receptores tipo Toll, del inglés *Toll-like Receptor*
TNF-α: Factor de necrosis tumoral α, del inglés *Tumor Necrosis Factor-alpha*
TNT: Nanotubos tunelizadores, del inglés *tunneling nanotubes*
UPS: ubiquitina-proteasoma
V5-Sph1: Sinfilina-1 marcada con V5
VAMP2: sinaptobrevina-2
VC: Fragmento Venus C-terminal
VMAT+: Transportador vesicular de monoaminas, del inglés *vesicular monoamine transporter positive*
VN: Fragmento Venus N-terminal.
VNSyn: Sinucleía marcada con el fragmento Venus N-Terminal
WB: Western Blot
WT: Ratones de tipo salvaje

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1.1. Epidemiología y sintomatología de la Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer (EA), y su prevalencia está en aumento debido al el envejecimiento de la población (Reeve et al., 2014). La incidencia de la enfermedad es de un 1.5 % de la población global mayor de 65 años y de un 3 % de la población mayor de 80 años (Pringsheim et al., 2014). Se ha acuñado el término "inicio temprano de EP" para describir a aquellos afectados que comienzan a experimentar los síntomas antes de los 40 años. Además, la carga global de la EP en términos de mortalidad y discapacidad ha aumentado drásticamente en las últimas dos décadas (Deuschl et al., 2020). A pesar de que la EP afecta a ambos sexos, diversos estudios apuntan a una ligera predilección hacia el sexo masculino (Bengtson, 1990; Mayeux et al., 1995; Van den Eeden et al., 2003), observándose algunas disparidades entre ambos géneros siendo mayor el riesgo de discinesias en mujeres y sufriendo los hombres mayor deterioro cognitivo (Pringsheim et al., 2014).

La EP se caracteriza por la pérdida de ~50-70 % de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) del mesencéfalo ventral y la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas e intraneuríticas llamadas cuerpos de Lewy (LB) y neuritas de Lewy (LN) respectivamente, que están compuestos principalmente de α-sinucleína (α-syn) y ubiquitina (Spillantini et al., 1997). El 80 % de la dopamina en el cerebro se encuentra en la vía nigroestriatal, en donde las neuronas dopaminérgicas contienen sus somas en la sustancia negra (SN) y envían sus proyecciones al cuerpo estriado (CE) liberando dopamina. Se han descrito cinco receptores de dopamina en dos familias: el grupo D1 (que incluye a los receptores tipo D1 y D5) y el grupo D2 (que incluye a los receptores tipo D2, D3 y D4). Estos se distribuyen de forma variable en áreas del cerebro como el CE, la corteza y el sistema límbico. La degeneración de las neuronas dopaminérgicas y el agotamiento de la dopamina es la característica neuroquímica más importante en la EP. Además de la dopamina, existen otros neurotransmisores afectados en esta enfermedad como pueden ser la acetilcolina, la serotonina o la noradrenalina, sin embargo, el papel de estos neurotransmisores en la EP todavía es incierto (Graybiel et al., 1990). Los cambios patológicos en la EP están muy extendidos, las áreas involucradas además de encontrarse en la SNpc y el CE, incluyen al tálamo, al hipotálamo, a la corteza límbica, a la neocorteza, al *locus coeruleus*, al núcleo del rafe, al núcleo basal de Meynert y al sistema nervioso autónomo (Gibb, 1997; Harrower et al., 2005; Jellinger, 2010; Spillantini et al., 1998).

El resultado de dicha neurodegeneración es la denervación dopaminérgica de las proyecciones de la SNpc hacia el CE, provocando una pérdida profunda de dopamina lo que condiciona una alteración en la fisiología normal del circuito motor de los ganglios basales (GB) y con ello una pérdida en el movimiento tanto voluntario como involuntario. Las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proyecciones dopaminérgicas nigroestriatales se conectan a este circuito a través de una vía directa e indirecta. La vía directa se inicia en las neuronas de proyección estriatales e involucra a los receptores D1 que envían sus proyecciones al globo pálido interno (GPi) y a la sustancia negra *pars reticulata* (SNpr) reduciendo su actividad inhibidora, mediada por el ácido γ-aminobutírico (GABA) y activando el tálamo. La vía indirecta se inicia en las neuronas de proyección estriatales e involucra a los receptores D2 cuyos axones actúan a través del globo pálido externo y el núcleo subtalámico de Luys (NST), aumentando la actividad inhibidora del GPi y SNpr e inhibiendo de esta forma el tálamo (Gerfen et al., 1990; Mitchell et al., 1989). Debido a que la SNpc regula la actividad de las proyecciones GABAérgicas del estriado, la degeneración neuronal en esta región genera un desequilibrio en ambas vías. Este desequilibrio afecta la inervación GABAérgica que alcanza al tálamo, intensificando así la hipocinesia característica de la EP al inhibir la vía directa. Por otro lado, la hiperactivación de la vía indirecta reduce la proyección GABAérgica hacia el tálamo y el córtex, provocando hipertonía y rigidez muscular (Calabresi et al., 2014).

Como se ha mencionado, otra de las características distintivas neuropatológicas de la EP es la presencia de LB y LN en el citoplasma y en las neuritas de las células neuronales, formados principalmente por agregados de α-syn, ubiquitina y proteasas. Se han descrito formas autosómicas recesivas de EP que no presentan patología con LB, pero los LB están presentes en la forma esporádica más común de EP, así como en otras formas autosómicas dominantes. Son cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos que consisten en un núcleo amorfo rodeado por un 'halo' menos denso. Se cree que su función biológica implica la eliminación de proteínas anormales o dañadas a través del sistema ubiquitina-proteasa (Gibb, 1997; Harrower et al., 2005; Jellinger, 2010; Spillantini et al., 1998). Aún se desconoce si los LB son dañinos o protectores en la EP (Harrower et al., 2005), sin embargo, se ha observado que la presencia de LB perjudica la producción de dopamina al causar estrés oxidativo, disfunción axonal, inhibición de proteínas, disfunción mitocondrial, disfunción sináptica y alteración del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) en el cerebro (Gómez-Benito et al., 2020). Estos agregados se detectan en etapas presintomáticas de la EP y existe un modelo en etapas en el que los agregados de α-syn se detectan inicialmente en el núcleo motor dorsal del vago, en el núcleo anterior de bulbo olfatorio y el plexo entérico, y a continuación se van propagando hasta alcanzar la SN (Braak et al., 2003a). Esta teoría está apoyada por la hipótesis de la propagación priónica de α-syn, que sostiene que los agregados pueden ser liberados al espacio extracelular y ser captados por las neuronas vecinas (Angot et al., 2012; Hijaz & Volpicelli-Daley, 2020; Jucker & Walker, 2013).

La sintomatología clínica de la EP es principalmente motora, siendo los principales síntomas el temblor en reposo, la rigidez muscular, la bradicinesia y la inestabilidad postural; sin embargo, estas manifestaciones motoras pueden ir acompañadas de síntomas no motores como déficits olfativos, fatiga, deterioro cognitivo leve, alteraciones del sueño y trastornos neuropsiquiátricos (Blesa et al., 2017; Braak et al., 2004; Chaudhuri et al., 2006; Forno, 1996; Martirosyan et al., 2024). Los síntomas motores se manifiestan cuando ya hay una degeneración de más del 60 % de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (SN) (Wirdefeldt et al., 2011). Sin embargo, los síntomas no motores pueden aparecer 12-14 años antes, por lo que un diagnóstico temprano, podría ser clave para realizar un tratamiento temprano de la enfermedad (Postuma et al., 2012).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.1.2. Etiología de la Enfermedad de Parkinson

A día de hoy, no se conoce la etiología exacta de la EP en la mayoría de los casos identificados. Aunque la mayor parte de los casos de EP son considerados esporádicos, muchos estudios epidemiológicos y genéticos han revelado que existe un factor de riesgo genético y ambiental en el desarrollo de esta enfermedad.

Los factores genéticos desempeñan un papel importante en la aparición de la EP (Golbe, 1990). Aproximadamente entre el 5 y el 10 % de los pacientes con EP presentan una forma familiar de parkinsonismo con un patrón de herencia autosómica dominante, siendo una de sus principales características la aparición temprana de los síntomas, generalmente antes de los 45 años. Además, entre el 10 y 20 % de los casos diagnosticados con EP padecen una forma monogenética de la enfermedad. Por otra parte, la EP idiopática o esporádica constituye más del 85 % de los casos de EP, siendo su etiología desconocida, posiblemente causada por una asociación de factores de riesgo genéticos y ambientales (Kalinderi et al., 2016; Tambasco et al., 2016). La EP esporádica avanza de forma más gradual y se caracteriza por la aparición gradual y tardía de los síntomas, comenzando entre los 50-70 años (Simon et al., 2020).

En la mayoría de los casos de pacientes con EP está implicada una interacción compleja de muchos genes, sin embargo, se han identificado mutaciones asociadas con un patrón monogenético, lo que significa que una sola mutación en un gen específico puede causar la EP familiar. Algunos de los genes relacionados con mutaciones monogenéticas incluyen la mutación en los genes *SNCA* (gen codificador de α-syn), *LRRK2* (quinasa de repetición rica en leucina 2), *PINK1* (proteína quinasa 1 inducida por PTEN), *Parkin* (PARK2) y *DJ-1* (Proteína desglicasa-1, PARK7) (Deng et al., 2018). Estas causas monogenéticas de la EP se consideraban muy raras hasta la identificación de mutaciones en el gen *LRRK2* (Gilks et al., 2005), que en poblaciones seleccionadas causan el 40 % de los casos de EP (Lesage & Brice, 2012). Además, se ha observado que las formas mutadas de α-syn en el gen *SNCA* como A30P y A53T dan lugar a variantes hereditarias de EP (Sulzer & Edwards, 2019). Las formas monogenéticas de EP pueden diferir de la EP esporádica tanto patológica como clínicamente. La excepción es la mutación *LRRK2*, que se parece en gran medida a la EP esporádica de inicio asimétrico y tardío y temblor frecuente. Por otro lado, Las formas recesivas de la EP suelen ser casos de aparición temprana con buena respuesta a la levodopa y desarrollo temprano de discinesias (Lill, 2016; Thenganatt & Jankovic, 2014).

Los factores ambientales como pueden ser los herbicidas, los pesticidas, metales pesados, infecciones virales u otro tipo de sustancias químicas suponen también un riesgo potencial para el desarrollo de la EP. De hecho, varios estudios señalan una asociación entre el trabajo agrícola y el desarrollo de la EP. Además, también se ha observado que otros factores ambientales como el sedentarismo, el consumo de ciertas aguas contaminadas y la contaminación del aire pueden estar asociadas a un mayor riesgo de padecer Parkinson (Noyce et al., 2012).

1.1.3. Mecanismos patológicos de la Enfermedad de Parkinson

A pesar de que todavía se desconoce la causa de la EP, diversos estudios han implicado el papel del estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad, la neuroinflamación, y los fallos en la proteostasis de la α-syn como mecanismos potencialmente importantes en la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

patología de la enfermedad (Figura **1**). Los efectos de estos problemas pueden resultar en la pérdida de células por apoptosis.

1.1.3.1. Estrés oxidativo

La dopamina puede, en su metabolismo oxidativo generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), un proceso que se ve acelerado por la presencia de hierro ferroso (Halliwell & Gutteridge, 1985; Olanow, 1990, 1993). El estrés oxidativo y la consiguiente degeneración celular pueden surgir en la SNpc por diversas razones, como un aumento en la producción de peróxido debido al recambio de dopamina excesivo, una disminución en la capacidad del cerebro para eliminar H_2O_2 o un aumento de hierro reactivo, que puede promover la formación de radicales libres de hidroxilo. Estudios *post mortem* en cerebros de pacientes con EP han mostrado un aumento en el hierro, una disminución en glutatión y daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN, indicando un estado de estrés oxidativo en la SNpc (Jenner & Olanow, 1996).

Aunque el estrés oxidativo se relaciona comúnmente con la muerte neuronal, no está claro si la acumulación gradual y leve de ROS en la SNpc envejecida conduce necesariamente a la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas en individuos sanos (Buchman et al., 2012; Fearnley & Lees, 1991; Mukherjee et al., 2002). Si bien en el propio envejecimiento ya hay un incremento del estrés oxidativo, se considera que en la EP hay presencia de factores adicionales que agravan progresivamente el desequilibrio entre la producción y la eliminación de ROS.

1.1.3.2. Disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial es un aspecto clave en la fisiopatología de la EP. Las mitocondrias están involucradas en la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP), la regulación del metabolismo celular y la apoptosis (muerte celular programada). En la EP, se ha observado que las mitocondrias presentan anomalías estructurales y funcionales, lo que contribuye al estrés oxidativo y al deterioro neuronal.

La función de las mitocondrias es crucial en la generación de energía dentro de las células. Un hallazgo relevante en la EP es la disminución del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Se ha observado una reducción específica del 30 al 40 % en la actividad del complejo I en la SNpc de pacientes con EP (Schapira et al., 1990). La evidencia de la implicación de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la EP proviene principalmente de dos fuentes. Algunas neurotoxinas, como el 1,2,3,6-metil-fenil-tetrahidropiridina (MPTP), la rotenona o el paraquat, que actúan como inhibidores del complejo I, pueden desencadenar parkinsonismo al provocar la muerte de las células dopaminérgicas en la SN y la aparición de síntomas similares a los de la EP. Por tanto, un fallo en el complejo I mitocondrial podría contribuir al deterioro celular en la EP al afectar a la síntesis de ATP y causar un déficit bioenergético. En estudios con sinaptosomas cerebrales de ratones, la inhibición del complejo I por sustancias como el MPTP o el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+) ha demostrado provocar un agotamiento del ATP celular (Scotcher et al., 1990). A pesar de ello, la investigación en modelos animales sugiere que una reducción del 40 % o menos en la actividad del complejo I no compromete los niveles de ATP en las células (Davey & Clark, 1996).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además, la mayoría de los genes asociados con la EP familiar también están relacionados con algún aspecto de la función mitocondrial. Entre estos genes se encuentran *Parkin*, *PINK1* y *DJ-1*. Los genes *PINK1* y *Parkin* son esenciales para el mantenimiento del recambio mitocondrial a través de la mitofagia, un proceso que elimina mitocondrias dañadas y disfuncionales (Abramov et al., 2011; Clark et al., 2006; Exner et al., 2007; Gegg et al., 2009; Geisler et al., 2010). DJ-1 participa en las respuestas al estrés oxidativo y su nivel aumenta en situaciones de elevados niveles de radicales libres en la célula (Lev et al., 2008; Yanagida et al., 2009).

Además, la disfunción mitocondrial no sólo resulta en una deficiencia en el suministro de energía, sino que también desempeña un papel crucial en la generación de estrés oxidativo. Durante la transferencia de electrones a lo largo de la cadena de transporte, los electrones individuales pueden escapar en el proceso, provocando la reducción del oxígeno molecular y la formación de aniones superóxido (O_2^-). En casos de disfunción mitocondrial, se observa un aumento en la producción de ROS, aumentando por tanto el estrés oxidativo y llevando a consecuencias perjudiciales como el daño oxidativo del ADN, la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas (Orhan et al., 2004).

1.1.3.3. Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es un proceso neurodegenerativo en donde las neuronas son expuestas a niveles elevados de neurotransmisores excitatorios, principalmente glutamato. La sobreestimulación de los receptores neuronales puede llevar a una cascada de eventos dañinos que culminan en la muerte neuronal. La excitotoxicidad se establece como un factor desencadenante de la degeneración neuronal, siendo señalada como un posible contribuyente en el desarrollo de la EP (Ambrosi et al., 2014).

Existen varias teorías que afirman que existen dos potenciales vías de excitotoxicidad en la EP. En primer lugar, se plantea la existencia de una excitotoxicidad intensa inducida por un incremento en la liberación de glutamato. Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc son particularmente sensibles, ya que poseen una alta densidad de receptores de glutamato y reciben una amplia cantidad de glutamato desde diversas regiones cerebrales, como la corteza y el NST. Estudios previos han mostrado que estas neuronas responden en forma de ráfagas cuando se les administra glutamato externamente (Johnson et al., 1992; Rothstein et al., 1994). Además, se ha observado que una lesión en las neuronas dopaminérgicas desinhibe el NST, aumentando la actividad de sus neuronas excitadoras (DeLong, 1990). Se ha sugerido que estas lesiones podrían potenciar el daño excitotóxico a medida que las proyecciones del NST alcanzan la SNpc (Rodriguez et al., 1998). La segunda vía plantea la posibilidad de un mecanismo excitotóxico de naturaleza más sutil (Beal, 1992). Esta teoría postula que una disminución en el metabolismo energético, derivada de una disfunción mitocondrial, conduce a la pérdida del bloqueo de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), lo que permite que haya un aumento en las concentraciones normales de glutamato y un aumento en el flujo de calcio hacia la célula, desencadenando eventos como el aumento del estrés oxidativo, disrupción de la homeostasis del calcio, activación de enzimas que producen radicales libres y muerte celular. Independientemente de la vía, el óxido nítrico es un factor importante que media en la excitotoxicidad (Dawson et al., 1991). Además, se han realizado diversos estudios que sugieren que los antagonistas de NMDA protegen contra la degeneración de las células dopaminérgicas

USC DE COMPOSTELA

inducida por la infusión de MPP^+ en la SNpc de ratas (Turski et al., 1991) y el tratamiento con MPTP en primates (Greenamyre et al., 1994), poniendo de manifiesto la importancia de la excitotoxicidad como mecanismo patológico de la EP.

1.1.3.4. Neuroinflamación

Se ha demostrado la existencia de una relación entre la neuroinflamación, la degeneración neuronal y la EP. Sin embargo, a día de hoy no se sabe si esta neuroinflamación observada en la SNpc y en el estriado es causa o consecuencia de la muerte neuronal y, por lo tanto, aún se desconoce si la neuroinflamación es simplemente una consecuencia secundaria de la EP o si desempeña un papel más activo en su desarrollo. La investigación sobre la neuroinflamación en la EP se enfoca principalmente en el sistema inmunitario innato, especialmente en el papel de la microglía, que constituye la población más abundante de macrófagos en el sistema nervioso central (SNC) (Lucin & Wyss-Coray, 2009; Prinz et al., 2019). La microglía controla el entorno local y regula la respuesta del sistema inmunológico. En situaciones de estrés leve, la microglía libera citoquinas antiinflamatorias y factores de crecimiento. Cuando el estrés es más intenso, la microglía libera citoquinas proinflamatorias para atraer células inmunes del sistema circulatorio y factores tóxicos para eliminar patógenos (Conti et al., 2020; Nimmerjahn et al., 2005). Por tanto, los eventos que sucedan en el entorno de la microglía determinan si la respuesta inmunitaria tiene resultados beneficiosos o dañinos. Un ejemplo es lo que ocurre con la α-syn. En condiciones normales, la microglía fagocita y degrada los agregados de α-syn, pero ante un mal plegamiento de esta proteína que provoque un estrés en el entorno celular, la microglía se activa y libera citoquinas proinflamatorias que inducen la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa y la generación de ROS (Alvarez-Erviti et al., 2011; Rocha et al., 2023; Zhang, 2005, 2017).

Los astrocitos juegan un papel crucial en la regulación de la respuesta microglial y en el soporte de las neuronas cerebrales (Chiareli et al., 2021; Glass et al., 2010). Diversos estudios han observado que en experimentos *in vitro* una mutación de *DJ-1* en los astrocitos puede desregular su respuesta ante la neuroinflamación, lo que podría conllevar a la neurodegeneración (Ashley et al., 2016; Waak et al., 2009). En la SN, la proporción de astrocitos es notablemente baja en comparación con otras regiones cerebrales (Jyothi et al., 2015; Mena & Garcia De Yébenes, 2008). Esta discrepancia en la densidad celular, con un alto número de microglía promotora de la neuroinflamación y un bajo número de astrocitos reguladores, podría explicar el riesgo elevado de neuroinflamación en esta región. Además, se ha observado que la presencia del pigmento neuromelanina en las neuronas de la SNpc activa la microglía, lo que potencia aún más la vulnerabilidad de esta área cerebral a la neuroinflamación (Krainc et al., 2023; Zecca et al., 2008).

1.1.3.5. Fallos en la proteostasis de la α-sinucleína

La alteración de los procesos de descomposición molecular y de orgánulos es una característica única de la EP, y hay evidencia creciente que sugiere una interacción funcional entre el UPS y la autofagia (Chu et al., 2009; Jang & Chung, 2022; Korolchuk et al., 2010). Ambos sistemas participan en la eliminación de proteínas mal plegadas. En la EP, la disfunción de estos sistemas de eliminación contribuye a la acumulación de α-syn y de mitocondrias defectuosas. Mutaciones del gen *SNCA* pueden interferir con la degradación de α-syn a través del bloqueo de la autofagia mediada por chaperonas o del UPS, lo que crea un ciclo de

retroalimentación positiva que amplifica las disfunciones de los sistemas degradativos de proteínas mal plegadas. Además, las mutaciones en el gen *UCHL-1*, cuyo producto génico posee actividad ubiquitin-ligasa, también incrementan el riesgo de desarrollar EP, debido a la incapacidad para llevar a cabo correctamente el proceso de ubiquitinación de proteínas que requieren ser degradadas (Chu et al., 2009; Nawaz et al., 2020).

1.1.3.6. Vulnerabilidad dopaminérgica

En la EP, la pérdida de neuronas dopaminérgicas ocurre de manera selectiva, en donde el área tegmental ventral y la SNpc exhiben distintos niveles de vulnerabilidad a la degeneración (Brichta & Greengard, 2014). La mayor susceptibilidad neuronal en la SN se atribuye a varios factores, que incluyen su alta actividad y dependencia de la producción de energía mitocondrial, lo que las hace especialmente sensibles a cualquier alteración en la función mitocondrial (Bolam & Pissadaki, 2012; Ricke et al., 2020). Esta actividad constante y esta demanda metabólica mitocondrial lleva a una mayor generación de radicales libres y ROS como subproductos metabólicos normales, lo que aumenta su exposición al estrés oxidativo. Además, el exceso de acumulación de neuromelanina, al interactuar con el hierro y otros metales prooxidantes, podría promover la aglomeración de α-syn y afectar la actividad neuronal (Double, 2012; Jansen van Rensburg et al., 2021; Vila, 2019).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

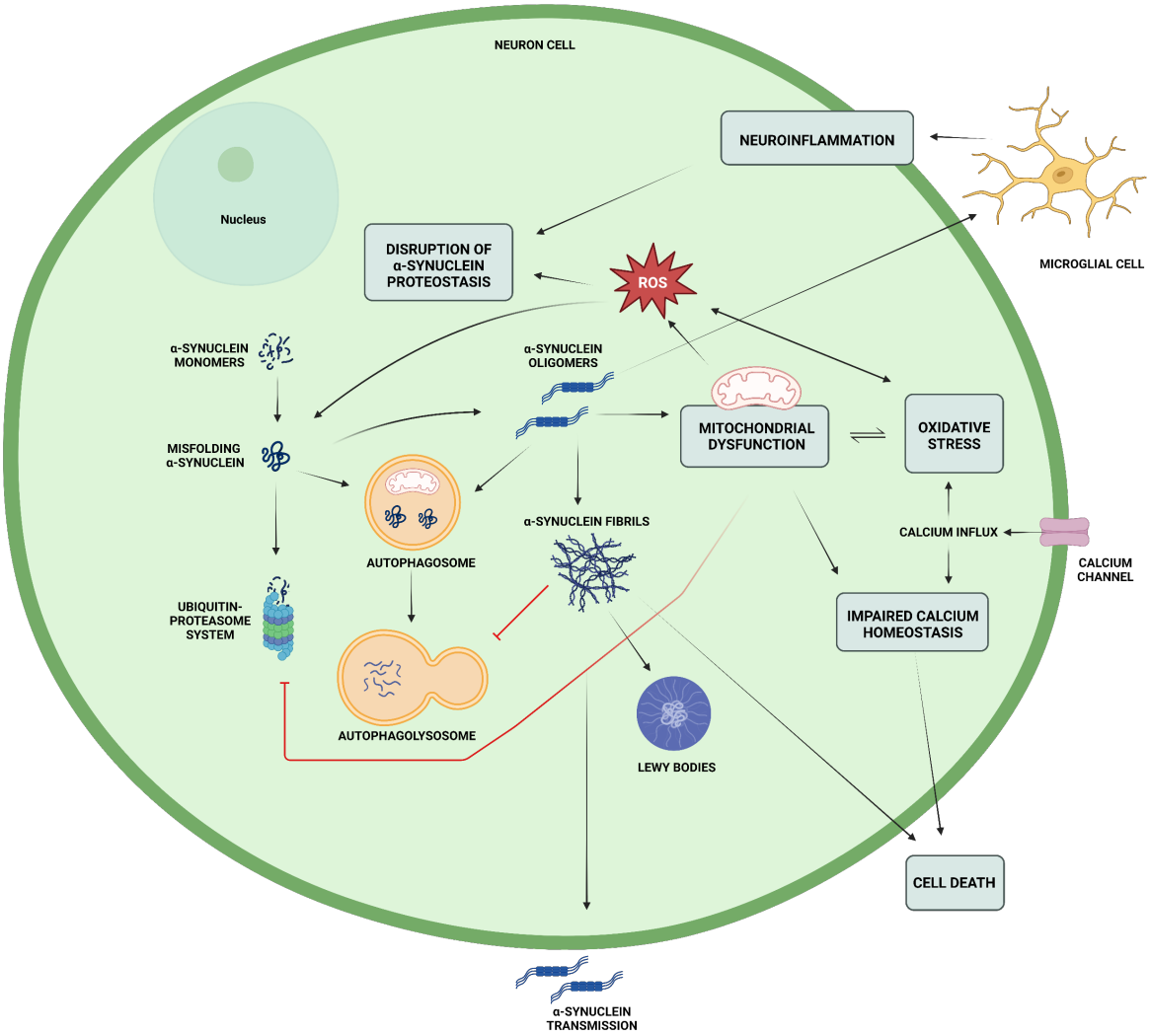


Figura 1. Mecanismos moleculares implicados en la degeneración dopaminérgica en la EP. Varios mecanismos contribuyen a la patogénesis de la EP, destacando la generación excesiva de ROS, la alteración de la dinámica mitocondrial y con ello su funcionalidad, la neuroinflamación, causada por la activación microglial, la excitotoxicidad y la disminución de la actividad del UPS y de la autofagia. Todos estos procesos alteran la proteostasis de la α-syn, que forma agregados dando lugar en última instancia a los LB. Figura de elaboración propia con www.biorender.com adaptada de Poewe et al., 2017.

1.1.4. Modelos de Enfermedad de Parkinson

1.1.4.1. Modelos neurotóxicos

Existen modelos de EP en donde la degeneración de las neuronas dopaminérgicas es provocada por la aplicación local o sistémica de diversas neurotoxinas. La primera neurotoxina descubierta fue la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Schober, 2004), la cual fue utilizada en un inicio para inducir degeneración de los nervios sinápticos (Tieu, 2011) y, posteriormente, fue empleada en el cerebro para simular EP. Otra neurotoxina muy ampliamente utilizada es el MPTP, descubierto a través de casos de parkinsonismo inducido químicamente tras una fallida síntesis del fármaco opioide 1-metil-4-fenil-4-propionpiperidina, MPPP (Schober, 2004). Como

ya se ha mencionado, se ha visto que poblaciones expuestas a pesticidas y herbicidas agrícolas (Costello et al., 2009) presentan un mayor riesgo de padecer EP, dando lugar al uso de estos compuestos para crear nuevos modelos de la enfermedad basados en neurotoxinas, así como a investigaciones sobre los factores de riesgo ambientales asociados a esta enfermedad.

- **MPTP**

El MPTP es un subproducto de la fabricación ilícita de un derivado sintético de la meperidina. Hoy en día el MPTP es una sustancia neurotóxica comúnmente empleada para simular la EP en modelos experimentales. Puede ser administrada de manera aguda, subaguda o crónica a través de diversas vías (Jackson-Lewis & Przedborski, 2007). Debido a su carácter lipofílico, atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) en cuestión de minutos. Dentro del cerebro, las células gliales captan MPTP, donde es metabolizada primero por la enzima monoaminooxidasa-B (MAO-B) para formar 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio, $MPDP^+$, y luego se oxida espontáneamente a su forma tóxica, MPP^+ (Dauer & Przedborski, 2003). Una vez liberado nuevamente en el parénquima cerebral el MPP^+ se dirige selectivamente a las células dopaminérgicas mediante el transportador de dopamina (DAT), donde se acumula en el citoplasma y en las vesículas del transportador vesicular de monoaminas ($VMAT^+$) (Jackson-Lewis et al., 2012). La acción del MPP^+ bloquea el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que disminuye la producción de ATP, incrementa el estrés oxidativo y, en última instancia, induce la muerte celular y la neuroinflamación (Dauer & Przedborski, 2003). Este mecanismo de acción ha sido fundamental en la investigación sobre la neurodegeneración dopaminérgica, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la neuroinflamación asociados con la EP.

El MPTP ha sido utilizado para inducir parkinsonismo en ratones y en primates no humanos, sin embargo, se ha observado que las ratas muestran resistencia a dosis moderadas de MPTP y muerte a dosis altas (Giovanni et al., 1994). Por tanto, el uso de MPTP en ratones ha sido utilizado ampliamente en investigación como modelo de la EP. La extensión de la lesión neuronal varía según la dosis, la vía de administración y la cepa de ratón utilizada, siendo las lesiones extensas beneficiosas como modelo representativo de EP en etapas avanzadas (Sedelis et al., 2000).

- **6-OHDA**

La 6-OHDA es una sustancia neurotóxica selectiva que originalmente se identificó como causante de lesiones en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales en ratas (Ungerstedt, 1968), aunque posteriormente se ha comprobado su efectividad en otros animales, como en ratones (Da Conceição et al., 2010). Esta toxina se acumula en el citosol e induce la muerte celular a través del estrés oxidativo al inhibir el complejo mitocondrial I y al producir ROS, como O_2^-, $^{\cdot}OH$ y H_2O_2. Esta reacción es catalizada por el hierro (Schober, 2004). Además, se ha observado una disminución en la síntesis de dopamina en el CE lesionado, mientras que el CE no afectado compensa esta reducción aumentando la producción de dopamina (Del-Bel et al., 2014).

Dado que la 6-OHDA no puede atravesar la BHE se administra mediante inyección directa en áreas específicas del cerebro, como la SNpc, el haz medial del cerebro anterior o el

CE (Rodriguez-Pallares et al., 2000). La inyección en la SNpc resulta en la muerte neuronal de las neuronas dopaminérgicas en menos de 24 horas (Jeon et al., 1995), mientras que la inyección en el CE provoca la muerte de estas neuronas en un período de 1 a 3 semanas (Przedbroski et al., 1995). La 6-OHDA, al tener una estructura similar a la dopamina, es captada principalmente por los DAT. Sin embargo, también comparte similitudes estructurales con otros componentes de las neuronas noradrenérgicas, lo que le permite actuar sobre los transportadores de estas células y causar daños en otras regiones del cerebro (Luthman et al., 1989; Sampaio et al., 2019; Soto-Otero et al., 2000). Sin embargo, una desventaja importante del uso de la 6-OHDA como modelo es que no provoca la formación de inclusiones similares a los LB (Dauer & Przedborski, 2003; Singh et al., 2024).

1.1.4.2. Modelos genéticos

Como se menciona anteriormente en el texto, la genética desempeña un papel crucial en el desarrollo de la EP. Además de mutaciones responsables de la enfermedad en casos de Parkinson familiar en los genes anteriormente mencionados, la EP de origen genético puede transmitirse a través de mutaciones autosómicas dominantes o recesivas. Además, también se han observado mutaciones *de novo* en estos genes en pacientes sin antecedentes familiares de la enfermedad (Kun-Rodrigues et al., 2015).

- ***LRRK2***

Se ha observado que las mutaciones en el gen *LRRK2* son responsables de una forma autosómica dominante de EP con antecedentes familiares con una penetrancia incompleta y variable y un fenotipo similar a la EP idiopática (Paisán-Ruíz et al., 2004). Se han establecido líneas de ratones y ratas *LRRK2*, pero estos modelos no han logrado replicar las características distintivas de la EP. Así, ratones *BAC-LRRK2-R1441G* muestran algunos déficits motores y patología axonal en el CE, pero carecen de una neurodegeneración dopaminérgica clara y de formación de inclusiones de α-syn (Li et al., 2009). Por otra parte, ratones *knockout* para *LRRK2* presentan una acumulación anormal de proteínas, incluida la α-syn, aunque no muestran una degeneración nigroestriatal evidente (Paisán-Ruíz et al., 2004; Tong et al., 2010).

- ***PRKN*, *PINK1* Y *DJ-1***

Se han identificado mutaciones autosómicas recesivas en los genes *PRKN* (*Parkin*), *PINK1* y *DJ-1* en casos de EP de origen familiar. *PRKN* es una ligasa integral en el UPS que presenta más de 100 mutaciones conocidas y es el gen más frecuentemente mutado en la EP de inicio temprano (Deng et al., 2018; Lücking et al., 2000). Por su parte, *PINK1* codifica una quinasa mitocondrial, que recluta *Parkin* del citosol a las mitocondrias, aumenta la actividad de ubiquitinación de *Parkin* e induce mitofagia mediada por *Parkin.* Además, este gen es el segundo gen con mayor frecuencia de mutación en la EP de inicio temprano, encontrándose en un 1 a 7 % de los casos (Lazarou et al., 2013). *DJ-1* es una chaperona molecular que desempeña un papel en la inhibición de la formación de agregados de α-syn, siendo las mutaciones en este gen las menos comunes (Nash et al., 2017; Oláh et al., 2021; Shendelman et al., 2004). Las mutaciones en estos tres genes resultan en disfunción y desarrollo de la EP (Gasser, 2009). Además, se han elaborado modelos de ratones *knockout* para estos genes, sin embargo, ninguno de estos modelos muestra una pérdida de células dopaminérgicas ni déficits motores simultáneamente (Dawson et al., 2010; Kin et al., 2019).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- ***SNCA***

El gen *SNCA*, que codifica para α-syn, fue el primero vinculado a formas familiares de la enfermedad y se designó como PARK1. Se han identificado tres mutaciones puntuales autosómicas dominantes en *SNCA* que poseen una penetrancia completa: A53T, A30P y E46K (Dawson et al., 2010; Deng et al., 2018). A pesar de que se han realizado numerosos intentos para replicar la EP familiar creando ratones transgénicos que porten estas mutaciones, existe mucha controversia sobre si estos modelos muestran o no degeneración clara de las neuronas dopaminérgicas y/o déficits motores parkinsonianos (Deng & Yuan, 2014; Kin et al., 2019). Algunos estudios han encontrado que ratones transgénicos que sobreexpresan α-syn muestran pérdida de dopamina en el estriado, neurodegeneración, déficits motores y acumulaciones citoplasmáticas que no llegan a formar una estructura fibrilar idéntica a los LB (Chia et al., 2020). No obstante, la pérdida neuronal observada suele ser leve o localizada en áreas que no están directamente vinculadas con la EP. Por ello, una de las principales limitaciones de estos modelos es su incapacidad para reproducir la expresión espaciotemporal de α-syn característica en pacientes con esta enfermedad (Volpicelli-Daley, 2017). Se ha observado que la α-syn mutada afecta también procesos celulares como la autofagia en modelos *in vitro* de A30P y A53T (Lei et al., 2019; Nascimento et al., 2020), y está asociada con la formación de ovillos fibrilares tau en ratones transgénicos con E46K y A53T (Emmer et al., 2011; Teravskis et al., 2018). Se cree que las formas truncadas de α-syn son más tóxicas que la forma completa, y los ratones transgénicos que expresan esta forma truncada muestran una reducción en el número de neuronas nigroestriatales debido a la pérdida celular durante el desarrollo temprano (Hall et al., 2015; Wakamatsu et al., 2008). Aunque estos modelos son valiosos para entender mejor la función de la α-syn y su relación con otras enfermedades relacionadas, su relevancia clínica para la EP es incierta, ya que afectan las etapas iniciales del desarrollo en lugar de modelar la neurodegeneración típica de la enfermedad en etapas posteriores.

La duplicación o triplicación de *SNCA*, designada PARK4, también está vinculada con la EP. Este fenómeno indica que niveles elevados de expresión de α-syn endógena pueden desencadenar la formación de LB y la EP, y también se relacionan con el riesgo de desarrollar la forma idiopática de la EP (Chang et al., 2017). A raíz de esto se han desarrollado modelos transgénicos de sobreexpresión de α-syn en ratas y ratones, que permiten comprender la EP en sus etapas iniciales y estudiar las cascadas patológicas desencadenadas por la α-syn. La propagación de los agregados de α-syn en estos modelos depende del sitio de integración, el promotor utilizado para impulsar la transcripción *SNCA* y el fondo genético (Deng & Yuan, 2014).

Aparte de las cepas transgénicas, la sobreexpresión de α-syn puede provocarse también mediante vectores virales. Este enfoque presenta ventajas que incluyen la focalización en el sistema nigroestriatal, la inducción de patología en la edad adulta y la capacidad de ajustar la dosis (Van der Perren et al., 2014). Se han empleado vectores recombinantes derivados de virus adenoasociados y lentivirus para transferir *SNCA* en roedores (Jan et al., 2019) y formas salvajes o mutadas (A53T) de α-syn en ratas (Rodriguez-Perez et al., 2018). Además, actualmente se están desarrollando modelos de vectores virales adenoasociados que permiten una transducción y sobreexpresión de α-syn en primates no humanos (Bey et al., 2020).

1.1.5. Tratamientos de la Enfermedad de Parkinson

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las terapias disponibles actualmente para tratar la EP sólo se basan en el tratamiento de los síntomas de esta enfermedad. Es por ello que uno de los objetivos fundamentales de la investigación sobre la EP es desarrollar medicamentos que modifiquen el curso de la enfermedad para ralentizar o detener el proceso neurodegenerativo.

1.1.5.1. Tratamientos farmacológicos

- **Levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina)**

La levodopa es un compuesto fundamental en el tratamiento de la EP ya que actúa como precursor de la dopamina y es capaz de atravesar la BHE y de restaurar los niveles de dopamina en el estriado. La administración de la levodopa para sustituir a la dopamina en el CE representó un hito significativo en el tratamiento de la EP. Desde entonces, se han identificado numerosos objetivos adicionales para terapias dopaminérgicas. La levodopa se considera el tratamiento estándar por excelencia para la EP (Witt & Fahn, 2016). Sin embargo, cuando se administra por vía oral, se descarboxila rápidamente, lo que hace que solo una pequeña porción de la dosis alcance el SNC sin alteraciones. Por esta razón, el tratamiento con levodopa se complementa con carbidopa o benserazida, compuestos que previenen el metabolismo de la dopamina y que no atraviesan la BHE. Estos compuestos actúan inhibiendo a la enzima catecol-O-metiltransferasa, COMT, responsable del metabolismo oxidativo de la dopamina. Sin embargo, el uso prolongado de levodopa se asocia con complicaciones como fluctuaciones motoras y discinesias. Aunque los mecanismos exactos que causan estas complicaciones no están completamente claros, se ha observado que la estimulación pulsátil y no fisiológica de los receptores de dopamina en el CE, debida a cambios en los mecanismos presinápticos y postsinápticos, puede llevar a respuestas neuronales desadaptativas (Andreoli et al., 2021; Olanow et al., 2020b).

- **Inhibidores de la monoaminooxidasa B (MAO-B)**

La MAO-B es una enzima mitocondrial ampliamente distribuida mayoritariamente en las células del SNC y en las plaquetas y desempeña funciones importantes en la metabolización de la dopamina. Actualmente se utilizan fármacos que inhiben la MAO-B para el tratamiento de trastornos afectivos y la EP. La inhibición de la MAO-B conduce a un aumento de la concentración de dopamina sináptica y de la eficacia sintomática. Existen varios inhibidores de la MAO-B entre ellos encontramos:

Selegilina, safinamida y rasagilina son inhibidores selectivos irreversibles de la MAO-B que previenen el metabolismo *in vivo* de la dopamina. Cuando se usan junto con levodopa, se potencian sus efectos antiparkinsonianos, permitiendo así una reducción en la dosis necesaria de levodopa. Por ello, su principal aplicación es como complementos terapéuticos a la levodopa. A mayores, varias investigaciones sugieren que la seleginina puede proteger las neuronas del estrés oxidativo y estimular la producción de factores de crecimiento neuronal (de Bie et al., 2020; Jankovic & Poewe, 2012). Sin embargo, el uso conjunto de selegilina con levodopa puede aumentar los efectos secundarios de esta última.

- **Agonistas de la dopamina**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los agonistas de la dopamina producen su efecto farmacológico al activar directamente los receptores de dopamina, sin necesidad de la síntesis presináptica de la dopamina. Los primeros medicamentos de esta categoría eran derivados de la ergolina, lo cual planteaba preocupaciones sobre la seguridad cardíaca y pulmonar. Sin embargo, los fármacos utilizados en la actualidad son todos diferentes a los derivados de la ergolina. Ejemplos de estos son pramipexol, ropinirol, apomorfina, piribedil y rotigotina. Estos agonistas de la dopamina estimulan los receptores de dopamina en el CE de manera más estable que la levodopa, lo que puede reducir significativamente el riesgo de complicaciones motoras cuando se utilizan como terapia inicial en monoterapia (Connolly & Lang, 2014; Olanow et al., 2020a). Varios estudios han sugerido que estos agentes podrían tener propiedades neuroprotectoras (Schapira, 2002, 2003). Sin embargo, aunque estos agentes muestran eficacia en el control de los síntomas cuando se administran en monoterapia, también están asociados con diversos efectos secundarios como puede ser la somnolencia y las desregulaciones en el control de impulsos, ya que activan los sistemas cerebrales de recompensa (Voon et al., 2011), por lo que una estrategia terapéutica óptima para retrasar el avance de la EP sería el uso de la combinación de estos agonistas de dopamina y de la levodopa a dosis adecuadas.

- **Tratamientos no dopaminérgicos**

Los síntomas tanto motores como no motores de la EP en etapas avanzadas suelen mostrar una respuesta deficiente a la terapia dopaminérgica. Esta falta de respuesta puede deberse a disfunciones en otros neurotransmisores distintos de la dopamina, como la acetilcolina y el glutamato. Entre los síntomas que requieren tratamiento con agentes no dopaminérgicos se incluyen las fluctuaciones motoras, las discinesias inducidas por levodopa, la congelación de la marcha, la inestabilidad postural y las caídas, así como los temblores resistentes al tratamiento y los trastornos de la deglución y del habla.

Entre los fármacos empleados, se considera a los antagonistas del glutamato como posibles fármacos neuroprotectores (Litim et al., 2017). La amantadina es actualmente el principal tratamiento para la discinesia relacionada con la levodopa. Además de su efecto antiglutamatérgico, se cree que la amantadina estimula la liberación de dopamina endógena, bloquea la recaptación de dopamina en la hendidura sináptica y tiene propiedades anticolinérgicas. Se ha demostrado que la formulación de liberación prolongada de amantadina mejora tanto la discinesia como las fluctuaciones motoras (Elmer et al., 2018).

Los tratamientos anticolinérgicos, como el trihexifenidilo y la benzotropina, bloquean los efectos de la acetilcolina en los receptores muscarínicos postsinápticos de las interneuronas estriatales. Principalmente se emplean para mitigar el temblor y no afectan la bradicinesia. Sin embargo, el bloqueo de la acetilcolina puede conllevar diversos efectos adversos, como deterioro cognitivo, confusión, alucinaciones, visión borrosa, sequedad bucal, estreñimiento y dificultad para orinar. Estos efectos secundarios limitan la utilidad de los anticolinérgicos en el tratamiento de la EP (Katzenschlager et al., 2002; Pirker et al., 2023).

1.1.5.2. Tratamientos no farmacológicos

- **Tratamientos quirúrgicos**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Se ha comprobado que las intervenciones quirúrgicas son beneficiosas para tratar los síntomas refractarios de la EP. Sin embargo, suelen reservarse como último recurso debido al riesgo potencial de complicaciones y a su eficacia limitada a largo plazo. Los avances recientes en este ámbito han ampliado las opciones quirúrgicas disponibles, como la palidotomía, talamotomía, estimulación talámica y estimulación cerebral profunda. Tanto la talamotomía como la estimulación talámica son reconocidas como procedimientos seguros y efectivos para abordar el temblor. Por otro lado, la palidotomía se centra en reducir la discinesia. Aunque ofrecen resultados prometedores, son intervenciones altamente invasivas que conllevan un elevado riesgo de mortalidad (Spindola et al., 2017).

Los avances recientes en este campo han dado lugar a la llegada de nuevas tecnologías, como los procedimientos estereotácticos y el desarrollo de la estimulación cerebral profunda. La estimulación cerebral profunda del STN o del GPi es un tratamiento ampliamente reconocido para pacientes que experimentan complicaciones motoras. En general, los procedimientos quirúrgicos mencionados se consideran en casos donde los efectos secundarios de la medicación son intolerables y en pacientes con capacidad cognitiva intacta (Hariz & Blomstedt, 2022).

- **Ultrasonido focalizado de alta intensidad**

El ultrasonido focalizado de alta intensidad o HIFU es una técnica no invasiva guiada por resonancia magnética emergente que se está utilizando para tratar los síntomas motores de la EP. Este tratamiento ha mostrado resultados prometedores en la ablación del NST y GPi Esta técnica está indicada para pacientes mayores de 22 años con EP refractaria al tratamiento farmacológico y que no son elegibles para cirugía. Aunque estos resultados son prometedores, el HIFU tiene limitaciones importantes, como su aplicación unilateral y la imposibilidad de ajustar el tratamiento tras el procedimiento, a diferencia de la estimulación cerebral profunda (Arias-Pacheco et al., 2022; Krishna et al., 2023; Martínez-Fernández et al., 2020).

- **Inmunoterapia**

Los avances en la comprensión de la patogénesis de la EP que involucra la formación de agregados proteicos han llevado al desarrollo de posibles estrategias terapéuticas basadas en inmunoterapia. Así, se han explorado diversas estrategias de vacunación en modelos de α-syn de la EP, las cuales pueden clasificarse en una vacunación activa y en una vacunación pasiva. En la vacunación activa se administran oligómeros de α-syn humana que son presentados al sistema inmunológico desencadenando la formación de anticuerpos y la activación de la microglía para eliminar la α-syn patológica (Jamal, 2020; Mandler et al., 2014). Por otro lado, en la vacunación pasiva se administran directamente anticuerpos monoclonales humanos contra la α-syn para bloquear sus efectos neurotóxicos (Folke et al., 2022). Actualmente, tanto las estrategias de vacunación activa como pasiva están siendo evaluadas en ensayos clínicos que aún se encuentran en fase I o fase II (Jankovic et al., 2018; Volc et al., 2020).

1.2. α-SINUCLEÍNA

La α-syn es una proteína de función aún desconocida, presente en los LB en formas anormalmente plegadas. La acumulación de agregados de α-syn se considera un marcador

patológico característico de las enfermedades denominadas sinucleopatías, que comprenden la EP, la demencia de cuerpos de Lewy (DCL) y la atrofia multisistémica (AMS). Se ha observado que diferentes patrones de agregación dan lugar a las diferentes enfermedades y se cree que la α-syn anormalmente plegada y agregada desempeña un papel central en la patogénesis de estas enfermedades, aunque los mecanismos exactos todavía no están completamente esclarecidos (Alafuzoff & Hartikainen, 2018).

1.2.1. Tipos de sinucleína

Las sinucleínas son una familia de proteínas que desempeñan roles importantes en el SNC y están asociadas con enfermedades neurodegenerativas. Aunque comparten algunas similitudes, cada tipo de sinucleína tiene características únicas y puede desempeñar funciones específicas en la fisiología y patología neuronal.

La familia las sinucleínas está compuesta por tres proteínas sinápticas:

- La **α-syn** es una proteína que está codificada por el gen codificador de α-syn, *SNCA*, y se encuentra de forma abundante en el SNC, especialmente en las terminales sinápticas, donde desempeña múltiples funciones (George, 2002). Esta proteína se caracteriza por su estructura intrínsecamente desordenada. La α-syn ha sido objeto de interés debido a su asociación con enfermedades neurodegenerativas, como la EP y la EA. En estas enfermedades, α-syn forma agregados anómalos conocidos como LB, que se acumulan en las células nerviosas y pueden provocar disfunción neuronal y muerte celular (Cavaliere et al., 2017; Goedert et al., 2012; Spillantini et al., 1997). La α-syn se aisló por primera vez de las vesículas sinápticas y los núcleos del órgano eléctrico del *Torpedo californica* (Maroteaux et al., 1988). En 1997, la α-syn fue identificada como el principal componente proteico de los LB y las LN (Spillantini et al., 1997). Ese mismo año, se asoció por primera vez una mutación puntual en el gen *SNCA* a formas autosómicas dominantes de la EP, lo que demuestra el papel de la genética en la enfermedad (Polymeropoulos et al., 1997). Estos hallazgos, junto con una gran cantidad de estudios *in vitro* e *in vivo*, sugieren que la α-syn juega un papel central en un grupo de trastornos neurodegenerativos conocidos como sinucleopatías. La α-syn se localiza en el líquido cefaloraquídeo (LCR), en la sangre, en el espacio extracelular neuronal y más predominantemente en el núcleo y cerca de las terminales presinápticas de las neuronas donde se asocia al tráfico de las vesículas sinápticas (Abeliovich et al., 2000; Folke et al., 2021; Loria et al., 2017; Maroteaux & Scheller, 1991; Outeiro & Lindquist, 2003; Savitt et al., 2006; Vasquez et al., 2017).

- La **β-sinucleína**, codificada por el gen codificador de β-sinucleína, *SNCB*, es la que está más estrechamente relacionada con la α-syn en cuanto a su función, estructura y localización dentro del SNC, en donde se encuentra en las terminales presinápticas. A pesar de que sigue siendo desconocido el papel de las funciones de los otros miembros de la familia de las sinucleínas, algunos estudios apuntan a que mayor expresión de β-sinucleína podría estar implicada en la reducción de los niveles de α-syn sin afectar a su ARNm (Fan et al., 2006) y podría a su vez regular

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

los niveles y el metabolismo de la α-syn, ya que se ha visto que la β-sinucleína inhibe la agregación de la α-syn (Brown et al., 2016; Hashimoto et al., 2001; Park & Lansbury, 2003; Williams et al., 2018). Entre otras funciones, se cree que la β-sinucleína podría estar implicada en los procesos de transporte vesicular y en la regulación de neurotransmisores (Carnazza et al., 2020; Jenco et al., 1998), y que, además de tener propiedades neuroprotectoras al regular la α-syn, puede, en determinadas situaciones, asumir un papel potencialmente neurotóxico (Taschenberger et al., 2013).

- La **γ-sinucleína**, codificada por el gen codificador de γ-sinucleína, *SNCG*, al igual que las otras sinucleínas, se encuentra en el SNC, aunque se localiza principalmente en el sistema nervioso periférico (Ji et al., 1997; Wakabayashi et al., 2010). A día de hoy, se desconoce el papel que desempeña esta sinucleína en las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, a pesar de que la función celular normal de la γ-sinucleína también es desconocida, se sabe que la expresión exógena de la proteína aumenta el potencial invasivo y metastásico de los tumores de mama (Jia et al., 1999; Siddartha Yerramilli & Scarlata, 2016).

1.2.2. Posibles funciones de α-sinucleína

No está clara la función exacta de la α-syn en su estado normal, aunque, diversos estudios revelaron que esta proteína juega un papel clave en la plasticidad sináptica (Bellani et al., 2010; George et al., 1995; Sorrentino et al., 2019), en el metabolismo de lípidos y remodelación de membranas (Makasewicz et al., 2021; Nakamura et al., 2011; Ouberai et al., 2013), y en la regulación de la neurotransmisión de dopamina, en donde la α-syn actúa interrumpiendo sutilmente la liberación de neurotransmisores en circunstancias de disparos repetidos (Abeliovich et al., 2000; Anwar et al., 2011; Somayaji et al., 2020). Además, se ha sugerido que la α-syn puede estar involucrada en el tráfico de cargas dentro del retículo endoplásmico/red de Golgi, ya que una de las consecuencias iniciales más profundas de la sobreexpresión de α-syn en levaduras parece ser una interrupción de este tráfico (Cooper et al., 2006; Rajasekaran et al., 2022).

Así, una función importante de la α-syn parece ser la regulación del tráfico de vesículas sinápticas, aunque su papel en esta regulación todavía se encuentra en debate. Se cree que la α-syn puede comportarse como una chaperona actuando de forma sinérgica con la proteína α de la cadena de cisteína en el ensamblaje el complejo SNARE implicando la unión a la sinaptobrevina-2 (VAMP2) y la liberación de las vesículas sinápticas protegiendo así las terminales nerviosas contra lesiones (Burré et al., 2010; Chandra et al., 2005). Por otro lado, otros estudios han documentado su función fisiológica en la inhibición de la liberación y reciclaje de vesículas sinápticas y en la interrupción de la fusión de membrana lipídica mediada por el complejo SNARE tanto actuando directamente sobre VAMP2 como de manera indirecta (Dewitt & Rhoades, 2013; Sun et al., 2019).

Por tanto, la función principal de la α-syn parecería ser el control de la liberación de neurotransmisores mediante la modulación del tráfico de vesículas sinápticas, a través de efectos sobre el complejo SNARE. La evidencia reciente, sugiere que esta función fisiológica puede proporcionar información sobre la función aberrante desencadenada en estados patológicos.

1.2.3. Estructura de α-sinucleína

La α-syn se clasifica como una proteína intrínsecamente desordenada ya que carece de una estructura secundaria característica. Está descrita como una proteína soluble de 140 aminoácidos con siete repeticiones imperfectas de la secuencia KTKEGV entre los residuos 7-87. Estas repeticiones actúan como dominios de unión a lípidos (Brontesi et al., 2023; Davidson et al., 1998; Zarbiv et al., 2014). Además, en general, se considera que la α-syn está dividida tres dominios distintos (Figura **2**):

- Un dominio **amino terminal (N-terminal),** que abarca los aminoácidos del 1 al 60. Esta área forma estructuras en hélice alfa con propiedades anfipáticas, incluyendo cuatro repeticiones de un patrón de unión a lípidos de membrana. La composición lipídica de las membranas es fundamental para la unión de la α-syn. Esta proteína prefiere específicamente la unión a zonas de las membranas caracterizadas por altas concentraciones de colesterol y esfingolípidos, conocidas también como balsas lipídicas. Esta región N-terminal contiene los residuos de aminoácidos afectados por las principales mutaciones del gen α-syn (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T, A53E) asociadas con la EP familiar autosómica dominante (Bartels et al., 2010; Jao et al., 2004; Vasili et al., 2019).

- Un dominio central conocido como **dominio NAC (componente no amiloide)**, en donde se encuentran los aminoácidos del 61 al 95. Este dominio contiene tres repeticiones adicionales del motivo de unión a lípidos y está enriquecido con residuos hidrofóbicos. De hecho, este fragmento contiene a los doce residuos hidrófobos esenciales para la formación de láminas β cilíndricas y fibrillas β-amiloides. Este dominio es altamente amiloidogénico y responsable de la formación y agregación de protofibrillas y fibrillas. Además, este dominio posee un sitio de fosforilación, el residuo S87, que lleva a la inhibición de la oligomerización de α-syn e influye en las interacciones sinucleína-membrana (Paleologou et al., 2010; Rodriguez et al., 2015; Vasili et al., 2019). Este dominio, característico de la α-syn, no está presente en la β-sinucleína y presenta una composición diferente en la γ-sinucleína.

- Un dominio **carboxi terminal (C-terminal)**, que comprende los aminoácidos del 96 al 140. Esta región es rica en residuos ácidos, carece de una estructura definida e incorpora la mayoría de los sitios de modificación postraduccional, incluida la fosforilación más común en la serina 129 (pS129), además de poseer tres residuos de tirosina (Y125, Y133 e Y136). Este dominio limita el plegamiento patológico y la agregación debido a sus factores estructurales. El dominio C-terminal cargado negativamente funciona como autochaperona para prevenir la fibrilación de α-syn mediante la interacción con la región. La pérdida de residuos ácidos C-terminales mediante el truncamiento promueve la formación de fibrillas. Por tanto, este dominio destaca por modular la agregación de la α-syn (Sorrentino & Giasson, 2020b; Souza et al., 2000; Vasili et al., 2019).

La α-syn puede existir en la neurona en un estado protofibrilar, monomérico u oligomérico (Dettmer et al., 2015). La α-syn monomérica es muy dinámica y puede poblar un gran número de estados conformacionales o de ensamblajes diferentes (Frimpong et al., 2010). En las

sinucleopatías, la formación de las distintas especies de α-syn están determinadas por la naturaleza de los procesos de autoensamblaje, que está influenciada por muchos factores, incluida la mutación o multiplicación del gen de la α-syn, la regulación epigenética y la modificación postraduccional o ciertos factores ambientales (Guhathakurta et al., 2017; Rokad et al., 2017). Las distintas formas de α-syn se agregan en neuronas, fibras nerviosas o células gliales a diferentes velocidades y pueden conducir a especies polimorfas fibrilares mixtas con diferentes interacciones intermoleculares, características de superficie y consecuencias patológicas (Alam et al., 2019; Cremades et al., 2017). Sin embargo, la conexión precisa entre la estructura de α-syn y su toxicidad sigue siendo un tema controvertido de debate.

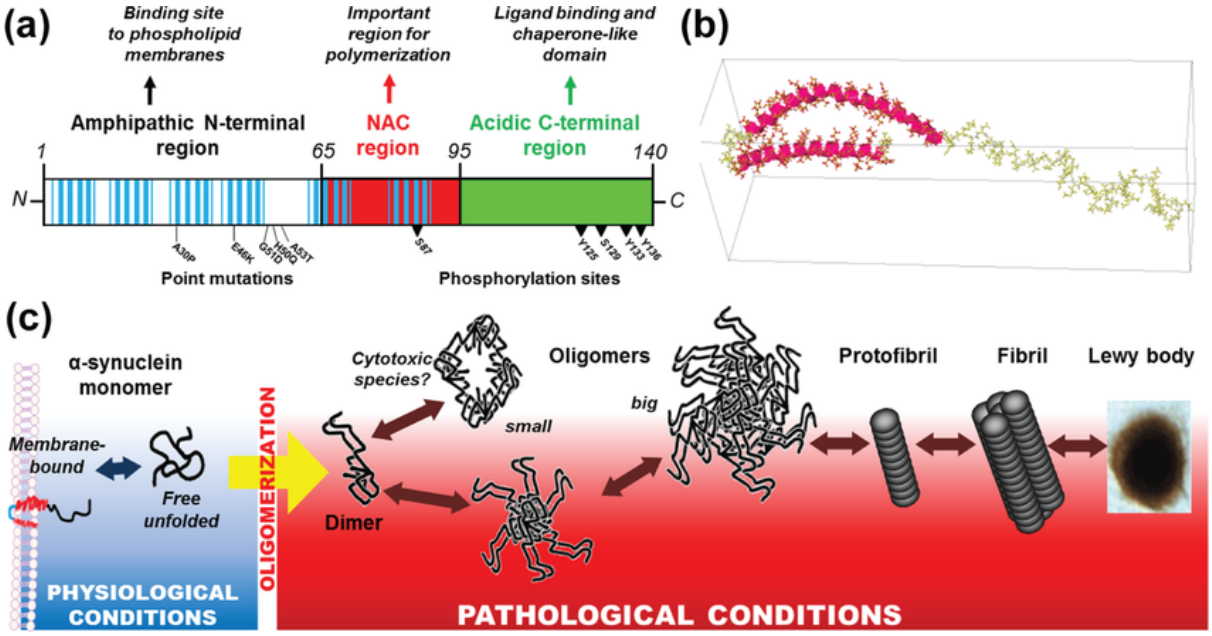


Figura 2. Ilustración esquemática de la estructura de la proteína α-syn y su proceso de agregación. a. Ilustración esquemática de la estructura primaria de α-syn endógena. La cadena de 140 aminoácidos se divide en tres regiones principales; el anfipático N-terminal, la región NAC y el extremo C terminal. **b.** Representación tridimensional de la estructura secundaria de α-syn. El extremo N-terminal forma dos regiones en hélice alfa mientras que el resto de la proteína se despliega de forma nativa. La α-syn monomérica se cree que adopta diferentes estructuras secundarias. **c.** La α-syn es fisiológicamente un monómero soluble no estructurado, pero también se encuentra unida a membranas con una estructura secundaria compuesta por dos hélices alfa. Bajo condiciones patológicas, la región hidrofóbica de la α-syn puede adquirir una conformación en lámina beta, dimerizarse y posteriormente polimerizarse en oligómeros y especies fibrilares. La especie citotóxica exacta de la α-syn es discutible; sin embargo, ahora se cree que las especies grandes insolubles son menos tóxicas que las especies oligoméricas prefibrilares. Permiso concedido por Sage Publications and Copyright Clearance Center RightsLink, en nombre de *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*; Jones et al., 2014.

1.2.4. Agregación de α-sinucleína

Las α-sinucleopatías incluyen varias entidades patológicas distintas, entre ellas destacan la EP, la DCL y la AMS. La evidencia sugiere que estas distintas enfermedades son causadas por diferencias conformacionales de los agregados α-syn denominadas "cepas" en los cerebros enfermos. Se ha demostrado que la inyección intracerebral de agregados de α-syn específicos de alguna de estas enfermedades recrea la patología específica de dicha enfermedad (Alafuzoff

& Hartikainen, 2018; Luk, et al., 2012; Mason et al., 2016; Rey et al., 2016; Uemura et al., 2019). De hecho, de forma más general, se ha visto que la α-syn mal plegada que se encuentra formando fibrillas, al inocularla en ratas Wistar, actuaría como semilla para la α-syn endógena provocando un ensamblaje aberrante de ésta formando más fibrillas. Es más, en base a esto se ha estudiado como la administración de fibrillas preformadas de α-syn (PFFs) exógenas, desencadena la formación de agregados de α-syn endógenos al actuar éstas también como semillas (Volpicelli-Daley et al., 2014a, 2016).

En la patogénesis de la EP, la α-syn endógena se pliega mal y se oligomeriza, lo que desencadena una cascada de polimerización que finalmente conduce a la formación de LB y LN. Además de la α-syn, los LB y LN contienen alrededor de 250 proteínas más, incluidas la ubiquitina, la p62 y una multitud de chaperonas moleculares, algunas de las cuales podrían ser marcadores de neurodegeneración (Kuusisto et al., 2003; Osellame et al., 2013; Spillantini et al., 1997). Estas observaciones sugieren que la α-syn puede tener un papel fundamental en la neurotoxicidad en la EP, por tanto, un conocimiento completo de la agregación de la α-syn sería crucial para el desarrollo de tratamientos contra esta enfermedad.

Los procesos biológicos que conducen a la agregación de la α-syn, que generalmente es soluble, pueden estar asociados tanto al entorno celular (como la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo o inflamatorio) como a factores relacionados con el metabolismo de la α-syn, como las modificaciones postraduccionales (Anwar et al., 2011; Rocha et al., 2018). Existen evidencias de que la agregación de α-syn es un paso temprano en la patogénesis de la EP. Por ejemplo, la duplicación o triplicación del número de copias del gen de la α-syn es un importante factor de riesgo genético para el desarrollo de la EP. Además, mutaciones puntuales en la región N-terminal de la α-syn como A30P, E46K, H50Q, G51D y A53T, son responsables de formas familiares autosómicas dominantes de EP (Appel-Cresswell et al., 2013; De Araújo Lima et al., 2018; Kiely et al., 2013; Polymeropoulos et al., 1997). Se han descrito varias modificaciones postraduccionales de la α-syn en LB, como la fosforilación en pS129 (Fujiwara et al., 2002; Tenreiro et al., 2014), la nitración en residuos de tirosina (Burai et al., 2015; Giasson et al., 2000), y truncamiento del extremo carboxi terminal (Li et al., 2005; Sorrentino et al., 2020a). Estas modificaciones postraduccionales actúan modulando la estructura, las funciones fisiológicas y la toxicidad de α-syn. La fosforilación de la α-syn en pS129 se encuentra en más del 90 % de α-syn de los LB de pacientes con EP y se considera un marcador importante de sinucleinopatía (Anderson et al., 2006; Fayyad et al., 2020; Oueslati, 2016). Aunque la función específica de pS129 aún no está clara, parece promover la formación de filamentos de α-syn así como de oligómeros (Chaturvedi et al., 2023; Chen et al., 2009). La fosforilación de pS129 confiere toxicidad a la α-syn, sin un aumento en el número de depósitos fibrilares, lo que sugiere que las especies no fibrilares de α-syn pueden ser también neurotóxicas (Chen & Feany, 2005). Por otra parte, en el caso del truncamiento del extremo C-terminal, al desempeñar el extremo C-terminal un papel protector contra la agregación debido a la presencia de residuos de prolina de la proteína, cambios en la carga o la hidrofobicidad por sustitución de estos residuos, así como la eliminación del extremo C-terminal, conducen a una agregación acelerada de α-syn *in vitro* (Afitska et al., 2017; Meuvis et al., 2010).

Además, la α-syn presenta cuatro residuos de tirosina, el Y39, cercano al extremo amino y los Y125, Y133 e Y136, cercanos al extremo carboxilo. En un inicio se creía que la α-syn fisiológica se encontraba en una forma monomérica que adoptaba una conformación alrededor

USC DE COMPOSTELA

del centro hidrofóbico que al unirse a membranas con fosfolípidos tomaba una estructura α-helicoidal (Uéda et al., 1993). Sin embargo, diversos estudios revelaron que la α-syn fisiológica se encuentra en forma oligomérica y no monomérica como se pensaba. Estos oligómeros están formados por varias cadenas de α-syn con una conformación α-helicoidal que se unen entre sí mediante uniones ditirosínicas (Bartels et al., 2011). Por tanto, los cambios conformacionales de la α-syn dependen de las tirosinas. La Y39 es esencial para la formación de fibrillas (Ulrih et al., 2008), aunque parece que la agregación en forma de LB depende más de los residuos cerca del extremo carboxilo (Y125, Y133, Y136).

Tanto la forma oligomérica como la fibrilar de α-syn son formas tóxicas para las células, sin embargo, todavía sigue en debate si son las fibrillas o los oligómeros los que producen toxicidad. En los últimos años varios estudios apuntan a que, a pesar de que las fibrillas producen toxicidad celular, las especies oligoméricas son las formas más citotóxicas de α-syn desempeñando un papel clave en la enfermedad (Alam et al., 2019; Chen et al., 2015; Fusco et al., 2017). Aunque se piensa que los oligómeros pueden contribuir al deterioro de la estabilidad neuronal, se observa que las estructuras fibrilares tienen una capacidad de propagación más eficaz tanto en estudios *in vivo* como en estudios *in vitro*.

1.2.5. Toxicidad de α-sinucleína

Aunque la α-syn normalmente se localiza en la terminal presináptica, sus oligómeros y agregados se localizan en todo el cuerpo celular y en las neuritas, lo que sugiere que la α-syn podría alterar la función celular más allá de la terminal presináptica. Los efectos nocivos de α-syn se intensifican a medida que las fibrillas de α-syn comienzan a formar los LB. Se ha observado un cambio en el tiempo en la forma y ubicación de α-syn, en donde a medida que va pasando el tiempo las fibrillas de α-syn se van haciendo más compactas localizándose preferentemente en el cuerpo celular. En el cuerpo celular neuronal, los agregados de α-syn reclutan más monómeros de α-syn, experimentan modificaciones postraduccionales e interactúan con otros componentes celulares para formar LB completamente desarrollados. La formación y maduración de los LB pueden desencadenar disfunción mitocondrial, mitofagia, despolarización mitocondrial y disfunción sináptica, lo que finalmente conduce a una neurodegeneración progresiva (Mahul-Mellier et al., 2020). De hecho, múltiples orgánulos están implicados en la toxicidad de la α-syn, incluidas las vesículas sinápticas, las mitocondrias, el retículo endoplasmático y aparato de Golgi, los lisosomas y los autofagosomas y el núcleo. Además, los contactos entre orgánulos y el transporte axonal de estos también se ven alterados por la toxicidad de la α-syn. Por tanto, los agregados de α-syn, incluidos los oligómeros y las fibrillas, pueden causar daño a las células mediante una variedad de mecanismos al interactuar con otras moléculas y orgánulos celulares (Figura **3**):

- **Tráfico de vesículas sinápticas:** La α-syn normalmente se encuentra en la terminal presináptica, donde se asocia con vesículas sinápticas (Kahle et al., 2000; Liu et al., 2021), se une a las membranas (Davidson et al., 1998; Liu et al., 2021) y produce una curvatura en ellas (Varkey et al., 2010). La α-syn regula la formación de SNARE (Chandra et al., 2005) al unirse a la proteína VAMP2, facilitando así la fusión de vesículas sinápticas en la terminal presináptica (Burré et al., 2010). Sin embargo, los oligómeros grandes de α-syn se unen preferentemente a VAMP2, lo que interrumpe la formación del complejo SNARE, la liberación de dopamina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(Choi et al., 2013) y la movilidad de las vesículas sinápticas (Wang et al., 2014). Así, el aumento de los niveles de α-syn puede interferir con la liberación de neurotransmisores al reducir el tamaño (Nemani et al., 2010) y la movilidad del reciclaje de vesículas sinápticas (Scott & Roy, 2012). Se cree que hay múltiples mecanismos a través de los cuales α-syn puede alterar el recambio de dopamina. Se ha observado que la sobreexpresión de α-syn puede inactivar la enzima tirosina hidroxilasa (TH) e interrumpir la liberación de dopamina al inhibir la exocitosis de las vesículas presinápticas (Lou et al., 2010; Nemani et al., 2010), afectando de esta forma a la neurotransmisión de dopamina. Además, en condiciones normales, la α-syn regula el almacenamiento de dopamina en las vesículas sinápticas al interactuar con VMAT2, un transportador esencial para prevenir los efectos oxidativos de los metabolitos de dopamina en el citosol. Cuando la α-syn está alterada, puede afectar a este proceso, lo que podría ser uno de los primeros eventos en la degeneración de neuronas dopaminérgicas (González-Hernández et al., 2004). Ratones que no expresan α-syn muestran una mayor liberación de dopamina desde las terminales nigroestriatales (Abeliovich et al., 2000) que no afecta a los niveles de α-syn citosólica (Masliah et al., 2000; Mosharov et al., 2009), mientras que ratones transgénicos que sobreexpresan α-syn humana muestran una pérdida terminal dopaminérgica (Masliah et al., 2000), una liberación deficiente de dopamina y una distribución alterada de las vesículas sinápticas (Janezic et al., 2013). Además, el aumento de la expresión de α-syn se ha relacionado con una reducción en la recaptación de dopamina y una función defectuosa del DAT (Lundblad et al., 2012).

- **Autofagia o vía lisosomal:** La autofagia es un proceso dinámico que participa en la degradación de orgánulos dañados y acumulaciones de proteínas (Wong & Holzbaur, 2015). La sobreexpresión de α-syn interfiere con el tráfico de proteínas transmembrana autofágicas, desde el retículo endoplásmico al Golgi, lo que disminuye la formación de omegasomas, los cuales son precursores de los autofagosomas (Winslow et al., 2010). En la autofagia mediada por chaperonas, las variantes A53T y A30P de α-syn se unen más estrechamente al receptor lisosomal LAMP2A que la forma nativa de α-syn, impidiendo su propia degradación y la carga de otros sustratos en los lisosomas (Martinez-Vicente et al., 2008). Además, la α-syn modificada con dopamina también podría ser tóxica ya que los aductos de dopamina estabilizan las protofibrillas de α-syn (Conway et al., 2001) al inhibir la agregación de ésta y promover la formación de oligómeros (Mazzulli et al., 2007), esto puede llevar también a la inhibición de la autofagia mediada por chaperonas, lo que podría contribuir a la vulnerabilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la EP (Martinez-Vicente et al., 2008). En modelos neuronales tratados con PFFs, los autofagosomas se forman de forma normal, pero presentan defectos en la fusión con los lisosomas y acumulación de carga autofágica (Tanik et al., 2013), posiblemente debido a un transporte axonal anómalo de los autofagosomas (Volpicelli-Daley et al., 2014b). Por último, la actividad lisosomal de varias enzimas, incluida la glucocerebrosidasa, se reduce en células madre pluripotentes inducidas de la EP con triplicación de α-syn en comparación con células control, lo que resulta en una degradación deficiente y trastorno en el tráfico del retículo endoplásmico al Golgi (Mazzulli et al., 2011).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- **Desregulación dinámica y funcional de los orgánulos celulares:** Se sugiere que los posibles blancos de la α-syn incluyen vesículas sinápticas, el transporte Golgi-retículo endoplásmico, las mitocondrias, los lisosomas y otros componentes de la maquinaria proteolítica, dando lugar a una disfunción de estos orgánulos celulares, en especial a una disfunción mitocondrial (Cooper et al., 2006; Cuervo et al., 2004; Devi et al., 2008; Gao et al., 2017; Nakamura, 2013; Soll et al., 2020; Xilouri et al., 2012). Diversos estudios demuestran que la α-syn posee una secuencia de direccionamiento mitocondrial en su extremo N-terminal y puede alterar los mecanismos de importación de proteínas mitocondriales en la EP (Devi et al., 2008; Di Maio et al., 2016; Maldonado Vidaurri et al., 2018). Se ha observado que la α-syn oligomérica o fosforilada en Ser-129 puede unirse al receptor TOM20 y prevenir su interacción con su correceptor TOM22, inhibiendo la importación de proteínas mitocondriales *in vitro*. La interacción entre la α-syn y TOM20 se asoció con deterioro mitocondrial y producción excesiva de ROS (Di Maio et al., 2016). Sin embargo, todavía está en debate si el bloqueo de la importación de proteínas mitocondriales es suficiente para impulsar la degeneración nigroestriatal. Además, también se ha observado que la α-syn puede estar implicada en otras vías de homeostasis mitocondrial ya que se ha visto que esta puede estar implicada en los procesos de bloqueo de fusión y fisión mitocondrial (Kamp et al., 2010), en la modulación de la morfología mitocondrial, en la dinámica de transporte mitocondrial (Xie & Chung, 2012) y en la eliminación de mitocondrias disfuncionales al dañar el complejo I mitocondrial (Chinta et al., 2010). Estos hallazgos respaldan la noción bien establecida de que la acumulación de α-syn en las mitocondrias se correlaciona con una alteración en la respiración dependiente del complejo I, una reducción en el potencial de membrana mitocondrial y un aumento en los niveles de ROS (Mullin & Schapira, 2013; Rocha et al., 2018).
  El retículo endoplásmico es vital para múltiples funciones celulares, incluyendo el plegamiento de proteínas, el transporte hacia el Golgi, la regulación del calcio y la respuesta a proteínas mal plegadas. Tanto la α-syn nativa como la mutante interfieren con el tráfico desde el retículo al Golgi en levaduras causando estrés en el retículo, afectando la vía secretora temprana (Outeiro & Lindquist, 2003). Este efecto puede ser contrarrestado por ciertas proteínas Rab como RAB1, RAB3A y RAB8A (Gitler et al., 2008). Además, la sobreexpresión de α-syn afecta a la función del retículo endoplasmático a la hora de modular el tráfico del DAT (Oaks et al., 2013). También se ha observado que los niveles elevados de α-syn aumentan los niveles de calcio citoplasmático, lo que activa una cascada tóxica de calmodulina-calcineurina (Luo et al., 2014), sugiriendo que la α-syn podría influir en la homeostasis del calcio en el retículo endoplasmático. Finalmente, se propone que la α-syn se une a la chaperona GRP78 en el retículo, interfiriendo con el plegamiento de proteínas y aumentando el estrés de éste (Bellucci et al., 2011; Colla et al., 2012).
  Aunque la mayoría de los estudios sobre la toxicidad celular de la α-syn se han realizado en condiciones estacionarias, los orgánulos son altamente dinámicos y están sujetos a transporte axonal, eventos de fisión y fusión, y maduración. Estos procesos están intrincadamente regulados por numerosas vías de señalización, incluyendo la fosforilación, la actividad de las GTPasas Rab, la señalización del calcio y la actividad eléctrica. Recientemente, se descubrió que las fibrillas de α-syn afectan al transporte axonal de los autofagosomas y de los endosomas positivos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

para los receptores RAB7 y TrkB, lo que sugiere que la α-syn no causa un defecto generalizado en el transporte axonal (Volpicelli-Daley et al., 2014b). Esto podría ser debido a la reducción de los niveles de proteínas de transporte axonal en pacientes con EP esporádica en comparación con controles de la misma edad (Chu et al., 2012), o a la disminución de la estabilidad de los microtúbulos y la movilidad de la carga dependiente de kinesina (Prots et al., 2013).

- **Función nuclear:** Las mutaciones A30P, A53T y G51D muestran una mayor presencia de α-syn en el núcleo en comparación con la forma nativa de la proteína (Fares et al., 2014; Kontopoulos et al., 2006). Se ha sugerido que la proteína nuclear TRIM28 (Rousseaux et al., 2016) podría regular la dirección de la α-syn hacia el núcleo, inhibiendo la acetilación de histonas (Kontopoulos et al., 2006). También se ha observado una alteración en la activación de varios factores de transcripción en neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas de pacientes con la variante A53T de α-syn y en la SN afectada por la EP (Ambasudhan et al., 2013; Eschbach et al., 2015). Además, se ha registrado una disminución en la activación del factor de transcripción TFEB de la vía lisosomal-autofagia en ratas que sobreexpresan α-syn mediante un virus adenoasociado (Decressac et al., 2013). Por otro lado, se ha observado un aumento en la activación del factor nuclear en neuronas dopaminérgicas de ratones transgénicos con α-syn y en cerebros de pacientes con EP o con DCL (Caraveo et al., 2014; Luo et al., 2014).

- **Alteración de membranas lipídicas:** La toxicidad de los agregados de α-syn, se debe en parte a su capacidad para alterar las características de las membranas lipídicas, lo que incluye la permeabilización de la membrana, la formación de estructuras similares a poros, la difusión y empaquetamiento de lípidos, el tamaño de los poros en la fusión de vesículas sinápticas y la curvatura de la membrana, produciendo una perturbación y disfunción de la membrana. Varios estudios apuntan a que los oligómeros pequeños prefibrilares de α-syn son las especies tóxicas que conducen a la disfunción y degeneración de las neuronas al formar estas estructuras con morfologías similares a poros. Además, se plantea la hipótesis de que estas estructuras similares a poros contribuyen a la citotoxicidad en enfermedades neurodegenerativas al alterar la permeabilidad y composición de las membranas de los orgánulos, lo que alteraría la función normal de los orgánulos (Cecchi & Stefani, 2013; Iyer et al., 2021; Logan et al., 2017; Smith et al., 2009; Volles & Lansbury, 2002; Zhu et al., 2003).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

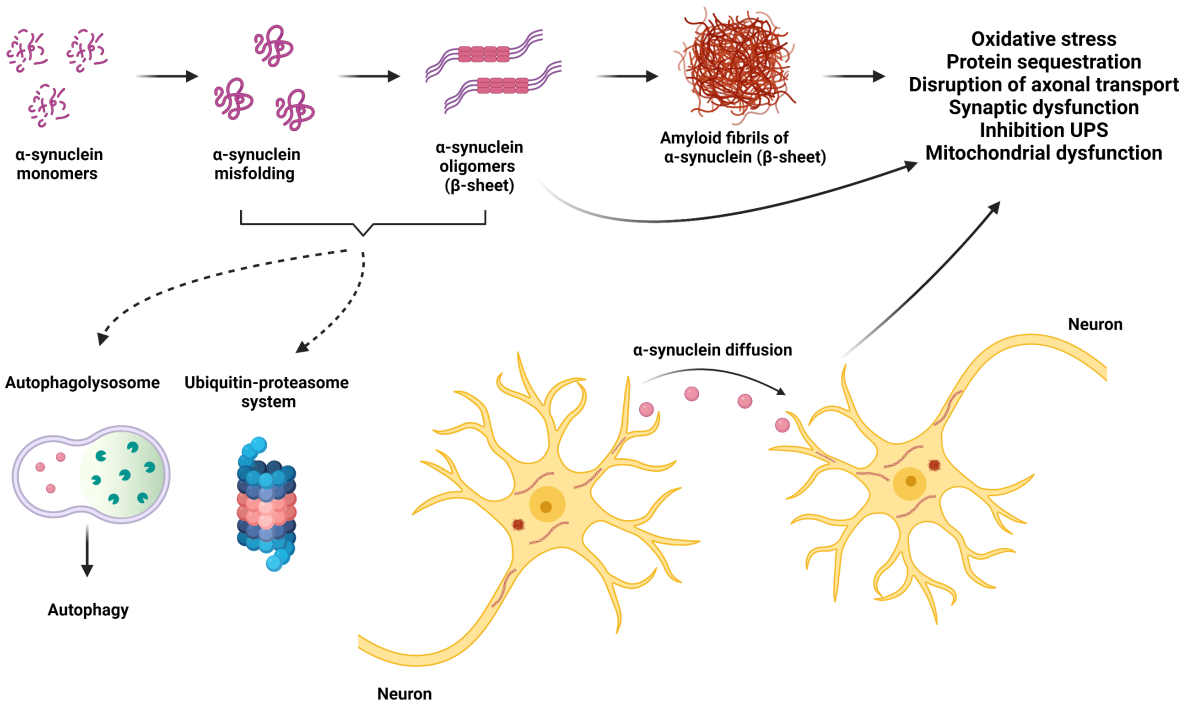


Figura 3. Mecanismos propuestos de la patología de la α-syn en la EP. La α-syn nativa existe como un monómero en un estado soluble de estructura desordenada. Para adquirir características patogénicas, la α-syn se pliega incorrectamente formando dímeros, trímeros y oligómeros. Estas estructuras se agregan aún más en protofibrillas y fibrillas amiloides. Los sistemas de control de calidad celular, como los proteasomas y los autofagolisosomas, en condiciones normales degradan esta α-syn oligomérica, sin embargo, una formación de agregados de α-syn puede hacer que estos complejos no funcionen correctamente y que sean incapaces de degradarla, dando lugar a que la α-syn se acumule. La progresión de la EP y otras sinucleopatías puede depender de la transmisión de α-syn patogénica de célula a célula. UPS, sistema ubiquitina-proteasoma. Figura de elaboración propia con www.biorender.com adaptada de Irwin et al., 2013.

Además de sus posibles efectos neurotóxicos, la α-syn puede manifestar efectos como bloqueo de canales, inhibición o agonismo de receptores, inhibición de vesículas sinápticas y otras acciones (Rokad et al., 2017). Por tanto, la comprensión de los mecanismos subyacentes a la agregación de la α-syn es crucial para el desarrollo de terapias efectivas para tratar las enfermedades neurodegenerativas asociadas a esta proteína. La investigación continua en este campo es fundamental para identificar nuevas estrategias terapéuticas y mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados por estas enfermedades.

1.2.6. Transmisión de α-sinucleína

Las enfermedades priónicas son enfermedades infecciosas que pueden transmitirse horizontalmente entre individuos o incluso entre diferentes especies (Costanzo & Zurzolo, 2013). En estas enfermedades hay un mal plegamiento de la proteína priónica y esta se convierte en una proteína patógena. A continuación, la proteína patógena actúa como semilla y va

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

convirtiendo la proteína endógena en proteína patógena adicional, propagando así la patología en el cerebro (Brandner et al., 1996; Pearce, 2017).

Se ha comprobado que la α-syn, tras formar estructuras mal plegadas, puede de transmitir esta conformación mal plegada a formas monoméricas normales de la proteína (Bartels et al., 2010; Coelho-Cerqueira et al., 2013; Rey et al., 2018; Sawamura et al., 2022; Shrivastava et al., 2020; Wu & Baum, 2010). Es por ello, que se considera que la α-syn se propaga de manera análoga a las proteínas priónicas. Sin embargo, hay una serie de diferencias entre la forma de propagación de α-syn con respecto a los priones. Estas diferencias se deben a las diferentes características estructurales entre la α-syn y las proteínas priónicas. Cada proteína tiene un núcleo característico que sufre cambios conformacionales y puede conducir a la agregación. En la α-syn, este núcleo es la región NAC (Xu et al., 2018). Se ha propuesto un modelo en el que la propagación de los agregados de α-syn ocurre de forma escalada, iniciándose periféricamente y accediendo por la vía nasal o gástrica al SNC, en donde se extiende por diversas regiones cerebrales de una manera prototípica (Braak et al., 2003a). Inicialmente, comienza en el tejido periférico (núcleo anterior del bulbo olfatorio, núcleo motor dorsal del vago, plexo entérico), lo que se considera la primera etapa, en donde los pacientes son asintomáticos o muestran síntomas motores tempranos. Durante la segunda etapa, la patología se extiende a los núcleos del rafe inferior, las porciones magnocelulares de la formación reticular y al *locus coeruleus*, comenzando así a manifestarse los síntomas motores. En la tercera etapa, los agregados llegan al mesencéfalo, afectando principalmente a la SNpc, en donde van a formarse los LB. En las últimas etapas la patología se propaga a la corteza afectando primero a la mesocorteza y en última instancia al neocortex (Braak et al., 2003a; Braak et al., 2003b). En estas últimas etapas los pacientes ya presentan problemas significativos de marcha y demencia. La patología con LB puede estar más extendida de lo que se pensaba anteriormente. También se puede encontrar en la médula espinal, el sistema nervioso autónomo y periférico, la piel, la retina, la glándula submandibular, el sistema nervioso cardíaco y otros órganos (Colom-Cadena et al., 2017; Djaldetti et al., 2009; Gelpi et al., 2014).

Algunos autores asocian el grado de propagación de α-syn con una gravedad cada vez mayor de los síntomas clínicos (Brettschneider et al., 2015). Este concepto ha sido una plataforma para explorar los mecanismos moleculares de la progresión de la enfermedad y ha proporcionado nuevos objetivos terapéuticos a estas enfermedades.

Se han realizado estudios adicionales en donde se ha visto la propagación de α-syn de un tejido enfermo a un tejido sano. En un ensayo clínico realizado en pacientes de EP se trasplantó al putamen de estos pacientes células mesencefálicas embrionarias sanas observando, años después, la presencia de LB y LN en las células trasplantadas (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008). Tras estos hallazgos, estudios sucesivos revelaron que la α-syn puede propagarse desde el huésped al tejido injertado (Angot et al., 2012; Desplats et al., 2009; Patrigeon et al., 2023; Reyes et al., 2014). En un estudio en el que trabajaban con lisados cerebrales de pacientes con AMS, vieron que cuando insertaban estos lisados a ratones TgM83 se producía una transmisión similar a la observada con las proteínas priónicas en el cerebro de un chimpancé en un modelo de Kuru (Gajdusek et al., 1966; Watts et al., 2013). Se ha sugerido que este proceso ocurría mediante la transmisión célula a célula y podría llegar a partes del SNC alejadas de la inyección (Luk, et al., 2012). Además, meses después de la inoculación de α-syn patológica a partir de tejido cerebral cortical de pacientes de AMS, se encontraron agregados de α-syn en el lado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

contralateral a la administración, lo que sugirió una propagación de la α-syn a estas zonas (Bernis et al., 2015). En todos estos experimentos el material humano provoca transmisión de α-syn en diferentes especies, siendo esta una de las características principales de las proteínas priónicas, lo que apoyaría la teoría del comportamiento priónico de la α-syn. Además, se ha observado que las fibrillas de α-syn pueden cruzar la BHE y llegar al SNC después de la inyección intravenosa (Pediaditakis et al., 2021; Peelaerts et al., 2015).

Estos estudios, junto con el modelo de Braak, sugieren que la progresión de la EP podría estar relacionada con la transmisión de α-syn entre neuronas, mostrando una propagación similar a un prion. Una neurona dañada liberaría α-syn patógena que sería recaptada por otra neurona y así sucesivamente hasta extender la enfermedad por toda la región cerebral.

1.2.7. Posibles mecanismos de transmisión célula a célula de α-sinucleína

En los últimos años se ha propuesto que la propagación de la EP ocurre a través de una transmisión célula a célula de α-syn mediante diferentes mecanismos (Figura **4**) (Choi et al., 2020; George et al., 2019; Tu et al., 2021):

- **Poros de membrana**, en donde los oligómeros de α-syn pueden formar estructuras similares a poros que penetran la membrana plasmática, siendo el mutante A53T más propenso a hacerlo. Estas estructuras pueden actuar como canales no selectivos, lo que lleva a la liberación de α-syn (Ma et al., 2017; Nellikka et al., 2021; Parres-Gold et al., 2020; Stöckl et al., 2013).

- **Difusión pasiva**, en donde la α-syn penetra directamente en la membrana plasmática para ser liberada y es captada nuevamente desde el espacio extracelular por captación pasiva (Grozdanov & Danzer, 2018).

- Transporte a través de **proteínas transportadoras**, en donde la α-syn interactúa con una posible proteína transportadora, que media la transferencia en la membrana plasmática y posteriormente la liberación de la α-syn (Reyes et al., 2019; Yang et al., 2017).

- **Exocitosis y endocitosis** (Lee et al., 2005; Lee et al., 2008a; Shearer et al., 2021), dentro de la endocitosis la α-syn puede ser internalizada, bien mediante fagocitosis, o bien mediante pinocitosis en un proceso dependiente de dinamina que parece ser más relevante para la α-syn monomérica que para la agregada (Braidy et al., 2013; Cavaliere et al., 2017).

- **Internalización mediada por receptores** (Mao et al., 2016), en donde la liberación α-syn también puede tener lugar a partir de células moribundas y la captación de α-syn podría estar mediada por receptores. Los receptores que participan en la internalización de sinucleína son el FcγRIIB y el LAG3. Ambos relacionados con procesos inmunes y presentes en la microglía (Chaudhary et al., 2014; Choi et al., 2018; Domingues et al., 2022; Volles & Lansbury, 2002).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- **Proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG)**, que pueden facilitar la internalización de α-syn, ya que esta se une a los HSPG en la superficie celular y luego es internalizada junto con los propios HSPG (Holmes et al., 2013; Vanderperre et al., 2023).

- **Exosomas**, que son vesículas de <100 nm de diámetro que se originan a partir de cuerpos multivesiculares (CMV) de la vía endocítica de neuronas, astrocitos y microglía y se cree que participan en la eliminación de desechos derivados de células (Emmanouilidou et al., 2010). Además, los exosomas facilitan la comunicación intercelular transportando proteínas o ARN y pueden liberarse mediante gemación formando una pequeña vesícula o formarse dentro del CMV, que luego se fusiona con la membrana celular liberando sus vesículas al espacio extracelular (Denzer et al., 2000; Isaac et al., 2021; Meldolesi, 2018). Los exosomas portadores de α-syn pueden causar fácilmente la muerte neuronal *in vitro*. Por tanto, la captación de exosomas que contienen α-syn por parte de los astrocitos puede tener efectos perjudiciales sobre la patogénesis de la enfermedad en las α-sinucleopatías al permitir la propagación transcelular de α-syn patógena y alterar la homeostasis de los astrocitos (Budnik et al., 2016; Melachroinou et al., 2024; Meng et al., 2020; Ngolab et al., 2017).

- **Nanotubos tunelizadores (TNT)**, puentes membranosos delgados (de 50 a 200 nm de diámetro) entre las células que conectan el citoplasma de células remotas (a una distancia de hasta 100 µm) y están compuestos por actina F. La α-syn puede propagarse de una célula a otra de forma similar a un prion a través de estos nanotubos mediante mecanismos como el tráfico intercelular de lisosomas (Abounit et al., 2016; Chakraborty & Zurzolo, 2022; Senol et al., 2021). Esto sucede no sólo entre las células neuronales, sino también en pericitos y astrocitos (Dieriks et al., 2017; Rostami et al., 2017) y de un tipo de célula a otro (Sun et al., 2012). Tanto estudios *in vivo* como estudios *in vitro* han demostrado la transferencia de α-syn entre neuronas y astrocitos a través de TNT. La α-syn lisosomal puede atravesar las neuronas o los astrocitos estresados con función lisosomal defectuosa y pueden intercambiar α-syn no digerida con un astrocito sano a cambio de mitocondrias funcionales sanas. Esto podría dar lugar a un escenario de doble filo, por un lado, provocaría una infección de astrocitos sanos con conformaciones de α-syn potencialmente tóxicos que conducen a una transmisión similar a la de priones y, por otro, conduciría a una recuperación funcional de astrocitos dañados por α-syn con mitocondrias nuevas (Abounit et al., 2016; Chakraborty & Zurzolo, 2022; Dieriks et al., 2017).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

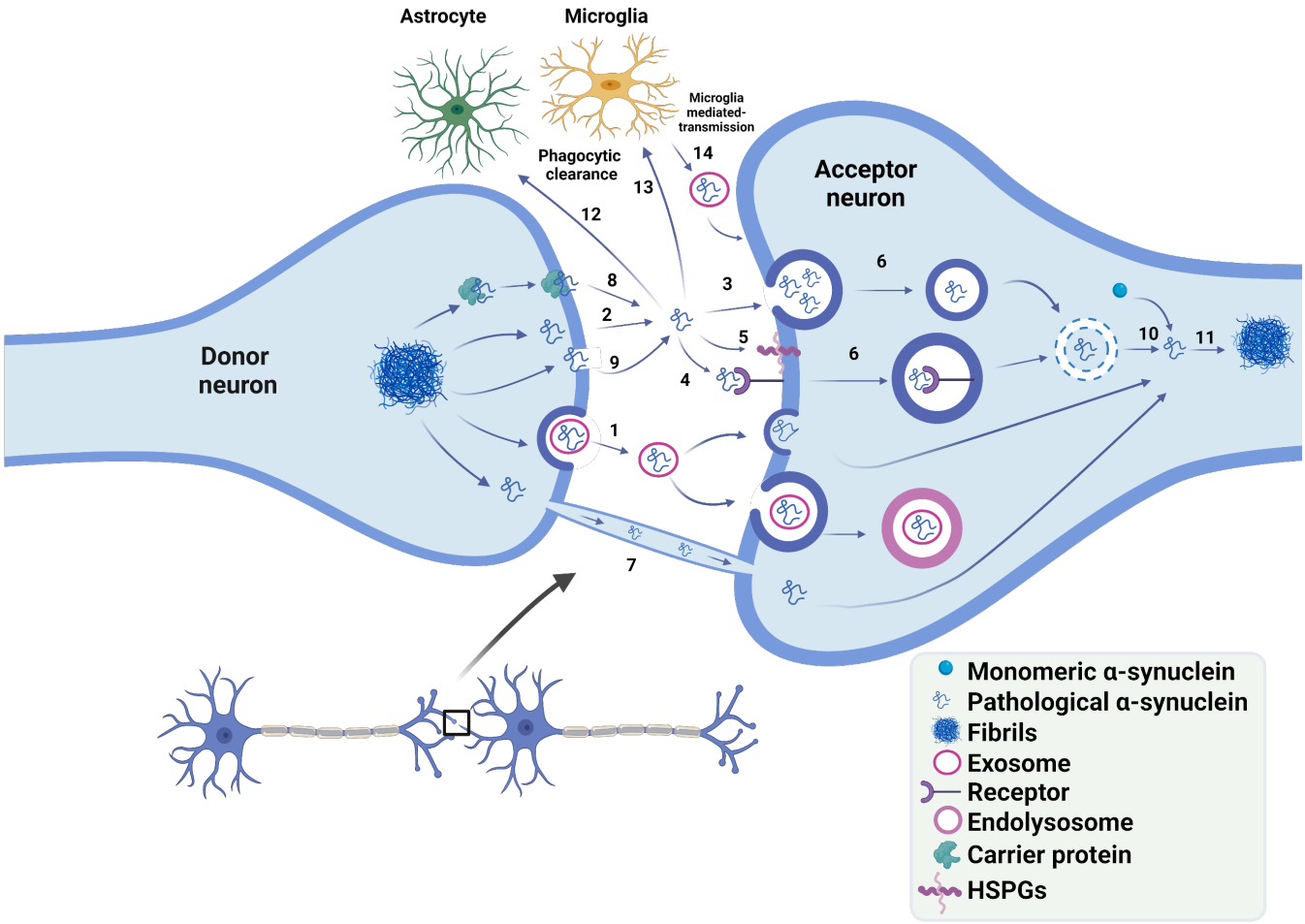


Figura 4. Representación esquemática de la transmisión de α-syn entre neuronas, astrocitos y microglía. (1) Liberación mediante exosomas de α-syn patológica. **(2)** Penetración directa de la membrana plasmática que puede conducir a la liberación de α-syn mediante difusión pasiva y, en consecuencia, captación pasiva desde el espacio extracelular. **(3)** Macropinocitosis de α-syn patológica. **(4)** Endocitosis mediada por receptores de α-syn patológica. **(5)** La α-syn puede unirse a los HSPG en la superficie celular para ser internalizada. **(6)** Transporte de α-syn a endolisosomas. **(7)** Transmisión a través de TNT, que son puentes de membrana entre las células compuestas por actina F. **(8)** Transporte mediante una proteína transportadora, que media la transferencia en la membrana plasmática y posteriormente su liberación. **(9)** Formación de estructuras similares a poros por oligómeros de α-syn que luego penetran la membrana plasmática. **(10)** Liberación de α-syn patológica en el citosol a través de lisosomas rotos. **(11)** Plegamiento incorrecto con plantilla de α-syn monomérica endógena. **(12)** Eliminación fagocítica de α-syn patológica por astrocitos. **(13)** Eliminación fagocítica de α-syn patológica por microglía. **(14)** Liberación de exosomas microgliales que contienen α-syn patológica y promueve la transmisión. Figura de elaboración propia con www.biorender.com adaptada de Vasili et al., 2019.

1.2.8. Papel de los astrocitos en la transmisión y toxicidad de α-sinucleína

Los astrocitos son el tipo de células gliales más abundantes del SNC teniendo un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis cerebral, así como en el correcto funcionamiento de las neuronas, de los oligodendrocitos y de las células microgliales, al cumplir diversas funciones a nivel de protección, sinapsis y plasticidad sináptica. Además, los astrocitos juegan un papel clave como los mayores productores de angiotensinógeno del SNC (Dominguez-

Meijide et al., 2017; Vasile et al., 2017). Por tanto, la pérdida de astrocitos o de alguna de sus funciones podría afectar en gran medida a la neurodegeneración. Concretamente, el papel principal de los astrocitos dentro de las α-sinucleopatías es el de paliar el estrés oxidativo, generar factores neurotróficos, modular la inflamación y reducir la patogenicidad de la α-syn.

Se observó que la α-syn se transfiere más eficientemente de neuronas a astrocitos y entre astrocitos, pero menos eficientemente de astrocitos a neuronas. Debido a esto se produce la acumulación patológica de esta proteína en astrocitos. Además, tanto los astrocitos como la microglía no expresan α-syn de forma endógena, o la expresan a niveles muy bajos (Takahashi & Mashima, 2022; Tanji et al., 2001), lo que implica que los agregados que se encuentran en el interior de los astrocitos probablemente provengan de fuentes externas, fundamentalmente neuronas (Sorrentino et al., 2019). Además, se ha observado que, debido a sus funciones de eliminación fagocítica en el SNC, tanto la microglía como los astrocitos desempeñan un papel protector contra la propagación de la patología de α-syn. Varios estudios han informado sobre la eliminación fagocítica microglial y astroglial de α-syn en cultivos celulares y en ratones. A diferencia de las neuronas, tanto los astrocitos como las células microgliales pueden degradar eficientemente la α-syn fibrilar, lo que sugiere un papel activo de estas células en la eliminación de los depósitos de α-syn. En conjunto, estos datos respaldan el papel de los astrocitos y la microglía en la captura y eliminación de depósitos patológicos de α-syn en la EP (Choi et al., 2020; George et al., 2019; Loria et al., 2017; Sorrentino et al., 2019; Xia et al., 2019). Los astrocitos y las neuronas son capaces de realizar el transporte intercelular bidireccional o unidireccionalmente de α-syn a través de mecanismos tales como TNT, exosomas, captación fagocítica o pinocítica entre otros.

La mayor parte de astrocitos con α-syn agregada se localizan en regiones como el sistema límbico, la corteza, el lóbulo temporal y la SN (Piao et al., 2003; Sorrentino et al., 2019). Existe una coincidencia en la presencia de astrocitos que contienen α-syn con la ubicación y la densidad de los LB neuronales tanto en la corteza como en el mesencéfalo (Braak et al., 2007).

La activación de los astrocitos puede dar lugar a dos morfologías características, la morfología hipertrófica, en donde que no hay proliferación celular, característica de un estado activo con capacidad para eliminar elementos potencialmente dañinos, y la morfología que se caracteriza por la superposición de dominios que implica proliferación celular (Haim et al., 2015). En muchos casos, los astrocitos afectados por la α-syn en EP no muestran una morfología hipertrófica, sino que solamente presentan crecimiento de sus procesos, lo que podría sugerir que la acumulación de α-syn perjudicaría la respuesta glial (Sorrentino et al., 2019).

En cultivos tratados con α-syn patológica en el cerebro humano, se ha observado que los astrocitos muestran cambios morfológicos consistentes con la activación, así como fragmentación mitocondrial, deterioro autofágico, deterioro del flujo de Ca^{2+}, sensibilización del estrés oxidativo y muerte celular (Angelova et al., 2016; Braidy et al., 2013; Cavaliere et al., 2017; Chavarría et al., 2018; Lindström et al., 2017; Meng et al., 2020). El mecanismo por el cual la agregación de α-syn induce toxicidad en los astrocitos parece ser a través de una combinación de disfunción mitocondrial, y de deterioro de los procesos de autofagia y mitofagia, que en su conjunto conducen al estrés oxidativo y apoptosis. Una hipótesis es que los lisosomas astrocíticos escinden preferentemente la α-syn de longitud completa en productos de truncamiento tóxicos más pequeños que podrían tener funciones patológicas adicionales en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

los astrocitos (Sorrentino et al., 2019). La acumulación tóxica de α-syn dentro de los astrocitos puede dañar sus funciones normales y tener resultados adversos, como la acumulación sináptica de neurotransmisores, incluidos el glutamato y la dopamina (Sarafian et al., 2017; Sheng et al., 2020; Trudler et al., 2021). Los astrocitos pueden perder la capacidad de protección contra el estrés oxidativo en el SNC al no ser capaces de producir diversos factores, cuya pérdida podría contribuir a la neurodegeneración (Johnson & Johnson, 2015; Zhu et al., 2005). La captación astrocítica de α-syn y el estrés oxidativo pueden afectar a las vías NF-kB, lo que puede provocar un aumento de citoquinas inflamatorias, como la interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), que afectarían a la función de la microglía vecina o de las células inmunes periféricas, lo que representa otra modalidad por la cual los astrocitos pueden contribuir a la neurodegeneración (Blum-Degena et al., 1995; Meng et al., 2020; Russ et al., 2021; Takahashi & Mashima, 2022). Además, los genes de factores de riesgo comunes asociados a la EP, *DJ-1*, *parkin* y *PINK1,* se expresan altamente en los astrocitos y su disfunción puede afectar a la mitofagia en una vía paralela a la de la α-syn patógena, lo que resulta en características degenerativas similares a las causadas por la α-syn, contribuyendo al daño en las células cerebrales (Booth et al., 2017). Pese a todo lo mencionado, hoy en día todavía existe un debate acerca del papel específico de los astrocitos en la propagación o profilaxis de la enfermedad. Investigaciones recientes sugieren que podrían desempeñar un papel en la protección neuronal al degradar la α-syn de manera más efectiva que las neuronas, lo que limitaría su dispersión. Sin embargo, una acumulación excesiva de α-syn podría interferir con la función normal de los astrocitos, contribuyendo así a la persistencia de la toxicidad de los agregados (Sorrentino et al., 2019).

1.2.9. Papel de la microglía en la transmisión y toxicidad de α-sinucleína

Se ha propuesto que las células microgliales podrían participar en el proceso de difusión de α-syn (George et al., 2019; Valdinocci et al., 2018). Las células microgliales son los principales componentes del sistema inmune del SNC, derivadas de macrófagos primitivos en el saco vitelino embrionario (Ginhoux et al., 2010). Estas células desempeñan múltiples funciones tanto en condiciones normales como en distintas enfermedades, mostrando tanto efectos protectores como perjudiciales para las neuronas. Normalmente, la microglía ejerce funciones inmunológicas, de eliminación de desechos celulares (Clark et al., 2015) y de remodelación sináptica (Paolicelli et al., 2011; Wallace et al., 2020; Zhan et al., 2014).

Aunque en la actualidad se reconoce que la microglía puede adoptar una amplia gama de estados fenotípicos, tradicionalmente se habla de dos estados principales. Estos estados se diferencian, entre otros aspectos, por su morfología: la **microglía en estado "basal", o "en reposo" (fenotipo antiinflamatorio),** tiene una forma altamente ramificada y expresa citoquinas antiinflamatorias como interleucina-4 (IL-4), interleucina-13 (IL-13), interleucina-10 (IL-10), factor de crecimiento transformante-β (TGFβ) y factores neuroprotectores, mientras que la **microglía en estado "activada", o "reactiva" (fenotipo proinflamatorio)** adopta una forma ameboide y expresa citoquinas proinflamatorias como interleucina-1β (IL-1β), interleucina-12 (IL-12), además de TNF-α, quimiocinas y factores neurotóxicos (Lee et al., 2021; Subhramanyam et al., 2019). Los estímulos que inducen la activación microglial incluyen lesiones, infecciones y estrés crónico (Nayak et al., 2014; Tay et al., 2017), así como compuestos patológicos como el lipopolisacárido (LPS) y el interferón-γ. La "activación microglial" conlleva la liberación de citoquinas proinflamatorias como la IL-1β, la IL-6 y el TNF-α, así como la producción de moléculas citotóxicas como el óxido nítrico, ROS y

prostaglandinas (Banati, 2002; Subhramanyam et al., 2019). En la etapa temprana de la EP , coexisten moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias producidas por microglía y sus perfiles de expresión cambian con el tiempo (Joers et al., 2017; Pisanu et al., 2014). La acumulación excesiva de estas moléculas citotóxicas puede ser perjudicial para las células neuronales circundantes y puede empeorar la progresión de la enfermedad (Haque et al., 2020; Imamura et al., 2003).

La "activación" de la microglía también puede ser provocada directamente por formas salvajes o mutadas de la α-syn, como la forma mutante A53T (Hoenen et al., 2016; Krzisch et al., 2023; Zhang et al., 2017), y la acumulación de formas fosforiladas o nitradas de la α-syn son cruciales en la patogénesis de la EP (Anderson et al., 2006; Hassanzadeh et al., 2024; Zafar et al., 2024), desencadenando la inflamación y la "activación" microglial (Barkholt et al., 2012; Gao et al., 2008; Hoenen et al., 2016). Las células microgliales "activadas" se han observado en diferentes modelos de enfermedades y en cerebros de pacientes con EP (Gerhard et al., 2006; Joers et al., 2017; Stefanova, 2022). Además, niveles elevados de citoquinas proinflamatorias se han detectado en el LCR y en el cerebro de pacientes con EP (Chen et al., 2018; Nagatsu et al., 2000), y también se han observado en varios modelos de ratones de EP (Cicchetti et al., 2002; Gerhard et al., 2006; Shen et al., 2020). Aunque se han detectado microglías "activadas" en todas las regiones del cerebro, su abundancia es especialmente notable en regiones afectadas por la EP, como la SN y el CE, donde la microglía puede liberar citoquinas de manera específica según la región y el estadío (Grabert et al., 2016). Además, estudios anteriores han vinculado la "activación" de la microglía en la SNpc con una disminución en la densidad de las neuronas dopaminérgicas y la muerte neuronal (Kuter et al., 2017; Ouchi et al., 2005). La "activación" de la microglía puede ser inducida eficazmente por estímulos proinflamatorios como el LPS (Chang et al., 2020; Lee et al., 2008b; Lively & Schlichter, 2018). Se ha demostrado que alterando los estados de "activación" microglial mediante la inyección de LPS en un modelo de ratón de propagación de agregados de α-syn de célula a célula, había un aumento significativo de la transferencia de α-syn entre neuronas (George et al., 2019). Este hallazgo se respaldó con evidencia adicional que mostraba que la inyección intranigral de LPS promovía la formación de agregados oxidados/nitrados de α-syn en ratones transgénicos que expresaban α-syn (Gao et al., 2008; Gao et al., 2011). El LPS podría interferir con la capacidad de la microglía "activada" para degradar la α-syn, lo que resultaría en su acumulación en el citoplasma. Este mecanismo se respaldó con datos que mostraban una disminución significativa en la eliminación de α-syn patológica en la microglía "activada" e inflamada (Lee et al., 2008b; Scheiblich et al., 2021). En conjunto, esta evidencia sugiere que una sobreestimulación de la microglía es menos efectiva para eliminar la α-syn, lo que a su vez aumenta la propagación de esta proteína en el cerebro.

Las células microgliales, como componentes inmunes intrínsecos del cerebro, poseen una capacidad notable para fagocitar diversas sustancias. Durante la neurogénesis y en condiciones de enfermedades como la EP, tanto las células microgliales "en reposo" como las "activadas" participan activamente en la eliminación de células apoptóticas, proteínas mal plegadas y otros desechos neuronales (Sierra et al., 2013). Este proceso de fagocitosis está regulado por una variedad de receptores, incluidos los receptores tipo Toll (TLR), los receptores TAM (Tyro 3, Axl y Mer), así como los receptores de detección de material en descomposición como CD14 y TREM-2 (Fourgeaud et al., 2016; Han et al., 2017; Stefanova et al., 2011). Entre estos, los receptores TLR específicos de microglía, como TLR2 y TLR4, desempeñan un papel crucial en la "activación" de la microglía inducida por la α-syn y la captación de esta proteína, lo que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

facilita su eliminación por parte de las células microgliales (Fellner et al., 2013; Kaur et al., 2021; Kim et al., 2013; Scheiblich et al., 2020; Stefanova et al., 2011; Xia et al., 2021). Específicamente, TLR4, expresado en abundancia en la microglía, está implicado en la "activación" microglial dependiente de TLR4 en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA y la EP (Hughes et al., 2019; Kouli et al., 2019; Lehnardt et al., 2003; Song et al., 2011). Además, se ha observado que la activación de TLR4 desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias y la producción de ROS en respuesta al tratamiento con α-syn (Fellner et al., 2013; Stefanova et al., 2011). Por tanto, la "activación" de la microglía y la inflamación neurogénica asociada juegan un papel significativo en el proceso patológico de la EP (Cheng et al., 2020; Lazdon et al., 2020).

Se ha demostrado que la α-syn internalizada por la microglía sufre degradación lisosomal dentro de autofagosomas. Esta degradación es mediada por el receptor p62 de autofagia selectiva, que incrementa su expresión a través de la vía de señalización TLR4-NF-κB en microglía (Choi et al., 2020).

La interrupción de la autofagia en la microglía ha demostrado aumentar la acumulación de α-syn y la neurotoxicidad asociada, así como inducir síntomas similares a los de la EP en modelos animales (Cheng et al., 2020). Es interesante destacar que el receptor TLR4 en la microglía participa en la autofagia selectiva de α-syn (Choi et al., 2020), y la eliminación de TLR4 afecta la capacidad fagocítica de la microglía, resultando en una eliminación deficiente de α-syn (Stefanova et al., 2011). Se ha observado que la α-syn extracelular puede activar directamente la microglía (Alvarez-Erviti et al., 2011; Su et al., 2008; Zhang et al., 2005), y las PFFs de α-syn pueden inducir la expresión de la ligasa de ubiquitina E3 en la microglía "activada" y mediar en la degradación lisosomal de α-syn. Estas condiciones pueden eventualmente llevar a la inhibición de la vía autofágica-lisosomal, creando así un ciclo perjudicial que se retroalimenta positivamente (Guo et al., 2020).

Por tanto, las neuronas pueden liberar α-syn directamente o a través de exosomas. Esta α-syn puede ser captada por las células microgliales y luego secretada nuevamente a través de los exosomas producidos por las células microgliales. En última instancia, estos exosomas microgliales que contienen α-syn pueden ser captados por neuronas sanas. Existen dos formas de captación de α-syn por parte de la microglía:

- Fagocitosis, que lleva a la degradación de α-syn a través de un proceso de **autofagia**. Además, los autofagosomas pueden fusionarse con CMV formando un compartimento intracelular autofagosoma-CMV, que se dirige a los lisosomas para su descomposición o se fusiona con la membrana plasmática para ser liberado al exterior como exosomas (Martinez-Vicente & Vila, 2013; Minakaki et al., 2018; Zheng & Zhang, 2021).

- Incorporación de **exosomas** que llevan α-syn. Estos exosomas dan lugar tras su incorporación a la formación de un endosoma temprano. Las membranas endosómicas tempranas pueden formar vesículas intraluminales que encapsulan a la α-syn y la transfiere a los endosomas tardíos o a los CMV. Una vez que la α-syn se encuentra dentro de los CMV, el proceso sería el mismo que para la α-syn

incorporada por fagocitosis (Emmanouilidou et al., 2010; Guo et al., 2020; Xia et al., 2019; Zheng & Zhang, 2021).

Por tanto, la microglía puede actuar como un potencial transportador de α-syn actuando conjuntamente con los exosomas para mediar en su propagación.

A pesar de estos hallazgos, todavía se requieren más investigaciones para explorar enfoques que modulen la actividad de la microglía para degradar α-syn de manera más efectiva, lo que podría ayudar a reducir la propagación de la α-syn y desarrollar nuevas opciones terapéuticas.

1.3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)

El sistema renina-angiotensina (SRA) ha sido considerado tradicionalmente como un sistema endocrino sistémico que desempeña un papel fundamental en la regulación de la homeostasis del sodio, el equilibrio de los fluidos corporales y el mantenimiento de la presión arterial. Actualmente se conoce al SRA sistémico como **SRA clásico, endocrino o circulante**. El angiotensinógeno, una proteína hepática que se libera a la sangre es escindido por la renina, una proteasa ácida producida en las células yuxtaglomerulares de la mácula densa del riñón, convirtiéndose en el decapéptido inactivo angiotensina I (AngI). Posteriormente, la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) escinde la AngI convirtiéndola en el octapéptido bioactivo angiotensina II (AngII), principal efector del SRA, involucrado en diversas funciones fisiológicas en una amplia gama de tejidos. La AngII se une a los receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2), receptores acoplados a proteínas G cuya activación desencadena una amplia gama de acciones biológicas que afectan prácticamente a todos los sistemas del organismo, incluidos el cerebro, el corazón, la vasculatura, los riñones y el sistema inmunológico. El efecto de la AngII se deriva de su acción principalmente sobre los receptores AT1 presentes en el músculo liso vascular y otros tejidos, como el cerebro. Los efectos incluyen vasoconstricción, inflamación, fibrosis, proliferación celular, disminución de óxido nítrico, aumento de la absorción renal de sodio, liberación de aldosterona y la hormona arginina-vasopresina. Por otro lado, la activación de AT2 produce efectos contrarios, produciendo vasodilatación, efectos antiinflamatorios, disminución de la fibrosis e incremento del óxido nítrico (Abiodun & Ola, 2020; Gao et al., 2014; Lavoie & Sigmund, 2003; Ocaranza et al., 2019; Satou et al., 2018). En los últimos años se han identificado componentes adicionales en el SRA que son también bioactivos. La Angiotensina III (AngIII), también conocida como Angiotensina 2–8, es un heptapéptido que consta de los 7 residuos C-terminales de la AngII. La AngIII es generada por la acción de la enzima aminopeptidasa A sobre la AngII (Reaux et al., 2000). Por otro lado, la Angiotensina IV (AngIV) o Angiotensina 3–8, es un hexapéptido que deriva de la AngIII mediante la acción de la aminopeptidasa N (Chansel et al., 1998). La AngIII puede activar receptores AT1 y AT2, al igual que la AngII, teniendo más afinidad por el receptor AT2. Al unirse a AT1, induce vasoconstricción y promueve la proliferación de las células del músculo liso a nivel sistémico, mientras que su interacción con AT2 favorece la natriuresis (Kemp et al., 2014; Li et al., 2017). Por otro lado, se ha observado que la AngIV interactúa con el receptor de AngIV (AT4) el cual es una aminopeptidasa regulada por insulina y excepcionalmente a AT1 (Albiston et al., 2001; Wright & Harding, 2013). AngIV se ha asociado con efectos protectores en enfermedades neurodegenerativas (Llorens-Cortes & Mendelsohn, 2002; Wright et al., 2015). Además, se han identificado otros metabolitos generados por la acción de la enzima convertidora de angiotensina II (ECA2) y otras peptidasas. ECA2 convierte

USC DE COMPOSTELA

AngI en angiotensina 1-9 (Ang(1-9) y AngII en angiotensina 1-7 (Ang(1-7), un heptapéptido que se une al receptor Mas (MasR), expresado principalmente en el cerebro (Bunnemann et al., 1990; Rukavina Mikusic et al., 2021), que también se puede unir con menos afinidad al receptor AT2 y a los receptores acoplados a proteínas G asociados a MasR (MrgDs) (Patel et al., 2016; Santos et al., 2003, 2018). La alamandina, producida a partir de la descarboxilación de Ang(1-7), actúa como ligando del receptor MrgD (Tetzner et al., 2016). La interacción de Ang(1-9), Ang(1-7), alamandina y AngIV con sus respectivos receptores ha demostrado tener un papel significativo en la protección contra enfermedades cardiovasculares (Hussain & Awan, 2018).

1.3.1. SRA locales

Además de su función endocrina, se han evidenciado en diversos estudios funciones **paracrinas o tisulares y autocrinas del SRA**. La función paracrina del SRA implica acciones locales en una variedad de órganos y tejidos, como el corazón, los riñones, los pulmones, los músculos, el SNC, los vasos sanguíneos, la glándula pituitaria, la glándula suprarrenal, el hígado, el sistema inmunológico, los eritrocitos, el tracto digestivo y el tejido adiposo (Bader et al., 2001; Engeli et al., 2000; Morimoto & Sigmund, 2002). Los SRA tisulares o locales son independientes al SRA endocrino, sin embargo, estos pueden interactuar entre sí estando implicados en procesos como la formación de la matriz extracelular, el crecimiento celular, la función endotelial, la proliferación vascular y la apoptosis (Paul et al., 2006). Por otro lado, hay un **SRA intracelular o intracrino**, evidenciado por la presencia de receptores AT1 en la membrana mitocondrial y otros componentes del SRA en las mitocondrias, núcleos de las neuronas, microglía y astrocitos y en vesículas neurosecretoras, con la capacidad de funcionar de forma independiente de los receptores de membrana, lo cual contribuye a procesos específicos en cada tejido (Costa-Besada et al., 2018; Deliu et al., 2014; Grobe et al., 2008; Valenzuela et al., 2016; Villar-Cheda et al., 2017). Aunque el papel del SRA intracelular aún no está claro, nuestros datos en neuronas sugieren efectos protectores en las células (Labandeira-Garcia et al., 2021; Villar-Cheda et al., 2017).

1.3.2. SRA cerebral

El descubrimiento de un SRA cerebral ha cambiado nuestra comprensión tradicional de SRA, mejorando nuestra comprensión de las funciones SRA en el cerebro (Ganten et al., 1971). Antiguamente se creía que los efectos del SRA en el SNC se debían a la acción del SRA periférico, donde la AngII atravesaba la BHE a través de capilares fenestrados en los órganos circunventriculares que rodean a los III y IV ventrículos. Sin embargo, se ha demostrado que la AngII no puede atravesar la BHE (Phillips & De Oliveira, 2008; Von Bohlen & Halbach, 2005) y que el SRA cerebral representa un sistema independiente con un papel diverso en varias funciones y trastornos cerebrales (Labandeira-Garcia et al., 2017; Wright & Harding, 2013). Se han identificado todos los componentes del SRA en el cerebro, los cuales son además producidos localmente. Asimismo, se ha descubierto que todos los elementos necesarios para la síntesis de péptidos de angiotensina se producen localmente en el cerebro (Jackson et al., 2018; Labandeira-Garcia et al., 2011, 2017, 2021) (Figura **5**). De hecho, estudios celulares y moleculares han demostrado la actividad de los genes del SRA y sus regiones promotoras en este órgano (Abiodun & Ola, 2020; Allen et al., 2008; Garrido-Gil et al., 2013a; Saavedra, 1992). Se ha observado que las angiotensinas periféricas también pueden interactuar con el SRA cerebral a nivel de los órganos circunventriculares, al ser aquí más permeable la BHE (Fry & Ferguson, 2007). Sin embargo, sólo las angiotensinas cerebrales llevan a cabo actividades

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

específicas. Estas interacciones complejas entre el tejido cerebral y el SRA sistémico periférico hacen que el sistema en su conjunto sea difícil de comprender (de Morais et al., 2018; Ferguson et al., 2001).

Se ha encontrado una distribución generalizada de los receptores AT1, AT2 y MasR en el SNC, sobre todo en neuronas, astrocitos y microglía del córtex, hipocampo y ganglios basales (Labandeira-Garcia et al., 2017; Lenkei et al., 1996; Rodriguez-Pallares et al., 2008; Schelling et al., 1983). Por otro lado, el receptor AT4 se encuentra limitado a las neuronas del córtex, hipocampo y ganglios basales, donde participa en mecanismos relacionados con la remodelación sináptica (Wright et al., 2015). En el cerebro, AT1 está asociado con la mayoría de los efectos proinflamatorios y prooxidativos de AngII, mientras que AT2 tiene un efecto opuesto, contrarrestando las acciones del primero. La AngII en el cerebro aumenta la expresión de AT1, influyendo en la actividad del SRA (Labandeira-Garcia et al., 2017, 2024; Rodriguez-Pallares et al., 2008; Rodriguez-Perez et al., 2015; Wei et al., 2009). Se ha observado que la señalización de AngII a través del receptor AT1 causa neurotoxicidad y daño a la BHE (Mowry et al., 2021). Además, se sabe que la AngII está involucrada en la progresión de la EP (Allen et al., 1992; Labandeira-Garcia et al., 2012, 2024) y que podría estarlo también en la EA (Wright & Harding, 2019). En contraste, cuando AngII actúa a través de su unión con AT2, puede promover el desarrollo neuronal (Garcia-Garrote et al., 2019).

El angiotensinógeno es el péptido más abundante del SRA en el cerebro y es de donde se originan los demás péptidos del este sistema. Los astrocitos son la principal fuente de angiotensinógeno, y por ende de la AngII en el SNC (Dominguez-Meijide et al., 2017; Stornetta et al., 1988). De hecho, varios estudios confirmaron que más del 90 % del angiotensinógeno cerebral se produce en astrocitos (Jiang et al., 2013; Stornetta et al., 1988), produciéndose el 10 % restante en neuronas y otras células gliales (Morimoto et al., 2001; Yang et al., 1999). Aunque la renina es abundante en la circulación sanguínea, se encuentra a niveles más bajos en el cerebro (Bodiga & Bodiga, 2013; Grobe et al., 2008). En este contexto, se ha identificado su expresión en células neuronales tanto a nivel intracelular como en su forma secretada prorenina, mientras su receptor específico (PRR) se encuentra tanto en neuronas y células gliales del sistema nigroestriatal de roedores, primates y humanos, así como en otras regiones cerebrales como el córtex y los ganglios basales (Garrido-Gil et al., 2013a, 2017; Valenzuela et al., 2010). Se ha sugerido que la renina intracelular podría ser fundamental para la generación de angiotensinas en el cerebro y para coordinar otras funciones no relacionadas con el SRA (Van Thiel et al., 2017). Se ha visto que la prorenina en el cerebro se une con mayor afinidad a los PRR que la renina, lo que conduce a la escisión de angiotensinógeno, activando así los receptores de AngII (Grobe et al., 2008; Valenzuela et al., 2010; Wright & Harding, 2013). La renina y su precursor, la prorenina, junto con el PRR, son componentes esenciales del SRA, aunque han recibido menos atención en la investigación. La prorenina y los PRR cumplen funciones tanto dependientes como independientes de AngII. En las funciones dependientes de AngII, la renina hidroliza el angiotensinógeno para generar AngI. La interacción de la renina con el PRR incrementa considerablemente su actividad catalítica, y la prorenina exhibe una actividad similar. En cuanto a las funciones independientes de AngII, estas se originan a través de la señalización intracelular mediada por PRR, cuyos efectos son generalmente proinflamatorios y prooxidativos. Sin embargo, las vías intracelulares involucradas en estos efectos son complejas y aún no se comprenden completamente (Ichihara & Yatabe, 2019; Lopez-Lopez et al., 2021; Nguyen et al., 2002; Valenzuela et al., 2010).

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La ECA es uno de los componentes más importantes del SRA en el cerebro. Predominantemente se localiza en los endotelios de la vasculatura cerebral y en los órganos circunventriculares, aunque su máxima expresión se ha encontrado en los plexos coroideos, el órgano vasculoso de la lámina terminal, el órgano subfornical y el área postrema (Bodiga & Bodiga, 2013). Diversos trabajos han demostrado la participación de la ECA en la disfunción cognitiva, ya que el uso de inhibidores de la ECA redujo la incidencia demencia en la EA (De Oliveira et al., 2014). Los inhibidores de ECA podrían reducir la disfunción cognitiva mediante acciones antiinflamatorias, independientemente de los efectos reductores de la presión arterial (Rygiel, 2016). Por otro lado, la ECA2 es una enzima expresada prácticamente en todo el cerebro, predominantemente en neuronas, y, en particular, en las regiones responsables de controlar la presión arterial central (Tota et al., 2012). Diversos estudios han revelado que ECA2 en el cerebro está relacionada con el desarrollo de la hipertensión neurogénica (Sriramula et al., 2015; Xia et al., 2009; 2015; Xu et al., 2017). Por ello, se ha propuesto la terapia génica con ECA2 como una posible estrategia para combatir la hipertensión (Tipnis et al., 2000). Por otro lado, la Ang(1-7) muestra una distribución más limitada, localizándose principalmente en el córtex cerebeloso, el hipocampo, el hipotálamo y la SN. (Gironacci et al., 2018). Se ha observado que el eje ECA2/Ang(1-7)/MasR está altamente distribuido en casi todas las células del cerebrales y ofrece protección al contrarrestar al eje ECA/AngII/AT1R (Gallagher et al., 2006; Jiang et al., 2013).

La activación del receptor AT1 por AngII, debido a un aumento en la expresión de ECA, está asociada con importantes efectos adversos, como la vasoconstricción cerebral y el deterioro cognitivo (Ahmed et al., 2018), la muerte celular (Zhang et al., 2012), y la inflamación (Labandeira-Garcia et al., 2017, 2024). La activación del receptor AT1 estimula la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato de la membrana, lo que genera dos moléculas importantes: trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 se une a sus receptores, que son canales de liberación de calcio activados por ligando ubicados en los sitios de almacenamiento de calcio dentro de la célula, como el retículo endoplásmico, y provoca la liberación del calcio intracelular provocando un aumento en la activación del complejo oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH-oxidasa) (Garcia & Boehning, 2017; Simo-Cheyou et al., 2017), una de las principales fuentes de producción de superóxido después de las mitocondrias (Babior, 2004; Belarbi et al., 2017). Además, el complejo NADPH-oxidasa puede ser activado también a través de la proteína quinasa C, que a su vez es activada por el DAG (Basu et al., 2019; Bollag, 2014). El superóxido generado por la actividad de NADPH-oxidasa, así como otras ROS derivadas de este superóxido, son los principales responsables de los efectos prooxidativos y proinflamatorios asociados con la activación del receptor AT1 (Grammatopoulos et al., 2007a; Rodriguez-Pallares et al., 2008). Además, la estimulación del receptor AT1 por AngII activa a través del superóxido derivado de NADPH-oxidasa la vía de señalización del NF-κB y la vía RhoA/Rho quinasa (RhoA/ROCK) en las células microgliales, lo que lleva a un incremento en la producción de citoquinas en varias regiones del cerebro incluidas los ganglios basales (Rodriguez-Perez et al., 2015). Los estados prooxidativos y proinflamatorios generados por la estimulación de AT1 pueden contribuir a la muerte de las neuronas dopaminérgicas y, en última instancia, a la progresión de la EP. En resumen, se ha demostrado que niveles elevados de AngII incrementan el estrés oxidativo y promueven la neuroinflamación, mientras que los bloqueadores de los receptores de AngII reducen muchos factores de riesgo asociados con enfermedades neurodegenerativas y protegen las neuronas (Saavedra, 2016). Por otro lado, los efectos asociados con los receptores AT2 suelen ser contrarios a los que producen los receptores AT1. La activación del receptor AT2 reduce la

actividad de la NADPH-oxidasa y la producción de superóxido, además de inhibir la fosforilación de NFκB y ERK1/2 (Bhat et al., 2019; Garrido-Gil et al., 2022; McCarthy et al., 2013; Labandeira-Garcia et al., 2024; Patel et al., 2020).

Por tanto, en lo referente a los péptidos y receptores de angiotensina que regulan el funcionamiento del SRA, estos suelen organizarse en dos brazos: uno **prooxidativo** y **proinflamatorio**, y otro **antioxidante** y **antiinflamatorio** con funciones protectoras o de contrarregulación. El brazo prooxidativo/proinflamatorio se caracteriza principalmente por la activación del eje ECA/AngII/AT1, lo que potencia la actividad del complejo NADPH-oxidasa y promueve la liberación de calcio, como se describió anteriormente. Además, la renina y su precursor, la prorenina, también interactúan con sus respectivos receptores. Cuando la prorenina se une a su receptor, adquiere propiedades catalíticas similares a las de la renina, además de desencadenar una vía de señalización que induce efectos prooxidativos, similares a los que genera la activación del receptor AT1 (Lopez-Lopez et al., 2021; Nguyen & Contrepas, 2008). Por tanto, la sobrectivación del eje ECA/AngII/AT1/NADPH-oxidasa incrementa la vulnerabilidad de las neuronas y puede dar lugar a la muerte neuronal. Esta serie de eventos suele desencadenar mecanismos compenatorios en donde participa el brazo antioxidante/antiinflamatorio que está compuesto principalmente por el eje ECA/AngII/AT2, el eje ECA2/Ang(1-7)/MasR y alamandina/MrgD (Kostenis et al., 2005; Santos et al., 2018). La ECA2 desempeña un papel esencial en el equilibrio entre estos dos brazos del SRA, ya que convierte los péptidos prooxidativos (AngI y AngII) en componentes antioxidantes como Ang(1-9) y, especialmente, Ang(1-7) (Labandeira-Garcia et al., 2017, 2024).

Varios estudios han evidenciado interacciones entre el SRA cerebral y diversos factores involucrados en la polarización de la microglía, como los estrógenos (Garrido-Gil et al., 2022; Labandeira-Garcia et al., 2016, 2017; Suzuki et al., 2007; Vegeto et al., 2008), la vía de señalización RhoA/ROCK (Villar-Cheda et al., 2012), el factor de crecimiento similar a la insulina-1 o IGF-1 (Rodriguez-Perez et al., 2016), el TNF-α (Borrajo et al., 2014a), el hierro (Garrido-Gil et al., 2013b), el receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas o PPAR-γ (Garrido-Gil et al., 2012) y los TLR (Biancardi et al., 2016). Así, la desregulación del SRA cerebral juega un papel clave en los cambios relacionados con el envejecimiento y la neurodegeneración, exacerbando el estrés oxidativo y la neuroinflamación. Diversos estudios han indicado que un SRA cerebral desregulado puede estar implicado en procesos de neurodegeneración, debido a la neuroinflamación, el estrés oxidativo y las alteraciones fisiopatológicas relacionadas con el envejecimiento (Labandeira-Garcia et al., 2017). La disfunción del SRA cerebral juega un papel crucial en varias enfermedades neurodegenerativas, como la EP, la EA, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple, además de en lesiones cerebrales traumáticas y en accidentes cerebrovasculares (Mogi & Horiuchi, 2013). Sin embargo, estos efectos negativos pueden mitigarse mediante la manipulación farmacológica de los componentes del SRA.

Dentro de los factores que interaccionan con el SRA cerebral, uno de los más importantes es la vía RhoA/ROCK. ROCK es una quinasa que es activada por RhoA, que es un regulador crucial del citoesqueleto de actina, controlando la migración de la microglía y otras células inflamatorias hacia zonas afectadas (Greenwood et al., 2003; Labandeira-Garcia et al., 2014; Yan et al., 2012). La vía RhoA/ROCK induce cambios en el citoesqueleto de actina necesarios para la motilidad celular, la retracción de procesos y la expansión celular, eventos que en el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

caso de la microglía desembocarían en su la activación (Bernhart et al., 2010). La activación de la vía RhoA/ROCK tiene un papel importante en el efecto del eje AngII/AT1/NADPH-oxidasa sobre la polarización de la microglía y la neurodegeneración (Villar-Cheda et al., 2012). Durante la activación microglial inducida por AngII, se ha observado una interacción entre NADPH-oxidasa y RhoA/ROCK, en donde, la activación de NADPH-oxidasa por AngII conduce a la producción de superóxido, a la translocación de NF-κB y a la activación de ROCK. Por otra parte, la activación de ROCK participa en la regulación de NADPH-oxidasa a través de la proteína quinasa activada por mitógenos p38. Además, la activación de la ROCK, mediante NF-κB, regula positivamente la expresión de AT1 en células microgliales, mediante un mecanismo de retroalimentación (Rodriguez-Perez et al., 2015). Además, en los últimos años, varios estudios han sugerido que la vía RhoA/ROCK puede estar involucrada en la agregación de varias proteínas, incluida la α-syn, y que los inhibidores de esta vía pueden promover la degradación de estas proteínas mal plegadas (Hou et al., 2018; Iyer et al., 2021; Liu et al., 2016). La vía RhoA/ROCK puede afectar a la agregación de la α-syn mediante la regulación de vesículas endocíticas. Se ha observado que la que la vía RhoA/ROCK induce la activación de Rab13 que forma el complejo retrómero Vps35, Vps26 y Vps29, el cual promueve la agregación de α-syn, inhibiendo la formación de componentes necesarios, como los componentes Snx, para el transporte de dopamina (Follett et al., 2016; Gitler et al., 2008; Iyer et al., 2021). Otro mecanismo por el cual la vía RhoA/ROCK puede afectar a la agregación de α-syn sería mediante la regulación de la expresión de esta proteína durante el tráfico de vesículas endocíticas, junto con dos factores de transcripción: el elemento de respuesta al suero y el factor de unión a GATA-2 (Scherzer et al., 2008; Zhou et al., 2011).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

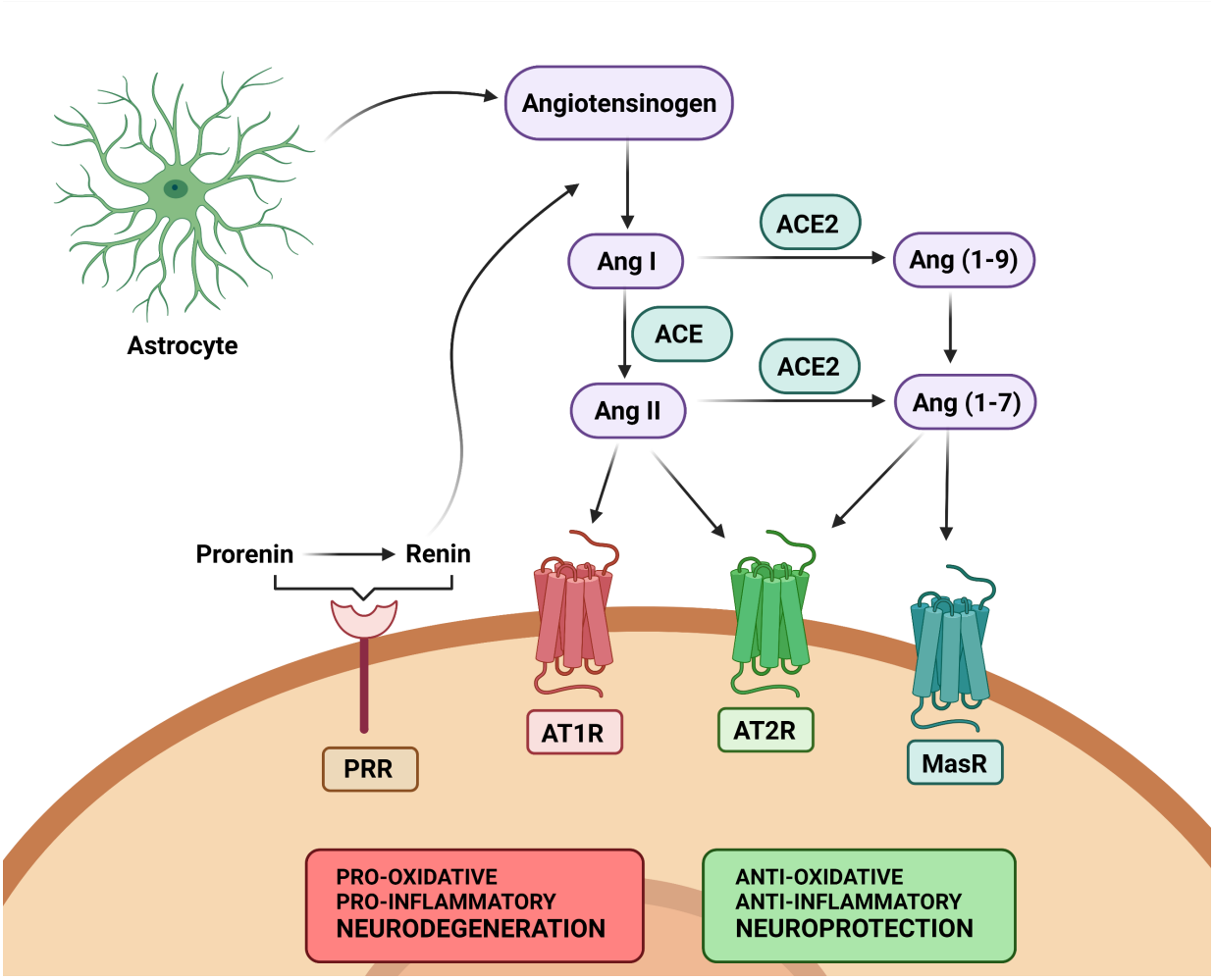


Figura 5. SRA cerebral. Los astrocitos son la principal fuente de angiotensinógeno a nivel cerebral. El angiotensinógeno es convertido por la renina en AngI. La AngI es a su vez escindida por ECA dando lugar a la AngII, el principal efector del SRA, que actúa sobre los receptores AT1 y AT2. De forma alternativa, la AngII puede dar lugar, gracias a la enzima ECA2, a la Ang(1-7), que ejerce sus acciones a través del MasR. La activación de AngII/AT1, eje proinflamatorio, interviene en procesos relacionados con el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la neurodegeneración, mientras que la activación de AngII/AT2 y Ang(1-7)/MasR, eje antiinflamatorio, contrarresta las acciones del eje proinflamatorio, dando lugar a la activación de mecanismos antiinflamatorios y antioxidantes promoviendo así la neuroprotección y supervivencia celular. Abreviaturas: ACE, enzima convertidora de angiotensina I; ACE2, enzima convertidora de angiotensina II; Ang I, angiotensina I; Ang II, angiotensina II; AT1R, receptor de angiotensina II tipo 1; Ang (1-7), angiotensina 1-7; Ang (1-9), angiotensina 1-9; AT2R, receptor de angiotensina II tipo 2; MasR, receptor Mas; PRR, receptor de prorenina. Figura de elaboración propia con www.biorender.com.

1.3.3. Influencia del SRA en la Enfermedad de Parkinson

Los primeros estudios que sugirieron una posible conexión entre el SRA y la EP comenzaron a surgir entre los años ochenta y noventa (Allen et al., 1992; Zubenko et al., 1986). En sus inicios, varios estudios identificaron componentes del SRA en los ganglios basales, especialmente en el sistema nigroestriatal (Allen et al., 1992; Quinlan & Phillips, 1981). Como se ha mencionado en el apartado anterior, la AngII induce la activación del complejo NADPH-oxidasa aumentando las concentraciones de ROS producidas por células inflamatorias, como la

microglía, en los ganglios basales, provocando la muerte de neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, la estimulación con AngII no aumenta la muerte de estas neuronas en ausencia de células microgliales (Joglar et al., 2009). Por tanto, en el sistema nigroestriatal, el estrés oxidativo y la neuroinflamación son procesos tempranos que conducen a la muerte celular dopaminérgica, y ambos eventos actúan sinérgicamente con otros factores para impulsar la progresión de la EP (Dionísio et al., 2021; Gao et al., 2003, 2011; Joglar et al., 2009; Wu et al., 2003).

A lo largo de las últimas dos décadas, nuestro grupo ha ido mostrando evidencias de la existencia de un SRA local con función paracrina en la SN y el CE de roedores (Rodriguez-Pallares et al., 2008), primates no humanos y humanos (Garrido-Gil et al., 2013a, 2017; Valenzuela et al., 2010). En dichos estudios, se detectaron receptores AT1 y AT2 en neuronas dopaminérgicas, astrocitos y microglía de ratas (Rodriguez-Pallares et al., 2008), ratones (Joglar et al., 2009), primates no humanos (Valenzuela et al., 2010; Garrido-Gil et al., 2017) y humanos (Garrido-Gil et al., 2013a). Además, se ha visto la presencia de receptores AT1 y AT2 en neuronas dopaminérgicas y células gliales en cultivos celulares primarios de la región nigral, así como en varias líneas celulares neuronales y gliales (Joglar et al., 2009; Rodriguez-Pallares et al., 2004, 2008). Asimismo, un estudio reciente que empleó perfiles genómicos de neuronas dopaminérgicas humanas reveló una alta expresión del gen del receptor AT1 como marcador de las neuronas dopaminérgicas más vulnerables en humanos, incluidos aquellos con EP, que se localizan en el nivel ventral de la SNpc (Kamath et al., 2022).

Estos hallazgos son evidencia de que el eje prooxidativo del receptor AngII/AT1 desempeña un papel en la degeneración dopaminérgica y contribuye de forma sinérgica al inicio y progresión de la enfermedad, ya que se ha observado la presencia y los efectos funcionales en las neuronas dopaminérgicas y las células gliales, de varios componentes del brazo prooxidativo/proinflamatorio, como el eje del receptor AngII/AT1 (Rodriguez-Pallares et al., 2008; Rodriguez-Perez et al., 2015) y la vía de señalización de la prorenina (Lopez-Lopez et al., 2021). Asimismo, se ha demostrado la presencia y la actividad funcional en estas células del brazo antioxidante/antiinflamatorio, que incluye el eje AngII/AT2 (Garrido-Gil et al., 2022; Rodriguez-Perez et al., 2020) y la vía del receptor Ang(1-7)/Mas (Costa-Besada et al., 2018).

Se han observado interacciones funcionales significativas entre los sistemas locales de dopamina y angiotensina en diversos órganos periféricos. La desregulación de estas interacciones, como una alteración en la expresión o la dimerización entre receptores de dopamina y receptores de angiotensina, puede conducir a enfermedades degenerativas renales e hipertensión (Chugh et al., 2012; Yang et al., 2012). En las últimas décadas, se han detectado interacciones similares entre el sistema dopaminérgico y el SRA local en el cerebro (Dominguez-Meijide et al., 2014; Villar-Cheda et al., 2014) y varios estudios han destacado la importancia de la desregulación en las interacciones dopamina-SRA en enfermedades cerebrales, especialmente en la degeneración dopaminérgica en la EP (Cosardereliogl u et al., 2020; Labandeira-Garcia et al., 2011, 2012, 2014).

Inicialmente se pensaba que el aumento de la respuesta microglial en las enfermedades neurodegenerativas era una reacción a la muerte neuronal para eliminar células muertas y desechos celulares, pero este proceso inflamatorio también puede causar daño adicional a las neuronas circundantes y contribuir a la progresión de la neurodegeneración, como se ha

informado en varias enfermedades autoinmunes (Vowinckel et al., 1997). No obstante, se ha demostrado que la respuesta microglial y la activación de la enzima NADPH-oxidasa son factores cruciales para desencadenar la degeneración neuronal, actuando en sinergia con otros factores patogénicos para inducir neurodegeneración en las primeras etapas de la enfermedad (Gao et al., 2003). En diferentes modelos de EP, se observó que la AngII aumentaba el efecto neurotóxico de dosis bajas de neurotoxinas dopaminérgicas, mientras que el uso de inhibidores de la ECA, como el captopril (Muñoz et al., 2006), o antagonistas del receptor AT1, como el candesartán o el losartán (Grammatopoulos et al., 2007a; Rodriguez-Pallares et al., 2008), brindaron una protección significativa para las neuronas dopaminérgicas y redujeron los niveles de oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos inducidos por neurotoxinas (Sánchez-Iglesias et al., 2007). Además, inhibidores de NADPH-oxidasa bloquearon el efecto potenciador de AngII sobre la neurodegeneración dopaminérgica, lo que confirmó que la activación de NADPH-oxidasa y las ROS derivadas de NADPH-oxidasa tienen un papel clave en la exacerbación de la pérdida neuronal inducida por AngII (Joglar et al., 2009; Rodriguez-Pallares et al., 2008). Se ha sugerido que AngII actúa mediante dos mecanismos: Por un lado, en las neuronas dopaminérgicas, AngII actúa sobre los receptores AT1 para generar bajos niveles de ROS intraneuronales mediante la activación de NADPH-oxidasa neuronal (Labandeira-Garcia et al., 2013). Por otro lado, AngII también actúa sobre la microglía, activando el eje AT1/NADPH-oxidasa, lo que produce altos niveles de superóxido y ROS que, al ser liberados al medio extracelular, pueden dañar a las neuronas. Además, una pequeña cantidad de ROS microglial se usa como segundo mensajero para regular la respuesta inflamatoria (Babior, 2004). En consecuencia, la sobreactivación del eje AngII/AT1/NADPH-oxidasa incrementa la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas y contribuye sinérgicamente al desarrollo y progresión de la EP. El papel del SRA cerebral en la muerte de las neuronas dopaminérgicas y su posible implicación en la EP también ha sido evidenciado por varios estudios de diferentes grupos de investigación (Grammatopoulos et al., 2007b; Zawada et al., 2011).

En resumen, la sobreactivación del eje AngII/AT1 en neuronas y células gliales promueve procesos importantes implicados en la progresión de la EP, como el estrés oxidativo mediante la activación del complejo NADPH-oxidasa (Rodriguez-Pallares et al., 2012). Además, la activación de AngII/AT1 promueve el aumento del calcio intraneuronal (Gebke et al., 1998) y respuestas neuroinflamatorias microgliales (Labandeira-Garcia et al., 2017). Sin embargo, a día de hoy todavía se desconoce si la sobreactivación de AngII/AT1 puede afectar a la agregación y a la transmisión de α-syn en neuronas y células gliales. Por tanto, aunque todavía se necesita ampliar el conocimiento sobre los mecanismos implicados en el desarrollo y la progresión de la EP, la manipulación farmacológica de los componentes SRA cerebral puede ser una estrategia neuroprotectora eficaz contra la vulnerabilidad dopaminérgica y la progresión de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas.

1.3.4. Autoanticuerpos agonistas del SRA

Los procesos autoinmunes han sido relacionados con el inicio y la progresión de enfermedades degenerativas, incluida la EP (Harms et al., 2021; Tansey et al., 2022). Se ha observado que tanto en modelos animales como en pacientes con EP tiene lugar un incremento significativo de autoanticuerpos (AA) dirigidos a componentes del SRA en los niveles séricos y en el LCR, en particular los autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1-AA), y los ECA2-AA (antagonistas de ECA2) en comparación con pacientes controles

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

sin EP (Labandeira et al., 2022b). Esto sugiere que las células B activadas pueden migrar al compartimento intratecal, lo que resulta en la secreción intratecal de estos AA.

Los AT1-AA pertenecen a la familia de inmunoglobulinas G de tipo 3 y fueron descubiertos por primera vez en 1999 por un equipo de investigadores en Alemania (Wallukat et al., 2003). Estos investigadores caracterizaron los AT1-AA después de aislar inmunoglobulinas totales del suero de mujeres embarazadas tanto normales como con preeclampsia. Demostraron que estos anticuerpos podían aumentar la frecuencia cardíaca de los cardiomiocitos neonatales de rata de manera similar a la AngII, y este efecto podía ser bloqueado por losartán, un antagonista del receptor AT1 (Wallukat et al., 1999, 2003). Después de realizar varios experimentos, determinaron que los AT1-AA tenían la misma afinidad y capacidad para activar el receptor AT1 que la AngII (Wallukat et al., 2003), activando una cascada de señalización similar a la generada por AngII/AT1, lo que contribuiría a la generación de ROS mediante la activación de la enzima NADPH-oxidasa (Dechend et al., 2003). Para comprender mejor la unión de los AT1-AA, evaluaron su efecto en la frecuencia cardíaca junto con pequeñas secuencias peptídicas correspondientes al receptor AT1. A partir de estos experimentos, identificaron una secuencia muy específica de siete aminoácidos en el segundo bucle extracelular del receptor como el sitio de unión de los AT1-AA, mismo sitio de unión de la AngII. Sin embargo, se ha observado que los AT1-AA no compiten con la AngII por el receptor AT1, sino que parece potenciar la unión y los efectos de la AngII durante el embarazo a través de varios mecanismos, como modificaciones conformacionales del receptor, su dimerización o la amplificación de las vías de señalización de la AngII (Brewer et al., 2013; Cunningham et al., 2016; Herse & Lamarca, 2013; Zhang et al., 2023).

Además de en la preeclampsia, se han identificado AT1-AA en otros procesos periféricos, como en otros casos de hipertensión (Campbell et al., 2018; Fu et al., 2000; Wallukat et al., 1999), o rechazo de injerto renal (Dragun et al., 2005). Estos AA desempeñan un papel funcional relevante en estas enfermedades, ya que potencian la actividad del eje SRA proinflamatorio AngII/AT1. También es posible que los AT1-AA circulantes contribuyan a la alteración de la BHE en los pacientes, lo que se alinea con estudios previos que indican que la activación de los receptores AT1 en las células endoteliales vasculares tiene un impacto significativo en la permeabilidad de la BHE (Fleegal-Demotta et al., 2009; Santisteban et al., 2020). De hecho, se ha observado que los antagonistas de AT1, y no otros fármacos antihipertensivos, bloquean el aumento de la permeabilidad de la BHE que se produce en la hipertensión, lo que sugiere que, en efecto, es la activación de los receptores AT1 endoteliales la responsable del aumento de la permeabilidad de la BHE, y no la hipertensión en sí misma (Fleegal-Demotta et al., 2009; Santisteban et al., 2020). Otros estudios han demostrado que los AT1-AA inducen la liberación de calcio en células endoteliales del músculo liso, lo que conduce a alteraciones en la función vascular (Sun et al., 2008). Además, se ha observado que el efecto de los AT1-AA puede ser contrarrestado mediante el uso de antagonistas del receptor AT1 (ARAII), como el valsartán (Wang et al., 2017) e irbesartán (Wenzel et al., 2011).

La razón detrás de la producción de AT1-AA aún no ha sido completamente esclarecida. No obstante, parece que la inflamación periférica juega un papel en la liberación de antígenos que desencadenan la producción de estos AA (LaMarca et al., 2009; Parrish et al., 2010). Además, se ha encontrado una correlación significativa entre los niveles séricos de AT1-AA y las citoquinas inflamatorias séricas en pacientes con EP, pero no en los controles, lo que sugiere

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que los mecanismos relacionados con la EP pueden contribuir al aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias periféricas mediante la activación de los receptores AT1 de las células periféricas. Varios estudios en modelos animales sugieren que las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-17 y TNF-α podrían estar involucradas en la generación de los AT1-AA. Estas citoquinas aumentan la expresión del gen Tgm2, que codifica la transglutaminasa tisular 2 (TG2), necesaria para la producción de AT1-AA (Dhillion et al., 2012; Irani et al., 2010). Entre estas citoquinas, TNFSF14 (LIGHT), producida principalmente por el sistema inmunológico, ha mostrado ser particularmente relevante, ya que actúa sobre células inflamatorias induciendo respuestas proinflamatorias y promoviendo la producción de citoquinas asociadas con TG2 (Herro & Croft, 2016). Además, se ha viso que LIGHT induce la producción de TG2, modificando postraduccionalmente en su segundo bucle extracelular, al receptor AT1, estabilizándolo y generando un neoantígeno que desencadena la producción autoinmune de AT1-AA (Liu et al., 2014, 2015, 2017). Estos cambios inducidos por TG2 afectan la internalización y eliminación de AT1, resultando en un aumento de su expresión y en la afinidad del receptor AT1 (Liu et al., 2019). Curiosamente, un estudio reciente observó que el gen LIGHT estaba regulado positivamente en pacientes con EP en comparación con los controles (Jiang et al., 2019), además, se ha observado que el aumento de la actividad TG2 también se ha relacionado con la formación de agregados proteicos en enfermedades neurodegenerativas, incluida la EP, y la neuroinflamación (Gatta et al., 2016), por lo que este mecanismo podría ofrecer posibles biomarcadores genéticos para la EP.

Por tanto, todo apunta a que estos AA pueden tener un rol importante potenciando al eje proinflamatorio de SRA, lo que a su vez promueve la neuroinflamación y la neurodegeneración dopaminérgica (Labandeira et al., 2022b). Estos AA contribuyen a la progresión de la neurodegeneración al aumentar la actividad de los receptores AT1 y reducir la actividad del eje antiinflamatorio ECA2. Se ha observado un aumento significativo de estos AA relacionados con el SRA tanto en suero como en el LCR de ratas lesionadas con la neurotoxina dopaminérgica 6-OHDA. Además, en cultivos celulares, se ha demostrado que la administración de AT1-AA aumenta la pérdida de neuronas dopaminérgicas, pero este efecto se ve inhibido con el uso del bloqueador del receptor AT1 candesartán. Estos hallazgos en cultivos celulares confirman que, independientemente de los posibles efectos de los AA del SRA circulante en la permeabilidad de la BHE u otros factores mediadores posibles *in vivo*, los AT1-AA pueden tener efectos nocivos directos mediante la activación del receptor AT1 en neuronas y células gliales (Labandeira et al., 2022a).

En conjunto, estos hallazgos indican que la aparición de AA asociados con el SRA durante las primeras etapas de la neurodegeneración contribuye a desregular el sistema hacia un estado proinflamatorio, lo que acelera la progresión de la degeneración dopaminérgica y de la EP. Los fármacos que bloquean los receptores de angiotensina o terapias que reducen la generación de estos AA podrían ayudar a mitigar estos efectos.

Actualmente, no se han estudiado los posibles efectos de los AT1-AA sobre la agregación de α-syn. Aunque se sabe que el SRA influye en el desarrollo de la EP aún no se ha esclarecido el posible impacto de los componentes del SRA en la agregación y propagación de α-syn en neuronas y células gliales. Por tanto, explorar el papel de los AT1-AA y de los componentes del SRA en la agregación de α-syn podría ser clave para comprender mejor la progresión de esta enfermedad.

USC DE COMPOSTELA

1.3.5. Tratamientos moduladores del SRA y sus receptores

Con el desarrollo de medicamentos que bloquean eficazmente diferentes componentes del SRA, se han hecho evidentes ventajas terapéuticas para inhibir este sistema en la hipertensión, la insuficiencia cardíaca, y la diabetes, entre otros estados fisiopatológicos. En consecuencia, los inhibidores del SRA han sido un pilar básico para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y renales durante los últimos 30 años. Los principales tratamientos que modulan el SRA se centran en bloquear los componentes del eje AngII/AT1 (Mirabito Colafella et al., 2019; Zaman et al., 2002). Los principales tratamientos que regulan la expresión y actividad del SRA y sus receptores son:

- **Inhibidores de ECA (IECAs)**: Estos medicamentos, al bloquear la ECA a nivel sistémico, disminuyen los niveles de AngII, lo que conduce a una reducción de la presión arterial (Burger et al., 2014). Además, el bloqueo de ECA por parte de IECAs puede ser beneficioso al aumentar los niveles de bradicinina, un péptido con propiedades vasodilatadoras que es capaz de estimular la producción de óxido nítrico, dando lugar a efectos antioxidantes y promoviendo la relajación de los vasos sanguíneos, contrarrestando así los efectos vasoconstrictores de la AngII (Taddei & Bortolotto, 2016).
  Actualmente, existen diversos IECAs en el mercado, como el benazepril, captopril, enalapril, lisinopril y ramipril, cada uno con características farmacocinéticas y farmacodinámicas específicas.
  Además de reducir la presión arterial, los IECA presentan otros beneficios clínicos. Diversos estudios han demostrado que pueden prevenir la hipertrofia ventricular izquierda, mejorar la función cardíaca en pacientes con insuficiencia cardíaca y proteger los riñones del daño en pacientes con diabetes y otras enfermedades renales (Zaman et al., 2002).

- **ARAII**: Los ARAII son una clase de medicamentos que actúan bloqueando específicamente los receptores AT1 de la angiotensina II, evitando así los efectos de la AngII. Estos medicamentos se utilizan ampliamente como tratamiento antihipertensivo y en trastornos cardiovasculares.
  Existen diferentes tipos de ARAII que se clasifican en función de su cinética de unión al receptor AT1:

  - **Antagonistas reversibles**: como losartán, valsartán y eprosartán, que se unen de forma reversible al receptor AT1 y pueden ser desplazados por concentraciones suficientemente altas de AngII (Burnier & Brunner, 2000).
  - **Antagonistas irreversibles**: como irbesartán, candesartán, telmisartán, EXP3174 (metabolito del losartán) y olmesartán. Estos se unen al receptor AT1 con alta afinidad y su disociación es lenta, lo cual significa que no pueden ser fácilmente desplazados por AngII, incluso en concentraciones elevadas (Burnier & Brunner, 2000).

Aunque los ARAII no se unen directamente al receptor AT2, su administración podría aumentar indirectamente la activación de este receptor. Por tanto, Los

ARAII son una alternativa eficaz y bien tolerada a los IECAs, con un perfil de efectos secundarios más favorable. (Zaman et al., 2002).

Aunque estos inhibidores son los más empleados, existen otros inhibidores menos utilizados que actúan sobre distintos componentes del sistema SRA y pueden ofrecer ventajas terapéuticas adicionales. Entre estos se encuentran fármacos agonistas del receptor AT2 y agonistas del eje ECA2/Ang(1-7)/MasR (Mirabito Colafella et al., 2019; Tamargo & Tamargo, 2017).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La EP es una patología neurodegenerativa compleja, caracterizada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc del mesencéfalo, y cuya progresión está asociada a la acumulación y propagación patológica de α-syn en el cerebro. Este proceso, que implica la formación de agregados tóxicos que dan lugar a los LB y la difusión de estos agregados entre regiones neuronales, es un componente clave en el deterioro progresivo de las neuronas dopaminérgicas, y representa uno de los principales objetivos terapéuticos en la investigación actual. Sin embargo, los mecanismos moleculares que impulsan la acumulación y propagación de α-syn permanecen insuficientemente comprendidos, lo que limita el desarrollo de estrategias efectivas para frenar la progresión de la enfermedad.

Entre los factores emergentes en este contexto, el SRA ha demostrado tener un papel relevante más allá de su función cardiovascular tradicional. Se ha documentado la presencia de un SRA local en varios órganos y tejidos, incluido el cerebro, donde puede influir en procesos inflamatorios y oxidativos. Estas funciones vinculan este sistema a diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la EP, actuando como modulador en procesos neurodegenerativos. Se ha observado que la activación del receptor AT1 del SRA por parte de su principal efector, la AngII, está asociada con neuroinflamación, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, condiciones que exacerban el daño neuronal y que podrían estar involucrados en el aumento de los agregados citotóxicos de α-syn. Además, los AT1-AA han sido identificados como un factor de activación persistente de este receptor, lo que sugiere su posible implicación en la exacerbación de la acumulación de α-syn y en el deterioro de las neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, aunque estas conexiones han comenzado a explorarse, el impacto específico de los AT1-AA en la patogénesis de la EP sigue siendo un área de investigación abierta.

Diversos estudios han mostrado que el SRA cerebral también interactúa con varias vías moleculares. Dentro de estas vías, la vía RhoA/ROCK es especialmente relevante, ya que la activación de esta vía contribuye a la inflamación al inducir la producción de radicales libres a través del complejo NADPH-oxidasa, aumentando así el estrés oxidativo. Esto, a su vez, aumenta la expresión del receptor AT1 en la microglía, creando un bucle de retroalimentación que amplifica la neurodegeneración. Además, varios estudios han sugerido que la vía RhoA/ROCK podría estar implicada en la agregación de diversas proteínas, incluida α-syn, dado que inhibidores de esta vía han mostrado efectos beneficiosos sobre la degradación de proteínas mal plegadas.

Sin embargo, a pesar de estos hallazgos y del conocimiento de que el SRA influye en el desarrollo de la EP, el posible impacto de los componentes del SRA sobre la agregación y propagación de α-syn en neuronas y células gliales sigue sin estar completamente definido. Asimismo, la interrelación entre la vía RhoA/ROCK, el SRA y la α-syn representa una vía molecular poco explorada, con un potencial significativo para entender los procesos patológicos subyacentes en la EP. Por ello, sería relevante profundizar en los mecanismos que vinculan la α-syn con el SRA, los AT1-AA y la vía RhoA/ROCK, con el objetivo de comprender cómo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estas rutas moleculares contribuyen a la progresión de la EP. Este enfoque permitiría abordar aspectos clave sobre la patogénesis de la enfermedad y abrir nuevas perspectivas terapéuticas orientadas a interrumpir estas vías. Por tanto, una comprensión más detallada de estas interacciones podría no solo mejorar el conocimiento sobre los procesos neurodegenerativos, sino que también facilitaría el desarrollo de tratamientos más efectivos y adaptados a las necesidades de los pacientes con EP.

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es estudiar las interacciones entre el SRA y los procesos de agregación y transmisión de α-syn en la EP.

Para alcanzar este objetivo principal, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. **Investigar los procesos de agregación intracelular de α-syn en modelos *in vitro* e *in vivo* y analizar cómo el SRA modula esta agregación.**
   - 1.1. Desarrollar y caracterizar modelos de líneas celulares microgliales, astrocíticas y neuronales basados en la sobreexpresión de α-syn para el estudio de la EP.
   - 1.2. Evaluar los efectos de la inhibición del eje AngII/AT1 sobre la agregación de α-syn en células microgliales, astrocíticas y neuronales.
   - 1.3. Analizar los mecanismos implicados en la interacción entre el eje AngII/AT1 y la agregación de α-syn.
   - 1.4. Estudiar los mecanismos involucrados en los procesos de transmisión intercelular de α-syn en células microgliales, astrocíticas y neuronales, y determinar cómo el eje AngII/AT1 afecta a esta transmisión.
   - 1.5. Evaluar la agregación de α-syn en modelos murinos de parkinsonismo neuronal y determinar cómo la inhibición del eje AngII/AT1 influye en este proceso.

2. **Estudiar cómo la vía RhoA/ROCK modula la agregación de α-syn en modelos *in vitro* e *in vivo*.**
   - 2.1. Analizar los efectos de la inhibición de la vía RhoA/ROCK sobre la agregación de α-syn en líneas celulares microgliales, astrocíticas y neuronales.
   - 2.2. Evaluar los mecanismos implicados en los efectos de la inhibición de la vía RhoA/ROCK sobre la agregación de α-syn.
   - 2.3. Determinar cómo la sobreexpresión de α-syn afecta la actividad de la vía RhoA/ROCK.
   - 2.4. Estudiar la agregación de α-syn en modelos murinos de parkinsonismo y analizar cómo la inhibición de la vía RhoA/ROCK afecta este proceso.

3. **Evaluar los efectos de AT1-AA sobre la agregación de α-syn.**
   - 3.1. Investigar los efectos de la estimulación del eje AngII/AT1 por AT1-AA en la agregación de α-syn.
   - 3.2. Analizar los mecanismos implicados en los efectos de AT1-AA sobre la agregación de α-syn.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir los objetivos planteados en esta tesis se diseñaron varios conjuntos de experimentos *in vitro* e *in vivo* en los cuales se estudiaron los efectos de la actividad AngII/AT1 sobre la agregación y transmisión de α-syn, los efectos del inhibidor de ROCK, fasudil, en la agregación de la α-syn y los efectos de AT1-AA sobre la agregación de α-syn.

3.1.1. Experimentos *in vitro*

Para los experimentos *in vitro* (resumidos en la Figura **6**), utilizamos diferentes líneas celulares correspondientes a neuronas dopaminérgicas y células gliales implicadas en la degeneración dopaminérgica: células neuronales dopaminérgicas N27 (SCC048, Merck Millipore) derivadas de tejido mesencefálico de rata (*Rattus norvegicus*), células astrogliales C6 (CCL-107, ATCC) derivadas de glioma de encéfalo de rata (*Rattus norvegicus*), y dos tipos de células microgliales: HMC3 (CRL-3304, ATCC) derivadas de un cultivo microglial primario procedente de cerebro fetal humano y BV2 (ICLC ATL03001) derivadas de glioma extraído de encéfalo de ratón (*Mus musculus*). Además, se utilizaron células HEK293 derivadas de riñón embrionario humano como células control. Las células HEK293 se pueden usar como control positivo para la transfección porque tienen una eficiencia de transfección muy alta (De Los Milagros Bassani Molinas et al., 2014), y también se puede usar como control negativo para los efectos de AngII, ya que las células HEK293 no expresan los receptores AT1 y AT2 (De Los Milagros Bassani Molinas et al., 2014; Rivas-Santisteban et al., 2020).

En un **primer bloque de experimentos**, se evaluaron los cambios en la presencia y cantidad de agregados de α-syn tras los tratamientos con AngII, losartán, inhibidores de ROCK (fasudil e Y27632) y AT1-AA en los diferentes tipos celulares (neuronas, microglía, astrocitos y células embrionarias de riñón humano) utilizando las líneas celulares N27, C6, HMC3 y HEK293 (ver material y métodos, tabla **1**). Para ello, utilizamos microscopía de fluorescencia y un modelo de agregación de α-syn denominado α-sinucleína-T/V5-sinfilina-1 (SynT/Sph1). Este modelo ya se ha utilizado anteriormente para la evaluación de los efectos de diferentes fármacos sobre la agregación de α-syn (Dominguez-Meijide et al., 2021; Lázaro et al., 2014; Masaracchia et al., 2020; Santos et al., 2022; Wu et al., 2019). En nuestro trabajo, este modelo ha sido utilizado para estudiar los efectos de los tratamientos mencionados sobre la agregación de α-syn en diferentes tipos de células. Para este procedimiento, las diferentes líneas celulares fueron transfectadas concomitantemente con plásmidos que codifican α-syn fusionados a una forma truncada de GFP denominada α-sinucleína-T y plásmidos que codifican V5-sinfilina-1. La sinfilina-1 es una proteína que aparece en la parte interna de los LB y su interacción con la α-syn conduce a la formación de inclusiones. V5 es una etiqueta peptídica añadida a la sinfilina-1 para permitir una detección más sencilla mediante inmunofluorescencia (McLean et al., 2001). Para la detección y cuantificación del número de inclusiones dentro de cada célula y el porcentaje de células que presentaban inclusiones, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia (Figura **6a**). A mayores, puesto que, hasta el presente trabajo, la técnica

SynT/Sph1 ha sido empleada casi exclusivamente en células de neuroglioma H4 y células SH-SY5Y, estudiamos la eficiencia de cada una de nuestras líneas celulares para la agregación de α-syn mediante esta técnica. Una vez observada la capacidad de agregación de las distintas líneas celulares, estudiamos los efectos de la actividad de AngII/AT1 en la agregación de α-syn utilizando cuatro grupos experimentales *in vitro*: células de control no tratadas, células tratadas con AngII, células tratadas con el bloqueador de AT1, losartán, y células tratadas con AngII y losartán. El losartán es un bloqueador del receptor AT1 ampliamente utilizado por su eficacia en experimentos *in vitro* en múltiples laboratorios, incluido el nuestro. Por otro lado, estudiamos los efectos de la inhibición de ROCK en la agregación de α-syn utilizando seis grupos experimentales *in vitro*: células control sin tratar, células tratadas con AngII, células tratadas con el inhibidor de ROCK fasudil, células tratadas con AngII y fasudil, células tratadas con el inhibidor de ROCK Y27632 y células tratadas con AngII e Y27632. Además, también estudiamos los efectos de los AT1-AA en la agregación de α-syn en tres grupos experimentales diferentes: células N27 control sin tratar, células N27 tratadas con AT1-AA y células N27 tratadas con AT1-AA y el inhibidor del receptor AT1, losartán. Estos grupos experimentales fueron utilizados a lo largo de la tesis dentro de distintos bloques experimentales. Para los experimentos de agregación utilizamos células microgliales HMC3, ya que su eficiencia para la transfección doble SynT/Sph1 es mucho mayor que la de las células BV2, que presentan una transfección demasiado baja. Sin embargo, las células BV2 mostraron una tasa de transfección adecuada para transfección sencilla con el plásmido de VN-α-sinucleína o el plásmido de α-sinucleína-VC con lo que son adecuadas para experimentos de difusión. Diferentes tratamientos celulares pueden afectar la formación de inclusiones, como afectarían a la formación de agregados fisiopatológicos de α-syn o la formación de LB (Engelender et al., 1999; Wakabayashi et al., 2002). Por tanto, los tratamientos que aumentan el número de inclusiones apuntan a un aumento en la agregación de α-syn, y los tratamientos que disminuyen el número de inclusiones apuntan a una disminución en la agregación de α-syn, lo que puede tener efectos protectores contra la progresión de la EP. La naturaleza de las inclusiones se determinó realizando inmunofluorescencia para comprobar si las inclusiones obtenidas mediante el modelo SynT/Sph1 son efectivamente agregados de α-syn, observando la colocalización de ambas proteínas. Además, utilizamos el marcador de agregación tioflavina S (ThS) para corroborar que las inclusiones son realmente agregados (Figura **6a**). Las tioflavinas T (ThT) y S son colorantes fluorescentes que se unen a estructuras fibrilares amiloides con conformación en lámina beta (Khurana et al., 2005). Así, tiñen las proteínas que presenten estas estructuras, que son características de agregados. Es por eso por lo que la ThS se ha utilizado ampliamente para el estudio de agregados de β-amiloide, tau y α-syn (Wei et al., 2005; Zhou et al., 2022). Por otro lado, se analizaron los cambios en el tamaño de los agregados de α-syn en estas mismas líneas celulares tras los tratamientos con AngII, losartán, fasudil e Y27632, mediante microscopía de fluorescencia y una versión modificada del modelo de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC). El modelo de BiFC desarrollado por primera vez por Lázaro y Outeiro (Gonçalves et al., 2010; Lázaro et al., 2014), utiliza α-syn y sinfilina-1 como proteínas, marcando α-syn con el extremo VC de la proteína de venus y sinfilina-1 con el extremo VN de la proteína de venus (SphVN/SynVC) (Figura **6b**). Cuando dos proteínas, cada una con una mitad de venus, están cerca entre sí y comienzan a interactuar, se produce la reconstitución de la proteína fluorescente venus, que empieza a emitir luz (Figura **6b**). Esto conduce a la formación de inclusiones fluorescentes, cuyo tamaño medimos directamente mediante análisis de imágenes (Dominguez-Meijide et al., 2020; Herrera et al., 2012). Los tratamientos que disminuyen el tamaño de la inclusión de α-syn pueden bloquear los procesos que conducen a la agregación de α-syn o romper los agregados ya formados en otros más

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pequeños. Una disminución tanto en el número de inclusiones como en su tamaño puede indicar un tratamiento protector frente a la progresión de la EP. Además, para confirmar la formación de agregados en los distintos tipos celulares y los cambios en su tamaño realizamos ensayos de sedimentación tras la digestión con diferentes detergentes mediante Western Blot (WB) SDS-PAGE, además de un WB de tricina semidesnaturalizante (SDD-tricina) y un WB en condiciones nativas en células en las que utilizamos el modelo SynT/Sph1 (Figura **6a**) y el método BiFC marcando una α-syn con el extremo VC de la proteína de venus y otra α-syn con el extremo VN de la proteína de venus (VNSyn/SynVC) (Figura **6c**). Los WB de SDD-tricina y en condiciones nativas rompen sólo parcialmente la estructura cuaternaria de las proteínas, lo que permite la observación de oligómeros y polímeros que aparecerán con pesos moleculares más altos que la proteína monomérica.

En un **segundo bloque de experimentos** *in vitro*, se comprobó mediante WB SDS-PAGE si los efectos observados en los experimentos de BiFC y SynT/Sph1 por los tratamientos de AngII, losartán y fasudil, en neuronas, microglía, astrocitos y células embrionarias de riñón humano (ver material y métodos, tabla **1**) no se deben a cambios en la expresión o fosforilación de α-syn. Además, se realizó citometría de flujo para comprobar los posibles efectos de estos tratamientos en la transfección (internalización) de los plásmidos en estas células.

En un **tercer bloque de experimentos** *in vitro,* se estudió la posible transmisión de α-syn entre diferentes líneas celulares (N27, C6 y BV2) y los efectos de AngII y losartán en esta transmisión mediante el uso de cocultivos (a través de transwell) y el recuento de células fluorescentes mediante el método BiFC VNSyn/SynVC y citometría de flujo. Realizamos todas las combinaciones posibles entre estas líneas celulares: N27-N27, C6-C6, BV2-BV2, N27-C6, N27-BV2 y C6-BV2. Para determinar la difusión de α-syn entre los distintos tipos celulares, empleamos una versión modificada del método BiFC. Este método se utilizó para evaluar la transferencia selectiva de α-syn entre diferentes tipos de células al tener células que expresan α-syn fusionada con el fragmento VN en una placa celular que se pone en contacto con células que expresan α-syn fusionada con el fragmento VC sembradas en un transwell, o viceversa (Figura **6c**). Para que haya emisión de fluorescencia deben formarse dímeros de α-syn que permitan la interacción de ambas mitades de venus dentro de una misma célula. Por lo tanto, la liberación y captación de α-syn son necesarias para la emisión de fluorescencia. Puesto que se debe producir transferencia de proteína para que se emita fluorescencia, los cambios en la emisión de fluorescencia en una línea celular, cuando se cultiva junto con una línea celular diferente, señalan cambios en la liberación y captación de α-syn. Una disminución del porcentaje de células fluorescentes indica, bien o una disminución de la captación, o bien un aumento de la liberación de α-syn. Por el contrario, un aumento del porcentaje de células fluorescentes indica un aumento de la captación o una disminución de la liberación de α-syn. Se ha propuesto, aunque está todavía en debate, que la expresión de VN-α-sinucleína es superior a la de α-sinucleína-VC, y que este sistema no debería utilizarse para la medición directa de la agregación (Anexo I, figura suplementaria **15**) (Frey et al., 2021; Outeiro, 2021). Por tanto, empleamos este sistema para la evaluación de la transferencia entre células y en la medición de áreas de fluorescencia, evitando así la medición directa de la agregación. Además, teniendo esto en cuenta, medimos los cambios de transferencia en los fragmentos VN y VC por separado.

En un **cuarto bloque de experimentos** *in vitro*, se estudiaron los posibles mecanismos responsables de los efectos del fasudil en la agregación de α-syn. Así, analizamos posibles

USC DE COMPOSTELA

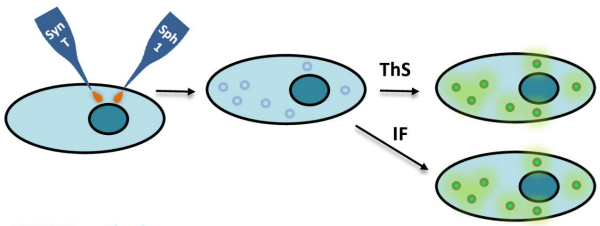
efectos directos de fasudil en la agregación de α-syn mediante interacciones molécula-molécula, realizando una técnica conocida como conversión inducida por agitación en tiempo real (RT-QuIC) (Figura **6d**). En esta técnica, tanto una mezcla de fasudil, α-syn recombinante monomérica y fibrillas preformadas de α-syn (PFFs), como una mezcla de α-syn recombinante monomérica y homogenados de células de la línea neuronal dopaminérgica N27 tratadas con PFFs y/o fasudil fueron sometidos a ciclos sucesivos de agitación y reposo para inducir la agregación de α-syn con el tiempo. Los niveles de agregación se midieron en tiempo real por emisión de fluorescencia de ThT. Posibles interacciones molécula-molécula entre fasudil y α-syn conducen a cambios estructurales en la α-syn, que conducen a cambios en la unión de moléculas de ThT a α-syn, lo que implica a su vez cambios en la estructura de ThT, que empieza a emitir fluorescencia una vez unida a α-syn. Al unirse la ThT solamente a α-syn que se encuentre agregada, un incremento en la señal de fluorescencia implica una mayor cantidad de α-syn agregada. Al irse midiendo estos cambios en tiempo real, se pueden observar cambios en la cinética de agregación. Debido al elevado tiempo que conlleva realizar esta técnica, el proceso se aceleró mediante el empleo de PFFs a modo de semillas o núcleos de agregación. Estas PFFs fueron producidas en nuestro laboratorio como se detalla más adelante.

En un **quinto bloque de experimentos** *in vitro*, se investigó si los efectos de la modulación de SRA y ROCK sobre la agregación de α-syn en neuronas (y en un control de HEK293), pueden estar mediados por la activación del complejo NADPH-oxidasa, y/o por el influjo de calcio. Estos dos experimentos también se realizaron para comprobar si los efectos de los AT1-AA sobre la agregación de α-syn en N27 pueden ser debidos a una activación de la NADPH-oxidasa y/o al influjo de calcio. Estos mecanismos celulares se analizaron utilizando ensayos ya establecidos basados en colorimetría o la transfección celular con siRNA (ARN pequeño de interferencia) gp91phox/CYBB/NOX2 (para la actividad de NADPH-oxidasa) e imágenes de células vivas (para el calcio). Asimismo, examinamos si los tratamientos con fasudil e Y27632 afectan al proceso de autofagia, el cual se sabe que está involucrado en la agregación de α-syn, en HMC3 mediante el uso de WB y un kit comercial para citometría de flujo. Además, para estudiar el efecto del fasudil en la internalización de la α-syn por la microglía llevamos a cabo un experimento de cocultivo directo añadiendo células HMC3 a N27 que expresan α-syn unida a la proteína verde fluorescente mejorada (α-syn-EGFP) para observar los cambios potenciales en la endocitosis mediante la combinación de técnicas de inmunofluorescencia y citometría de flujo (Figura **6e**). Finalmente, para confirmar que los efectos observados en la agregación de α-syn en N27 estaban relacionados con la disminución de la actividad de ROCK inducida por fasudil o por Y27632, realizamos un ensayo para medir la actividad ROCK mediante un kit comercial en N27.

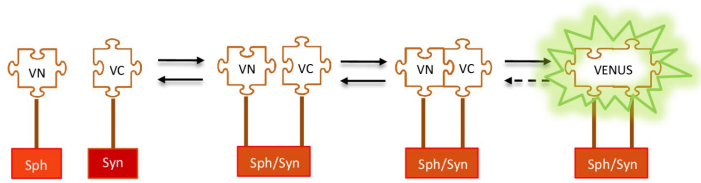
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

In vitro experiments

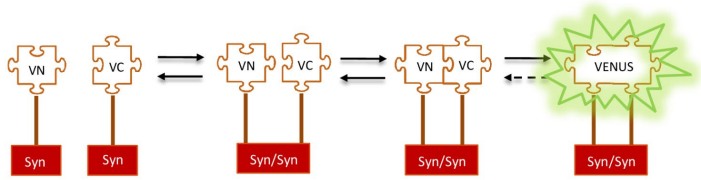
a. Syn T/Sph1 method



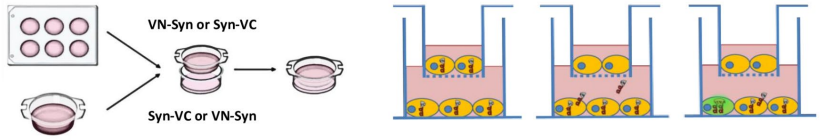
b. Sph1VN/SynVC BiFC method



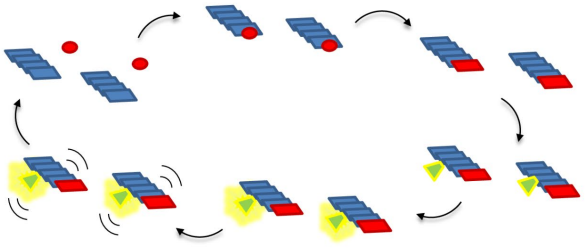
c. VNSyn/SynVC BiFC method



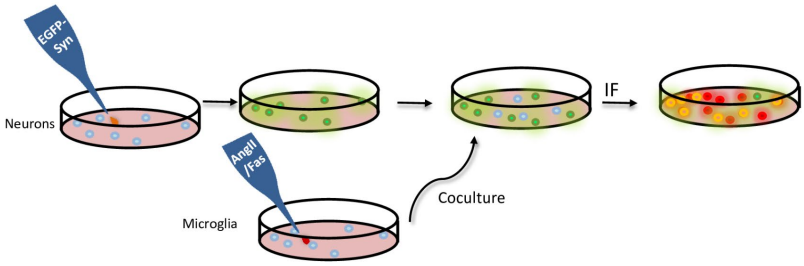
Cell-to-cell transfer



d. RT-QuiC method



e. EGFP method



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 6. Diseño experimental y representación esquemática de los experimentos *in vitro.* **a.** Representación esquemática del método α-sinucleína-T/Sinfilina-1 y tinción con ThS. La expresión concomitante de SynT y V5-Sph-1 conduce a la formación de inclusiones que pueden observarse mediante inmunofluorescencia. La unión de ThS a α-syn agregada conduce a la emisión de fluorescencia, que se utilizó para la caracterización cualitativa de las inclusiones. La unión de SynT y V5-Sph-1 se utilizó para solubilización con detergente, WB SDD-tricina y WB nativo, y para la evaluación cuantitativa de la agregación de α-syn y del porcentaje de células con inclusiones. **b.** Representación esquemática del método BiFC Sinfilina-1-VN/α-sinucleína-VC. La sinfilina-1 marcada con el fragmento VN de venus interacciona con la α-syn marcada con el fragmento VC de venus, dando lugar a la reconstitución del fluoróforo y a la emisión de fluorescencia. Este método se utilizó para la evaluación cuantitativa del tamaño de las inclusiones de α-syn. **c**. Representación esquemática de la técnica BiFC VN-α-sinucleína/α-sinucleína-VC. La α-syn marcada con el fragmento VN de venus interacciona con la α-syn marcada con el fragmento VC de venus dando lugar a fluorescencia. Este método se utilizó para solubilización con detergente, WB SDS-PAGE, WB SDD-tricina, WB nativo y la evaluación de los niveles de transfección por citometría de flujo. Este método fue utilizado también para observar la transferencia célula a célula de α-syn. Las células se cultivan en placas de cultivo y transwells y se transfectan, cada una con diferentes mitades del sistema BiFC VNSyn/SynVC. Los transwells se insertan en los pocillos de las placas de cultivo. La α-syn marcada migra de las células del interior de los transwells a las células del interior de la placa y viceversa, formando dímeros, oligómeros o agregados que pueden reconstituir la fluorescencia del sistema BiFC que se mide por citometría de flujo. **d.** Representación esquemática de la amplificación RT-QuIC. Los pequeños agregados de α-syn se rompen tras la amplificación, creando centros de nucleación (semillas) que incorporan α-syn monomérica, dando lugar a la formación de agregados mayores. La ThT se une a agregados de cierto tamaño, cambiando su conformación y dando lugar a la emisión de fluorescencia. **e.** Representación esquemática de la incorporación de α-syn marcada con EGFP a la microglía. Las células microgliales tratadas con AngII o AngII más fasudil se cocultivan con células neuronales que expresan α-syn marcada con EGFP. A continuación, la α-syn marcada con EGFP se incorpora a la microglía, que es identificada mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo. Abreviaturas: IF, inmunofluorescencia; WB, Western Blot; Sph, sinfilina; Syn, α-sinucleína; ThS, Tioflavina S.

3.1.2. Experimentos *in vivo*

Para los estudios *in vivo* empleamos el modelo murino de parkinsonismo por MPTP. Tras caracterizar la presencia de agregados de α-syn en estos animales (Gibrat et al., 2009; Jethva et al., 2011), se pasó a estudiar los efectos de los ejes AngII/AT1 y RhoA/ROCK sobre la agregación de α-syn. Para ello se establecieron cuatro grupos de tratamiento para estudiar los cambios de los efectos de AngII/AT1: ratones tratados con solución vehículo, ratones tratados con MPTP, ratones tratados con MPTP más el bloqueador de AT1, telmisartán, y ratones *knock-out* para los receptores AT1 (KO AT1) tratados con MPTP. Se establecieron también tres grupos de tratamiento para estudiar los cambios de los efectos de la inhibición de ROCK: ratones tratados con solución vehículo, ratones tratados con MPTP y ratones tratados con el inhibidor de ROCK Y27632 (Pernis et al., 2016). Se realizó una técnica inmunohistoquímica para estudiar la expresión de α-syn y una tinción con ThS para estudiar su agregación. El análisis de imágenes se realizó en las secciones de cerebro mediante microscopía de fluorescencia. Además, para comprobar la naturaleza de los agregados de α-syn, realizamos homogenizados de la SN de ratones controles y MPTP que fueron procesados mediante WB SDS-PAGE y WB SDD-tricina.

3.2. PURIFICACIÓN DE AUTOANTICUERPOS AGONISTAS DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1

Los AT1-AA se obtuvieron del suero de mujeres embarazadas que sufrían preeclampsia. Estas mujeres fueron pacientes del Servicio de Obstetricia del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Todas las pacientes fueron informadas del objetivo y protocolo del estudio y firmaron el correspondiente consentimiento informado. La aprobación

de este estudio se obtuvo del Comité Ético de Investigación de Medicamentos de Galicia (CEIm-G), protocolo 2017/618, y la investigación se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. El aislamiento de AT1-AA a partir de las muestras de suero se llevó a cabo por otros miembros del laboratorio mediante cromatografía de afinidad y posterior cuantificación por volumetría (Pedrosa et al., 2023). La inmunoglobulina G (IgG) antihumana se purificó haciendo pasar un mililitro de suero a través de una columna de purificación específica. Tras este paso, los AT1-AA se separaron de la fracción de IgG humana uniendo el epítopo a la secuencia correspondiente para el segundo bucle extracelular del receptor AT1 (SC1208; Chemical Peptide Synthesis) unido covalentemente al gel activado por Sepharose 4B CNBr (GE17-0430-01; Sigma Aldrich). La IgG unida se eluyó con tampón de glicina 200 mM después de lavar la IgG no unida. El eluido se mantuvo en tampón TRIS-HCl/KCl, y luego se concentró y el tampón se cambió por solución salina tamponada con fosfato (PBS) mediante el uso de un filtro de centrífuga Amicon de 3 kDa (UFC500396, Merck Millipore). La concentración final de AT1-AA se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 252 (Thermo Fisher Scientific). La concentración final usada para el tratamiento de las células fue de 0,1 µg/µL. Todos los experimentos se realizaron con el mismo lote de autoanticuerpos, obtenidos de un reservorio de muestras séricas de pacientes con preeclampsia.

3.3. CULTIVOS CELULARES Y TRANSFECCIÓN

Las células HEK293 se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 10-013-CV, Falcon Corning) con un 10 % de suero fetal bovino activado (FBSa; 35-079-CV, Falcon Corning), 1 % de penicilina 100 U/mL/estreptomicina 100 U/mL (P4333; Sigma Aldrich) y 1 % de fungizona (250 µg/mL; A2942, Sigma Aldrich). Las células HMC3 se cultivaron en medio DMEM con un 10 % de FBSa, 0,5 % de penicilina 100 U/mL/estreptomicina 100 U/mL y 0,5 % de fungizona. Las células C6 se cultivaron en medio F-12K Nut Mix (1X) (21127-022, gibico) con un 2,5 % de FBSa, 15 % de suero de caballo, 0,5 % de penicilina/estreptomicina y 0,5 % de fungizona. Las células BV2 y N27 se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI; R8758-1640, Sigma Aldrich), ambas suplementadas con 10 % de FBSa, 1 % de penicilina/estreptomicina y 1 % de fungizona. Todas las células fueron cultivadas en frascos de 75 cm^2 (353136, Falcon) para cultivos celulares e incubadas a 37 °C y 5 % de CO_2 en un incubador con un 95% de humedad relativa.

Veinticuatro horas antes de la transfección, se sembraron aproximadamente 100000 células por pocillo en placas de 12 pocillos (353043, Falcon) o 200000 células por pocillo en placas de 6 pocillos (353046, Falcon). Para las líneas celulares HEK293, C6 y N27, la transfección se realizó con el reactivo de transfección TRANSIT-X2 (Mirus Bio, Madison, EE. UU.) de acuerdo con el siguiente protocolo: se agregaron 1 µg de ADN total y 2 µL de TRANSIT-X2 a 100 µL de DMEM sin FBSa y la mezcla se dejó incubar por 20 minutos. Para HMC3 y BV2 se transfectó con nanopartículas magnéticas utilizando el reactivo de transfección Glial Mag (OZBioscience, GL00500) de acuerdo con el siguiente protocolo: se agregaron 1 µg de ADN total y 3,5 µL de Glial Mag a 100 µL de DMEM, y se dejaron 30 minutos de tiempo de incubación iniciales. Luego, a esta mezcla se le añadió reactivo Glial Boost (OZBioscience, GL00500) según el siguiente protocolo: 3 µL de Glial Boost por cada µg de ADN añadido. La mezcla resultante se añadió gota a gota a las células y la placa se agitó suavemente. Estas células a las que se añadió la mezcla del reactivo Glial Mag se sometieron a magnetofección utilizando una placa súper magnética (OZBioscience, MF10000) durante 45 minutos para mejorar la introducción del ADN en las células. A continuación, las células se mantuvieron en un

incubador a 37 °C, 5 % de CO_2 y con un 95 % de humedad relativa durante 24/48 horas adicionales. Los plásmidos utilizados para la transfección fueron Sinfilina-1-VN/α-sinucleína-VC, α-sinucleína-T/Sinfilina-1, VN-α-sinucleína/α-sinucleína-VC o α-syn-EGFP. Estos plásmidos fueron clonados en vectores de mamíferos PCDNA3.1+. Los plásmidos originales fueron donados por el Profesor Tiago Outeiro y se prepararon nuevos clonajes de estos siguiendo los protocolos publicados (McLean et al., 2001).

3.4. TRATAMIENTOS CELULARES

Para estudiar los efectos del bloqueo de los receptores AT1 en la agregación de α-syn, se empleó el losartán como fármaco inhibidor de este receptor. Se realizaron los tratamientos en las diferentes líneas celulares de la siguiente manera: 24 horas después de la transfección, las células se alimentaron con medio fresco sin FBSa y se trataron a una concentración final de 10 µM de losartán potásico (Sigma Aldrich, 61188-100MG), repartido de forma homogénea por todo el pozo. Media hora después, las células correspondientes se trataron con 100 nM de AngII (Sigma Aldrich, A9525). A las 24 y a las 48 horas se repitieron los mismos tratamientos y las células se mantuvieron en un incubador a 37 ºC, 5 % de CO_2 y con un 95% de humedad relativa. Veinticuatro horas después del tercer tratamiento, las células se procesaron para el experimento correspondiente. El impacto del influjo de calcio y la actividad de la NADPH-oxidasa en la formación de agregados de α-syn, se evaluó en células neuronales dopaminérgicas N27 de la siguiente manera: 24 horas después de la transfección, se trataron las células con 50 µM de 2-aminoetil difenilborinato (2-APB; Sigma Aldrich, D9754), un inhibidor del influjo de calcio a través de los canales de potencial transitorio (Naziroğlu, 2011; Villar-Cheda et al., 2017), o con 100 µM de apocinina (Thermo Scientific, 11458653), un inhibidor de la NADPH-oxidasa (Rodriguez-Perez et al., 2015; Stolk et al., 1994). Media hora más tarde, las células correspondientes se trataron con 100 nM de AngII. Veinticuatro y 48 horas después, las células se volvieron a tratar con los mismos fármacos (es decir, apocinina o 2-APB, y AngII) y se mantuvieron en un incubador a 37 ºC, 5 % de CO_2 y con un 95% de humedad relativa. Veinticuatro horas después del tercer tratamiento, las células fueron procesadas para los experimentos correspondientes. Para el experimento del ensayo de calcio, el propio día del ensayo las células fueron tratadas con losartán y AngII inmediatamente antes de la adquisición de las imágenes.

Para estudiar los efectos de fasudil e Y27632 en la agregación de α-syn, las células se trataron de la siguiente manera: 48 horas después de la transfección las células se alimentaron con medio fresco sin FBSa y se trataron con 20 µM de monohidrocloruro de fasudil (LC laboratories. F4660) o con 30 µM de Y27632 (Merck, SCM075). Treinta minutos después del tratamiento con fasudil o Y27632, las células se trataron con 100 nM de AngII. Las células se volvieron a tratar 24 y 48 horas después y se mantuvieron en un incubador a 37 ºC y 5 % de CO_2 con un 95 % de humedad relativa. Veinticuatro horas después del tercer tratamiento, las células fueron procesadas para los experimentos correspondientes. El tratamiento se realizó 48 horas después de la transfección ya que, como se verá en los resultados, el tratamiento con fasudil 24 horas tras la transfección afectaba a la internalización celular del plásmido. Para el experimento del ensayo de calcio, el propio día del ensayo las células fueron tratadas con fasudil, Y27632 y AngII inmediatamente antes de la adquisición de las imágenes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para estudiar el efecto del fasudil en la internalización de la α-syn por la microglía, llevamos a cabo un experimento de cocultivo celular directo. Para ello, cultivamos aproximadamente 200000 células microgliales HMC3 y neuronales N27 por separado en placas de 6 pocillos. Una vez que las células alcanzaron un nivel de confluencia del 70 %, procedimos a transfectar las células N27 con α-syn marcada con EGFP. Simultáneamente, alimentamos las células HCM3 con medio fresco y las tratamos con 20 µM de fasudil. Treinta minutos después del tratamiento con fasudil, las células HCM3 fueron tratadas con 100 nM AngII. Veinticuatro y 48 horas después, las células fueron tratadas de nuevo siguiendo el mismo procedimiento indicado anteriormente. Veinticuatro horas después del último tratamiento, se recogieron las células HCM3 y se añadieron a las células N27 transfectadas. Setenta y dos horas más tarde, se recogieron las células cocultivadas para inmunocitoquímica y su posterior análisis mediante citometría de flujo.

Para estudiar los efectos de AT1-AA, en la agregación de α-syn, veinticuatro horas después de la transfección, las células se alimentaron con medio fresco sin FBSa y se trataron con 10 µM de losartán potásico. Media hora después las células fueron tratadas con 0,1 µg/µL de AT1-AA. Además, como grupo control de muerte celular, un grupo de células fueron tratadas con 20 µM de 6-OHDA (H4381, Sigma Aldrich). Adicionalmente, se incluyó un grupo control tratado con un anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP; 0,1 µg/µL; Z0334, Dako) a modo de anticuerpo "indiferente" para neuronas. El tratamiento con el anticuerpo "indiferente" se realizó a una concentración final de 0,1 µg/µL siguiendo el mismo protocolo que con los AT1-AA. Veinticuatro horas después de los tratamientos, las células fueron procesadas para los experimentos correspondientes. Para el experimento del ensayo de calcio, el propio día del ensayo las células fueron tratadas con losartán y AT1-AA inmediatamente antes de la adquisición de las imágenes.

Para evaluar los efectos del fasudil sobre la agregación de α-syn endógena inducida por PFFs en células neuronales dopaminérgicas, se establecieron cinco grupos de tratamiento en células de la línea N27: un grupo control, un grupo tratado con 1 µM de PFFs, un grupo tratado con 20 µM de fasudil, un grupo tratado con 1 µM de PFFs seguido de 20 µM de fasudil a las 48 h, y un grupo tratado con 20 µM de fasudil seguido de 1 µM de PFFs a las 24 h. Tras 24 h de tratamiento con PFFs, las células fueron sometidas a un lavado con PBS, seguido de 30 segundos en tripsina para eliminar restos extracelulares de PFFs que podrían llevar a resultados falso-positivos. La tripsina fue neutralizada con FBSa y se realizó un nuevo lavado con PBS antes de añadir medio completo (Masaracchia et al., 2018; Vasili et al., 2022). Finalmente, las células fueron recolectadas para realizar el ensayo RT-QuIC tras completar los tratamientos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1. Resumen de los medios de cultivo, reactivos de transfección, tratamientos y técnicas utilizadas en las distintas líneas celulares. Abreviaturas: RPMI, medio Roswell Park Memorial Institute; AngII, Angiotensina II; AT1-AA, autoanticuerpos del receptor de angiotensina II tipo 1; WB, Western Blot; PFFs, fibrillas preformadas de α-syn; RT-QuIC, conversión inducida por agitación en tiempo real.

	Línea neuronal	Línea astroglial	Líneas microgliales		Otras líneas
Línea celular	N27: derivadas de tejido mesencefálico de rata, *Rattus norvegicus*	C6: derivadas de glioma de encéfalo de rata, *Rattus norvegicus*	HMC3: derivadas de un cultivo microglial primario procedente de cerebro fetal humano	BV2: derivadas de glioma extraído de encéfalo de ratón, *Mus musculus*	HEK293: derivadas de riñón embrionario humano
Medio de cultivo	RPMI	F-12K Nut Mix	RPMI	RPMI	RPMI
Reactivo de transfección	TransitX2	TransitX2	Glial Mag + Glial Boost		TransitX2
Tratamientos utilizados	AngII Losartan Fasudil Y27632 AT1-AA Apocinina 2-APB PFFs	AngII Losartan Fasudil Y27632	AngII Losartan Fasudil Y27632	Losartan	AngII Losartan Fasudil Y27632
Técnicas utilizadas	Inmunofluorescencia, WB-SDS, WB-SDD, WB de naturaleza nativa, citometría de flujo, actividad NADPH, medición del influjo de calcio, kit de actividad ROCK, fagocitosis, cocultivo con transwell, RT-QuiC	Inmunofluorescencia, WB-SDS, WB-SDD, WB de naturaleza nativa, citometría de flujo, cocultivo con transwell	Inmuno fluorescencia, WB-SDS, WB-SDD, WB de naturaleza nativa, citometría de flujo, kit y WB-SDS de autofagia, fagocitosis cocultivo con transwell	Cocultivo con transwell	Inmunofluorescencia, WB-SDS, WB-SDD, WB de naturaleza nativa, citometría de flujo, actividad NADPH

3.5. INMUNOFLUORESCENCIA DE CULTIVOS CELULARES PARA CARACTERIZACIÓN, CUANTIFICACIÓN Y TAMAÑO DE LAS INCLUSIONES

Las células transfectadas con α-sinucleína-T y V5-sinfilina-1 que se utilizaron para la caracterización se cultivaron en cubreobjetos de vidrio. Estas células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS; (pH 7,4), se incubaron con ThS al 0,01 % (Sigma Aldrich, T1892) durante 8 minutos y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de eso, se realizaron el bloqueo y la permeabilización de las células durante una hora a temperatura ambiente con 1 % de albúmina de suero bovino ultrapura (BSA; A0100-010, GenDEPOT), 2 % de suero de burro normal (NDS, D9663, Sigma Aldrich) y 1,5 % de Triton X-100 en DPBS. Después de la permeabilización, las células se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo monoclonal de conejo anti-α-sinucleína MJFR1 (1:1500; ab138501, Abcam) y el anticuerpo policlonal de cabra anti-V5 (1:3000; ab9137, Abcam) en DPBS con 1 % de BSA y 2 % de NDS. Los cultivos se lavaron con DPBS y luego se incubaron durante dos horas con los siguientes anticuerpos secundarios fluorescentes: anticuerpo de burro IgG anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 568 (1:200; A10042, Invitrogen de Thermo Fisher) y anticuerpo de burro IgG anti-cabra conjugado con Alexa Fluor 633 (1:200; A-21082, Invitrogen de Thermo Fisher) en DPBS con 1 % de BSA y 2 % de NDS. A continuación, los cultivos se incubaron durante 20 minutos con el colorante de unión al ADN Hoechst 33342 (1:2000 en DPBS; B2261, Sigma Aldrich,) a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con DPBS y los cubreobjetos se montaron con Immu-Mount (9990402, Epredia). Las células se mantuvieron a 4 °C hasta realizar el análisis de imagen como se describe más adelante. Todos los anticuerpos utilizados están resumidos en la Tabla **2** y la Tabla **3**.

Las células transfectadas con VN-sinfilina-1 y α-sinucleína-VC que se utilizaron para medir los tamaños de las inclusiones, se lavaron con DPBS (pH 7,4) y se fijaron con PFA al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación, las células se lavaron tres veces, se incubaron durante 20 minutos con el tinte de unión al ADN Hoechst 33342 (1:2000 en DPBS) a temperatura ambiente, se lavaron tres veces adicionales con DPBS y se mantuvieron en DPBS hasta el análisis. Las células transfectadas con α-sinucleína-T y V5-sinfilina-1 que se utilizaron para la cuantificación de las inclusiones, se lavaron con DPBS, pH 7,4, y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación con PFA al 4 %, las células se bloquearon y permeabilizaron durante una hora a temperatura ambiente con BSA al 1 %, NDS al 2 % y Triton X-100 al 1,5 % en DPBS. Después de la permeabilización, las células se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo monoclonal de conejo anti-α-sinucleína MJFR1 (1:1500) en DPBS con 1 % de BSA y 2 % de NDS. Los cultivos se lavaron con DPBS y luego se incubaron durante dos horas con el anticuerpo secundario fluorescente de burro IgG anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (1:200; A-21206, Invitrogen de Thermo Fisher) en DPBS con 1 % de BSA y 2 % de NDS. A continuación, las células se incubaron durante 20 minutos con el colorante de unión al ADN Hoechst 33342 (1:2000 en DPBS) a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron tres veces con DPBS y se mantuvieron a 4 °C hasta realizar el análisis de imagen como se describe más adelante. Todos los anticuerpos utilizados están resumidos en la Tabla **2** y la Tabla **3**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.6. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES

En el presente estudio se utilizaron ratones (*Mus musculus*) C57BL/6J machos adultos de 8 semanas de edad al comienzo de los experimentos. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE y la Directiva 86/609/CEE y fueron aprobados por el comité de experimentación con animales de la Universidad de Santiago de Compostela (protocolo 15005/15/002). Todos los ratones fueron anestesiados con ketamina/xilazina antes del sacrificio. Los ratones eran ratones de tipo salvaje (WT) o KO AT1.

Los ratones y tratamientos empleados se detallan en la figura **7**. Para el estudio *in vivo* de los efectos de AngII/AT1 y de los efectos de la inhibición de ROCK sobre la agregación de α-syn, utilizamos el modelo murino de parkinsonismo por MPTP (Gibrat et al., 2009; Jethva et al., 2011). En una primera serie de experimentos, para determinar los efectos de AngII/AT1 sobre la agregación de α-syn se establecieron cuatro grupos de tratamiento que comprendían de 6 a 14 animales por grupo. Un primer grupo de ratones WT fue tratado intraperitonealmente con solución salina durante 5 días a modo de control (*n*=13). Un segundo grupo de ratones WT (*n*=14) recibió MPTP (M0896, Sigma Aldrich) por vía intraperitoneal durante 5 días a una dosis diaria de 30 mg/kg. Un tercer grupo de ratones WT (*n*=6) fueron tratados por vía oral con el bloqueador de AT1, telmisartán (5 mg/kg/día, Sandoz), comenzando 14 días antes del inicio del tratamiento con MPTP y finalizando 7 días después del final del tratamiento con MPTP. Un último grupo de ratones, en este caso ratones KO AT1 fue tratado por vía intraperitoneal durante 5 días con una dosis diaria de 30 mg/kg de MPTP. Se empleó telmisartán porque es uno de los bloqueantes de AT1 con mayor capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica, y dosis bajas que no afectan a la presión arterial pueden inducir efectos sobre el SRA cerebral *in vivo* (Rodriguez-Perez et al., 2018; Unger, 2003).

Por otro lado, para confirmar que los efectos en la agregación de la α-syn se relacionan con la inhibición de ROCK, se establecieron tres grupos adicionales de ratones WT que comprendían de 6 a 8 animales por grupo. Un primer grupo de ratones fue tratado con solución salina durante 5 días a modo de control (*n*=6). Un segundo grupo fue tratado con MPTP intraperitonealmente durante 5 días a una dosis diaria de 30 mg/kg (*n*=8). Finalmente, un tercer grupo fue tratado intraperitonealmente con el inhibidor de ROCK, Y27632 (5 mg/kg/día, Sigma Aldrich) (Büyükafşar et al., 2006; Pernis et al., 2016), 30 minutos antes del tratamiento con MPTP durante 5 días (*n*=6).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tras los tratamientos, los cerebros se extrajeron y luego se procesaron para WB, inmunohistoquímica de α-syn y tinción con ThS para observar la formación y naturaleza de los agregados.

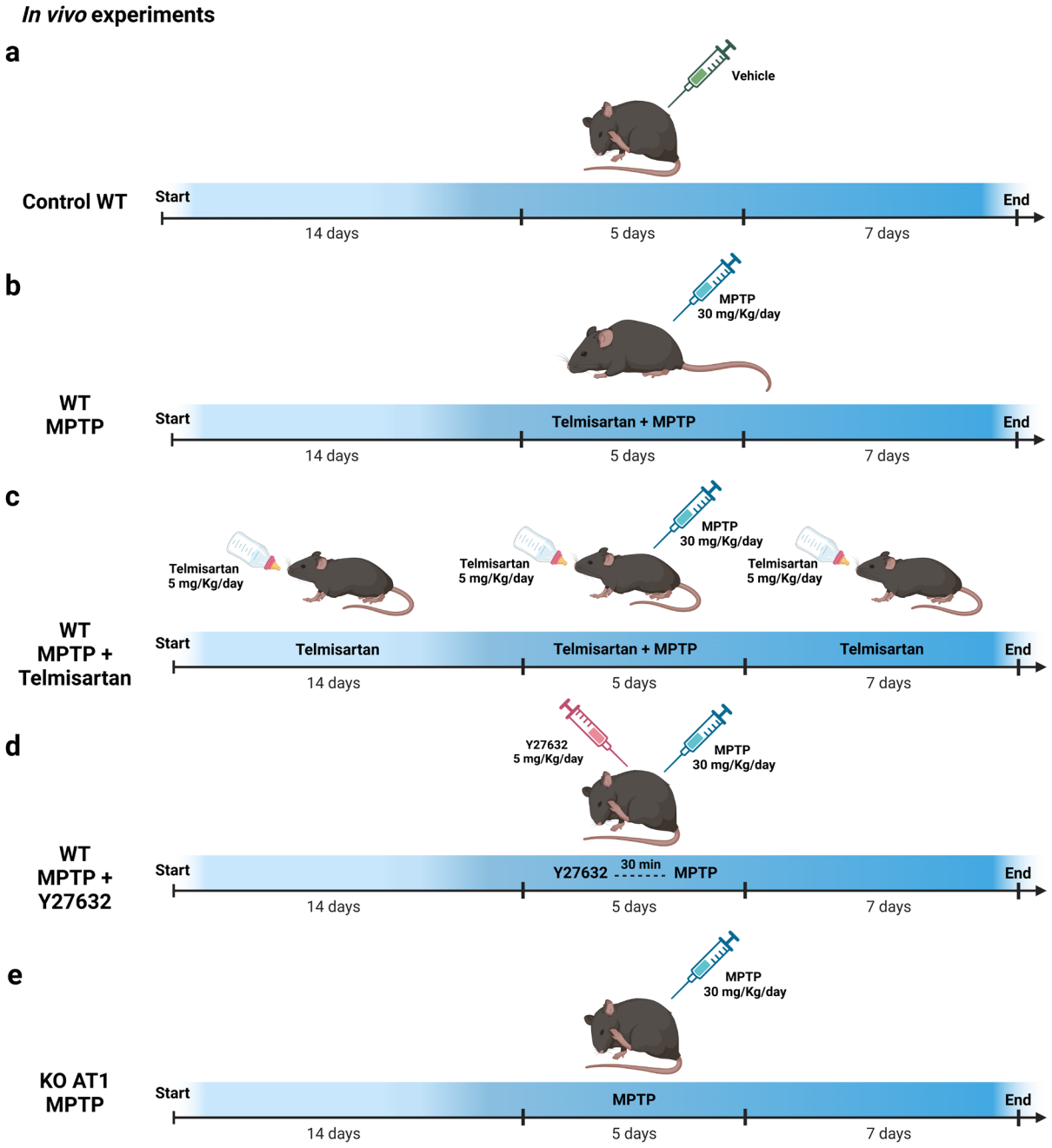


Figura 7. Representación esquemática de los experimentos *in vivo*. a. Ratones WT tratados intraperitonealmente con solución salina utilizados como grupo control para ver los efectos de AngII/AT1 y ROCK sobre la agregación de α-syn. **b.** Ratones WT tratados intraperitonealmente con MPTP para ver los efectos de AngII/AT1 y ROCK sobre la agregación de α-syn. **c.** Ratones WT tratados intraperitonealmente con MPTP y oralmente con el inhibidor del receptor AT1 telmisartan para ver los efectos de AngII/AT1 sobre la agregación de α-syn. **d.** Ratones WT tratados intraperitonealmente con MPTP y con Y27632 para observar los efectos de ROCK

sobre la agregación de α-syn. **e.** Ratones KO AT1 tratados intraperitonealmente con MPTP para observar los efectos de AngII/AT1 sobre la agregación de α-syn. Abreviaturas: WT, tipo salvaje; KO AT1, ratones *knock-out* para los receptors AT1; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina. Figura de elaboración propia con www.biorender.com.

3.7. INMUNOHISTOQUÍMICA EN RATÓN

Los animales se anestesiaron con ketamina/xilazina antes del sacrificio y luego se perfundieron, primero con solución salina al 0,9 % y luego con PFA frío al 4 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4. Los cerebros se extrajeron, se lavaron y se crioprotegieron en el mismo tampón que contenía un 20 % de sacarosa y finalmente se cortaron en un microtomo de congelación con un espesor de 30 µm. Se escogieron secciones de SN y estriado para estudiar los efectos de AngII/AT1 en la agregación de α-syn y secciones de estriado para estudiar los efectos de la inhibición de ROCK en la agregación de esta proteína. Las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución al 0,1 % del marcador de agregación ThS. A continuación, las secciones se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato y potasio (KPBS) 20 mM, se bloquearon y permeabilizaron 1 hora a temperatura ambiente con KPBS 20 mM que contenía 5 % de BSA, 5 % de NDS y 0,3 % de Triton X-100. Luego, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios monoclonales de conejo anti-α-sinucleína MJFR1 (1:500) o de ratón anti-α-sinucleína LB509 (1:500; ab27766, Abcam). Los primarios anti-α-sinucleína se escogieron en función del anticuerpo primario utilizado para el marcaje celular. Para el marcaje celular se utilizaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP; 1:1000; MAB360, EMD Merck Millipore) como marcador de astrocitos, anticuerpo policlonal de conejo contra la molécula adaptadora de unión al calcio ionizada 1 (IBA-1; 1:500; 019-19741, Wako) como marcador de microglía, y anticuerpo monoclonal de ratón contra tirosina hidroxilasa (TH; 1:1000; T2928, Sigma Aldrich) como marcador de neuronas dopaminérgicas. Al día siguiente, las secciones se lavaron tres veces con KPBS 20 mM y posteriormente se incubaron, primero durante dos horas con los correspondientes anticuerpos secundarios: de burro anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 568 (1:100) , de burro anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 647 (1:100; A-31571, Invitrogen de Thermo Fisher), de burro anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 568 (1:100; A10037, Invitrogen de Thermo Fisher) y de burro anti-conejo conjugado de Alexa Fluor 647 (1:100; A-31573, Invitrogen de Thermo Fisher), y luego durante 20 minutos a temperatura ambiente con Hoechst 33342 (3×10^{-5} M en KPBS). Todos los anticuerpos fueron diluidos en una solución con un 5 % de BSA, 5 % de NDS y 0,3 % de Triton X-100. Las secciones se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina y se cubrieron con cubreobjetos utilizando Immu-Mount (9990402, Epredia) como medio de montaje y fueron estudiadas mediante análisis de imágenes como se describe a continuación. Todos los anticuerpos utilizados están resumidos en la Tabla **2** y la Tabla **3**.

3.8. CUANTIFICACIÓN POR MICROSCOPÍA

Para la cuantificación, el análisis de tamaño de las inclusiones y la determinación del porcentaje de células con inclusiones, las fotografías se realizaron en un microscopio de fluorescencia de campo ancho Leica DMI6000B a 40 X con un objetivo seco HC PL Fluotar L ×40/0,60 (referencia 11506201) y una cámara DFC360FX-31202708 con filtros de 460 y 527 nm simultáneamente. Se fotografiaron al menos 30 campos por cada tratamiento y experimento. Posteriormente, las imágenes se analizaron en el software ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/). Para la caracterización de las inclusiones en cultivos de líneas celulares, las fotografías se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

realizaron en un microscopio de fluorescencia Thunder Leica DM4B con un objetivo HC PL fluotar 40 X y una cámara Leica-K5-14401204 con filtros de 460, 527, 630 y 700 nm simultáneamente. Además, también se tomaron fotografías representativas de las líneas celulares mediante un microscopio Confocal Leica TCS SP5 con un objetivo HCX PL CS 63 X. Imágenes de baja magnificación se sacaron en un microscopio de fluorescencia de campo ancho Leica DMI6000B a 20 X con un objetivo seco HC PL Fluotar L ×20/0,40 (referencia 11506242) y una cámara DFC360FX-31202708 con filtros de 460 y 527 nm simultáneamente.

Las imágenes obtenidas se analizaron con el software ImageJ. Inicialmente, se determinaron unos umbrales de intensidad de color para cada imagen. El valor del umbral se determinó de tal forma que las señales por encima del valor umbral de intensidad de color se correspondiesen con las inclusiones fluorescentes. La imagen resultante se utilizó para analizar el tamaño de las partículas directamente con el complemento de análisis de partículas de ImageJ. Luego se asignó un límite inferior de 0,016 μm^2 para el tamaño de las partículas. El propio software ImageJ asigna un valor a las áreas medidas en función de los datos generados por el propio microscopio a través del software Leica Application Suite X (LAS X, Leica). Para la cuantificación de las inclusiones de α-syn de cultivos celulares, las células transfectadas con α-syn se clasificaron además según la presencia o ausencia de inclusiones y los datos se expresaron como porcentaje de células con inclusiones.

Para comprobar la inmunofluorescencia del cerebro de ratón y realizar las fotografías de las secciones, se empleó un microscopio Thunder Leica DM4B con un objetivo HC PL fluotar 40 X y una cámara Leica-K5-14401204 con filtros de 460, 527, 630 y 700 nm simultáneamente. Para la cuantificación de las inclusiones de α-syn en los cerebros de los ratones, la cuantificación del área para cada anticuerpo y la cuantificación de la tinción de ThS, se midieron las áreas de las partículas mediante LAS X e ImageJ, de la siguiente manera: se fotografiaron al menos 30 campos y sometimos las imágenes a un proceso de definido a través de Thunder Imaging en LAS X. El valor umbral de intensidad de fluorescencia para las imágenes se ajustó en ImageJ. La imagen resultante se usó para analizar el tamaño de las partículas directamente con el complemento de análisis de partículas de ImageJ. El valor del área obtenido se expresó como porcentaje del área total de la imagen. Además, también se tomaron fotos representativas de las secciones de cerebro de ratón mediante un microscopio Confocal Leica TCS SP5 con un objetivo HCX PL CS 63 X.

3.9. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

Se empleó WB SDS-PAGE para el análisis de los niveles de expresión y fosforilación de α-syn celular. La proteína se extrajo mediante homogeneización celular con tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA, Tris-Cl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1 % Triton X-100, 1 % SDS, 0,1 % desoxicolato de sodio) complementado con cóctel de inhibidor de proteasas (1:200; P8340, Sigma Aldrich), cóctel de inhibidor de fosfatasas (1:200; P5726, Sigma Aldrich) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF; 1:100; P7626, Sigma Aldrich). Después de la extracción de proteínas, las muestras se sonicaron durante 3 segundos con una amplitud del 10 % y a una temperatura de 25 °C. Después de eso, se calculó la concentración de proteína total mediante el kit colorimétrico Pierce BCA Protein Assay (23225, Thermo Fisher Scientific) y se midió la absorbancia a 525 nm en un lector de placas TECAN infinite M200 Pro (Tecan, Suiza), realizando un análisis cuantitativo a partir de una recta patrón

utilizando diluciones seriadas de la proteína BSA. Se añadió tampón de carga 5X a las muestras y las proteínas se desnaturalizaron con un choque térmico, calentándolas durante 4 minutos a 95 °C. Se separaron cantidades iguales de proteína (15 µg de proteína por pocillo), mediante un gel de bis-tris poliacrilamida al 12 % y a continuación se realizó la transferencia de la proteína mediante una fuente de voltaje (BioRad) a una membrana de nitrocelulosa (0,45 µm; 1620115, BioRad). Las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en solución salina tamponada con Tris (TBS)-Tween20 con un 3 % de BSA. A continuación, se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-α-sinucleína 211 (1:2000; Ab80627, Abcam), el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-α-sinucleína S129 fosforilada (1:2000; Ab59264, Abcam) y con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-β-actina (1:10000; A2228, Sigma Aldrich) como control de carga. Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces con TBS y fueron incubadas durante una hora por el anticuerpo secundario fluorescente de burro anti-ratón IRDye 680LT (1:20000; 926-68022, LI-COR) y el anticuerpo secundario fluorescente de burro anti-conejo IRDye 800CW (1:20000; 926-32213, LI-COR). Todos los anticuerpos se diluyeron en TBS-Tween20 con 3 % de BSA. Las membranas fueron lavadas una vez con TBS-Tween20 y cuatro veces con TBS y la inmunofluorescencia se visualizó con un sistema de detección de fluorescencia (Molecular Imager ChemiDoc MP imaging System, BioRad). El color rojo se asignó a IRDye 680D y el verde IRDye 800CW. La expresión de proteínas se midió mediante análisis densitométrico de cada banda correspondiente utilizando el software de ImageJ y se expresó en relación con el valor de la banda de β-actina. Los niveles de fosforilación fueron medidos calculando la relación directa entre los niveles de α-syn fosforilada y los niveles de α-syn total. Los datos se normalizaron con los grupos control (a los que se les asignó un valor del 100 %) correspondientes a cada grupo de estudio para comparar las posibles variabilidades entre ambos grupos.

Se realizaron WB SDD-tricina y WB nativo para evaluar la presencia y el tamaño relativo de los agregados de α-syn en los distintos tipos celulares. El WB semidesnaturalizante, específicamente una variación conocida como WB SDD-AGE, se ha utilizado ampliamente para estimar el tamaño de agregados de β-amiloide. En estos tipos de WB las proteínas no se desnaturalizan completamente, manteniendo parcialmente su estructura terciaria y cuaternaria (Drozdova et al., 2020; Kryndushkin et al., 2003; Olsson et al., 2018). Estos tipos de WB suponen un término medio entre el WB SDS-PAGE estándar y el WB nativo, lo que nos permite comprobar la presencia, el tamaño relativo y la fuerza de empaquetamiento de los agregados proteicos, que pueden aparecer como manchas o bandas gruesas de diferentes pesos moleculares. En nuestro caso se realizó una modificación de un protocolo propuesto previamente (Olsson et al., 2018). Después de la cuantificación de la proteína total mediante el kit colorimétrico Pierce BCA Protein Assay, se cargaron lisados celulares previamente diluidos en tampón de carga 2X en geles de tricina al 10 %. La electroforesis se realizó con un tampón que contenía Tris base 0,1 M, tricina 0,1 M y SDS al 0,1 %. A continuación, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con una solución del 3 % de BSA en TBS-Tween20 durante una hora a temperatura ambiente y se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-α-sinucleina 211 (1:2000) a 4 °C. Después de tres lavados con TBS-Tween20, las membranas se incubaron durante una hora adicional con el anticuerpo secundario de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP; 1:5000; P0260, Dako) o con el anticuerpo secundario fluorescente de burro anti-ratón IRDye 680LT (1:20000). Todos los anticuerpos se diluyeron en una solución al 3 % de BSA en TBS-Tween20. Después de la incubación el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron una vez con TBS-Tween20 y cuatro veces con TBS y se revelaron en un sistema de

detección de quimioluminiscencia (Molecular Imager ChemiDoc XRS System, BioRad) o un sistema de detección de fluorescencia dependiendo del anticuerpo secundario usado. Para realizar el WB nativo (no desnaturalizante), después de la cuantificación de la proteína total mediante el kit colorimétrico Pierce BCA Protein Assay, se añadió el tampón de carga 4X (Tris 200 mM pH6,8, glicerol 20 % y azul de bromofenol 0,02 %) al volumen total de las muestras directamente y se cargaron en geles prefabricados Native PAGE (Invitrogen) y la separación electroforética se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo primario y secundario (fluorescente) fueron los mismos que el del WB SDD-tricina y se diluyeron en una solución al 3 % de BSA en TBS-Tween20. Las membranas se revelaron en un sistema de detección de fluorescencia.

El tejido nigral de ratón se lisó con ayuda de un homogenizador (PRO200, KemaKeur) en Tris-HCl 10 mM (pH = 7,4) que contenía SDS al 0,1 %, cóctel de inhibidor de proteasas (1:200), cóctel de inhibidor de fosfatasas (1:200) y PMSF (1:100). El homogenado resultante se centrifugó 20 minutos a 12000 x g y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteína total se midió con el kit colorimétrico Pierce BCA Protein Assay. La absorbancia a 525 nm fue medida en un lector de placas TECAN infinite M200 Pro, y se cuantificaron de igual manera que con las muestras celulares. Las muestras se dividieron en tres grupos diferentes: un grupo para WB SDS-PAGE para la digestión con proteinasa K (pK; *Trichirachum album* P6556, Sigma Aldrich), un segundo grupo para WB SDS-PAGE para la medida de pS129 y un tercer grupo para WB semidesnaturalizante con SDD-tricina.

Para la digestión con pK, se procesaron homogeneizados de tejido nigral de ratón que contenían 20 mg de proteína total con 3 µg/mL de pK a 37 °C a los siguientes tiempos: menos de un minuto, 5, 15 y 30 minutos. Después de cada período, la pK se neutralizó con tampón de carga 5X. Después de esto, las muestras se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos, se cargaron en un gel de bis-tris poliacrilamida al 12 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con una solución al 3 % de BSA en TBS-Tween20 durante una hora a temperatura ambiente y se incubaron durante la noche con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-α-sinucleína 211 (1:2000) y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-β-actina (1:10000) como control de carga. Al día siguiente las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween20 y fueron incubadas durante una hora con los anticuerpos secundarios fluorescentes de burro anti-ratón IRDye 680LT (1:20000) y anti-conejo IRDye 800CW (1:20000). Después de la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron una vez con TBS-Tween20 y cuatro veces con TBS y se revelaron en un sistema de detección de fluorescencia. Para la transferencia de pS129, se añadió tampón de carga 5X a los homogeneizados de tejido nigral de ratón y se hirvieron las muestras a 95 °C durante 5 minutos. A continuación, se cargaron en geles de bis-tris poliacrilamida al 12 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con TBS-Tween20 y 3 % de BSA durante una hora a temperatura ambiente y se incubaron durante la noche con un anticuerpo de conejo anti-α-sinucleína S129 fosforilada (1:2000) y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-β-actina (1:10000) como control de carga. Al día siguiente las membranas se lavaron y fueron incubadas durante una hora con los anticuerpos secundarios fluorescentes de burro anti-ratón IRDye 680LT (1:20000) y anti-conejo IRDye 800CW (1:20000). Después de la incubación con el anticuerpo secundario y de los lavados, las membranas se revelaron en un sistema de detección de fluorescencia. Para la transferencia de SDD-tricina, a muestras que contenían 20 mg de proteína total se les añadió tampón de carga de tricina 2X y se cargaron directamente en geles de tricina al 10 %, como se describió anteriormente. A continuación, se transfirió la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proteína a unas membranas de nitrocelulosa y estas se bloquearon con una solución al 3 % de BSA en TBS-Tween20 durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-α-sinucleína 211 (1:2000) y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-β-actina (1:10000) como control de carga. A continuación, las membranas se lavaron y se incubaron durante una hora adicional con el anticuerpo secundario de conejo anti-ratón conjugado con HRP (1:5000) o con el anticuerpo secundario fluorescente de burro anti-ratón IRDye 680LT (1:20000). Todos los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en una solución al 3 % de BSA en TBS-Tween20. Después de la incubación el anticuerpo secundario y de los lavados, las membranas se revelaron en un sistema de detección de quimioluminiscencia o un sistema de detección de fluorescencia dependiendo del anticuerpo secundario utilizado.

Para medir los niveles de autofagia se realizó WB SDS-PAGE. Para ello, la proteína se extrajo mediante homogeneización celular con tampón RIPA complementado con cóctel de inhibidor de proteasas (1:200), cóctel de inhibidor de fosfatasas (1:200) y PMSF (1:100). Después de la extracción de proteína, las muestras se sonicaron durante 3 segundos a una amplitud del 10 % y una temperatura de 25 °C. A continuación, se calculó la concentración de proteína total mediante el kit colorimétrico Pierce BCA Protein Assay y la medida de absorbancia a 525 nm de la reacción resultante del kit en un lector de placas TECAN infinite M200 Pro. Posteriormente, se añadió tampón de carga 5X a las muestras y las proteínas se desnaturalizaron con un choque térmico, calentándolas durante 4 minutos a 95 °C. Se cargaron 15 µg de proteína en cada pozo, se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida bis-tris al 15 % y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno, PVDF, preactivadas en metanol. Las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en 3 % de BSA en TBS-Tween20 y a continuación se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-LC3b-I/LC3b-II (1:500; #12741, Cell signaling) durante una noche a 4 °C y contra el anticuerpo primario monoclonal de ratón contra β-actina (1:10000) durante una hora a temperatura ambiente. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron con TBS-Tween20 y se incubaron durante una hora más a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios de burro fluorescentes anti-ratón IRDye 680RD (1:20000) y anti-conejo IRDye 800CW (1:20000). Tanto los anticuerpos primarios como los secundarios se diluyeron en 3 % de BSA en TBS-Tween20. A continuación, las membranas se lavaron una vez con TBS-Tween20 y cuatro veces con TBS y se visualizaron en un sistema de detección de fluorescencia. Los niveles de expresión de LC3b-II y LC3b-I se determinaron y se normalizaron con respecto al valor de la banda β-actina. Los resultados se expresaron como la relación entre LC3b-II y LC3b-I. Todos los anticuerpos utilizados están incluidos en las tablas **2** y **3**.

3.10. SOLUBILIDAD EN TRITON-X Y SDS

Para determinar las fracciones solubles en Triton-X y SDS de la proteína total, las células se recogieron en un tampón que contenía 1 % de Triton X-100 en Tris 50 mM y NaCl 150 mM (pH 7,6) con inhibidores de proteasas (1:200), fosfatasas (1:200) y PMSF (1:100). Las soluciones resultantes se dejaron a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos y a continuación, se sonicaron tres veces durante 3 segundos al 10 % de intensidad. Después de la sonicación, las muestras se centrifugaron a 14000 x g durante 10 minutos y se recogieron los pellets y los sobrenadantes. A continuación, los pellets se disolvieron en tampón SDS que contenía SDS al 1 % en Tris 50 mM y NaCl 150 mM (pH 7,6) con inhibidores de proteasas (1:200), fosfatasas (1:200) y PMSF (1:100). Las muestras se centrifugaron nuevamente a 14000

x g durante 10 minutos y se recogieron los nuevos pellets y sobrenadantes resultantes. Finalmente se disolvieron los pellets en 100 µL de tampón SDS. A todas las fracciones obtenidas se les añadió tampón de carga 5X y se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. A continuación, se cargaron en geles de poliacrilamida al 12 % para WB SDS-PAGE para luego transferir la proteína a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en TBS-Tween20 con un 3 % de BSA y después se incubaron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-α-sinucleína 211 (1:2000), se lavaron con TBS-Tween20 y se incubaron dos horas adicionales al siguiente día con el anticuerpo secundario fluorescente de burro anti-ratón IRDye 680LT (1:20000). Todos los anticuerpos se diluyeron en una solución al 3 % de BSA en TBS-Tween20. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, se realizó un lavado con TBS-Tween20 y cuatro lavados con TBS, la inmunofluorescencia se visualizó con un sistema de detección de fluorescencia. Todos los anticuerpos utilizados están incluidos en las tablas **2** y **3**.

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y WB. Abreviaturas: TH, Tiroxina Hidroxilasa; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; Iba-1, molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1.

Antígeno	Especie	Tipo	Dilución	Casa comercial/ referencia
α-sinucleína MJFR1	Conejo	Monoclonal	1:1500	Abcam/ ab138501
α-sinucleína LB509	Ratón	Monoclonal	1:500	Abcam/ ab27766
α-sinucleína 211	Ratón	Monoclonal	1:2000	Abcam/Ab80627
α-sinucleína S129 fosforilada	Conejo	Policlonal	1:2000	Abcam/ Ab59264
V5	Cabra	Policlonal	1:3000	Abcam/ab9137
β-actina	Mouse	Monoclonal	1:10.000	Sigma/A2228
GFAP	Ratón	Monoclonal	1:1000	EMD Millipore/ MAB360
IBA-1	Conejo	Policlonal	1:500	Wako/ 019-19741
TH	Ratón	Monoclonal	1:1000	Sigma Aldrich/ T2928
LC3b-I/LC3b-II	Conejo	Monoclonal	1:500	Cell signaling/ #12741

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados en inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y WB. Abreviaturas: IgG, inmunoglobulina de tipo G; HRP, peroxidasa de rábano.

Antígeno	Especie	Dilución	Casa comercial/Referencia
IgG conejo Alexa Fluor 488	Burro	1:200	Thermo Fisher Scientific/ A-21206
IgG conejo Alexa Fluor 568	Burro	1:200	Thermo Fisher Scientific/ A10042
IgG cabra Alexa Fluor 633	Burro	1:200	Thermo Fisher Scientific/ A-21082
IgG ratón Alexa fluor 647	Burro	1:100	Invitrogen de Thermo Fisher/ A-31571
IgG ratón Alexa fluor 568	Burro	1:100	Invitrogen de Thermo Fisher/ A10037
IgG conejo Alexa fluor 647	Burro	1:100	Invitrogen de Thermo Fisher/ A-31573
IgG ratón IRDye 680LT	Burro	1:20000	LI-COR/ 926-68022
IgG conejo IRDye 800CW	Burro	1:20000	LI-COR/ 926-32213
IgG ratón conjugado con HRP	Conejo	1:5000	Dako/ P0260

3.11. PREPARACIÓN DE FIBRILLAS PREFORMADAS

Las PFFs se prepararon basándose en métodos publicados previamente (Fares et al., 2016; Polinski et al., 2018; Volpicelli-Daley et al., 2014a). Para prepararlas, la α-syn recombinante (abcam, ab51189) se diluyó en PBS hasta una concentración de 30 µM y se agitó a 750 rpm durante 8 días. La formación de PFFs se midió mediante la emisión de fluorescencia de ThT y mediante un ensayo de sedimentación de la siguiente manera: para la emisión de fluorescencia de ThT, se tomaron muestras antes de empezar el proceso de agitación, a los 4 días y a los 8 días. Una vez pasado el proceso de agitación, estas muestras se diluyeron en 100 µL de PBS hasta una concentración de 7 µM. Inmediatamente, se añadió ThT a las diluciones hasta una concentración final de 10 µM y la mezcla resultante se cargó en placas negras de 96 pocillos (COSTAR, Corning Incorporated), y se midió la emisión de fluorescencia en un lector de placas TECAN Infinite M200 Pro a una longitud de onda de 480 nm. Para el ensayo de sedimentación, las muestras recogidas se diluyeron 1:10 en PBS y se centrifugaron a 10000 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron los sobrenadantes y los pellets se resuspendieron en 60 µL de PBS. A continuación, se añadieron 12 µL de tampón de carga Laemmli 5X tanto a los sobrenadantes como a los pellets resuspendidos. Todas las preparaciones se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12 %, y se realizó SDS-PAGE. Después de la electroforesis, los geles de poliacrilamida se tiñeron con la tinción de Coomassie, se decoloraron y se fotografiaron. Las PFFs formadas se congelaron y se guardaron a -80 °C hasta su uso en la RT-QuIC. Inmediatamente antes de empezar la RT-QuIC, las PFFs se descongelaron

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y se sonicaron durante 1 minuto a una intensidad del 30 % con pulsos de un segundo encendido, un segundo apagado.

3.12. CONVERSIÓN INDUCIDA POR AGITACIÓN EN TIEMPO REAL (RT-QuIC)

Las células utilizadas para el experimento de RT-QuIC fueron recogidas y su proteína se extrajo mediante homogeneización celular con tampón RIPA, complementado con cóctel de inhibidor de proteasas (1:200) y PMSF (1:100). Después de la extracción de proteínas, se calculó la concentración de proteína total mediante el kit colorimétrico Pierce BCA Protein Assay, midiéndose la absorbancia a 525 nm en un lector de placas TECAN infinite M200 Pro, realizando un análisis cuantitativo a partir de una recta patrón utilizando diluciones seriadas de la proteína BSA.

Los análisis de RT-QuIC se realizaron basándose en un método descrito anteriormente (Dominguez-Meijide et al., 2021). Las reacciones se realizaron en placas negras de 96 pocillos (COSTAR, Corning Incorporated) en las que se cargaron 100 µL de las mezclas de reacción preparadas en microtubos de baja adhesión (4092.3NS, Deltalab). Las concentraciones finales para cada componente de la mezcla de reacción fueron las siguientes: 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 20 µM de ThT, 70 µM de SDS, 70 µM de α-syn monomérica y 0,7 µM de PFFs en tampón PBS. Se añadió fasudil a 20 µM. Algunas reacciones se realizaron con 40 µM de fasudil, añadido en dos tiempos, justo antes de iniciar la reacción y 20 horas después de que la reacción comenzara. Las placas se cubrieron con cinta de sellado (Axygen UC-500, Corning) y se incubaron a 41 °C en un lector de placas TECAN Infinite M200 Pro con ciclos intermitentes de agitación, que consistieron en un minuto de agitación orbital a 432 rpm seguido de dos minutos de incubación y un minuto de pausa para medir la intensidad de fluorescencia de ThT a 480 nm. Se midieron dos réplicas de cada muestra a lo largo de 750 ciclos de amplificación (aproximadamente 50 horas).

3.13. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN (^{1}H-RMN)

La resonancia magnética nuclear de protones (^{1}H-RMN) se realizó en un sistema de resonancia magnética Bruker DRX-500 (Bruker, Alemania). Las muestras, tanto antes como después de someterse a la RT-QuIC se disolvieron en agua deuterada (D_2O) con una pureza del 99.9 % (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA).

3.14. DIFUSIÓN DE α-SINUCLEÍNA Y TRATAMIENTOS CELULARES

Para el estudio de la difusión de α-syn, se utilizaron filtros de membrana de PET transparente permeable para placas de 6 pocillos, denominados transwell (353090, Falcon; diámetro de poro de 400 nm y ancho nominal de 10 µm). A continuación, se sembraron 200000 células tanto en el interior de los transwells como en los pozos de las placas. Una vez que las células adquirieron una confluencia del 70 %, se transfectaron, bien con el plásmido BiFC VN-α-sinucleína, o bien con el plásmido α-sinucleína-VC. Aproximadamente 72 horas después de la transfección, se cambiaron los medios de cultivo en los transwells y en los pocillos de la placa, y los transwells se colocaron en el pocillo de la placa correspondiente para que se produjera la difusión de α-syn entre células. Inmediatamente después de colocar el transwell en su pozo correspondiente las células se trataron con 10 µM de losartán potásico añadido gota a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

gota; media hora más tarde, las células correspondientes se trataron con AngII 100 nM. Veinticuatro y 48 horas después, las células se trataron nuevamente y se mantuvieron en un incubador a 37 ºC, 5 % de CO_2 y con un 95 % de humedad relativa. Veinticuatro horas después del tercer tratamiento, las células fueron procesadas para citometría de flujo.

3.15. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para evaluar la transfección y la transmisión de la α-syn en las distintas líneas celulares, se trataron las células con tripsina para levantarlas de los pocillos, y a continuación la tripsina fue neutralizada con medio FBSa. Tras varios lavados, la suspensión celular se centrifugó a 200 x g 5 minutos, el sobrenadante se descartó y el pellet se lavó tres veces con PBS para finalmente resuspenderlo en PBS + FBSa al 5 % y mantenerlo en hielo hasta el análisis. Se contaron 10000 eventos para cada medida en un citómetro de flujo personal BD Accuri C6 Plus. La selección inicial de la población celular se llevó a cabo en base a los valores de dispersión FSC/SCC (Anexo I, figuras suplementarias **2**, **9**). Las células seleccionadas se dividieron además en células positivas y negativas para fluorescencia. Las células positivas se definieron como células con una intensidad de fluorescencia de venus superior a 98000, 100000 o 120000 RFU, según los valores de intensidad de fluorescencia de los controles negativos y positivos para cada tipo de célula en todos los experimentos (Anexo I, figuras suplementarias **3**, **4**, **10**). Las muestras se analizaron utilizando el software BD CSampler plus. La normalización se realizó asignando un valor de 100 al promedio de la fracción de células positivas en las mezclas entre células del mismo tipo. Posteriormente, a las mezclas entre diferentes tipos celulares y tratamientos con AngII se les asignó su correspondiente valor percentil en relación con las mezclas entre células del mismo tipo. En los experimentos de transwell, las células sembradas dentro de transwells y las células sembradas dentro de los pocillos de las placas se analizaron por separado. En este experimento, las células positivas y negativas se definieron como se ha descrito previamente (Anexo I, figuras suplementarias **5-7**).

En los experimentos de endocitosis de incorporación de α-syn en estos tipos de células, las células microgliales se identificaron mediante inmunocitoquímica, realizada antes de la citometría de flujo. Para llevar a cabo la inmunocitoquímica, se empleó un anticuerpo anti-IBA1 (1:500) como marcador de microglía. El anticuerpo secundario correspondiente utilizado fue el anticuerpo de burro anti-conejo Alexa Fluor 647 (1:100). Se realizó citometría de flujo activada por fluorescencia utilizando un citómetro de flujo Becton Dickinson (BD) FACSCaliburTM (10000 eventos analizados por medida, filtros a 530 nm para EGFP y 670 nm para Alexa Fluor). Inicialmente, se realizó una primera selección para separar los desechos de las células reales basándose en los parámetros FSC y SSC (Anexo I, figura suplementaria **11**). Seguidamente, se realizó una segunda selección para identificar células positivas, definiéndose como positivas las células con valores por encima de 100 RFU para 670 nm y 75 RFU para 530 nm (Anexo I, figura suplementaria **11**). Las muestras se analizaron utilizando el software FlowJo 10.8.

Para las mediciones de autofagia se utilizó un kit de ensayo de autofagia fluorescente rojo (AB270790-1001, Abcam) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células HMC3 se recolectaron en tripsina, se lavaron con PBS y se marcaron con la sonda fluorescente del kit. Las células se incubaron a 37 °C durante 2 h con la sonda, se centrifugaron a 200 x g, se lavaron nuevamente 3 veces con PBS y se resuspendieron en el tampón incluido en el kit. Las

USC DE COMPOSTELA

mediciones de fluorescencia se realizaron utilizando un citómetro Beckman Coulter Cytoflex (10000 eventos analizados por medida, filtros a 610 nm para rojo y 525 nm para EGFP). Se realizó una primera selección para separar los desechos de las células reales basándose en los parámetros FSC y SSC. A continuación, se realizó una segunda selección para identificar células positivas para autofagia, definiéndose como positivas las células con valores por encima de 800000/1800000 RFU para 610 nm (Anexo I, figura suplementaria **12**).

3.16. TRANSFECCIÓN Y TRATAMIENTOS DE ARN PEQUEÑO DE INTERFERENCIA (siRNA)

Para la transfección de siRNA, las células N27 ya transfectadas para el modelo BiFC SphVN/SynVC o SynT/Sph1 se dejaron crecer durante 24 horas o hasta alcanzar el 80 % de confluencia. Después de esto, las células se transfectaron con el siRNA gp91phox/CYBB/NOX2 (Santa Cruz, sc-61838) y el reactivo de transfección TRANSIT-X2 siguiendo las instrucciones del fabricante. Veinticuatro y 48 horas después, las células se trataron con AngII 100 nM. Veinticuatro horas más tarde, las células fueron procesadas para el experimento correspondiente. El silenciamiento del gen se confirmó mediante WB SDS-PAGE siguiendo las recomendaciones del fabricante (Anexo I, figura suplementaria **8k**).

3.17. MEDICIONES DE ACTIVIDAD NADPH-OXIDASA

Las células N27 y HEK293 se recogieron en PBS y se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos. A continuación, se diluyeron los pellets en tampón Krebs-Hepes con un 0,3 % de inhibidores de proteasas y se homogeneizaron mecánicamente con la pipeta y mediante ciclos de congelación y descongelación para obtener la proteína total. Se analizó la concentración de proteínas de la suspensión resultante utilizando el kit colorimétrico Pierce BCA Protein Assay. La actividad NADPH-oxidasa se midió en 30 µg de proteínas extraídas en presencia de lucigenina (5×10^{-6} mol/L; M8010, Sigma Aldrich) en oscuridad. Tras 15 minutos se añadió el sustrato NADPH (10^{-4} mol/L; N-1630, Sigma Aldrich) y se realizaron las mediciones de luminiscencia cada 15 segundos durante 10 minutos y 40 ciclos con un lector de placas TECAN Infinite M200 Pro. No se detectó actividad enzimática en ausencia de NADPH.

3.18. ACTIVIDAD Rho QUINASA

La actividad de ROCK se midió con un kit de ensayo de actividad de ROCK disponible comercialmente (CellBiolabs, Inc, San Diego, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. Este ensayo es un inmunoensayo enzimático desarrollado para la detección de la fosforilación específica de la subunidad objetivo de la fosfatasa de miosina 1 en Thr696 por ROCK. Las células se recolectaron en un tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM beta-glicerofosfato, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM ortovanadato de sodio, 1 % Triton X-100) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas (1:200). La concentración de proteínas de los extractos se evaluó usando el kit colorimétrico Pierce BCA Protein Assay y se utilizaron cantidades iguales de proteína (20 µg por pocillo); cada muestra se midió por duplicado. Las mediciones de la actividad de fosforilación se realizaron mediante la medición de la absorbancia colorimétrica en un lector de placas TECAN Infinite M200 Pro a una longitud de onda de 450 nm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.19. MEDICIONES DE NIVELES DE CALCIO

Los cambios en el calcio intracelular se determinaron utilizando el sensor Fluo-4 AM calcio (Thermo Fisher Scientific). Las células N27 control y tratadas se incubaron en Fluo-4 AM 5 µM a 37 °C durante 60 min. Después de lavar las células con tampón sin calcio, se analizó la fluorescencia utilizando el microscopio de fluorescencia de campo ancho Leica DMI6000B (excitación de 488 nm, emisión de 520 nm) a 20 X con un objetivo seco HC PL Fluotar L ×20/0,40 (referencia 11506242) y una cámara DFC360FX-31202708. Para estudiar los cambios de calcio intracelular, cada célula se definió como una región de interés (ROI) utilizando ImageJ. Los cambios en la intensidad de la fluorescencia en cada ROI correspondieron a cambios de calcio intracelular y se midieron como el área bajo la curva de fluorescencia relativa normalizada (ΔF) en relación con la fluorescencia basal (período de registro antes de la adición de AngII o AT1-AA).

3.20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La normalidad de las poblaciones y la homogeneidad de las varianzas se comprobaron antes de cada análisis de varianza mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para comparaciones múltiples, se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) cuando el conjunto de datos pasó la prueba de normalidad. A las pruebas ANOVA les siguió la correspondiente prueba *post hoc* basada en la normalidad y homogeneidad de los datos. Las comparaciones por pares se realizaron mediante análisis por test *t* no pareadas o las pruebas no paramétricas correspondientes. Para estudios con dos factores se utilizó un ANOVA de dos vías o el correspondiente test no paramétrico seguido de un análisis *post hoc* de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0{,}05$. Todos los datos se obtuvieron de al menos cuatro medidas independientes y se expresaron como medias ± error estándar de la media. Para la preparación de PFFs, se analizaron los datos de tres medidas independientes y se expresaron como medias ± desviación estándar de la media. Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 8 y con SigmaPlot 11, mientras que los gráficos de puntos de dispersión se realizaron con GraphPad Prism 8.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. RESULTADOS

4.1. LA AGREGACIÓN Y TRANSMISIÓN DE α-SINUCLEÍNA NEURONAL Y GLIAL ESTÁ MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1

A día de hoy, se desconoce si la sobreactivación del eje AngII/AT1 afecta a la agregación y transmisión de α-syn en neuronas y células gliales, por tanto, en el presente trabajo estudiamos cómo la activación del receptor AT1 mediante AngII, y su inhibición con losartán, pueden alterar la naturaleza y cantidad de los agregados de α-syn en neuronas, astrocitos y microglía. El principal efector, tanto del SRA clásico como del SRA cerebral, es la AngII que se une a los receptores AT1 provocando, a nivel cerebral, importantes efectos adversos como la desregulación de la vasoconstricción cerebral y deterioro cognitivo (Ahmed et al., 2018), muerte celular (Zhang et al., 2012), y neuroinflamación (Labandeira-Garcia et al., 2017). Se ha observado que la sobreactivación del eje AngII/AT1 en neuronas y células gliales promueve procesos importantes implicados en la progresión de la EP, como el estrés oxidativo mediante la activación del complejo NADPH-oxidasa (Rodriguez-Pallares et al., 2012), el influjo del calcio intraneuronal (Gebke et al., 1998) y respuestas neuroinflamatorias microgliales (Labandeira-Garcia et al., 2017).

4.1.1. Validación de modelos *in vitro*: presencia de estructuras similares a agregados en células neuronales, microgliales y astrogliales

Para los experimentos *in vitro* realizados para la validación de la formación de estructuras similares a agregados de α-syn, utilizamos la línea celular neuronal N27, la línea celular astroglial C6 y la línea celular microglial HMC3. Además, se utilizaron células HEK293 de riñón humano como células control ya que éstas se pueden usar como control positivo para la transfección debido a su alta eficiencia de transfección (De Los Milagros Bassani Molinas et al., 2014). Asimismo, las HEK293 también se usaron como control negativo para ver los efectos de AngII, ya que estas células no expresan los receptores AT1 y AT2 (Rivas-Santisteban et al., 2020).

Para estudiar la formación de agregados de α-syn, empleamos el modelo de agregación SynT/Sph1 (Figura **8a**) (Lázaro et al., 2014; Masaracchia et al., 2020; Wu et al., 2019). Este modelo se puede utilizar para estudiar los efectos de diferentes tratamientos sobre la agregación de α-syn *in vitro* en diferentes tipos de células, ya que las células expresan un cierto número de estructuras similares a agregados denominadas inclusiones (ver sección material y métodos, apartado 3.1.1 para más detalles). En nuestros experimentos *in vitro*, las inclusiones también se estudiaron utilizando el método BIFC, que permite la visualización directa de las interacciones de proteínas en células vivas. El método BIFC es particularmente adecuado para medir el tamaño de las inclusiones y la transferencia de proteínas de célula a célula. Este método fue desarrollado inicialmente por Lázaro y Outeiro (Gonçalves et al., 2010; Lázaro et al., 2014), etiquetando α-syn con el extremo VC de la proteína venus y sinfilina-1 con el extremo VN de la proteína venus, SphVN/SynVC (Figura **8b**), o etiquetando α-syn con el extremo VC de la

proteína venus o con el extremo VN de la proteína venus, VNSyn/SynVC (Figura **8c**). Cuando dos proteínas, cada una con una mitad de venus, están cerca entre sí y comienzan a interactuar (Figura **8b-c**), los dos fragmentos de la proteína venus pasan a estar lo suficientemente próximos como para que se reconstituya la proteína venus. Esto conduce finalmente a la formación de inclusiones fluorescentes que pueden ser analizadas.

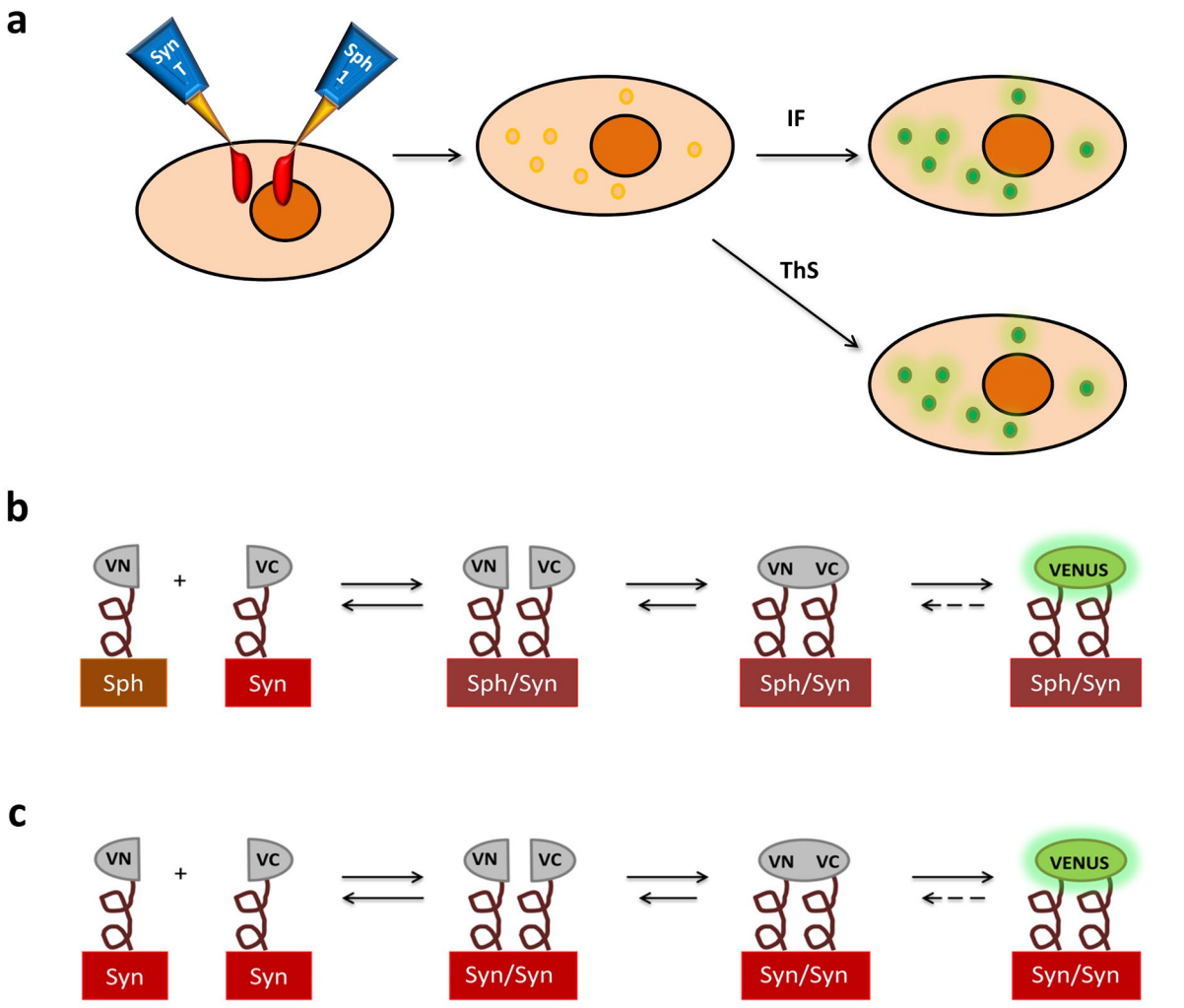


Figura 8. Representación de los experimentos *in vitro* utilizados para estudiar la agregación de α-syn. a. Esquema del método SynT/Sph1 y tinción con ThS para marcar las inclusiones de α-syn mediante inmunofluorescencia. La unión de ThS a α-syn agregada se utilizó para la caracterización cualitativa de las inclusiones (Figura **9a**), y el método SynT/Sph1 para solubilización con detergente, WB SDD-tricina y WB nativo (Figura **9b-h**), y la evaluación cuantitativa de la agregación de α-syn (Figura **10a, b, e, f, i, j, m, o, q, s, u**; **12e, g**; anexo I, figura suplementaria **1**). **b**. Esquema del método BIFC SphVN/SynVC utilizado para la evaluación cuantitativa del tamaño de las inclusiones de α-syn (Figura **10c, d, g, h, k, l, n, p, r, t, v; 12f, h**; anexo I, figura suplementaria **1**). **c**. Método BIFC VNSyn/SynVC utilizado para ensayos de solubilidad en diferentes detergentes, WB SDD-tricina, WB nativo (Figura **9b-h)** y, para la evaluación de los niveles de expresión y fosforilación, WB SDS-PAGE (Figura **11a-h**) y evaluación de los niveles de transfección por citometría de flujo (Figura **11i-l**; anexo I, figuras suplementarias **3**, **4**). Abreviaturas: IF, inmunofluorescencia; ThS, Tioflavina S; Syn, α-sinucleína; Sph, Sinfilina-1.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Como prueba inicial, como el modelo de transfección con α-synT y V5-sinfilina-1 (modelo SynT/Sph1) había sido aplicado fundamentalmente en la línea celular de neuroglioma H4 y en la línea celular neuronal SH-SY5Y (Santos et al., 2022; Wu et al., 2019), comprobamos la eficiencia del modelo en otras líneas celulares, concretamente en las líneas N27 (neuronal), C6 (astroglial) y HMC3 (microglial), empleando células HEK293 como controles debido a su alta eficiencia de transfección, como se indica más adelante. Inicialmente realizamos tinción con ThS combinada con inmunofluorescencia para α-syn y V5 (Figura **9a**). Nuestros resultados mostraron la presencia de inclusiones positivas para ThS, V5 y α-syn en las células neuronales, microgliales y astrogliales, así como en las células control HEK293. Esto confirmó la naturaleza de las inclusiones como agregados y la posibilidad de que estos agregados tengan una estructura similar a LB, ya que se ha propuesto que los LB están compuestos de α-syn mal plegada en el exterior y sinfilina-1 en el interior (Wakabayashi et al., 2002). Además, para verificar la formación de estos agregados, realizamos WB de SDD-tricina (Dominguez-Meijide et al., 2021; Olsson et al., 2018). Nuestros resultados mostraron presencia de oligómeros en las líneas celulares HMC3 y N27, ya que el peso molecular de los monómeros es de 15 kDa para la α-syn endógena y de 23 kDa para el oligómero de α-synT y se observaron especies de mayor peso molecular. También observamos la presencia de oligómeros y de especies de mayor peso molecular en las líneas celulares HEK293 y C6 (Figura **9b-c**).

Además, analizamos la presencia de especies de alto peso molecular mediante un WB nativo no desnaturalizante. En condiciones nativas, nuestros resultados mostraron que las especies de mayor peso molecular están presentes tanto en el modelo SynT/Sph1 como en el modelo BIFC, lo que hace que ambos métodos sean comparables para la evaluación del tamaño de inclusión (Figura **9d**). Además, el WB de muestras digeridas en Triton-X mostraron que independientemente del método utilizado, se pueden observar agregados, y los cambios posteriores en la solubilidad del SDS están más relacionados con la naturaleza de los agregados en las diferentes líneas celulares que con las inclusiones provenientes del modelo SynT/Sph1 o el modelo BIFC (Figura **9e-g**). Se observó que en las células N27 no había señal de α-syn en las fracciones de SDS, lo que indica una naturaleza diferente de las inclusiones en estas células en comparación con las otras líneas celulares (Figura **9h**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

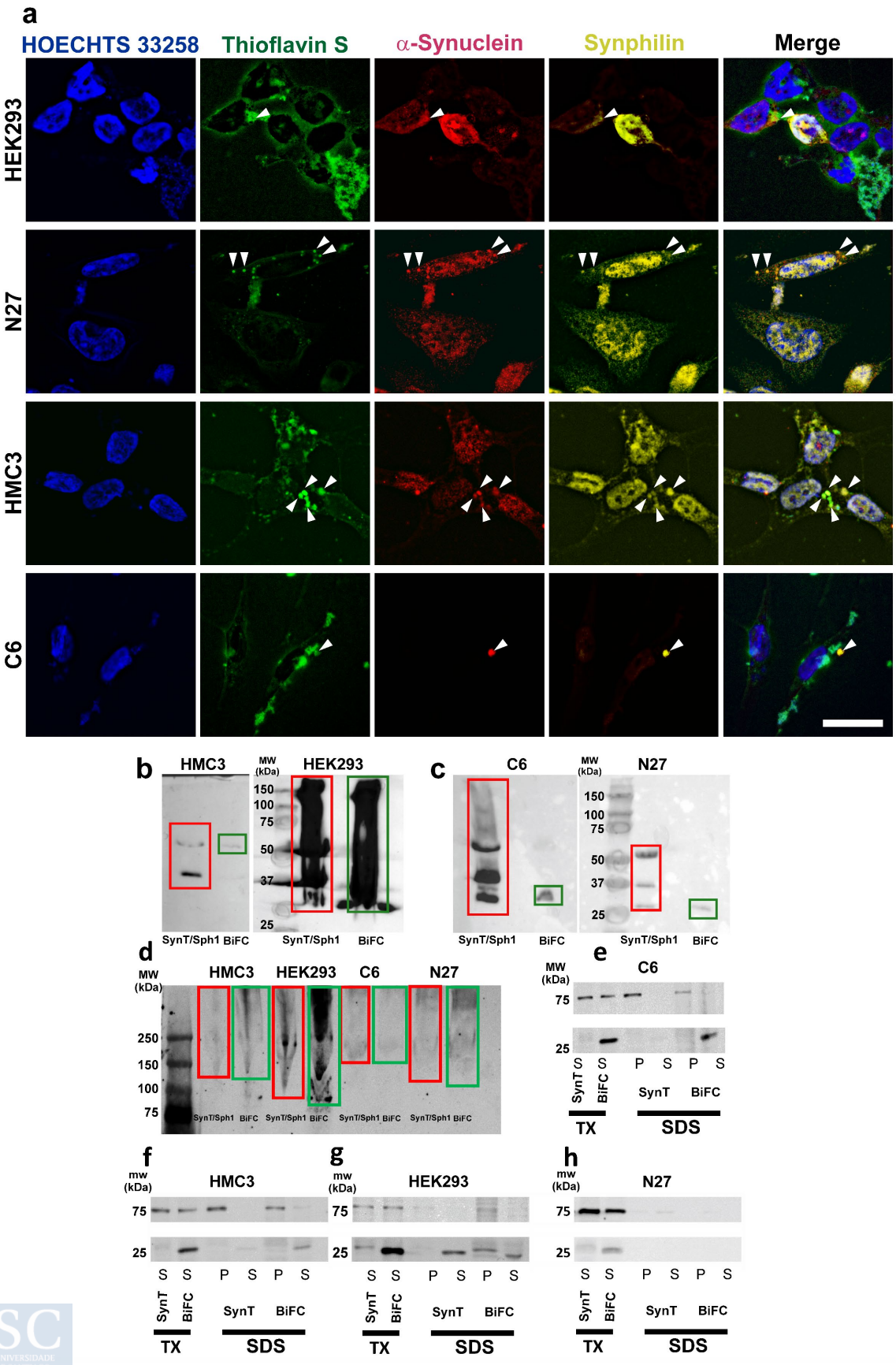

a
HOECHTS 33258
Thioflavin S
α-Synuclein
Synphilin
Merge
HEK293
N27
HMC3
C6
b
HMC3
HEK293
MW (kDa)
150
100
75
50
37
25
SynT/Sph1
BiFC
c
C6
N27
d
MW (kDa)
250
150
100
75
e
f
g
h
mw (kDa)
SynT
BiFC
TX
SDS
S
P

Figura 9. Formación de inclusiones en los métodos *in vitro*. a. Imágenes representativas de células HEK293, N27, HMC3 y C6 que muestran tinción positiva para ThS de agregados (verde) e inmunorreactividad para α-synT (rojo) y V5-sinfilina-1 (amarillo). Las flechas apuntan a posibles estructuras similares a LB. Barra de escala: 15 µm. **b.** Membrana SDD-tricina de células HMC3 (lado izquierdo) y HEK293 (lado derecho) transfectadas con α-synT y V5-sinfilina-1 (SynT/Sph1, rectángulo rojo), VN-α-syn y α-syn-VC (BIFC, rectángulo verde). Las células HMC3 muestran dos bandas de ~40 y 60 KDa cuando se transfectan con α-synT, que pueden estar compuestas de dímeros y trímeros de α-syn. Las células HEK293 muestran un marcaje de diferente peso molecular que oscila entre ~25 KDa y más de 150 KDa. **c.** Membrana SDD-tricina de líneas celulares C6 (lado izquierdo) y N27 (lado derecho) transfectadas con α-synT y V5-sinfilina-1 (SynT/Sph1, rectángulo rojo), VN-α-syn y α-syn-VC (BIFC, rectángulo verde). Las células C6 muestran varias bandas que pueden ser oligómeros. Las células N27 muestran la presencia de posibles monómeros, dímeros y trímeros. **d.** Membrana WB nativo de líneas celulares C6, N27, HMC3 y HEK293 transfectadas con α-synT y V5-sinfilina-1 (SynT/Sph, rectángulo rojo), VN-α-syn y α-syn-VC (BIFC, rectángulo verde). **e**–**g.** Membranas WB SDS-PAGE para ensayos de solubilidad Triton-X y SDS en células C6, HMC3 y HEK293. Los modelos BIFC VNSyn/SynVC y SynT/Sph1 muestran señales solubles de Triton-X de alto peso molecular. **h.** Membranas WB SDS-PAGE para ensayos de solubilidad Triton-X y SDS en células N27. No se ha observado ninguna señal en fracciones solubles en SDS después de la digestión con Triton-X (*n*=4 experimentos independientes). Abreviaturas: SynT, α-sinucleina-T; Sph1, Sinfilina-1; TX, Tritón-X; P, fracción de pellets (insoluble); S, fracción soluble.

4.1.2. Efectos del tratamiento con angiotensina II en el porcentaje de células con inclusiones y en el tamaño medio de las inclusiones en células neuronales y microgliales

Una vez confirmada la naturaleza de las inclusiones, estudiamos los efectos que la activación del eje AngII/AT1 puede tener sobre el número y la naturaleza de las inclusiones en los diferentes tipos de células. Inicialmente, contamos el número de inclusiones formadas y el porcentaje de células con inclusiones con el modelo SynT/Sph1 y el tamaño de inclusión promedio utilizando el modelo BIFC SphVN/SynVC (Figura **10a-l** y anexo I, figura suplementaria **1**). Observamos que en la línea celular de neuronas dopaminérgicas N27, el tratamiento con AngII aumentó significativamente el porcentaje de células que presentan inclusiones, lo que fue inhibido por el tratamiento con el inhibidor del receptor AT1 losartán (Figura **10m**). Además, observamos un aumento significativo en el tamaño promedio de las inclusiones (Figura **10n**). Estos resultados sugieren que AngII induce la formación un mayor número de agregados de α-syn de mayor tamaño en las neuronas dopaminérgicas.

En la línea celular microglial HMC3, también observamos un mayor porcentaje de células que presentan inclusiones y un tamaño de inclusión promedio más alto después del tratamiento con AngII, que es inhibido mediante el tratamiento con el inhibidor del receptor AT1 losartán (Figura **10o-p**), señalando, como ocurre con las células dopaminérgicas N27, la presencia de un mayor número de agregados de α-syn de mayor tamaño. En la línea celular de astrocitos C6, el tratamiento con AngII no indujo cambios significativos en el porcentaje de células que presentan inclusiones ni en el tamaño de las inclusiones (Figura **10q-r**). Esto puede deberse a que los astrocitos son una fuente importante de AngII endógena, que ya está presente en el medio de cultivo, mientras que las neuronas y la microglía no liberan o prácticamente no liberan AngII al medio (ver sección discusión, apartado 5.1.1 para más detalles). En la línea celular HEK293, no observamos ningún cambio significativo después del tratamiento con AngII y/o losartán (Figura **10s-t**), lo cual es de esperar ya que se sabe que las células HEK293 carecen de receptores AT1 (Rivas-Santisteban et al., 2020), lo que confirma la validez de nuestro modelo. Además, los resultados revelaron que, en estas líneas celulares, el tratamiento sólo con losartán no indujo ninguna disminución significativa en el porcentaje de células que presentan

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inclusiones, por lo que este tratamiento estaría actuando únicamente a nivel del receptor AT1, inhibiendo los efectos de la AngII (Anexo I, figura suplementaria **1**).

Una vez estudiado el porcentaje de células que presentan inclusiones y el tamaño de éstas, decidimos analizar la cantidad de inclusiones formadas en cada línea celular utilizando el modelo SynT/Sph1. Nuestros resultados revelaron una cantidad significativamente mayor de inclusiones en las neuronas dopaminérgicas N27, y que las células HEK293 tienen una menor cantidad de inclusiones (Figura **10u**). Además, también analizamos el tamaño promedio de las inclusiones entre estas líneas mediante el método BIFC SphVN/SynVC, observando un tamaño de inclusiones significativamente mayor en las células HEK293 y un tamaño más pequeño en las células N27 (Figura **10v**). En conjunto, todos estos resultados sugieren la formación de un mayor número de agregados de menor tamaño en las neuronas dopaminérgicas y un menor número de agregados de mayor tamaño en las células HEK293, mientras que los agregados de astroglia C6 y microglía HMC3 ocuparon una posición intermedia en tamaño y número.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

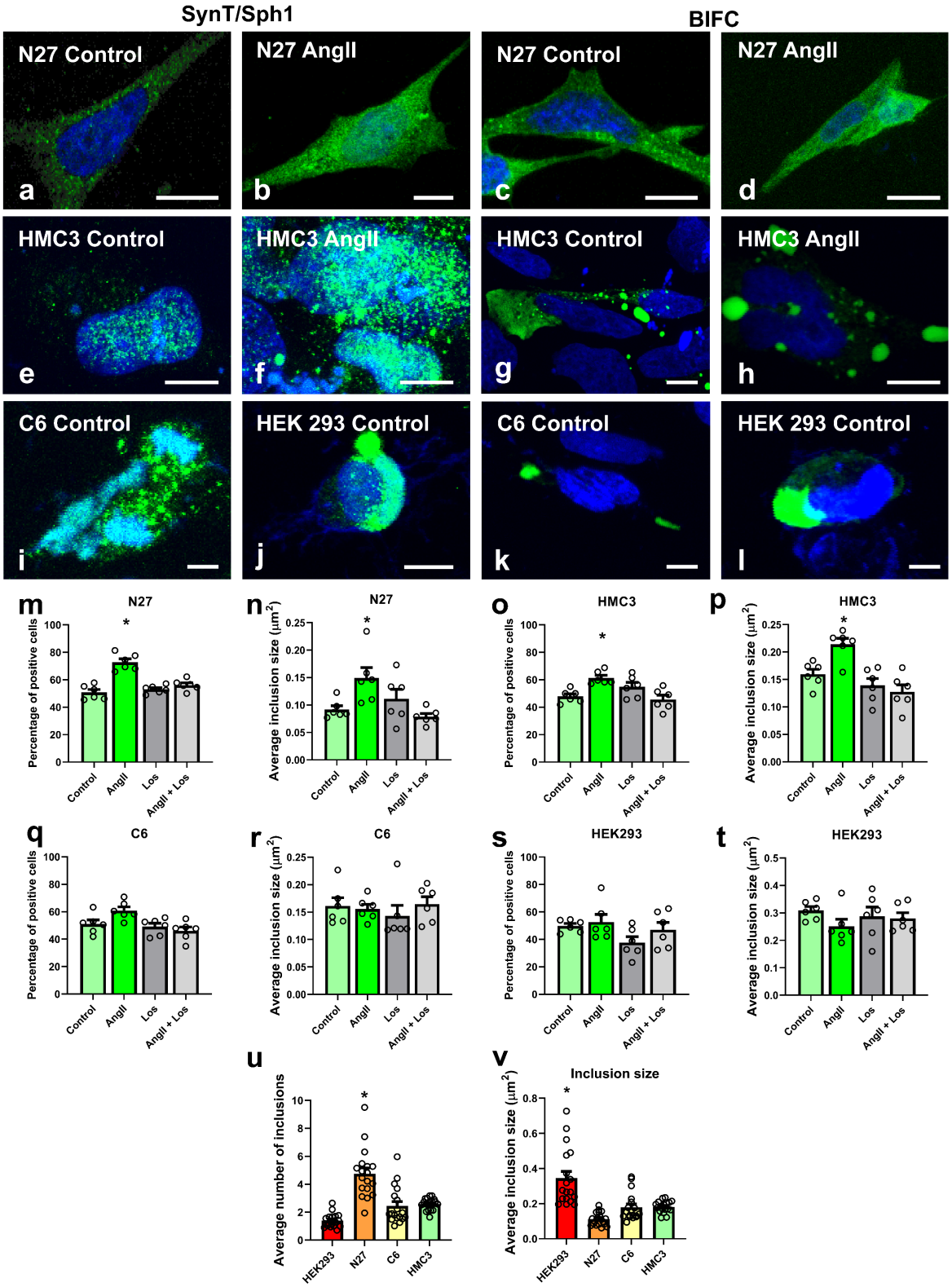

SynT/Sph1
BIFC
N27 Control
N27 AngII
N27 Control
N27 AngII
a
b
c
d
HMC3 Control
HMC3 AngII
HMC3 Control
HMC3 AngII
e
f
g
h
C6 Control
HEK 293 Control
C6 Control
HEK 293 Control
i
j
k
l
m
N27
Percentage of positive cells
n
N27
Average inclusion size (µm²)
o
HMC3
Percentage of positive cells
p
HMC3
Average inclusion size (µm²)
q
C6
Percentage of positive cells
r
C6
Average inclusion size (µm²)
s
HEK293
Percentage of positive cells
t
HEK293
Average inclusion size (µm²)
Control
AngII
Los
AngII + Los
u
Average number of inclusions
HEK293
N27
C6
HMC3
v
Inclusion size
Average inclusion size (µm²)

Figura 10. AngII aumenta el porcentaje de células que presentan inclusiones y el tamaño de las mismas. Las células se transfectaron con el modelo SynT/Sph1 para medir porcentaje de células que presentan inclusiones, y se transfectaron con el modelo BIFC SphVN/SynVC para medir el tamaño de las inclusiones. **a**–**l.** Imágenes de microscopía confocal representativas de las células analizadas. Verde: α-syn; Azul: Hoechst 33342. **m**–**p.** El tratamiento con AngII en células N27 y HMC3 produce un aumento significativo en el porcentaje de células que presentan inclusiones y en el tamaño medio de las inclusiones que es revertido con el tratamiento del inhibidor del receptor AT1 losartán. **q**–**t.** El tratamiento con AngII en células C6 y HEK293 no produce cambios significativos en el porcentaje de células que presentan inclusiones ni en el tamaño medio de las inclusiones. *n*=6 experimentos independientes, se analizaron al menos 30 fotografías por cada tratamiento y experimento. * $p < 0,05$ en relación con los controles. **u.** Las células N27 muestran un número significativamente mayor de inclusiones por célula, como se observa mediante microscopía de fluorescencia utilizando el método SynT/Sph1. **v.** Tamaño promedio de las inclusiones en las diferentes líneas celulares observado mediante microscopía de fluorescencia utilizando el método BIFC SphVN/SynVC. Las células HEK293 muestran inclusiones significativamente mayores que las células N27, C6 y HMC3. *n*=18 experimentos independientes. Cada experimento consta de aproximadamente 30 imágenes analizadas por grupo celular. Barras de escala: 14 µm (**a**–**j**, **l**), 22 µm (**k**). Abreviaturas: AngII, angiotensina II; Los, losartán. * $p < 0,05$ en relación con el resto de las células. ANOVA unidireccional y pruebas de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan SEM.

4.1.3. Papel de angiotensina II y de losartán en los niveles de expresión, fosforilación o transfección de α-sinucleína en los modelos *in vitro*

Para saber si los cambios observados en el porcentaje de células con inclusiones o el tamaño de las inclusiones después del tratamiento con AngII o losartán pueden ser debidos a cambios en la expresión de α-syn, realizamos WB SDS-PAGE de homogenados de células en las que se utilizó el método BIFC VNSyn/SynVC. En las neuronas dopaminérgicas, las células astrogliales, las células microgliales y las células HEK293 transfectadas, no observamos cambios significativos en la expresión de α-syn relacionada con los tratamientos con AngII o losartán (Figura **11a-d**). Además, como la fosforilación de α-syn en la serina 129 puede cambiar la capacidad de la α-syn para formar agregados o su internalización (Kawahata et al., 2022), realizamos dos experimentos adicionales. Primero, medimos mediante WB de fluorescencia los niveles de fosforilación de α-syn después de los diferentes tratamientos. Nuestros resultados no mostraron ningún cambio en los niveles de fosforilación de α-syn en ningún tipo celular (Figura **11e-h**). En segundo lugar, medimos los cambios en la cantidad de células transfectadas mediante citometría de flujo y BIFC VNSyn/SynVC, ya que las células transfectadas serán aquellas que interioricen y expresen ambas construcciones de α-syn. No observamos ningún cambio en el número de células transfectadas, lo que indica que tanto VN-α-syn como α-syn-VC se transfectan y expresan normalmente por las células después de los diferentes tratamientos (Figura **11i-l;** anexo I, figuras suplementarias **2-4**). Por lo tanto, los cambios mencionados anteriormente en el porcentaje de células que presentan inclusiones y en el tamaño de los agregados inducidos por AngII o el inhibidor del receptor AT1 losartán (Figura **10**) no se deben a cambios en las tasas de expresión o fosforilación de α-syn, ni a cambios en los niveles de transfección.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

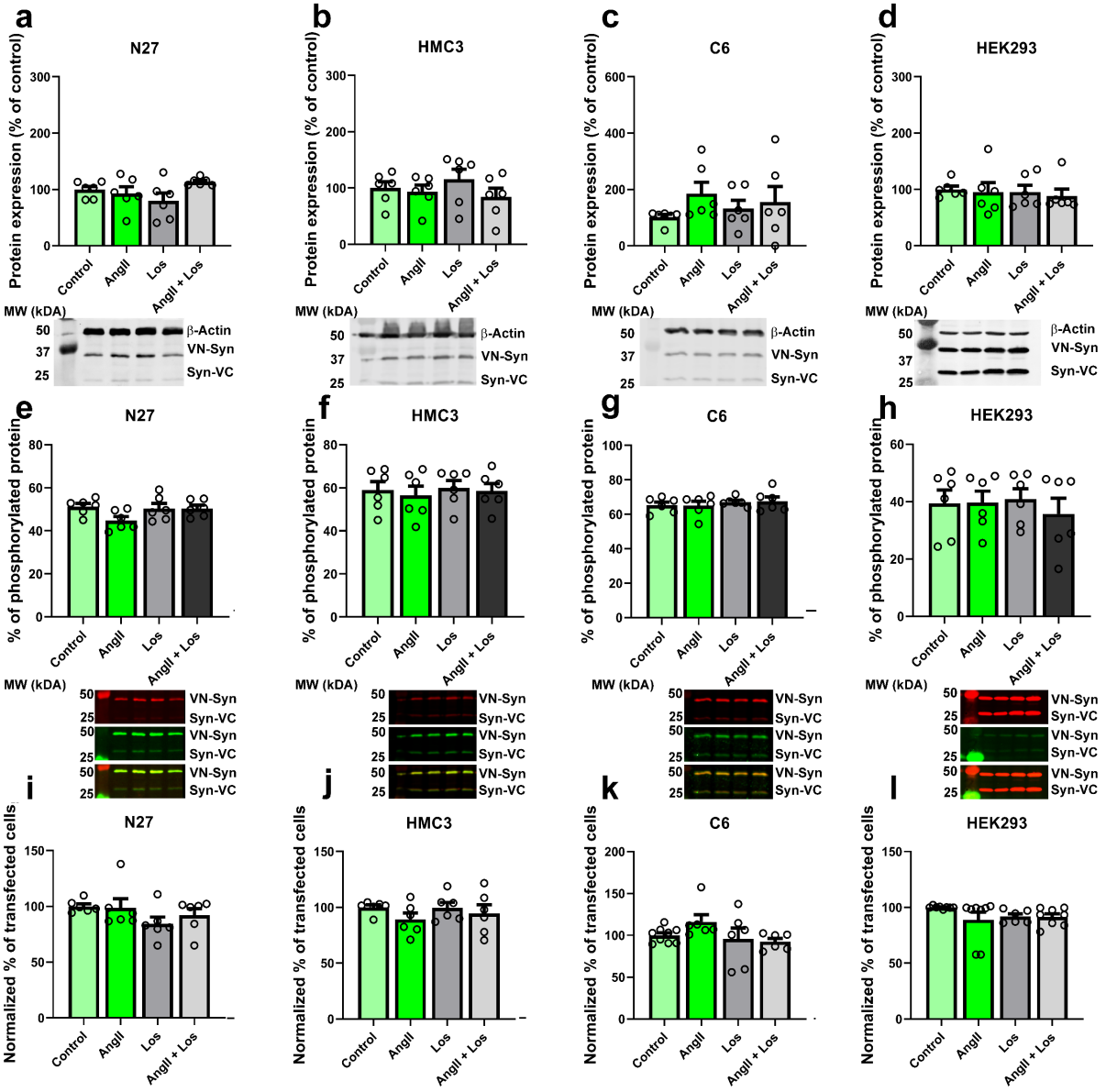


Figura 11. Los análisis de WB no muestran cambios significativos en la expresión de α-syn ni en la fosforilación de α-syn y tampoco muestran cambios significativos en la transfección de α-syn mediante análisis de citometría de flujo. Las células se transfectaron con VNSyn/SynVC para medir tanto la expresión y fosforilación de α-syn como la eficiencia de la transfección. **a**–**d.** Los análisis de WB de células N27, HMC3, C6 y HEK293 con diferentes tratamientos no mostraron cambios significativos en la expresión de la α-syn. *n*=6. **e**–**h.** Los análisis de WB de células N27, HMC3, C6 y HEK293 no mostraron diferencias en los niveles de fosforilación de α-syn debido a los diferentes tratamientos. Verde: α-syn fosforilada. Rojo: α-syn no fosforilada. *n*=6. **i**–**l.** Los análisis de citometría de flujo de los diferentes tratamientos celulares no mostraron ninguna diferencia en la transfección de α-syn para los plásmidos VNSyn y SynVC. *n*=6-8. Abreviaturas: AngII, angiotensina II; Los, losartán. ANOVA unidireccional y pruebas de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan SEM.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.4. Papel de la activación de NADPH-oxidasa y del aumento del calcio intracelular, inducidos por el eje AngII/AT1, en el aumento de la agregación de α-sinucleína

Para entender cómo la vía AngII/AT1 provoca estos cambios en la naturaleza de las inclusiones de α-syn, se estudiaron los niveles de NADPH-oxidasa y de calcio intracelular en la línea dopaminérgica N27. Estudios previos en diferentes tipos celulares han demostrado que los efectos principales del eje AngII/AT1 están mediados por la activación del complejo NADPH-oxidasa, lo que conduce a un aumento de los niveles intracelulares de superóxido y a un aumento del calcio intracelular. Nuestros estudios revelaron que esto también ocurría en nuestro modelo celular. De acuerdo con estudios anteriores, observamos un aumento en la actividad de NADPH-oxidasa en células dopaminérgicas N27 después del tratamiento con AngII, que fue bloqueado tanto por el tratamiento con el inhibidor del receptor AT1 losartán como con el inhibidor de NADPH-oxidasa apocinina (Figura **12a-b**). Además, confirmamos que AngII aumenta el calcio intracelular en las células N27 y que este aumento se bloquea tanto mediante el tratamiento con el inhibidor del receptor AT1 losartán como con el inhibidor del canal de calcio 2-APB (Figura **12c-d**).

El tratamiento con el inhibidor del canal de calcio 2-APB o con el inhibidor de la NADPH-oxidasa apocinina bloqueó los efectos de la AngII en el porcentaje de células que muestran inclusiones y el tamaño promedio de las inclusiones en las neuronas dopaminérgicas N27 (Figura **12e-f**; anexo I, figura suplementaria **1**). Dado que los inhibidores actuales de la NADPH-oxidasa, incluida la apocinina, no son totalmente específicos, confirmamos la participación de la activación de NADPH en los efectos antes mencionados de la AngII sobre las inclusiones de α-syn mediante el bloqueo parcial de la expresión de la subunidad gp91 de la NADPH-oxidasa con siRNA, que también inhibió los efectos de AngII en el porcentaje de células que muestran inclusiones y en el tamaño promedio de las inclusiones en las neuronas dopaminérgicas N27 (Figura, **12g-h**; anexo I, figura suplementaria **1**). Todos estos resultados revelan que el aumento de superóxido derivado de la NADPH-oxidasa y los niveles de calcio intracelular inducidos por la activación de los receptores AT1 son responsables de los efectos mencionados anteriormente del eje AngII/AT1 sobre la agregación de α-syn.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

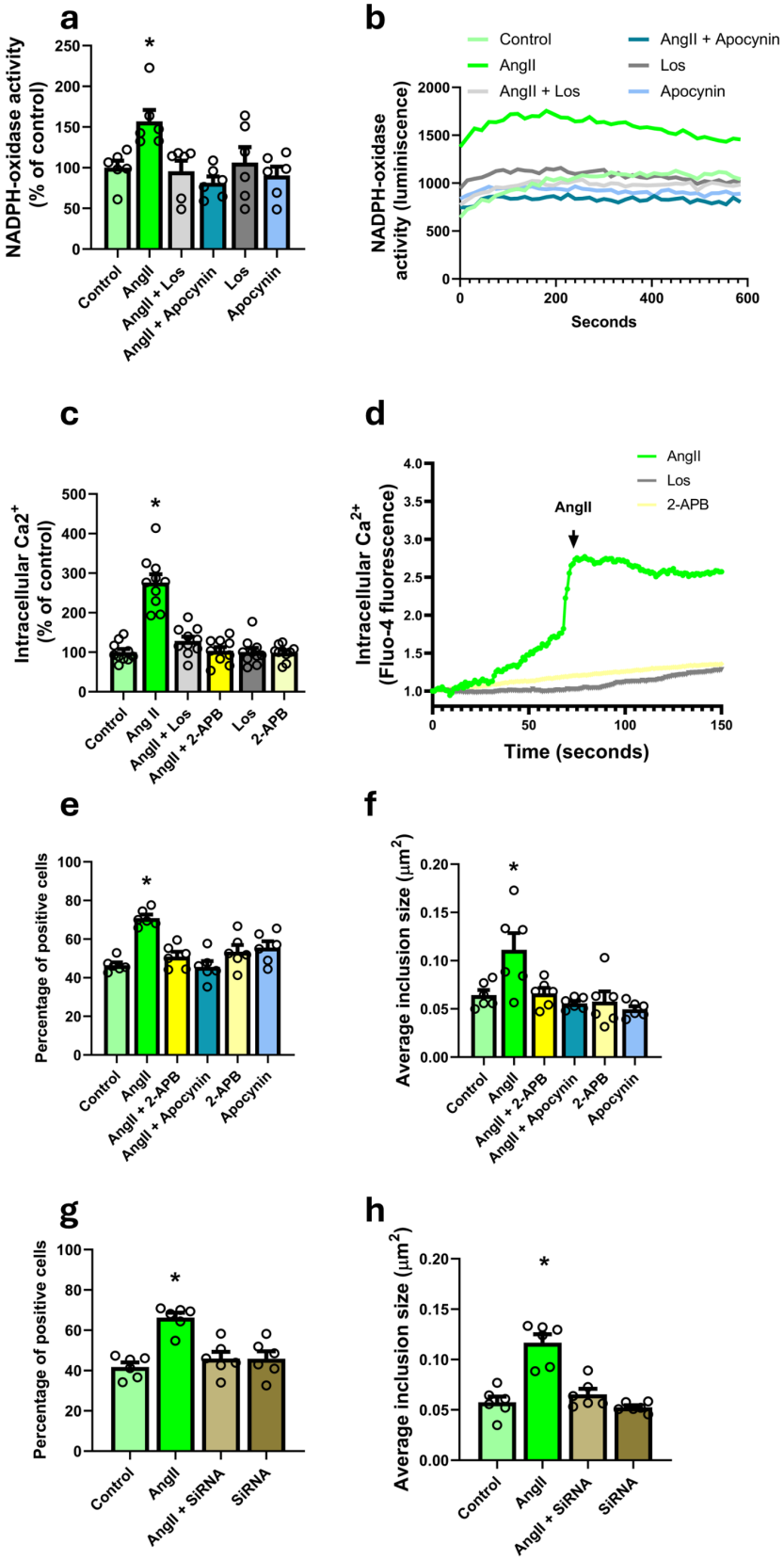

a
NADPH-oxidase activity (% of control)
Control
AngII
AngII + Los
AngII + Apocynin
Los
Apocynin
b
Control
AngII
AngII + Los
AngII + Apocynin
Los
Apocynin
NADPH-oxidase activity (luminiscence)
Seconds
c
Intracellular Ca2+ (% of control)
Control
Ang II
AngII + Los
AngII + 2-APB
Los
2-APB
d
AngII
Los
2-APB
Intracellular Ca2+ (Fluo-4 fluorescence)
Time (seconds)
e
Percentage of positive cells
Control
AngII
AngII + 2-APB
AngII + Apocynin
2-APB
Apocynin
f
Average inclusion size (µm2)
Control
AngII
AngII + 2-APB
AngII + Apocynin
2-APB
Apocynin
g
Percentage of positive cells
Control
AngII
AngII + SiRNA
SiRNA
h
Average inclusion size (µm2)
Control
AngII
AngII + SiRNA
SiRNA

Figura 12. La activación de la NADPH-oxidasa y el aumento del calcio intracelular median el aumento inducido por el eje AngII/AT1 en la agregación de α-syn. a-b. El tratamiento con losartán o apocinina bloquea el efecto de la AngII sobre la activación de la NADPH-oxidasa. *n*=6 mediciones independientes. **c-d.** El tratamiento con losartán o 2-APB bloquea el efecto de la AngII sobre la liberación de calcio intracelular. Para las mediciones de liberación de calcio, se utilizaron *n*=10 células sacadas con un microscopio de campo ancho. Se analizaron regiones individuales de interés para cada imagen. **e-f.** El tratamiento con el inhibidor del influjo de calcio, 2-APB, o con el inhibidor de NADPH-oxidasa, apocinina, bloquea los efectos de la AngII sobre el porcentaje de células con inclusiones y el tamaño medio de las inclusiones en las células N27. **g-h.** El bloqueo parcial de la expresión de la subunidad gp91 de NADPH-oxidasa con siRNA bloquea los efectos de AngII sobre el porcentaje de células con inclusiones y el tamaño medio de las inclusiones en las células N27. *n*=6 experimentos independientes, se analizaron entre 20 y 34 fotografías por cada tratamiento y experimento. Abreviaturas: AngII, angiotensina II; Los, losartán; siRNA, ARN pequeño de interferencia. * $p < 0,05$ en relación con los controles. ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan SEM.

4.1.5. Validación de un modelo *in vivo*: estudio de la agregación de α-sinucleína en ratones tratados con MPTP

Una vez observados los cambios que provoca la modulación SRA en la agregación de α-syn en diferentes modelos celulares, decidimos estudiar si estos cambios también se producían en un modelo *in vivo* murino. Actualmente, los resultados publicados son controvertidos, ya que varios estudios no pudieron observar la presencia de agregados de α-syn en ratones tratados con MPTP (Alvarez-Fischer et al., 2008; Shimoji et al., 2005), mientras que otros estudios sí han informado de la presencia de estos agregados (Jethva et al., 2011; Wang et al., 2022). Estos resultados controvertidos pueden estar relacionados con el curso y las dosis utilizadas en diferentes experimentos (Gibrat et al., 2009). Algunos autores proponen que es la administración crónica de MPTP, y no la aguda o subaguda, en ratones la que da lugar a la formación de agregados de α-syn en astrocitos y neuronas dopaminérgicas (Fornai et al., 2005; Forno et al., 1993; Gibrat et al., 2009; Goloborshcheva et al., 2022; Meredith et al., 2008). Sin embargo, otros autores proponen que el tratamiento crónico a dosis más bajas puede llevar a una menor lesión y a una menor expresión de agregados de α-syn que los tratamientos más cortos a dosis más altas (Gibrat et al., 2009). Dado que esto puede ser un punto de conflicto, se requiere estudiar más este campo a fin de resolver esta controversia. Por tanto, en nuestros experimentos, inicialmente estudiamos mediante microscopía confocal si nuestros ratones C57BL/6J tratados con una dosis subaguda de 30 mg/kg de MPTP durante 5 días presentaban agregados de α-syn. En nuestras imágenes, observamos claramente la presencia de agregados positivos para la tinción con ThS y para la inmunorreactividad con el anticuerpo contra la α-syn, como se muestra en las proyecciones tridimensionales (Figura **13a-b**). Para reforzar más la validez del modelo, realizamos experimentos adicionales en homogeneizados de SN de ratón. Como mencionamos, la α-syn agregada está principalmente fosforilada en la serina 129, por tanto, en nuestros resultados *in vivo*, medimos mediante WB SDS-PAGE los niveles de fosforilación de α-syn en la serina 129 en homogeneizados de SN de ratón. Observamos un aumento en la fosforilación en ratones tratados con MPTP (Figura **13c**; anexo I, figura suplementaria **8j**). Además, realizamos una serie de digestiones de los homogeneizados de SN de ratón con pK mediante WB SDS-PAGE, ya que los agregados más compactos son más resistentes a la digestión con pK. No observamos cambios claros en la resistencia a la digestión con pK entre los ratones control y tratados con MPTP (Figura **13d**) independientemente de la cantidad total de α-syn. Finalmente, de manera similar a nuestros experimentos *in vitro*, realizamos un WB con SDD-tricina, donde observamos una señal más fuerte en especies de alto peso molecular en ratones tratados con MPTP, lo que apunta a mayores cantidades de agregados de α-syn (Figura **13e**). Por tanto, podemos decir que nuestros resultados muestran que, aunque

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

los agregados en sí no están más empaquetados, hay un número significativamente mayor de agregados patológicos de α-syn en el modelo murino de parkinsonismo por MPTP.

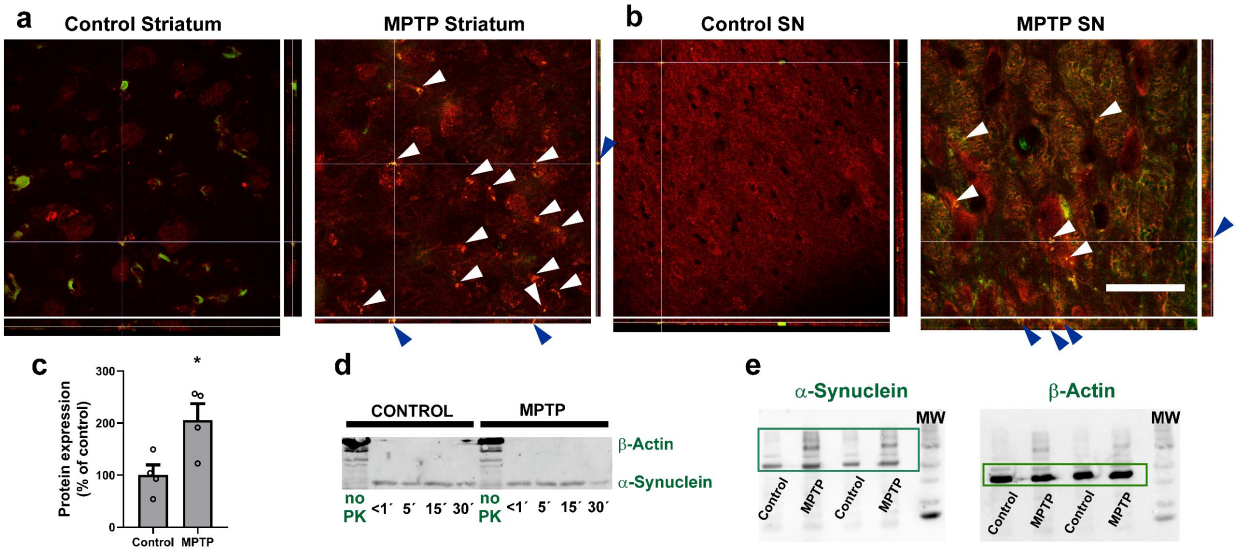


Figura 13. Cuerpo estriado y sustancia negra de ratones control y ratones tratados con MPTP. a-b. El tratamiento con MPTP indujo la formación de inclusiones en el CE (**a**) y SN (**b**), como se observa en las imágenes de microscopía confocal con proyecciones en las tres dimensiones, donde las flechas blancas y azules apuntan a las inclusiones. Barra de escala: 50 µm; Rojo: α-syn. Verde: ThS. **c.** El tratamiento con MPTP condujo a niveles más altos de fosforilación del oligómero de α-syn en la serina 129, medido mediante WB SDS-PAGE. **d.** El tratamiento con MPTP no cambió la resistencia de los oligómeros de α-syn agregada a la digestión con pK, medido mediante WB SDS-PAGE. **e.** El tratamiento con MPTP indujo la formación de especies de mayor peso molecular en SN de ratón como se observó mediante WB con SDD-tricina. Abreviaturas: SN, sustancia negra. * $p < 0,05$ en relación con el control. Prueba *t* de dos colas no apareada (**c**). Las barras de error representan SEM.

4.1.6. Efectos de la modulación de SRA en la agregación de α-sinucleína en ratones tratados con MPTP

Una vez observada la presencia de agregados de α-syn en nuestro modelo murino de parkinsonismo por MPTP, estudiamos los cambios en estos agregados mediante análisis de microscopía de fluorescencia en ratones C57BL/6J tratados sólo con MPTP, ratones tratados con MPTP y el inhibidor del receptor AT1 telmisartán, y ratones KO AT1 tratados con MPTP. Losartán es un compuesto ampliamente elegido como inhibidor del receptor AT1 para experimentos *in vitro*. Sin embargo, el losartán no cruza bien la barrera hematoencefálica, por lo que el telmisartán es más apropiado para modelos *in vivo*, ya que es uno de los inhibidores de AT1 que cruza más eficientemente la barrera hematoencefálica, y dosis bajas que no afectan a la presión arterial pueden inducir efectos sobre el SRA cerebral *in vivo* (Rodriguez-Perez et al., 2018; Unger, 2003).

Analizamos al menos 30 secciones de CE y de SN por ratón en 6 ratones diferentes por grupo experimental. Tanto en el CE como en la SN, los resultados obtenidos del análisis de imágenes mostraron un aumento significativo de los agregados con la tinción con ThS después del tratamiento subagudo con MPTP, que fue inhibido por el tratamiento con el inhibidor del receptor AT1 telmisartán y en ratones KO AT1. Además, observamos un aumento significativo en la expresión de α-syn después del tratamiento subagudo con MPTP, que fue inhibido por el tratamiento con el inhibidor del receptor AT1 telmisartán y en animales KO AT1 (Figura **14a-**

d). Estos resultados confirman, bajo nuestras condiciones experimentales y métodos analíticos, la formación de agregados en el sistema nigroestriatal del ratón, que se combina con un aumento significativo en la expresión de α-syn después del tratamiento subagudo con MPTP, y que la AngII, a través de los receptores AT1, juega un papel importante en este proceso. Además, de acuerdo con nuestras observaciones *in vitro*, observamos la presencia de agregados principalmente en neuronas y terminales dopaminérgicas, pero también en astrocitos y microglía de ratones tratados con MPTP. Realizamos doble inmunofluorescencia para el marcador del tipo celular correspondiente y el marcador de la α-syn combinado con el marcador de agregación ThS. Nuestros análisis mostraron una colocalización de la tinción con ThS y de la α-syn en las neuronas TH positivas de la SN y las terminales estriatales (Figura **14e**). Además, también se encontró que los agregados marcados con ThS y con α-syn colocalizaban con el marcador microglial IBA-1 (Figura **14f**) y el marcador astroglial GFAP (Figura **14g**).

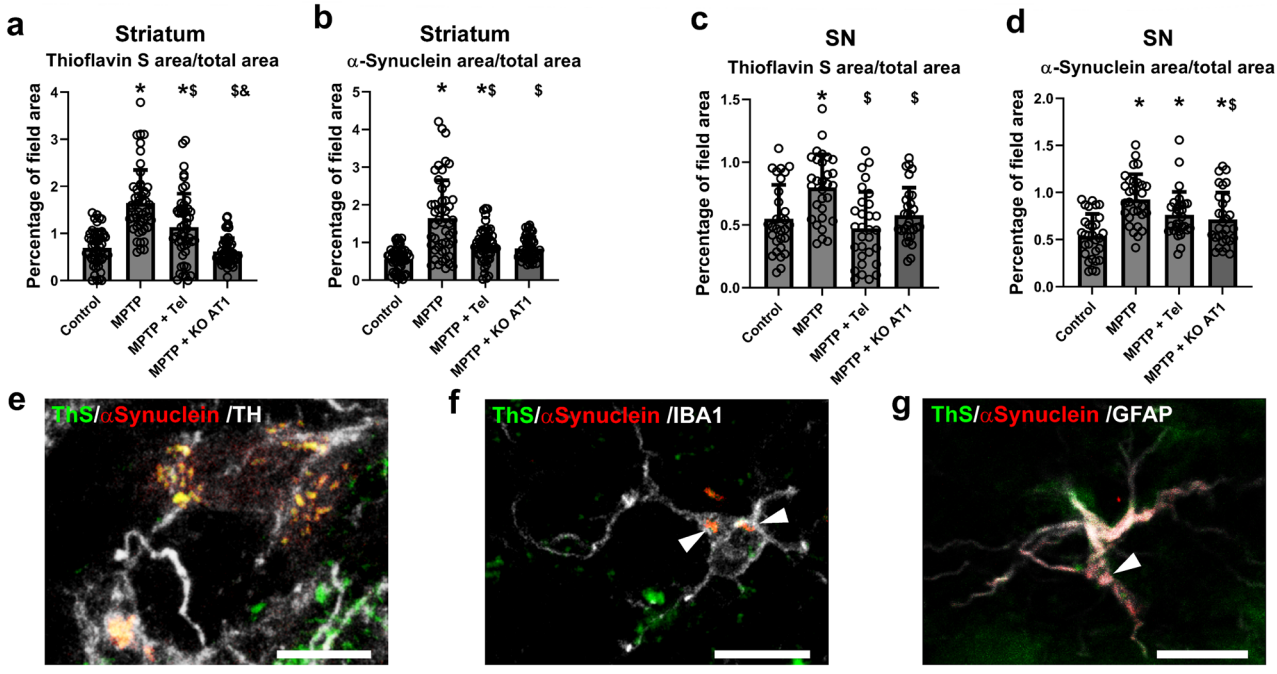


Figura 14. Efectos del RAS en agregados positivos a ThS y en la expresión de α-syn en ratones tratados con MPTP. a-d. El tratamiento con MPTP condujo a un aumento significativo en la tinción positiva de ThS (**a**, **c**) y en la expresión de α-syn (**b**, **d**) en el CE (**a**-**b**) y la SN (**c**-**d**), que fueron inhibidos por el tratamiento con el inhibidor del receptor AT1 telmisartán o en ratones KO AT1. *n*=50 (**a**-**c**) o 30 (**d**) imágenes analizadas. **e-g.** Doble inmunofluorescencia y tinción con ThS de tejido de ratón que muestra la presencia de agregados de α-syn en neuronas dopaminérgicas nigrales (**e**), microglía (**f**) y astrocitos (**g**). Barra de escala: 10 µm. Abreviaturas: Tel, telmisartán; MPTP + KO AT1, ratones *knock-out* para los receptors AT1 tratados con MPTP; ThS, tioflavina S. Rojo: α-syn. Blanco: TH (**e**), IBA-1 (**f**), GFAP (**g**). Verde: ThS agregados. * $p < 0,05$ en relación con el control. \$ $p < 0,05$ en relación con MPTP. & $p < 0,05$ en relación con MPTP + Telmisartán. ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan SEM.

4.1.7. Liberación y captación de α-sinucleína entre diferentes líneas celulares

Una vez estudiada la presencia de inclusiones con estructuras similares a agregados de α-syn y los cambios en su naturaleza debido a los diferentes tratamientos y mecanismos como la activación de la NADPH-oxidasa y el influjo de calcio, estudiamos las diferencias en la liberación y captación de la α-syn entre las distintas líneas celulares. Para estudiar la posible transmisión de α-syn entre diferentes tipos de células (particularmente neuronas dopaminérgicas, células astrogliales y células microgliales), realizamos cocultivos celulares (a través de transwell) y contamos células fluorescentes utilizando el método BIFC VNSyn/SynVC y citometría de flujo (Figura **15**). Utilizando un sistema transwell analizamos cada tipo de célula por separado. Inicialmente evaluamos los niveles de fluorescencia de células que expresan fragmentos VN o VC que se cocultivaron con células del mismo tipo y los establecimos como valores de control. A continuación, procedimos a evaluar mediante citometría de flujo los niveles de fluorescencia de cocultivos entre diferentes tipos de células que expresan fragmentos VN o VC (Figura **16** y anexo I, figuras suplementarias **5-7**).

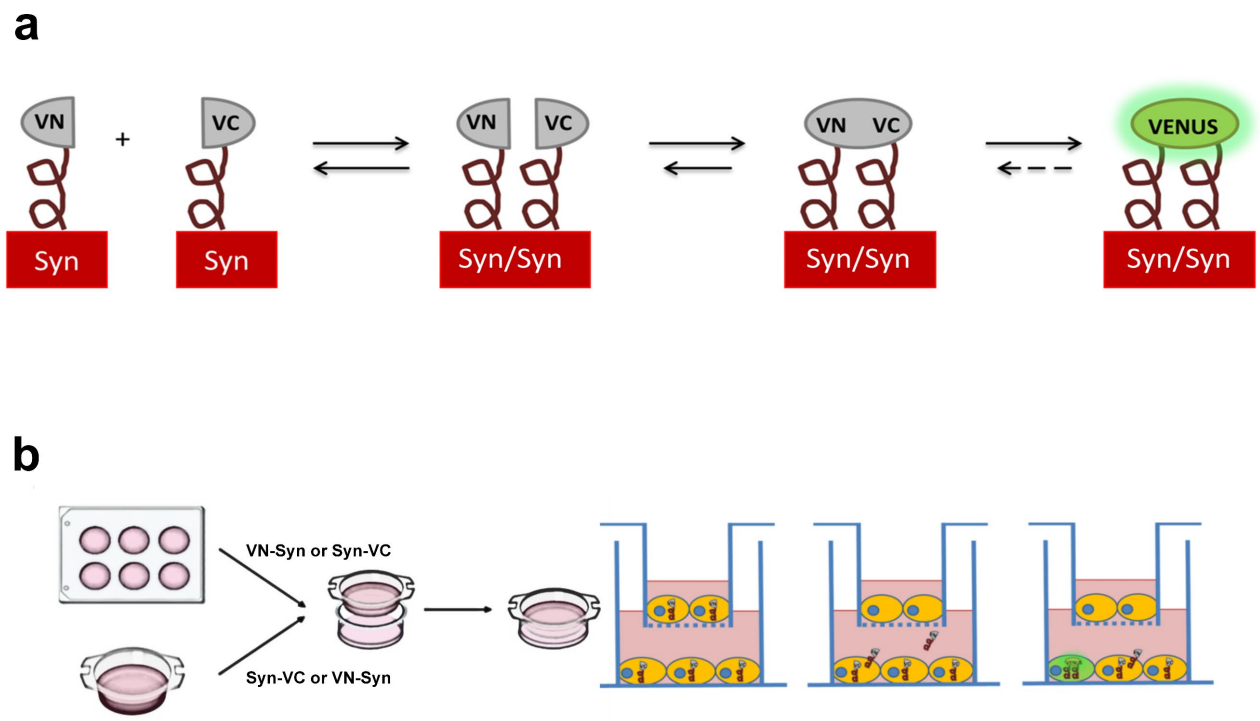


Figura 15. Representación de los experimentos *in vitro* utilizados para estudiar la transmisión de α-syn. a-b. Cocultivo celular mediante transwell para medir la transferencia de α-syn transfectada mediante el sistema BIFC con VN-α-syn en transwell y α-syn-VC en pozo o viceversa. La proteína se une formando dímeros, oligómeros o agregados que pueden reconstituir la fluorescencia del sistema BIFC que se mide por citometría de flujo (Figura **16, 17,** anexo I, figuras suplementarias **5-7**). Abreviaturas: Syn, α-sinucleína; VN-Syn, VN-α-sinucleína; Syn-VC, α-sinucleína-VC.

Para este conjunto de experimentos, utilizamos células microgliales BV2 ya que las células microgliales HMC3 eran menos adecuadas. Las células BV2 muestran buenas tasas de transfección para plásmidos individuales y buena supervivencia en cocultivos. Además, durante la transferencia de célula a célula, como las células BV2 son más pequeñas que las células HMC3, el citómetro de flujo las detecta más fácilmente. Sin embargo, las células BV2 fueron menos adecuadas que HCM3 para los experimentos de agregación descritos anteriormente

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

porque las células BV2 tienen tasas de transfección muy bajas para la doble transfección del modelo SynT/Sph1, lo que lleva a que no haya suficientes células transfectadas para cuantificar adecuadamente diferentes tratamientos.

Los resultados mostraron un alto nivel de transferencia de α-syn entre las neuronas dopaminérgicas N27, que fue significativamente mayor que la transferencia de α-syn entre BV2/BV2 y C6/C6 (Figura **16a**). Las tasas de transferencia entre diferentes tipos de células se muestran usando un código de color (Figura **16b**), donde un color rojo más fuerte indica una captación más fuerte, un amarillo claro indica la tasa de transferencia entre células del mismo tipo (que se muestra en la Figura **16a**) y un color verde más fuerte indica una liberación más fuerte por parte de las células indicadas en la parte superior de cada histograma cuando se mezclan con las células indicadas debajo de cada columna del histograma (Figura **16c-h**). Nuestros resultados mostraron una mayor liberación de α-syn de las células dopaminérgicas N27 cuando se mezclan con células BV2 y C6 (Figura **16c-d**). De manera similar, observamos un aumento en los niveles de fluorescencia de las células BV2 (no significativas) y C6 cuando se mezclaron con células N27, lo que apunta a una mayor captación de α-syn por estos tipos de células gliales en presencia de neuronas dopaminérgicas N27 (Figura **16e-h**). Nuestros resultados refuerzan la hipótesis de una fuerte transferencia de α-syn desde las neuronas a los astrocitos y la microglía, pero no una transferencia significativa de la glia a las neuronas. Además, observamos una tendencia (no significativa en los presentes experimentos) a transferir α-syn de las células BV2 a C6, lo que sugiere la posibilidad de transferencia de α-syn de la microglía a los astrocitos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

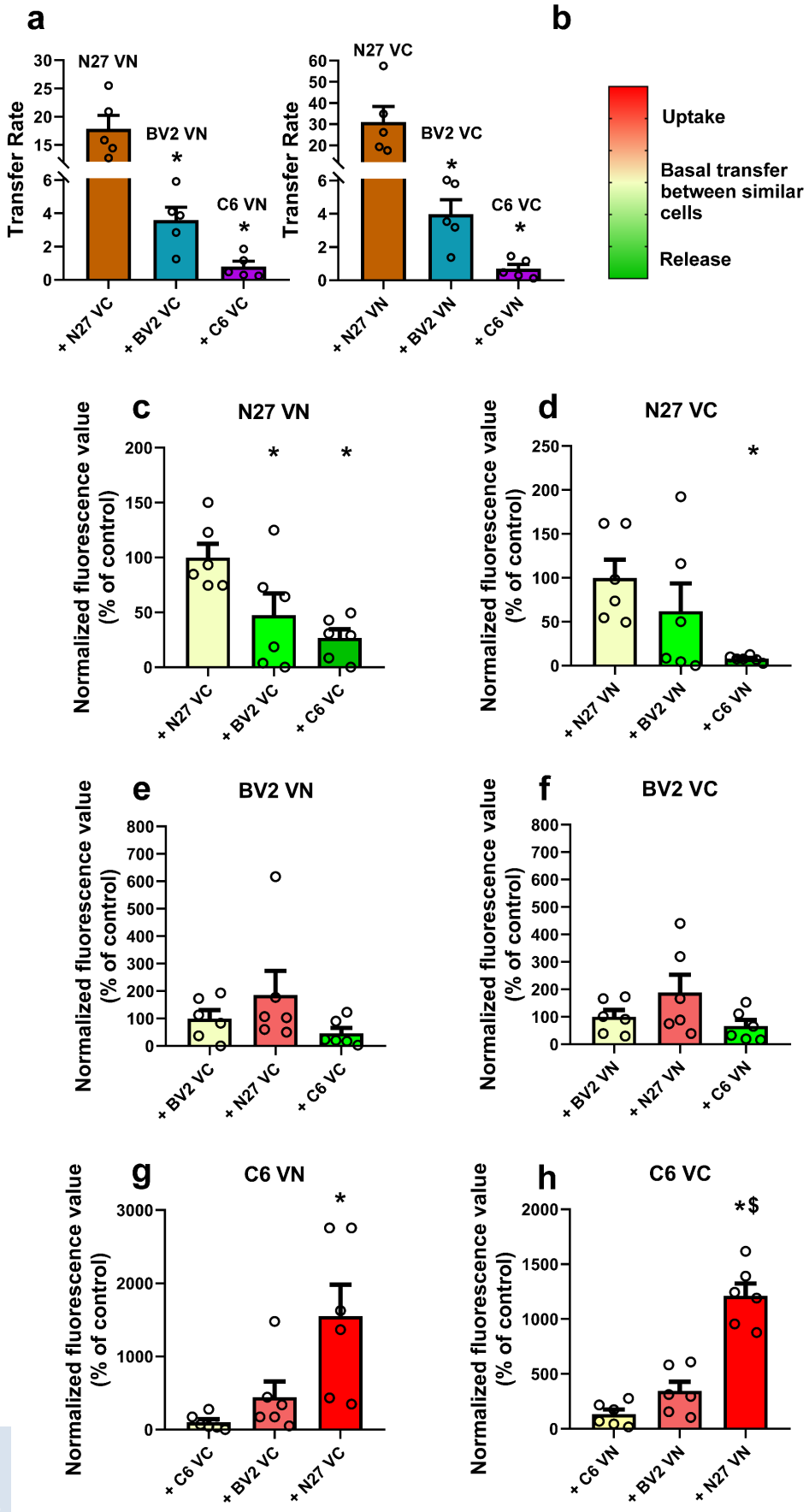

a
N27 VN
BV2 VN
C6 VN
Transfer Rate
+ N27 VC
+ BV2 VC
+ C6 VC
N27 VC
BV2 VC
C6 VC
+ N27 VN
+ BV2 VN
+ C6 VN
b
Uptake
Basal transfer between similar cells
Release
c
N27 VN
d
N27 VC
e
BV2 VN
f
BV2 VC
g
C6 VN
h
C6 VC
Normalized fluorescence value (% of control)

Figura 16. Transferencia diferencial de célula a célula de α-syn. Las células se transfectaron con VN-α-syn o α-syn-VC para medir la transmisión de α-syn mediante BIFC. **a.** Las células N27 muestran una tasa de transferencia de α-syn significativamente mayor que las células BV2 y C6. **b.** Código de color para **c**–**h**. El amarillo claro indica la tasa de transferencia entre células del mismo tipo que se muestra en **a**. El color rojo indica captación de α-syn, mientras que el color verde indica liberación de α-syn por las células indicadas en la parte superior de cada histograma cuando se mezclan con las células indicadas debajo de cada columna del histograma. **c-d.** Las células N27 manifiestan un aumento significativo en su tasa de liberación de α-syn cuando se cultivan conjuntamente con células C6 y un aumento significativo en la tasa de liberación de VN-α-syn cuando se cultivan conjuntamente con células BV2 que expresan α-syn-VC. **e-f.** Las células BV2 manifiestan tendencias leves y no significativas en su transferencia de α-syn cuando se cultivan conjuntamente con otros tipos de células: captación con N27 y liberación con C6. **g-h.** Las células C6 muestran un aumento significativo en su captación de α-syn cuando se cultivan conjuntamente con células N27. n=6 mediciones de citometría de flujo independientes (10000 eventos analizados). * $p < 0,05$ en relación con los controles (valores amarillos). ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Dunnet. Las barras de error representan SEM.

4.1.8. Efectos de angiotensina II sobre la liberación y captación de α-sinucleína entre diferentes líneas celulares

Después de evaluar las diferencias en la liberación y captación de α-syn entre las diferentes líneas celulares, estudiamos los posibles efectos de la adición de AngII en la transferencia de la α-syn. El fundamento de estos experimentos fue similar al utilizado para evaluar las diferencias en la liberación y la captación, es decir, empleamos la técnica BIFC VNSyn/SynVC y células cocultivadas mediante el sistema transwell (Figura **17**, anexo I, figuras suplementarias **5-7**). Aunque el tratamiento con AngII induce un aumento en la agregación de α-syn (ver apartados anteriores), la AngII no produjo ningún cambio significativo en la liberación o captación de proteínas por parte de las células N27 en relación con su tasa basal (Figura **17a-b**). Sin embargo, el tratamiento con AngII condujo a una mayor internalización de α-syn por parte de las células BV2 cuando se mezcla con células C6 o N27, lo que indica que AngII aumenta la capacidad de las células microgliales para capturar α-syn, y estos cambios se bloquean con el tratamiento con losartán, lo que demuestra que los efectos están mediados por la activación de la vía AngII/AT1 (Figura **17c-d**). Respecto a las células astrogliales C6, se observan cambios significativos cuando las células C6 se mezclan con células C6; lo que lleva a un aumento en el porcentaje de células C6 positivas, que sugiere un aumento en la transferencia de α-syn entre las células C6 (Figura **17e-f**). Las células astrogliales C6 muestran un alto nivel de captación de α-syn desde las neuronas N27 en presencia o ausencia de AngII exógena, posiblemente esta captación está relacionada con la liberación de AngII derivada de C6 (Figura **16g-h**; Figura **17e-f**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

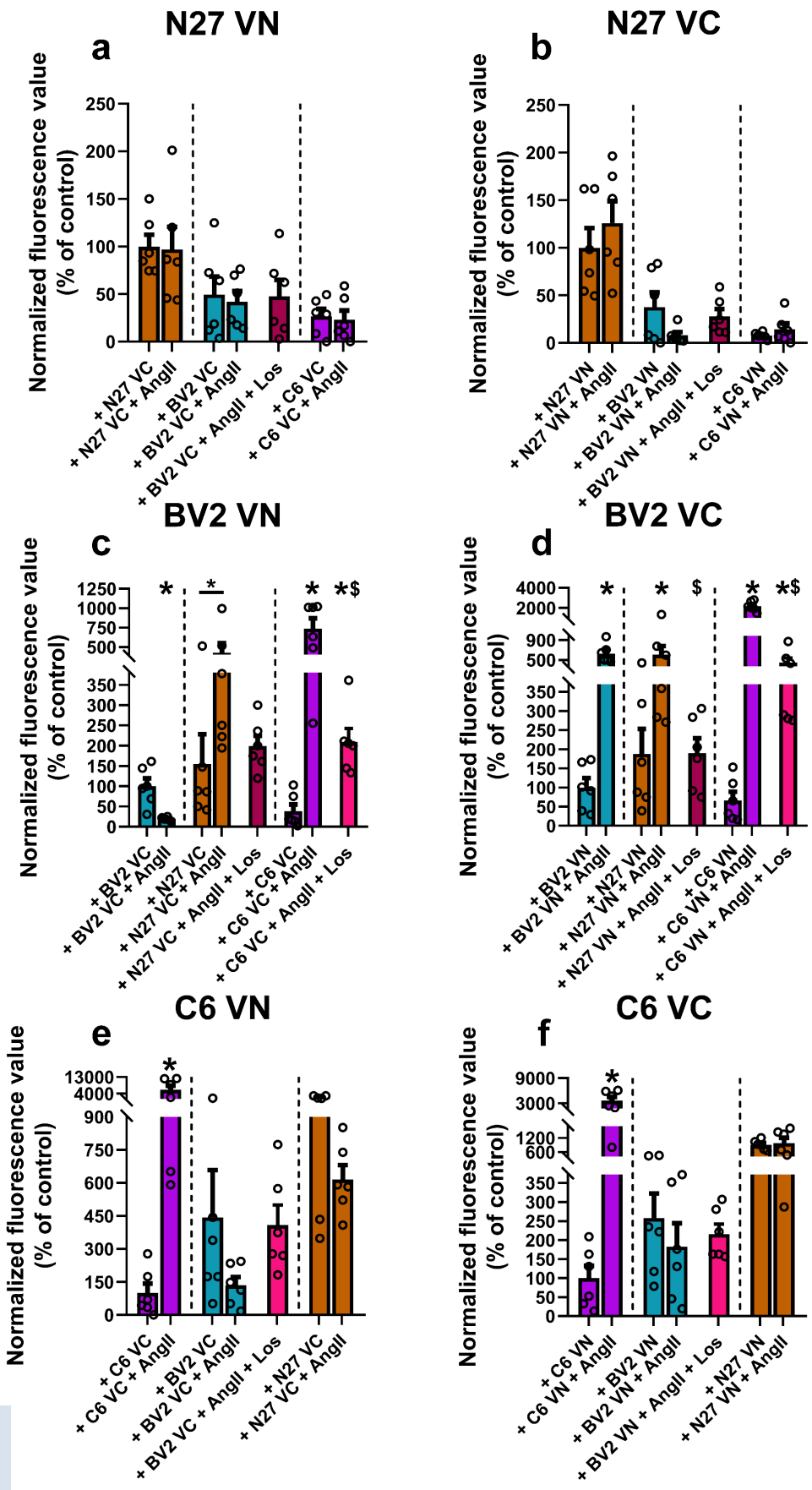

N27 VN
a
Normalized fluorescence value (% of control)
250
200
150
100
50
0
+ N27 VC
+ N27 VC + AngII
+ BV2 VC
+ BV2 VC + AngII
+ BV2 VC + AngII + Los
+ C6 VC
+ C6 VC + AngII
N27 VC
b
Normalized fluorescence value (% of control)
250
200
150
100
50
0
+ N27 VN
+ N27 VN + AngII
+ BV2 VN
+ BV2 VN + AngII
+ BV2 VN + AngII + Los
+ C6 VN
+ C6 VN + AngII
BV2 VN
c
Normalized fluorescence value (% of control)
1250
1000
750
500
350
300
250
200
150
100
50
0
*
*
*
*$
+ BV2 VC
+ BV2 VC + AngII
+ N27 VC
+ N27 VC + AngII
+ N27 VC + AngII + Los
+ C6 VC
+ C6 VC + AngII
+ C6 VC + AngII + Los
BV2 VC
d
Normalized fluorescence value (% of control)
4000
2000
900
500
350
300
250
200
150
100
50
0
*
*
$
*
*$
+ BV2 VN
+ BV2 VN + AngII
+ N27 VN
+ N27 VN + AngII
+ N27 VN + AngII + Los
+ C6 VN
+ C6 VN + AngII
+ C6 VN + AngII + Los
C6 VN
e
Normalized fluorescence value (% of control)
13000
4000
900
750
600
450
300
150
0
*
+ C6 VC
+ C6 VC + AngII
+ BV2 VC
+ BV2 VC + AngII
+ BV2 VC + AngII + Los
+ N27 VC
+ N27 VC + AngII
C6 VC
f
Normalized fluorescence value (% of control)
9000
3000
1200
600
350
300
250
200
150
100
50
0
*
+ C6 VN
+ C6 VN + AngII
+ BV2 VN
+ BV2 VN + AngII
+ BV2 VN + AngII + Los
+ N27 VN
+ N27 VN + AngII

Figura 17. Efecto del tratamiento con AngII sobre la transferencia de célula a célula de α-syn. Las células se transfectaron con VN-α-syn o α-syn-VC para medir la transmisión de α-syn mediante BIFC. **a-b.** El tratamiento con AngII no produjo cambios significativos en la liberación o captación de las proteínas por parte de las células N27. **c-d.** El tratamiento con AngII condujo a un aumento significativo en la captación de las proteínas por parte de las células BV2 cuando se cultivaron conjuntamente con células N27 o C6, que puede inhibirse mediante el tratamiento con losartán. Entre las células BV2, el tratamiento con AngII conduce a un aumento significativo en la liberación de VN-α-syn. Se puede observar una disminución significativa en el porcentaje de células BV2 fluorescentes que expresan VN-α-syn junto con un aumento significativo en el porcentaje de células BV2 fluorescentes que expresan α-syn-VC. **e-f.** El tratamiento con AngII conduce a una mayor transferencia de α-syn entre las células C6, mostrando un aumento significativo en el porcentaje de células C6 fluorescentes; a diferencia de las células BV2 donde la transferencia ocurre en una dirección, en las células C6 ocurre en ambas direcciones. *n*=6 mediciones independientes (10000 eventos analizados). Abreviaturas: AngII, angiotensina II; los, losartán. * $p < 0,05$ en relación con las células no tratadas. $ $p < 0,05$ en relación con las células tratadas con AngII. Prueba *t* de dos colas no apareada o prueba de Mann-Whitney para comparaciones por pares o ANOVA de Brown-Forsythe y Welch para comparaciones múltiples. Las barras de error representan SEM.

4.2. ROCK MEDIA LA AGREGACIÓN DE α-SINUCLEÍNA

Una vez demostrada la implicación de la vía AngII/AT1 en la agregación y la transmisión de α-syn, decidimos estudiar la relación entre los efectos de la vía AngII/AT1 en la agregación de la α-syn y la posible implicación de la vía RhoA/ROCK sobre esta agregación al haberse comprobado que ésta puede ser contrarrestada mediante el tratamiento con fasudil (Hou et al., 2018; Iyer et al., 2021). Además, estudiamos los efectos de los inhibidores de ROCK, fasudil e Y27632, en la agregación de la α-syn. La vía de señalización RhoA/ROCK es una ruta molecular que desempeña un papel crucial en la regulación de diversas funciones celulares, incluyendo la morfología celular, la motilidad, la adhesión y la supervivencia. En el SNC, esta vía tiene un impacto significativo en el desarrollo neuronal, la función cognitiva y la plasticidad sináptica, alterando la sinapsis neuronal y aumentando la neuroinflamación y la muerte neuronal (Koch et al., 2018). Se ha observado la existencia de una interacción entre la vía AngII/AT1 y la vía RhoA/ROCK, provocando cambios a nivel de la polarización microglial y la neurodegeneración (Villar-Cheda et al., 2012).

4.2.1. Efectos del tratamiento con el inhibidor de ROCK fasudil en el aumento de la agregación de α-sinucleína mediado por angiotensina II

Para estos experimentos *in vitro* volvimos a utilizar la línea celular neuronal N27, la línea celular astroglial C6 y la línea celular microglial HMC3. Además, se volvieron a utilizar las células HEK293 de riñón humano como células control para la transfección y como control negativo para ver los efectos de AngII.

Inicialmente, decidimos estudiar los efectos que el fasudil puede tener en el aumento inducido por la AngII en la naturaleza de las inclusiones en los diferentes tipos celulares. Analizamos el porcentaje de células con inclusiones utilizando el modelo SynT/Sph1, y el tamaño medio de las inclusiones utilizando el método BIFC etiquetando la α-syn con el extremo VC de la proteína venus y la sinfilina-1 con el extremo VN de la proteína venus, SphVN/SynVC (Figura **18a-l**).

En las células neuronales dopaminérgicas N27, el tratamiento con AngII aumentó significativamente el porcentaje de células que presentaban inclusiones, lo que fue bloqueado por el tratamiento con el inhibidor de ROCK fasudil (Figura **18m**). Resultados similares se

observaron en el tamaño medio de las inclusiones en N27 (Figura **18n**). Esto sugiere que la AngII induce la formación de un mayor porcentaje de células que presentan inclusiones de α-syn de mayor tamaño que se bloquea tras el tratamiento con el inhibidor de ROCK fasudil.

Observamos resultados similares en las células microgliales HMC3. Tras el tratamiento con AngII, un mayor porcentaje de células mostraron inclusiones y se observó un mayor tamaño medio de las inclusiones (Figura **18o-p**), lo que apunta a la formación de un mayor porcentaje de células que muestran inclusiones de α-syn de mayor tamaño, que fue inhibido por fasudil.

En las células astrocíticas C6, los diferentes tratamientos no produjeron ningún cambio significativo en el porcentaje de células que presentan inclusiones (Figura **18q**). Esto puede deberse a que, como mencionamos previamente, los astrocitos son una fuente importante de AngII endógena, que ya está presente en el medio de cultivo, mientras que las neuronas y la microglía no liberan o prácticamente no liberan AngII al medio. Sin embargo, observamos una disminución significativa del tamaño de las inclusiones tras el tratamiento con fasudil o fasudil y AngII (Figura **18r**).

En las células HEK293, no observamos cambios significativos tras el tratamiento con AngII (Figura **18s-t**). Se ha demostrado que las células HEK293 carecen de receptores AT1 (Rivas-Santisteban et al., 2020; Sackin, 2021), por lo que cabía esperar estos resultados. Sin embargo, el tratamiento con fasudil produjo un porcentaje significativamente menor de células que presentan inclusiones y del tamaño de las inclusiones, lo que apunta a efectos del fasudil sobre la agregación de α-syn independientes de sus efectos sobre la vía AngII/AT1. Esto sugiere que el fasudil puede actuar también a través de vías o mecanismos adicionales, que se abordarán en los siguientes experimentos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

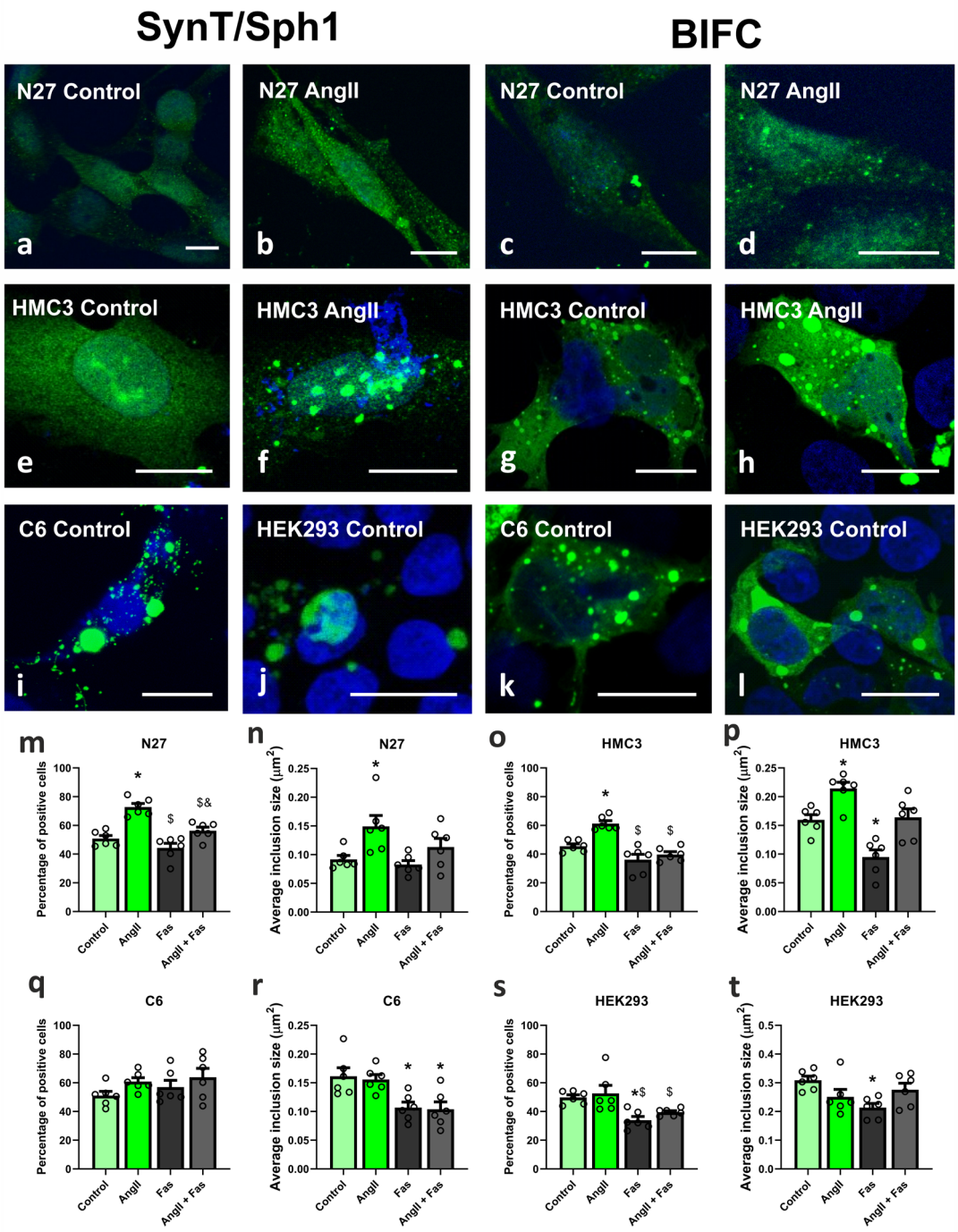


Figura 18. Fasudil disminuye el aumento mediado por AngII del porcentaje de células con inclusiones y del tamaño medio de las inclusiones en células N27 y HMC3. a-l. Fotografías de microscopía confocal representativas de las células analizadas. **m-n.** El tratamiento con AngII en células N27 conduce a un aumento significativo del porcentaje de células con inclusiones y del tamaño medio de las mismas, que se revierten con el tratamiento con fasudil. **o-p.** El tratamiento con AngII en células HMC3 conduce a un aumento significativo en el porcentaje de células con inclusiones y en el tamaño medio de las inclusiones que se revierten tras el tratamiento con fasudil. El tratamiento con fasudil solo conduce a una disminución significativa del tamaño de las inclusiones en relación con los controles. **q-t**. El tratamiento con AngII en células C6 y HEK293 no produjo cambios significativos en el porcentaje de células que presentan inclusiones, ni en el tamaño medio de las inclusiones. El fasudil por sí solo provoca una disminución significativa del tamaño de las inclusiones, y en el caso de HEK293 en el porcentaje de células que presentan inclusiones. El tamaño medio de las inclusiones disminuye tras el

tratamiento con AngII y fasudil en células C6. *n*=6 experimentos independientes, se analizaron al menos 30 imágenes por cada tratamiento y experimento. Barras de escala 12 µm. Abreviaturas: AngII, angiotensina II; Fas, fasudil. * $p < 0,05$ en relación con el control. $ $p < 0,05$ en relación con AngII. & $p < 0,05$ en relación con fasudil. ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan el SEM.

4.2.2. Papel de angiotensina II y fasudil en la expresión de la proteína α-sinucleína y en su fosforilación

Para evaluar si los cambios observados en el porcentaje de células con inclusiones o en el tamaño de estas tras los diferentes tratamientos se deben a cambios en la expresión o fosforilación proteica o a una mayor tendencia a formar agregados, realizamos WB SDS-PAGE mediante el uso del método BIFC VNSyn/SynVC de las células analizadas por microscopía. Nuestros resultados no mostraron ningún cambio significativo en la expresión proteica con ninguno de los diferentes tratamientos (Figura **19a-d**). Además, como la fosforilación de la α-syn puede cambiar la capacidad de la α-syn para formar agregados o la internalización de la proteína (Kawahata et al., 2022), medimos, mediante WB SDS-PAGE fluorescente, los niveles de fosforilación de la α-syn tras los diferentes tratamientos. No observamos ningún cambio en los niveles de fosforilación de α-syn con ninguno de los diferentes tratamientos (Figura **19e-h**). Estos resultados implican que los cambios en el porcentaje de células con inclusiones y en el tamaño medio de las inclusiones de α-syn no se deben a cambios en la expresión de la proteína, ni a cambios en los niveles de fosforilación de α-syn.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

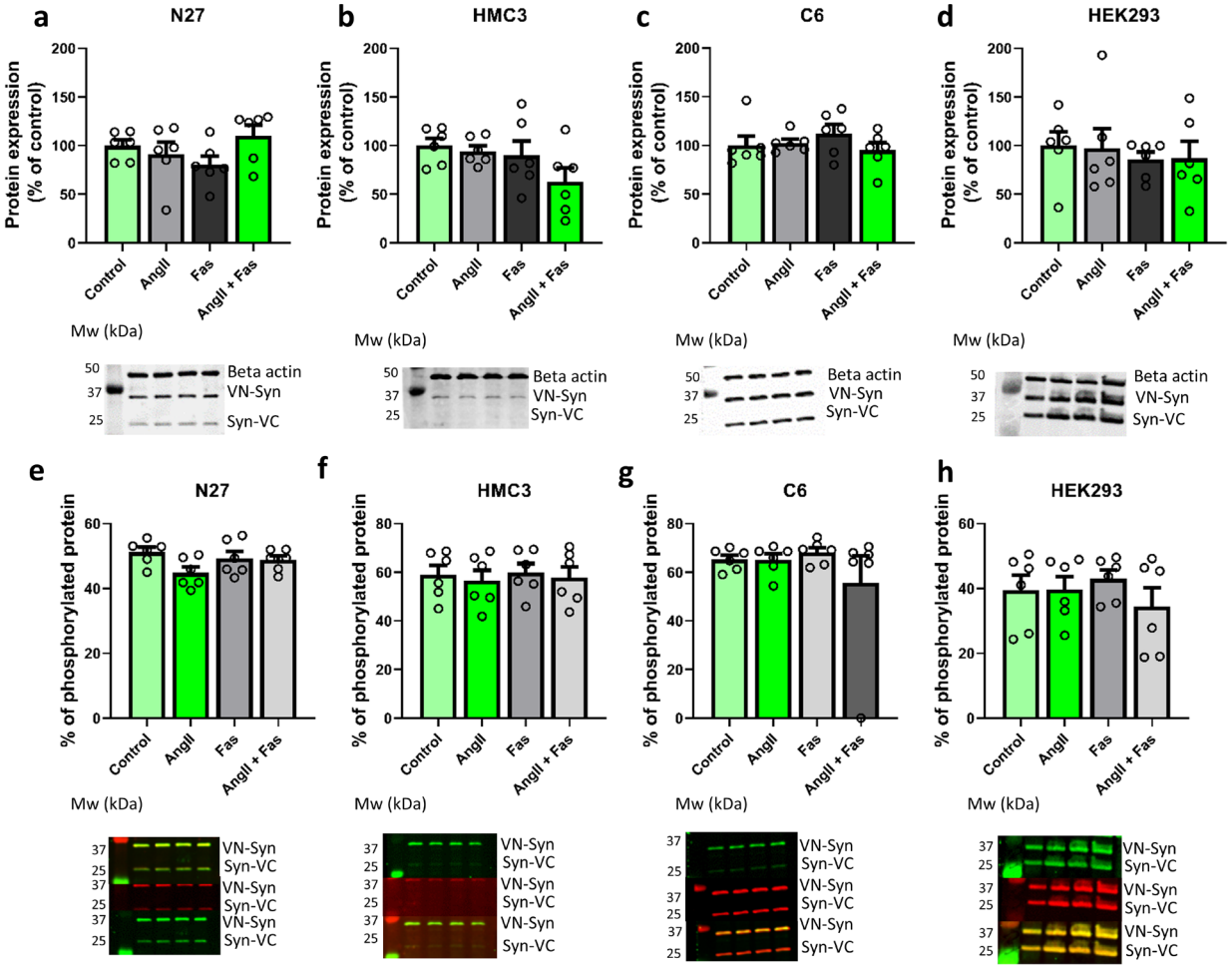


Figura 19. Los análisis de WB SDS-PAGE no muestran cambios significativos en la expresión de α-syn ni en la fosforilación de α-syn. Las células fueron transfectadas con BIFC VNSyn/SynVC para medir la expresión y fosforilación de α-syn. **a-d.** Los análisis WB de las células N27, HMC3, C6 y HEK293 no mostraron cambios significativos en la expresión de la α-syn debidos a los diferentes tratamientos. **e-h.** Los análisis de WB SDS-PAGE fluorescente de células N27, HMC3, C6 y HEK293 no mostraron diferencias en los niveles de fosforilación de α-syn debido a los diferentes tratamientos. Verde: α-syn fosforilada. Rojo: α-syn no fosforilada. *n*=6 mediciones independientes. Abreviaturas: AngII, angiotensina II; Fas, fasudil. ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan el SEM.

4.2.3. Agregación de α-sinucleína tras la interacción directa entre fasudil y α-sinucleína

Una vez observados los cambios provocados por el tratamiento de fasudil en los agregados de α-syn, y que estos cambios no se deben a los niveles de expresión o fosforilación de la proteína α-syn, decidimos estudiar si el fasudil provocaba estos cambios debido a una interacción directa con la α-syn. Se ha propuesto que el fasudil puede unirse directamente a la α-syn bloqueando la adición de nuevos monómeros, lo que puede conducir a un bloqueo de la formación de especies de alto peso molecular (Robustelli, et al., 2022; Tatenhorst et al., 2016). Para evaluar la interacción directa entre la α-syn y el fasudil, realizamos un ensayo RT-QuIC (Figura **20**), en donde agregados de pequeño tamaño de α-syn se rompen mediante vibración

tras su amplificación dando lugar a centros de nucleación denominados semillas o PFFs que incorporarán α-syn monomérica, formando agregados cada vez de mayor tamaño. La ThT se une a estos agregados, cambiando su conformación y dando lugar a la emisión de fluorescencia.

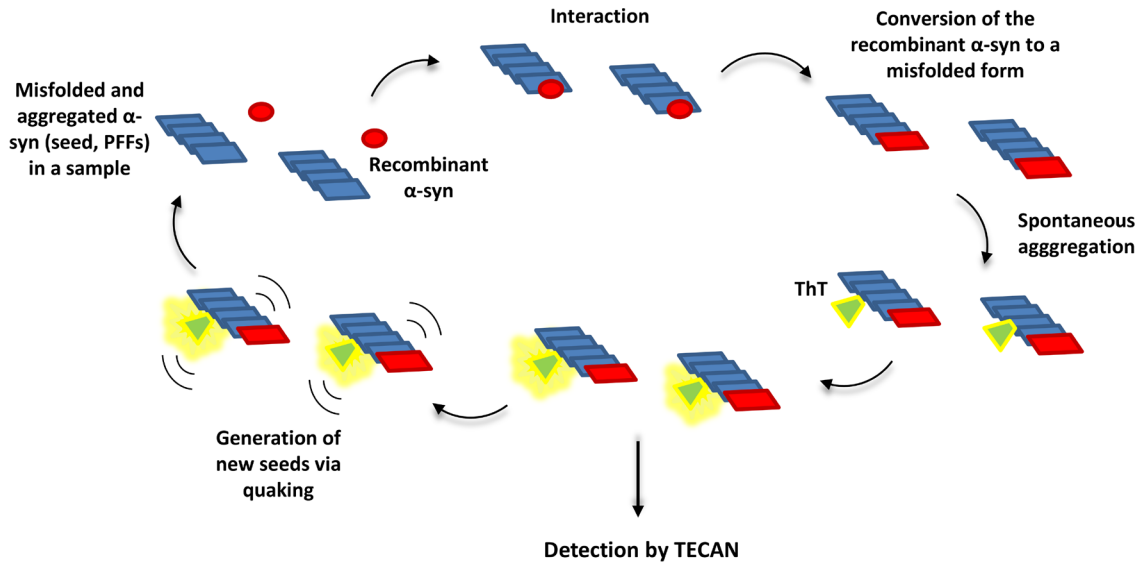


Figura 20. Representación esquemática de la amplificación por RT-QuIC. Los pequeños agregados de α-syn se rompen tras un proceso de agitación (quaking), creando centros de nucleación (semillas) que incorporarán α-syn monomérica, dando lugar a la formación de agregados mayores. La ThT se une a agregados de cierto tamaño, cambiando su conformación y dando lugar a la emisión de fluorescencia que es detectada en un lector de placas TECAN Infinite M200 Pro. Abreviaturas: PFFs, fibrillas preformadas de α-syn; ThT, Tioflavina T; α-syn, α-sinucleína.

Antes de realizar este experimento, comprobamos la formación de las PFFs que utilizamos como semillas para el ensayo. Sometimos las PFFs a un proceso de agitación y, ocho días después de iniciar el proceso de preparación de las PFFs, realizamos un ensayo de sedimentación y de tinción con ThT. Los resultados de ambos ensayos fueron significativamente diferentes de los resultados obtenidos para la α-syn monomérica recombinante antes de iniciar la preparación de las PFFs (Figura **21a-d**). Los resultados obtenidos mostraron que las PFFs estaban listas 8 días después de iniciar el proceso de preparación, ya que observamos que en el ensayo de sedimentación había una cantidad significativamente mayor de proteína en los sobrenadantes antes de iniciar el proceso de preparación de PFFs y a los 4 días. Por otra parte, observamos que a los 8 días del inicio de la preparación se ha producido un incremento de la cantidad de proteína en el precipitado (Figura **21a-c**). Además, con el ensayo ThT de las PFFs pudimos observar un aumento significativo de la fluorescencia de ThT en las muestras recogidas a los 8 días tras iniciar el proceso de preparación con respecto de las muestras recogidas a los 4 días y con respecto a la proteína monomérica recombinante (Figura **21d**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

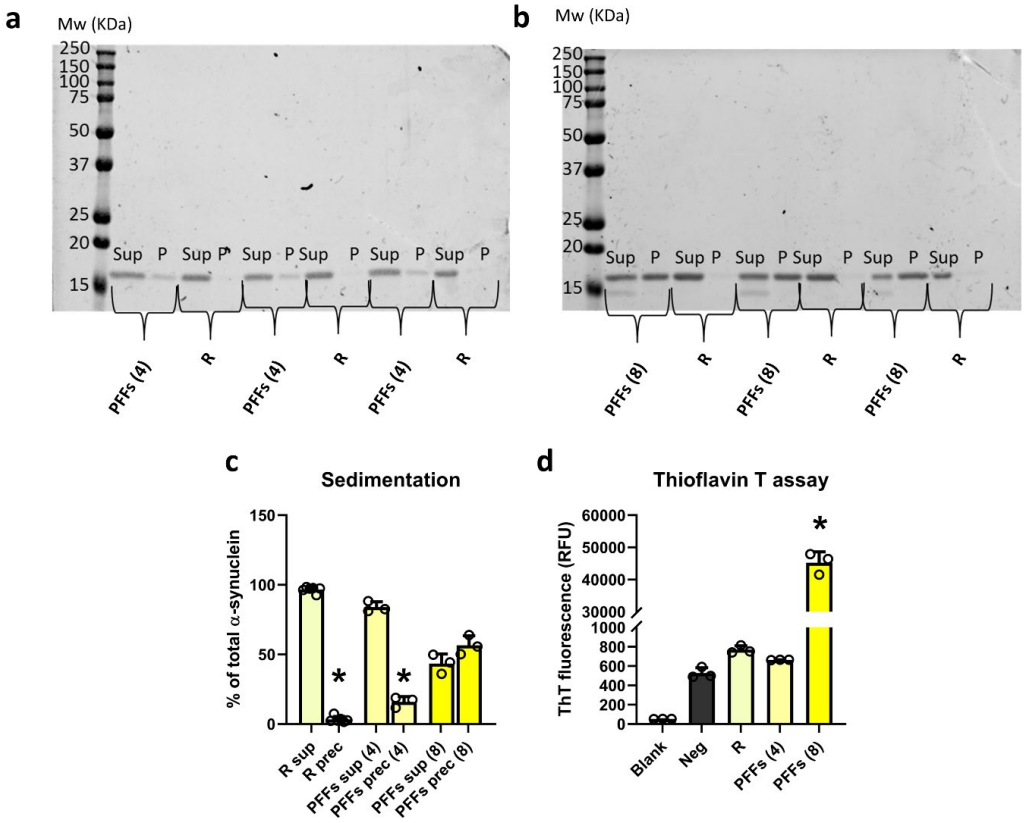


Figura 21. Caracterización de las PFFs. a-b. La tinción de Coomasie de geles de acrilamida muestra la presencia de PFFs 8 días después de iniciar el proceso de preparación. **c.** La cuantificación de los geles teñidos con Coomasie mostró una cantidad significativamente mayor de proteína en los sobrenadantes antes de iniciar el proceso de preparación de PFFs y a los 4 días. * $p < 0,05$ en relación con la columna anterior. **d.** El ensayo ThT de las PFFs muestra un aumento significativo de la fluorescencia ThT en las muestras recogidas a los 8 días de iniciar el proceso de preparación. *n*=3 mediciones independientes. Abreviaturas: R, proteína monomérica recombinante; Sup, sobrenadante; P, precipitado; Prec, precipitado; PFFs, fibrillas preformadas de α-syn; PFFs (4), Muestra tras cuatro días de agitación; PFFs (8), Muestra tras ocho días de agitación. * $p < 0,05$ en relación con R. ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan la SD.

Una vez preparadas las PFFs, procedimos a realizar el ensayo de RT-QuIC para estudiar los posibles efectos del fasudil en la agregación de la α-syn al interactuar con esta. Nuestros resultados de RT-QuIC no mostraron diferencias significativas en el área bajo la curva, el tiempo de retardo, la fluorescencia ThT en el punto final, ni en la constante de agregación, debido al tratamiento con fasudil al final del ensayo de RT-QuIC donde se han usado PFFs como simientes o núcleos de agregación (Figura **22a-e**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

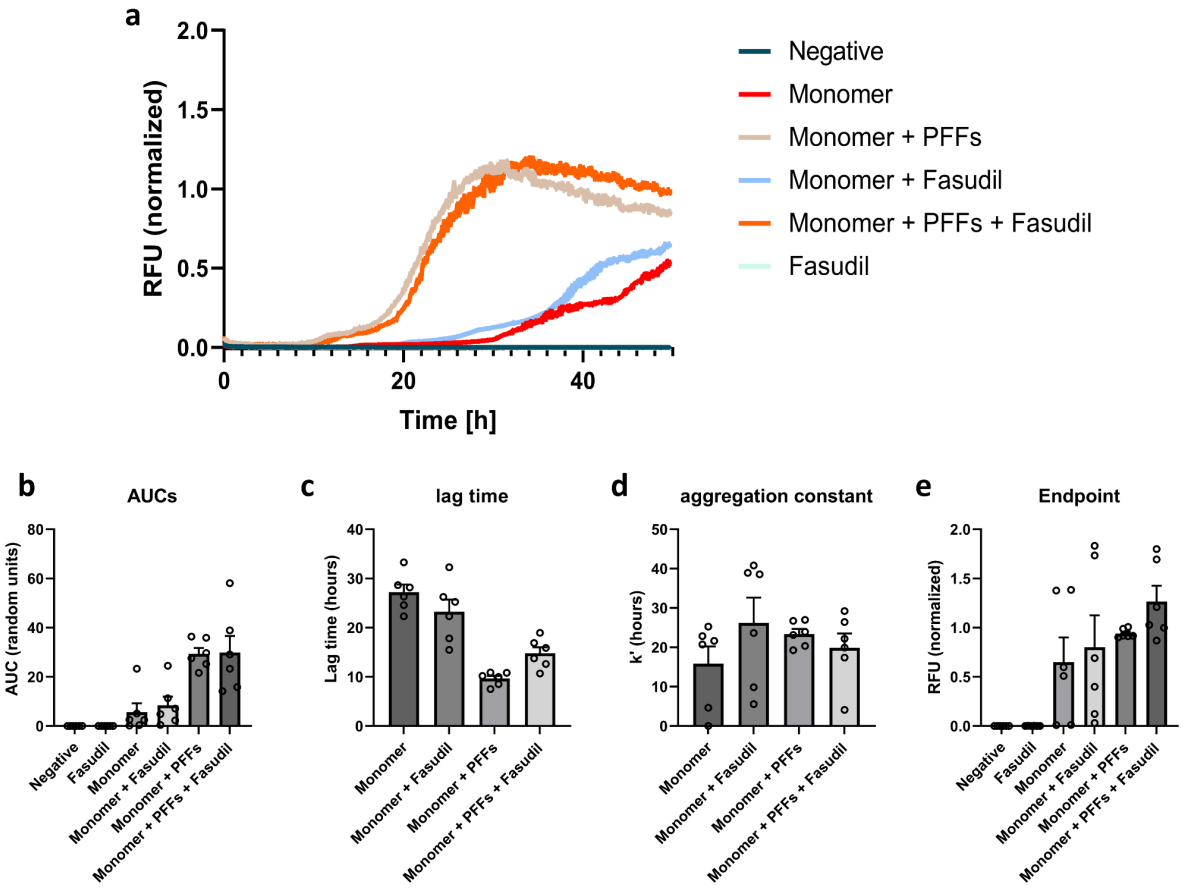


Figura 22. El fasudil no afecta a la agregación de la α-syn por interacción directa. a. Gráfico RT-QuIC de la amplificación de α-syn monomérica en presencia y ausencia de 20 µM de fasudil. **b-e.** El tratamiento con fasudil no produce cambios significativos en el AUC, el tiempo de retardo, la constante de agregación, ni en los valores normalizados de RFU al final del ensayo de RT-QuIC donde se han usado PFFs como simientes o núcleos de agregación. *n*=3-6 amplificaciones independientes. Abreviaturas: PFFs, fibrillas preformadas de α-syn; AUC, área bajo la curva. ANOVA unidireccional y prueba de múltiple comparación de Tukey. Las barras de error representan el SEM.

4.2.4. Efecto de la amplificación RT-QuIC sobre la degradación de fasudil

Para determinar si la falta de inhibición de la agregación observada por RT-QuIC podría deberse a la degradación del fasudil o de las fibrillas durante el proceso de RT-QuIC, realizamos tres experimentos diferentes. En primer lugar, analizamos si la adición de fasudil a fibrillas ya formadas podría conducir a su degradación. Nuestros resultados no mostraron disminución de la fluorescencia ThT, lo que indica que las fibrillas no sufren degradación (Figura **23a**). El segundo experimento consistió en la adición de fasudil 20 horas después de comenzar el proceso RT-QuIC, aproximadamente el momento en el que comenzaría la agregación. Si el fasudil se degrada, el nuevo fasudil inhibirá la agregación. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que cuando añadimos 20 µM de fasudil *de novo*, las curvas de fluorescencia se hicieron más pronunciadas en relación con las curvas de control (Figura **23b-f**). Este efecto es consecuencia de una mayor velocidad de agregación. Los principales sitios de unión de fasudil en α-Syn son las tirosinas Y125, Y133 y Y136 en la región C-terminal. Sin embargo, se ha propuesto que un exceso de fasudil puede unirse a Y39 (en la región anfipática) además de a las tirosinas

mencionadas, cambiando así las propiedades anfipáticas de la α-syn, lo que conduce a mayores tasas de agregación (Robustelli, et al., 2022; Semenyuk, 2022). Por último, en un tercer experimento, comprobamos la estabilidad del fasudil durante el proceso RT-QuIC. Para ello, realizamos el proceso RT-QuIC en ausencia de α-syn y ThT en uno de los pocillos. Se recogieron alícuotas de esta muestra antes y después del proceso RT-QuIC y se realizó ^{1}H-NMR (resonancia magnética nuclear de protón) para compararlas. Si el proceso hubiera afectado a la estabilidad del fasudil, habríamos observado cambios en los desplazamientos químicos. Nuestros resultados de ^{1}H-NMR fueron los siguientes: 1H-NMR (500 MHz, D2O) δ 9,06 (d, J=0,9 Hz, 1H), 8,38 (d, J=6,2 Hz, 1H), 8,17 - 8,07 (m, 3H), 7,61 (t, J=7,8 Hz, 1H), 3,65 (m, 2H), 3. 45 (t, J=6,2 Hz, 2H), 3,36 - 3,29 (m, 4H), 2,07 (p, J=6,0 Hz, 2H) para la muestra antes de RT-QuIC y 1H-NMR (500 MHz, D2O) δ 9. 07 (d, J=0,9 Hz, 1H), 8,39 (d, J=6,2 Hz, 1H), 8,19 - 8,08 (m, 3H), 7,62 (t, J=7,8 Hz, 1H), 3,65 (m, 2H), 3,45 (t, J=6,2 Hz, 2H), 3,36 - 3,28 (m, 4H), 2,07 (p, J=5,9 Hz, 2H) para la muestra después de RT-QuIC. Señal de disolvente a δ 4,70. Los resultados no mostraron cambios significativos en el desplazamiento químico, lo que demuestra que el fasudil no sufrió ninguna degradación durante el proceso RT-QuIC (Anexo I, figura suplementaria **13**).

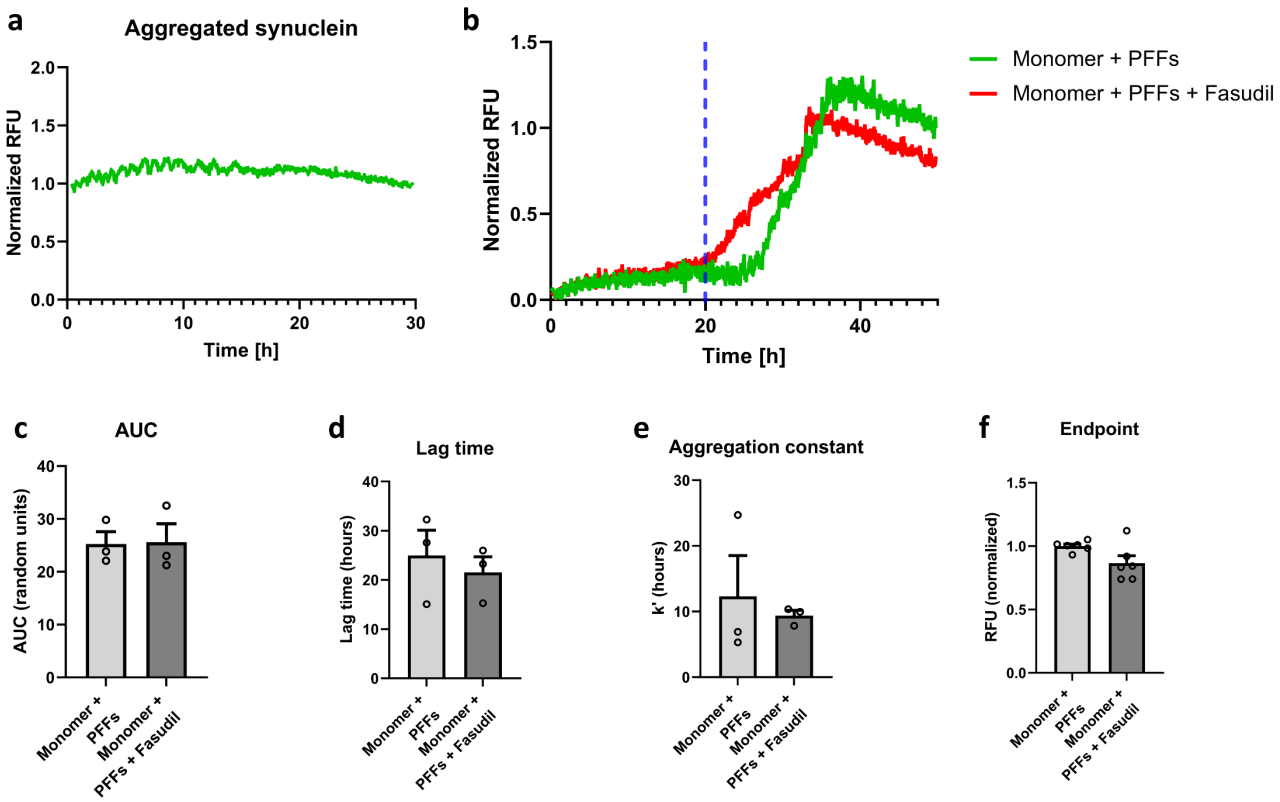


Figura 23. El fasudil no es degradado por la amplificación RT-QuIC. a. El tratamiento con fasudil no afecta a la α-syn ya agregada. **b.** Gráfico RT-QuIC de la amplificación de α-syn monomérica en presencia y ausencia de 40 µM de fasudil, añadido al inicio de la reacción y después de 20 horas (línea de puntos). **c-f.** Un segundo tratamiento con fasudil 20 horas después del inicio del proceso no produce cambios significativos en el AUC, el tiempo de retardo, la constante de agregación, ni en los valores normalizados de RFU al final del ensayo de RT-QuIC donde se han usado PFFs como simientes o núcleos de agregación. *n*=3-6 amplificaciones independientes. Abreviaturas: PFFs, fibrillas preformadas de α-syn; AUC, área bajo la curva. Prueba t de Student no apareada de dos colas. Las barras de error representan el SEM.

4.2.5. Fasudil inhibe la agregación de α-sinucleína inducida por fibrillas preformadas *in cellulo*

Una vez confirmado que el fasudil no influye en la agregación de α-syn mediante interacción directa, evaluamos la existencia de otros posibles mecanismos intracelulares mediante RT-QuIC en la línea celular N27, para evaluar cómo el tratamiento de las células con PFFs afecta la agregación de α-syn endógena y los posibles efectos moduladores de la agregación por parte de fasudil. Resultados provisionales mostraron en las curvas de agregación un mayor incremento de la señal de fluorescencia de ThT tanto en el grupo tratado únicamente con PFFs como en el grupo tratado con fasudil antes de la exposición a PFFs, indicando que las fibrillas posiblemente actúen como simientes, induciendo la agregación de α-syn endógena en las neuronas dopaminérgicas (Figura **24a**). El incremento de fluorescencia observado en el grupo pretratado con fasudil podría atribuirse a un efecto rebote tras la adición posterior de PFFs, hipótesis que estamos estudiando.

En contraste, tanto el grupo control como el grupo tratado con PFFs seguido de fasudil presentaron niveles similares de fluorescencia ThT, lo que sugiere una baja agregación de α-syn (Figura **24a**). Además, no se observaron diferencias significativas en parámetros como el área bajo la curva, el tiempo de retardo, la fluorescencia ThT en el punto final o la constante de agregación al comparar los grupos tratados con fasudil en presencia de PFFs como simientes o núcleos de agregación (Figura **24b-e**). Los resultados expuestos son preliminares y aún es necesario aumentar el tamaño muestral de estos para obtener resultados más concluyentes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

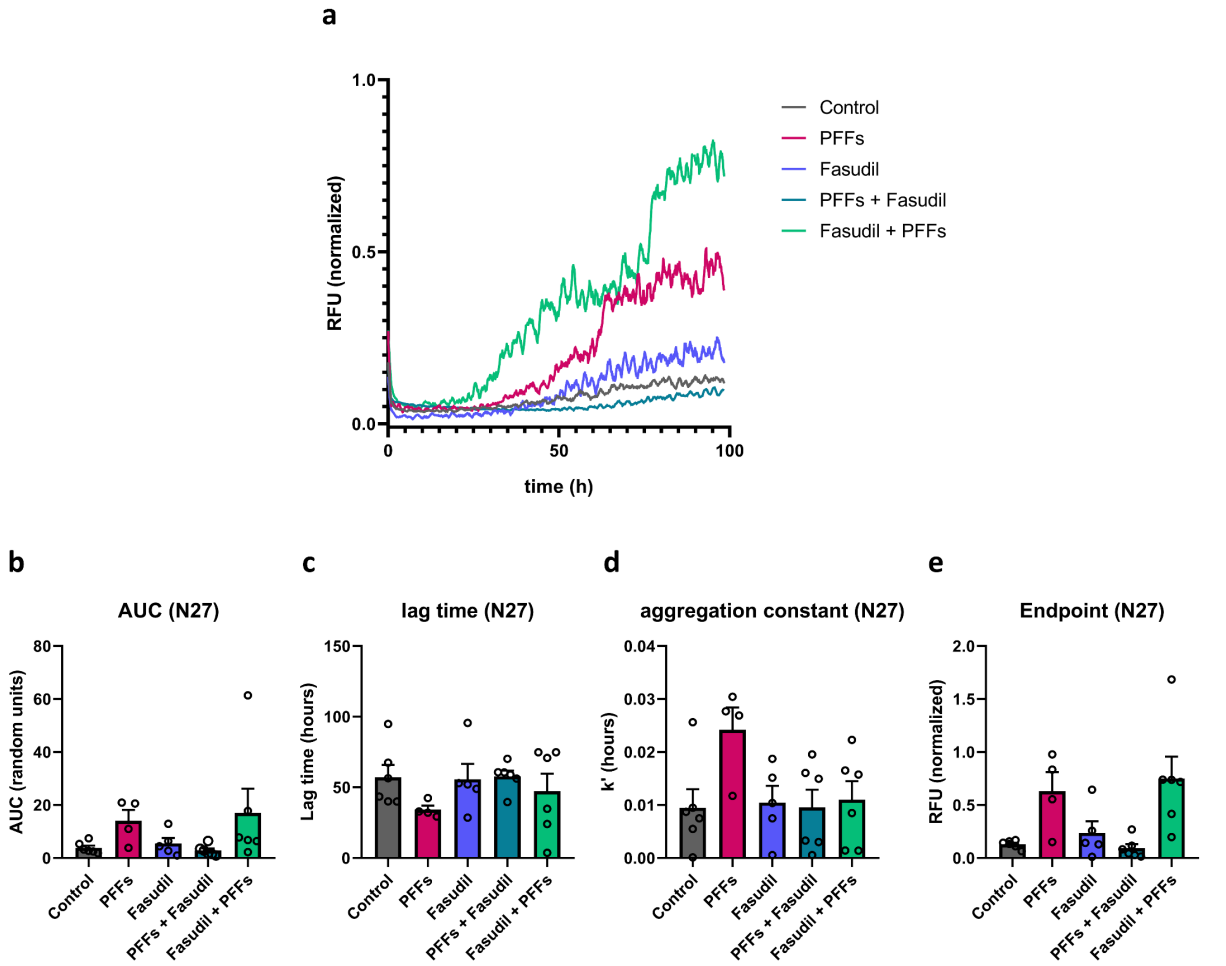


Figura 24. El fasudil inhibe la agregación de α-syn tras el tratamiento con PFFs en neuronas dopaminérgicas. a. Gráfico RT-QuIC de la amplificación de α-syn endógena en presencia y ausencia de 1 µM de PFFs y 20 µM de fasudil. **b-e.** El tratamiento con fasudil no produce cambios significativos en el AUC, el tiempo de retardo, la constante de agregación, ni en los valores normalizados de RFU al final del ensayo de RT-QuIC donde se han usado PFFs como simientes o núcleos de agregación. *n*=4-6 réplicas biológicas. Abreviaturas: PFFs, fibrillas preformadas de α-syn; AUC, área bajo la curva. Análisis unidireccional por rangos de Kruskal-Wallis y prueba de comparación múltiple de Dunn´s. Las barras de error representan el SEM.

4.2.6. Efectos de fasudil sobre la agregación de α-sinucleína a través de la inhibición de ROCK

Los datos descritos anteriormente sugieren que los efectos del fasudil sobre la agregación de α-syn se producen a través de la inhibición de ROCK y no a través de efectos específicos de la molécula de fasudil. Para confirmar esta teoría, estudiamos los efectos del fasudil y de otro inhibidor de ROCK (Y27632) *in vitro* e *in vivo*.

En un primer lugar, para corroborar que los efectos observados estaban relacionados con la disminución de la actividad de ROCK inducida por fasudil, medimos la actividad de ROCK en la línea celular N27. Tanto la activación del eje AngII/AT1 como la sobreexpresión y acumulación de α-syn indujeron un aumento significativo de la actividad ROCK, que fue

bloqueado por el tratamiento con fasudil. Además, los efectos inhibidores del fasudil sobre la actividad ROCK se reprodujeron con un segundo inhibidor de ROCK, el Y27632 (Figura **25a**).

Además, confirmamos que la agregación de α-syn también se veía reducida *in vitro* mediante un segundo inhibidor de ROCK (Y27632). En las células neuronales N27, el aumento del porcentaje de células que presentan inclusiones y del tamaño de los agregados inducido por la activación del eje AngII/AT1 fue bloqueado por el tratamiento con Y27632 (Figura **25b-c**), al igual que lo observado previamente con el fasudil.

Para confirmar que el efecto de la inhibición de ROCK sobre la agregación de α-syn observada *in vitro* también se producía *in vivo*, utilizamos el modelo de ratones MPTP utilizado previamente en este trabajo (ver sección resultados, apartado 4.1.5 para más detalles). Al igual que en nuestros resultados anteriores y en estudios de otros laboratorios, el MPTP indujo un aumento significativo de la agregación de α-syn, medida mediante la señal del colorante fluorescente ThS, y del anticuerpo contra α-syn en el CE de ratón (para más detalles, véase Jethva et al., 2011). En el presente estudio, observamos que el efecto del incremento de la agregación de α-syn inducido por el tratamiento con MPTP fue inhibido significativamente por el tratamiento simultáneo de los ratones con el inhibidor de ROCK Y27632 (Figura **25d-f**).

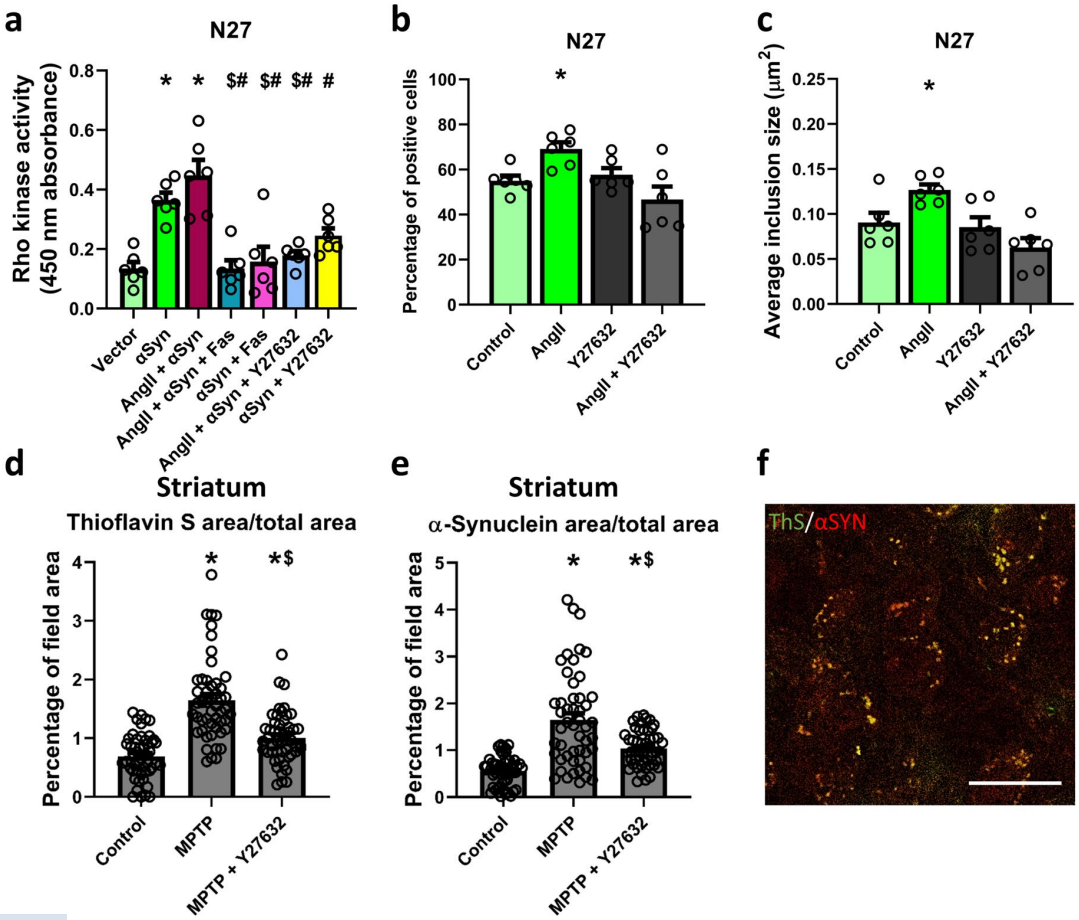


Figura 25. La inhibición de ROCK media los efectos de fasudil sobre la agregación de α-syn. a. El tratamiento con fasudil o Y27632 bloquea el aumento de la actividad de ROCK debido a la estimulación con AngII y/o a la

sobreexpresión de α-syn. * p < 0,05 en relación con el control. $ p < 0,05 en relación con α-syn. # p < 0,05 en relación con α-syn + AngII. **b-c.** El tratamiento con AngII en células N27 conduce a un aumento significativo del porcentaje de células que presentan inclusiones y del tamaño medio de las inclusiones, que se revierten con el tratamiento con el inhibidor de ROCK Y27632. *n*=6 experimentos independientes. Cada experimento y tratamiento consta de aproximadamente 30 imágenes analizadas por grupo celular. * p < 0,05 en relación con el control. ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan el SEM. **d-f.** El tratamiento con MPTP indujo la formación de inclusiones en el estriado, como se observa en la imagen de confocal. El tratamiento con MPTP condujo a un aumento significativo de la tinción positiva con ThS y de la expresión de α-syn en el estriado, que fueron inhibidas por el tratamiento con el inhibidor de ROCK Y27632. *n*=50 imágenes analizadas. Barra de escala: 20 µm. Abreviaturas: AngII, angiotensina II; Fas, fasudil; ThS, tioflavina S; αSyn, α-sinucleína. Rojo: α-syn. Verde: ThS agregados. * p < 0,05 en relación con el control. $ p < 0,05 en relación con MPTP. ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan el SEM.

4.2.7. Efectos del tratamiento temprano con fasudil sobre la transfección

Como se ha demostrado anteriormente, la inhibición de ROCK puede provocar alteraciones en la incorporación de los plásmidos de ADN de α-syn a lo largo del tiempo, dando lugar así a una menor formación de dímeros y oligómeros y a una menor intensidad de fluorescencia (Mao et al., 2022; Wayt et al., 2021). Para ver los posibles cambios en la transfección de los plásmidos con nuestros distintos tratamientos, realizamos el método BIFC VNsyn/synVC y su posterior detección de la fluorescencia mediante citometría de flujo en las diferentes líneas celulares.

Para evitar que los efectos de este mecanismo pudieran estar enmascarando posibles efectos directos de la inhibición de ROCK sobre la agregación de α-syn, realizamos los tratamientos con fasudil 48 horas después de la transfección para que hubiese una correcta internalización de la α-syn. Nuestros resultados de citometría de flujo mostraron que el tratamiento con fasudil no afecta a la internalización o expresión del plásmido si el tratamiento se realiza 48 horas después de la transfección (Figura **26a-d**). Sin embargo, la internalización del plásmido puede verse afectada si los tratamientos se realizan antes, como 24 horas después de la transfección (Figura **26e-g**). Por lo tanto, podemos afirmar que este mecanismo no afectó a los resultados del presente estudio.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

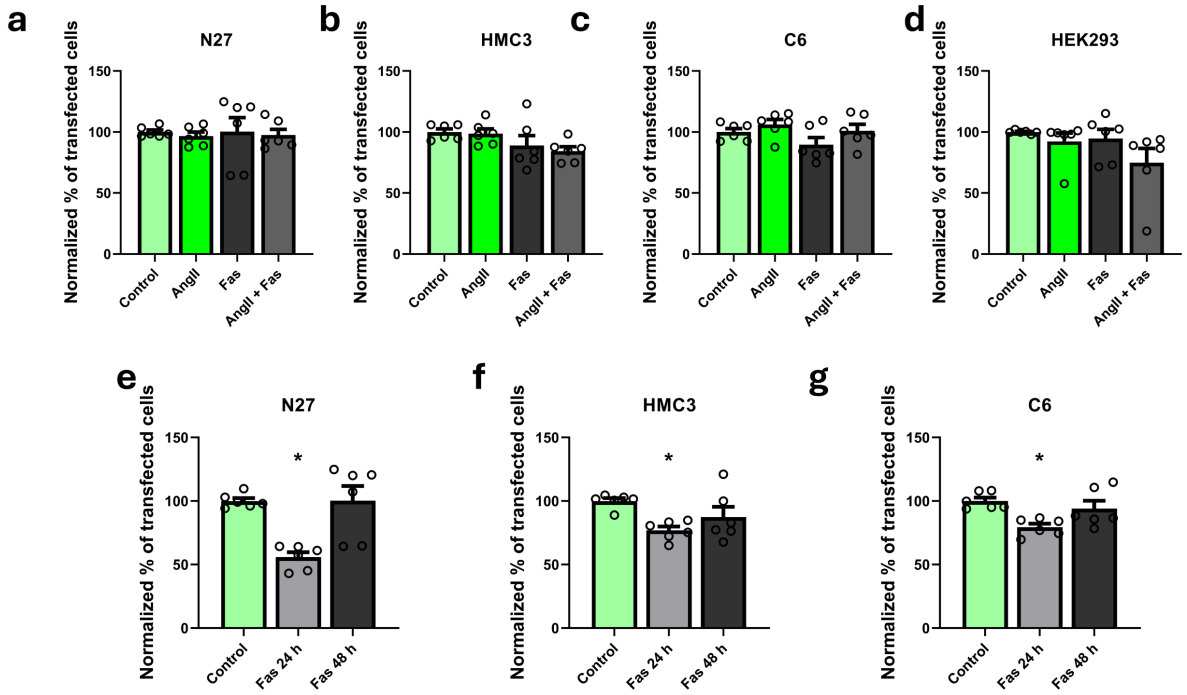


Figura 26. Efectos del fasudil en la internalización de los plásmidos. a-d. Los análisis de citometría de flujo de los distintos tratamientos celulares no muestran diferencias en la transfección de α-syn para VN-α-syn y α-syn-VC tras el tratamiento con AngII o con fasudil 48 horas después de la transfección. **e-g.** Los análisis de citometría de flujo muestran que el fasudil afecta a la transfección si el tratamiento se realiza en menos de 24 horas después de la transfección. *n*=6 mediciones independientes. Abreviaturas: AngII, angiotensina II; Fas, fasudil. * $p < 0,05$ en relación con el control. ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan el SEM.

4.2.8. Papel de fasudil en la endocitosis de α-sinucleína en la microglía

Los resultados presentados muestran que los efectos de fasudil sobre la agregación de α-syn se producen a través de la inhibición de ROCK. Por tanto, analizamos los posibles mecanismos relacionados con ROCK implicados en estos efectos. Dado que ROCK es una de las proteínas que regulan los cambios de membrana que pueden facilitar los procesos endocíticos (Kural et al., 2023), estudiamos si los efectos de fasudil pueden estar relacionados, al menos parcialmente, con alteraciones en la endocitosis celular. Realizamos cocultivos directos añadiendo células microgliales HMC3 no tratadas, tratadas con AngII, tratadas con fasudil o tratadas con AngII más fasudil a neuronas dopaminérgicas N27 que expresaban α-syn-EGFP (Figura **27**).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

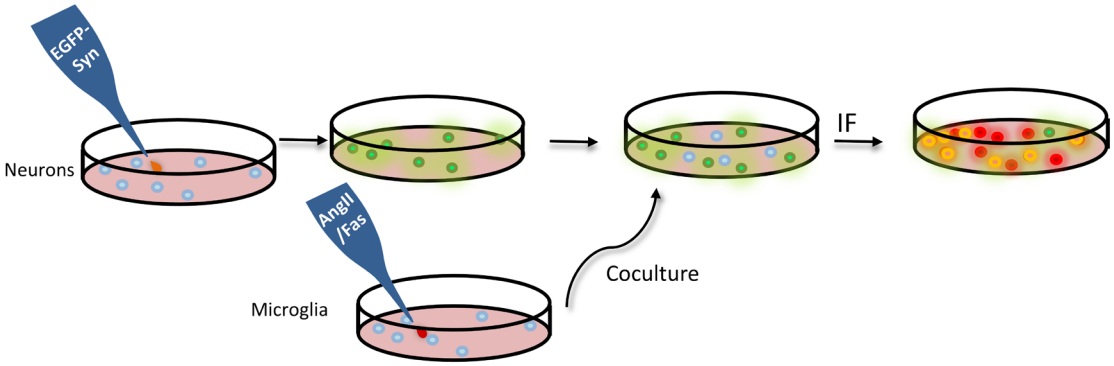


Figura 27. Representación esquemática de la incorporación de α-syn marcada con EGFP en la microglía. Las células microgliales tratadas con AngII o AngII más fasudil se cocultivan con células neuronales que expresan α-syn marcada con EGFP. A continuación, la α-syn marcada con EGFP se incorpora a la microglía, que se identifica mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo. Abreviaturas: IF, inmunofluorescencia.

Nuestros resultados revelaron que había una captación por parte de la microglía HMC3 de α-syn-EGFP-positiva desde las neuronas dopaminérgicas N27 que expresaban esta proteína. Además, observamos un aumento significativo de la microglía que presentaba α-syn-EGFP-positiva tras el tratamiento con AngII, que fue bloqueada tras el tratamiento con fasudil. Estos resultados podrían indicar que el fasudil tiene un efecto inhibidor sobre la endocitosis microglial, sin embargo, observamos que el fasudil por sí solo no tuvo ningún efecto en comparación con los controles (Figura **28a-b**). Esta diferencia puede deberse a que la AngII exacerba la actividad de la vía RhoA/ROCK dando lugar a un aumento de la endocitosis que es bloqueada por el fasudil al inhibir vía RhoA/ROCK.

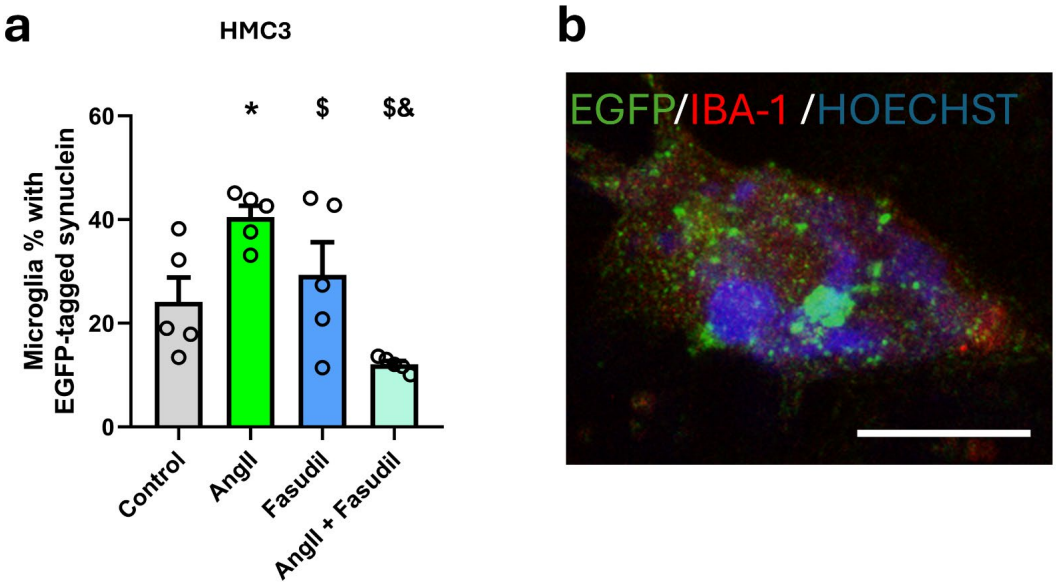


Figura 28. Efectos del fasudil sobre la endocitosis. a. La AngII aumenta significativamente la internalización de α-syn por la microglía, que se bloquea tras el tratamiento con fasudil. *n*=5 medidas independientes. * $p < 0,05$ en relación con el control. $ $p < 0,05$ en relación con AngII. & $p < 0,05$ en relación con fasudil. **b.** Imagen confocal

representativa de células HMC3 (rojo) que han internalizado α-syn (verde). Barra de escala: 12 µm. Abreviaturas: AngII, angiotensina II. ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan el SEM.

4.2.9. Inhibición del aumento de la actividad de la NADPH-oxidasa inducido por la activación del eje AngII/AT1 y la acumulación de α-sinucleína mediado por fasudil

Una vez comprobado que los efectos del fasudil sobre la agregación de la α-syn eran debidos a la inhibición de ROCK y no a efectos específicos de la molécula de fasudil, se evaluó cómo la inhibición de ROCK por parte del fasudil o el Y27632 podría afectar a la actividad NADPH-oxidasa. El estrés oxidativo derivado de la NADPH-oxidasa se ha considerado un factor importante que induce la agregación de α-syn en oligómeros (Cheng & Trombetta, 2004; Goodwin et al., 2013; Musgrove et al., 2019), lo que hemos confirmado en células neuronales N27 en esta tesis (ver resultados, apartado 4.1.4 para más detalles). Dado que tanto la activación del eje AngII/AT1 (Joglar et al., 2009; Rodriguez-Pallares et al., 2008) como la acumulación de α-syn (Hou et al., 2018) aumentan la actividad NADPH-oxidasa, estudiamos si este efecto potenciador de la actividad NADPH-oxidasa puede ser inhibido por fasudil. En células N27 que sobreexpresan α-syn, el tratamiento con AngII aumentó la actividad NADPH-oxidasa, y esto se revirtió a los valores de control (es decir, células transfectadas con vectores de transfección vacíos) tras el tratamiento con el inhibidor de ROCK fasudil (Figura **29a-b**). En células HEK293, confirmamos que la sobreexpresión de α-syn también induce un aumento de la actividad NADPH-oxidasa. Este efecto no cambia tras el tratamiento con AngII porque las células HEK293 carecen de receptores para AngII. Sin embargo, el tratamiento con fasudil inhibió el aumento de la actividad NADPH-oxidasa en las células HEK293 (Figura **29c-d**). Además, observamos que efectos similares fueron inducidos por un segundo inhibidor de ROCK, Y27632 (Figura **29a-d**), lo que reforzaría nuestra teoría de que la actividad NADPH-oxidasa está relacionada con la inhibición de ROCK y no con propiedades específicas de fasudil.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

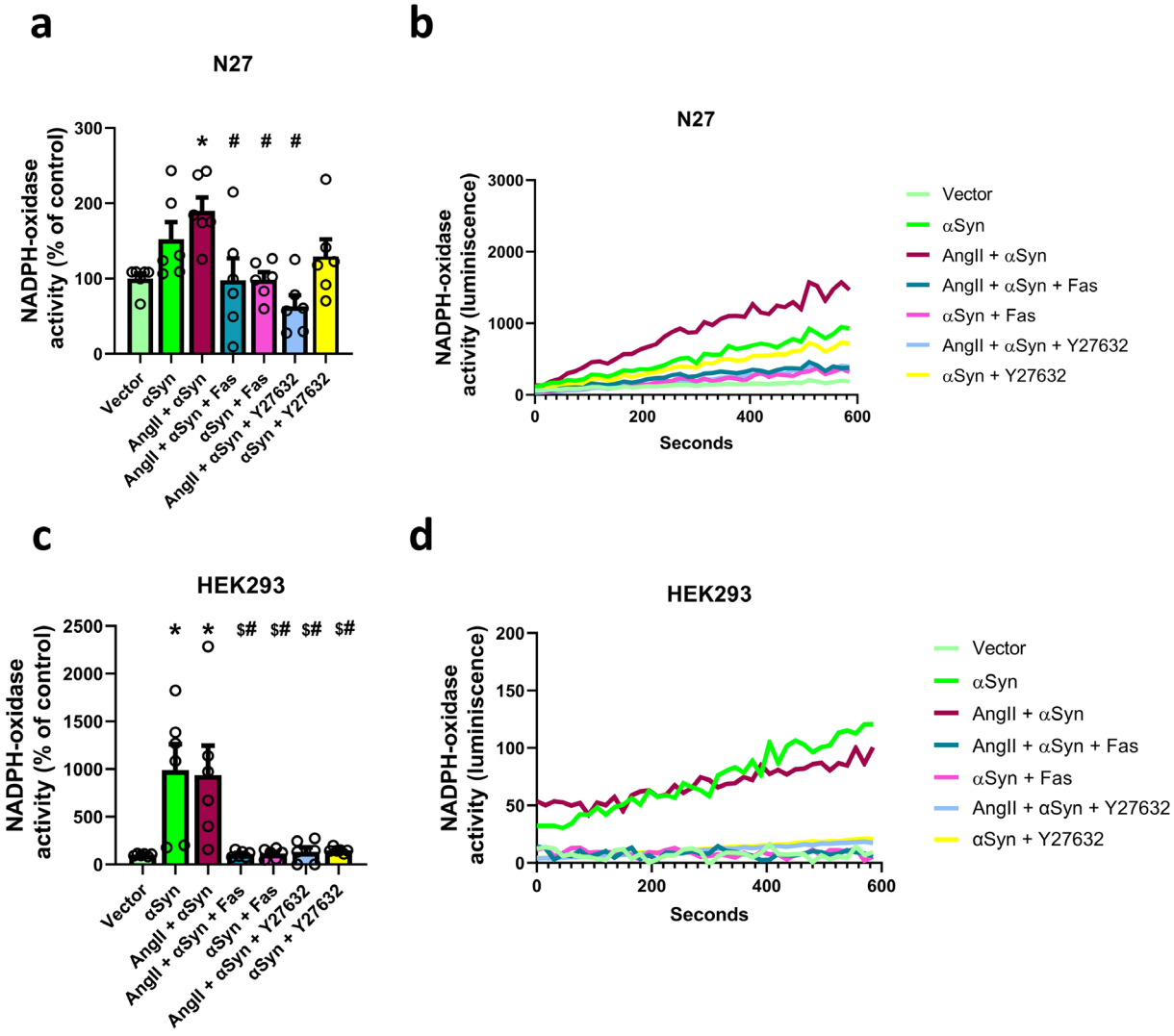


Figura 29. La activación de la NADPH-oxidasa (Nox) aumentó con la sobreexpresión de α-syn y la activación de AngII/AT1. En células N27 (**a-b**) y en células HEK293 (**c-d**), el tratamiento con fasudil o Y27632 bloqueó la activación de la NADPH-oxidasa. *n*=6 mediciones independientes. Abreviaturas: AngII, angiotensina II; αSyn, α-sinucleína; Fas, fasudil. * $p < 0,05$ en relación con el control. \$ $p < 0,05$ en relación con la α-syn. # $p < 0,05$ en relación con α-syn + AngII. ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan el SEM.

4.2.10. Efecto de fasudil en el incremento intraneuronal del calcio

Una vez comprobado el efecto del fasudil y del Y27632 sobre la actividad NADPH-oxidasa, decidimos estudiar el efecto de la inhibición de ROCK utilizando estos fármacos sobre el influjo de calcio. El incremento intraneuronal del calcio se ha relacionado con el aumento de la agregación de α-syn. En las células N27, el tratamiento con AngII produjo un aumento significativo de los niveles de calcio en relación con las células de control no tratadas. Al tratar las células tanto con el fasudil como el Y27632 se produjo un bloqueo del aumento del calcio intracelular inducido por la AngII (Figura **30a-b**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Se sabe que la activación del eje AngII/AT1 promueve el aumento del calcio intraneuronal (Gebke et al., 1998; Izumisawa et al., 2019; Wang et al., 1996). Nuestros resultados confirmaron que la AngII aumenta el calcio intracelular en las células N27, y que la inhibición de ROCK bloquea el aumento de los niveles de calcio intracelular, que promueven la agregación de α-syn.

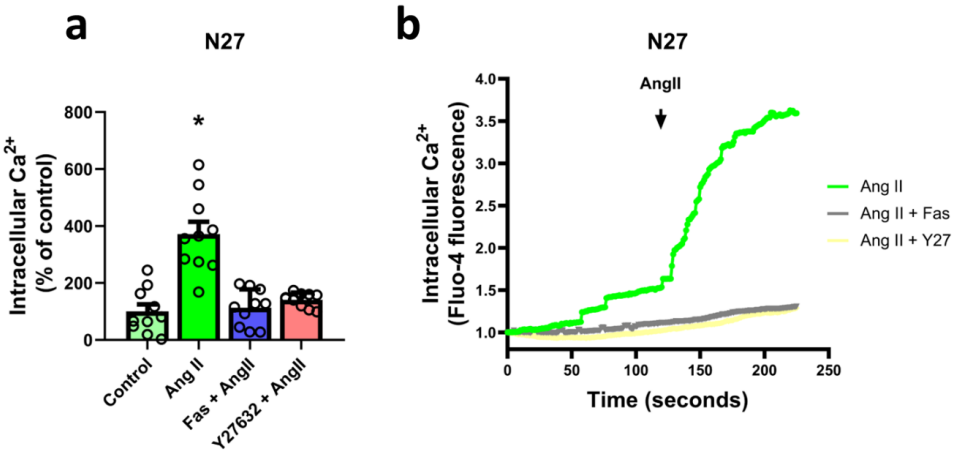


Figura 30. La liberación de calcio intracelular aumenta con la activación del eje AngII/AT1 y es bloqueada con los bloqueadores de ROCK. a-b. El tratamiento con fasudil o Y27632 bloqueó la liberación de calcio inducida por AngII. *n*=10 células sacadas con un microscopio de campo ancho. Se analizaron regiones individuales de interés para cada imagen. Abreviaturas: AngII, angiotensina II; Fas, fasudil. * p < 0,05 en relación con el control. ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey. Las barras de error representan el SEM.

4.2.11. Efecto de fasudil en la autofagia

Una vez demostrado que el aumento de la actividad NADPH-oxidasa y del influjo de calcio eran bloqueados por los inhibidores de ROCK, decidimos estudiar cómo esta inhibición podría afectar a la autofagia. Otro mecanismo por el cual la inhibición de ROCK puede reducir la acumulación de agregados de α-syn es mediante el aumento del proceso autofágico. En las células HMC3, medimos los niveles de autofagia por WB (Figura **31a-b**). La autofagia se evalúa normalmente por WB con un anticuerpo que detecta la proteína 1 asociada a microtúbulos de cadena ligera 3 beta (LC3b). Durante la autofagia, la LC3b-I soluble se convierte en LC3b-II, que se asocia a los autofagosomas. La relación entre ambas isoformas se utiliza para medir la autofagia (Mizushima & Yoshimori, 2007). Observamos que el tratamiento con fasudil aumentaba los niveles de autofagia, lo que también se observó tras el tratamiento con un inhibidor de ROCK diferente, Y27632, lo que sugiere que este efecto está mediado por la inhibición de la actividad de ROCK. Además, confirmamos los resultados mediante citometría de flujo utilizando un ensayo de autofagia comercial (Figura **31d-e**). Para comprobar la validez de los resultados obtenidos tanto por WB como por citometría de flujo, se trataron las células con el inhibidor de la autofagia bafilomicina y con el potenciador de la autofagia rapamicina (Figura **31c, f**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

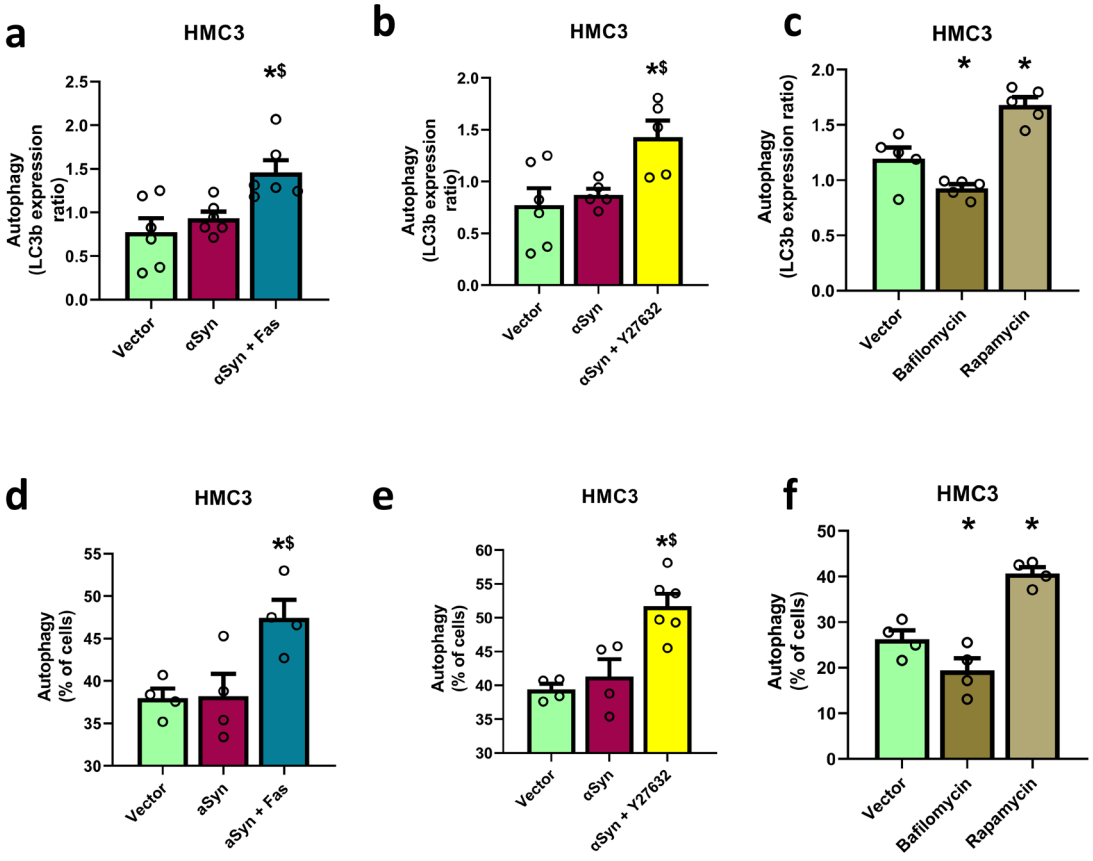


Figura 31. La autofagia en células HMC3 que sobreexpresaban α-syn aumentó con fasudil e Y27632. a-b. Cuantificación por WB que muestra que tanto el fasudil como el Y27632 aumentaron la autofagia en células HMC3 que sobreexpresaban α-syn. **c.** El tratamiento con el inhibidor de la autofagia bafilomicina conduce a una disminución significativa de la autofagia, mientras que el tratamiento con el inductor de la autofagia rapamicina conduce a un aumento significativo de la autofagia en células HMC3 medido por WB. Membrana completa representativa en el anexo I, figura suplementaria **14**. *n*=5-6 medidas independientes. **d-e.** Cuantificación por citometría de flujo que muestra que tanto el fasudil como el Y27632 aumentaron la autofagia en células HMC3 que sobreexpresan α-syn. **f.** El tratamiento con el inhibidor de la autofagia bafilomicina conduce a una disminución significativa de la autofagia, mientras que el tratamiento con el inductor de la autofagia rapamicina conduce a un aumento significativo de la autofagia en células HMC3 medido por citometría de flujo. *n*=4-6 experimentos independientes. Abreviaturas: αSyn, α-sinucleína; Fas, fasudil. * $p < 0,05$ en relación con el control. \$ $p < 0,05$ en relación con la α-syn. ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey (a-b, d-e) o prueba de Dunnet (c, f). Las barras de error representan el SEM.

4.3. AUTOANTICUERPOS AGONISTAS DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1 PROMUEVEN LA AGREGACIÓN DE α-SINUCLEÍNA EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

Como hemos visto, tanto la vía AngII/AT1 como la vía RhoA/ROCK son dos factores importantes en la agregación, acumulación y transmisión de α-syn, la cual es considerada como un factor importante en la progresión de la degeneración dopaminérgica. Sin embargo, todavía no se ha estudiado el posible efecto de los AT1-AA sobre la agregación de esta proteína. En los presentes experimentos, estudiamos esta cuestión en cultivos de neuronas dopaminérgicas y los posibles mecanismos involucrados en los efectos observados. El papel de los procesos autoinmunes en la neurodegeneración, incluida en la EP, se ha revelado recientemente (Tansey et al., 2022) y se ha sugerido que los AT1-AA actúan como agonistas de los receptores AT1 (Meyer et al., 2020; Rodriguez-Perez et al., 2021). Además, se ha observado recientemente un aumento en la expresión de AT1-AA en el suero y el LCR de pacientes con EP y modelos experimentales de EP, que se generaron durante el proceso neurodegenerativo (Labandeira et al., 2022a). Además, los AT1-AA generados en procesos inflamatorios periféricos, como el síndrome metabólico, pueden influir en la progresión de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, revelando un factor de enlace entre la inflamación periférica y la EP (Pedrosa et al., 2023). Se ha observado que los AT1-AA aumentan la progresión de la degeneración dopaminérgica (Labandeira et al., 2022a), lo que se ha relacionado con un aumento del estrés oxidativo neuronal y la neuroinflamación, dos factores principales involucrados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Labandeira et al., 2022a; Pedrosa et al., 2023).

4.3.1. Efecto de los autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina II tipo 1 en la agregación de α-sinucleína

Inicialmente analizamos el porcentaje de células con inclusiones y el número promedio de inclusiones por célula utilizando el modelo SynT/Sph1. Nuestros resultados mostraron que el número de neuronas dopaminérgicas N27 con inclusiones de α-syn aumentaba significativamente tras el tratamiento de los cultivos con AT1-AA. El tratamiento de los cultivos con losartán, inhibidor de los receptores AT1, inhibió los efectos de los AT1-AA, indicando que estos efectos estaban mediados por la sobreactivación del receptor AT1 (Figura **32a-f**). Además, el tratamiento con AT1-AA produjo un aumento significativo del número medio de inclusiones por célula. De nuevo, este efecto fue inhibido por el inhibidor del receptor AT1 losartán (Figura **32a-e, g**). Los efectos inducidos por los AT1-AA no se observaron cuando se utilizó un anticuerpo no dirigido, “indiferente” para neuronas, como el anti-GFAP (Figura **32f-g**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

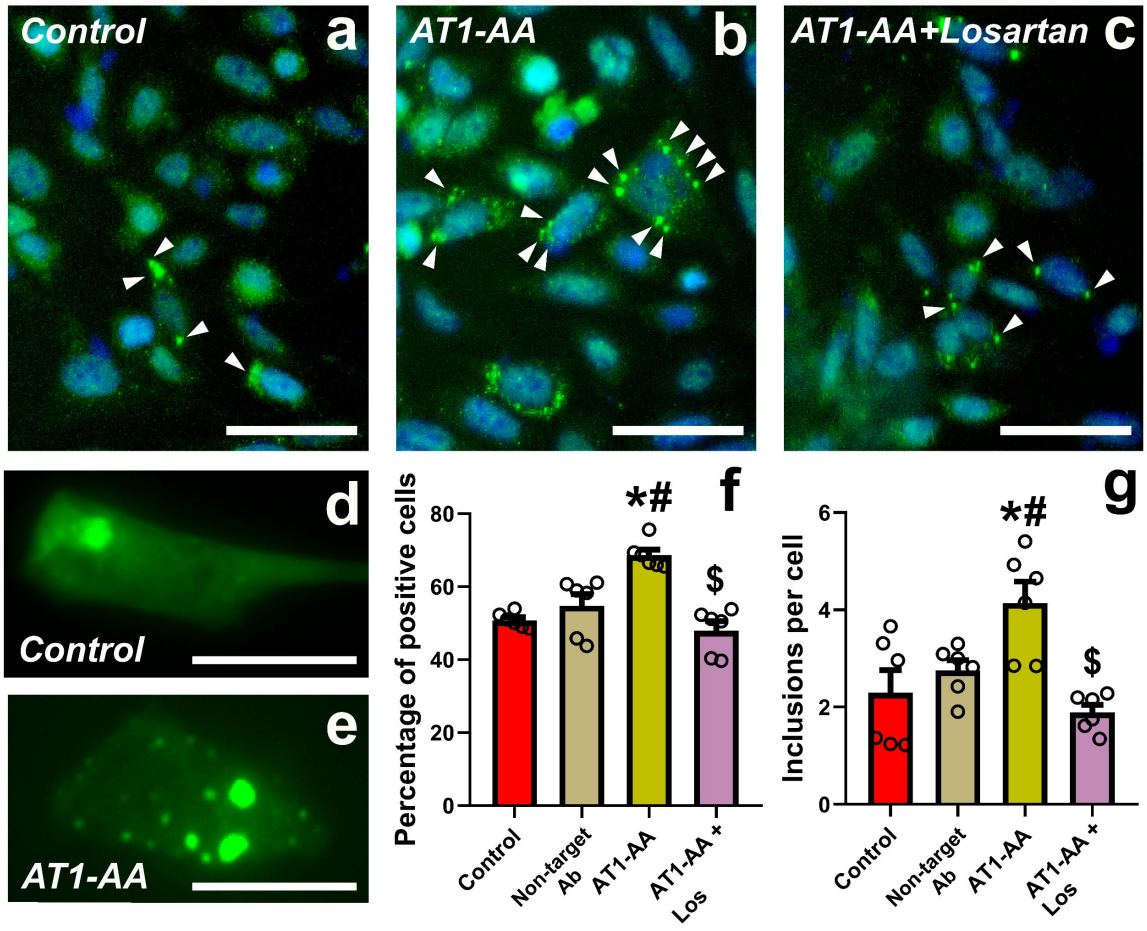


Figura 32. El tratamiento con AT1-AA aumenta la agregación de α-syn. a–e. Fotografías representativas a baja **(a–c)** y alta **(d-e)** magnificación de neuronas dopaminérgicas N27 que muestran inclusiones de α-syn (señaladas con las flechas blancas). Barras de escala: 50 µm **(a–c)** y 15 µm **(d-e)**. **f.** Porcentaje de células transfectadas que muestran inclusiones. El tratamiento con AT1-AA aumenta significativamente el porcentaje de células que presentan inclusiones. El tratamiento con losartán bloquea los efectos de los AT1-AA **(a–c, f)**. **g.** Número promedio de inclusiones por célula. El tratamiento con AT1-AA aumenta significativamente el número promedio de inclusiones por célula. Este aumento es bloqueado por el tratamiento con losartán **(a–c, g)**. *n*=6. Abreviaturas: Ab, anticuerpo; AT1-AA, autoanticuerpos para receptores AT1; Los, losartán. * $P < 0.05$ en relación con el grupo control, # $P < 0.05$ en relación con el grupo del anticuerpo "indiferente", $ $P < 0.05$ en relación con el grupo AT1-AA. ANOVA unidireccional (**f**) y análisis unidireccional por rangos de Kruskal-Wallis (**g**) y prueba *post hoc* mediante el método Student-Newman-Keuls. Las barras de error representan SEM.

En consonancia con observaciones en estudios anteriores (Labandeira et al., 2022a; Pedrosa et al., 2023), el tratamiento con AT1-AA, en ausencia de otros factores deletéreos, no produjo una reducción estadísticamente significativa del número de neuronas dopaminérgicas (Figura **33a-d**). Esta se midió como el número de células en una serie de al menos 180 imágenes analizadas en 6 experimentos diferentes. Como control positivo de la muerte celular, utilizamos un tratamiento con 20 µM de 6-OHDA en los cultivos celulares, produciendo una disminución significativa del número de células observadas (Figura **33c-d**). De nuevo, los efectos inducidos por los AT1-AA no se observaron cuando se utilizó un anticuerpo no dirigido, "indiferente" para neuronas, como el anti-GFAP (Figura **33d**). En conjunto, estos resultados confirmaron que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el tratamiento con AT1-AA aumenta la agregación de α-syn, que debe actuar de forma sinérgica con otros factores para inducir muerte neuronal significativa, al menos en las presentes condiciones experimentales.

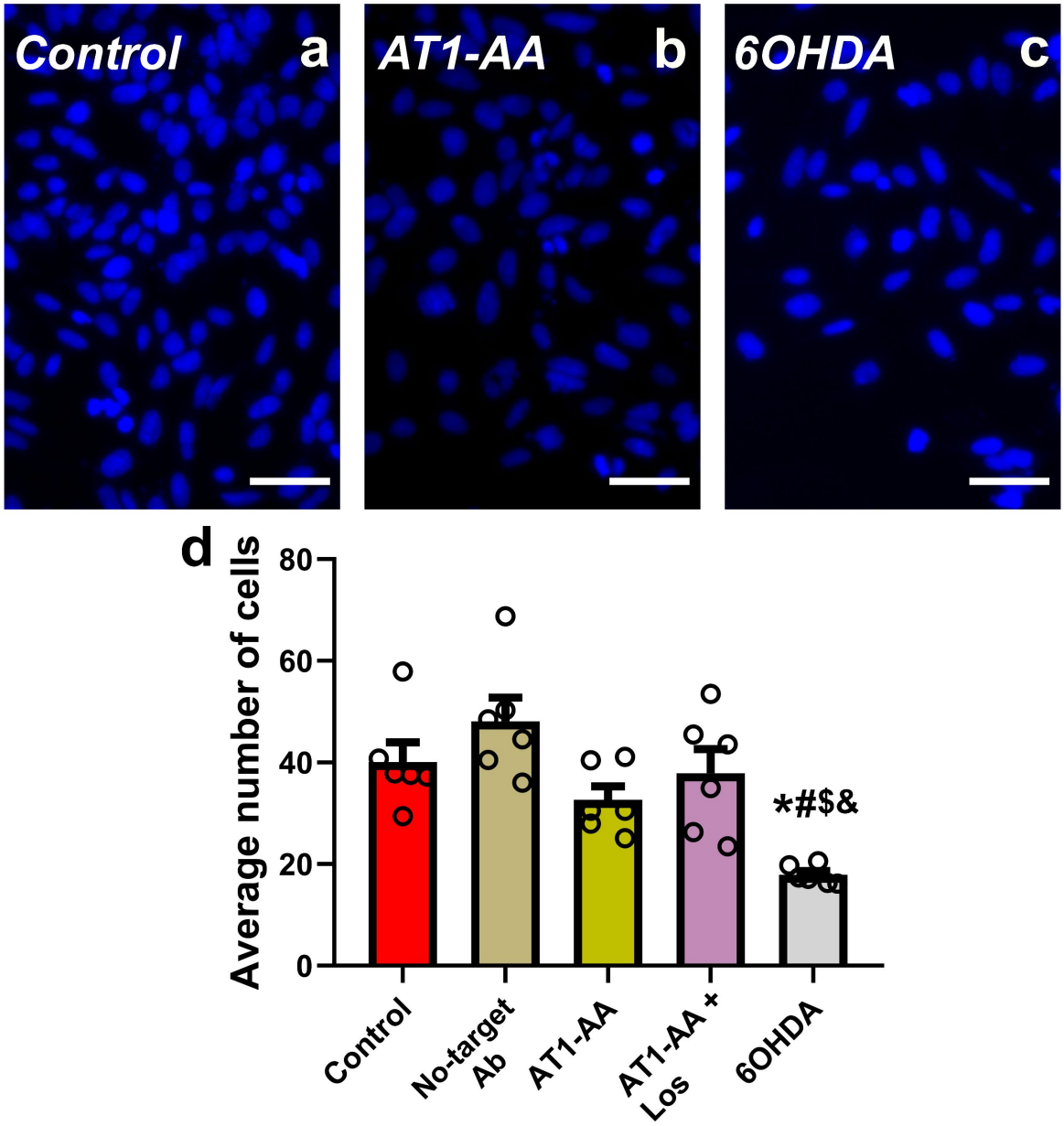


Figura 33. Número promedio de células por campo microscópico. a–d. En el modelo actual, el tratamiento con AT1-AA solo indujo una pequeña disminución no significativa en el número de neuronas dopaminérgicas. El tratamiento con dosis bajas de la neurotoxina dopaminérgica 6-OHDA (20 µM) disminuyó significativamente el número de células y se utilizó como control positivo. Las neuronas fueron identificadas y contadas mediante tinción con Hoechst **a–c**; *n*=6. Barras de escala: 50 µm. Abreviaturas: Ab, anticuerpo; AT1-AA, autoanticuerpos contra receptores AT1; Los, losartán. * $P < 0.05$ en relación con el grupo control, # $P < 0.05$ en relación con el grupo del anticuerpo "indiferente", $ $P < 0.05$ en relación con el grupo AT1-AA, & $P < 0.05$ en relación con el grupo AT1-AA + Los. ANOVA unidireccional y prueba *post hoc* mediante el método Student-Newman-Keuls. Las barras de error representan SEM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.2. Papel del aumento del calcio intracelular en el aumento de la agregación de α-sinucleína inducida por autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina II tipo 1

En estudios anteriores, el aumento de los niveles de calcio intracelular se ha relacionado con la agregación de α-syn, y este aumento puede estar causado por la activación del receptor AT1 mediante la unión de su efector principal AngII (ver sección discusión, apartado 5.3. para más detalles). Para observar si estos efectos se producían también al tratar las neuronas con AT1-AA, medimos los niveles de calcio intracelular utilizando un sensor fluorescente comercial que aumenta su emisión de luz cada vez que se incrementan los niveles de calcio intracelular (Figura **34a-f**). Observamos un marcado aumento de los niveles de calcio intracelular tras el tratamiento con AT1-AA, que fue inhibido por el tratamiento con el inhibidor del receptor AT1 losartán (Figura **34a-h**). En las neuronas dopaminérgicas, nuestros resultados indican que los AT1-AA aumentan los niveles intracelulares de calcio, lo que puede potenciar la agregación de α-syn.

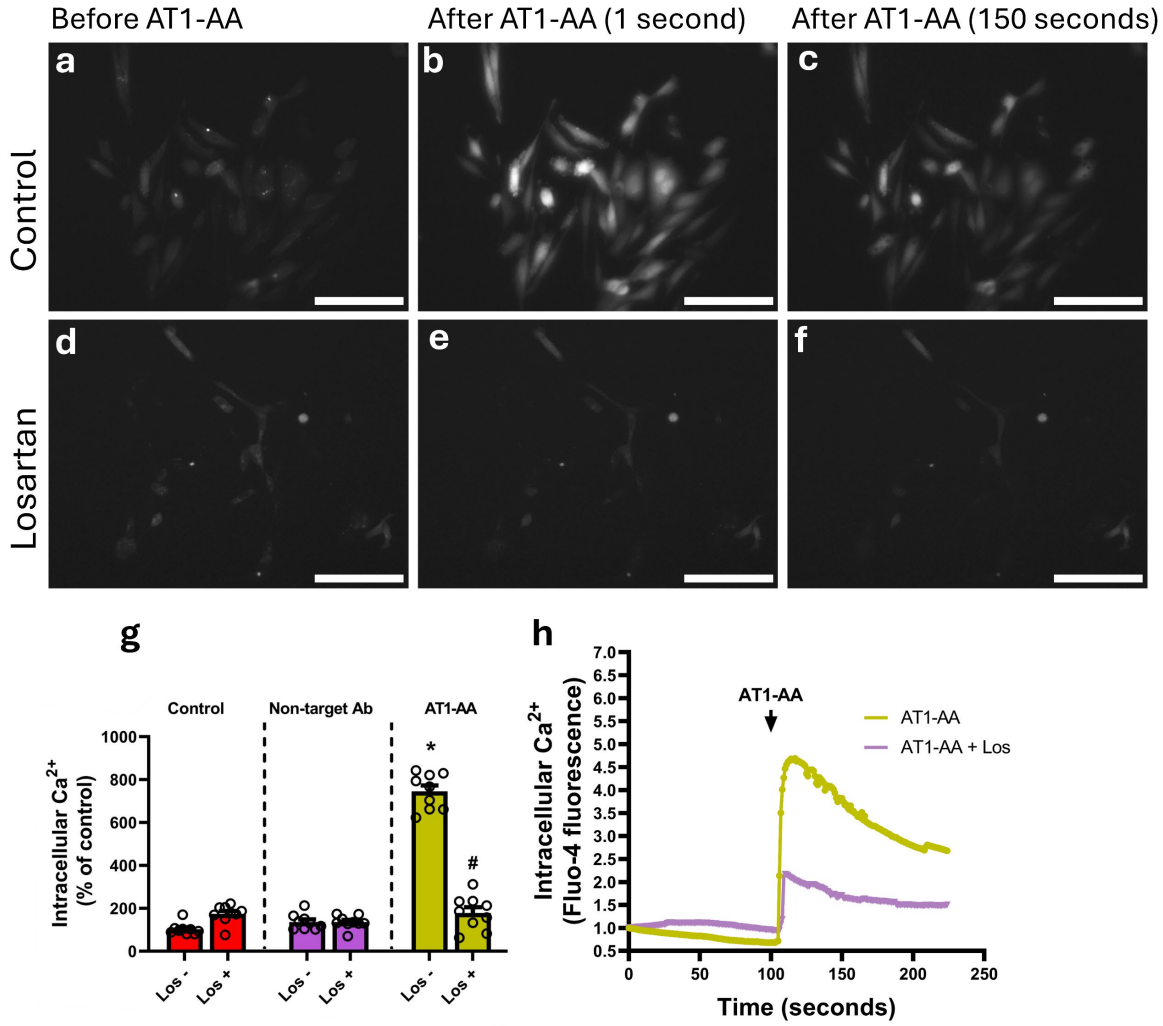


Figura 34. Los AT1-AA aumentan los niveles de calcio intracelular. a-c. Imágenes representativas sacadas con un microscopio de campo ancho de células vivas tratadas con Fluo-4 AM que muestran un aumento de la

fluorescencia después de la adición de AT1-AA. Barras de escala: 50 µm. **d-f.** Imágenes representativas sacadas con un microscopio de campo ancho de células vivas tratadas con Fluo-4 AM y el inhibidor del receptor AT1 losartán que muestran que el tratamiento con AT1-AA no indujo un aumento significativo de la fluorescencia en presencia de losartán. Barras de escala: 50 µm. **g-h.** El tratamiento con losartán inhibió el efecto de los AT1-AA sobre la liberación de calcio intracelular; no se observaron cambios significativos en las células control tratadas con losartán ni en las células tratadas con el anticuerpo "indiferente", tanto en presencia como en ausencia de losartán. *n*=10 células sacadas con un microscopio de campo ancho. Se analizaron regiones individuales de interés para cada imagen. Abreviaturas: Ab, anticuerpo; AT1-AA, autoanticuerpos contra receptores AT1; Los, losartán. * P < 0,05 en relación con el grupo control (con/sin losartán) y con las células control tratadas con un anticuerpo "indiferente" (con/sin losartán), # P < 0,05 en relación con el grupo AT1-AA. Análisis bidireccional por rangos de Kruskal-Wallis y prueba *post hoc* mediante el método de Bonferroni. Las barras de error representan SEM.

4.3.3. Papel del aumento de la activación de la NADPH-oxidasa en el aumento de la agregación de α-sinucleína inducida por autoanticuerpos agonistas del receptor de angiotensina II tipo 1

En estudios anteriores, el estrés oxidativo inducido por el superóxido derivado del NADPH-oxidasa se ha relacionado con la agregación de α-syn. La activación de la NADPH-oxidasa puede estar causada por la activación del receptor AT1 por parte de la AngII (ver sección discusión, apartado 5.3. para más detalles). Por tanto, estudiamos si, bajo nuestras condiciones experimentales, estos efectos se producían al tratar nuestras neuronas con los AT1-AA. Observamos que el tratamiento con AT1-AA produjo un aumento de la actividad NADPH-oxidasa que fue inhibida por el tratamiento con el inhibidor del receptor AT1 losartán (Figura **35a-b**). En las neuronas dopaminérgicas, nuestros resultados indican que los AT1-AA aumentan la actividad de la NADPH-oxidasa, lo que puede potenciar la agregación de α-syn.

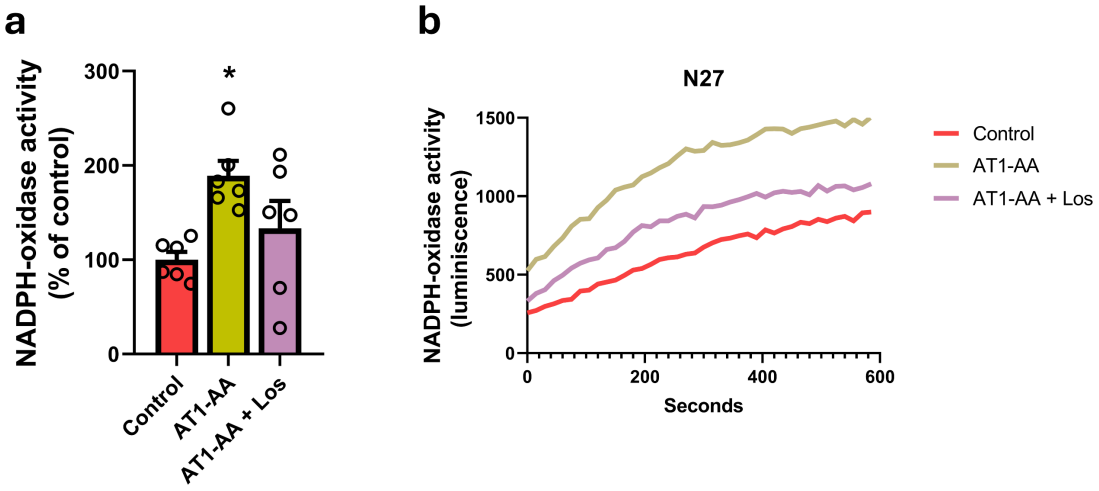


Figura 35. Los AT1-AA aumentan la actividad de la NADPH-oxidasa. a-b. El tratamiento con losartán inhibió el efecto de los AT1-AA sobre la activación de la NADPH-oxidasa. *n*=6 mediciones independientes. Abreviaturas: AT1-AA, autoanticuerpos contra receptores AT1; Los, losartán. * P < 0,05 en relación con el control. ANOVA unidireccional y prueba *post hoc* mediante el método Student-Newman-Keuls. Las barras de error representan SEM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. DISCUSIÓN

5.1. LA AGREGACIÓN Y TRANSMISIÓN DE α-SINUCLEÍNA NEURONAL Y GLIAL ESTÁ MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1

5.1.1. El tratamiento con angiotensina II aumenta el porcentaje de células con inclusiones y el tamaño medio de las inclusiones en células neuronales y microgliales

La α-syn se expresa principalmente en el cerebro, particularmente en neuronas y, a niveles más bajos, en células gliales, y en varios órganos periféricos. Aunque la α-syn se expresa principalmente en neuronas, se observaron agregados de α-syn en astrocitos en varias enfermedades neurodegenerativas (Sorrentino et al., 2019), y se ha sugerido que las células microgliales captan y degradan la α-syn liberada por las neuronas (Choi et al., 2020). Se considera comúnmente que las células gliales acumulan agregados de α-syn al captar α-syn extracelular secretada por neuronas para regular la homeostasis de α-syn en el cerebro (Lee et al., 2010; Lindström et al., 2017). En la presente tesis, hemos demostrado la capacidad para la formación de agregados/inclusiones no solo por neuronas dopaminérgicas N27, sino también por astrocitos, microglía y células HEK293 mediante microscopía de fluorescencia y diversos tipos de WB (Figura **9**). Con respecto al tamaño y número de inclusiones, observamos cambios dependiendo del tipo celular, con un mayor número de agregados más pequeños en neuronas dopaminérgicas N27, y un menor número de agregados más grandes en células HEK293 (Figura **10**). Como se ha mencionado, la α-syn se expresa principalmente en neuronas, lo cual es consistente con nuestros resultados. Se ha documentado que tanto los astrocitos como la microglía son encargados de degradar la α-syn mediante el complejo UPS o la autofagia (Bussi et al., 2017; Choi et al., 2020; Loria et al., 2017; Rostami et al., 2021; Sorrentino & Giasson, 2020b). En consecuencia, un menor número de agregados de mayor tamaño tanto en las HMC3 como en las C6 podría deberse a una acumulación de oligómeros de α-syn preparados para su degradación mediante autofagia. Además, con respecto a las HEK293, el mayor tamaño de las inclusiones observadas podría deberse a que estas células tienen una mayor capacidad de transfección, por lo que esto conlleva a una mayor expresión y acumulación de α-syn agregada. En el presente estudio sólo se midieron los niveles de α-syn exógena. Los niveles endógenos de α-syn fueron muy bajos o incluso no detectables en membranas de WB (Anexo I, figura suplementaria **8a-i**). En las membranas donde se puede detectar, los niveles están consistentemente por debajo del 4 % de la α-syn total. De hecho, la literatura previa también mostró niveles muy bajos de α-syn endógena en células dopaminérgicas N27, lo que básicamente se ignoró (Kaul et al., 2005). Por lo tanto, consideramos que los efectos de la α-syn endógena son insignificantes en relación con los niveles totales.

Nuestros resultados muestran que la activación del eje AngII/AT1 afecta a la agregación de α-syn. En modelos *in vitro*, observamos que la activación de los receptores AT1 por AngII conduce a un aumento en la agregación de α-syn en neuronas y células microgliales (Figura

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10). Como se esperaba, no se observaron efectos en células HEK293, que carecen de receptores AT1. Sin embargo, no detectamos ningún aumento significativo en la agregación de α-syn en astrocitos C6 después del tratamiento con AngII. Una posible explicación es que los astrocitos ya producen angiotensinógeno/AngII, siendo la principal fuente cerebral de AngII (Dominguez-Meijide et al., 2017; Stornetta et al., 1988). En cultivos de astrocitos primarios o células astrogliales C6, se ha demostrado previamente que el tratamiento con AngII exógena indujo una disminución en los niveles de angiotensinógeno astroglial y una regulación negativa de los receptores AT1, que fue inhibida por el tratamiento simultáneo con el bloqueador AT1 candesartán, lo que sugiere un mecanismo de retroalimentación de regulación de la producción endógena de angiotensinógeno por altos niveles de AngII extracelular (Dominguez-Meijide et al., 2017). Esto puede contrarrestar y atenuar los efectos del tratamiento de cultivos C6 con AngII exógena adicional en los presentes experimentos. Trabajos previos realizados en células de neuroglioma señalaron efectos opuestos de AngII en la agregación de α-syn (Grammatopoulos, et al., 2007b), sin embargo, según nuestros resultados, los efectos de AngII sobre la agregación de α-syn varían según el tipo de célula. Las neuronas son las células que sufren los efectos de la EP, y estos cambios pueden ser especialmente dañinos para ellas, ya que AngII a través de los receptores AT1 no solo conduce a una mayor agregación de α-syn, sino también a una mayor respuesta neuroinflamatoria en el cerebro y una mayor producción de ROS, que pueden conducir a una mayor muerte neuronal (Borrajo et al., 2014b; Choi et al., 2020; Labandeira-Garcia et al., 2014, 2015). Fortaleciendo nuestros hallazgos, otros grupos han propuesto que el tratamiento con Ang(1-7) puede reducir la agregación de α-syn (Gao et al., 2022). Además, nuestro grupo y otros han mostrado que Ang(1-7) a través del MasR y AngII a través de los receptores AT2 tienen efectos opuestos a los de AngII a través de los receptores AT1 (Bader, 2013; Costa-Besada et al., 2018; Labandeira-Garcia et al., 2017; Villela et al., 2015).

5.1.2. La activación de la NADPH-oxidasa y el aumento del calcio intracelular, median el aumento inducido por el eje AngII/AT1 en la agregación de α-sinucleína

Varios mecanismos pueden estar involucrados en el aumento de la agregación de α-syn por sobreactivación del eje AngII/AT1. El aumento de la expresión o fosforilación de α-syn puede afectar la agregación (Anderson et al., 2006; Kawahata et al., 2022). En un cerebro sano, la mayor parte de la α-syn no está fosforilada, mientras que la α-syn agregada en LB está principalmente fosforilada en S129, por lo que la fosforilación de la α-syn puede afectar a su agregación. Sin embargo, observamos que los cambios en las diferentes líneas celulares después del tratamiento con AngII no se deben a cambios inducidos por AngII en la expresión o fosforilación de α-syn ni a cambios en el proceso de transfección de la α-syn (Figura **11**), por lo que estos resultados sugieren que las variaciones en la agregación de la α-syn con los diferentes tratamientos podrían estar mediadas por la activación de otros mecanismos celulares.

Curiosamente, estudios previos han observado que el estrés oxidativo, particularmente el inducido por el superóxido derivado de la NADPH-oxidasa, promueve la agregación de α-syn en oligómeros (Cheng & Trombetta, 2004; Goodwin et al., 2013; Musgrove et al., 2019). Además, el aumento del calcio libre intracelular también promueve la agregación de α-syn (Rcom-H'cheo-Gauthier et al., 2016), y tanto el calcio como el estrés oxidativo cooperan para mejorar sinérgicamente la agregación de α-syn (Goodwin et al., 2013), de modo que la unión del calcio por sí solo induce agregados no estables, mientras que el calcio junto con el estrés

oxidativo induce agregados más grandes y estables (Nath et al., 2011; Rcom-H'cheo-Gauthier et al., 2016). Por el contrario, la agregación de α-syn eleva los niveles de calcio y el estrés oxidativo (Dryanovski et al., 2013; Hettiarachchi et al., 2009), lo que puede dar lugar a un círculo vicioso. Es bien sabido que un mecanismo principal inducido por la activación del eje AngII/AT1 es el aumento en la generación de superóxido derivado de la activación del complejo NADPH-oxidasa, que produce altos niveles de superóxido en las células responsables de la respuesta inflamatoria, como las células microgliales, y niveles más bajos de superóxido en las células residentes en los tejidos, como las neuronas (Babior, 2004). Además, la interacción entre el superóxido derivado de la NADPH-oxidasa y las mitocondrias, a través de los canales de potasio sensibles al ATP mitocondrial (mitoKATP), induce un aumento adicional en los niveles de ROS celulares, como se muestra en varios tipos de células, incluidas las neuronas dopaminérgicas (Rodriguez-Pallares et al., 2012; Zawada et al., 2011). La actividad del eje AngII/AT1 también induce un aumento persistente del calcio citosólico en neuronas y células gliales (Gebke et al., 1998; Izumisawa et al., 2019; Wang et al., 1996). Un efecto sinérgico del aumento de superóxido y calcio puede explicar el aumento inducido por el eje AngII/AT1 en la agregación de α-syn observado en la presente tesis. En nuestros experimentos, demostramos que la activación de la NADPH-oxidasa y los cambios en la homeostasis del calcio inducidos por la activación del eje AngII/AT1 median el aumento de la agregación de α-syn en las neuronas dopaminérgicas, que es bloqueada por los inhibidores de la NADPH-oxidasa y los inhibidores del influjo de calcio (Figura **12**). También es interesante observar que, en nuestros experimentos, el tratamiento sólo con losartán no condujo a cambios significativos en la agregación de α-syn en las neuronas dopaminérgicas y las células gliales. Estudios previos han propuesto que el losartán solo puede interactuar con proteínas amiloides como β-amiloide y α-syn a través de mecanismos independientes de la vía AngII/AT1 (Chen et al., 2021; Liu et al., 2022). En nuestros modelos, no observamos estas interacciones propuestas, lo que sugiere que los efectos del losartán dependen de su inhibición de la vía AngII/AT1.

5.1.3. Presencia de agregados de α-sinucleína en el modelo murino de parkinsonismo por MPTP y efectos de la modulación de SRA en estos agregados

Como se mencionó anteriormente, hay cierta controversia sobre la presencia de agregados de α-syn en el modelo de ratón MPTP, que probablemente está relacionada con las condiciones experimentales, particularmente las dosis, el curso temporal de la administración de MPTP y el método utilizado para detectar los agregados de α-syn (Alvarez-Fischer et al., 2008; Gibrat et al., 2009; Jethva et al., 2011). En el modelo de MPTP subagudo utilizado en el presente trabajo, observamos claramente un aumento significativo en la expresión de α-syn y agregados en la SN y el CE, que se observaron particularmente en neuronas y terminales dopaminérgicas, pero también en astrocitos y microglía (Figura **13**).

En consonancia con las observaciones *in vitro*, la activación del eje AngII/AT1 está involucrada en el aumento de la expresión y agregación de α-syn en ratones tratados con MPTP, ya que disminuyeron significativamente en ratones tratados con el antagonista de los receptores AT1 telmisartán y en ratones KO AT1 (Figura **14**). Esto es consistente con el aumento bien conocido del estrés oxidativo y de la respuesta neuroinflamatoria microglial que media la neurotoxicidad del MPTP (Joglar et al., 2009; Wu et al., 2003), y particularmente con estudios previos de nuestro grupo y otros grupos que muestran que los bloqueadores del receptor AT1 inhiben el estrés oxidativo y la neuroinflamación en el modelo de ratón MPTP, lo que lleva a una reducción en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Joglar et al., 2009; Zawada

et al., 2011). Esto está respaldado además por la observación de que la generación de estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas tratadas con MPP^+ ocurre como una cascada dependiente de la NADPH-oxidasa que involucra tanto al superóxido derivado de la NADPH-oxidasa como al mitocondrial y que esto es inhibido por el tratamiento con bloqueadores del receptor AT1 (Gao et al., 2003; Rodriguez-Pallares et al., 2012; Wu et al., 2003; Zawada et al., 2011). En consonancia con esto, también se observó que el MPP^+ puede actuar directamente sobre los astrocitos mejorando la producción de angiotensinógeno/AngII (Dominguez-Meijide et al., 2017). Tanto el estrés oxidativo (Goodwin et al., 2013) como la neuroinflamación (Tanji et al., 2001) promueven la expresión y agregación de α-syn, y ambos son inducidos por el tratamiento con MPTP y mejorados por la activación de AT1 (Joglar et al., 2009; Zawada et al., 2011), lo que respalda los resultados observados en los presentes experimentos en ratones.

Varios estudios previos han observado que las inclusiones murinas inducidas por MPTP parecían diferentes de los LB nigrales clásicos, y se parecían mucho a las inclusiones corticales humanas y a los gránulos inmunorreactivos a α-syn con núcleo granular denso de los LB nigrales clásicos, lo que sugiere que las inclusiones inducidas por MPTP pueden reflejar las etapas iniciales en la formación de los LB nigrales (Kowall et al., 2000; Meredith et al., 2002, 2004). Es interesante considerar que la mayoría de la literatura relacionada con la estructura de los agregados de α-syn en ratones tiene al menos diez años más que los estudios más recientes sobre la estructura de los agregados de α-syn en humanos. Esto implica que las nuevas técnicas que permitieron una determinación más clara de las estructuras de los LB humanos, como la microscopía crioelectrónica o la microscopía STED, aún no se han utilizado en el modelo de ratones MPTP (Moors et al., 2021; Shahmoradian et al., 2019; Trinkaus et al., 2021). Estos estudios recientes en humanos muestran la presencia de orgánulos abarrotados y membranas lipídicas entre los filamentos de α-syn, con LB que albergan altas cantidades de lípidos (Moors et al., 2021; Shahmoradian et al., 2019). Estas observaciones pueden indicar similitudes más cercanas entre las inclusiones de α-syn en ratones tratados con MPTP y LB humanos de lo que se pensaba anteriormente. En estudios futuros, una caracterización detallada de las inclusiones inducidas por MPTP utilizando las nuevas metodologías mencionadas anteriormente sería interesante para un mejor conocimiento de las diferencias entre las inclusiones inducidas por MPTP y los LB nigrales humanos. En cualquier caso, los resultados actuales muestran que los bloqueadores de AT1 disminuyen significativamente la presencia de estas posibles formas iniciales de patología de LB en el modelo de ratón MPTP.

5.1.4. Efectos de angiotensina II sobre la liberación y captación de α-sinucleína entre diferentes líneas celulares

En el presente estudio, realizamos un análisis detallado de la transmisión de α-syn entre neuronas dopaminérgicas, astrocitos y microglía utilizando un modelo transwell y el método BiFC VNsyn/synVC en ausencia y presencia de AngII. Los resultados mostraron un alto nivel de transferencia de α-syn entre neuronas dopaminérgicas N27, que es significativamente mayor que la transferencia de α-syn entre BV2/BV2 y C6/C6 (Figura **16a-b**). También observamos una alta liberación de α-syn de las células dopaminérgicas N27 cuando se mezclan con células BV2 y C6 (Figura **16c-d**). Igualmente, observamos una pequeña captación de α-syn por parte de las células BV2 (Figura **16e-f**) y un aumento significativo de la captación de α-syn por parte de las C6 (Figura **16g-h**) cuando se mezclaron con las células N27, lo que apunta a una mayor captación de α-syn por estos tipos de células gliales en presencia de neuronas dopaminérgicas N27. También pudimos observar una tendencia, no estadísticamente significativa, de la

transferencia de α-syn de las células BV2 a las células C6, lo cual podría indicar una posible vía de transferencia de α-syn de la microglía a los astrocitos. Los presentes resultados son consistentes con la hipótesis de una fuerte transmisión de α-syn de las neuronas a los astrocitos y la microglía y una transmisión menos eficiente de la glía a las neuronas. La mayor captación de α-syn por parte de las células astrogliales, tal y como se observa en este estudio, coincide con estudios previos (Loria et al., 2017) en donde han demostrado que los astrocitos desempeñan un papel clave en la degradación de α-syn, impidiendo su propagación y la progresión de la enfermedad.

También observamos que el tratamiento de cocultivos con AngII indujo cambios en la transmisión de α-syn de célula a célula. Curiosamente, aunque AngII indujo un aumento en el tamaño y número de agregados en neuronas dopaminérgicas N27, el tratamiento con AngII no condujo a cambios significativos en la tasa de transferencia de α-syn de neuronas N27 a células gliales (Figura **17a-b**), lo que puede conducir a un aumento adicional en la acumulación de agregados en neuronas dopaminérgicas después de la activación del eje AngII/AT1. Sin embargo, AngII condujo a una mayor captación de α-syn por las células microgliales BV2 cuando se mezclaron con células C6 o neuronas dopaminérgicas N27 (Figura **17c-d**), lo que sugiere que AngII aumenta la capacidad de las células microgliales para capturar α-syn. Además, cuando se añadió AngII al cultivo, la captación de α-syn por las células astrogliales C6 mostró una tendencia a disminuir en presencia de células BV2 (que mostraron un aumento significativo inducido por AngII en la captación de la α-syn desde los astrocitos). Además, AngII indujo un aumento significativo en la transferencia de α-syn entre las células astrogliales C6 (Figura **17e-f**). Los mecanismos responsables de los efectos observados aún deben aclararse totalmente. Estudios previos han demostrado que el estrés oxidativo, y particularmente el aumento del superóxido derivado de NADPH, mejoró la transmisión de α-syn de célula a célula (Luk, 2019; Musgrove et al., 2019) y la activación del complejo NADPH-oxidasa es un mecanismo principal involucrado en los efectos del eje AngII/AT1 (ver arriba). Además, la activación del eje AngII/AT1 aumenta la respuesta proinflamatoria microglial (Borrajo et al., 2014b; Rodriguez-Perez et al., 2015), lo que es consistente con el marcado aumento inducido por AngII en la captación microglial de α-syn observado en los presentes experimentos. La clarificación de los mecanismos moleculares involucrados en la transmisión de α-syn de célula a célula es esencial para desarrollar terapias efectivas para la EP y otras sinucleopatías. Un punto importante es aclarar si, efectivamente, las células gliales, particularmente los astrocitos, promueven la eliminación de α-syn o pueden contribuir a su propagación a las neuronas. Como se ha mencionado, los resultados actuales apoyan la función de depuración, al menos en nuestro modelo. También se ha sugerido que los astrocitos y la microglía pueden captar y degradar inicialmente los agregados de α-syn, pero pueden ser finalmente incapaces de lograr la eliminación total, lo que lleva a la acumulación intracelular y su transferencia a otras células (Choi et al., 2020; Miyazaki & Asanuma, 2020). Además, la incorporación de especies de α-syn por los astrocitos y la microglía puede promover respuestas neuroinflamatorias y la progresión de la enfermedad (Bido et al., 2021; Kim et al., 2013; Tu et al., 2021).

Nuestros resultados en microglía muestran una tendencia mayor a capturar α-syn en presencia de AngII, además el tratamiento con AngII conduce a un aumento en el número de células que manifiestan agregados y en el tamaño de dichos agregados. Estos resultados confirman los hallazgos de otros grupos que proponen que las células microgliales capturan α-syn liberada por neuronas para su degradación por autofagia (Choi et al., 2020). La AngII, a través de los receptores AT1, conduce a la activación microglial y a efectos proinflamatorios

(Labandeira-Garcia et al., 2017; Rodriguez-Pallares et al., 2008). Se ha propuesto que la α-syn, a través de la activación de los receptores tipo Toll, TLR4 o TLR2 (Chavarría et al., 2022; Fellner et al., 2013; Kim et al., 2013), también puede conducir a la activación de la microglía. La internalización de α-syn por la microglía depende en parte de los receptores TLR4, a diferencia de los astrocitos (Kim et al., 2021; Rannikko et al., 2015). Se ha demostrado que la AngII, a través de la AT1, aumenta la expresión de TLR4 y que la activación microglial inducida por la AngII se redujo en ratones deficientes en TLR4 (Rietdijk et al., 2016). Esta interacción entre TLR4, AngII y la internalización de α-syn puede explicar las diferencias que la adición de AngII muestra en nuestros experimentos en astrocitos y células microgliales.

La transferencia de célula a célula de α-syn puede ocurrir a través de varios mecanismos propuestos. Estos incluyen difusión pasiva (Grozdanov & Danzer, 2018), transporte a través de proteínas transportadoras (Yang et al., 2017), exo- y endocitosis (Lee et al., 2005), y exosomas o nanotubos tunelizadores (Abounit et al., 2016; Emmanouilidou et al., 2010). En nuestro diseño experimental, la membrana del sistema transwell tiene un diámetro de poro de 400 nm y un ancho nominal de 10 µm, manteniendo más de 200 µm de separación entre la membrana del transwell y el fondo del pocillo de la placa celular. El transporte por nanotubos tunelizadores no es probable debido a la distancia entre las células cultivadas en la membrana transwell y en el fondo del pocillo de la placa celular. La membrana transwell también puede limitar el transporte por vesículas de diámetros superiores a 400 nm (Vallabhaneni et al., 2012). Con respecto a los exosomas (que tienen un diámetro promedio de 100 nm), se ha informado que los transwell pueden reducir su difusión (Thayanithy et al., 2017). Por lo tanto, los principales mecanismos restantes de transferencia de α-syn de célula a célula son la difusión pasiva, la transferencia a través de proteínas transportadoras y la exo- y endocitosis. En este modelo, la transferencia de α-syn de célula a célula puede ocurrir tanto para las formas oligoméricas como monoméricas de α-syn (Dominguez-Meijide et al., 2020; Uemura et al., 2020).

Por tanto, nuestros hallazgos indican que la activación del eje AngII/AT1 favorece tanto la agregación como la transmisión de α-syn en células neuronales y gliales, principalmente a través de mecanismos mediados por el estrés oxidativo y el aumento de calcio intracelular. Observamos que la activación de los receptores AT1 por parte de AngII produce un incremento significativo en el tamaño y número de agregados de α-syn en neuronas dopaminérgicas y en la microglía. Además, hemos observado que la AngII potencia la captación de α-syn por parte de las células gliales, especialmente microglía, lo cual podría contribuir a la propagación patológica de α-syn en el cerebro. Asimismo, demostramos que el bloqueo de AT1 por parte del tratamiento con losartán, no tiene un efecto directo sobre la agregación de α-syn en las células, pero sí reduce los efectos patológicos mediados por la vía AngII/AT1. Esto sugiere que el losartán, al inhibir la señalización de AngII, podría ser útil para mitigar indirectamente la agregación y la difusión de α-syn en entornos donde esta vía se encuentra hiperactivada. Nuestros resultados también revelan que la inhibición de la NADPH-oxidasa y el bloqueo de los canales de calcio intracelular contrarrestan significativamente el aumento de la agregación de α-syn inducida por parte de AngII, reforzando la importancia de estos mecanismos en la patología de las sinucleopatías. Estos datos subrayan el papel crucial del eje AngII/AT1 en la progresión de la agregación y propagación de α-syn, proponiendo así que la modulación de esta vía podría ofrecer un enfoque terapéutico prometedor para frenar el avance de enfermedades neurodegenerativas asociadas con la acumulación de α-syn (Figura **36**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A mayores, se sabe que, en la EP varios procesos importantes están involucrados en la degeneración dopaminérgica, particularmente el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la acumulación de agregados de α-syn. Sin embargo, la razón para iniciar estos procesos y su orden de aparición aún están por aclarar. Ahora se debate la visión habitual de la agregación de α-syn y la patología de cuerpos de Lewy como el evento inicial, y se sugirió la posibilidad de que ocurran cambios celulares y moleculares más tempranos en las neuronas dopaminérgicas más vulnerables (Koeglsperger et al., 2023; Milber et al., 2012). Antes de la patología de cuerpos de Lewy, se han reportado cambios neuroquímicos tempranos como una disminución en la TH (Beach et al., 2008) , daño oxidativo (Dalfó & Ferrer, 2008) y neuroinflamación (Doorn et al., 2014). Estudios previos en diferentes tejidos, incluido el tejido nigroestriatal, han revelado interacciones contrarreguladoras entre la dopamina y el eje AngII/AT1 (Labandeira-Garcia et al., 2013, 2014), de modo que una disminución inicial en los niveles de dopamina debido a una alteración temprana en la función dopaminérgica (Beach et al., 2008) puede aumentar la actividad del eje AngII/AT1, que a su vez induce un aumento compensatorio en los niveles de dopamina a través de una serie de mecanismos (Dominguez-Meijide et al., 2017; Kobiec et al., 2021; Martínez-Pinilla et al., 2015; Villar-Cheda et al., 2010, 2014). Sin embargo, la hiperactividad del eje AngII/AT1 puede promover simultáneamente el estrés oxidativo y la neuroinflamación al mejorar la actividad de la NADPH-oxidasa y el aumento en los niveles de calcio libre intracelular, como se describió anteriormente. Curiosamente, el presente estudio muestra que la activación del eje AngII/AT1 también puede promover la expresión de α-syn, la agregación y la transmisión de célula a célula. Otros factores, incluido el envejecimiento (Villar-Cheda et al., 2014) la inflamación periférica o el síndrome metabólico (Pedrosa et al., 2023) también pueden inducir la hiperactivación del eje nigroestriatal AngII/AT1, a través de autoanticuerpos agonistas del receptor AT1 (Labandeira et al., 2022a; Pedrosa et al., 2023) u otros mecanismos, lo que afecta particularmente a las neuronas dopaminérgicas del nivel ventral nigral con altos niveles de expresión del receptor (Kamath et al., 2022).

Hasta donde sabemos, no hay estudios sobre los posibles efectos de la activación del eje AngII/AT1 en la agregación y transmisión de α-syn en tejidos periféricos. Entre los tejidos periféricos, el tracto gastrointestinal es particularmente interesante para la EP y la patología de α-syn en el contexto del eje intestino-cerebro. Curiosamente, se sabe que hay un SRA intestinal (Garg et al., 2020) y un sistema dopaminérgico intestinal (Auteri et al., 2016; Tolstanova et al., 2015) que regulan importantes funciones del tracto gastrointestinal. En varios estudios, se ha estudiado el papel del SRA en las interacciones cerebro-intestino en modelos de EP (Garrido-Gil, et al., 2018), y las interacciones entre el SRA intestinal y el sistema dopaminérgico intestinal en modelos de factores de mayor riesgo para EP, como el envejecimiento (Garrido-Gil, et al., 2018) o la menopausia (Garrido-Gil et al., 2021). Sin embargo, un posible papel de la desregulación de las interacciones SRA intestinales/dopamina en la patología de α-syn intestinal queda por aclarar en futuros estudios.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

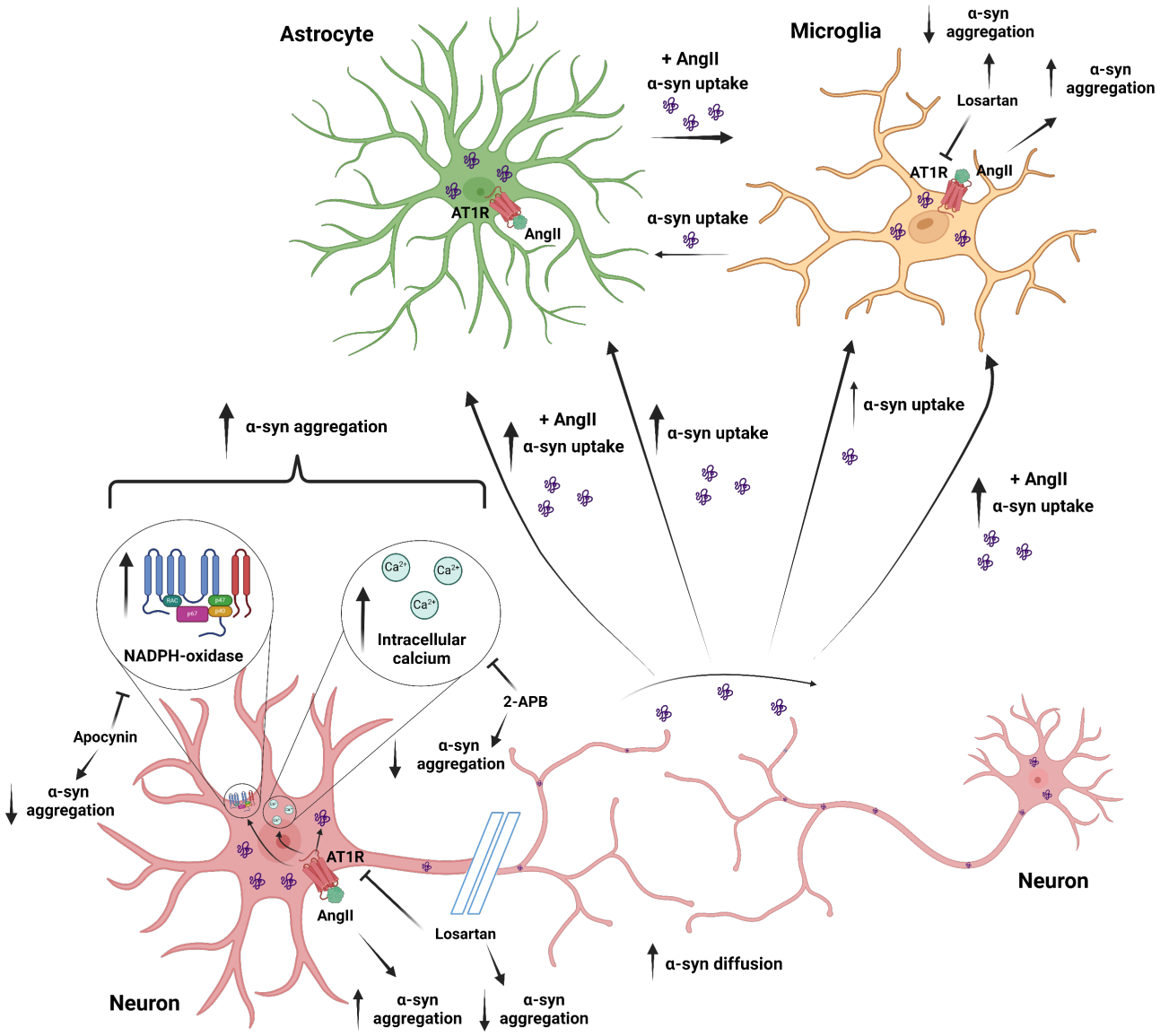


Figura 36: Esquema resumen del efecto de la modulación de SRA en la agregación y difusión de α-syn en neuronas, astrocitos y microglía. La AngII aumenta la agregación de α-syn en las células neuronales y microgliales mediante el aumento de los niveles de la actividad NADPH-oxidasa y los niveles del calcio intracelular. Los agregados de α-syn se transfieren preferentemente de neurona a neurona propagando la EP. En condiciones normales la α-syn es liberada al medio intercelular y es captada mayoritariamente por los astrocitos y en menor medida por la microglía para su degradación. Hay una tendencia de difusión de la α-syn desde la microglía a los astrocitos. El tratamiento con AngII activa la microglía aumentando su capacidad de captación de α-syn desde las neuronas y los astrocitos. Figura de elaboración propia con www.biorender.com.

5.2. FASUDIL INHIBE LA AGREGACIÓN DE α-SINUCLEÍNA A TRAVÉS DE MECANISMOS MEDIADOS POR LA INHIBICIÓN DE ROCK

5.2.1. Fasudil inhibe el aumento de la agregación de α-sinucleína mediado por angiotensina II

Los resultados presentes muestran que el fasudil inhibe el aumento inducido por AngII en el número de células con inclusiones y el tamaño de las inclusiones en neuronas y células gliales, sugiriendo una disminución en la agregación de α-syn. Además, también detectamos una disminución significativa en el tamaño de las inclusiones después del tratamiento con fasudil solo (es decir, en ausencia de AngII) en microglía y astrocitos, pero no en las células dopaminérgicas N27. Como se observó previamente, la administración de AngII a cultivos de la línea celular de astrocitos C6 no aumentó el número de células con inclusiones ni el tamaño de las inclusiones, posiblemente porque los astrocitos son la principal fuente de angiotensina endógena del cerebro (Dominguez-Meijide et al., 2017; Stornetta et al., 1988), y la administración adicional de AngII no es efectiva. Sin embargo, la administración de fasudil a cultivos de astrocitos C6 disminuyó significativamente el tamaño de las inclusiones. Curiosamente, el tratamiento con fasudil también fue efectivo para disminuir el número de células con inclusiones y el tamaño de las inclusiones en células HEK293 que carecen de receptores de AngII (De Los Milagros Bassani Molinas et al., 2014; Rivas-Santisteban et al., 2020), lo que indica que el efecto de fasudil sobre la agregación de α-syn no está sólo relacionado con la inhibición de los efectos de AngII (Figura **18**).

5.2.2. La inhibición de ROCK media los efectos de fasudil sobre la agregación de α-sinucleína

Como nuestros resultados demuestran, excluimos que el efecto de fasudil sobre la agregación de α-syn pudiera ser una consecuencia indirecta de los efectos sobre la expresión o la fosforilación de proteínas, en lugar de un cambio en la tendencia a formar agregados. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de la α-syn no está fosforilada en un cerebro sano, sin embargo, en los cerebros que presentan LB, la α-syn agregada está mayormente fosforilada en S129, por lo que el aumento de la expresión o fosforilación de la α-syn puede afectar a la agregación (Anderson et al., 2006; Kawahata et al., 2022). Nuestros resultados muestran que los cambios producidos en las diferentes líneas celulares después de los tratamientos con AngII o fasudil no se deben a cambios en la expresión de α-syn, ni a cambios en la fosforilación de ésta (Figura **19**). Por tanto, la variación observada en la agregación de la α-syn con la AngII o con el fasudil, podría deberse a la activación de otras rutas moleculares.

Se ha propuesto que el fasudil puede inhibir la agregación de α-syn mediante la interacción directa molécula-molécula, independiente de su efecto sobre la actividad de ROCK (Robustelli, et al., 2022; Tatenhorst et al., 2016). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la disminución inducida por fasudil en los marcadores de agregación en células neuronales, gliales y HEK293 no se debe a la interacción directa molécula-molécula, sino que está relacionada con la inhibición de la actividad de ROCK. Observamos que no hubo una disminución en la agregación de α-syn, pero sí un retraso en su inicio en las reacciones RT-QuIC (Figura **22**). Inicialmente, observamos los mismos efectos que en trabajos previos que sugerían efectos directos del fasudil, pero a medida que mantuvimos la reacción, los niveles de fluorescencia de ThT del grupo tratado con fasudil alcanzaron los mismos valores que el grupo no tratado, lo

que indica que la interacción directa molécula-molécula entre fasudil y α-syn no conduce a una disminución en la agregación de α-syn. De lo contrario, los niveles finales de fluorescencia de ThT habrían sido más bajos en el grupo tratado con fasudil. Además, en el ensayo RT-QuIC realizado en neuronas dopaminérgicas, nuestros resultados preliminares apuntan a un posible aumento en la amplificación de α-syn endógena tras el tratamiento con PFFs, mientras que este efecto fue bloqueado al tratar las células posteriormente con fasudil, lo que sugiere que su acción se debe a mecanismos celulares que reducen la agregación de α-syn y no a la interacción directa. Por tanto, podemos confirmar que los resultados observados en la disminución de la agregación de α-syn en las distintas líneas celulares, se deben a la inhibición de ROCK inducida por el tratamiento con fasudil.

Nuestros datos sugieren que la vía de ROCK está involucrada en el aumento de la agregación de α-syn y que la inhibición de la actividad de ROCK por fasudil es responsable de la reducción de la agregación de α-syn. En neuronas, ROCK regula la movilización de vesículas, el ciclo de vesículas y la motilidad en la sinapsis (Edelman et al., 1992; Li et al., 2016; Solecki et al., 2009). En células gliales, ROCK regula la activación proinflamatoria, la segregación de filamentos gliales y la migración (Edelman et al., 1992; Thomas et al., 2002; Yasui et al., 1998). Consistente con esto, la activación de la vía RhoA/ROCK lleva a un aumento de las respuestas inflamatorias de la microglía, procesos apoptóticos y degeneración axonal que aumentan la muerte de neuronas dopaminérgicas en modelos de EP (Labandeira-Garcia et al., 2014; Tönges et al., 2012; Villar-Cheda et al., 2012). Los resultados presentes sugieren que la activación de ROCK también promueve la agregación de α-syn. Además, observamos que la agregación de α-syn es aumentada por factores que aumentan la actividad de ROCK, como la activación del eje AngII/AT1 y el tratamiento con MPTP (Tönges et al., 2012; Villar-Cheda et al., 2012), y se disminuye con inhibidores de ROCK, incluyendo no sólo fasudil sino también otros inhibidores específicos de ROCK como Y27632 (Figura **25**). Curiosamente, los resultados presentes sugieren que la agregación de α-syn por sí sola puede llevar a una mayor actividad de ROCK. Esto, a su vez, lleva a una mayor actividad del eje AngII/AT1 y niveles más altos de agregación de α-syn (Iyer et al., 2021; Lopez-Lopez et al., 2021). La interrupción de este ciclo vicioso usando fasudil o Y27632 llevó a niveles más bajos de agregación de α-syn en el presente estudio.

5.2.3. La inhibición de ROCK bloquea la endocitosis de α-sinucleína en la microglía

Estudiamos varios posibles mecanismos que podrían vincular la activación de ROCK y la agregación de α-syn. ROCK es una de las proteínas que regulan los cambios en la membrana que pueden facilitar los procesos endocíticos, la formación y liberación de vesículas, y el reensamblaje del citoesqueleto celular que permite el movimiento celular y la fagocitosis (Choi et al., 2020; Fu et al., 2016; Labandeira-Garcia et al., 2014; Scheiblich & Bicker, 2017). Por lo tanto, la inhibición de ROCK puede llevar a alteraciones en la incorporación de los plásmidos de ADN de α-syn con el tiempo, llevando a una menor formación de dímeros y oligómeros y a una menor intensidad de fluorescencia en nuestros experimentos (Mao et al., 2022; Wayt et al., 2021). Sin embargo, al administrar los inhibidores de ROCK 48 horas después de la transfección pudimos evitar la alteración en la internalización de los plásmidos (Figura **26**). Consistente con esta propiedad de ROCK, confirmamos que el tratamiento con fasudil lleva a una menor función endocítica en cocultivos de células HMC3 y células N27 que expresan α-syn-EGFP. La AngII exacerbó la actividad de la vía de ROCK, llevando a un mayor número de células microgliales HMC3 mostrando inclusiones, lo que fue bloqueado por el tratamiento con

fasudil (Figura **28**). Esto es consistente con estudios previos que muestran que la inhibición de ROCK en células microgliales reduce la captación de desechos neuronales e inhibe la mayoría de las propiedades proinflamatorias de la microglía, como el aumento en el tamaño del cuerpo celular, el número de procesos filopodiales y el tamaño del aparato de Golgi (Barcia et al., 2012; Scheiblich & Bicker, 2017). Curiosamente, durante la apoptosis neuronal, los agregados de α-syn se liberan al espacio extracelular, y estos agregados son captados por la microglía, induciendo una mayor activación proinflamatoria de la microglía (He et al., 2016; Zhang, et al., 2005), lo que se reduciría con la inhibición de ROCK. Sin embargo, también están involucrados otros mecanismos en la disminución de la agregación de α-syn inducida por la inhibición de ROCK en nuestros cultivos de células neuronales, gliales o HEK293.

5.2.4. Fasudil inhibe el aumento de la actividad NADPH-oxidasa y el influjo de calcio inducido por la activación del eje AngII/AT1 y la acumulación de α-sinucleína

Estudios previos han mostrado que el estrés oxidativo, particularmente el promovido por la activación de NADPH-oxidasa y su liberación de superóxido, induce la agregación de α-syn en oligómeros (Cheng & Trombetta, 2004; Cristóvão et al., 2012; Goodwin et al., 2013; Musgrove et al., 2019). Además, como se ha mencionado, el estrés oxidativo derivado de NADPH-oxidasa se ve aumentado por la interacción del superóxido con las mitocondrias, a través de los canales mitoKATP, originando un incremento sustancial de los niveles de ROS en la célula, como se ha documentado en diversos tipos celulares, entre ellas las neuronas dopaminérgicas (Rodriguez-Pallares et al., 2012; Zawada et al., 2011). Por otro lado, el calcio intracelular promueve la agregación de α-syn, y la interacción entre este y el estrés oxidativo potencia significativamente la agregación de α-syn (Goodwin et al., 2013). El equilibrio entre calcio y estrés oxidativo es crucial para la estabilidad de los agregados de α-syn. Un exceso de calcio por sí solo genera agregados inestables, mientras que la combinación con el estrés oxidativo produce agregados más grandes y estables (Nath et al., 2011; Rcom-H'cheo-Gauthier et al., 2016). Se ha observado que la agregación de α-syn, a su vez, induce un aumento en los niveles de calcio y estrés oxidativo (Dryanovski et al., 2013; Hettiarachchi et al., 2009), lo que puede dar lugar a una retroalimentación positiva entre ambos procesos, aumentando los efectos deletéreos.

Hemos observado que la activación del receptor del eje AngII/AT1 aumenta la agregación de α-syn, y que esto fue mediado por un aumento inducido por AngII en la actividad de NADPH-oxidasa y los niveles de calcio intracelular. Se sabe que existe una interacción mutua entre las vías de AngII/AT1 y RhoA/ROCK, de modo que la activación de NADPH-oxidasa inducida por AngII aumenta la actividad de ROCK, y la activación de ROCK promueve todavía más la activación de NADPH-oxidasa (Bali & Singh Jaggi, 2016; Lopez-Lopez et al., 2023; Rodriguez-Perez et al., 2015). La activación del eje AngII/AT1 también induce un aumento persistente de calcio citosólico en neuronas y células gliales (Gebke et al., 1998; Izumisawa et al., 2019; Wang et al., 1996). Los resultados presentes muestran que ocurren interacciones similares respecto a la agregación de α-syn. Observamos que la inhibición de ROCK con fasudil bloqueó el aumento en la agregación de α-syn inducido por el tratamiento con AngII, y también el aumento en la agregación observado en ausencia de estimulación con AngII (por ejemplo, HEK293). Tanto fasudil como el inhibidor de ROCK, Y27632, bloquearon el aumento en la actividad de ROCK y la actividad de NADPH-oxidasa inducido por el tratamiento con AngII o por la sobreexpresión de α-syn (Figura **29**), lo que apoya de manera sólida la participación de la inhibición de ROCK y la inhibición de NADPH-oxidasa sobre la agregación de α-syn (Hou

et al., 2018). Además, observamos que tanto el fasudil como el Y27632 bloquearon el aumento de la actividad de ROCK y con ello el calcio citosólico (Figura **30**), por lo que nuestros resultados avalan la participación de la inhibición de ROCK y del calcio intracelular en la agregación de la α-syn.

5.2.5. Fasudil aumenta la autofagia

La acumulación de agregados en las células también puede estar relacionada con una disminución en los mecanismos de eliminación de α-syn, como la autofagia. Hay resultados conflictivos respecto a la posible inhibición de la autofagia mediada por ROCK. Varios estudios han observado que la inhibición de ROCK, particularmente mediante el uso de fasudil, aumenta la autofagia (Liu et al., 2016; Yan et al., 2020). Por el contrario, otros autores observaron que una mayor actividad de ROCK llevó a una mayor autofagia celular (Gurkar et al., 2013; Iyer et al., 2021). En el presente estudio, estudiamos el posible efecto de los cambios en la autofagia en nuestros resultados, y observamos que el tratamiento con los inhibidores de ROCK fasudil o Y27632 indujo un aumento significativo en la autofagia en células HMC3 que sobreexpresan α-syn (Figura **31**). Por lo tanto, podemos confirmar, bajo nuestras condiciones experimentales, que el aumento en la autofagia puede contribuir a la reducción inducida por fasudil de la acumulación de α-syn.

Por tanto, nuestros resultados indican que la inhibición de ROCK reduce la agregación de α-syn en diferentes tipos celulares, incluyendo neuronas, células gliales y células HEK293. Además, la inhibición de ROCK no solo disminuye la agregación inducida por AngII sino también la agregación basal en ausencia de AngII. Hemos demostrado que este efecto no se debe a una interacción directa entre fasudil y α-syn, sino a la inhibición de la actividad de ROCK, que a su vez afecta a varios procesos moleculares, como observamos en nuestros resultados en la reducción la actividad de NADPH-oxidasa y los niveles de calcio intracelular. Estos hallazgos sugieren que la vía ROCK/NADPH-oxidasa/calcio juega un papel crucial en la agregación de α-syn y que la inhibición de ROCK puede interrumpir este ciclo patológico, disminuyendo la formación de agregados. Además, se observó un aumento en la autofagia tras el tratamiento con fasudil, lo cual también podría contribuir a la reducción de la acumulación de α-syn. Asimismo, se detectó una disminución en la endocitosis de α-syn por parte de la microglía al ser cocultivada con neuronas, lo que resulta en una menor captación de desechos neuronales y en una disminución de sus propiedades proinflamatorias (Figura **37**). Estos resultados proporcionan una base sólida para considerar la inhibición de ROCK como una estrategia terapéutica potencial para enfermedades neurodegenerativas asociadas con la agregación de α-syn.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

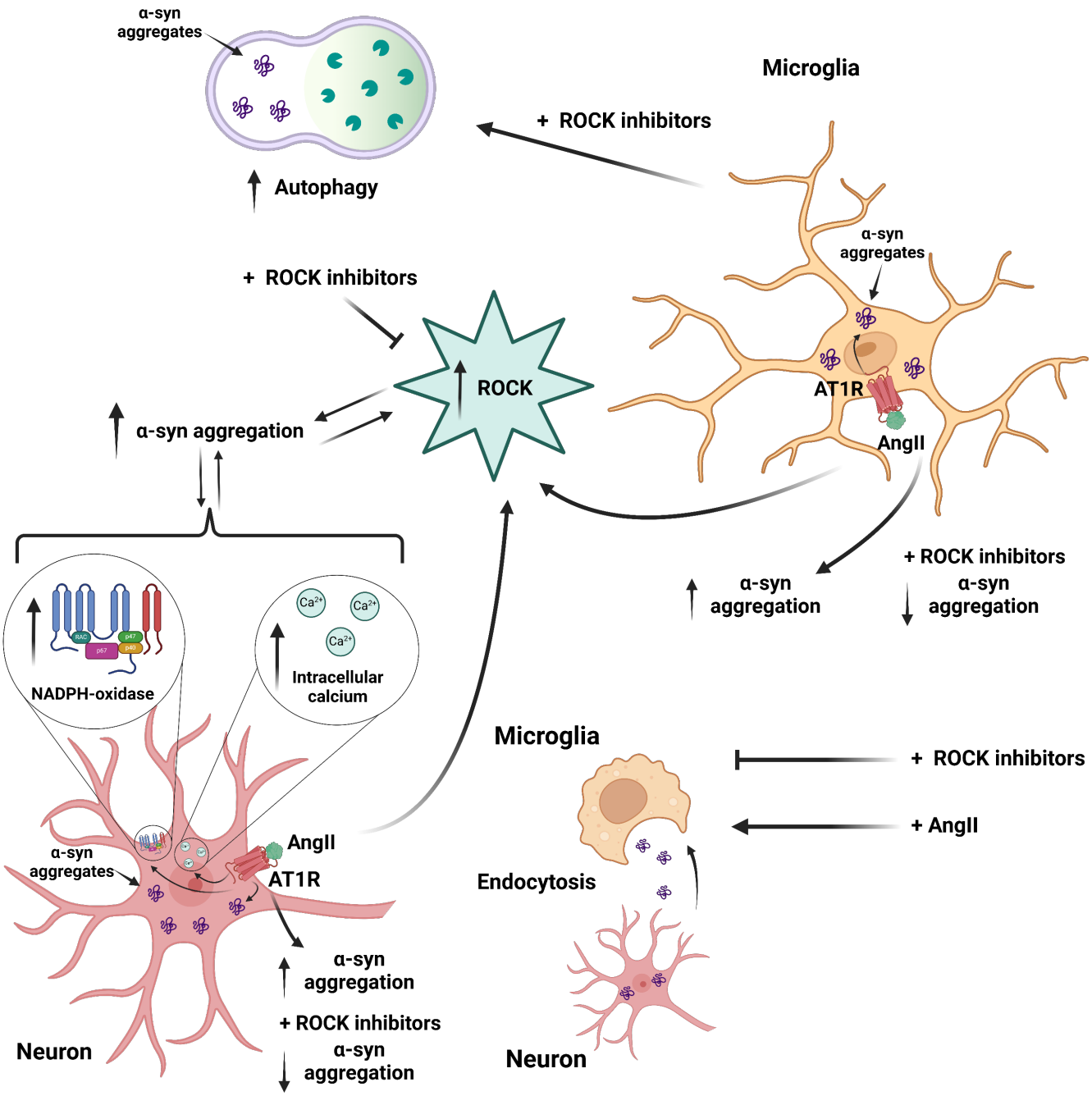


Figura 37: Esquema resumen del efecto de la inhibición de ROCK en la agregación de α-syn en neuronas y microglía. La inhibición de ROCK bloquea el aumento de la actividad NADPH-oxidasa y el influjo de calcio inducido por la activación del eje AngII/AT1 y la agregación de α-syn en neuronas. Además, la inhibición de ROCK induce la autofagia y reduce la endocitosis de los agregados de α-syn en las células microgliales. Figura de elaboración propia con www.biorender.com.

5.3. AUTOANTICUERPOS AGONISTAS DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1 PROMUEVEN LA AGREGACIÓN DE α-SINUCLEÍNA EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

Los autoanticuerpos que actúan sobre los dominios extracelulares de las proteínas neuronales o gliales se han asociado con varias enfermedades cerebrales, incluidas las enfermedades neurodegenerativas (Prüss, 2021). Los autoanticuerpos para los receptores acoplados a proteínas G pueden desempeñar efectos agonistas-estimulantes o antagonistas-inhibidores sobre los receptores acoplados a proteínas G e inducir disfunciones celulares funcionales que pueden llevar a diversas enfermedades (Riemekasten et al., 2020). Los autoanticuerpos circulantes, al cruzar una BHE alterada, pueden ingresar al LCR y al cerebro, aunque también se ha demostrado su síntesis intratecal por células B activadas que migraron al compartimento intratecal (Negi & Das, 2020; Prüss, 2021). Los mecanismos responsables de la generación de estos autoanticuerpos no están claros, e incluyen posibles defectos en los puntos de control inmunitario y otros procesos (Prüss, 2021; Riemekasten et al., 2020). Sin embargo, en el caso de los AT1-AA, se ha demostrado que las citoquinas relacionadas con la inflamación modifican los receptores AT1, transformándolos en neoantígenos responsables de la inducción de AT1-AA (Liu et al., 2014; Pedrosa et al., 2023). Se ha sugerido que los AT1-AA pueden actuar como potentes activadores de los receptores AT1 ya que, además de su efecto agonista, la unión de los AT1-AA a los receptores AT1 estabiliza al receptor en un estado activado permanente, inhibiendo su internalización, lo que aumenta a su vez la expresión del receptor AT1 (Liu et al., 2019). Los receptores AT1 proinflamatorios y prooxidativos, presentes en neuronas dopaminérgicas y células gliales, contribuyen a regular el estrés oxidativo neuronal y las respuestas proinflamatorias de la microglía (Kamath et al., 2022; Prüss, 2021). Mediante microscopía confocal y marcaje fluorescente de AT1-AA, se ha demostrado la unión de AT1-AA a la superficie de neuronas dopaminérgicas y células gliales, presumiblemente a los receptores AT1 (Labandeira et al., 2022a). Además, la administración de AT1-AA a cultivos aumentó los niveles de citoquinas proinflamatorias y la muerte de neuronas dopaminérgicas, lo que fue inhibido por el tratamiento simultáneo con antagonistas de AT1 (Labandeira et al., 2022a). Curiosamente, estudios previos han demostrado que la activación de los receptores AT1 endoteliales induce la disrupción de la BHE (Fleegal-Demotta et al., 2009), y se ha observado que la infusión crónica intraperitoneal de AT1-AA también indujo la disrupción de ésta (Pedrosa et al., 2023), lo que puede actuar como un factor adicional que aumenta la neurodegeneración.

En el presente estudio, observamos que los AT1-AA pueden contribuir a la degeneración dopaminérgica promoviendo la agregación de α-syn en neuronas dopaminérgicas (Figura **32,** Figura **33**), ya que los AT1-AA pueden aumentar los principales mecanismos involucrados en el proceso de agregación, como la activación de la NADPH-oxidasa y el aumento del calcio intracelular (Figura **34;** Figura **35;** Figura **38**). Investigaciones previas han identificado que la sobreactivación de los receptores AT1 desencadena una cascada de eventos moleculares. Entre las principales consecuencias se encuentran el estrés oxidativo mediado por la enzima NADPH-oxidasa y la alteración del equilibrio del calcio intracelular (Labandeira-Garcia et al., 2024). El superóxido generado por la NADPH-oxidasa se ha relacionado directamente con el aumento de la agregación de α-syn en estructuras oligoméricas (Musgrove et al., 2019). De manera similar, el incremento del calcio libre intracelular también favorece la formación de agregados de α-syn (Rcom-H'cheo-Gauthier et al., 2016). La interacción sinérgica entre el calcio y el estrés oxidativo exacerba todavía más este proceso. Varios estudios han demostrado que el aumento del calcio por sí solo conduce a agregados inestables, mientras que la combinación del calcio y

del estrés oxidativo genera agregados más grandes y estables (Goodwin et al., 2013). Además, confirmamos que el efecto potenciador de los AT1-AA sobre la agregación de α-syn se produce a través de la activación del receptor AT1, ya que fue inhibido por el bloqueador del receptor AT1 losartán. Como se observó en nuestros estudios previos utilizando AT1-AA a dosis similares (Labandeira et al., 2022a) o bajas dosis de angiotensina (Joglar et al., 2009), los AT1-AA solos no indujeron una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas, pero mejoraron sinérgicamente el efecto de otros factores dañinos, como bajas dosis de neurotoxinas dopaminérgicas como 6-OHDA (Labandeira et al., 2022a). Esto es consistente con el origen multifactorial de la EP. Además, la neurodegeneración dopaminérgica y la neuroinflamación relacionadas con la EP inducen todavía más la producción de AT1-AA (Labandeira et al., 2022a), generando un ciclo vicioso. Por tanto, los resultados refuerzan el papel crucial de los receptores AT1 en la degeneración dopaminérgica y la EP, donde las neuronas más vulnerables presentan la mayor expresión del gen AT1 (Kamath et al., 2022). Además, respaldan varios estudios clínicos recientes que sugieren efectos neuroprotectores de los bloqueadores de los receptores AT1 (es decir, sartanes) sobre el riesgo y la progresión de la EP (Jo et al., 2022). Este estudio demuestra por tanto que los AT1-AA promueven la formación de oligómeros y agregados de α-syn, un mecanismo clave en la progresión de la enfermedad.

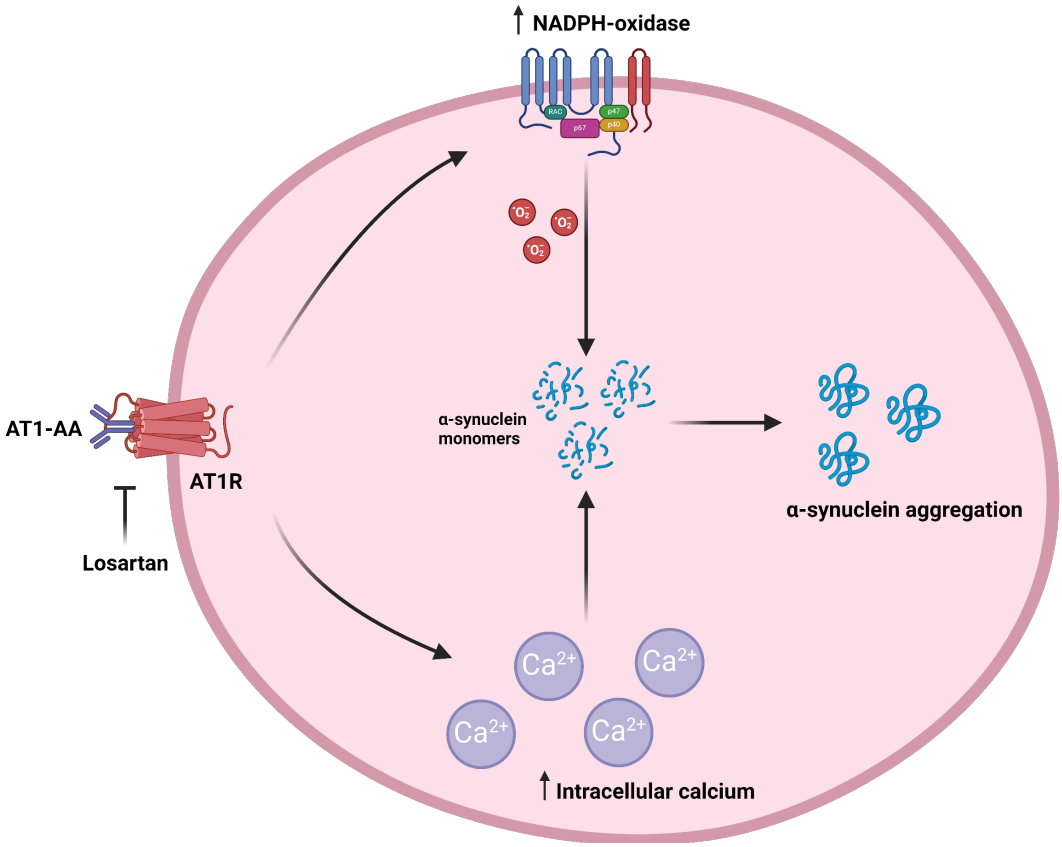


Figura 38: Esquema resumen del efecto de los AT1-AA sobre la agregación de α-syn en neuronas dopaminérgicas. Los AT1-AA se unen a los receptores AT1 fomentando la activación de la NADPH-oxidasa, y con ello la liberación de superóxido, y el aumento del calcio intracelular. La activación sinérgica de estos eventos moleculares desencadena la formación de agregados de α-syn. Figura de elaboración propia con www.biorender.com.

CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIONES

1. Nuestros modelos experimentales de agregación de α-sinucleína, empleados en líneas celulares de neuronas dopaminérgicas, microglía y astrocitos, dan lugar a inclusiones de composición análoga a los agregados que se forman en la Enfermedad de Parkinson.

2. Neuronas, microglía y astrocitos muestran diferencias en el número y tamaño de los agregados de α-sinucleína, observándose un número mayor de agregados de menor tamaño en neuronas.

3. La hiperactivación del eje AngII/AT1 incrementa tanto la cantidad de células con inclusiones de α-sinucleína como el tamaño promedio de dichas inclusiones en células neuronales y microgliales; estos efectos son revertidos mediante el tratamiento con losartán, un inhibidor del receptor AT1.

4. La activación de la NADPH-oxidasa y el aumento del calcio intracelular son los mecanismos involucrados en los efectos de la agregación de α-sinucleína por parte del eje AngII/AT1 en las neuronas dopaminérgicas.

5. El modelo murino de parkinsonismo por MPTP (a una dosis de 30mg/kg intraperitoneal durante 5 días) da lugar a la formación de agregados de α-sinucleína positivos para tinción con el marcador de agregados amiloides tioflavina S en células neuronales, microgliales y astrocitarias en la sustancia negra y el cuerpo estriado.

6. La formación de los agregados de α-sinucleína en el modelo murino de parkinsonismo por MPTP esta mediada por la activación del eje AngII/AT1 tanto en la sustancia negra como en el cuerpo estriado, tal y como se comprobó mediante el empleo de animales KO AT1 y mediante el tratamiento con telmisartán, un inhibidor del receptor de AT1.

7. En condiciones normales, la transferencia de α-sinucleína es más intensa entre las neuronas dopaminérgicas que entre los astrocitos y la microglía. Las neuronas dopaminérgicas liberan altos niveles de α-sinucleína cuando interactúan con la microglía y con los astrocitos, mientras que éstos incorporan de manera eficiente la α-sinucleína en presencia de neuronas dopaminérgicas. La AngII potencia la capacidad de las células microgliales para captar α-sinucleína en cocultivos con neuronas dopaminérgicas y astrocitos, pero reduce la captación de α-sinucleína por los astrocitos en presencia de la microglía. Además, AngII promueve un incremento significativo en la transferencia de α-sinucleína entre células astrogliales.

8. La activación del eje AngII/AT1 produce en neuronas y células gliales un aumento de células con inclusiones y tamaño de las inclusiones, que es inhibido por el bloqueo de ROCK mediante fasudil, sugiriendo que fasudil disminuye la agregación de α-sinucleína.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9. Esta disminución de la agregación no se debe a una interacción directa entre fasudil y α-sinucleína, sino a la inhibición de la vía RhoA/ROCK, que está involucrada en el aumento de la agregación de α-sinucleína. Además, los resultados sugieren que la agregación de α-sinucleína a su vez puede llevar a una mayor actividad de ROCK, dando lugar una mayor actividad del eje AngII/AT1 y con ello a niveles más altos de agregación de α-sinucleína en las neuronas dopaminérgicas, generándose así un círculo vicioso.

10. *In vivo*, el incremento de la a agregación de α-sinucleína observado en el estriado del modelo murino de parkinsonismo por MPTP también es bloqueado mediante el tratamiento con un inhibidor de ROCK diferente (Y27632), confirmando que lo observado es consecuencia de la inhibición de ROCK y no a otras propiedades de fasudil.

11. La inhibición de ROCK mediante los tratamientos con fasudil o Y27632 producen la inhibición de la actividad NADPH-oxidasa y el incremento del calcio intracelular inducido por la activación del eje AngII/AT1 y el depósito de α-sinucleína en las neuronas dopaminérgicas.

12. La inhibición de ROCK mediante tratamiento con fasudil bloquea la endocitosis de α-sinucleína proveniente de neuronas dopaminérgicas por la microglía. Además, el tratamiento con los inhibidores de ROCK fasudil o Y27632 aumenta significativamente la autofagia en células microgliales que sobreexpresan α-sinucleína contribuyendo a la reducción de los agregados de α-sinucleína.

13. Los autoanticuerpos para AT1 inducen la activación de la NADPH-oxidasa y el aumento del calcio intracelular promoviendo la agregación de α-sinucleína en neuronas dopaminérgicas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. CONCLUSIONS

1. Our experimental models of α-synuclein aggregation, employed in dopaminergic neuronal, microglial, and astrocytic cell lines, result in inclusions similar in composition to the aggregates formed in Parkinson's disease.

2. Neurons, microglia, and astrocytes show differences in the number and size of α-synuclein aggregates, with a higher number of smaller aggregates observed in neurons.

3. Hyperactivation of the AngII/AT1 axis increases both the number of cells with α-synuclein inclusions and the average size of these inclusions in neuronal and microglial cells; these effects are reversed by treatment with losartan, an AT1 receptor inhibitor.

4. Activation of NADPH-oxidase and the increase in intracellular calcium are mechanisms involved in the α-synuclein aggregation effects mediated by the AngII/AT1 axis in dopaminergic neurons.

5. The murine model of MPTP-induced parkinsonism (administered at a dose of 30 mg/kg intraperitoneally for 5 days) leads to the formation of α-synuclein aggregates positive for amyloid marker thioflavin S staining in neuronal, microglial, and astrocytic cells in the substantia nigra and in the corpus striatum.

6. Formation of α-synuclein aggregates in the murine model of MPTP-induced parkinsonism is mediated by activation of the AngII/AT1 axis in both substantia nigra and corpus striatum, as demonstrated through the use of AT1 KO animals and treatment with telmisartan, an AT1 receptor inhibitor.

7. Under normal conditions, the transfer of α-synuclein is more intense between dopaminergic neurons than between astrocytes and microglia. Dopaminergic neurons release high levels of α-synuclein when interacting with microglia and astrocytes, while these cells efficiently incorporate α-synuclein in the presence of dopaminergic neurons. AngII enhances the capacity of microglial cells to uptake α-synuclein in co-cultures with dopaminergic neurons and astrocytes but reduces the uptake of α-synuclein by astrocytes in the presence of microglia. Furthermore, AngII significantly increases the transfer of α-synuclein between astroglial cells.

8. Activation of the AngII/AT1 axis in neurons and glial cells increases the number of cells with inclusions and the size of the inclusions, which is inhibited by ROCK blockade via fasudil, suggesting that fasudil reduces α-synuclein aggregation.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9. This reduction in aggregation is not due to a direct interaction between fasudil and α-synuclein but to the inhibition of the RhoA/ROCK pathway, which is involved in the increased aggregation of α-synuclein. Additionally, the results suggest that α-synuclein aggregation can, in turn, lead to higher ROCK activity, promoting further activation of the AngII/AT1 axis and resulting in elevated levels of α-synuclein aggregation in dopaminergic neurons, thereby creating a vicious cycle.

10. *In vivo*, the increase in α-synuclein aggregation observed in the striatum of the MPTP-induced murine parkinsonism model is also blocked by treatment with a different ROCK inhibitor (Y27632), confirming that the observed effects are due to ROCK inhibition and not due to other properties of fasudil.

11. ROCK inhibition through treatment with fasudil or Y27632 suppresses NADPH-oxidase activity and the intracellular calcium increase induced by AngII/AT1 axis activation, as well as α-synuclein deposition in dopaminergic neurons.

12. ROCK inhibition via fasudil treatment blocks the endocytosis of α-synuclein from dopaminergic neurons by microglia. Moreover, treatment with the ROCK inhibitors fasudil or Y27632 significantly enhances autophagy in microglial cells overexpressing α-synuclein, contributing to the reduction of α-synuclein aggregates.

13. Autoantibodies to AT1 induce NADPH-oxidase activation and an increase in intracellular calcium, promoting α-synuclein aggregation in dopaminergic neurons.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8. BIBLIOGRAFÍA

Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., Garcia Verdugo, J. M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., & Rosenthal, A. (2000). Mice lacking α-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25(1), 239–252. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80886-7

Abiodun, O. A., & Ola,M.S. (2020). Role of brain renin angiotensin system in neurodegeneration: An update. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(3), 905. https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.01.026

Abounit, S., Bousset, L., Loria, F., Zhu, S., de Chaumont, F., Pieri, L., Olivo-Marin, J., Melki, R., & Zurzolo, C. (2016). Tunneling nanotubes spread fibrillar α-synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *The EMBO Journal*, *35*(19), 2120–2138. https://doi.org/10.15252/EMBJ.201593411

Abramov, A. Y., Gegg, M., Grunewald, A., Wood, N. W., Klein, C., & Schapira, A. H. V. (2011). Bioenergetic consequences of PINK1 mutations in parkinson disease. *PLoS ONE*, *6*(10). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0025622

Afitska, K., Fucikova, A., Shvadchak, V. V., & Yushchenko, D. A. (2017). Modification of C Terminus Provides New Insights into the Mechanism of α-synuclein Aggregation. *Biophysical journal*, *113*(10), 2182–2191. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.027

Ahmed, H. A., Ishrat, T., Pillai, B., Bunting, K. M., Patel, A., Vazdarjanova, A., Waller, J. L., Arbab, A. S., Ergul, A., & Fagan, S. C. (2018). Role of angiotensin system modulation on progression of cognitive impairment and brain MRI changes in aged hypertensive animals - A randomized double- blind pre-clinical study. *Behavioural Brain Research*, *346*, 29–40. https://doi.org/10.1016/J.BBR.2017.12.007

Alafuzoff, I., & Hartikainen, P. (2018). α-synucleinopathies. *Handbook of Clinical Neurology*, *145*, 339–353. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00024-9

Alam, P., Bousset, L., Melki, R., & Otzen, D. E. (2019). α-synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities. *Journal of Neurochemistry*, *150*(5), 522–534. https://doi.org/10.1111/JNC.14808

Albiston, A. L., McDowall, S. G., Matsacos, D., Sim, P., Clune, E., Mustafa, T., Lee, J., Mendelsohn, F. A. O., Simpson, R. J., Connolly, L. M., & Chai, S. Y. (2001). Evidence That the Angiotensin IV (AT4) Receptor Is the Enzyme Insulin-regulated Aminopeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(52), 48623–48626. https://doi.org/10.1074/JBC.C100512200

Allen, A. M., MacGregor, D. P., Chai, S. Y., Donnan, G. A., Kaczmarczyk, S., Richardson, K., Kalnins, R., Ireton, J., & Mendelsohn, F. A. O. (1992). Angiotensin II receptor binding associated with nigrostriatal dopaminergic neurons in human basal ganglia. *Annals of Neurology*, *32*(3), 339–344. https://doi.org/10.1002/ANA.410320306

Allen, A., O'Callaghan, E., Hazelwood, L., Germain, S., Castrop, H., Castrop, H., Schnermann, J., & Bassi, J. (2008). Distribution of cells expressing human renin-promoter activity in the brain of a transgenic mouse. *Brain Research*, *1243*, 78-85. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.046

Alvarez-Erviti, L., Couch, Y., Richardson, J., Cooper, J. M., & Wood, M. J. A. (2011). α-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line. *Neuroscience Research*, *69*(4), 337–342. https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2010.12.020

Alvarez-Fischer, D., Guerreiro, S., Hunot, S., Saurini, F., Marien, M., Sokoloff, P., Hirsch, E. C., Hartmann, A., & Michel, P. P. (2008). Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid. *Journal of Neurochemistry*, *107*(3), 701–711. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05651.x

Ambasudhan, R., Ryan, S. D., Dolatabadi, N., Chan, S. F., Zhang, X., Akhtar, M. W., Parker, J., Soldner, F., Sunico, C. R., Nagar, S., Talantova, M., Lee, B., Lopez, K., Nutter, A., Shan, B., Molokanova, E., Zhang, Y., Han, X., Nakamura, T., … Lipton, S. A. (2013). Isogenic human iPSC Parkinson's model shows nitrosative stress-induced dysfunction in MEF2-PGC1α transcription. *Cell*, *155*(6), 1351. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.11.009

Ambrosi, G., Cerri, S., & Blandini, F. (2014). A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, *121*(8), 849–859. https://doi.org/10.1007/S00702-013-1149-Z/TABLES/2

Anderson, J. P., Walker, D. E., Goldstein, J. M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R. J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., Diep, L., Keim, P. S., Shen, X., Chataway, T., Schlossmacher, M. G., Seubert, P., Schenk, D., Sinha, S., Gai, W. P., & Chilcote, T. J. (2006). Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of α-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(40), 29739–29752. https://doi.org/10.1074/jbc.M600933200

Andreoli, L., Abbaszadeh, M., Cao, X., & Cenci, M. A. (2021). Distinct patterns of dyskinetic and dystonic features following D1 or D2 receptor stimulation in a mouse model of parkinsonism. *Neurobiology of Disease*, *157*, 105429. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2021.105429

Angelova, P. R., Ludtmann, M. H. R., Horrocks, M. H., Negoda, A., Cremades, N., Klenerman, D., Dobson, C. M., Wood, N. W., Pavlov, E. V., Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2016). Ca2+ is a key factor in α-synuclein-induced neurotoxicity. *Journal of Cell Science*, *129*(9), 1792–1801. https://doi.org/10.1242/JCS.180737/260219/AM/CALCIUM-IS-A-KEY-FACTOR-IN-SYNUCLEIN-INDUCED

Angot, E., Steiner, J. A., Tomé, C. M., Ekström, P., Mattsson, B., Björklund, A., & Brundin, P. (2012). α-Synuclein Cell-to-Cell Transfer and Seeding in Grafted Dopaminergic Neurons *In Vivo*. *PLoS ONE*, *7*(6), 39465. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0039465

Anwar, S., Peters, O., Millership, S., Ninkina, N., Doig, N., Connor-Robson, N., Threlfell, S., Kooner, G., Deacon, R. M., Bannerman, D. M., Bolam, J. P., Chandra, S. S., Cragg, S. J., Wade-Martins, R., & Buchman, V. L. (2011). Functional Alterations to the Nigrostriatal System in Mice Lacking All Three Members of the Synuclein Family. *The Journal of Neuroscience*, *31*(20), 7264. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6194-10.2011

Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Trinh, J., Aasly, J. O., Rajput, A., Rajput, A. H., Jon Stoessl, A., & Farrer, M. J. (2013). α-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *28*(6), 811–813. https://doi.org/10.1002/MDS.25421

Arias-Pacheco, A., del Mar Polo-de-Santos, M., Luengo-Matos, S., Hijas-Gómez, A. I., Rodríguez-Ortiz-de-Salazar, B., & Sánchez-Gómez, L. M. (2022). PP109 Efficacy And Safety Of High-Intensity Focused Ultrasound In Parkinson's Disease. *International Journal of Technology Assessment in Health Care*, *38*(S1), S75–S75. doi:10.1017/S0266462322

Ashley, A., Hinds, A., Hanneman, W., Tjalkens, R., & Légaré, M. (2016). DJ-1 mutation decreases astroglial release of inflammatory mediators. *Neurotoxicology*, *52*, 198-203. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.007

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Auteri, M., Zizzo, M. G., Amato, A., & Serio, R. (2016). Dopamine induces inhibitory effects on the circular muscle contractility of mouse distal colon via D1- and D2-like receptors. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *73*(3), 395–404. https://doi.org/10.1007/S13105-017-0566-0

Bohlen, V. und Halbach, O. (2005). The Renin-Angiotensin System in the Mammalian Central Nervous System. *Current Protein & Peptide Science*, *6*(4), 355–371. https://doi.org/10.2174/1389203054546361

Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, *16*(1), 42–47. https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.12.001

Bader, M. (2013). ACE2, angiotensin-(1–7), and Mas: the other side of the coin. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *465*(1), 79–85. https://doi.org/10.1007/s00424-012-1120-0

Bader, M., Peters, J., Baltatu, O., Müller, D. N., Luft, F. C., & Ganten, D. (2001). Tissue renin-angiotensin systems: New insights from experimental animal models in hypertension research. *Journal of Molecular Medicine*, *79*(2), 76–102. https://doi.org/10.1007/S001090100210/METRICS

Bali, A., & Singh Jaggi, A. (2016). An Integrative Review on Role and Mechanisms of Ghrelin in Stress, Anxiety and Depression. *Current Drug Targets*, *17*(5), 495–507. https://doi.org/10.2174/1389450116666150518095650

Banati, R. B. (2002). Visualising microglial activation *in vivo*. *Glia*, *40*(2), 206–217. https://doi.org/10.1002/GLIA.10144

Barcia, G., Fleming, M. R., Deligniere, A., Gazula, V. R., Brown, M. R., Langouet, M., Chen, H., Kronengold, J., Abhyankar, A., Cilio, R., Nitschke, P., Kaminska, A., Boddaert, N., Casanova, J. L., Desguerre, I., Munnich, A., Dulac, O., Kaczmarek, L. K., Colleaux, L., & Nabbout, R. (2012). De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nature Genetics*, *44*(11), 1255–1259. https://doi.org/10.1038/NG.2441

Barkholt, P., Sanchez-Guajardo, V., Kirik, D., & Romero-Ramos, M. (2012). Long-term polarization of microglia upon α-synuclein overexpression in nonhuman primates. *Neuroscience*, *208*, 85–96. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.02.004

Bartels, T., Ahlstrom, L. S., Leftin, A., Kamp, F., Haass, C., Brown, M. F., & Beyer, K. (2010). The N-Terminus of the Intrinsically Disordered Protein α-Synuclein Triggers Membrane Binding and Helix Folding. *Biophysical Journal*, *99*(7), 2116–2124. https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2010.06.035

Bartels, T., Choi, J. G., & Selkoe, D. J. (2011). α-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*, *477*(7362), 107. https://doi.org/10.1038/NATURE10324

Basu, U., Case, A. J., Liu, J., Tian, J., Li, Y. L., & Zimmerman, M. C. (2019). Redox-sensitive calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIα in angiotensin II intra-neuronal signaling and hypertension. *Redox Biology*, *27*, 101230. https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2019.101230

Beach, T. G., Adler, C. H., Sue, L. I., Peirce, J. B., Bachalakuri, J., Dalsing-Hernandez, J. E., Lue, L. F., Caviness, J. N., Connor, D. J., Sabbagh, M. N., & Walker, D. G. (2008). Reduced striatal tyrosine hydroxylase in incidental Lewy body disease. *Acta Neuropathologica*, *115*(4), 445–451. https://doi.org/10.1007/S00401-007-0313-7

Beal, M. F. (1992). Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Annals of Neurology*, *31*(2), 119–130. https://doi.org/10.1002/ANA.410310202

Belarbi, K., Cuvelier, E., Destée, A., Gressier, B., & Chartier-Harlin, M. C. (2017). NADPH oxidases in Parkinson's disease: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1). https://doi.org/10.1186/S13024-017-0225-5

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bellani, S., Sousa, V. L., Ronzitti, G., Valtorta, F., Meldolesi, J., & Chieregatti, E. (2010). The regulation of synaptic function by α-synuclein. *Communicative & integrative biology*, *3*(2), 106–109. https://doi.org/10.4161/cib.3.2.10964

Bellucci, A., Navarria, L., Zaltieri, M., Falarti, E., Bodei, S., Sigala, S., Battistin, L., Spillantini, M., Missale, C., & Spano, P. (2011). Induction of the unfolded protein response by α-synuclein in experimental models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *116*(4), 588–605. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2010.07143.X

Bengtson, S. (1990). Hoffman, A. 1989. Arguments on evolution. A paleontologist's perspective. 274 pp. Oxford University Press, New York and Oxford. ISBN 0-19-504443-6. £22.50. *Journal of Evolutionary Biology*, *3*(5–6), 481–482. https://doi.org/10.1046/J.1420-9101.1990.3050481.X

Bernhart, E., Kollroser, M., Rechberger, G., Reicher, H., Heinemann, A., Schratl, P., Hallström, S., Wintersperger, A., Nusshold, C., DeVaney, T., Zorn-Pauly, K., Malli, R., Graier, W., Malle, E., & Sattler, W. (2010). Lysophosphatidic acid receptor activation affects the C13NJ microglia cell line proteome leading to alterations in glycolysis, motility, and cytoskeletal architecture. *PROTEOMICS*, *10*(1), 141–158. https://doi.org/10.1002/PMIC.200900195

Bernis, M. E., Babila, J. T., Breid, S., Wüsten, K. A., Wüllner, U., & Tamgüney, G. (2015). Prion-like propagation of human brain-derived α-synuclein in transgenic mice expressing human wild-type α-synuclein. *Acta Neuropathologica Communications*, *3*(1), 75. https://doi.org/10.1186/S40478-015-0254-7/FIGURES/9

Bey, K., Deniaud, J., Dubreil, L., Joussemet, B., Cristini, J., Ciron, C., Hordeaux, J., Le Boulc'h, M., Marche, K., Maquigneau, M., Guilbaud, M., Moreau, R., Larcher, T., Deschamps, J. Y., Fusellier, M., Blouin, V., Sevin, C., Cartier, N., Adjali, O., Aubourg, P., … Colle, M. A. (2020). Intra-CSF AAV9 and AAVrh10 Administration in Nonhuman Primates: Promising Routes and Vectors for Which Neurological Diseases? *Molecular therapy. Methods & clinical development*, *17*, 771–784. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.04.001

Bhat, S. A., Sood, A., Shukla, R., & Hanif, K. (2019). AT2R Activation Prevents Microglia Pro-inflammatory Activation in a NOX-Dependent Manner: Inhibition of PKC Activation and p47phox Phosphorylation by PP2A. *Molecular Neurobiology*, *56*(4), 3005–3023. https://doi.org/10.1007/S12035-018-1272-9

Biancardi, V. C., Stranahan, A. M., Krause, E. G., de Kloet, A. D., & Stern, J. E. (2016). Cross talk between AT1 receptors and Toll-like receptor 4 in microglia contributes to angiotensin II-derived ROS production in the hypothalamic paraventricular nucleus. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *310*(3), H404–H415. https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00247.2015/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH40031618070006.JPEG

Bido, S., Muggeo, S., Massimino, L., Marzi, M. J., Giannelli, S. G., Melacini, E., Nannoni, M., Gambarè, D., Bellini, E., Ordazzo, G., Rossi, G., Maffezzini, C., Iannelli, A., Luoni, M., Bagicaluppi, M., Gregori, S., Nicassio, F., & Broccoli, V. (2021). Microglia-specific overexpression of α-synuclein leads to severe dopaminergic neurodegeneration by phagocytic exhaustion and oxidative toxicity. *Nature Communications*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/S41467-021-26519-X

Blesa, J., Trigo-Damas, I., Dileone, M., del Rey, N. L. G., Hernandez, L. F., & Obeso, J. A. (2017). Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification. *Experimental Neurology*, *298*, 148–161. https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2017.10.002

Blum-Degena, D., Müller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H., & Riederer, P. (1995). Interleukin-1β and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Parkinson's disease patients. *Neuroscience Letters*, *202*(1–2), 17–20. https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12192-7

Bodiga, V. L., & Bodiga, S. (2013). Renin Angiotensin System in Cognitive Function and Dementia. *Asian Journal of Neuroscience*, *2013*, 1–18. https://doi.org/10.1155/2013/102602

Bolam, J. P., & Pissadaki, E. K. (2012). Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *27*(12), 1478–1483. https://doi.org/10.1002/MDS.25135

Bollag, W. B. (2014). Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Comprehensive Physiology*, *4*(3), 1017–1055. https://doi.org/10.1002/CPHY.C130037

Booth, H. D. E., Hirst, W. D., & Wade-Martins, R. (2017). The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends in Neurosciences*, *40*(6), 358–370. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2017.04.001

Borrajo, A., Rodriguez-Perez, A. I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2014a). Microglial TNF-α mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin. *Glia*, *62*(1), 145–157. https://doi.org/10.1002/GLIA.22595

Borrajo, A., Rodriguez-Perez, A. I., Villar-Cheda, B., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2014b). Inhibition of the microglial response is essential for the neuroprotective effects of Rho-kinase inhibitors on MPTP-induced dopaminergic cell death. *Neuropharmacology*, *85*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.05.021

Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003a). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*(2), 197–211. https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00065-9

Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*, *318*(1), 121–134. https://doi.org/10.1007/S00441-004-0956-9/FIGURES/7

Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., & Del Tredici, K. (2003b). Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of Neural Transmission*, *110*(5), 517–536. https://doi.org/10.1007/S00702-002-0808-2/METRICS

Braak, H., Sastre, M., & Del Tredici, K. (2007). Development of α-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, *114*(3), 231–241. https://doi.org/10.1007/S00401-007-0244-3/FIGURES/4

Braidy, N., Gai, W. P., Xu, Y. H., Sachdev, P., Guillemin, G. J., Jiang, X. M., Ballard, J. W. O., Horan, M. P., Fang, Z. M., Chong, B. H., & Chan, D. K. Y. (2013). Uptake and mitochondrial dysfunction of α-synuclein in human astrocytes, cortical neurons and fibroblasts. *Translational Neurodegeneration*, *2*(1), 20. https://doi.org/10.1186/2047-9158-2-20

Brandner, S., Raeber, A., Sailer, A., Blättler, T., Fischer, M., Weissmann, C., & Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(23), 13148–13151. https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13148Brettschneider, J., Del Tredici, K., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2015). Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(2), 109–120. https://doi.org/10.1038/nrn3887

Brewer, J., Liu, R., Lu, Y., Scott, J., Wallace, K., Wallukat, G., Moseley, J., Herse, F., Dechend, R., Martin, J. N., & LaMarca, B. (2013). Endothelin-1, oxidative stress, and endogenous angiotensin II: mechanisms of angiotensin II type I receptor autoantibody-enhanced renal and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

blood pressure response during pregnancy. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *62*(5), 886–892. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01648

Brichta, L., & Greengard, P. (2014). Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: an update. *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*(DEC). https://doi.org/10.3389/FNANA.2014.00152

Brontesi, L., Imberdis, T., Ramalingam, N., & Dettmer, U. (2023). The effects of KTKEGV repeat motif and intervening ATVA sequence on α-synuclein solubility and assembly. *Journal of neurochemistry*, *165*(2), 246–258. https://doi.org/10.1111/jnc.15763

Brown, J. W., Buell, A. K., Michaels, T. C., Meisl, G., Carozza, J., Flagmeier, P., Vendruscolo, M., Knowles, T. P., Dobson, C. M., & Galvagnion, C. (2016). β-Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of α-synuclein aggregation via competitive binding to surfaces. *Scientific reports*, *6*, 36010. https://doi.org/10.1038/srep36010

Buchman, A. S., Shulman, J. M., Nag, S., Leurgans, S. E., Arnold, S. E., Morris, M. C., Schneider, J. A., & Bennett, D. A. (2012). Nigral pathology and parkinsonian signs in elders without Parkinson disease. *Annals of Neurology*, *71*(2), 258–266. https://doi.org/10.1002/ANA.22588

Budnik, V., Ruiz-Cañada, C., & Wendler, F. (2016). Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nature reviews. Neuroscience*, *17*(3), 160–172. https://doi.org/10.1038/nrn.2015.29

Bunnemann, B., Fuxe, K., Metzger, R., Mullins, J., Jackson, T. R., Hanley, M. R., & Ganten, D. (1990). Autoradiographic localization of mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. *Neuroscience Letters*, *114*(2), 147–153. https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90063-F

Burai, R., Ait-Bouziad, N., Chiki, A., & Lashuel, H. A. (2015). Elucidating the Role of Site-Specific Nitration of α-Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Disease via Protein Semisynthesis and Mutagenesis. *Journal of the American Chemical Society*, *137*(15), 5041–5052. https://doi.org/10.1021/ja5131726

Burger, D., Reudelhuber, T., Mahajan, A., Chibale, K., Sturrock, E., & Touyz, R. (2014). Effects of a domain-selective ACE inhibitor in a mouse model of chronic angiotensin II-dependent hypertension. *Clinical science*, *127*(1), 57-63. https://doi.org/10.1042/CS20130808

Burnier, M., & Brunner, H. R. (2000). Angiotensin II receptor antagonists. *The Lancet*, *355*(9204), 637–645. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)10365-9

Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., & Südhof, T. C. (2010). α-synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*. *Science (New York, N.Y.)*, *329*(5999), 1663–1667. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1195227

Bussi, C., Ramos, J. M. P., Arroyo, D. S., Gallea, J. I., Ronchi, P., Kolovou, A., Wang, J. M., Florey, O., Celej, M. S., Schwab, Y., Ktistakis, N. T., & Iribarren, P. (2017). α-synuclein fibrils induce autophagy in microglial cells as a consequence of lysosomal damage. *BioRxiv*. https://doi.org/10.1101/169375

Büyükafşar, K., Yalçin, I., Kurt, A. H., Tiftik, R. N., Şahan-Firat, S., & Aksu, F. (2006). Rho-kinase inhibitor, Y-27632, has an antinociceptive effect in mice. *European Journal of Pharmacology*, *541*(1–2), 49–52. https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2006.04.042

Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., & Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature Neuroscience*, *17*(8), 1022–1030. https://doi.org/10.1038/nn.3743

Campbell, N., LaMarca, B., & Cunningham Jr, M. W. (2018). The Role of Agonistic Autoantibodies to the Angiotensin II Type 1 Receptor (AT1-AA) in Pathophysiology of Preeclampsia. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *19*(10), 781–785. https://doi.org/10.2174/1389201019666180925121254

Caraveo, G., Auluck, P. K., Whitesell, L., Chung, C. Y., Baru, V., Mosharov, E. V., Yan, X., Ben-Johny, M., Soste, M., Picotti, P., Kim, H., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Sulzer, D., Yue, D. T., & Lindquist, S. (2014). Calcineurin determines toxic versus beneficial responses to α-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(34), E3544–E3552. https://doi.org/10.1073/pnas.1413201111

Carnazza, K., Komer, L., Pineda, A., Na, Y., Ramlall, T., Buchman, V., Eliezer, D., Sharma, M., & Burré, J. (2020). Beta- and gamma-synucleins modulate synaptic vesicle-binding of α-synuclein. *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2020.11.19.390419

Cavaliere, F., Cerf, L., Dehay, B., Ramos-Gonzalez, P., De Giorgi, F., Bourdenx, M., Bessede, A., Obeso, J. A., Matute, C., Ichas, F., & Bezard, E. (2017). *In vitro* α-synuclein neurotoxicity and spreading among neurons and astrocytes using Lewy body extracts from Parkinson disease brains. *Neurobiology of Disease*, *103*, 101–112. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2017.04.011

Cecchi, C., & Stefani, M. (2013). The amyloid-cell membrane system. The interplay between the biophysical features of oligomers/fibrils and cell membrane defines amyloid toxicity. *Biophysical Chemistry*, *182*, 30–43. https://doi.org/10.1016/J.BPC.2013.06.003

Chakraborty, R., & Zurzolo, C. (2022). Tunnelling nanotubes between neuronal and microglial cells allow bi-directional transfer of α-synuclein and mitochondria. *Cell Death & Disease*, *14*(5). https://doi.org/10.1101/2022.12.13.519450

Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O. M., & Südhof, T. C. (2005). α-synuclein cooperates with CSPα in preventing neurodegeneration. *Cell*, *123*(3), 383–396. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.028

Chang, D., Nalls, M. A., Hallgrímsdóttir, I. B., Hunkapiller, J., Brug, M. van der, Cai, F., Kerchner, G. A., Ayalon, G., Bingol, B., Sheng, M., Hinds, D., Behrens, T. W., Singleton, A. B., Bhangale, T. R., & Graham, R. R. (2017). A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. *Nature Genetics*, *49*(10), 1511–1516. https://doi.org/10.1038/ng.3955

Chang, J., Wu, M., Song, W., & Yang, F. (2020). Ultrasound Stimulation Suppresses LPS-Induced Proinflammatory Responses by Regulating NF-κB and CREB Activation in Microglial Cells. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991), 30*(8), 4597–4606. https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa062

Chansel, D., Czekalski, S., Vandermeersch, S., Ruffet, E., Fournié-Zaluski, M. C., & Ardaillou, R. (1998). Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *The American journal of physiology*, *275*(4), F535–F542. https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.275.4.F535

Chaturvedi, M., Raj, R., Yadav, S. K., Srivastava, T., Devi, S., Dharmadana, D., Valéry, C., Sharma, S. K., Kumar, D., & Priya, S. (2023). Implications of *In Vitro* Multi-Serine Phosphorylation of α-Synuclein in Aggregation and Cytotoxicity. *ACS chemical neuroscience*, *14*(17), 3103–3112. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.3c00234

Chaudhary, H., Stefanovic, A. N. D., Subramaniam, V., & Claessens, M. M. A. E. (2014). Membrane interactions and fibrillization of α-synuclein play an essential role in membrane disruption. *FEBS Letters*, *588*(23), 4457–4463. https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2014.10.016

Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., & Schapira, A. H. V. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *The Lancet Neurology*, *5*(3), 235–245. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70373-8

Chavarría, C., Ivagnes, R., & Souza, J. M. (2022). Extracellular α-synuclein: Mechanisms for Glial Cell Internalization and Activation. *Biomolecules*, *12*(5). https://doi.org/10.3390/biom12050655

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Chavarría, C., Rodríguez-Bottero, S., Quijano, C., Cassina, P., & Souza, J. (2018). Impact of monomeric, oligomeric and fibrillar α-synuclein on astrocyte reactivity and toxicity to neurons. *The Biochemical journal*, *475*(19), 3153-3169. https://doi.org/10.1042/BCJ20180297

Chen, K. S., Menezes, K., Rodgers, J. B., O'Hara, D. M., Tran, N., Fujisawa, K., Ishikura, S., Khodaei, S., Chau, H., Cranston, A., Kapadia, M., Pawar, G., Ping, S., Krizus, A., Lacoste, A., Spangler, S., Visanji, N. P., Marras, C., Majbour, N. K., … Kalia, L. V. (2021). Small molecule inhibitors of α-synuclein oligomers identified by targeting early dopamine-mediated motor impairment in C. elegans. *Molecular Neurodegeneration*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/S13024-021-00497-6

Chen, L., & Feany, M. B. (2005). α-Synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, *8*(5), 657–663. https://doi.org/10.1038/nn1443

Chen, L., Periquet, M., Wang, X., Negro, A., McLean, P. J., Hyman, B. T., & Feany, M. B. (2009). Tyrosine and serine phosphorylation of α-synuclein have opposing effects on neurotoxicity and soluble oligomer formation. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(11), 3257–3265. https://doi.org/10.1172/JCI39088

Chen, S. W., Drakulic, S., Deas, E., Ouberai, M., Aprile, F. A., Arranz, R., Ness, S., Roodveldt, C., Guilliams, T., De-Genst, E. J., Klenerman, D., Wood, N. W., Knowles, T. P., Alfonso, C., Rivas, G., Abramov, A. Y., Valpuesta, J. M., Dobson, C. M., & Cremades, N. (2015). Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during α-synuclein fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(16), E1994–E2003. https://doi.org/10.1073/pnas.1421204112

Chen, X., Hu, Y., Cao, Z., Liu, Q., & Cheng, Y. (2018). Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokine Aberrations in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Immunology*, *9*, 2122. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02122

Cheng, J., Liao, Y., Dong, Y., Hu, H., Yang, N., Kong, X., Li, S., Li, X., Guo, J., Qin, L., Yu, J., Ma, C., Li, J., Li, M., Tang, B., & Yuan, Z. (2020). Microglial autophagy defect causes parkinson disease-like symptoms by accelerating inflammasome activation in mice. *Autophagy*, *16*(12), 2193–2205. https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1719723

Cheng, S. Y., & Trombetta, L. D. (2004). The induction of amyloid precursor protein and α-synuclein in rat hippocampal astrocytes by diethyldithiocarbamate and copper with or without glutathione. *Toxicology Letters*, *146*(2), 139–149. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.09.009

Chia, S. J., Tan, E. K., & Chao, Y. X. (2020). Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, *21*(7), 2464. https://doi.org/10.3390/ijms21072464

Chiareli, R., Carvalho, G., Marques, B., Mota, L., Oliveira-Lima, O., Gomes, R., Birbrair, A., Gomez, R., Simão, F., Klempin, F., Leist, M., & Pinto, M. (2021). The Role of Astrocytes in the Neurorepair Process. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 665795. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.665795

Chinta, S. J., Mallajosyula, J. K., Rane, A., & Andersen, J. K. (2010). Mitochondrial α-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy *in vivo*. *Neuroscience Letters*, *486*(3), 235–239. https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2010.09.061

Choi, B. K., Choi, M. G., Kim, J. Y., Yang, Y., Lai, Y., Kweon, D. H., Lee, N. K., & Shin, Y. K. (2013). Large α-synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(10), 4087–4092. https://doi.org/10.1073/pnas.1218424110

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Choi, I., Zhang, Y., Seegobin, S. P., Pruvost, M., Wang, Q., Purtell, K., Zhang, B., & Yue, Z. (2020). Microglia clear neuron-released α-synuclein via selective autophagy and prevent neurodegeneration. *Nature Communications*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/S41467-020-15119-W

Choi, Y., Cha, S., Kang, S., Kim, J., Jou, I., & Park, S. (2018). Prion-like Propagation of α-Synuclein Is Regulated by the FcγRIIB-SHP-1/2 Signaling Pathway in Neurons. *Cell reports*, *22*(1), 136-148 . https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.009

Chu, Y., Dodiya, H., Aebischer, P., Olanow, C. W., & Kordower, J. H. (2009). Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: Relationship to α-synuclein inclusions. *Neurobiology of Disease*, *35*(3), 385–398. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2009.05.023

Chu, Y., Morfini, G. A., Langhamer, L. B., He, Y., Brady, S. T., & Kordower, J. H. (2012). Alterations in axonal transport motor proteins in sporadic and experimental Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, *135*(7), 2058–2073. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWS133

Chugh, G., Lokhandwala, M. F., & Asghar, M. (2012). Altered functioning of both renal dopamine D1 and angiotensin II type 1 receptors causes hypertension in old rats. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *59*(5), 1029–1036. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.192302

Cicchetti, F., Brownell, A. L., Williams, K., Chen, Y. I., Livni, E., & Isacson, O. (2002). Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *European Journal of Neuroscience*, *15*(6), 991–998. https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.2002.01938.X

Clark, A. K., Gruber-Schoffnegger, D., Drdla-Schutting, R., Gerhold, K. J., Malcangio, M., & Sandkühler, J. (2015). Selective Activation of Microglia Facilitates Synaptic Strength. *Journal of Neuroscience*, *35*(11), 4552–4570. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2061-14.2015

Clark, I. E., Dodson, M. W., Jiang, C., Cao, J. H., Huh, J. R., Seol, J. H., Yoo, S. J., Hay, B. A., & Guo, M. (2006). Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*, *441*(7097), 1162–1166. https://doi.org/10.1038/NATURE04779

Coelho-Cerqueira, E., Carmo-Gonçalves, P., Sá Pinheiro, A., Cortines, J., & Follmer, C. (2013). α-Synuclein as an intrinsically disordered monomer – fact or artefact? *The FEBS Journal*, *280*(19), 4915–4927. https://doi.org/10.1111/FEBS.12471

Colla, E., Coune, P., Liu, Y., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Iwatsubo, T., Schneider, B. L., & Lee, M. K. (2012). Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of α-synucleinopathy *in vivo*. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(10), 3306–3320. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5367-11.2012

Colom-Cadena, M., Grau-Rivera, O., Planellas, L., Cerquera, C., Morenas, E., Helgueta, S., Muñoz, L., Kulisevsky, J., Marti, M., Tolosa, E., Clarimón, J., Lleó, A., & Gelpí, E. (2017). Regional Overlap of Pathologies in Lewy Body Disorders. *Journal of Neuropatholgy & Experimental Neurology*, *76*, 216–224. https://doi.org/10.1093/jnen/nlx002

Connolly, B. S., & Lang, A. E. (2014). Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*, *311*(16), 1670–1683. https://doi.org/10.1001/JAMA.2014.3654

Conti, P., Lauritano, D., Caraffa, A., Gallenga, C., Kritas, S., Ronconi, G., & Martinotti, S. (2020). Microglia and mast cells generate proinflammatory cytokines in the brain and worsen inflammatory state: Suppressor effect of IL-37. *European journal of pharmacology*, *875*, 173035. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173035

Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K. E., Liu, F., Cao, S., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Marsischky, G., Kolodner, R. D., LaBaer, J., Rochet, J. C., Bonini, N. M., & Lindquist, S. (2006). α-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*, *313*(5785), 324–328. https://doi.org/10.1126/science.1129462

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cosardereliogl u, C., Nidadavolu, L. S., George, C. J., Oh, E. S., Bennett, D. A., Walston, J. D., & Abadir, P. M. (2020). Brain Renin–Angiotensin System at the Intersect of Physical and Cognitive Frailty. *Frontiers in Neuroscience*, *14*, 586314. https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.586314/BIBTEX

Costa-Besada, M. A., Valenzuela, R., Garrido-Gil, P., Villar-Cheda, B., Parga, J. A., Lanciego, J. L., & Labandeira-Garcia, J. L. (2018). Paracrine and Intracrine Angiotensin 1-7/Mas Receptor Axis in the Substantia Nigra of Rodents, Monkeys, and Humans. *Molecular Neurobiology*, *55*(7), 5847–5867. https://doi.org/10.1007/S12035-017-0805-Y

Costanzo, M., & Zurzolo, C. (2013). The cell biology of prion-like spread of protein aggregates: mechanisms and implication in neurodegeneration. *Biochemical Journal*, *452*(1), 1–17. https://doi.org/10.1042/BJ20121898

Costello, S., Cockburn, M., Bronstein, J., Zhang, X., & Ritz, B. (2009). Parkinson's Disease and Residential Exposure to Maneb and Paraquat From Agricultural Applications in the Central Valley of California. *American Journal of Epidemiology*, *169*(8), 919–926. https://doi.org/10.1093/AJE/KWP006

Cremades, N., Chen, S. W., & Dobson, C. M. (2017). Structural Characteristics of α-synuclein Oligomers. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *329*, 79–143. https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2016.08.010

Cristóvão, A. C., Guhathakurta, S., Bok, E., Je, G., Yoo, S. D., Choi, D. H., & Kim, Y. S. (2012). NADPH Oxidase 1 Mediates α-Synucleinopathy in Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience, 32*(42), 14465. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2246-12.2012

Cunningham, M. W., Williams, J. M., Amaral, L., Usry, N., Wallukat, G., Dechend, R., & Lamarca, B. (2016). Agonistic Autoantibodies to the Angiotensin II Type 1 Receptor Enhance ANG II Induced Renal Vascular Sensitivity and Reduce Renal Function during Pregnancy. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *68*(5), 1308. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07971

Da Conceição, F. S. L., Ngo-Abdalla, S., Houzel, J. C., & Rehen, S. K. (2010). Murine model for Parkinson's disease: From 6-OH dopamine lesion to behavioral test. *Journal of Visualized Experiments*, *35*, 1376. https://doi.org/10.3791/1376

Dalfó, E., & Ferrer, I. (2008). Early α-synuclein lipoxidation in neocortex in Lewy body diseases. *Neurobiology of Aging*, *29*(3), 408–417. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2006.10.022

Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*, *39*(6), 889–909. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3

Davey, G. P., & Clark, J. B. (1996). Threshold Effects and Control of Oxidative Phosphorylation in Nonsynaptic Rat Brain Mitochondria. *Journal of Neurochemistry*, *66*(4), 1617–1624. https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1996.66041617.X

Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., & George, J. M. (1998). Stabilization of α-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(16), 9443–9449. https://doi.org/10.1074/JBC.273.16.9443

Dawson, T. M., Ko, H. S., & Dawson, V. L. (2010). Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. *Neuron*, *66*(5), 646–661. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2010.04.034

Dawson, V. L., Dawson, T. M., London, E. D., Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(14), 6368–6371. https://doi.org/10.1073/PNAS.88.14.6368

De Araújo Lima, V., Nascimento, L., Eliezer, D., & Follmer, C. (2018). Role of Parkinson's Disease-Linked Mutations and N-Terminal Acetylation on the Oligomerization of α-synuclein Induced

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

by 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde. *ACS chemical neuroscience*, *10*(1), 690-703. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00498

De Bie, R. M. A., Clarke, C. E., Espay, A. J., Fox, S. H., & Lang, A. E. (2020). Initiation of pharmacological therapy in Parkinson's disease: when, why, and how. The Lancet. *Neurology*, *19*(5), 452–461. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30036-3

De Los Milagros Bassani Molinas, M., Beer, C., Hesse, F., Wirth, M., & Wagner, R. (2014). Optimizing the transient transfection process of HEK-293 suspension cells for protein production by nucleotide ratio monitoring. *Cytotechnology*, *66*(3), 493–514. https://doi.org/10.1007/S10616-013-9601-3/TABLES/4

De Morais, S. D. B., Shanks, J., & Zucker, I. H. (2018). Integrative Physiological Aspects of Brain RAS in Hypertension. *Current Hypertension Reports*, *20*(2). https://doi.org/10.1007/S11906-018-0810-1

De Oliveira, F., Bertolucci, P., Chen, E., & Smith, M. (2014). Brain-penetrating angiotensin-converting enzyme inhibitors and cognitive change in patients with dementia due to Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD, 42 Suppl 3*, S321-4. https://doi.org/10.3233/JAD-132189

Dechend, R., Viedt, C., Müller, D. N., Ugele, B., Brandes, R. P., Wallukat, G., Park, J. K., Janke, J., Barta, P., Theuer, J., Fiebeler, A., Homuth, V., Dietz, R., Haller, H., Kreuzer, J., & Luft, F. C. (2003). AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation*, *107*(12), 1632–1639. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000058200.90059.B1

Decressac, M., Mattsson, B., Weikop, P., Lundblad, M., Jakobsson, J., & Björklund, A. (2013). TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α-synuclein toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(19), E1817–E1826. https://doi.org/10.1073/pnas.1305623110

Del-Bel, E., Padovan-Neto, F. E., Szawka, R. E., Da-Silva, C. A., Raisman-Vozari, R., Anselmo-Franci, J., Romano-Dutra, A. C., & Guimaraes, F. S. (2014). Counteraction by nitric oxide synthase inhibitor of neurochemical alterations of dopaminergic system in 6-OHDA-lesioned rats under l-DOPA treatment. *Neurotoxicity Research*, *25*(1), 33–44. https://doi.org/10.1007/S12640-013-9406-3/FIGURES/4

Deliu, E., Cristina Brailoiu, G., Eguchi, S., Hoffman, N. E., Rabinowitz, J. E., Tilley, D. G., Madesh, M., Koch, W. J., & Brailoiu, E. (2014). Direct evidence of intracrine angiotensin II signaling in neurons. American Journal of Physiology. *Cell Physiology*, *306*(8). https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00131.2013

DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, *13*(7), 281–285. https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90110-V

Deng, H., Wang, P., & Jankovic, J. (2018). The genetics of Parkinson disease. *Ageing Research Reviews*, *42*, 72–85. https://doi.org/10.1016/J.ARR.2017.12.007

Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F. G., Stoorvogel, W., & Geuze, H. J. (2000). Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science*, *113*(19), 3365–3374. https://doi.org/10.1242/JCS.113.19.3365

Desplats, P., Lee, H. J., Bae, E. J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., & Lee, S. J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(31), 13010–13015. https://doi.org/10.1073/pnas.0903691106

Dettmer, U., Newman, A. J., Soldner, F., Luth, E. S., Kim, N. C., Von Saucken, V. E., Sanderson, J. B., Jaenisch, R., Bartels, T., & Selkoe, D. (2015). Parkinson-causing α-synuclein missense

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. *Nature Communications*, *6*(1), 1–16. https://doi.org/10.1038/ncomms8314

Deuschl, G., Beghi, E., Fazekas, F., Varga, T., Christoforidi, K. A., Sipido, E., Bassetti, C. L., Vos, T., & Feigin, V. L. (2020). The burden of neurological diseases in Europe: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Public Health*, *5*(10), e551–e567. https://doi.org/10.1016/S2468-2667(20)30190-0

Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(14), 9089–9100. https://doi.org/10.1074/JBC.M710012200

DeWitt, D. C., & Rhoades, E. (2013). α-Synuclein can inhibit SNARE-mediated vesicle fusion through direct interactions with lipid bilayers. *Biochemistry*, *52*(14), 2385–2387. https://doi.org/10.1021/bi4002369

Dhillion, P., Wallace, K., Herse, F., Scott, J., Wallukat, G., Heath, J., Mosely, J., Martin, J. N., Jr, Dechend, R., & LaMarca, B. (2012). IL-17-mediated oxidative stress is an important stimulator of AT1-AA and hypertension during pregnancy. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, *303*(4), R353–R358. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00051.2012

Di Maio, R., Barrett, P. J., Hoffman, E. K., Barrett, C. W., Zharikov, A., Borah, A., Hu, X., McCoy, J., Chu, C. T., Burton, E. A., Hastings, T. G., & Greenamyre, J. T. (2016). α-Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science Translational Medicine*, *8*(342). https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAF3634

Dieriks, B. V., Park, T. I. H., Fourie, C., Faull, R. L. M., Dragunow, M., & Curtis, M. A. (2017). α-synuclein transfer through tunneling nanotubes occurs in SH-SY5Y cells and primary brain pericytes from Parkinson's disease patients. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/srep42984

Dionísio, P., Amaral, J., & Rodrigues, C. (2021). Oxidative stress and regulated cell death in Parkinson's disease. *Ageing Research Reviews*, *67*. https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101263

Djaldetti, R., Lev, N., & Melamed, E. (2009). Lesions outside the CNS in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *24*(6), 793–800. https://doi.org/10.1002/MDS.22172

Domingues, R., Sant'Anna, R., da Fonseca, A. C. C., Robbs, B. K., Foguel, D., & Outeiro, T. F. (2022). Extracellular α-synuclein: Sensors, receptors, and responses. *Neurobiology of Disease*, *168*. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2022.105696

Dominguez-Meijide, A., Parrales, V., Vasili, E., González-Lizárraga, F., König, A., Lázaro, D. F., Lannuzel, A., Haik, S., Del Bel, E., Chehín, R., Raisman-Vozari, R., Michel, P. P., Bizat, N., & Outeiro, T. F. (2021). Doxycycline inhibits α-synuclein-associated pathologies *in vitro* and *in vivo*. *Neurobiology of Disease*, *151*, 105256. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2021.105256

Dominguez-Meijide, A., Rodriguez-Perez, A. I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2017). Dopamine modulates astroglial and microglial activity via glial renin-angiotensin system in cultures. *Brain, Behavior, and Immunity*, *62*, 277–290. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2017.02.013

Dominguez-Meijide, A., Vasili, E., König, A., Cima-Omori, M.-S., Ibáñez de Opakua, A., Leonov, A., Ryazanov, S., Zweckstetter, M., Griesinger, C., & Outeiro, T. F. (2020). Effects of pharmacological modulators of α-synuclein and tau aggregation and internalization. *Scientific Reports*, *10*(1), 12827. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69744-y

Dominguez-Meijide, A., Villar-Cheda, B., Garrido-Gil, P., Sierrra-Paredes, G., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2014). Effect of chronic treatment with angiotensin type 1 receptor antagonists on striatal dopamine levels in normal rats and in a rat model of Parkinson's disease

treated with l-DOPA. *Neuropharmacology*, *76(PART A)*, 156–168. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2013.07.016

Doorn, K. J., Moors, T., Drukarch, B., van de Berg, W. D. J., Lucassen, P. J., & van Dam, A. M. (2014). Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathologica Communications, 2*(1). https://doi.org/10.1186/S40478-014-0090-1

Double, K. L. (2012). Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, *18*(SUPPL. 1), S52–S54. https://doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70018-9

Dragun, D., Müller, D. N., Bräsen, J. H., Fritsche, L., Nieminen-Kelhä, M., Dechend, R., Kintscher, U., Rudolph, B., Hoebeke, J., Eckert, D., Mazak, I., Plehm, R., Schönemann, C., Unger, T., Budde, K., Neumayer, H. H., Luft, F. C., & Wallukat, G. (2005). Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *The New England journal of medicine*, *352*(6), 558–569. https://doi.org/10.1056/NEJMoa035717

Drozdova, P. B., Barbitoff, Y. A., Belousov, M. V., Skitchenko, R. K., Rogoza, T. M., Leclercq, J. Y., Kajava, A. V., Matveenko, A. G., Zhouravleva, G. A., & Bondarev, S. A. (2020). Estimation of amyloid aggregate sizes with semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis and its limitations. *Prion*, *14*(1), 118–128. https://doi.org/10.1080/19336896.2020.1751574

Dryanovski, D. I., Guzman, J. N., Xie, Z., Galteri, D. J., Volpicelli-Daley, L. A., Lee, V. M. Y., Miller, R. J., Schumacker, P. T., & James Surmeier, D. (2013). Calcium entry and α-synuclein inclusions elevate dendritic mitochondrial oxidant stress in dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(24), 10154–10164. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5311-12.2013

Edelman, A. M., Higgins, D. M., Bowman, C. L., Haber, S. N., Rabin, R. A., & Cho-Lee, J. (1992). Myosin light chain kinase is expressed in neurons and glia: immunoblotiing and immunocytochemical studies. *Molecular Brain Research*, *14*(1–2), 27–34. https://doi.org/10.1016/0169-328X(92)90006-W

Elmer, L., Juncos, J., Singer, C., Truong, D., Criswell, S., Parashos, S., Felt, L., Johnson, R., & Patni, R. (2018). Pooled Analyses of Phase III Studies of ADS-5102 (Amantadine) Extended-Release Capsules for Dyskinesia in Parkinson's Disease. *CNS Drugs*, *32*, 387 - 398. https://doi.org/10.1007/s40263-018-0498-4

Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., Stefanis, L., & Vekrellis, K. (2010). Cell-produced α-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(20), 6838–6851. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010

Emmer, K. L., Waxman, E. A., Covy, J. P., & Giasson, B. I. (2011). E46K Human α-Synuclein Transgenic Mice Develop Lewy-like and Tau Pathology Associated with Age-dependent, Detrimental Motor Impairment. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(40), 35104–35118. https://doi.org/10.1074/JBC.M111.247965

Engelender, S., Kaminsky, Z., Xin, G., Sharp, A. H., Amaravi, R. K., Kleiderlein, J. J., Margolis, R. L., Troncoso, J. C., Lanahan, A. A., Worley, P. F., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Ross, C. A. (1999). Synphilin-1 associates with α-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nature Genetics*, *22*(1), 110–114. https://doi.org/10.1038/8820

Engeli, S., Negrel, R., & Sharma, A. M. (2000). Physiology and Pathophysiology of the Adipose Tissue Renin-Angiotensin System. *Hypertension*, *35*(6), 1270–1277. https://doi.org/10.1161/01.HYP.35.6.1270

Eschbach, J., Von Einem, B., Müller, K., Bayer, H., Scheffold, A., Morrison, B. E., Rudolph, K. L., Thal, D. R., Witting, A., Weydt, P., Otto, M., Fauler, M., Liss, B., McLean, P. J., La Spada, A.

R., Ludolph, A. C., Weishaupt, J. H., & Danzer, K. M. (2015). Mutual exacerbation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α deregulation and α-synuclein oligomerization. *Annals of Neurology*, *77*(1), 15–32. https://doi.org/10.1002/ANA.24294

Exner, N., Treske, B., Paquet, D., Holmström, K., Schiesling, C., Gispert, S., Carballo-Carbajal, I., Berg, D., Hoepken, H. H., Gasser, T., Krüger, R., Winklhofer, K. F., Vogel, F., Reichert, A. S., Auburger, G., Kahle, P. J., Schmid, B., & Haass, C. (2007). Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *Journal of Neuroscience*, *27*(45), 12413–12418. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0719-07.2007

Fan, Y., Limprasert, P., Murray, I. V. J., Smith, A. C., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Sopher, B. L., & La Spada, A. R. (2006). β-synuclein modulates α-synuclein neurotoxicity by reducing α-synuclein protein expression. *Human Molecular Genetics*, *15*(20), 3002–3011. https://doi.org/10.1093/HMG/DDL242

Fares, M. B., Ait-Bouziad, N., Dikiy, I., Mbefo, M. K., Jovičić, A., Kiely, A., Holton, J. L., Lee, S. J., Gitler, A. D., Eliezer, D., & Lashuel, H. A. (2014). The novel Parkinson's disease linked mutation G51D attenuates *in vitro* aggregation and membrane binding of α-synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells. *Human Molecular Genetics*, *23*(17), 4491–4509. https://doi.org/10.1093/HMG/DDU165

Fares, M. B., Maco, B., Oueslati, A., Rockenstein, E., Ninkina, N., Buchman, V. L., Masliah, E., & Lashuel, H. A. (2016). Induction of de novo α-synuclein fibrillization in a neuronal model for Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(7), E912–E921. https://doi.org/10.1073/PNAS.1512876113

Fayyad, M., Majbour, N., Vaikath, N., Erskine, D., El-Tarawneh, H., Sudhakaran, I., Abdesselem, H., & El-Agnaf, O. (2020). Generation of monoclonal antibodies against phosphorylated α-Synuclein at serine 129: Research tools for synucleinopathies. *Neuroscience Letters*, *725*, 134899. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134899

Fearnley, J. M., & Lees, A. J. (1991). Ageing and parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, *114*(5), 2283–2301. https://doi.org/10.1093/BRAIN/114.5.2283

Fellner, L., Irschick, R., Schanda, K., Reindl, M., Klimaschewski, L., Poewe, W., Wenning, G. K., & Stefanova, N. (2013). Toll-like receptor 4 is required for α-synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia*, *61*(3), 349–360. https://doi.org/10.1002/GLIA.22437

Ferguson, A. V., Washburn, D. L. S., & Latchford, K. J. (2001). Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *226*(2), 85–96. https://doi.org/10.1177/153537020122600205

Fleegal-DeMotta, M. A., Doghu, S., & Banks, W. A. (2009). Angiotensin II modulates BBB permeability via activation of the AT(1) receptor in brain endothelial cells. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *29*(3), 640–647. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.158

Folke, J., Ferreira, N., Brudek, T., Borghammer, P., & Van Den Berge, N. (2022). Passive Immunization in α-Synuclein Preclinical Animal Models. *Biomolecules*, *12*(2), 168. https://doi.org/10.3390/biom12020168

Folke, J., Rydbirk, R., Løkkegaard, A., Hejl, A. M., Winge, K., Starhof, C., Salvesen, L., Pedersen, L. Ø., Aznar, S., Pakkenberg, B., & Brudek, T. (2021). Cerebrospinal fluid and plasma distribution of anti-α-synuclein IgMs and IgGs in multiple system atrophy and Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders, 87*, 98–104. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2021.05.001

Follett, J., Bugarcic, A., Yang, Z., Ariotti, N., Norwood, S. J., Collins, B. M., Parton, R. G., & Teasdale, R. D. (2016). Parkinson Disease-linked Vps35 R524W Mutation Impairs the Endosomal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Association of Retromer and Induces α-Synuclein Aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(35), 18283–18298. https://doi.org/10.1074/JBC.M115.703157

Fornai, F., Schlüter, O. M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C. L., Pontarelli, F., Battaglia, G., Pellegrini, A., Nicoletti, F., Ruggieri, S., Paparelli, A., & Südhof, T. C. (2005). Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and α-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(9), 3413–3418. https://doi.org/10.1073/pnas.0409713102

Forno, L. S. (1996). Neuropathology of Parkinson's Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *55*(3), 259–272. https://doi.org/10.1097/00005072-199603000-00001

Forno, L. S., DeLanney, L. E., Irwin, I., & Langston, J. W. (1993). Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonsim and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Advances in Neurology*, *60*, 600–608.

Fourgeaud, L., Traves, P. G., Tufail, Y., Leal-Bailey, H., Lew, E. D., Burrola, P. G., Callaway, P., Zagorska, A., Rothlin, C. V., Nimmerjahn, A., & Lemke, G. (2016). TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. *Nature*, *532*(7598), 240–244. https://doi.org/10.1038/nature17630

Frey, B., AlOkda, A., Jackson, M. P., Riguet, N., Duce, J. A., & Lashuel, H. A. (2021). Monitoring α-synuclein oligomerization and aggregation using bimolecular fluorescence complementation assays: What you see is not always what you get. *Journal of Neurochemistry*, *157*(4), 872–888. https://doi.org/10.1111/jnc.15147

Frimpong, A. K., Abzalimov, R. R., Uversky, V. N., & Kaltashov, I. A. (2010). Characterization of intrinsically disordered proteins with electrospray ionization mass spectrometry: Conformational heterogeneity of α-synuclein. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *78*(3), 714–722. https://doi.org/10.1002/PROT.22604

Fry, M., & Ferguson, A. V. (2007). The sensory circumventricular organs: brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. *Physiology & Behavior*, *91*(4), 413–423. https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2007.04.003

Fu, M. L. X., Herlitz, H., Schulze, W., Wallukat, G., Micke, P., Eftekhari, P., Sjögren, K. G., Hjalmarson, Å., Müller-Esterl, W., & Hoebeke, J. (2000). Autoantibodies against the angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension. *Journal of Hypertension*, *18*(7), 945–953. https://doi.org/10.1097/00004872-200018070-00017

Fu, P., Tang, R., Yu, Z., Li, C., Chen, X., Xie, M., Wang, W., & Luo, X. (2016). Rho-Associated Kinase Inhibitors Promote Microglial Uptake Via the ERK Signaling Pathway. *Neuroscience Bulletin*, *32*(1), 83–91. https://doi.org/10.1007/s12264-016-0013-1

Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Shen, J., Takio, K., & Iwatsubo, T. (2002). α-synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature Cell Biology*, *4*(2), 160–164. https://doi.org/10.1038/ncb748

Fusco, G., Chen, S. W., Williamson, P. T. F., Cascella, R., Perni, M., Jarvis, J. A., Cecchi, C., Vendruscolo, M., Chiti, F., Cremades, N., Ying, L., Dobson, C. M., & De Simone, A. (2017). Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α-synuclein oligomers. *Science (New York, N.Y.)*, *358*(6369), 1440–1443. https://doi.org/10.1126/science.aan6160

Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J., & Alpers, M. (1966). Experimental Transmission of a Kuru-like Syndrome to Chimpanzees. *Nature*, *209*(5025), 794–796. https://doi.org/10.1038/209794a0

Gallagher, P. E., Chappell, M. C., Ferrario, C. M., & Tallant, E. A. (2006). Distinct roles for ANG II and ANG-(1-7) in the regulation of angiotensin-converting enzyme 2 in rat astrocytes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

American Journal of Physiology. Cell Physiology, *290*(2). https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00409.2004

Ganten, D., Marquez-Julio, A., Granger, P., Hayduk, K., Karsunky, K. P., Boucher, R., & Genest, J. (1971). Renin in dog brain. *The American journal of physiology*, *221*(6), 1733–1737. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1971.221.6.1733

Gao, G., Wang, Z., Lu, L., Duan, C., Wang, X., & Yang, H. (2017). Morphological analysis of mitochondria for evaluating the toxicity of α-synuclein in transgenic mice and isolated preparations by atomic force microscopy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *96*, 1380–1388. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.11.057

Gao, H. M., Kotzbauer, P. T., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2008). Neuroinflammation and Oxidation/Nitration of α-Synuclein Linked to Dopaminergic Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, *28*(30), 7687–7698. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0143-07.2008

Gao, H.-M., Liu, B., Zhang, W., & Hong, J.-S. (2003). Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the *in vitro* MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *17*(13), 1–22. https://doi.org/10.1096/FJ.03-0109FJE

Gao, H., Zhang, F., Zhou, H., Kam, W., Wilson, B., & Hong, J. (2011). Neuroinflammation and α-Synuclein Dysfunction Potentiate Each Other, Driving Chronic Progression of Neurodegeneration in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Environmental Health Perspectives*, *119*, 807 - 814. https://doi.org/10.1289/ehp.1003013

Gao, J., Marc, Y., Iturrioz, X., Leroux, V., Balavoine, F., & Llorens-Cortes, C. (2014). A new strategy for treating hypertension by blocking the activity of the brain renin-angiotensin system with aminopeptidase A inhibitors. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *127*(3), 135–148. https://doi.org/10.1042/CS20130396

Gao, Q., Chen, R., Wu, L., Huang, Q., Wang, X.-X., Tian, Y.-Y., & Zhang, Y.-D. (2022). Angiotensin-(1-7) reduces α-synuclein aggregation by enhancing autophagic activity in Parkinson's disease. *Neural Regeneration Research*, *17*(5), 1138–1145. https://doi.org/10.4103/1673-5374.324854

Garcia-Garrote, M., Pérez-Villalba, A., Garrido-Gil, P., Belenguer, G., Parga, J., Pérez-Sánchez, F., Labandeira-Garcia, J., Fariñas, I., & Rodriguez-Pallares, J. (2019). Interaction between Angiotensin Type 1, Type 2, and Mas Receptors to Regulate Adult Neurogenesis in the Brain Ventricular–Subventricular Zone. *Cells*, *8*. https://doi.org/10.3390/cells8121551

Garcia, M. I., & Boehning, D. (2017). Cardiac inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, *1864*(6), 907–914. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.017

Garg, M., Royce, S. G., Tikellis, C., Shallue, C., Batu, D., Velkoska, E., Burrell, L. M., Patel, S. K., Beswick, L., Jackson, A., Britto, K., Lukies, M., Sluka, P., Wardan, H., Hirokawa, Y., Tan, C. W., Faux, M., Burgess, A. W., Hosking, P., … Lubel, J. (2020). Imbalance of the renin-angiotensin system may contribute to inflammation and fibrosis in IBD: a novel therapeutic target? *Gut*, *69*(5), 841–854. https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2019-318512

Garrido-Gil, P., Dominguez-Meijide, A., Moratalla, R., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2018a). Aging-related dysregulation in enteric dopamine and angiotensin system interactions: implications for gastrointestinal dysfunction in the elderly. *Oncotarget*, *9*(13), 10834–10846. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.24330

Garrido-Gil, P., Joglar, B., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2012). Involvement of PPAR-γ in the neuroprotective and anti-inflammatory effects of angiotensin type 1 receptor inhibition: Effects of the receptor antagonist telmisartan and receptor deletion

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

in a mouse MPTP model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-38/FIGURES/6_523

Garrido-Gil, P., Pedrosa, M. A., Garcia-Garrote, M., Pequeño-Valtierra, A., Rodríguez-Castro, J., García-Souto, D., Rodríguez-Pérez, A. I., & Labandeira-Garcia, J. L. (2022). Microglial angiotensin type 2 receptors mediate sex-specific expression of inflammatory cytokines independently of circulating estrogen. *Glia*, *70*(12), 2348–2360. https://doi.org/10.1002/GLIA.24255

Garrido-Gil, P., Rodriguez-Pallares, J., Dominguez-Meijide, A., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2013b). Brain angiotensin regulates iron homeostasis in dopaminergic neurons and microglial cells. *Experimental Neurology*, *250*, 384–396. https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2013.10.013

Garrido-Gil, P., Rodriguez-Perez, A. I., Dominguez-Meijide, A., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2018b). Bidirectional Neural Interaction Between Central Dopaminergic and Gut Lesions in Parkinson's Disease Models. *Molecular Neurobiology*, *55*(9), 7297–7316. https://doi.org/10.1007/S12035-018-0937-8

Garrido-Gil, P., Rodriguez-Perez, A. I., Fernandez-Rodriguez, P., Lanciego, J. L., & Labandeira-Garcia, J. L. (2017). Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the rat and monkey striatal neurons and glial cells. *Brain Structure & Function*, *222*(6), 2559–2571. https://doi.org/10.1007/S00429-016-1357-Z

Garrido-Gil, P., Rodriguez-Perez, A. I., Lage, L., & Labandeira-Garcia, J. L. (2021). Estrogen Deficiency and Colonic Function: Surgical Menopause and Sex Differences in Angiotensin and Dopamine Receptor Interaction. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, *76*(9), 1533–1541. https://doi.org/10.1093/GERONA/GLAA244

Garrido-Gil, P., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Lanciego, J. L., & Labandeira-Garcia, J. L. (2013a). Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Structure & Function*, *218*(2), 373–388. https://doi.org/10.1007/S00429-012-0402-9

Gasser, T. (2009). Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *11*, e22. https://doi.org/10.1017/S1462399409001148

Gatta, N., Cammarota, G., & Gentile, V. (2016). Possible roles of transglutaminases in molecular mechanisms responsible for human neurodegenerative diseases. *AIMS Biophysics*, *3*, 529-545. https://doi.org/10.3934/biophy.2016.4.529

Gebke, E., Müller, A. R., Jurzak, M., & Gerstberger, R. (1998). Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience*, *85*(2), 509–520. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00601-5

Gegg, M. E., Cooper, J. M., Schapira, A. H. V., & Taanman, J. W. (2009). Silencing of PINK1 expression affects mitochondrial DNA and oxidative phosphorylation in dopaminergic cells. *PLoS ONE*, *4*(3). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0004756

Geisler, S., Holmström, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J., & Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology*, *12*(2), 119–131. https://doi.org/10.1038/NCB2012

Gelpi, E., Navarro-Otano, J., Tolosa, E., Gaig, C., Compta, Y., Rey, M., Marti, M., Hernández, I., Valldeoriola, F., Reñé, R., & Ribalta, T. (2014). Multiple organ involvement by α-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Movement Disorders*, *29*. https://doi.org/10.1002/mds.25776

George, J. M. (2002). The synucleins. *Genome Biology*, *3*(1). https://doi.org/10.1186/GB-2001-3-1-REVIEWS3002

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

George, J. M., Jin, H., Woods, W. S., & Clayton, D. F. (1995). Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron*, *15*(2), 361–372. https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90040-3

George, S., Rey, N. L., Tyson, T., Esquibel, C., Meyerdirk, L., Schulz, E., Pierce, S., Burmeister, A. R., Madaj, Z., Steiner, J. A., Escobar Galvis, M. L., Brundin, L., & Brundin, P. (2019). Microglia affect α-synuclein cell-to-cell transfer in a mouse model of Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *14*(1), 34. https://doi.org/10.1186/s13024-019-0335-3

Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Frederick J. Monsma, Jr., & Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 Dopamine Receptor-regulated Gene Expression of Striatonigral and Striatopallidal Neurons. *Science*, *250*(4986), 1429–1432. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2147780

Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R. B., & Brooks, D. J. (2006). *In vivo* imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, *21*(2), 404–412. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2005.08.002

Giasson, B. I., Duda, J. E., Murray, I. V. J., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig, H. I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective α-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, *290*(5493), 985–989. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.290.5493.985/SUPPL_FILE/1052537S2_THUMB.GIF

Gibb, W. R. G. (1997). Functional Neuropathology in Parkinson's Disease. *European Neurology*, *38*(Suppl. 2), 21–25. https://doi.org/10.1159/000113472

Gibrat, C., Saint-Pierre, M., Bousquet, M., Lévesque, D., Rouillard, C., & Cicchetti, F. (2009). Differences between subacute and chronic MPTP mice models: investigation of dopaminergic neuronal degeneration and α-synuclein inclusions. *Journal of Neurochemistry*, *109*(5), 1469–1482. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2009.06072.X

Gilks, W. P., Abou-Sleiman, P. M., Gandhi, S., Jain, S., Singleton, A., Lees, A. J., Shaw, K., Bhatia, K. P., Bonifati, V., Quinn, N. P., Lynch, J., Healy, D. G., Holton, J. L., Revesz, T., & Wood, N. W. (2005). A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *The Lancet*, *365*(9457), 415–416. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17830-1

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, *330*(6005), 841–845. https://doi.org/10.1126/science.1194637

Giovanni, A., Sieber, B. A., Heikkila, R. E., & Sonsalla, P. K. (1994). Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: Systemic administration. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *270*(3), 1000–1007.

Gironacci, M. M., Vicario, A., Cerezo, G., & Silva, M. G. (2018). The depressor axis of the renin-angiotensin system and brain disorders: a translational approach. *Clinical science (London, England: 1979)*, *132*(10), 1021–1038. https://doi.org/10.1042/CS20180189

Gitler, A. D., Bevis, B. J., Shorter, J., Strathearn, K. E., Hamamichi, S., Su, L. J., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Rochet, J. C., McCaffery, J. M., Barlowe, C., & Lindquist, S. (2008). The Parkinson's disease protein α-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(1), 145–150. https://doi.org/10.1073/PNAS.0710685105

Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*, *140*(6), 918–934. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.02.016

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K., & Braak, H. (2012). 100 years of Lewy pathology. *Nature Reviews Neurology*, *9*(1), 13–24. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.242

Golbe, L. I. (1990). The genetics of Parkinson's disease: A reconsideration. *Neurology*, *40*(10), 7–14. https://www.researchwithrutgers.com/en/publications/the-genetics-of-parkinsons-disease-a-reconsideration

Goloborshcheva, V. V, Kucheryanu, V. G., Voronina, N. A., Teterina, E. V, Ustyugov, A. A., & Morozov, S. G. (2022). Synuclein Proteins in MPTP-Induced Death of Substantia Nigra Pars Compacta Dopaminergic Neurons. *Biomedicines*, *10*(9). https://doi.org/10.3390/biomedicines10092278

Gómez-Benito, M., Granado, N., García-Sanz, P., Michel, A., Dumoulin, M., & Moratalla, R. (2020). Modeling Parkinson's Disease With the α-Synuclein Protein. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 524328. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00356/BIBTEX

Gonçalves, S. A., Matos, J. E., & Outeiro, T. F. (2010). Zooming into protein oligomerization in neurodegeneration using BiFC. *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(11), 643–651. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.007

González-Hernández, T., Barroso-Chinea, P., De La Cruz Muros, I., Del Mar Pérez-Delgado, M., & Rodríguez, M. (2004). Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, *479*(2), 198–215. https://doi.org/10.1002/CNE.20323

Goodwin, J., Nath, S., Engelborghs, Y., & Pountney, D. L. (2013). Raised calcium and oxidative stress cooperatively promote α-synuclein aggregate formation. *Neurochemistry International*, *62*(5), 703–711. https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2012.11.004

Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M. H., Clohisey, S., Kenneth Baillie, J., Stevens, M. P., Freeman, T. C., Summers, K. M., & McColl, B. W. (2016). Microglial brain region−dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature Neuroscience*, *19*(3), 504–516. https://doi.org/10.1038/nn.4222

Grammatopoulos, T. N., Jones, S. M., Ahmadi, F. A., Hoover, B. R., Snell, L. D., Skoch, J., Jhaveri, V. V., Poczobutt, A. M., Weyhenmeyer, J. A., & Zawada, W. M. (2007a). Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Molecular Neurodegeneration*, *2*(1). https://doi.org/10.1186/1750-1326-2-1

Grammatopoulos, T. N., Outeiro, T. F., Hyman, B. T., & Standaert, D. G. (2007b). Angiotensin II protects against α-synuclein toxicity and reduces protein aggregation *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *363*(3), 846–851. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.043

Graybiel, A. M., Hirsch, E. C., & Agid, Y. (1990). The nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Advances in Neurology*, *53*, 17–29. https://europepmc.org/article/med/1978514

Greenamyre, J. T., Eller, R. V., Zhang, Z., Ovadia, A., Kurlan, R., & Gash, D. M. (1994). Antiparkinsonian effects of remacemide hydrochloride, a glutamate antagonist, in rodent and primate models of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, *35*(6), 655–661. https://doi.org/10.1002/ANA.410350605

Greenwood, J., Walters, C. E., Pryce, G., Kanuga, N., Beraud, E., Baker, D., & Adamson, P. (2003). Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *The FASEB Journal*, *17*(8), 1–16. https://doi.org/10.1096/FJ.02-1014FJE

Grobe, J. L., Xu, D., & Sigmund, C. D. (2008). An intracellular renin-angiotensin system in neurons: fact, hypothesis, or fantasy. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *23*(4), 187–193. https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00002.2008

Grozdanov, V., & Danzer, K. M. (2018). Release and uptake of pathologic α-synuclein. *Cell and Tissue Research*, *373*(1), 175–182. https://doi.org/10.1007/S00441-017-2775-9/FIGURES/1

Guhathakurta, S., Bok, E., Evangelista, B. A., & Kim, Y. S. (2017). Deregulation of α-synuclein in Parkinson's disease: Insight from epigenetic structure and transcriptional regulation of *SNCA*. *Progress in Neurobiology*, *154*, 21–36. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2017.04.004

Guo, M., Wang, J., Zhao, Y., Feng, Y., Han, S., Dong, Q., Cui, M., & Tieu, K. (2020). Microglial exosomes facilitate α-synuclein transmission in Parkinson's disease. *Brain*, *143*(5), 1476–1497. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAA090

Gurkar, A. U., Chu, K., Raj, L., Bouley, R., Lee, S. H., Kim, Y. B., Dunn, S. E., Mandinova, A., & Lee, S. W. (2013). Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress. *Nature Communications*, *4*, 2189. https://doi.org/10.1038/NCOMMS3189

Haim, L. Ben, Carrillo-de Sauvage, M. A., Ceyzériat, K., & Escartin, C. (2015). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 151863. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2015.00278/BIBTEX

Hall, K., Yang, S., Sauchanka, O., Spillantini, M., & Anichtchik, O. (2015). Behavioural deficits in transgenic mice expressing human truncated (1–120 amino acid) α-synuclein. *Experimental Neurology*, *264*, 8-13. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.11.003

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1985). Oxygen radicals and the nervous system. *Trends in Neurosciences*, *8*(C), 22–26. https://doi.org/10.1016/0166-2236(85)90010-4

Han, J., Wang, M., Ren, M., & Lou, H. (2017). Contributions of triggering-receptor-expressed-on-myeloid-cells-2 to neurological diseases. *International Journal of Neuroscience*, *127*(4), 368–375. https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1264072

Haque, M., Akther, M., Jakaria, M., Kim, I., Azam, S., & Choi, D. (2020). Targeting the Microglial NLRP3 Inflammasome and Its Role in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, *35*. https://doi.org/10.1002/mds.27874

Hariz, M., y Blomstedt, P. (2022). Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Journal of Internal Medicine*, *292*, 764-778. https://doi.org/10.1111/joim.13541

Harms, A. S., Ferreira, S. A., & Romero-Ramos, M. (2021). Periphery and brain, innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, *141*(4), 527–545. https://doi.org/10.1007/S00401-021-02268-5

Harrower, T. P., Michell, A. W., & Barker, R. A. (2005). Lewy bodies in Parkinson's disease: Protectors or perpetrators? *Experimental Neurology*, *195*(1), 1–6. https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2005.06.002

Hashimoto, M., Rockenstein, E., Mante, M., Mallory, M., & Masliah, E. (2001). β-synuclein inhibits α-synuclein aggregation: A possible role as an anti-Parkinsonian factor. *Neuron*, *32*(2), 213–223. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00462-7

Hassanzadeh, K., Liu, J., Maddila, S., & Mouradian, M. M. (2024). Posttranslational Modifications of **α**-Synuclein, Their Therapeutic Potential, and Crosstalk in Health and Neurodegenerative Diseases. *Pharmacological reviews*, *76*(6), 1254–1290. https://doi.org/10.1124/pharmrev.123.001111

He, Q., Li, Y. hua, Guo, S. si, Wang, Y., Lin, W., Zhang, Q., Wang, J., Ma, C. gen, & Xiao, B. G. (2016). Inhibition of Rho-kinase by Fasudil protects dopamine neurons and attenuates inflammatory response in an intranasal lipopolysaccharide-mediated Parkinson's model. *European Journal of Neuroscience*, *43*(1), 41–52. https://doi.org/10.1111/EJN.13132

Herrera, F., Gonçalves, S., & Outeiro, T. F. (2012). Imaging protein oligomerization in neurodegeneration using bimolecular fluorescence complementation. *Methods in Enzymology*, *506*, 157–174. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391856-7.00033-0

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Herro, R., & Croft, M. (2016). The control of tissue fibrosis by the inflammatory molecule LIGHT (TNF Superfamily member 14). *Pharmacological Research*, *104*, 151–155. https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2015.12.018

Herse, F., & Lamarca, B. (2013). Angiotensin II type 1 receptor autoantibody (AT1-AA)-mediated pregnancy hypertension. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, *69*(4), 413–418. https://doi.org/10.1111/AJI.12072

Hettiarachchi, N. T., Parker, A., Dallas, M. L., Pennington, K., Hung, C. C., Pearson, H. A., Boyle, J. P., Robinson, P., & Peers, C. (2009). α-synuclein modulation of Ca2+ signaling in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Journal of Neurochemistry*, *111*(5), 1192–1201. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2009.06411.X

Hijaz, B. A., & Volpicelli-Daley, L. A. (2020). Initiation and propagation of α-synuclein aggregation in the nervous system. *Molecular Neurodegeneration*, *15*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/S13024-020-00368-6/FIGURES/2

Hoenen, C., Gustin, A., Birck, C., Kirchmeyer, M., Beaume, N., Felten, P., Grandbarbe, L., Heuschling, P., & Heurtaux, T. (2016). α-synuclein Proteins Promote Pro-Inflammatory Cascades in Microglia: Stronger Effects of the A53T Mutant. *PLOS ONE*, *11*(9), e0162717. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0162717

Holmes, B. B., DeVos, S. L., Kfoury, N., Li, M., Jacks, R., Yanamandra, K., Ouidja, M. O., Brodsky, F. M., Marasa, J., Bagchi, D. P., Kotzbauer, P. T., Miller, T. M., Papy-Garcia, D., & Diamond, M. I. (2013). Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(33), E3138–E3147. https://doi.org/10.1073/PNAS.1301440110/SUPPL_FILE/SM01.MOV

Hou, L., Bao, X., Zang, C., Yang, H., Sun, F., Che, Y., Wu, X., Li, S., Zhang, D., & Wang, Q. (2018). Integrin CD11b mediates α-synuclein-induced activation of NADPH oxidase through a Rho-dependent pathway. *Redox Biology*, *14*, 600–608. https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2017.11.010

Hughes, C. D., Choi, M. L., Ryten, M., Hopkins, L., Drews, A., Botía, J. A., Iljina, M., Rodrigues, M., Gagliano, S. A., Gandhi, S., Bryant, C., & Klenerman, D. (2019). Picomolar concentrations of oligomeric α-synuclein sensitizes TLR4 to play an initiating role in Parkinson's disease pathogenesis. *Acta neuropathologica*, *137*(1), 103–120. https://doi.org/10.1007/s00401-018-1907-y

Hussain, M., & Awan, F. R. (2018). Hypertension regulating angiotensin peptides in the pathobiology of cardiovascular disease. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y.: 1993)*, *40*(4), 344–352. https://doi.org/10.1080/10641963.2017.1377218

Ichihara, A., & Yatabe, M. S. (2019). The (pro)renin receptor in health and disease. *Nature reviews. Nephrology*, *15*(11), 693–712. https://doi.org/10.1038/s41581-019-0160-5

Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., & Hashizume, Y. (2003). Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathologica*, *106*(6), 518–526. https://doi.org/10.1007/S00401-003-0766-2/FIGURES/6

Irani, R. A., Zhang, Y., Zhou, C. C., Blackwell, S. C., Hicks, M. J., Ramin, S. M., Kellems, R. E., & Xia, Y. (2010). Autoantibody-mediated angiotensin receptor activation contributes to preeclampsia through tumor necrosis factor-alpha signaling. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *55*(5), 1246–1253. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150540

Irwin, D. J., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2013). Parkinson's disease dementia: convergence of α-synuclein, tau and amyloid-β pathologies. *Nature Reviews. Neuroscience*, *14*(9), 626. https://doi.org/10.1038/NRN3549

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Isaac, R., Reis, F., Ying, W., & Olefsky, J. (2021). Exosomes as mediators of intercellular crosstalk in metabolism. *Cell metabolism*, *33* (9), 1744-1762. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.08.006

Iyer, M., Subramaniam, M. D., Venkatesan, D., Cho, S. G., Ryding, M., Meyer, M., & Vellingiri, B. (2021). Role of RhoA-ROCK signaling in Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology*, *894*, 173815. https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2020.173815

Izumisawa, Y., Tanaka-Yamamoto, K., Ciriello, J., Kitamura, N., & Shibuya, I. (2019). Persistent cytosolic Ca2+ increase induced by angiotensin II at nanomolar concentrations in acutely dissociated subfornical organ (SFO) neurons of rats. *Brain Research*, *1718*, 137–147. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2019.05.014

Jackson, L., Eldahshan, W., Fagan, S. C., & Ergul, A. (2018). Within the Brain: The Renin Angiotensin System. *International journal of molecular sciences*, *19*(3), 876. https://doi.org/10.3390/ijms19030876

Jackson-Lewis, V., Blesa, J., & Przedborski, S. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, *18*(SUPPL. 1), S183–S185. https://doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70057-8

Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S. (2007). Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nature Protocols*, *2*(1), 141–151. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.342

Jamal F. (2020). Immunotherapies Targeting α-Synuclein in Parkinson Disease. *Federal practitioner: for the health care professionals of the VA, DoD, and PHS*, *37*(8), 375–379. https://doi.org/10.12788/fp.0026

Jan, A., Richner, M., Vægter, C., Nyengaard, J., & Jensen, P. (2019). Gene Transfer in Rodent Nervous Tissue Following Hindlimb Intramuscular Delivery of Recombinant Adeno-Associated Virus Serotypes AAV2/6, AAV2/8, and AAV2/9. *Neuroscience Insights*, *14*. https://doi.org/10.1177/1179069519889022

Janezic, S., Threlfell, S., Dodson, P. D., Dowie, M. J., Taylor, T. N., Potgieter, D., Parkkinen, L., Senior, S. L., Anwar, S., Ryan, B., Deltheil, T., Kosillo, P., Cioroch, M., Wagner, K., Ansorge, O., Bannerman, D. M., Bolam, J. P., Magill, P. J., Cragg, S. J., & Wade-Martins, R. (2013). Deficits in dopaminergic transmission precede neuron loss and dysfunction in a new Parkinson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(42). https://doi.org/10.1073/PNAS.1309143110

Jang, H. J., & Chung, K. C. (2022). The ubiquitin-proteasome system and autophagy mutually interact in neurotoxin-induced dopaminergic cell death models of Parkinson's disease. *FEBS letters*, *596*(22), 2898–2913. https://doi.org/10.1002/1873-3468.14479

Jankovic, J., Goodman, I., Safirstein, B., Marmon, T. K., Schenk, D. B., Koller, M., Zago, W., Ness, D. K., Griffith, S. G., Grundman, M., Soto, J., Ostrowitzki, S., Boess, F. G., Martin-Facklam, M., Quinn, J. F., Isaacson, S. H., Omidvar, O., Ellenbogen, A., & Kinney, G. G. (2018). Safety and Tolerability of Multiple Ascending Doses of PRX002/RG7935, an anti-α-synuclein Monoclonal Antibody, in Patients With Parkinson Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*, *75*(10), 1206–1214. https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2018.1487

Jankovic, J., & Poewe, W. (2012). Therapies in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, *25*(4), 433–447. https://doi.org/10.1097/WCO.0B013E3283542FC2

Jansen van Rensburg, Z., Abrahams, S., Bardien, S., & Kenyon, C. (2021). Toxic Feedback Loop Involving Iron, Reactive Oxygen Species, α-Synuclein and Neuromelanin in Parkinson's Disease and Intervention with Turmeric. *Molecular neurobiology*, *58*(11), 5920–5936. https://doi.org/10.1007/s12035-021-02516-5

Jao, C. C., Der-Sarkissian, A., Chent, J., & Langen, R. (2004). Structure of membrane-bound α-synuclein studied by site-directed spin labelling. *Proceedings of the National Academy of*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sciences of the United States of America, *101*(22), 8331–8336. https://doi.org/10.1073/PNAS.0400553101/SUPPL_FILE/00553FIG8.PDF

Jellinger, K. A. (2010). Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *14*(3), 457–487. https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2010.01010.X

Jenco, J. M., Rawlingson, A., Daniels, B., & Morris, A. J. (1998). Regulation of phospholipase D2: Selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by α- and β-synucleins. *Biochemistry*, *37*(14), 4901–4909. https://doi.org/10.1021/BI972776R/ASSET/IMAGES/LARGE/BI972776RF00006.JPEG

Jenner, P., & Olanow, C. W. (1996). Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*, *47*(6 SUPPL. 3). https://doi.org/10.1212/WNL.47.6_SUPPL_3.161S

Jeon, B. S., Jackson-Lewis, V., & Burke, R. E. (1995). 6-Hydroxydopamine Lesion of the Rat Substantia Nigra: Time Course and Morphology of Cell Death. *Neurodegeneration*, *4*(2), 131–137. https://doi.org/10.1006/NEUR.1995.0016

Jethva, P. N., Kardani, J. R., & Roy, I. (2011). Modulation of α-synuclein aggregation by dopamine in the presence of MPTP and its metabolite. *The FEBS Journal*, *278*(10), 1688–1698. https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2011.08093.X

Ji, H., Liu, Y. E., Jia, T., Wang, M., Liu, J., Xiao, G., Joseph, B. K., Rosen, C., & Shi, Y. E. (1997). Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Research*, *57*(4), 759–764.

Jia, T., Liu, Y. E., Liu, J., & Shi, Y. E. (1999). Stimulation of breast cancer invasion and metastasis by synuclein gamma. *Cancer Research*, *59*(3), 742–747.

Jiang, F., Wu, Q., Sun, S., Bi, G., & Guo, L. (2019). Identification of potential diagnostic biomarkers for Parkinson's disease. *FEBS Open Bio*, *9*(8), 1460–1468. https://doi.org/10.1002/2211-5463.12687

Jiang, T., Gao, L., Lu, J., & Zhang, Y.-D. (2013). ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke. *Current Neuropharmacology*, *11*(2), 209–217. https://doi.org/10.2174/1570159X11311020007

Jo, Y., Kim, S., Ye, B. S., Lee, E., & Yu, Y. M. (2022). Protective Effect of Renin-Angiotensin System Inhibitors on Parkinson's Disease: A Nationwide Cohort Study. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.837890

Joers, V., Tansey, M., Mulas, G., & Carta, A. (2017). Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. *Progress in Neurobiology*, *155*, 57-75. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.04.006

Joglar, B., Rodriguez-Pallares, J., Rodriguez-Perez, A. I., Rey, P., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2009). The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. *Journal of Neurochemistry*, *109*(2), 656–669. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05999.x

Johnson, D. A., & Johnson, J. A. (2015). Nrf2—a therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, *88*(Part B), 253–267. https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2015.07.147

Johnson, S. W., Seutin, V., & North, R. A. (1992). Burst Firing in Dopamine Neurons Induced by N-Methyl-D-aspartate: Role of Electrogenic Sodium Pump. *Science*, *258*(5082), 665–667. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1329209

Jones, D. R., Moussaud, S., & Mclean, P. (2014). Targeting heat shock proteins to modulate α-synuclein toxicity. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, *7*(1), 33–51. https://doi.org/10.1177/1756285613493469

Jucker, M., & Walker, L. C. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*, *501*(7465), 45–51. https://doi.org/10.1038/nature12481

Jyothi, H. J., Vidyadhara, D. J., Mahadevan, A., Philip, M., Parmar, S. K., Manohari, S. G., Shankar, S. K., Raju, T. R., & Alladi, P. A. (2015). Aging causes morphological alterations in astrocytes and microglia in human substantia nigra pars compacta. *Neurobiology of aging*, *36*(12), 3321–3333. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.024

Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Müller, V., Jacobsen, H., Schindzielorz, A., Okochi, M., Leimer, U., Van Der Putten, H., Probst, A., Kremmer, E., Kretzschmar, H. A., & Haass, C. (2000). Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant α-synuclein in human and transgenic mouse brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(17), 6365–6373. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-17-06365.2000

Kalinderi, K., Bostantjopoulou, S., & Fidani, L. (2016). The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects. *Acta Neurologica Scandinavica*, *134*(5), 314–326. https://doi.org/10.1111/ANE.12563

Kamath, T., Abdulraouf, A., Burris, S. J., Langlieb, J., Gazestani, V., Nadaf, N. M., Balderrama, K., Vanderburg, C., & Macosko, E. Z. (2022). Single-cell genomic profiling of human dopamine neurons identifies a population that selectively degenerates in Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, *25*(5), 588–595. https://doi.org/10.1038/S41593-022-01061-1

Kamp, F., Exner, N., Lutz, A. K., Wender, N., Hegermann, J., Brunner, B., Nuscher, B., Bartels, T., Giese, A., Beyer, K., Eimer, S., Winklhofer, K. F., & Haass, C. (2010). Inhibition of mitochondrial fusion by α-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *The EMBO Journal*, *29*(20), 3571–3589. https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2010.223

Katzenschlager, R., Sampaio, C., Costa, J., & Lees, A. (2002). Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson´s disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2010*(1). https://doi.org/10.1002/14651858.CD003735/INFORMATION/EN

Kaul, S., Anantharam, V., Kanthasamy, A., & Kanthasamy, A. G. (2005). Wild-type α-synuclein interacts with pro-apoptotic proteins PKCdelta and BAD to protect dopaminergic neuronal cells against MPP+-induced apoptotic cell death. Brain Research. *Molecular Brain Research*, *139*(1), 137–152. https://doi.org/10.1016/J.MOLBRAINRES.2005.05.022

Kaur, G., Behl, T., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Kumar, A., Arora, S., & Bungău, S. (2021). RETRACTED ARTICLE: Role of TLR2 and TLR4 Signaling in Parkinson's Disease: An Insight into Associated Therapeutic Potential. *Journal of Molecular Neuroscience*, *71*, 2429 - 2429. https://doi.org/10.1007/s12031-021-01811-z

Kawahata, I., Finkelstein, D. I., & Fukunaga, K. (2022). Pathogenic Impact of α-Synuclein Phosphorylation and Its Kinases in α-Synucleinopathies. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(11). https://doi.org/10.3390/ijms23116216

Kemp, J. R., Unal, H., Desnoyer, R., Yue, H., Bhatnagar, A., & Karnik, S. S. (2014). Angiotensin II-regulated microRNA 483-3p directly targets multiple components of the renin-angiotensin system. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *75*, 25–39. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.06.008

Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V., Grover, R. K., Roy, R., & Singh, S. (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, *151*(3), 229–238. https://doi.org/10.1016/J.JSB.2005.06.006

Kiely, A. P., Asi, Y. T., Kara, E., Limousin, P., Ling, H., Lewis, P., Proukakis, C., Quinn, N., Lees, A. J., Hardy, J., Revesz, T., Houlden, H., & Holton, J. L. (2013). α-Synucleinopathy associated with G51D *SNCA* mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathologica*, *125*(5), 753–769. https://doi.org/10.1007/S00401-013-1096-7

Kim, C., Ho, D. H., Suk, J. E., You, S., Michael, S., Kang, J., Lee, S. J., Masliah, E., Hwang, D., Lee, H. J., & Lee, S. J. (2013). Neuron-released oligomeric α-synuclein is an endogenous agonist of

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nature Communications*, *4*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/ncomms2534

Kim, C., Kwon, S., Iba, M., Spencer, B., Rockenstein, E., Mante, M., Adame, A., Shin, S. J., Fields, J. A., Rissman, R. A., Lee, S.-J., & Masliah, E. (2021). Effects of innate immune receptor stimulation on extracellular α-synuclein uptake and degradation by brain resident cells. *Experimental & Molecular Medicine*, *53*(2), 281–290. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00562-6

Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., & Date, I. (2019). Animal Models for Parkinson's Disease Research: Trends in the 2000s. *International journal of molecular sciences*, *20*(21), 5402. https://doi.org/10.3390/ijms20215402

Kobiec, T., Otero-Losada, M., Chevalier, G., Udovin, L., Bordet, S., Menéndez-Maissonave, C., Capani, F., & Pérez-Lloret, S. (2021). The Renin-Angiotensin System Modulates Dopaminergic Neurotransmission: A New Player on the Scene. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *13*. https://doi.org/10.3389/FNSYN.2021.638519

Koch, J. C., Tatenhorst, L., Roser, A. E., Saal, K. A., Tönges, L., & Lingor, P. (2018). ROCK inhibition in models of neurodegeneration and its potential for clinical translation. *Pharmacology & Therapeutics*, *189*, 1–21. https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2018.03.008

Koeglsperger, T., Rumpf, S. L., Schließer, P., Struebing, F. L., Brendel, M., Levin, J., Trenkwalder, C., Höglinger, G. U., & Herms, J. (2023). Neuropathology of incidental Lewy body & prodromal Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *18*(1). https://doi.org/10.1186/S13024-023-00622-7

Kontopoulos, E., Parvin, J. D., & Feany, M. B. (2006). α-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Human Molecular Genetics*, *15*(20), 3012–3023. https://doi.org/10.1093/HMG/DDL243

Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., & Olanow, C. W. (2008). Lewy body–like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature Medicine*, *14*(5), 504–506. https://doi.org/10.1038/nm1747

Korolchuk, V. I., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2010). Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Letters*, *584*(7), 1393–1398. https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2009.12.047

Kostenis, E., Milligan, G., Christopoulos, A., Sanchez-Ferrer, C. F., Heringer-Walther, S., Sexton, P. M., Gembardt, F., Kellett, E., Martini, L., Vanderheyden, P., Schultheiss, H. P., & Walther, T. (2005). G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*, *111*(14), 1806–1813. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000160867.23556.7D

Kouli, A., Horne, C., & Williams-Gray, C. (2019). Toll-like receptors and their therapeutic potential in Parkinson's disease and α-synucleinopathies. *Brain, Behavior, and Immunity*, *81*, 41-51. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.06.042

Kowall, N. W., Hantraye, P., Brouillet, E., Beal, M. F., McKee, A. C., & Ferrante, R. J. (2000). MPTP induces α-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport*, *11*(1), 211–213. https://doi.org/10.1097/00001756-200001170-00041

Krainc, T., Monje, M. H. G., Kinsinger, M., Bustos, B. I., & Lubbe, S. J. (2023). Melanin and Neuromelanin: Linking Skin Pigmentation and Parkinson's Disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *38*(2), 185–195. https://doi.org/10.1002/mds.29260

Krzisch, M., Yuan, B., Chen, W., Osaki, T., Fu, D., Garrett-Engele, C., Svoboda, D., Andrykovich, K., Sur, M., & Jaenisch, R. (2023). The A53T mutation in α-synuclein enhances pro-inflammatory activation in human microglia. *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2023.08.29.555300

Kryndushkin, D. S., Alexandrov, I. M., Ter-Avanesyan, M. D., & Kushnirov, V. V. (2003). Yeast [PSI+] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(49), 49636–49643. https://doi.org/10.1074/JBC.M307996200

Kun-Rodrigues, C., Ganos, C., Guerreiro, R., Schneider, S. A., Schulte, C., Lesage, S., Darwent, L., Holmans, P., Singleton, A., Bhatia, K., & Bras, J. (2015). A systematic screening to identify de novo mutations causing sporadic early-onset Parkinson's disease. *Human Molecular Genetic*s, *24*(23), 6711–6720. https://doi.org/10.1093/HMG/DDV376

Kural, M. H., Djakbarova, U., Chan, E. T., Madraki, Y., Niklason, L., & Kural, C. (2023). Mechanoinhibition of endocytosis sensitizes cancer cells to Fas-induced apoptosis. *Biophysical Journal*, *122*(3), 514a. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.11.2733

Kuter, K., Olech, Ł., & Głowacka, U. (2017). Prolonged Dysfunction of Astrocytes and Activation of Microglia Accelerate Degeneration of Dopaminergic Neurons in the Rat Substantia Nigra and Block Compensation of Early Motor Dysfunction Induced by 6-OHDA. *Molecular Neurobiology*, *55*, 3049 - 3066. https://doi.org/10.1007/s12035-017-0529-z

Kuusisto, E., Parkkinen, L., & Alafuzoff, I. (2003). Morphogenesis of Lewy Bodies: Dissimilar Incorporation of α-Synuclein, Ubiquitin, and p62. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *62*(12), 1241–1253. https://doi.org/10.1093/JNEN/62.12.1241

Labandeira, C., Fraga-Bau, A., Arias Ron, D., Alvarez-Rodriguez, E., Vicente-Alba, P., Lago-Garma, J., & Rodriguez-Perez, A. (2022b). Parkinson's disease and diabetes mellitus: Common mechanisms and treatment repurposing. *Neural Regeneration Research*, *17*(8), 1652–1658. https://doi.org/10.4103/1673-5374.332122

Labandeira, C. M., Pedrosa, M. A., Quijano, A., Valenzuela, R., Garrido-Gil, P., Sanchez-Andrade, M., Suarez-Quintanilla, J. A., Rodriguez-Perez, A. I., & Labandeira-Garcia, J. L. (2022a). Angiotensin type-1 receptor and ACE2 autoantibodies in Parkinson´s disease. *Npj Parkinson's Disease*, *8*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41531-022-00340-9

Labandeira-Garcia, J. L., Garrido-Gil, P., Rodriguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Borrajo, A., & Rodríguez-Perez, A. I. (2014). Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*, 67. https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00067

Labandeira-Garcia, J. L., Labandeira, C. M., Guerra, M. J., & Rodriguez-Perez, A. I. (2024). The role of the brain renin-angiotensin system in Parkinson´s disease. *Translational Neurodegeneration*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/S40035-024-00410-3

Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Pallares, J., Dominguez-Meijide, A., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., & Rodríguez-Perez, A. I. (2013). Dopamine-Angiotensin interactions in the basal ganglia and their relevance for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *28*(10), 1337–1342. https://doi.org/10.1002/mds.25614

Labandeira-Garcia, J. L., Rodríguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., Rodriguez-Pallares, J., Lanciego, J. L., & Guerra, M. J. (2017). Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*, 129. https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00129

Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A., & Guerra, M. J. (2016). Menopause and Parkinson's disease. Interaction between estrogens and brain renin-angiotensin system in dopaminergic degeneration. *Frontiers in neuroendocrinology*, *43*, 44–59. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2016.09.003

Labandeira-Garcia, J. L., Rodríguez-Perez, A. I., Villar-Cheda, B., Borrajo, A., Dominguez-Meijide, A., & Guerra, M. J. (2015). Rho Kinase and Dopaminergic Degeneration: A Promising Therapeutic Target for Parkinson's Disease. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, *21*(6), 616–629. https://doi.org/10.1177/1073858414554954

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Labandeira-Garcia, J. L., Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A., Villar-Cheda, B., & Rodriguez-Perez, A. I. (2021). The intracellular renin-angiotensin system: Friend or foe. Some light from the dopaminergic neurons. *Progress in Neurobiology*, *199*. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2020.101919

Labandeira-Garcia, J., Rodriguez-Pallares, J., Rodriguez-Perez, A., Garrido-Gil, P., Villar-Cheda, B., Valenzuela, R., & Guerra, M. (2012). Brain angiotensin and dopaminergic degeneration: relevance to Parkinson's disease. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, *1*(3), 226–244

Labandeira-Garcia, J., Rodriguez-Pallares, J., Villar-Cheda, B., Rodriguez-Perez, A., Garrido-Gil, P., & Guerra, M. (2011). Aging, Angiotensin system and dopaminergic degeneration in the substantia nigra. *Aging and Disease*, *2*(3), 257–274

LaMarca, B., Parrish, M., Ray, L. F., Murphy, S. R., Roberts, L., Glover, P., Wallukat, G., Wenzel, K., Cockrell, K., Martin, J. N., Ryan, M. J., & Dechend, R. (2009). Hypertension in response to autoantibodies to the angiotensin II type I receptor (AT1-AA) in pregnant rats: role of endothelin-1. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *54*(4), 905–909. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.137935

Lavoie, J. L., & Sigmund, C. D. (2003). Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System—An Endocrine and Paracrine System. *Endocrinology*, *144*(6), 2179–2183. https://doi.org/10.1210/EN.2003-0150

Lázaro, D. F., Rodrigues, E. F., Langohr, R., Shahpasandzadeh, H., Ribeiro, T., Guerreiro, P., Gerhardt, E., Kröhnert, K., Klucken, J., Pereira, M. D., Popova, B., Kruse, N., Mollenhauer, B., Rizzoli, S. O., Braus, G. H., Danzer, K. M., & Outeiro, T. F. (2014). Systematic comparison of the effects of α-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation. *PLoS Genetics*, *10*(11). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1004741

Lazarou, M., Narendra, D. P., Jin, S. M., Tekle, E., Banerjee, S., & Youle, R. J. (2013). PINK1 drives Parkin self-association and HECT-like E3 activity upstream of mitochondrial binding. *Journal of Cell Biology*, *200*(2), 163–172. https://doi.org/10.1083/JCB.201210111

Lazdon, E., Stolero, N., & Frenkel, D. (2020). Microglia and Parkinson's disease: footprints to pathology. *Journal of Neural Transmission*, *127*(2), 149–158. https://doi.org/10.1007/S00702-020-02154-6/TABLES/1

Lee, H. J., Patel, S., & Lee, S. J. (2005). Intravesicular localization and exocytosis of α-synuclein and its aggregates. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(25), 6016–6024. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0692-05.2005

Lee, H. J., Suk, J. E., Bae, E. J., Lee, J. H., Paik, S. R., & Lee, S. J. (2008a). Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular α-synuclein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *40*(9), 1835–1849. https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2008.01.017

Lee, H. J., Suk, J. E., Bae, E. J., & Lee, S. J. (2008b). Clearance and deposition of extracellular α-synuclein aggregates in microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *372*(3), 423–428. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2008.05.045

Lee, H. J., Suk, J. E., Patrick, C., Bae, E. J., Cho, J. H., Rho, S., Hwang, D., Masliah, E., & Lee, S. J. (2010). Direct transfer of α-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(12), 9262–9272. https://doi.org/10.1074/JBC.M109.081125

Lee, J. W., Chun, W., Lee, H. J., Kim, S. M., Min, J. H., Kim, D. Y., Kim, M. O., Ryu, H. W., & Lee, S. U. (2021). The Role of Microglia in the Development of Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines*, *9*(10), 1449. https://doi.org/10.3390/biomedicines9101449

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F. E., Ratan, R., Rosenberg, P. A., Volpe, J. J., & Vartanian, T. (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(14), 8514–8519. https://doi.org/10.1073/PNAS.1432609100

Lei, Z., Cao, G., & Wei, G. (2019). A30P mutant α-synuclein impairs autophagic flux by inactivating JNK signaling to enhance ZKSCAN3 activity in midbrain dopaminergic neurons. *Cell Death & Disease*, *10*. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1364-0

Lenkei, Z., Palkovits, M., Corvol, P., & Llorens-Cortes, C. (1996). Distribution of angiotensin II type-2 receptor (AT2) mRNA expression in the adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *373*(3), 322–339. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960923)373:3

Lesage, S., & Brice, A. (2012). Role of Mendelian genes in "sporadic" Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, *18*(SUPPL. 1), S66–S70. https://doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70022-0

Lev, N., Ickowicz, D., Melamed, E., & Offen, D. (2008). Oxidative insults induce DJ-1 upregulation and redistribution: Implications for neuroprotection. *NeuroToxicology*, *29*(3), 397–405. https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2008.01.007

Li, J. Y., Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., Lashley, T., Quinn, N. P., Rehncrona, S., Björklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., & Brundin, P. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature Medicine*, *14*(5), 501–503. https://doi.org/10.1038/NM1746

Li, L., Wu, X., Yue, H. Y., Zhu, Y. C., & Xu, J. (2016). Myosin light chain kinase facilitates endocytosis of synaptic vesicles at hippocampal boutons. *Journal of Neurochemistry*, *138*(1), 60–73. https://doi.org/10.1111/JNC.13635

Li, W., West, N., Colla, E., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Marsh, L., Dawson, T. M., Jäkälä, P., Hartmann, T., Price, D. L., & Lee, M. K. (2005). Aggregation promoting C-terminal truncation of α-synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(6), 2162–2167. https://doi.org/10.1073/pnas.0406976102

Li, X. C., Zhang, J., & Zhuo, J. L. (2017). The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: Physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases. *Pharmacological research*, *125*(Pt A), 21–38. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.06.005

Li, Y., Liu, W., Oo, T. F., Wang, L., Tang, Y., Jackson-Lewis, V., Zhou, C., Geghman, K., Bogdanov, M., Przedborski, S., Beal, M. F., Burke, R. E., & Li, C. (2009). Mutant LRRK2R1441G BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, *12*(7), 826–828. https://doi.org/10.1038/nn.2349

Lill, C. M. (2016). Genetics of Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Probes*, *30*(6), 386–396. https://doi.org/10.1016/J.MCP.2016.11.001

Lindström, V., Gustafsson, G., Sanders, L. H., Howlett, E. H., Sigvardson, J., Kasrayan, A., Ingelsson, M., Bergström, J., & Erlandsson, A. (2017). Extensive uptake of α-synuclein oligomers in astrocytes results in sustained intracellular deposits and mitochondrial damage. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *82*, 143–156. https://doi.org/10.1016/J.MCN.2017.04.009

Litim, N., Morissette, M.P., & Paolo, T.D. (2017). Metabotropic glutamate receptors as therapeutic targets in Parkinson's disease: An update from the last 5 years of research. *Neuropharmacology*, *115*, 166-179. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.036

Liu, C., Kellems, R. E., & Xia, Y. (2017). Inflammation, Autoimmunity, and Hypertension: The Essential Role of Tissue Transglutaminase. *American Journal of Hypertension*, *30*(8), 756–764. https://doi.org/10.1093/AJH/HPX027

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Liu, C., Luo, R., Elliott, S. E., Wang, W., Parchim, N. F., Iriyama, T., Daugherty, P. S., Blackwell, S. C., Sibai, B. M., Kellems, R. E., & Xia, Y. (2015). Elevated Transglutaminase Activity Triggers Angiotensin Receptor Activating Autoantibody Production and Pathophysiology of Preeclampsia. *Journal of the American Heart Association*, *4*(12). https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002323

Liu, C., Luo, R., Wang, W., Peng, Z., Johnson, G. V. W., Kellems, R. E., & Xia, Y. (2019). Tissue Transglutaminase-Mediated AT1 Receptor Sensitization Underlies Pro-inflammatory Cytokine LIGHT-Induced Hypertension. *American Journal of Hypertension*, *32*(5), 476–485. https://doi.org/10.1093/AJH/HPZ018

Liu, C., Wang, W., Parchim, N., Irani, R. A., Blackwell, S. C., Sibai, B., Jin, J., Kellems, R. E., & Xia, Y. (2014). Tissue transglutaminase contributes to the pathogenesis of preeclampsia and stabilizes placental angiotensin receptor type 1 by ubiquitination-preventing isopeptide modification. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *63*(2), 353–361. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02361

Liu, C., Zhao, Y., Xi, H., Jiang, J., Yu, Y., & Dong, W. (2021). The Membrane Interaction of α-Synuclein. *Frontiers in cellular neuroscience*, *15*, 633727. https://doi.org/10.3389/fncel.2021.633727

Liu, F. T., Yang, Y. J., Wu, J. J., Li, S., Tang, Y. L., Zhao, J., Liu, Z. Y., Xiao, B. G., Zuo, J., Liu, W., & Wang, J. (2016). Fasudil, a Rho kinase inhibitor, promotes the autophagic degradation of A53T α-synuclein by activating the JNK 1/Bcl-2/beclin 1 pathway. *Brain Research*, *1632*, 9–18. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2015.12.002

Liu, W., Wang, G., Wang, Z., Wang, G., Huang, J., & Liu, B. (2022). Repurposing small-molecule drugs for modulating toxic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Drug Discovery Today*, *27*(7), 1994–2007. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.04.003

Lively, S., & Schlichter, L. (2018). Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFNγ+TNFα) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00215

Llorens-Cortes, C., & Mendelsohn, F. A. O. (2002). Organisation and functional role of the brain angiotensin system. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System: JRAAS*, *3 Suppl 1*, S39–S48. https://doi.org/10.3317/JRAAS.2002.029

Logan, T., Bendor, J., Toupin, C., Thorn, K., & Edwards, R. H. (2017). α-Synuclein promotes dilation of the exocytotic fusion pore. *Nature Neuroscience*, *20*(5), 681–689. https://doi.org/10.1038/nn.4529

Lopez-Lopez, A., Valenzuela, R., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., Labandeira-Garcia, J. L., & Muñoz, A. (2023). Interactions between Angiotensin Type-1 Antagonists, Statins, and ROCK Inhibitors in a Rat Model of L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *12*(7). https://doi.org/10.3390/ANTIOX12071454

Lopez-Lopez, A., Villar-Cheda, B., Quijano, A., Garrido-Gil, P., Garcia-Garrote, M., Díaz-Ruiz, C., Muñoz, A., & Labandeira-Garcia, J. L. (2021). NADPH-Oxidase, Rho-Kinase and Autophagy Mediate the (Pro)renin-Induced Pro-Inflammatory Microglial Response and Enhancement of Dopaminergic Neuron Death. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *10*(9). https://doi.org/10.3390/ANTIOX10091340

Loria, F., Vargas, J. Y., Bousset, L., Syan, S., Salles, A., Melki, R., & Zurzolo, C. (2017). α-Synuclein transfer between neurons and astrocytes indicates that astrocytes play a role in degradation rather than in spreading. *Acta Neuropathologica*, *134*(5), 789–808. https://doi.org/10.1007/S00401-017-1746-2/FIGURES/9

Lou, H., Montoya, S. E., Alerte, T. N. M., Wang, J., Wu, J., Peng, X., Hong, C. S., Friedrich, E. E., Mader, S. A., Pedersen, C. J., Marcus, B. S., McCormack, A. L., Di Monte, D. A., Daubner, S.

C., & Perez, R. G. (2010). Serine 129 phosphorylation reduces the ability of α-synuclein to regulate tyrosine hydroxylase and protein phosphatase 2A *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(23), 17648–17661. https://doi.org/10.1074/JBC.M110.100867/ASSET/440C5426-3063-4A4A-A8DE-9C5394243808/MAIN.ASSETS/GR7.JPG

Lucin, K. M., & Wyss-Coray, T. (2009). Immune Activation in Brain Aging and Neurodegeneration: Too Much or Too Little? *Neuron*, *64*(1), 110–122. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2009.08.039

Lücking, C. B., Dürr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B. S., Meco, G., Denèfle, P., Wood, N. W., Agid, Y., Nicholl, D., Breteler, M. M. B., Oostra, B. A., De Mari, M., Marconi, R., Filla, A., Bonnet, A.-M., Broussolle, E., … Brice, A. (2000). Association between Early-Onset Parkinson's Disease and Mutations in the Parkin Gene. *New England Journal of Medicine*, *342*(21), 1560–1567. https://doi.org/10.1056/NEJM200005253422103

Luk, K. C. (2019). Oxidative stress and α-synuclein conspire in vulnerable neurons to promote Parkinson's disease progression. *The Journal of Clinical Investigation*, *129*(9), 3530–3531. https://doi.org/10.1172/JCI130351

Luk, K. C., Kehm, V. M., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2012). Intracerebral inoculation of pathological α-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α-synucleinopathy in mice. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(5), 975–986. https://doi.org/10.1084/JEM.20112457

Lundblad, M., Decressac, M., Mattsson, B., & Björklund, A. (2012). Impaired neurotransmission caused by overexpression of α-synuclein in nigral dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(9), 3213–3219. https://doi.org/10.1073/PNAS.1200575109

Luo, J., Sun, L., Lin, X., Liu, G., Yu, J., Parisiadou, L., Xie, C., Ding, J., & Cai, H. (2014). A calcineurin- and NFAT-dependent pathway is involved in α-synuclein-induced degeneration of midbrain dopaminergic neurons. *Human Molecular Genetics*, *23*(24), 6567–6574. https://doi.org/10.1093/HMG/DDU377

Luthman, J., Fredriksson, A., Sundström, E., Jonsson, G., & Archer, T. (1989). Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behavioural Brain Research*, *33*(3), 267–277. https://doi.org/10.1016/S0166-4328(89)80121-4

Ma, R. hong, Zhang, Y., Hong, X. yue, Zhang, J. fei, Wang, J. Z., & Liu, G. ping. (2017). Role of microtubule-associated protein tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, *37*(3), 307–312. https://doi.org/10.1007/S11596-017-1732-X/METRICS

Mahul-Mellier, A. L., Burtscher, J., Maharjan, N., Weerens, L., Croisier, M., Kuttler, F., Leleu, M., Knott, G. W., & Lashuel, H. A. (2020). The process of Lewy body formation, rather than simply α-synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(9), 4971–4982. https://doi.org/10.1073/PNAS.1913904117/SUPPL_FILE/PNAS.1913904117.SD04.XLSX

Makasewicz, K., Wennmalm, S., Stenqvist, B., Fornasier, M., Andersson, A., Jönsson, P., Linse, S., & Sparr, E. (2021). Cooperativity of α-Synuclein Binding to Lipid Membranes. *ACS chemical neuroscience*, *12*(12), 2099–2109. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00006

Maldonado Vidaurri, E., Chávez-Montes, A., Tapia, M., Castro-Ríos, R., & Gónzalez-Horta, A. (2018). Differential interaction of α-synuclein N-terminal segment with mitochondrial model membranes. *International journal of biological macromolecules*, *119*, 1286-1293. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.049

Mandler, M., Valera, E., Rockenstein, E., Weninger, H., Patrick, C., Adame, A., Santic, R., Meindl, S., Vigl, B., Smrzka, O., Schneeberger, A., Mattner, F., & Masliah, E. (2014). Next-generation active immunization approach for synucleinopathies - implications for Parkinson's Disease clinical trials. *Acta Neuropathologica*, *127*(6), 861. https://doi.org/10.1007/S00401-014-1256-4

Mao, Q.-Y., He, S.-Y., Hu, Q.-Y., Lu, Y., Niu, Y.-X., Li, X.-Y., Zhang, H.-M., Qin, L., & Su, Q. (2022). Advanced Glycation End Products (AGEs) Inhibit Macrophage Efferocytosis of Apoptotic β Cells through Binding to the Receptor for AGEs. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *208*(5), 1204–1213. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100695

Mao, X., Ou, M. T., Karuppagounder, S. S., Kam, T. I., Yin, X., Xiong, Y., Ge, P., Umanah, G. E., Brahmachari, S., Shin, J. H., Kang, H. C., Zhang, J., Xu, J., Chen, R., Park, H., Andrabi, S. A., Kang, S. U., Gonçalves, R. A., Liang, Y., … Dawson, T. M. (2016). Pathological α-synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science*, *353*(6307). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAH3374/SUPPL_FILE/SCIENCE.AAH3374_SM.V1.PDF

Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *Journal of Neuroscience*, *8*(8), 2804–2815. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-08-02804.1988

Maroteaux, L., & Scheller, R. H. (1991). The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. Brain research. *Molecular brain research*, *11*(3-4), 335–343. https://doi.org/10.1016/0169-328x(91)90043-w

Martínez-Fernández, R., Máñez-Miró, J. U., Rodríguez-Rojas, R., Del Álamo, M., Shah, B. B., Hernández-Fernández, F., Pineda-Pardo, J. A., Monje, M. H. G., Fernández-Rodríguez, B., Sperling, S. A., Mata-Marín, D., Guida, P., Alonso-Frech, F., Obeso, I., Gasca-Salas, C., Vela-Desojo, L., Elias, W. J., & Obeso, J. A. (2020). Randomized Trial of Focused Ultrasound Subthalamotomy for Parkinson's Disease. *The New England journal of medicine*, *383*(26), 2501–2513. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2016311

Martínez-Pinilla, E., Rodríguez-Pérez, A. I., Navarro, G., Aguinaga, D., Moreno, E., Lanciego, J. L., Labandeira-García, J. L., & Franco, R. (2015). Dopamine D2 and angiotensin II type 1 receptors form functional heteromers in rat striatum. *Biochemical Pharmacology*, *96*(2), 131–142. https://doi.org/10.1016/J.BCP.2015.05.006

Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Kaushik, S., Massey, A. C., Mazzulli, J., Mosharov, E. V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D. C., Follenzi, A., Dauer, W., Przedborski, S., Ischiropoulos, H., Lansbury, P. T., Sulzer, D., & Cuervo, A. M. (2008). Dopamine-modified α-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(2), 777–778. https://doi.org/10.1172/JCI32806

Martinez-Vicente, M., & Vila, M. (2013). α-synuclein and protein degradation pathways in Parkinson's disease: a pathological feed-back loop. *Experimental Neurology*, *247*, 308–313. https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2013.03.005

Martirosyan, A., Ansari, R., Pestana, F., Hebestreit, K., Gasparyan, H., Aleksanyan, R., Hnatova, S., Poovathingal, S., Marneffe, C., Thal, D. R., Kottick, A., Hanson-Smith, V. J., Guelfi, S., Plumbly, W., Belgard, T. G., Metzakopian, E., & Holt, M. G. (2024). Unravelling cell type-specific responses to Parkinson's Disease at single cell resolution. *Molecular Neurodegeneration*, *19*(1), 7. https://doi.org/10.1186/S13024-023-00699-0

Masaracchia, C., Hnida, M., Gerhardt, E., Lopes da Fonseca, T., Villar-Pique, A., Branco, T., Stahlberg, M. A., Dean, C., Fernández, C. O., Milosevic, I., & Outeiro, T. F. (2018). Membrane binding, internalization, and sorting of α-synuclein in the cell. *Acta neuropathologica communications*, *6*(1), 79. https://doi.org/10.1186/s40478-018-0578-1

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Masaracchia, C., König, A., Valiente-Gabioud, A. A., Peralta, P., Favretto, F., Strohäker, T., Lázaro, D. F., Zweckstetter, M., Fernandez, C. O., & Outeiro, T. F. (2020). Molecular characterization of an aggregation-prone variant of α-synuclein used to model synucleinopathies. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, *1868*(1), 140298. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140298

Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A., & Mucke, L. (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in α-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science (New York, N.Y.), 287(5456)*, 1265–1269. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5456.1265

Mason, D. M., Nouraei, N., Pant, D. B., Miner, K. M., Hutchison, D. F., Luk, K. C., Stolz, J. F., & Leak, R. K. (2016). Transmission of α-synucleinopathy from olfactory structures deep into the temporal lobe. *Molecular neurodegeneration*, *11*(1), 49. https://doi.org/10.1186/s13024-016-0113-4

Mayeux, R., Ottman, R., Maestre, G., Ngai, C., Tang, M. X., Ginsberg, H., Chun, M., Tycko, B., & Shelanski, M. (1995). Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-ε4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, *45*(3I), 555–557. https://doi.org/10.1212/WNL.45.3.555

Mazzulli, J. R., Armakola, M., Dumoulin, M., Parastatidis, I., & Ischiropoulos, H. (2007). Cellular oligomerization of α-synuclein is determined by the interaction of oxidized catechols with a C-terminal sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(43), 31621–31630. https://doi.org/10.1074/JBC.M704737200

Mazzulli, J. R., Xu, Y. H., Sun, Y., Knight, A. L., McLean, P. J., Caldwell, G. A., Sidransky, E., Grabowski, G. A., & Krainc, D. (2011). Gaucher disease glucocerebrosidase and α-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*, *146*(1), 37–52. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.06.001

McCarthy, C. A., Widdop, R. E., Denton, K. M., & Jones, E. S. (2013). Update on the angiotensin AT(2) receptor. *Current Hypertension Reports*, *15*(1), 25–30. https://doi.org/10.1007/S11906-012-0321-4

McLean, P. J., Kawamata, H., & Hyman, B. T. (2001). α-synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome sensitive inclusions in primary neurons. *Neuroscience*, *104*(3), 901–912. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00113-0

Melachroinou, K., Divolis, G., Tsafaras, G., Karampetsou, M., Fortis, S., Stratoulias, Y., Papadopoulou, G., Kriebardis, A., Samiotaki, M., & Vekrellis, K. (2024). Endogenous α-Synuclein is Essential for the Transfer of Pathology by Exosome-Enriched Extracellular Vesicles, Following Inoculation with Preformed Fibrils *in vivo*. *Aging and disease*, *15*(2), 869–892. https://doi.org/10.14336/AD.2023.0614

Meldolesi, J. (2018). Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Current Biology*, *28*, R435-R444. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.059

Mena, M. A., & García De Yébenes, J. (2008). Glial cells as players in parkinsonism: The "good," the "bad," and the "mysterious" glia. *Neuroscientist*, *14*(6), 544–560. https://doi.org/10.1177/1073858408322839

Meng, Y., Ding, J., Li, C., Fan, H., He, Y., & Qiu, P. (2020). Transfer of pathological α-synuclein from neurons to astrocytes via exosomes causes inflammatory responses after METH exposure. *Toxicology letters*, *31*, 188–199. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.06.016

Meredith, G. E., Halliday, G. M., & Totterdell, S. (2004). A critical review of the development and importance of proteinaceous aggregates in animal models of Parkinson's disease: New insights into Lewy body formation. *Parkinsonism and Related Disorders*, *10*(4), 191–202. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2004.01.001

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Meredith, G. E., Totterdell, S., Petroske, E., Santa Cruz, K., Callison, R. C., & Lau, Y. S. (2002). Lysosomal malfunction accompanies α-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Brain Research*, *956*(1), 156–165. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03514-X

Meredith, G. E., Totterdell, S., Potashkin, J. A., & Surmeier, D. J. (2008). Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. *Parkinsonism & Related Disorders*, *14 Suppl 2*(Suppl 2), S112-5. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.012

Meuvis, J., Gerard, M., Desender, L., Baekelandt, V., & Engelborghs, Y. (2010). The conformation and the aggregation kinetics of α-synuclein depend on the proline residues in its C-terminal region. *Biochemistry*, *49*(43), 9345–9352. https://doi.org/10.1021/BI1010927/SUPPL_FILE/BI1010927_SI_001.PDF

Meyer, L. S., Gong, S., Reincke, M., Williams, T. A., & Williams, T. A. (2020). Angiotensin II Type 1 Receptor Autoantibodies in Primary Aldosteronism. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Metabolisme*, *52*(6), 379–385. https://doi.org/10.1055/A-1120-8647

Milber, J. M., Noorigian, J. V., Morley, J. F., Petrovitch, H., White, L., Ross, G. W., & Duda, J. E. (2012). Lewy pathology is not the first sign of degeneration in vulnerable neurons in Parkinson disease. *Neurology*, *79*(24), 2307–2314. https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E318278FE32

Minakaki, G., Menges, S., Kittel, A., Emmanouilidou, E., Schaeffner, I., Barkovits, K., Bergmann, A., Rockenstein, E., Adame, A., Marxreiter, F., Mollenhauer, B., Galasko, D., Buzás, E. I., Schlötzer-Schrehardt, U., Marcus, K., Xiang, W., Lie, D. C., Vekrellis, K., Masliah, E., … Klucken, J. (2018). Autophagy inhibition promotes *SNCA*/α-synuclein release and transfer via extracellular vesicles with a hybrid autophagosome-exosome-like phenotype. *Autophagy*, *14*(1), 98–119. https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1395992

Mirabito Colafella, K. M., Bovée, D. M., & Danser, A. H. J. (2019). The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets. *Experimental Eye Research*, *186*, 107680. https://doi.org/10.1016/J.EXER.2019.05.020

Mitchell, I. J., Clarke, C. E., Boyce, S., Robertson, R. G., Peggs, D., Sambrook, M. A., & Crossman, A. R. (1989). Neural mechanisms underlying parkinsonian symptoms based upon regional uptake of 2-deoxyglucose in monkeys exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience*, *32*(1), 213–226. https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90120-6

Miyazaki, I., & Asanuma, M. (2020). Neuron-Astrocyte Interactions in Parkinson's Disease. *Cells*, *9*(12), 1–28. https://doi.org/10.3390/CELLS9122623

Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, *3*(6), 542–545. https://doi.org/10.4161/AUTO.4600

Mogi, M., & Horiuchi, M. (2013). Effect of angiotensin II type 2 receptor on stroke, cognitive impairment and neurodegenerative diseases. *Geriatrics & Gerontology International*, *13*(1), 13–18. https://doi.org/10.1111/J.1447-0594.2012.00900.X

Moors, T. E., Maat, C. A., Niedieker, D., Mona, D., Petersen, D., Timmermans-Huisman, E., Kole, J., El-Mashtoly, S. F., Spycher, L., Zago, W., Barbour, R., Mundigl, O., Kaluza, K., Huber, S., Hug, M. N., Kremer, T., Ritter, M., Dziadek, S., Geurts, J. J. G., … van de Berg, W. D. J. (2021). The subcellular arrangement of α-synuclein proteoforms in the Parkinson's disease brain as revealed by multicolor STED microscopy. *Acta Neuropathologica*, 142(3), 423–448. https://doi.org/10.1007/S00401-021-02329-9

Morimoto, S., Cassell, M. D., Beltz, T. G., Johnson, A. K., Davisson, R. L., & Sigmund, C. D. (2001). Elevated blood pressure in transgenic mice with brain-specific expression of human

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

angiotensinogen driven by the glial fibrillary acidic protein promoter. *Circulation Research*, *89*(4), 365–372. https://doi.org/10.1161/HH1601.094988

Morimoto, S., & Sigmund, C. D. (2002). Angiotensin mutant mice: A focus on the brain renin-angiotensin system. *Neuropeptides*, *36*(2–3), 194–200. https://doi.org/10.1054/NPEP.2002.0894

Mosharov, E. V., Larsen, K. E., Kanter, E., Phillips, K. A., Wilson, K., Schmitz, Y., Krantz, D. E., Kobayashi, K., Edwards, R. H., & Sulzer, D. (2009). Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and α-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron*, *62*(2), 218–229. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2009.01.033

Mowry, F., Peaden, S., Stern, J., & Biancardi, V. (2021). TLR4 and AT1R mediate blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and autonomic dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacological research*, *174*, 105877. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105877

Mukherjee, J., Christian, B. T., Dunigan, K. A., Shi, B., Narayanan, T. K., Satter, M., & Mantil, J. (2002). Brain imaging of 18F-fallypride in normal volunteers: Blood analysis, distribution, test-retest studies, and preliminary assessment of sensitivity to aging effects on dopamine D-2/D-3 receptors. *Synapse*, *46*(3), 170–188. https://doi.org/10.1002/SYN.10128

Mullin, S., & Schapira, A. (2013). α-Synuclein and Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. Molecular *Neurobiology*, *47*(2), 587–597. https://doi.org/10.1007/S12035-013-8394-X

Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., Mendez-Alvarez, E., Soto-Otero, R., & Labandeira-Garcia, J. L. (2006). Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of parkinsonism. *Neuropharmacology*, *51*(1), 112–120. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2006.03.004

Musgrove, R. E., Helwig, M., Bae, E. J., Aboutalebi, H., Lee, S. J., Ulusoy, A., & Di Monte, D. A. (2019). Oxidative stress in vagal neurons promotes parkinsonian pathology and intercellular α-synuclein transfer. *The Journal of Clinical Investigation*, *129*(9), 3738–3753. https://doi.org/10.1172/JCI127330

Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., & Togari, A. (2000). Cytokines in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission, Supplement*, *58*, 143–151. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6284-2_12

Nakamura, K. (2013). α-Synuclein and Mitochondria: Partners in Crime? *Neurotherapeutics*, *10*(3), 391–399. https://doi.org/10.1007/S13311-013-0182-9

Nakamura, K., Nemani, V. M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J. M., Egami, K., Munishkina, L., Zhang, J., Gardner, B., Wakabayashi, J., Sesaki, H., Cheng, Y., Finkbeiner, S., Nussbaum, R. L., Masliah, E., & Edwards, R. H. (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein α-synuclein. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(23), 20710–20726. https://doi.org/10.1074/JBC.M110.213538

Nascimento, A. C., Erustes, A. G., Reckziegel, P., Bincoletto, C., Ureshino, R. P., Pereira, G. J. S., & Smaili, S. S. (2020). α-Synuclein Overexpression Induces Lysosomal Dysfunction and Autophagy Impairment in Human Neuroblastoma SH-SY5Y. *Neurochemical research*, *45*(11), 2749–2761. https://doi.org/10.1007/s11064-020-03126-8

Nash, Y., Schmukler, E., Trudler, D., Pinkas-Kramarski, R., & Frenkel, D. (2017). DJ-1 deficiency impairs autophagy and reduces α-synuclein phagocytosis by microglia. *Journal of Neurochemistry*, *143*(5), 584–594. https://doi.org/10.1111/jnc.14222

Nath, S., Goodwin, J., Engelborghs, Y., & Pountney, D. L. (2011). Raised calcium promotes α-synuclein aggregate formation. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *46*(2), 516–526. https://doi.org/10.1016/J.MCN.2010.12.004

Nawaz, M. S., Asghar, R., Pervaiz, N., Ali, S., Hussain, I., Xing, P., Bao, Y., & Abbasi, A. A. (2020). Molecular evolutionary and structural analysis of human UCHL1 gene demonstrates the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

relevant role of intragenic epistasis in Parkinson's disease and other neurological disorders. *BMC evolutionary biology*, *20*(1), 130. https://doi.org/10.1186/s12862-020-01684-7

Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annual Review of Immunology, 32*, 367–402. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032713-120240/1

Naziroğlu, M. (2011). TRPM2 channel membrane currents in primary rat megakaryocytes were activated by the agonist ADP-ribose but not oxidative stress. *The Journal of Membrane Biology*, *241*(2), 51–57. https://doi.org/10.1007/S00232-011-9356-8

Negi, N., & Das, B. K. (2020). Decoding intrathecal immunoglobulins and B cells in the CNS: their synthesis, function, and regulation. *International Reviews of Immunology*, *39*(2), 67–79. https://doi.org/10.1080/08830185.2019.1711073

Nellikka, R., Bhaskar, B., Sanghrajka, K., Patil, S., & Das, D. (2021). α-Synuclein kinetically regulates the nascent fusion pore dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*. https://doi.org/10.1073/pnas.2021742118

Nemani, V. M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M. K., Chaudhry, F. A., Nicoll, R. A., & Edwards, R. H. (2010). Increased expression of α-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*, *65*(1), 66–79. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2009.12.023

Ngolab, J., Trinh, I., Rockenstein, E., Mante, M., Florio, J., Trejo, M., Masliah, D., Adame, A., Masliah, E., & Rissman, R. A. (2017). Brain-derived exosomes from dementia with Lewy bodies propagate α-synuclein pathology. *Acta Neuropathologica Communications*, *5*(1), 46. https://doi.org/10.1186/S40478-017-0445-5/FIGURES/5

Nguyen, G., & Contrepas, A. (2008). The (pro)renin receptors. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *86*(6), 643–646. https://doi.org/10.1007/S00109-008-0319-1

Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzhir, L., Giller, T., & Sraer, J. D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *The Journal of clinical investigation*, *109*(11), 1417–1427. https://doi.org/10.1172/JCI14276

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science*, *308*(5726), 1314–1318. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1110647

Noyce, A. J., Bestwick, J. P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C. H., Giovannoni, G., Lees, A. J., & Schrag, A. (2012). Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Annals of Neurology*, *72*(6), 893–901. https://doi.org/10.1002/ana.23687

Oaks, A. W., Marsh-Armstrong, N., Jones, J. M., Credle, J. J., & Sidhu, A. (2013). Synucleins antagonize endoplasmic reticulum function to modulate dopamine transporter trafficking. *PloS One*, *8*(8). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0070872

Olah, J., Lehotzky, A., Szénási, T., & Ovádi, J. (2021). Anti-Aggregative Effect of the Antioxidant DJ-1 on the TPPP/p25-Derived Pathological Associations of α-Synuclein. *Cells*, *10*(11), 2909. https://doi.org/10.3390/cells10112909

Olanow, C. W. (1990). Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology*, *40*(10 Suppl 3), 32–39. https://europepmc.org/article/med/2215972

Olanow, C. W. (1993). A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends in Neurosciences*, *16*(11), 439–444. https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90070-3

Olanow, C. W., Calabresi, P., & Obeso, J. A. (2020b). Continuous Dopaminergic Stimulation as a Treatment for Parkinson's Disease: Current Status and Future Opportunities. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *35*(10), 1731–1744. https://doi.org/10.1002/MDS.28215

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Olanow, C. W., Factor, S. A., Espay, A. J., Hauser, R. A., Shill, H. A., Isaacson, S., Pahwa, R., Leinonen, M., Bhargava, P., Sciarappa, K., Navia, B., Blum, D., & CTH-300 Study investigators (2020a). Apomorphine sublingual film for off episodes in Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *The Lancet. Neurology*, *19*(2), 135–144. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30396-5

Olsson, T. T., Klementieva, O., & Gouras, G. K. (2018). Prion-like seeding and nucleation of intracellular amyloid-β. *Neurobiology of Disease*, *113*, 1–10. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2018.01.015

Orhan, H., Van Holland, B., Krab, B., Moeken, J., Vermeulen, N. P. E., Hollander, P., & Meerman, J. H. N. (2004). Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: Increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free Radical Research*, *38*(12), 1269–1279. https://doi.org/10.1080/10715760400013763

Ornelas, A., Adler, C., Serrano, G., Curry, J., Shill, H., Kopyov, O., & Beach, T. (2020). Co-Existence of tau and α-synuclein pathology in fetal graft tissue at autopsy: A case report. *Parkinsonism & related disorders*, *71*, 36-39. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.12.013

Osellame, L. D., Rahim, A. A., Hargreaves, I. P., Gegg, M. E., Richard-Londt, A., Brandner, S., Waddington, S. N., Schapira, A. H. V., & Duchen, M. R. (2013). Mitochondria and quality control defects in a mouse model of Gaucher disease--links to Parkinson's disease. *Cell metabolism*, *17*(6), 941–953. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.014

Ouberai, M. M., Wang, J., Swann, M. J., Galvagnion, C., Guilliams, T., Dobson, C. M., & Welland, M. E. (2013). α-Synuclein senses lipid packing defects and induces lateral expansion of lipids leading to membrane remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(29), 20883–20895. https://doi.org/10.1074/JBC.M113.478297

Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., Futatsubashi, M., Kanno, T., Ogusu, T., & Torizuka, T. (2005). Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, *57*(2), 168–175. https://doi.org/10.1002/ANA.20338

Oueslati A. (2016). Implication of α-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *Journal of Parkinson's disease*, *6*(1), 39–51. https://doi.org/10.3233/JPD-160779

Outeiro, T. F. (2021). α-synuclein oligomerization and aggregation: A model will always be a model: This is a response to "Monitoring α-synuclein oligomerization and aggregation using bimolecular fluorescence complementation assays: What you see is not always what you get. *Journal of Neurochemistry*, *157*(4), 889–890. https://doi.org/10.1111/jnc.15264

Outeiro, T. F., & Lindquist, S. (2003). Yeast cells provide insight into α-synuclein biology and pathobiology. *Science (New York, N.Y.)*, *302*(5651), 1772–1775. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1090439

Paisán-Ruíz, C., Jain, S., Evans, E. W., Gilks, W. P., Simón, J., Van Der Brug, M., De Munain, A. L., Aparicio, S., Gil, A. M., Khan, N., Johnson, J., Martinez, J. R., Nicholl, D., Carrera, I. M., Peña, A. S., De Silva, R., Lees, A., Martí-Massó, J. F., Pérez-Tur, J., … Singleton, A. B. (2004). Cloning of the Gene Containing Mutations that Cause PARK8-Linked Parkinson's Disease. *Neuron*, *44*(4), 595–600. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2004.10.023

Paleologou, K. E., Oueslati, A., Shakked, G., Rospigliosi, C. C., Kim, H. Y., Lamberto, G. R., Fernandez, C. O., Schmid, A., Chegini, F., Gai, W. P., Chiappe, D., Moniatte, M., Schneider, B. L., Aebischer, P., Eliezer, D., Zweckstetter, M., Masliah, E., & Lashuel, H. A. (2010). Phosphorylation at S87 Is Enhanced in Synucleinopathies, Inhibits α-Synuclein Oligomerization, and Influences Synuclein-Membrane Interactions. *Journal of Neuroscience*, *30*(9), 3184–3198. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5922-09.2010

Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, *333*(6048), 1456–1458. https://doi.org/10.1126/science.1202529

Park, J. Y., & Lansbury, P. T. (2003). Beta-synuclein inhibits formation of α-synuclein protofibrils: a possible therapeutic strategy against Parkinson's disease. *Biochemistry*, *42*(13), 3696–3700. https://doi.org/10.1021/BI020604A

Parres-Gold, J., Chieng, A., Su, S., & Wang, Y. (2020). Real-Time Characterization of Cell Membrane Disruption by α-Synuclein Oligomers in Live SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *ACS chemical neuroscience*, *11*(17), 2528–2534. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00309

Parrish, M. R., Murphy, S. R., Rutland, S., Wallace, K., Wenzel, K., Wallukat, G., Keiser, S., Ray, L. F., Dechend, R., Martin, J. N., Granger, J. P., & Lamarca, B. (2010). The Effect of Immune Factors, Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α), and Agonistic Autoantibodies to the Angiotensin II Type I Receptor (AT1-AA) on Soluble fms-Like Tyrosine-1 (sFlt-1) and Soluble Endoglin (sEng) Production in Response to Hypertension During Pregnancy. *American Journal of Hypertension*, *23*(8), 911. https://doi.org/10.1038/AJH.2010.70

Patel, S. N., Fatima, N., Ali, R., & Hussain, T. (2020). Emerging Role of Angiotensin AT2 Receptor in Anti-Inflammation: An Update. *Current Pharmaceutical Design*, *26*(4), 492–500. https://doi.org/10.2174/1381612826666200115092015

Patel, V. B., Zhong, J. C., Grant, M. B., & Oudit, G. Y. (2016). Role of the ACE2/Angiotensin 1–7 Axis of the Renin–Angiotensin System in Heart Failure. *Circulation Research*, *118*(8), 1313–1326. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.307708

Patrigeon, M., Brot, S., Bonnet, M. L., Belnoue, L., & Gaillard, A. (2023). Host-to-graft Propagation of α-synuclein in a Mouse Model of Parkinson's Disease: Intranigral Versus Intrastriatal Transplantation. *Transplantation*, *107*(8), e201–e212. https://doi.org/10.1097/TP.0000000000004565

Paul, M., Mehr, A. P., & Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological Reviews*, *86*(3), 747–803. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00036.2005

Paz Ocaranza, M., Riquelme, J. A., García, L., Jalil, J. E., Chiong, M., Santos, R. A. S., & Lavandero, S. (2019). Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, *17*(2), 116–129. https://doi.org/10.1038/s41569-019-0244-8

Pearce, M. (2017). Prion-like transmission of pathogenic protein aggregates in genetic models of neurodegenerative disease. *Current opinion in genetics & development*, *44*, 149-155. https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.03.011

Pediaditakis, I., Kodella, K. R., Manatakis, D. V., Le, C. Y., Hinojosa, C. D., Tien-Street, W., Manolakos, E. S., Vekrellis, K., Hamilton, G. A., Ewart, L., Rubin, L. L., & Karalis, K. (2021). Modeling α-synuclein pathology in a human brain-chip to assess blood-brain barrier disruption. *Nature communications*, *12*(1), 5907. https://doi.org/10.1038/s41467-021-26066-5

Pedrosa, M. A., Labandeira, C. M., Valenzuela, R., Quijano, A., Sanchez-Andrade, M., Suarez-Quintanilla, J. A., Lanciego, J. L., Labandeira-Garcia, J. L., & Rodriguez-Perez, A. I. (2023). AT1 receptor autoantibodies mediate effects of metabolic syndrome on dopaminergic vulnerability. *Brain, Behavior, and Immunity*, *108*, 255–268. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2022.12.009

Peelaerts, W., Bousset, L., Van Der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., Van Den Haute, C., Melki, R., & Baekelandt, V. (2015). α-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature*, *522*(7556), 340–344. https://doi.org/10.1038/nature14547

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Pernis, A. B., Ricker, E., Weng, C. H., Rozo, C., & Yi, W. (2016). Rho kinases in autoimmune diseases. *Annual Review of Medicine*, *67*, 355–374. https://doi.org/10.1146/annurev-med-051914-022120

Phillips, M. I., & de Oliveira, E. M. (2008). Brain renin angiotensin in disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany), 86*(6), 715–722. https://doi.org/10.1007/s00109-008-0331-5

Piao, Y. S., Mori, F., Hayashi, S., Tanji, K., Yoshimoto, M., Kakita, A., Wakabayashi, K., & Takahashi, H. (2003). α-synuclein pathology affecting Bergmann glia of the cerebellum in patients with α-synucleinopathies. *Acta Neuropathologica*, *105*(4), 403–409. https://doi.org/10.1007/S00401-002-0655-0

Pirker, W., Katzenschlager, R., Hallett, M., & Poewe, W. (2023). Pharmacological Treatment of Tremor in Parkinson's Disease Revisited. *Journal of Parkinson's disease*, *13*(2), 127–144. https://doi.org/10.3233/JPD-225060

Pisanu, A., Lecca, D., Mulas, G., Wardas, J., Simbula, G., Spiga, S., & Carta, A. R. (2014). Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR-γ agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, *71*(1), 280–291. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2014.08.011

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A. E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(1), 1–21. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13

Polinski, N. K., Volpicelli-Daley, L. A., Sortwell, C. E., Luk, K. C., Cremades, N., Gottler, L. M., Froula, J., Duffy, M. F., Lee, V. M. Y., Martinez, T. N., & Dave, K. D. (2018). Best Practices for Generating and Using α-Synuclein Pre-Formed Fibrils to Model Parkinson's Disease in Rodents. *Journal of Parkinson's Disease*, *8*(2), 303–322. https://doi.org/10.3233/JPD-171248

Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the α-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, *276*(5321), 2045–2047. https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045

Postuma, R. B., Aarsland, D., Barone, P., Burn, D. J., Hawkes, C. H., Oertel, W., & Ziemssen, T. (2012). Identifying prodromal Parkinson's disease: Pre-Motor disorders in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *27*(5), 617–626. https://doi.org/10.1002/MDS.24996

Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, *179*, 292-311. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.053

Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., & Steeves, T. D. L. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, *29*(13), 1583–1590. https://doi.org/10.1002/MDS.25945

Prots, I., Veber, V., Brey, S., Campioni, S., Buder, K., Riek, R., Böhm, K. J., & Winner, B. (2013). α-synuclein oligomers impair neuronal microtubule-kinesin interplay. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(30), 21742–21754. https://doi.org/10.1074/JBC.M113.451815

Prüss, H. (2021). Autoantibodies in neurological disease. Nature Reviews. *Immunology*, *21*(12), 798–813. https://doi.org/10.1038/S41577-021-00543-W

Przedbroski, S., Leviver, M., Jiang, H., Ferreira, M., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., & Togasaki, D. M. (1995). Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by instrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, *67*(3), 631–647. https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00066-R

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Quinlan, J. T., & Phillips, M. I. (1981). Immunoreactivity for an angiotensin II-like peptide in the human brain. *Brain Research*, *205*(1), 212–218. https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90735-6

Rajasekaran, S., Peterson, P. P., Liu, Z., Robinson, L. C., & Witt, S. N. (2022). α-synuclein inhibits Snx3-retromer retrograde trafficking of the conserved membrane-bound proprotein convertase Kex2 in the secretory pathway of Saccharomyces cerevisiae. *Human molecular genetics*, *31*(5), 705–717. https://doi.org/10.1093/hmg/ddab284

Rannikko, E. H., Weber, S. S., & Kahle, P. J. (2015). Exogenous α-synuclein induces toll-like receptor 4 dependent inflammatory responses in astrocytes. *BMC Neuroscience*, *16*, 57. https://doi.org/10.1186/s12868-015-0192-0

Rcom-H'cheo-Gauthier, A. N., Osborne, S. L., Meedeniya, A. C. B., & Pountney, D. L. (2016). Calcium: α-synuclein Interactions in α-Synucleinopathies. *Frontiers in Neuroscience*, *10*, 570. https://doi.org/10.3389/FNINS.2016.00570

Reaux, A., Iturrioz, X., Vazeux, G., Fournie-Zaluskit, M. C., David, C., Roques, B. P., Corvol, P., & Llorens-Cortes, C. (2000). Aminopeptidase A, which generates one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, has a key role in central control of arterial blood pressure. *Biochemical Society Transactions*, *28*(4), 435–440. https://doi.org/10.1042/bst0280435

Reeve, A., Simcox, E., & Turnbull, D. (2014). Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Research Reviews*, *14*(100), 19–30. https://doi.org/10.1016/J.ARR.2014.01.004

Rey, N. L., George, S., Steiner, J. A., Madaj, Z., Luk, K. C., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., & Brundin, P. (2018). Spread of aggregates after olfactory bulb injection of α-synuclein fibrils is associated with early neuronal loss and is reduced long term. *Acta neuropathologica*, *135*(1), 65–83. https://doi.org/10.1007/s00401-017-1792-9

Rey, N. L., Steiner, J. A., Maroof, N., Luk, K. C., Madaj, Z., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., & Brundin, P. (2016). Widespread transneuronal propagation of α-synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. *The Journal of experimental medicine*, *213*(9), 1759–1778. https://doi.org/10.1084/jem.20160368

Reyes, J. F., Rey, N. L., Bousset, L., Melki, R., Brundin, P., & Angot, E. (2014). α-synuclein transfers from neurons to oligodendrocytes. *Glia*, *62*(3), 387–398. https://doi.org/10.1002/GLIA.22611

Reyes, J. F., Sackmann, C., Hoffmann, A., Svenningsson, P., Winkler, J., Ingelsson, M., & Hallbeck, M. (2019). Binding of α-synuclein oligomers to Cx32 facilitates protein uptake and transfer in neurons and oligodendrocytes. *Acta neuropathologica*, *138*(1), 23–47. https://doi.org/10.1007/s00401-019-02007-x

Ricke, K. M., Paß, T., Kimoloi, S., Fährmann, K., Jüngst, C., Schauss, A., Baris, O. R., Aradjanski, M., Trifunovic, A., Eriksson Faelker, T. M., Bergami, M., & Wiesner, R. J. (2020). Mitochondrial Dysfunction Combined with High Calcium Load Leads to Impaired Antioxidant Defense Underlying the Selective Loss of Nigral Dopaminergic Neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *40*(9), 1975–1986. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1345-19.2019

Riemekasten, G., Petersen, F., & Heidecke, H. (2020). What Makes Antibodies Against G Protein-Coupled Receptors so Special? A Novel Concept to Understand Chronic Diseases. *Frontiers in Immunology*, *11*, 564526. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.564526

Rietdijk, C. D., Wezel, R. J. A. van, Garssen, J., & Kraneveld, A. D. (2016). Neuronal toll-like receptors and neuro-immunity in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and stroke. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, *3*, 27–37. https://doi.org/10.20517/2347-8659.2015.28

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Rivas-Santisteban, R., Rodriguez-Perez, A. I., Muñoz, A., Reyes-Resina, I., Labandeira-García, J. L., Navarro, G., & Franco, R. (2020). Angiotensin AT(1) and AT(2) receptor heteromer expression in the hemilesioned rat model of Parkinson's disease that increases with levodopa-induced dyskinesia. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(1), 243. https://doi.org/10.1186/s12974-020-01908-z

Robustelli, P., Ibanez-De-Opakua, A., Campbell-Bezat, C., Giordanetto, F., Becker, S., Zweckstetter, M., Pan, A. C., & Shaw, D. E. (2022). Molecular Basis of Small-Molecule Binding to α-synuclein. *Journal of the American Chemical Society*, *144*(6), 2501–2510. https://doi.org/10.1021/JACS.1C07591/SUPPL_FILE/JA1C07591_SI_001.PDF

Rocha, E. M., De Miranda, B., & Sanders, L. H. (2018). α-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, *109*, 249–257. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2017.04.004

Rocha, S., Kirkley, K., Chatterjee, D., Aboellail, T., Smeyne, R., & Tjalkens, R. (2023). Microglia-specific knock-out of NF-κB/IKK2 increases the accumulation of misfolded α-synuclein through the inhibition of p62/sequestosome-1-dependent autophagy in the rotenone model of Parkinson's disease. *Glia*, *71*, 2154 - 2179. https://doi.org/10.1002/glia.24385.

Rodriguez, J. A., Ivanova, M. I., Sawaya, M. R., Cascio, D., Reyes, F. E., Shi, D., Sangwan, S., Guenther, E. L., Johnson, L. M., Zhang, M., Jiang, L., Arbing, M. A., Nannenga, B. L., Hattne, J., Whitelegge, J., Brewster, A. S., Messerschmidt, M., Boutet, S., Sauter, N. K., … Eisenberg, D. S. (2015). Structure of the toxic core of α-synuclein from invisible crystals. *Nature*, *525*(7570), 486–490. https://doi.org/10.1038/nature15368

Rodriguez, M. C., Obeso, J. A., & Olanow, C. W. (1998). Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in parkinson's disease: A target for neuroprotection. *Annals of Neurology*, *44*(S1), S175–S188. https://doi.org/10.1002/ANA.410440726

Rodriguez-Pallares, J., Caruncho, H. J., Muñoz, A., Guerra, M. J., & Labandeira-García, J. L. (2000). GABAA receptor subunit expression in intrastriatal ventral mesencephalic transplants. *Experimental brain research*, *135*(3), 331–340. https://doi.org/10.1007/s002210000537

Rodriguez-Pallares, J., Parga, J. A., Joglar, B., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2012). Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels enhance angiotensin-induced oxidative damage and dopaminergic neuron degeneration. Relevance for aging-associated susceptibility to Parkinson's disease. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, *34*(4), 863–880. https://doi.org/10.1007/S11357-011-9284-7

Rodriguez-Pallares, J., Quiroz, C. R., Parga, J. A., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2004). Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *European Journal of Neuroscience*, *20*(6), 1489–1498. https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2004.03621.X

Rodriguez-Pallares, J., Rey, P., Parga, J. A., Muñoz, A., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2008). Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiology of Disease*, *31*(1), 58–73. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2008.03.003

Rodriguez-Perez, A. I., Borrajo, A., Diaz-Ruiz, C., Garrido-Gil, P., Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Perez, A. I., Borrajo, A., Diaz-Ruiz, C., Garrido-Gil, P., & Labandeira-Garcia, J. L. (2016). Crosstalk between insulin-like growth factor-1 and angiotensin-II in dopaminergic neurons and glial cells: role in neuroinflammation and aging. *Oncotarget*, *7*(21), 30049–30067. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9174

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Rodriguez-Perez, A. I., Borrajo, A., Rodriguez-Pallares, J., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2015). Interaction between NADPH-oxidase and Rho-kinase in angiotensin II-induced microglial activation. *Glia*, *63*(3), 466–482. https://doi.org/10.1002/GLIA.22765

Rodriguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., Pedrosa, M. A., Garcia-Garrote, M., Valenzuela, R., Navarro, G., Franco, R., & Labandeira-Garcia, J. L. (2020). Angiotensin type 2 receptors: Role in aging and neuroinflammation in the substantia nigra. *Brain, Behavior, and Immunity*, *87*, 256–271. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2019.12.011

Rodriguez-Perez, A. I., Labandeira, C. M., Pedrosa, M. A., Valenzuela, R., Suarez-Quintanilla, J. A., Cortes-Ayaso, M., Mayán-Conesa, P., & Labandeira-Garcia, J. L. (2021). Autoantibodies against ACE2 and angiotensin type-1 receptors increase severity of COVID-19. *Journal of Autoimmunity*, *122*. https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2021.102683

Rodriguez-Perez, A. I., Sucunza, D., Pedrosa, M. A., Garrido-Gil, P., Kulisevsky, J., Lanciego, J. L., & Labandeira-Garcia, J. L. (2018). Angiotensin Type 1 Receptor Antagonists Protect Against α-Synuclein-Induced Neuroinflammation and Dopaminergic Neuron Death. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *15*(4), 1063–1081. https://doi.org/10.1007/S13311-018-0646-Z

Rokad, D., Ghaisas, S., Harischandra, D. S., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A., & Kanthasamy, A. G. (2017). Role of neurotoxicants and traumatic brain injury in α-synuclein protein misfolding and aggregation. *Brain Research Bulletin*, *133*, 60–70. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2016.12.003

Rostami, J., Holmqvist, S., Lindström, V., Sigvardson, J., Westermark, G. T., Ingelsson, M., Bergström, J., Roybon, L., & Erlandsson, A. (2017). Human Astrocytes Transfer Aggregated α-synuclein via Tunneling Nanotubes. *Journal of Neuroscience*, *37*(49), 11835–11853. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0983-17.2017

Rostami, J., Mothes, T., Kolahdouzan, M., Eriksson, O., Moslem, M., Bergström, J., Ingelsson, M., O'Callaghan, P., Healy, L. M., Falk, A., & Erlandsson, A. (2021). Crosstalk between astrocytes and microglia results in increased degradation of α-synuclein and amyloid-β aggregates. *Journal of Neuroinflammation*, *18*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/S12974-021-02158-3/FIGURES/9

Rothstein, J. D., Bristol, L. A., Hosler, B., Brown, R. H., & Kuncl, R. W. (1994). Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(10), 4155–4159. https://doi.org/10.1073/PNAS.91.10.4155

Rousseaux, M. W. C., de Haro, M., Lasagna-Reeves, C. A., de Maio, A., Park, J., Jafar-Nejad, P., Al-Ramahi, I., Sharma, A., See, L., Lu, N., Vilanova-Velez, L., Klisch, T. J., Westbrook, T. F., Troncoso, J. C., Botas, J., & Zoghbi, H. Y. (2016). TRIM28 regulates the nuclear accumulation and toxicity of both α-synuclein and tau. *ELife*, *5*, e19809. https://doi.org/10.7554/ELIFE.19809

Rukavina Mikusic, N., Pineda, A., & Gironacci, M. (2021). Angiotensin-(1-7) and Mas receptor in the brain. *Exploration of Medicine*, *2*, 268–293 https://doi.org/10.37349/emed.2021.00046

Russ, K., Teku, G., Bousset, L., Redeker, V., Piel, S., Savchenko, E., Pomeshchik, Y., Savistchenko, J., Stummann, T., Azevedo, C., Collin, A., Goldwurm, S., Fog, K., Elmér, E., Vihinen, M., Melki, R., & Roybon, L. (2021). TNF-α and α-synuclein fibrils differently regulate human astrocyte immune reactivity and impair mitochondrial respiration. *Cell reports*, *34*(12), 108895. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108895

Rygiel, K. (2016). Can angiotensin-converting enzyme inhibitors impact cognitive decline in early stages of Alzheimer's disease? An overview of research evidence in the elderly patient population. *Journal of Postgraduate Medicine*, *62*(4), 242–248. https://doi.org/10.4103/0022-3859.188553

Saavedra J. M. (1992). Brain and pituitary angiotensin. *Endocrine reviews*, *13*(2), 329–380. https://doi.org/10.1210/edrv-13-2-329

Saavedra, J. M. (2016). Evidence to Consider Angiotensin II Receptor Blockers for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *36*(2), 259–279. https://doi.org/10.1007/S10571-015-0327-Y

Sackin, H. (2021). Hypothesis for renin-angiotensin inhibitor mitigation of COVID-19. *Medical Hypotheses*, *152*, 110609. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2021.110609

Sampaio, T. B., Soares de Souza, B., Roversi, K., Schuh, T., Poli, A., Takahashi, R. N., & Prediger, R. D. (2019). Temporal development of behavioral impairments in rats following locus coeruleus lesion induced by 6-hydroxydopamine: Involvement of β_3-adrenergic receptors. *Neuropharmacology*, *151*, 98–111. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.04.006

Sánchez-Iglesias, S., Rey, P., Méndez-Álvarez, E., Labandeira-García, J. L., & Soto-Otero, R. (2007). Time-course of brain oxidative damage caused by intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochemical Research*, *32*(1), 99–105. https://doi.org/10.1007/S11064-006-9232-6

Santisteban, M. M., Ahn, S. J., Lane, D., Faraco, G., Garcia-Bonilla, L., Racchumi, G., Poon, C., Schaeffer, S., Segarra, S. G., Körbelin, J., Anrather, J., & Iadecola, C. (2020). Endothelium-Macrophage Crosstalk Mediates Blood-Brain Barrier Dysfunction in Hypertension. *Hypertension*, *76*(3), 795–807. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15581

Santos, C. C., Cardim-Pires, T. R., Shvachiy, L., Fonseca-Fonseca, L. A., Muñoz, P., Almeida, Á. M. A. N., Costa, A. C. S., Teles-Souza, J., Ochoa-Rodríguez, E., de Fátima Dias Costa, M., Palhano, F. L., Segura-Aguilar, J., Barbosa, D. B., do Bomfim, M. R., dos Santos Junior, M. C., Leite, F. H. A., da Rocha Pita, S. S., Costa, S. L., Núñez-Figueredo, Y., … Silva, V. D. A. (2022). JM-20, a Benzodiazepine-Dihydropyridine Hybrid Molecule, Inhibits the Formation of α-Synuclein-Aggregated Species. *Neurotoxicity Research*, *40*(6), 2135–2147. https://doi.org/10.1007/S12640-022-00559-7

Santos, R. A. S., Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., & Campagnole-Santo, M. J. (2018). The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiological Reviews*, *98*(1), 505–553. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00023.2016

Santos, R. A. S., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., Silva, D. M. R., Machado, R. P., De Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V. B., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H. P., Speth, R., & Walther, T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(14), 8258–8263. https://doi.org/10.1073/PNAS.1432869100

Sarafian, T. A., Littlejohn, K., Yuan, S., Fernandez, C., Cilluffo, M., Koo, B. K., Whitelegge, J. P., & Watson, J. B. (2017). Stimulation of Synaptoneurosome Glutamate Release by Monomeric and Fibrillated α-synuclein. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(9), 1871. https://doi.org/10.1002/JNR.24024

Satou, R., Penrose, H., & Navar, L. G. (2018). Inflammation as a Regulator of the Renin-Angiotensin System and Blood Pressure. *Current Hypertension Reports*, *20*(12), 1–9. https://doi.org/10.1007/S11906-018-0900-0/TABLES/1

Savitt, J. M., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2006). Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *The Journal of clinical investigation*, *116*(7), 1744–1754. https://doi.org/10.1172/JCI29178

Sawamura, M., Onoe, H., Tsukada, H., Isa, K., Yamakado, H., Okuda, S., Ikuno, M., Hatanaka, Y., Murayama, S., Uemura, N., Isa, T., & Takahashi, R. (2022). Lewy Body Disease Primate Model

with α-Synuclein Propagation from the Olfactory Bulb. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *37*(10), 2033–2044. https://doi.org/10.1002/mds.29161

Schapira, A. H. V. (2002). Dopamine agonists and neuroprotection in Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, *9 Suppl 3*, 7–14. https://doi.org/10.1046/J.1468-1331.9.S3.9.X

Schapira, A. H. V. (2003). Neuroprotection in PD - A role for dopamine agonists? *Neurology*, *61*(6 SUPPL. 3). https://doi.org/10.1212/WNL.61.6_SUPPL_3.S34

Schapira, A. H. V., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, *54*(3), 823–827. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1990.TB02325.X

Scheiblich, H., & Bicker, G. (2017). Regulation of Microglial Phagocytosis by RhoA/ROCK-Inhibiting Drugs. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *37*(3), 461–473. https://doi.org/10.1007/s10571-016-0379-7

Scheiblich, H., Bousset, L., Schwartz, S., Griep, A., Latz, E., Melki, R., & Heneka, M. (2020). Microglial NLRP3 Inflammasome Activation upon TLR2 and TLR5 Ligation by Distinct α-Synuclein Assemblies. *The Journal of Immunology*, *207*, 2143 - 2154. https://doi.org/10.2139/ssrn.3677218

Scheiblich, H., Dansokho, C., Mercan, D., Schmidt, S., Bousset, L., Wischhof, L., Eikens, F., Odainic, A., Spitzer, J., Griep, A., Schwartz, S., Bano, D., Latz, E., Melki, R., & Heneka, M. (2021). Microglia jointly degrade fibrillar α-synuclein cargo by distribution through tunneling nanotubes. *Cell*, *184*, 5089 - 5106.e21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.007

Schelling, P., Clauser, E., & Felix, D. (1983). Regulation of Angiotensinogen in the Central Nervous System. *Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice*, *5*(7-8), 1047–1061. https://doi.org/10.3109/10641968309048841

Scherzer, C. R., Grass, J. A., Liao, Z., Pepivani, I., Zheng, B., Eklund, A. C., Ney, P. A., Ng, J., McGoldrick, M., Mollenhauer, B., Bresnick, E. H., & Schlossmacher, M. G. (2008). GATA transcription factors directly regulate the Parkinson's disease-linked gene α-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(31), 10907–10912. https://doi.org/10.1073/pnas.0802437105

Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and Tissue Research*, *318*(1), 215–224. https://doi.org/10.1007/S00441-004-0938-Y/FIGURES/2

Scotcher, K. P., Irwin, I., DeLanney, L. E., Langston, J. W., & Di Monte, D. (1990). Effects of 1-Methyl-4-Phenyl- 1,2,3,6-Tetrahydropyridine and 1 -Methyl-4-Phenylpyridinium Ion on ATP Levels of Mouse Brain Synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*, *54*(4), 1295–1301. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1990.TB01962.X

Scott, D., & Roy, S. (2012). α-Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(30), 10129–10135. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0535-12.2012

Sedelis, M., Hofele, K., Auburger, G. W., Morgan, S., Huston, J. P., & Schwarting, R. K. W. (2000). MPTP susceptibility in the mouse: Behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behavior Genetics*, *30*(3), 171–182. https://doi.org/10.1023/A:1001958023096/METRICS

Semenyuk, P. I. (2022). REMD Simulations of Full-Length α-synuclein Together with Ligands Reveal Binding Region and Effect on Amyloid Conversion. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(19). https://doi.org/10.3390/IJMS231911545

Senol, A., Samarani, M., Syan, S., Guardia, C., Nonaka, T., Liv, N., Latour-Lambert, P., Hasegawa, M., Klumperman, J., Bonifacino, J., & Zurzolo, C. (2021). α-synuclein fibrils subvert lysosome

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

structure and function for the propagation of protein misfolding between cells through tunneling nanotubes. *PLoS Biology*, *19*, e3001287. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001287

Shahmoradian, S. H., Lewis, A. J., Genoud, C., Hench, J., Moors, T. E., Navarro, P. P., Castaño-Díez, D., Schweighauser, G., Graff-Meyer, A., Goldie, K. N., Sütterlin, R., Huisman, E., Ingrassia, A., Gier, Y. de, Rozemuller, A. J. M., Wang, J., Paepe, A. De, Erny, J., Staempfli, A., … Lauer, M. E. (2019). Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nature Neuroscience*, *22*(7), 1099–1109. https://doi.org/10.1038/S41593-019-0423-2

Shearer, L. J., Petersen, N. O., & Woodside, M. T. (2021). Internalization of α-synuclein oligomers into SH-SY5Y cells. *Biophysical journal*, *120*(5), 877–885. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.12.031

Shen, Z., Huang, J., Wei, H., Niu, H., Li, B., Li, R., & Liu, G. (2020). Validation of an *in vivo* electrochemical immunosensing platform for simultaneous detection of multiple cytokines in Parkinson's disease mice model. *Bioelectrochemistry*, *134*, 107532. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107532

Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T., & Abeliovich, A. (2004). DJ-1 Is a Redox-Dependent Molecular Chaperone That Inhibits α-Synuclein Aggregate Formation. *PLOS Biology*, *2*(11), e362. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0020362

Sheng, L., Stewart, T., Yang, D., Thorland, E., Soltys, D., Aro, P., Khrisat, T., Xie, Z., Li, N., Liu, Z., Tian, C., Bercow, M., Matsumoto, J., Zabetian, C., Peskind, E., Quinn, J., Shi, M., & Zhang, J. (2020). Erythrocytic α-synuclein contained in microvesicles regulates astrocytic glutamate homeostasis: a new perspective on Parkinson's disease pathogenesis. *Acta Neuropathologica Communications*, *8*(1), 102. https://doi.org/10.1186/s40478-020-00983-w

Shimoji, M., Zhang, L., Mandir, A. S., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2005). Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Brain Research. *Molecular Brain Research*, *134*(1), 103–108. https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.01.012

Shrivastava, A. N., Bousset, L., Renner, M., Redeker, V., Savistchenko, J., Triller, A., & Melki, R. (2020). Differential Membrane Binding and Seeding of Distinct α-synuclein Fibrillar Polymorphs. *Biophysical journal*, *118*(6), 1301–1320. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.01.022

Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., & Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: Beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 6. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2013.00006/BIBTEX

Simo-Cheyou, E. R., Tan, J. J., Grygorczyk, R., & Srivastava, A. K. (2017). STIM-1 and ORAI-1 channel mediate angiotensin-II-induced expression of Egr-1 in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology, 232*(12), 3496–3509. https://doi.org/10.1002/JCP.25810

Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, *36*(1), 1. https://doi.org/10.1016/J.CGER.2019.08.002

Singh, A., Panhelainen, A., Reunanen, S., Luk, K. C., & Voutilainen, M. H. (2024). Combining fibril-induced α-synuclein aggregation and 6-hydroxydopamine in a mouse model of Parkinson's disease and the effect of cerebral dopamine neurotrophic factor on the induced neurodegeneration. *The European journal of neuroscience*, *59*(1), 132–153. https://doi.org/10.1111/ejn.16196

Smith, P. E. S., Brender, J. R., & Ramamoorthy, A. (2009). Induction of negative curvature as a mechanism of cell toxicity by amyloidogenic peptides: The case of islet amyloid polypeptide. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(12), 4470–4478. https://doi.org/10.1021/JA809002A/SUPPL_FILE/JA809002A_SI_001.PDF

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Solecki, D. J., Trivedi, N., Govek, E. E., Kerekes, R. A., Gleason, S. S., & Hatten, M. E. (2009). Myosin II motors and F-actin dynamics drive the coordinated movement of the centrosome and soma during CNS glial-guided neuronal migration. *Neuron*, *63*(1), 63–80. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2009.05.028

Soll, L. G., Eisen, J. N., Vargas, K. J., Medeiros, A. T., Hammar, K. M., & Morgan, J. R. (2020). α-Synuclein-112 Impairs Synaptic Vesicle Recycling Consistent With Its Enhanced Membrane Binding Properties. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 547224. https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00405/BIBTEX

Somayaji, M., Cataldi, S., Choi, S. J., Edwards, R. H., Mosharov, E. V., & Sulzer, D. (2020). A dual role for α-synuclein in facilitation and depression of dopamine release from substantia nigra neurons *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(51), 32701–32710. https://doi.org/10.1073/pnas.2013652117

Song, M., Jin, J. J., Lim, J. E., Kou, J., Pattanayak, A., Rehman, J. A., Kim, H. D., Tahara, K., Lalonde, R., & Fukuchi, K. I. (2011). TLR4 mutation reduces microglial activation, increases Aβ deposits and exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, *8*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-92/FIGURES/7

Sorrentino, Z. A., & Giasson, B. I. (2020b). The emerging role of α-synuclein truncation in aggregation and disease. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(30), 10224–10244. https://doi.org/10.1074/JBC.REV120.011743

Sorrentino, Z. A., Xia, Y., Gorion, K. M., Hass, E., & Giasson, B. I. (2020a). Carboxy-terminal truncations of mouse α-synuclein alter aggregation and prion-like seeding. *FEBS letters*, *594*(8), 1271–1283. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13728

Sorrentino, Z. A., Giasson, B. I., & Chakrabarty, P. (2019). α-Synuclein and astrocytes: tracing the pathways from homeostasis to neurodegeneration in Lewy body disease. *Acta Neuropathologica*, *138*(1), 1. https://doi.org/10.1007/S00401-019-01977-2

Soto-Otero, R., Méndez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., Muñoz-Patiño, A. M., & Labandeira-Garcia, J. L. (2000). Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, *74*(4), 1605–1612. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0741605.x

Souza, J. M., Giasson, B. I., Lee, V. M. Y., & Ischiropoulos, H. (2000). Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS Letters*, *474*(1), 116–119. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01563-5

Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). α-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(11), 6469–6473. https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6469

Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). α-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, *388*(6645), 839–840. https://doi.org/10.1038/42166

Spindola, B., Leite, M. A., Orsini, M., Fonoff, E., Landeiro, J. A., & Pessoa, B. L. (2017). Ablative surgery for Parkinson's disease: Is there still a role for pallidotomy in the deep brain stimulation era? *Clinical neurology and neurosurgery*, *158*, 33–39. https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2017.04.018

Sriramula, S., Xia, H., Xu, P., & Lazartigues, E. (2015). Brain-targeted angiotensin-converting enzyme 2 overexpression attenuates neurogenic hypertension by inhibiting cyclooxygenase-mediated inflammation. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *65*(3), 577–586. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04691

Stefanova, N. (2022). Microglia in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, *12*, S105 - S112. https://doi.org/10.3233/JPD-223237

Stefanova, N., Fellner, L., Reindl, M., Masliah, E., Poewe, W., & Wenning, G. K. (2011). Toll-Like Receptor 4 Promotes α-Synuclein Clearance and Survival of Nigral Dopaminergic Neurons. *The American Journal of Pathology*, *179*(2), 954–963. https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2011.04.013

Stöckl, M. T., Zijlstra, N., & Subramaniam, V. (2013). α-synuclein oligomers: an amyloid pore? Insights into mechanisms of α-synuclein oligomer-lipid interactions. *Molecular Neurobiology*, *47*(2), 613–621. https://doi.org/10.1007/S12035-012-8331-4/FIGURES/7

Stolk, J., Hiltermann, T. J., Dijkman, J. H., & Verhoeven, A. J. (1994). Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *11*(1), 95–102. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.11.1.8018341

Stornetta, R. L., Hawelu-Johnson, C. L., Guyenet, P. G., & Lynch, K. R. (1988). Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science (New York, N.Y.)*, *242*(4884), 1444–1446. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.3201232

Su, X., Maguire-Zeiss, K. A., Giuliano, R., Prifti, L., Venkatesh, K., & Federoff, H. J. (2008). Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *29*(11), 1690–1701. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2007.04.006

Subhramanyam, C. S., Wang, C., Hu, Q., & Dheen, S. T. (2019). Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Seminars in cell & developmental biology*, *94*, 112–120. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.004

Sulzer, D., & Edwards, R. H. (2019). The physiological role of α-synuclein and its relationship to Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, *150*(5), 475–486. https://doi.org/10.1111/JNC.14810

Sun, J., Wang, L., Bao, H., Premi, S., Das, U., Chapman, E. R., & Roy, S. (2019). Functional cooperation of α-synuclein and VAMP2 in synaptic vesicle recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(23), 11113–11115. https://doi.org/10.1073/PNAS.1903049116

Sun, X., Wang, Y., Zhang, J., Tu, J., Wang, X. J., Su, X. D., Wang, L., & Zhang, Y. (2012). Tunneling-nanotube direction determination in neurons and astrocytes. *Cell Death & Disease*, *3*(12), e438–e438. https://doi.org/10.1038/cddis.2012.177

Sun, Y. X., Zhang, H. Y., Wei, Y. M., Zhu, F., Wang, M., & Liao, Y. H. (2008). The mechanism of signal transduction during vascular smooth muscle cell proliferation induced by autoantibodies against angiotensin AT1 receptor from hypertension. *Chinese medical journal*, *121*(1), 43–48

Suzuki, S., Brown, C. M., Dela Cruz, C. D., Yang, E., Bridwell, D. A., & Wise, P. M. (2007). Timing of estrogen therapy after ovariectomy dictates the efficacy of its neuroprotective and antiinflammatory actions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(14), 6013–6018. https://doi.org/10.1073/pnas.0610394104

Taddei, S., & Bortolotto, L. (2016). Unraveling the Pivotal Role of Bradykinin in ACE Inhibitor Activity. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, *16*, 309-321. https://doi.org/10.1007/s40256-016-0173-4

Takahashi, S., & Mashima, K. (2022). Neuroprotection and Disease Modification by Astrocytes and Microglia in Parkinson Disease. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *11*(1), 170. https://doi.org/10.3390/antiox11010170

Tambasco, N., Nigro, P., Romoli, M., Prontera, P., Simoni, S., & Calabresi, P. (2016). A53T in a parkinsonian family: a clinical update of the *SNCA* phenotypes. *Journal of Neural Transmission*, *123*(11), 1301–1307. https://doi.org/10.1007/S00702-016-1578-6/TABLES/1

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tamargo, M., & Tamargo, J. (2017). Future drug discovery in renin-angiotensin-aldosterone system intervention. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *12*(8), 827–848. https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1335301

Tanik, S. A., Schultheiss, C. E., Volpicelli-Daley, L. A., Brunden, K. R., & Lee, V. M. Y. (2013). Lewy body-like α-synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(21), 15194–15210. https://doi.org/10.1074/JBC.M113.457408

Tanji, K., Imaizumi, T., Yoshida, H., Mori, F., Yoshimoto, M., Satoh, K., & Wakabayashi, K. (2001). Expression of α-synuclein in a human glioma cell line and its up-regulation by interleukin-1beta. *Neuroreport*, *12*(9), 1909–1912. https://doi.org/10.1097/00001756-200107030-00028

Tansey, M. G., Wallings, R. L., Houser, M. C., Herrick, M. K., Keating, C. E., & Joers, V. (2022). Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. Nature Reviews. *Immunology*, *22*(11), 657–673. https://doi.org/10.1038/S41577-022-00684-6

Taschenberger, G., Toloe, J., Tereshchenko, J., Akerboom, J., Wales, P., Benz, R., Becker, S., Outeiro, T. F., Looger, L. L., Bähr, M., Zweckstetter, M., & Kügler, S. (2013). β-synuclein aggregates and induces neurodegeneration in dopaminergic neurons. *Annals of Neurology*, *74*(1), 109–118. https://doi.org/10.1002/ANA.23905

Tatenhorst, L., Eckermann, K., Dambeck, V., Fonseca-Ornelas, L., Walle, H., Lopes da Fonseca, T., Koch, J. C., Becker, S., Tönges, L., Bähr, M., Outeiro, T. F., Zweckstetter, M., & Lingor, P. (2016). Fasudil attenuates aggregation of α-synuclein in models of Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*, 39. https://doi.org/10.1186/s40478-016-0310-y

Tay, T. L., Savage, J. C., Hui, C. W., Bisht, K., & Tremblay, M. È. (2017). Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *The Journal of Physiology*, *595*(6), 1929–1945. https://doi.org/10.1113/JP272134

Tenreiro, S., Eckermann, K., & Outeiro, T. F. (2014). Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Frontiers in molecular neuroscience*, *7*, 42. https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00042

Teravskis, P. J., Covelo, A., Miller, E. C., Singh, B., Martell-Martínez, H. A., Benneyworth, M. A., Gallardo, C., Oxnard, B. R., Araque, A., Lee, M. K., & Liao, D. (2018). A53T Mutant α-Synuclein Induces Tau-Dependent Postsynaptic Impairment Independently of Neurodegenerative Changes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *38*(45), 9754–9767. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0344-18.2018

Tetzner, A., Gebolys, K., Meinert, C., Klein, S., Uhlich, A., Trebicka, J., Villacañas, Ó., & Walther, T. (2016). G-Protein-Coupled Receptor MrgD Is a Receptor for Angiotensin-(1-7) Involving Adenylyl Cyclase, cAMP, and Phosphokinase A. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *68*(1), 185–194. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07572

Thayanithy, V., O'Hare, P., Wong, P., Zhao, X., Steer, C. J., Subramanian, S., & Lou, E. (2017). A transwell assay that excludes exosomes for assessment of tunneling nanotube-mediated intercellular communication. *Cell Communication and Signaling: CCS*, *15*(1), 46. https://doi.org/10.1186/s12964-017-0201-2

Thenganatt, M. A., & Jankovic, J. (2014). Parkinson Disease Subtypes. *JAMA Neurology*, *71*(4), 499–504. https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2013.6233

Thomas, M. G., Santa Coloma, T. A., Correale, J., & Boccaccio, G. L. (2002). Myosin light chain kinase inhibitors induce retraction of mature oligodendrocyte processes. *Neurochemical Research*, *27*(11), 1305–1312. https://doi.org/10.1023/A:1021615530960/METRICS

Tieu, K. (2011). A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *1*(1), a009316. https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A009316

Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., & Turner, A. J. (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

insensitive carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(43), 33238–33243. https://doi.org/10.1074/JBC.M002615200

Tolstanova, G., Deng, X., Ahluwalia, A., Paunovic, B., Prysiazhniuk, A., Ostapchenko, L., Tarnawski, A., Sandor, Z., & Szabo, S. (2015). Role of Dopamine and D2 Dopamine Receptor in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, *60*(10), 2963–2975. https://doi.org/10.1007/S10620-015-3698-5

Tong, Y., Yamaguchi, H., Giaime, E., Boyle, S., Kopan, R., Kelleher, R. J., & Shen, J. (2010). Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of α-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(21), 9879–9884. https://doi.org/10.1073/pnas.1004676107

Tönges, L., Frank, T., Tatenhorst, L., Saal, K. A., Koch, J. C., Szego, É. M., Bähr, M., Weishaupt, J. H., & Lingor, P. (2012). Inhibition of rho kinase enhances survival of dopaminergic neurons and attenuates axonal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, *135*(Pt 11), 3355–3370. https://doi.org/10.1093/brain/aws254

Tota, S., Nath, C., Najmi, A. K., Shukla, R., & Hanif, K. (2012). Inhibition of central angiotensin converting enzyme ameliorates scopolamine induced memory impairment in mice: role of cholinergic neurotransmission, cerebral blood flow and brain energy metabolism. *Behavioural Brain Research*, *232*(1), 66–76. https://doi.org/10.1016/J.BBR.2012.03.015

Trinkaus, V. A., Riera-Tur, I., Martínez-Sánchez, A., Bäuerlein, F. J. B., Guo, Q., Arzberger, T., Baumeister, W., Dudanova, I., Hipp, M. S., Hartl, F. U., & Fernández-Busnadiego, R. (2021). In situ architecture of neuronal α-synuclein inclusions. *Nature Communications*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/S41467-021-22108-0

Trudler, D., Sanz-Blasco, S., Eisele, Y., Ghatak, S., Bodhinathan, K., Akhtar, M., Lynch, W., Piña-Crespo, J., Talantova, M., Kelly, J., & Lipton, S. (2021). α-Synuclein Oligomers Induce Glutamate Release from Astrocytes and Excessive Extrasynaptic NMDAR Activity in Neurons, Thus Contributing to Synapse Loss. *The Journal of Neuroscience*, *41*, 2264 - 2273. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1871-20.2020

Tu, H. Y., Yuan, B. S., Hou, X. O., Zhang, X. J., Pei, C. S., Ma, Y. T., Yang, Y. P., Fan, Y., Qin, Z. H., Liu, C. F., & Hu, L. F. (2021). α-synuclein suppresses microglial autophagy and promotes neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Aging Cell*, *20*(12). https://doi.org/10.1111/ACEL.13522

Turski, L., Bressler, K., Jürgen Rettig, K., Löschmann, P. A., & Wachtel, H. (1991). Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature*, *349*(6308), 414–418. https://doi.org/10.1038/349414a0

Uéda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D. A. C., Kondo, J., Ihara, Y., & Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(23), 11282. https://doi.org/10.1073/PNAS.90.23.11282

Uemura, N., Uemura, M. T., Lo, A., Bassil, F., Zhang, B., Luk, K. C., Lee, V. M., Takahashi, R., & Trojanowski, J. Q. (2019). Slow Progressive Accumulation of Oligodendroglial α-synuclein (α-Syn) Pathology in Synthetic α-Syn Fibril-Induced Mouse Models of Synucleinopathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, *78*(10), 877–890. https://doi.org/10.1093/jnen/nlz070.

Uemura, N., Uemura, M. T., Luk, K. C., Lee, V. M.-Y., & Trojanowski, J. Q. (2020). Cell-to-Cell Transmission of Tau and α-synuclein. *Trends in Molecular Medicine*, *26*(10), 936–952. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.03.012

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ulrih, N. P., Barry, C. H., & Fink, A. L. (2008). Impact of Tyr to Ala mutations on α-synuclein fibrillation and structural properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1782*(10), 581–585. https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2008.07.004

Unger, T. (2003). Inhibiting angiotensin receptors in the brain: possible therapeutic implications. *Current Medical Research and Opinion*, *19*(5), 449–451. https://doi.org/10.1185/030079903125001974

Ungerstedt, U. (1968). 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, *5*(1), 107–110. https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7

Valdinocci, D., Grant, G. D., Dickson, T. C., & Pountney, D. L. (2018). Epothilone D inhibits microglia-mediated spread of α-synuclein aggregates. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *89*, 80–94. https://doi.org/10.1016/J.MCN.2018.04.006

Valenzuela, R., Barroso-Chinea, P., Villar-Cheda, B., Joglar, B., Muñoz, A., Lanciego, J. L., & Labandeira-Garcia, J. L. (2010). Location of prorenin receptors in primate substantia nigra: effects on dopaminergic cell death. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *69*(11), 1130–1142. https://doi.org/10.1097/NEN.0B013E3181FA0308

Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A., Iglesias-Gonzalez, J., Perez-Costas, E., Villar-Cheda, B., Garrido-Gil, P., Melendez-Ferro, M., Soto-Otero, R., Lanciego, J. L., Henrion, D., Franco, R., & Labandeira-Garcia, J. L. (2016). Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration. *Cell death & disease*, *7*(10), e2427. https://doi.org/10.1038/cddis.2016.327

Vallabhaneni, K. C., Haller, H., & Dumler, I. (2012). Vascular smooth muscle cells initiate proliferation of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes. *Stem Cells and Development*, *21*(17), 3104–3113. https://doi.org/10.1089/SCD.2011.0691

Van den Eeden, S. K., Barzilay, J. I., Ettinger, B., & Minkoff, J. (2003). Thyroid Hormone Use and the Risk of Hip Fracture in Women ≥65 Years: A Case-Control Study. *Journal of women's health*, *12*(1), 27–31. https://doi.org/10.1089/154099903321154112

Van der Perren, A., Van den Haute, C., & Baekelandt, V. (2014). Viral Vector-based models of Parkinson's disease. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, *22*, 271–301. https://doi.org/10.1007/7854_2014_310/COVER

Van Thiel, B. S., Góes Martini, A., Te Riet, L., Severs, D., Uijl, E., Garrelds, I. M., Leijten, F. P. J., Van Der Pluijm, I., Essers, J., Qadri, F., Alenina, N., Bader, M., Paulis, L., Rajkovicova, R., Domenig, O., Poglitsch, M., & Danser, A. H. J. (2017). Brain Renin-Angiotensin System: Does It Exist? *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *69*(6), 1136–1144. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08922

Vanderperre, B., Muraleedharan, A., Dorion, M., Larroquette, F., Del Cid Pellitero, E., Rajakulendran, N., Chen, C., Larivière, R., Michaud-Tardif, C., Chidiac, R., Lipuma, D., MacLeod, G., Thomas, R., Wang, Z., Reintsch, W., Luo, W., Shlaifer, I., Fuming, Z., Xia, K., Yan., L., Steinhart, Z., Linhardt, R., Trempe, J., Liu, J., Durcan, T., Angers, S., & Fon, E. (2023). A genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies genes that regulate the cellular uptake of α-synuclein fibrils by modulating heparan sulfate proteoglycans. *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2023.09.29.560170

Varkey, J., Isas, J. M., Mizuno, N., Jensen, M. B., Bhatia, V. K., Jao, C. C., Petrlova, J., Voss, J. C., Stamou, D. G., Steven, A. C., & Langen, R. (2010). Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(42), 32486–32493. https://doi.org/10.1074/JBC.M110.139576

Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure & Function*, *222*(5), 2017. https://doi.org/10.1007/S00429-017-1383-5

Vasili, E., Dominguez-Meijide, A., Flores-León, M., Al-Azzani, M., Kanellidi, A., Melki, R., Stefanis, L., & Outeiro, T. F. (2022). Endogenous Levels of α-synuclein Modulate Seeding and Aggregation in Cultured Cells. *Molecular neurobiology*, *59*(2), 1273–1284. https://doi.org/10.1007/s12035-021-02713-2

Vasili, E., Dominguez-Meijide, A., & Outeiro, T. F. (2019). Spreading of α-Synuclein and Tau: A Systematic Comparison of the Mechanisms Involved. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*, 107. https://doi.org/10.3389/FNMOL.2019.00107

Vasquez, V., Mitra, J., Hegde, P. M., Pandey, A., Sengupta, S., Mitra, S., Rao, K. S., & Hegde, M. L. (2017). Chromatin-Bound Oxidized α-synuclein Causes Strand Breaks in Neuronal Genomes in *in vitro* Models of Parkinson's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, *60*(s1), S133–S150. https://doi.org/10.3233/JAD-170342

Vegeto, E., Benedusi, V., & Maggi, A. (2008). Estrogen anti-inflammatory activity in brain: A therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *29*(4), 507–519. https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2008.04.001

Vila, M. (2019). Neuromelanin, aging, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *34*(10), 1440. https://doi.org/10.1002/MDS.27776

Villar-Cheda, B., Costa-Besada, M. A., Valenzuela, R., Perez-Costas, E., Melendez-Ferro, M., & Labandeira-Garcia, J. L. (2017). The intracellular angiotensin system buffers deleterious effects of the extracellular paracrine system. *Cell Death & Disease*, *8*(9). https://doi.org/10.1038/CDDIS.2017.439

Villar-Cheda, B., Dominguez-Meijide, A., Joglar, B., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2012). Involvement of microglial RhoA/Rho-Kinase pathway activation in the dopaminergic neuron death. Role of angiotensin via angiotensin type 1 receptors. *Neurobiology of Disease*, *47*(2), 268–279. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2012.04.010

Villar-Cheda, B., Dominguez-Meijide, A., Valenzuela, R., Granado, N., Moratalla, R., & Labandeira-Garcia, J. L. (2014). Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiology of Aging*, *35*(7), 1726–1738. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2014.01.017

Villar-Cheda, B., Rodríguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Muñoz, A., Guerra, M. J., Baltatu, O. C., & Labandeira-Garcia, J. L. (2010). Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: implications for progression of Parkinson's disease. *The European Journal of Neuroscience*, *32*(10), 1695–1706. https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2010.07448.X

Villela, D., Leonhardt, J., Patel, N., Joseph, J., Kirsch, S., Hallberg, A., Unger, T., Bader, M., Santos, R. A., Sumners, C., & Steckelings, U. M. (2015). Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: a complex liaison. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *128*(4), 227–234. https://doi.org/10.1042/CS20130515

Volc, D., Poewe, W., Kutzelnigg, A., Lührs, P., Thun-Hohenstein, C., Schneeberger, A., Galabova, G., Majbour, N., Vaikath, N., El-Agnaf, O., Winter, D., Mihailovska, E., Mairhofer, A., Schwenke, C., Staffler, G., & Medori, R. (2020). Safety and immunogenicity of the α-synuclein active immunotherapeutic PD01A in patients with Parkinson's disease: a randomised, single-blinded, phase 1 trial. *The Lancet Neurology*, *19*(7), 591–600. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30136-8

Volles, M. J., & Lansbury, P. T. (2002). Vesicle permeabilization by protofibrillar α-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry*, *41*(14), 4595–4602. https://doi.org/10.1021/bi0121353

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Volpicelli-Daley L. A. (2017). Effects of α-synuclein on axonal transport. *Neurobiology of disease*, *105*, 321–327. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.12.008

Volpicelli-Daley, L. A., Gamble, K. L., Schultheiss, C. E., Riddle, D. M., West, A. B., & Lee, V. M. Y. (2014b). Formation of α-synuclein Lewy neurite-like aggregates in axons impedes the transport of distinct endosomes. *Molecular Biology of the Cell*, *25*(25), 4010–4023. https://doi.org/10.1091/MBC.E14-02-0741

Volpicelli-Daley, L. A., Kirik, D., Stoyka, L. E., Standaert, D. G., & Harms, A. S. (2016). How can rAAV-α-synuclein and the fibril α-synuclein models advance our understanding of Parkinson's disease? *Journal of Neurochemistry*, *139 Suppl 1*(Suppl 1), 131–155. https://doi.org/10.1111/JNC.13627

Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., & Lee, V. M. Y. (2014a). Addition of exogenous α-synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous α-synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nature Protocols*, *9*(9), 2135–2146. https://doi.org/10.1038/NPROT.2014.143

Voon, V., Gao, J., Brezing, C., Symmonds, M., Ekanayake, V., Fernandez, H., Dolan, R. J., & Hallett, M. (2011). Dopamine agonists and risk: impulse control disorders in Parkinson's disease. *Brain*, *134*(5), 1438. https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWR080

Vowinckel, E., Reutens, D., Becher, B., Verge, G., Evans, A., Owens, T., & Antel, J. P. (1997). PK11195 binding to the peripheral benzodiazepine receptor as a marker of microglia activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*, *50*(2), 345–353. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19971015)50:2<345::AID-JNR22>3.0.CO;2-5

Waak, J., Weber, S. S., Waldenmaier, A., Görner, K., Alunni-Fabbroni, M., Schell, H., Vogt-Weisenhorn, D., Pham, T. T., Reumers, V., Baekelandt, V., Wurst, W., & Kahle, P. J. (2009). Regulation of astrocyte inflammatory responses by the Parkinson's disease-associated gene DJ-1. *FASEB Journal*, *23*(8), 2478–2489. https://doi.org/10.1096/FJ.08-125153

Wakabayashi, K., Engelender, S., Tanaka, Y., Yoshimoto, M., Mori, F., Tsuji, S., Ross, C. A., & Takahashi, H. (2002). Immunocytochemical localization of synphilin-1, an α-synuclein-associated protein, in neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathologica*, *103*(3), 209–214. https://doi.org/10.1007/S004010100451

Wakabayashi, K., Mori, F., Tanji, K., Orimo, S., & Takahashi, H. (2010). Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. *Acta Neuropathologica*, *120*, 1-12. https://doi.org/10.1007/s00401-010-0706-x

Wakamatsu, M., Ishii, A., Iwata, S., Sakagami, J., Ukai, Y., Ono, M., Kanbe, D., Muramatsu, S. ichi, Kobayashi, K., Iwatsubo, T., & Yoshimoto, M. (2008). Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human α-synuclein in mice. *Neurobiology of Aging*, *29*(4), 574–585. https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2006.11.017

Wallace, J., Lord, J., Dissing-Olesen, L., Stevens, B., & Murthy, V. N. (2020). Microglial depletion disrupts normal functional development of adult-born neurons in the olfactory bulb. *ELife*, *9*, e50531. https://doi.org/10.7554/ELIFE.50531

Wallukat, G., Homuth, V., Fischer, T., Lindschau, C., Horstkamp, B., Jüpner, A., Baur, E., Nissen, E., Vetter, K., Neichel, D., Dudenhausen, J. W., Haller, H., & Luft, F. C. (1999). Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *The Journal of Clinical Investigation*, *103*(7), 945–952. https://doi.org/10.1172/JCI4106

Wallukat, G., Neichel, D., Nissen, E., Homuth, V., & Luft, F. C. (2003). Agonistic autoantibodies directed against the angiotensin II AT1 receptor in patients with preeclampsia. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *81*(2), 79–83. https://doi.org/10.1139/Y02-160

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Wang, D., Martens, J. R., Posner, P., Sumners, C., & Gelband, C. H. (1996). Angiotensin II regulation of intracellular calcium in astroglia cultured from rat hypothalamus and brainstem. *Journal of Neurochemistry*, *67*(3), 996–1004. https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1996.67030996.X

Wang, L., Das, U., Scott, D. A., Tang, Y., McLean, P. J., & Roy, S. (2014). α-synuclein multimers cluster synaptic vesicles and attenuate recycling. *Current Biology: CB*, *24*(19), 2319–2326. https://doi.org/10.1016/J.CUB.2014.08.027

Wang, L., Zhao, Z., Zhao, L., Zhao, Y., Yang, G., Wang, C., Gao, L., Niu, C., & Li, S. (2022). Lactobacillus plantarum DP189 Reduces α-SYN Aggravation in MPTP-Induced Parkinson's Disease Mice via Regulating Oxidative Damage, Inflammation, and Gut Microbiota Disorder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *70*(4), 1163–1173. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C07711

Wang, Z. C., Qi, J., Liu, L. M., Li, J., Xu, H. Y., Liang, B., & Li, B. (2017). Valsartan reduces AT1-AA-induced apoptosis through suppression oxidative stress mediated ER stress in endothelial progenitor cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *21*(5), 1159–1168. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28338173/

Watts, J. C., Giles, K., Oehler, A., Middleton, L., Dexter, D. T., Gentleman, S. M., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2013). Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(48), 19555–19560. https://doi.org/10.1073/pnas.1318268110

Wayt, J., Cartagena-Rivera, A., Dutta, D., Donaldson, J. G., & Waterman, C. M. (2021). Myosin II isoforms promote internalization of spatially distinct clathrin-independent endocytosis cargoes through modulation of cortical tension downstream of ROCK2. *Molecular Biology of the Cell*, *32*(3), 226–236. https://doi.org/10.1091/mbc.E20-07-0480

Wei, J., Wu, C., Lankin, D., Gulrati, A., Valyi-Nagy, T., Cochran, E., Pike, V., Kozikowski, A., & Wang, Y. (2005). Development of novel amyloid imaging agents based upon thioflavin S. *Current Alzheimer Research*, *2*(2), 109–114. https://doi.org/10.2174/1567205053585864

Wei, S. G., Yu, Y., Zhang, Z. H., & Felder, R. B. (2009). Angiotensin II upregulates hypothalamic AT1 receptor expression in rats via the mitogen-activated protein kinase pathway. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *296*(5). https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00942.2008

Wenzel, K., Rajakumar, A., Haase, H., Geusens, N., Hubner, N., Schulz, H., Brewer, J., Roberts, L., Hubel, C. A., Herse, F., Hering, L., Qadri, F., Lindschau, C., Wallukat, G., Pijnenborg, R., Heidecke, H., Riemekasten, G., Luft, F. C., Muller, D. N., … Dechend, R. (2011). Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies and Increased Angiotensin II Sensitivity in Pregnant Rats. *Hypertension*, *58*(1), 77. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.171348

Williams, J. K., Yang, X., Atieh, T. B., Olson, M. P., Khare, S. D., & Baum, J. (2018). Multi-Pronged Interactions Underlie Inhibition of α-Synuclein Aggregation by β-Synuclein. *Journal of molecular biology*, *430*(16), 2360–2371. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.05.024

Winslow, A. R., Chen, C. W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D. E., Peden, A. A., Lichtenberg, M., Menzies, F. M., Ravikumar, B., Imarisio, S., Brown, S., O'Kane, C. J., & Rubinsztein, D. C. (2010). α-synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *The Journal of Cell Biology*, *190*(6), 1023–1037. https://doi.org/10.1083/JCB.201003122

Wirdefeldt, K., Adami, H. O., Cole, P., Trichopoulos, D., & Mandel, J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European Journal of Epidemiology*, *26 Suppl 1*, S1–S58. https://doi.org/10.1007/S10654-011-9581-6

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Witt, P. A. L., & Fahn, S. (2016). Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and forward. *Neurology*, *86*(14 Suppl 1), S3–S12. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002509

Wong, Y. C., & Holzbaur, E. L. F. (2015). Autophagosome dynamics in neurodegeneration at a glance. *Journal of Cell Science*, *128*(7), 1259–1267. https://doi.org/10.1242/JCS.161216

Wright, J., & Harding, J. (2019). Contributions by the Brain Renin-Angiotensin System to Memory, Cognition, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, *67*(2), 469-480. https://doi.org/10.3233/JAD-181035

Wright, J. W., & Harding, J. W. (2013). The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *465*(1), 133–151. https://doi.org/10.1007/S00424-012-1102-2

Wright, J., Kawas, L., & Harding, J. (2015). The development of small molecule angiotensin IV analogs to treat Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Progress in Neurobiology*, *125*, 26-46. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.11.004

Wu, D. C., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ischiropoulos, H., & Przedborski, S. (2003). NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(10), 6145–6150. https://doi.org/10.1073/PNAS.0937239100

Wu, J. Z., Ardah, M., Haikal, C., Svanbergsson, A., Diepenbroek, M., Vaikath, N. N., Li, W., Wang, Z. Y., Outeiro, T. F., El-Agnaf, O. M., & Li, J. Y. (2019). Dihydromyricetin and Salvianolic acid B inhibit α-synuclein aggregation and enhance chaperone-mediated autophagy. *Translational Neurodegeneration*, *8*(1). https://doi.org/10.1186/S40035-019-0159-7

Wu, K. P., & Baum, J. (2010). Detection of transient interchain interactions in the intrinsically disordered protein α-synuclein by NMR paramagnetic relaxation enhancement. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(16), 5546–5547. https://doi.org/10.1021/ja9105495

Xia, H., de Queiroz, T. M., Sriramula, S., Feng, Y., Johnson, T., Mungrue, I. N., & Lazartigues, E. (2015). Brain ACE2 overexpression reduces DOCA-salt hypertension independently of endoplasmic reticulum stress. American journal of physiology. *Regulatory, integrative and comparative physiology*, *308*(5), R370–R378. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00366.2014

Xia, H., Feng, Y., Obr, T. D., Hickman, P. J., & Lazartigues, E. (2009). Angiotensin II type 1 receptor-mediated reduction of angiotensin-converting enzyme 2 activity in the brain impairs baroreflex function in hypertensive mice. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *53*(2), 210–216. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.123844

Xia, Y., Zhang, G., Han, C., Ma, K., Guo, X., Wan, F., Kou, L., Yin, S., Liu, L., Huang, J., Xiong, N., & Wang, T. (2019). Microglia as modulators of exosomal α-synuclein transmission. *Cell Death & Disease*, *10*(3), 1–15. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1404-9

Xia, Y., Zhang, G., Kou, L., Yin, S., Han, C., Hu, J., Wan, F., Sun, Y., Wu, J., Li, Y., Huang, J., Xiong, N., Zhang, Z., & Wang, T. (2021). Reactive microglia enhance the transmission of exosomal α-synuclein via toll-like receptor 2. *Brain: a journal of neurology*. *144*(7), 2024–2037. https://doi.org/10.1093/brain/awab122

Xie, W., & Chung, K. K. K. (2012). α-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *122*(2), 404–414. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2012.07769.X

Xilouri, M., Brekk, O. R., & Stefanis, L. (2012). α-synuclein and Protein Degradation Systems: a Reciprocal Relationship. *Molecular Neurobiology*, *47*(2), 537–551. https://doi.org/10.1007/S12035-012-8341-2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Xu, J., Sriramula, S., Xia, H., Moreno-Walton, L., Culicchia, F., Domenig, O., Poglitsch, M., & Lazartigues, E. (2017). Clinical Relevance and Role of Neuronal AT1 Receptors in ADAM17-Mediated ACE2 Shedding in Neurogenic Hypertension. *Circulation Research*, *121*(1), 43–55. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310509

Xu, L., Bhattacharya, S., & Thompson, D., (2018). The fold preference and thermodynamic stability of α-synuclein fibrils is encoded in the non-amyloid-β component region. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, *20*(6), 4502–4512. https://doi.org/10.1039/c7cp08321a

Yan, J., Zhou, X., Guo, J. J., Mao, L., Wang, Y. J., Sun, J., Sun, L. X., Zhang, L. Y., Zhou, X. F., & Liao, H. (2012). Nogo-66 inhibits adhesion and migration of microglia via GTPase Rho pathway *in vitro*. *Journal of Neurochemistry*, *120*(5), 721–731. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07619.X

Yan, Y., Xiang, C., Yang, Z., Miao, D., & Zhang, D. (2020). Rho Kinase Inhibition by Fasudil Attenuates Adriamycin-Induced Chronic Heart Injury. *Cardiovascular Toxicology*, *20*(4), 351–360. https://doi.org/10.1007/S12012-019-09561-6

Yanagida, T., Tsushima, J., Kitamura, Y., Yanagisawa, D., Takata, K., Shibaike, T., Yamamoto, A., Taniguchi, T., Yasui, H., Taira, T., Morikawa, S., Inubushi, T., Tooyama, I., & Ariga, H. (2009). Oxidative stress induction of DJ-1 protein in reactive astrocytes scavenges free radicals and reduces cell injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(1), 36–42. https://doi.org/10.4161/OXIM.2.1.7985

Yang, G., Gray, T. S., Sigmund, C. D., & Cassell, M. D. (1999). The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system. *Brain Research*, *817*(1–2), 123–131. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01236-0

Yang, S., Yao, B., Zhou, Y., Yin, H., Zhang, M. Z., & Harris, R. C. (2012). Intrarenal dopamine modulates progressive angiotensin II-mediated renal injury. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *302*(6), F742–F749. https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00583.2011

Yang, Y., Qin, M., Bao, P., Xu, W., & Xu, J. (2017). Secretory carrier membrane protein 5 is an autophagy inhibitor that promotes the secretion of α-synuclein via exosome. *PloS One*, *12*(7). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0180892

Yasui, Y., Amano, M., Nagata, K. I., Inagaki, N., Nakamura, H., Saya, H., Kaibuchi, K., & Inagaki, M. (1998). Roles of Rho-associated Kinase in Cytokinesis; Mutations in Rho-associated Kinase Phosphorylation Sites Impair Cytokinetic Segregation of Glial Filaments. *Journal of Cell Biology*, *143*(5), 1249–1258. https://doi.org/10.1083/JCB.143.5.1249

Yerramilli, V. S., & Scarlata, S. (2016). The Breast Cancer Susceptibility Gene Product (γ-Synuclein) Alters Cell Behavior through its [corrected] Interaction with Phospholipase Cβ. *Cellular signalling*, *28*(1), 91-99. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.10.018

Zafar, S., Fatima, S. I., Schmitz, M., & Zerr, I. (2024). Current Technologies Unraveling the Significance of Post-Translational Modifications (PTMs) as Crucial Players in Neurodegeneration. *Biomolecules*, *14*(1), 118. https://doi.org/10.3390/biom14010118

Zaman, M. A., Oparil, S., & Calhoun, D. A. (2002). Drugs targeting the renin–angiotensin–aldosterone system. *Nature Reviews Drug Discovery*, *1*(8), 621–636. https://doi.org/10.1038/nrd873

Zarbiv, Y., Simhi-Haham, D., Israeli, E., Elhadi, S. A., Grigoletto, J., & Sharon, R. (2014). Lysine residues at the first and second KTKEGV repeats mediate α-synuclein binding to membrane phospholipids. *Neurobiology of disease*, *70*, 90–98. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.05.031

Zawada, W. M., Banninger, G. P., Thornton, J., Marriott, B., Cantu, D., Rachubinski, A. L., Das, M., Griffin, W. S. T., & Jones, S. M. (2011). Generation of reactive oxygen species in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) treated dopaminergic neurons occurs as an NADPH oxidase-dependent two-wave cascade. *Journal of Neuroinflammation*, *8*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-129/FIGURES/9

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Zecca, L., Wilms, H., Geick, S., Claasen, J. H., Brandenburg, L. O., Holzknecht, C., Panizza, M. L., Zucca, F. A., Deuschl, G., Sievers, J., & Lucius, R. (2008). Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: Implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, *116*(1), 47–55. https://doi.org/10.1007/S00401-008-0361-7

Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforazzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A. L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience*, *17*(3), 400–406. https://doi.org/10.1038/nn.3641

Zhang, Q. S., Heng, Y., Yuan, Y. H., & Chen, N. H. (2017). Pathological α-synuclein exacerbates the progression of Parkinson's disease through microglial activation. *Toxicology Letters*, *265*, 30–37. https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2016.11.002

Zhang, T. L., Fu, J. L., Geng, Z., Yang, J. J., & Sun, X. J. (2012). The neuroprotective effect of losartan through inhibiting AT1/ASK1/MKK4/JNK3 pathway following cerebral I/R in rat hippocampal CA1 region. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *18*(12), 981–987. https://doi.org/10.1111/CNS.12015

Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D. S., Wu, X., Block, M. L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J. S., & Zhang, J. (2005). Aggregated α-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(6), 533–542. https://doi.org/10.1096/fj.04-2751com

Zhang, X., Zhang, S., Wang, M., & Liu, H. (2023). Abstract 12379: AT1-AA (Angiotensin II Type 1 Receptor Autoantibody) Aggravates Abdominal Aortic Aneurysm Through Activating AT1R/Gq Allosterically. *Circulation*, *148*(Suppl_1). https://doi.org/10.1161/CIRC.148.SUPPL_1.12379

Zheng, T., & Zhang, Z. (2021). Activated microglia facilitate the transmission of α-synuclein in Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, *148*, 105094. https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2021.105094

Zhou, Y., Hua, J., Ding, D., & Tang, Y. (2022). Interrogating amyloid aggregation with aggregation-induced emission fluorescence probes. *Biomaterials*, *286*, 121605. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2022.121605

Zhou, Z., Kim, J., Insolera, R., Peng, X., Fink, D. J., & Mata, M. (2011). Rho GTPase regulation of α-synuclein and VMAT2: Implications for pathogenesis of Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *48*(1), 29–37. https://doi.org/10.1016/J.MCN.2011.06.002

Zhu, D., Tan, K. S., Zhang, X., Sun, A. Y., Sun, G. Y., & Lee, J. C. M. (2005). Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *Journal of Cell Science*, *118*(16), 3695–3703. https://doi.org/10.1242/JCS.02507

Zhu, M., Li, J., & Fink, A. L. (2003). The association of α-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(41), 40186–40197. https://doi.org/10.1074/jbc.M305326200

Zubenko, G. S., Marquis, J. K., Volicer, L., Direnfeld, L. K., Langlais, P. J., & Nixon, R. A. (1986). Cerebrospinal fluid levels of angiotensin-converting enzyme, acetylcholinesterase, and dopamine metabolites in dementia associated with Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a correlative study. *Biological Psychiatry*, *21*(14), 1365–1381. https://doi.org/10.1016/0006-3223(86)90328-8

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO I

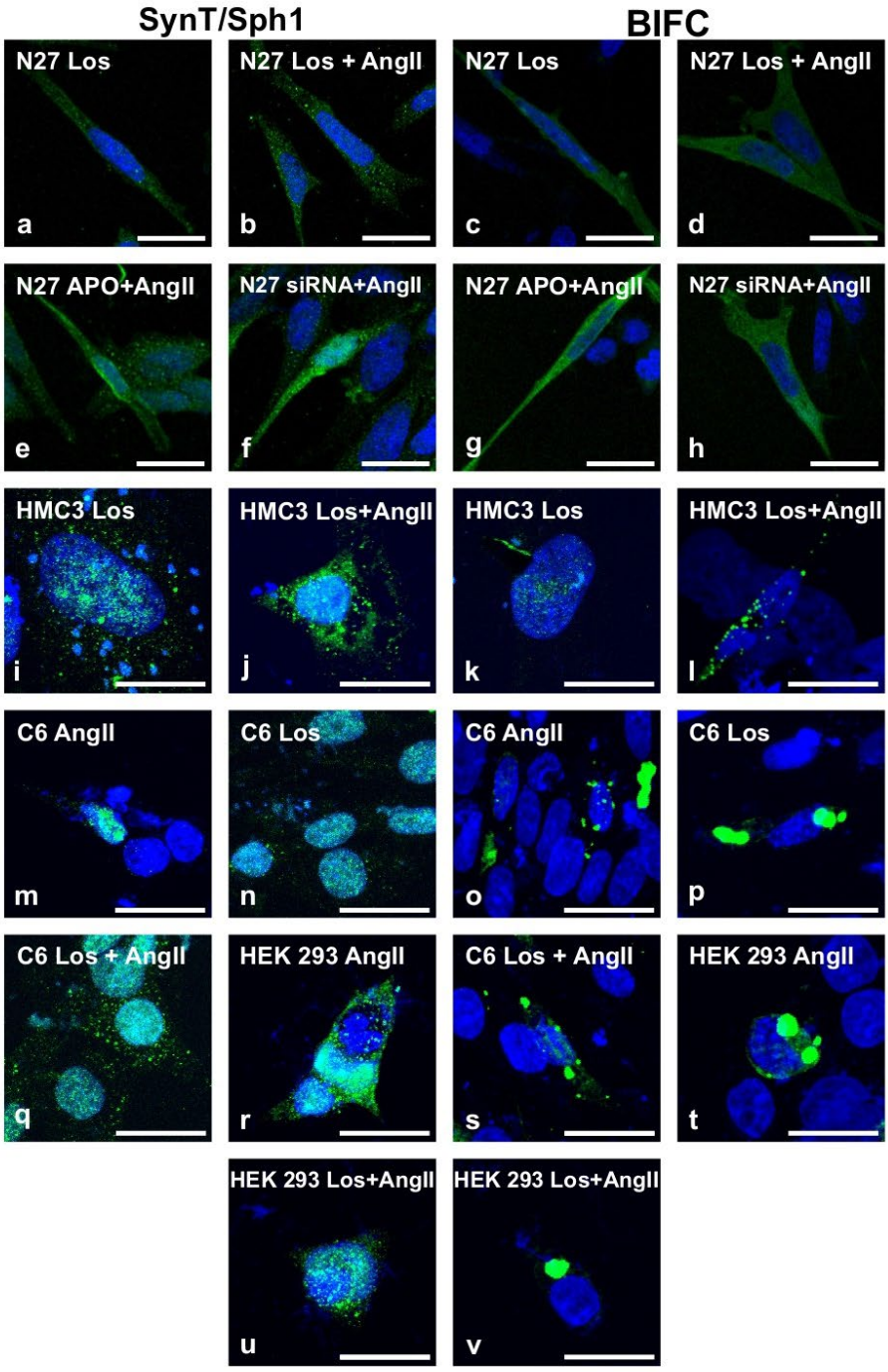


Figura Suplementaria 1. Imágenes de microscopía confocal de las células analizadas para el contaje del número y el tamaño de las inclusiones representativas de los tratamientos que no indujeron cambios significativos en comparación con los controles mostrados en las Figuras 10a-t y 12e-h. Los: losartán. APO: apocinina. Barra de escala: 20 µm.

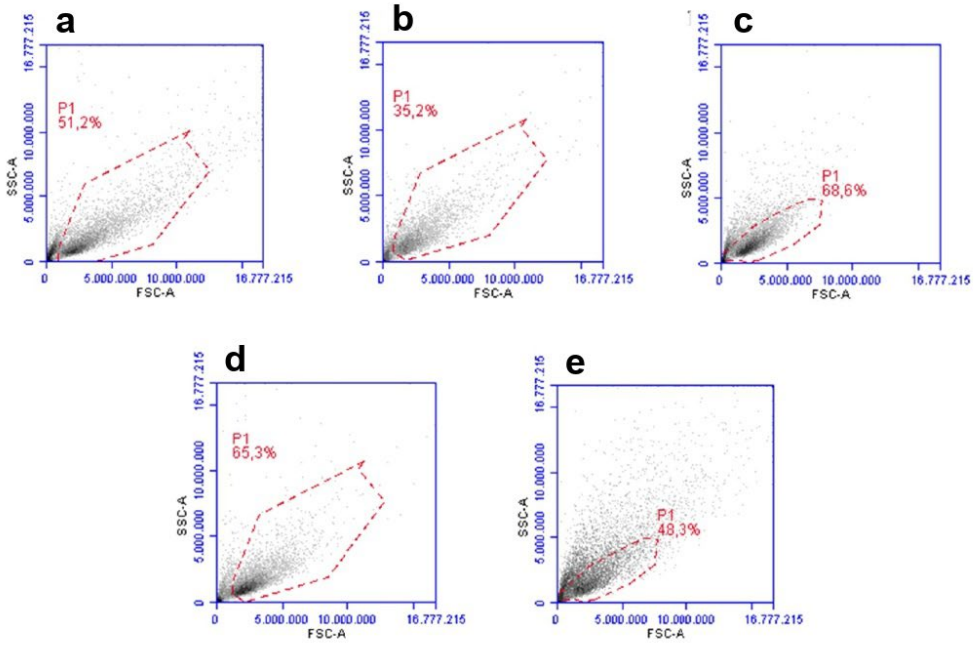


Figura Suplementaria 2. Diagramas de puntos representativos de citometría de flujo que muestran el gating inicial para las siguientes líneas celulares: N27 (**a**), HMC3 (**b**), BV2 (**c**), C6 (**d**) y HEK293 (**e**). Los histogramas de las figuras suplementarias 3-7 siguen las estrategias de delimitación mostradas en esta figura para cada línea celular.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

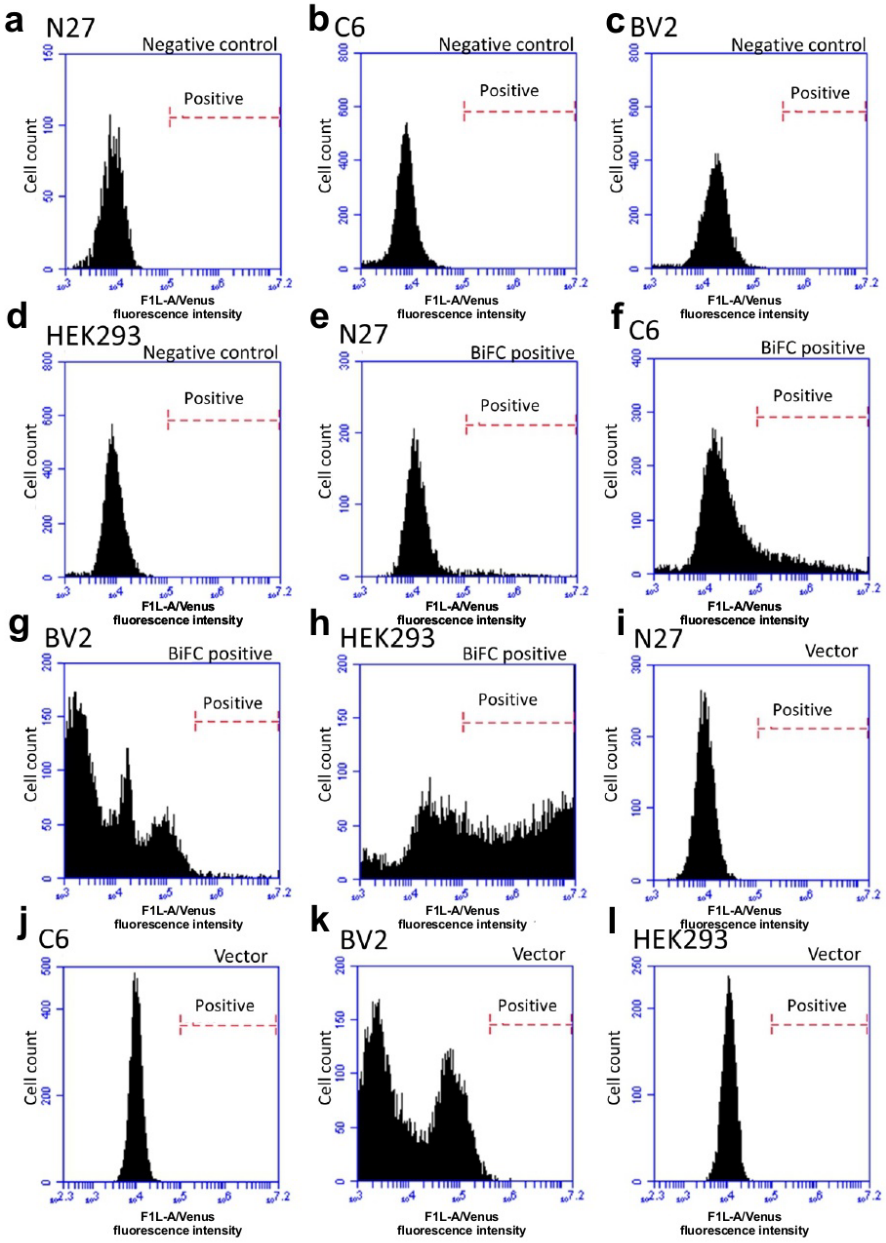


Figura Suplementaria 3. (**a-d**) Histogramas representativos de citometría de flujo para células negativas N27, BV2 y HEK293. Se analizaron 10000 eventos. (**e-h**) Histogramas representativos de citometría de flujo para células N27, C6, BV2 y HEK293 transfectadas simultáneamente con VN-α-syn y α-syn-VC. Se analizaron 10000 eventos. (**i-l**) Histogramas representativos de citometría de flujo para células N27, C6, BV2 y HEK293 transfectadas con vector vacío. Se analizaron 10000 eventos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

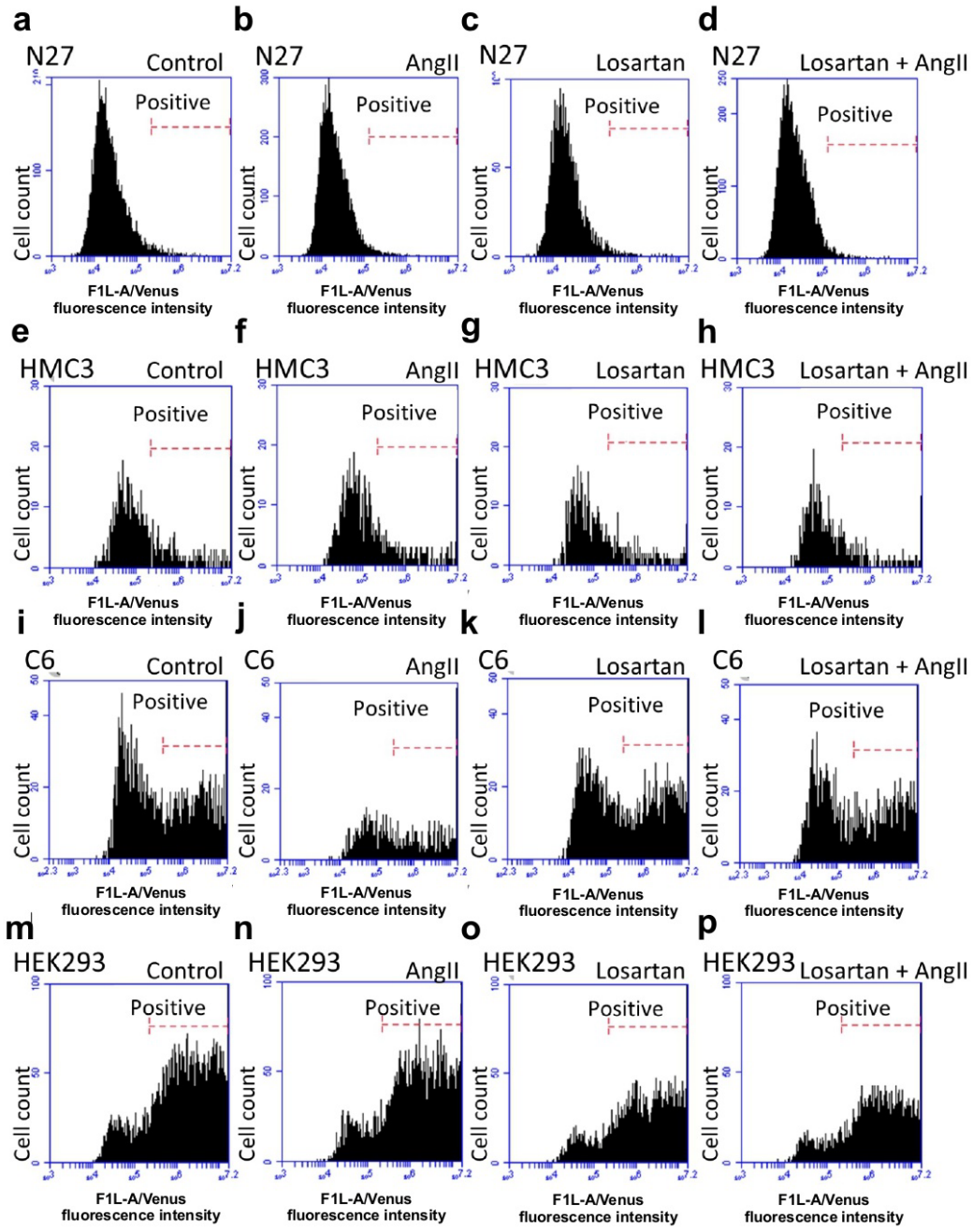


Figura Suplementaria 4. Histogramas representativos de citometría de flujo para células BiFC positivas: células N27 BiFC positivas no tratadas (**a**); células N27 tratadas con AngII (**b**); células N27 tratadas con losartán (**c**); células N27 tratadas con losartán y AngII (**d**); células HMC3 BiFC positivas no tratadas (**e**); células HMC3 tratadas con AngII (**f**); células HMC3 tratadas con losartán (**g**); células HMC3 tratadas con losartán y AngII (**h**); células C6 BiFC positivas no tratadas (**i**); células C6 tratadas con AngII (**j**); células C6 tratadas con losartán (**k**); células C6 tratadas con losartán y AngII (**l**); células HEK293 BiFC positivas no tratadas (**m**); células HEK293 tratadas con AngII (**n**); células HEK293 tratadas con losartán (**o**); células HEK293 tratadas con losartán y AngII (**p**). En cada análisis, se analizaron 10000 eventos.

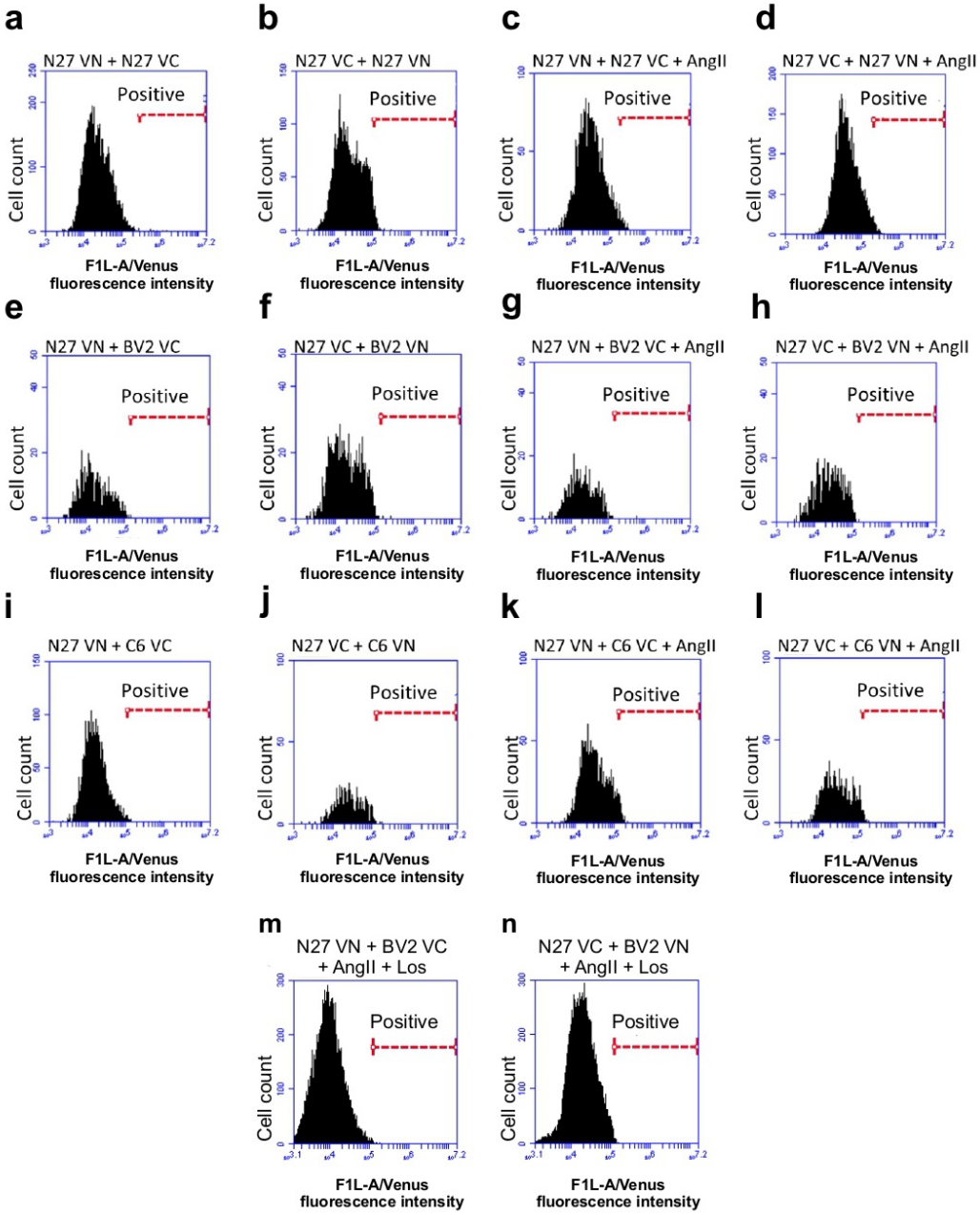


Figura Suplementaria 5. Histogramas representativos de citometría de flujo para las siguientes células. (**a**) Células VN N27 para el cocultivo entre células VN N27 y células N27 VC. (**b**) Células N27 VC para el cocultivo entre células VN N27 y células N27 VC. (**c**) Células VN N27 para el cocultivo entre células VN N27 y células N27 VC después del tratamiento con AngII. (**d**) Células N27 VC para el cocultivo entre células VN N27 y células N27 VC después del tratamiento con AngII. (**e**) Células VN N27 para el cocultivo entre células VN N27 y células BV2 VC. (**f**) Células N27 VC para el cocultivo entre células VN BV2 y células N27 VC. (**g**) Células VN N27 para el cocultivo entre células VN N27 y células BV2 VC después del tratamiento con AngII. (**h**) Células N27 VC para el cocultivo entre células VN BV2 y células N27 VC después del tratamiento con AngII. (**i**) Células VN N27 para el cocultivo entre células VN N27 y células C6 VC. (**j**) Células N27 VC para el cocultivo entre células VN C6 y células

N27 VC. (**k**) Células VN N27 para el cocultivo entre células VN N27 y células C6 VC después del tratamiento con AngII. (**l**) Células N27 VC para el cocultivo entre células VN C6 y células N27 VC después del tratamiento con AngII. (**m**) Células VN N27 para el cocultivo entre células VN N27 y células BV2 VC después del tratamiento con losartán y AngII. (**n**) Células N27 VC para el cocultivo entre células VN BV2 y células N27 VC después del tratamiento con losartán y AngII. Se analizaron 10000 eventos.

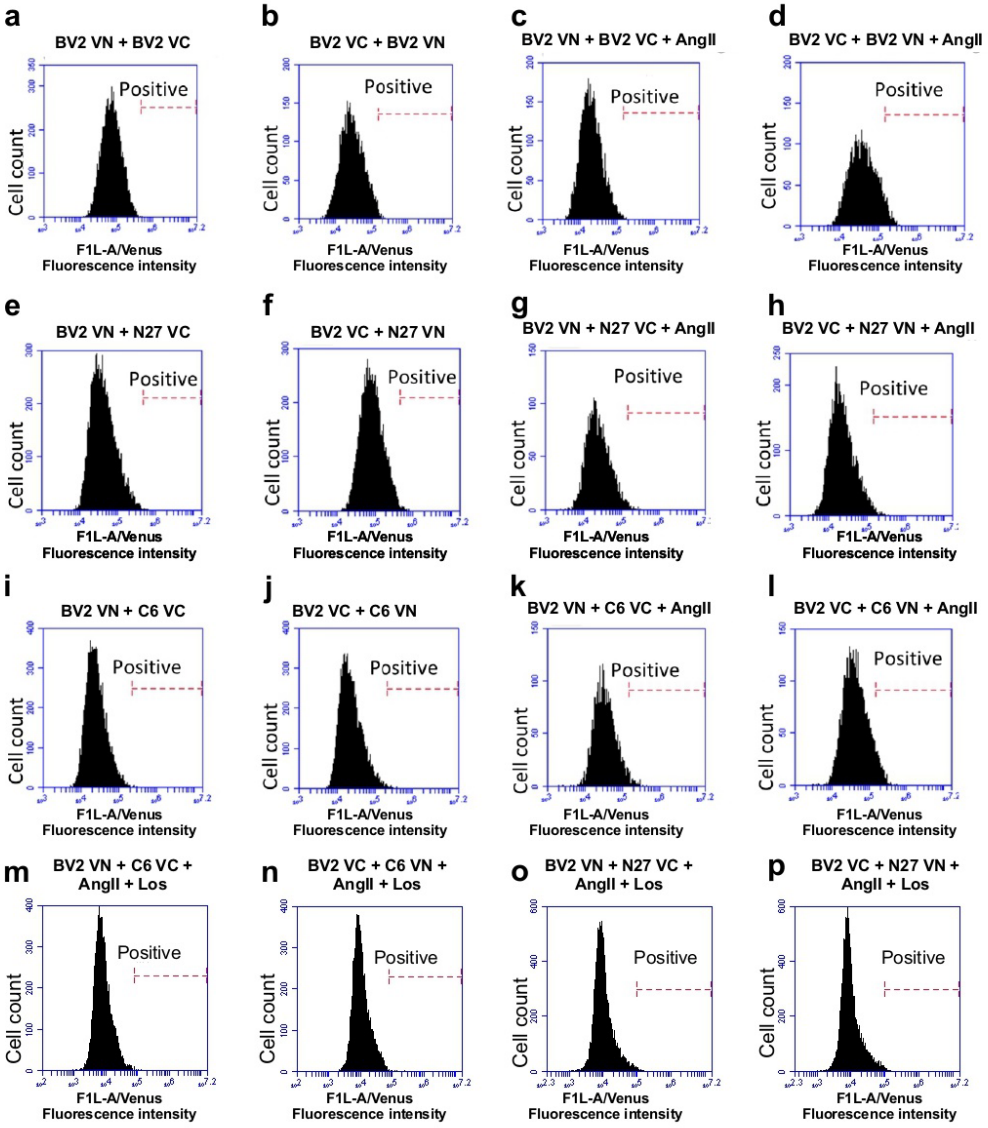


Figura Suplementaria 6. Histogramas representativos de citometría de flujo para las siguientes células: (**a**) Células VN BV2 para el cocultivo entre células VN BV2 y células BV2 VC. (**b**) Células BV2 VC para el cocultivo entre células VN BV2 y células BV2 VC. (**c**) Células VN BV2 para el cocultivo entre células VN BV2 y células BV2 VC después del tratamiento con AngII. (**d**) Células BV2 VC para el cocultivo entre células VN BV2 y células BV2 VC después del tratamiento con AngII. (**e**) Células VN BV2 para el cocultivo entre células VN BV2 y células N27 VC. (**f**) Células BV2 VC para el cocultivo entre células VN N27 y células BV2 VC. (**g**)

Células VN BV2 para el cocultivo entre células VN BV2 y células N27 VC después del tratamiento con AngII. (**h**) Células BV2 VC para el cocultivo entre células VN N27 y células BV2 VC después del tratamiento con AngII. (**i**) Células VN BV2 para el cocultivo entre células VN BV2 y células C6 VC. (**j**) Células BV2 VC para el cocultivo entre células VN C6 y células BV2 VC. (**k**) Células VN BV2 para el cocultivo entre células VN BV2 y células C6 VC después del tratamiento con AngII. (**l**) Células BV2 VC para el cocultivo entre células VN C6 y células BV2 VC después del tratamiento con AngII. (**m**) Células VN BV2 para el cocultivo entre células VN BV2 y células C6 VC después del tratamiento con losartán y AngII. (**n**) Células BV2 VC para el cocultivo entre células VN C6 y células BV2 VC después del tratamiento con losartán y AngII. (**o**) Células VN BV2 para el cocultivo entre células VN BV2 y células N27 VC después del tratamiento con losartán y AngII. (**p**) Células BV2 VC para el cocultivo entre células VN N27 y células BV2 VC después del tratamiento con losartán y AngII. Se analizaron 10000 eventos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

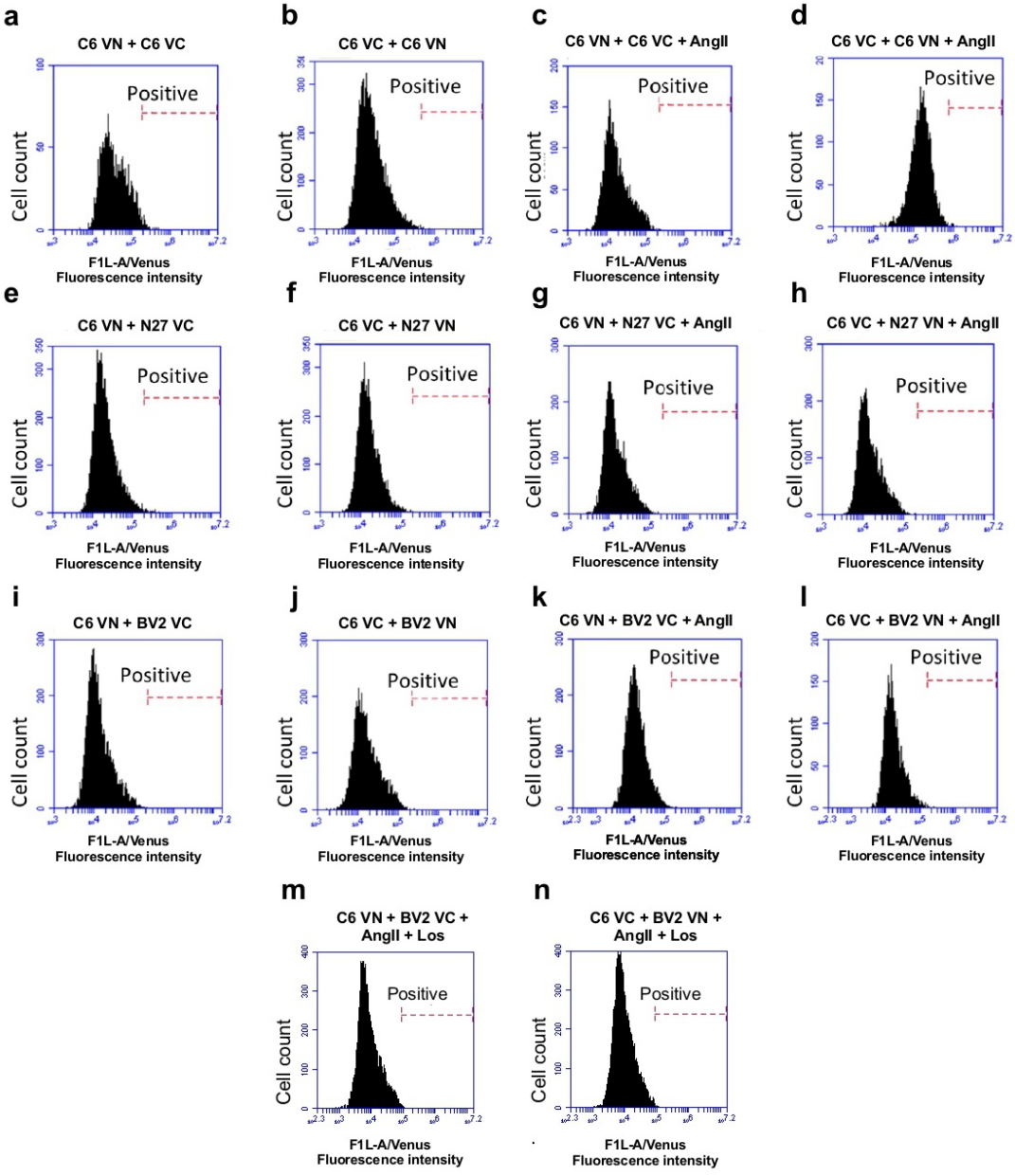


Figura Suplementaria 7. Histogramas representativos de citometría de flujo para las siguientes células: (**a**) Células VN C6 para el cocultivo entre células VN C6 y células C6 VC. (**b**) Células C6 VC para el cocultivo entre células VN C6 y células C6 VC. (**c**) Células VN C6 para el cocultivo entre células VN C6 y células C6 VC después del tratamiento con AngII. (**d**) Células C6 VC para el cocultivo entre células VN C6 y células C6 VC después del tratamiento con AngII. (**e**) Células VN C6 para el cocultivo entre células VN C6 y células N27 VC. (**f**) Células C6 VC para el cocultivo entre células VN N27 y células C6 VC. (**g**) Células VN C6 para el cocultivo entre células VN C6 y células N27 VC después del tratamiento con AngII. (**h**) Células C6 VC para el cocultivo entre células VN N27 y células C6 VC después del tratamiento con AngII. (**i**) Células VN C6 para el cocultivo entre células VN C6 y células BV2 VC. (**j**) Células C6 VC para el cocultivo entre células VN BV2 y células C6 VC. (**k**) Células VN C6 para el cocultivo entre células VN C6 y células BV2 VC después del tratamiento con AngII. (**l**) Células

C6 VC para el cocultivo entre células VN BV2 y células C6 VC después del tratamiento con AngII. (**m**) Células VN C6 para el cocultivo entre células VN C6 y células BV2 VC después del tratamiento con losartán y AngII. (**n**) Células C6 VC para el cocultivo entre células VN BV2 y células C6 VC después del tratamiento con losartán y AngII. Se analizaron 10000 eventos.

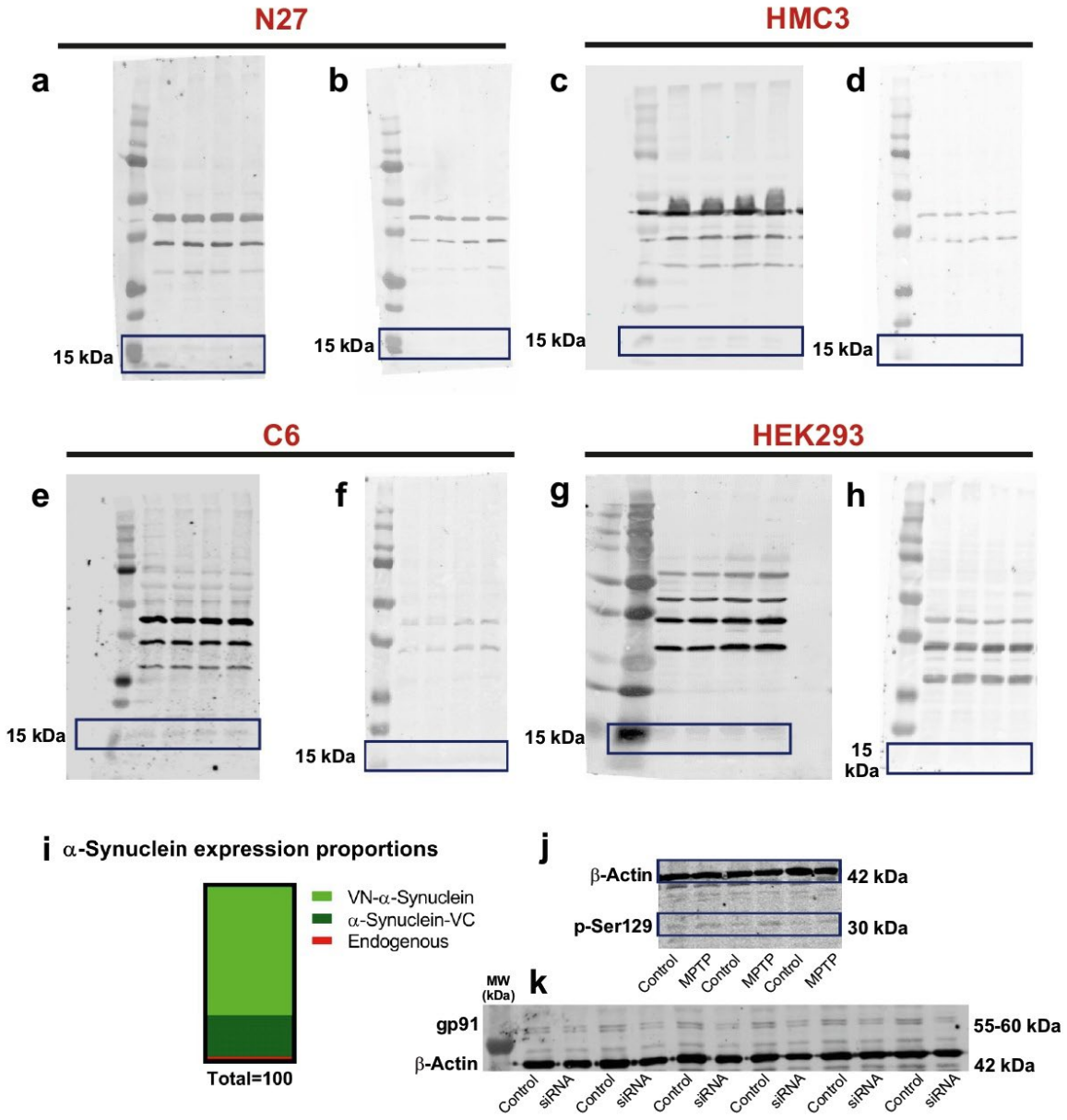
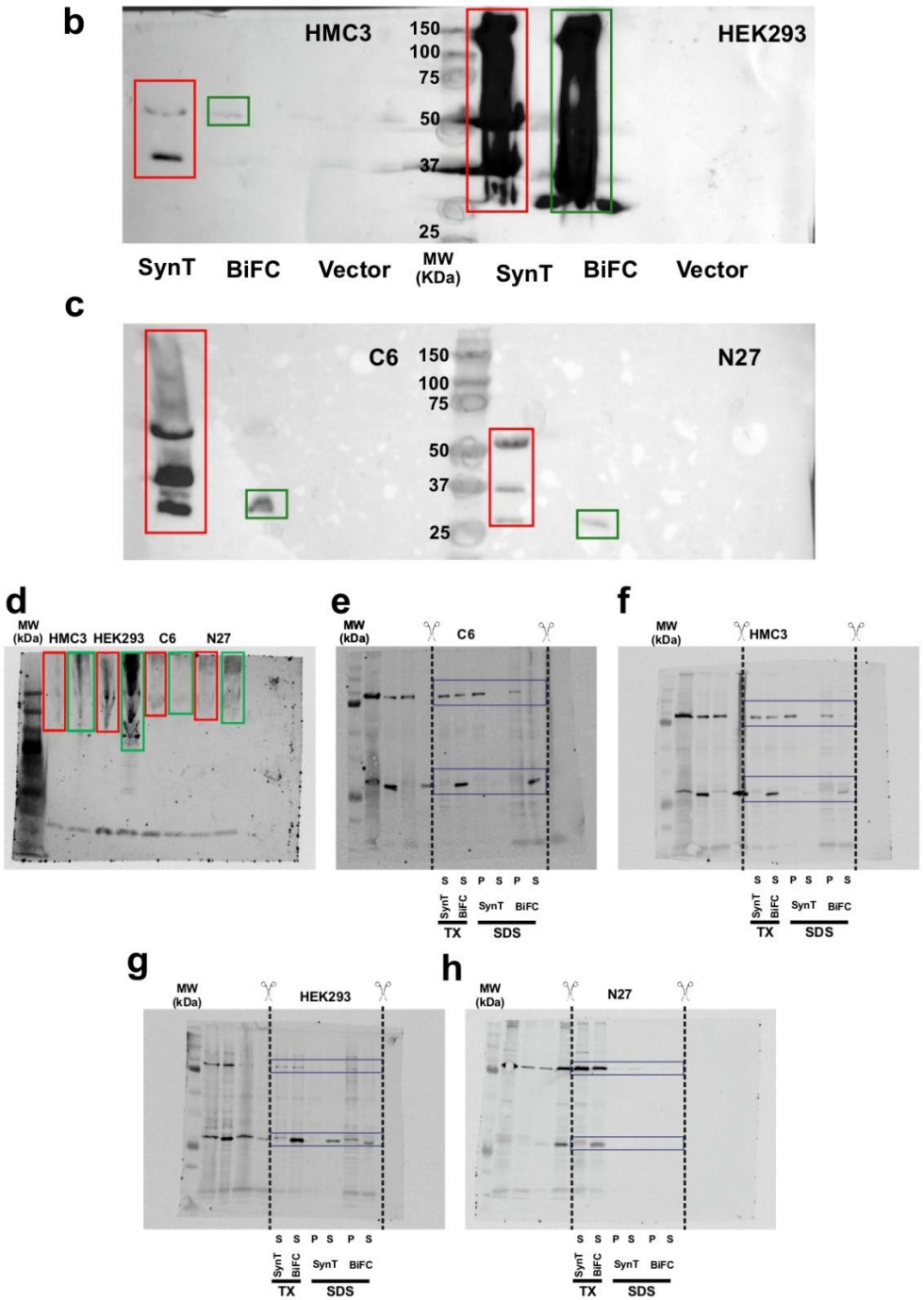
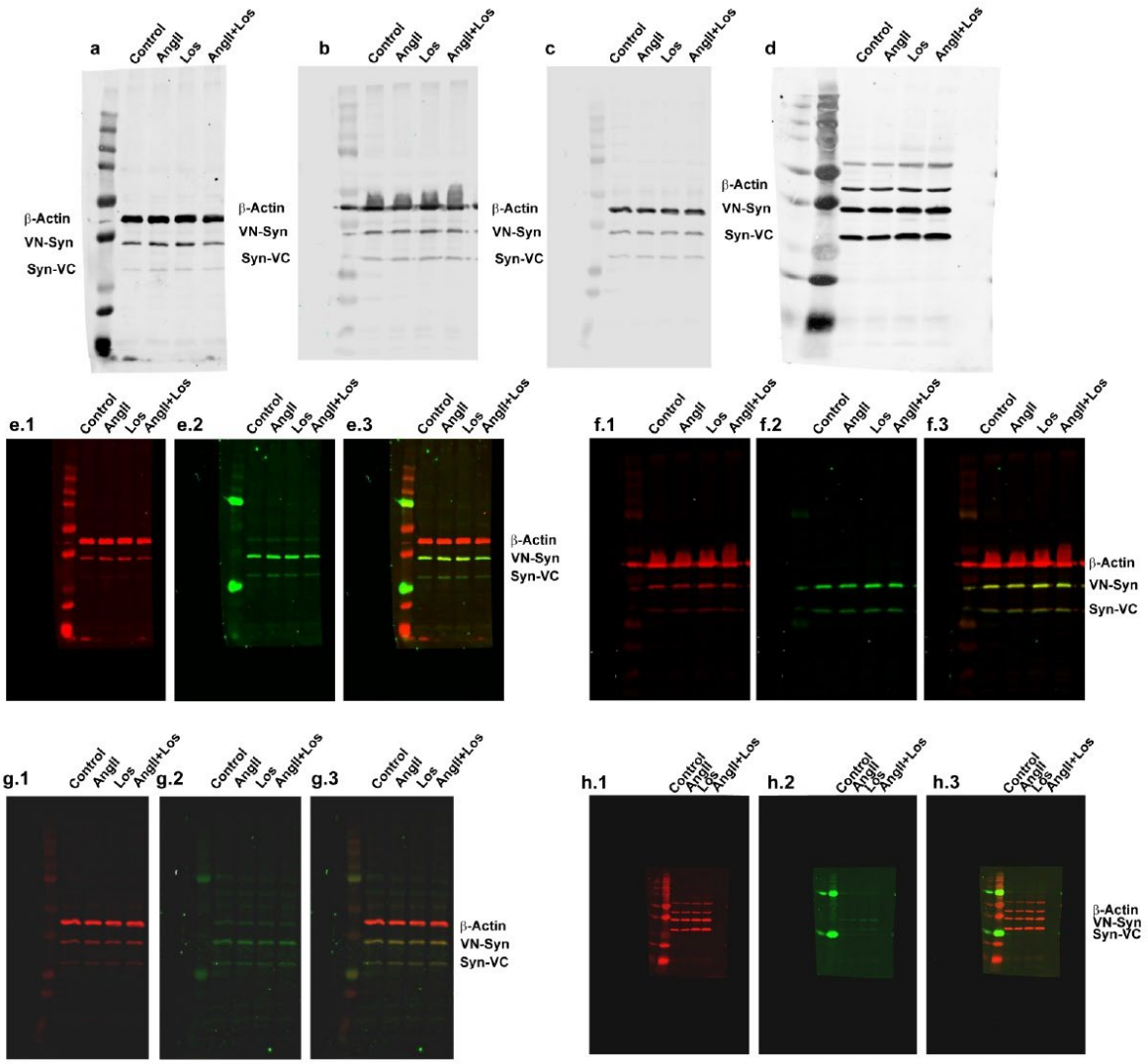


Figura Suplementaria 8. Los niveles endógenos de α-syn son muy bajos o incluso no detectables en la membrana de Western Blot (**a-h**). Membranas completas de Western Blot que muestran la presencia o ausencia de α-syn endógena (rectángulos azules). (**i**) Porcentajes de expresión de VN-α-syn (73.78 ± 7.39), α-syn-VC (23.88 ± 7.65) y α-syn endógena (2.33 ± 1.38). En las membranas donde se puede detectar, los niveles de α-syn endógena son consistentemente inferiores al 4% del total de α-syn. (**j**) Membrana representativa de Western Blot de los datos presentados en la figura 13c. La membrana muestra la diferente expresión de

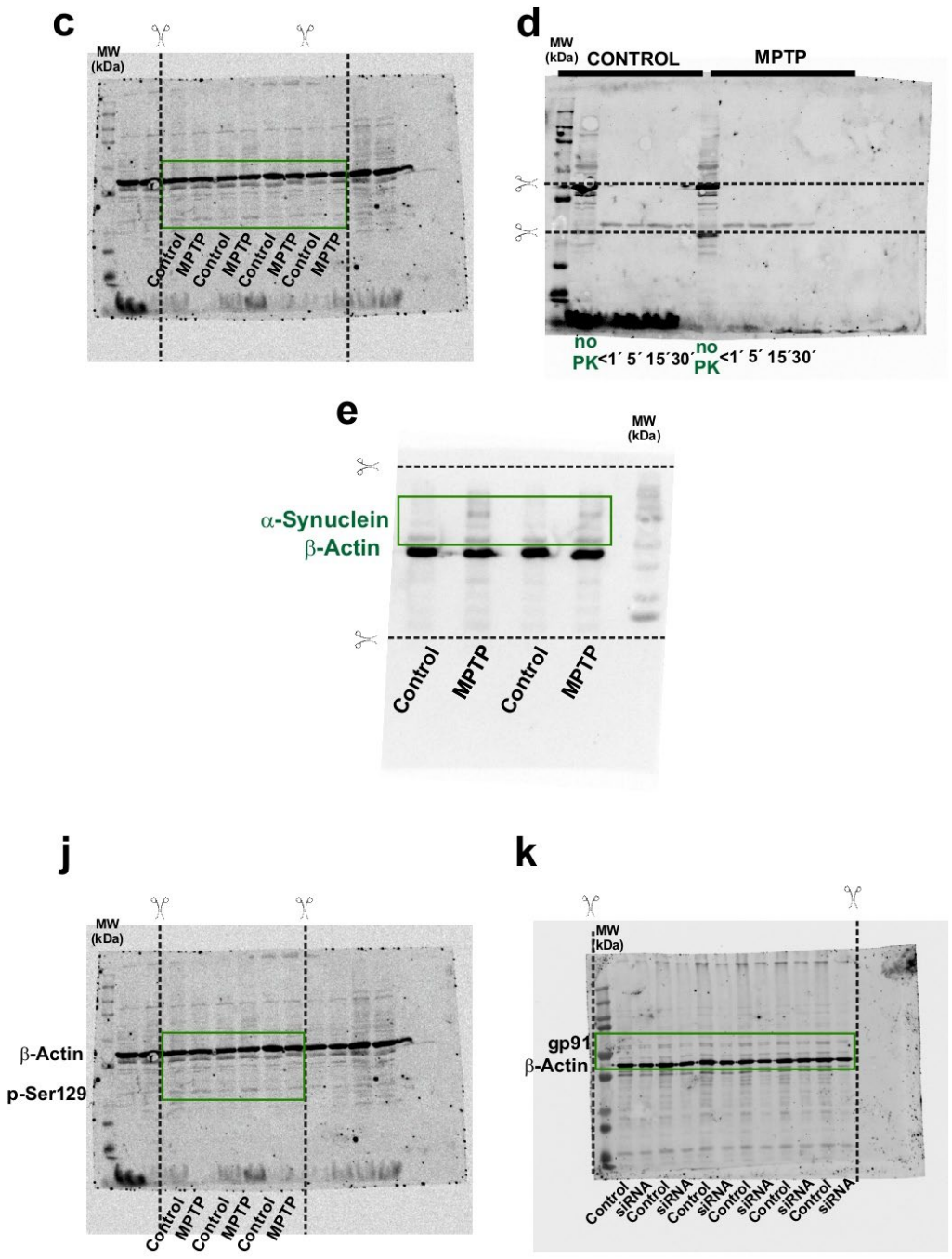
α-syn fosforilada en la serina 129 entre ratones tratados con solución salina y MPTP. (**k**) Membrana de Western Blot que muestra la disminución de la expresión de gp91 debido al tratamiento con siRNA.



Membranas completas de la Figura 9.



Membranas completas de la Figura 11. (**a-d**) Membranas completas de las imágenes recortadas de la Figura 11a-d. (**e-h**) Membranas completas de las imágenes recortadas de la Figuras 11e-h, se muestran ambos canales de fluorescencia y las imágenes combinadas.



Membranas completas de la Figura 13 (c-e) y de la Figura suplementaria 8 (j, k).

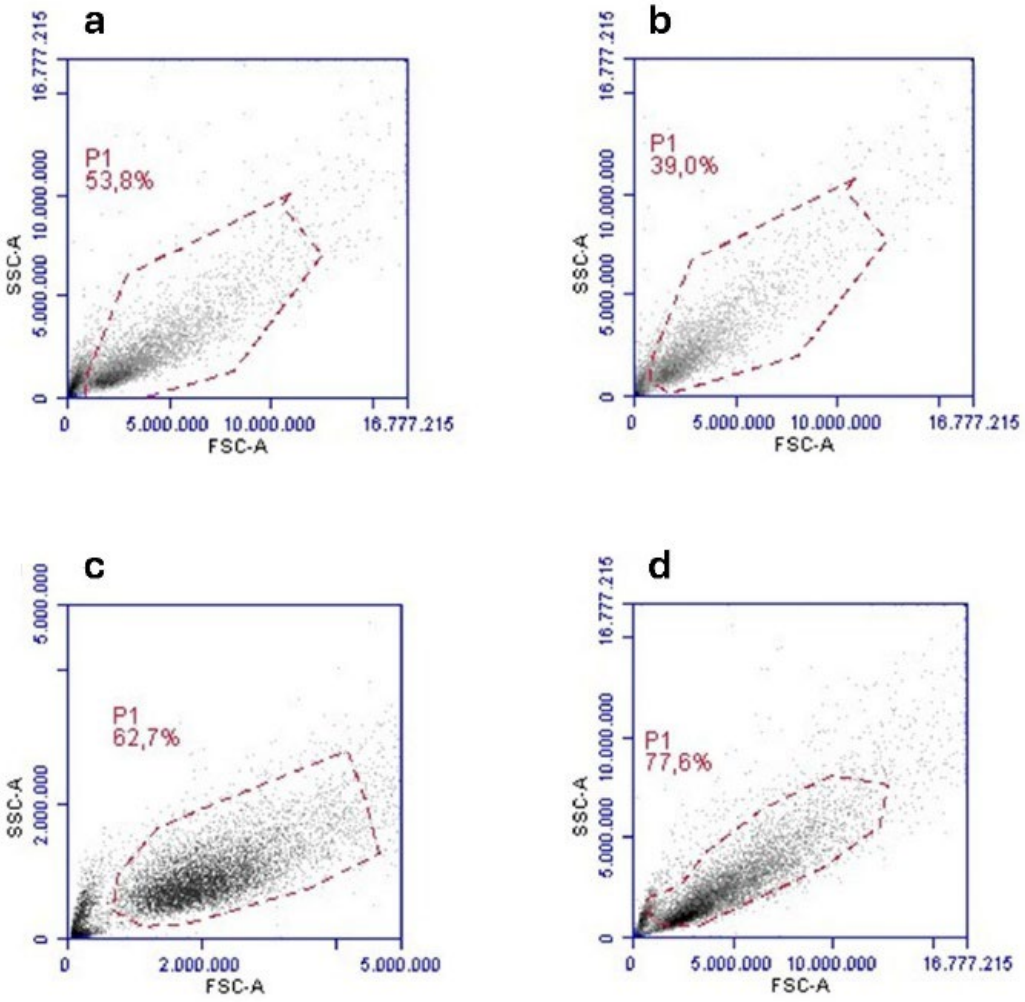


Figura Suplementaria 9. Diagramas de puntos representativos de citometría de flujo que muestran el gating inicial para las siguientes líneas celulares: N27 (**a**), HMC3 (**b**), C6 (**c**) y HEK293 (**d**). Los histogramas de la Figura Suplementaria 10 siguen las estrategias de delimitación mostradas en esta figura para cada línea celular.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

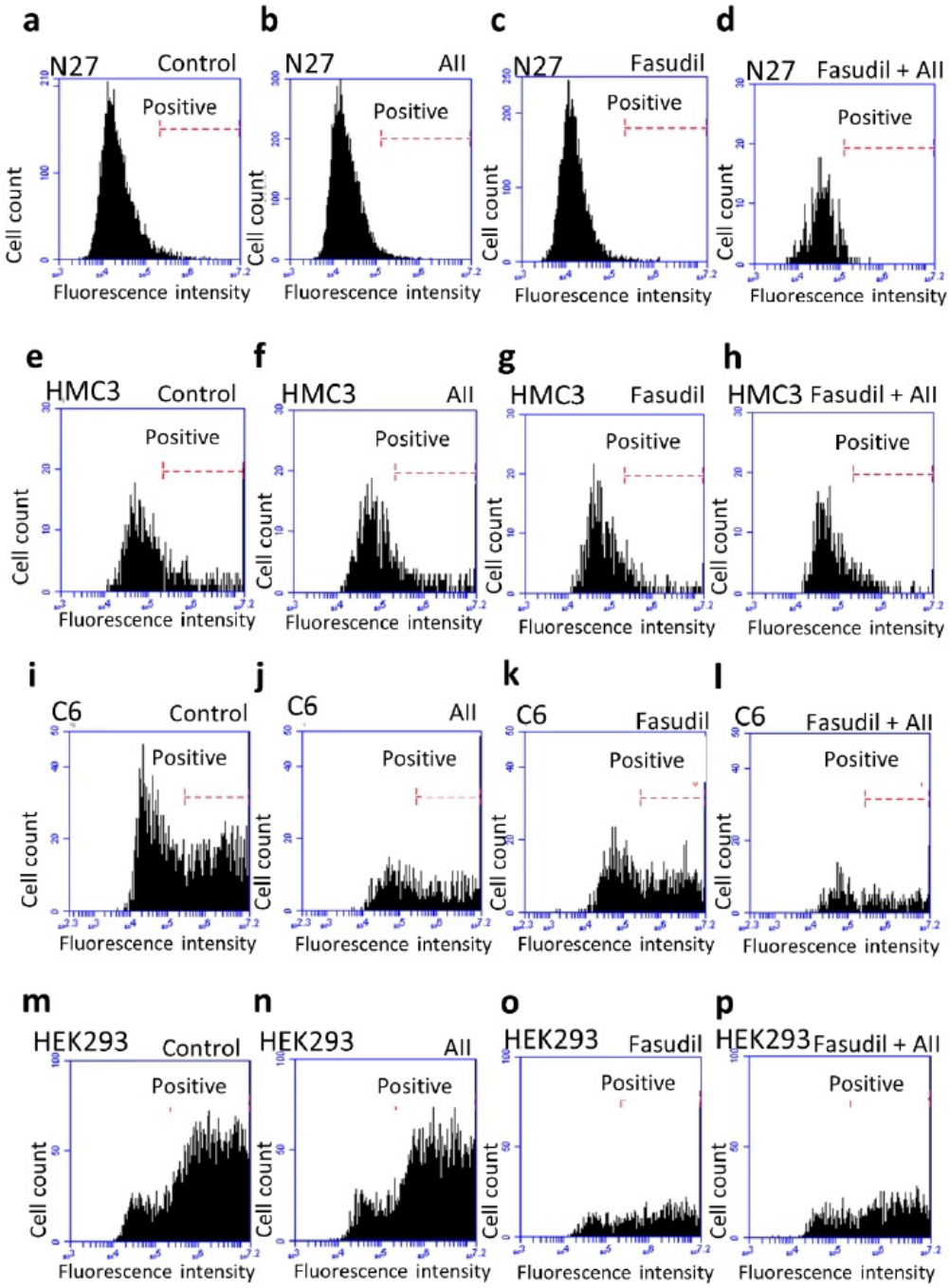


Figura Suplementaria 10. Histogramas representativos de citometría de flujo para células BiFC positivas: células N27 BiFC positivas no tratadas (**a**); células N27 tratadas con AngII (**b**); células N27 tratadas con fasudil (**c**); células N27 tratadas con fasudil y AngII (**d**); células HMC3 BiFC positivas no tratadas (**e**); células HMC3 tratadas con AngII (**f**); células HMC3 tratadas con fasudil (**g**); células HMC3 tratadas con fasudil y AngII (**h**); células C6 BiFC positivas no tratadas (**i**); células C6 tratadas con AngII (**j**); células C6 tratadas con fasudil (**k**); células C6 tratadas con fasudil y AngII (**l**); células HEK293 BiFC positivas no tratadas (**m**); células

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HEK293 tratadas con AngII (**n**); células HEK293 tratadas con fasudil (**o**); células HEK293 tratadas con fasudil y AngII (**p**). En cada análisis, se analizaron 10000 eventos.

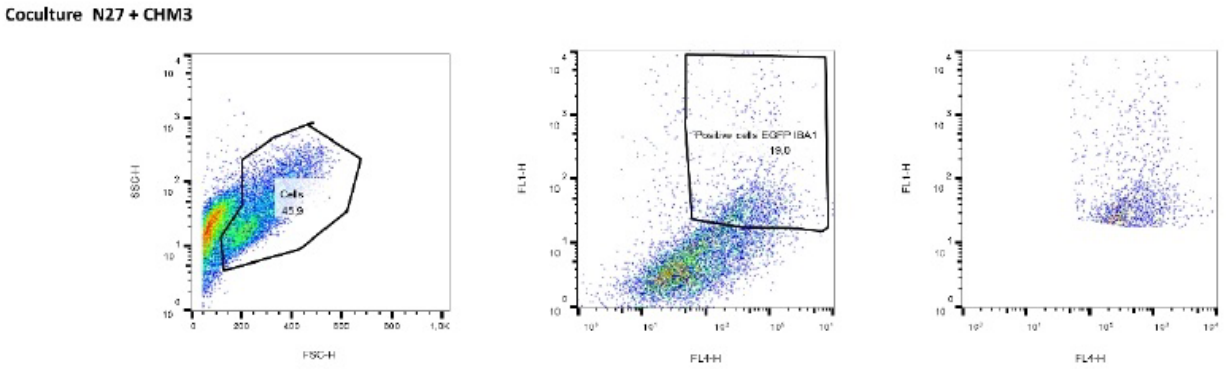


Figura Suplementaria 11. Estrategias de selección seguidas de la doble fluorescencia de células HMC3. En cada análisis, se analizaron 10000 eventos.

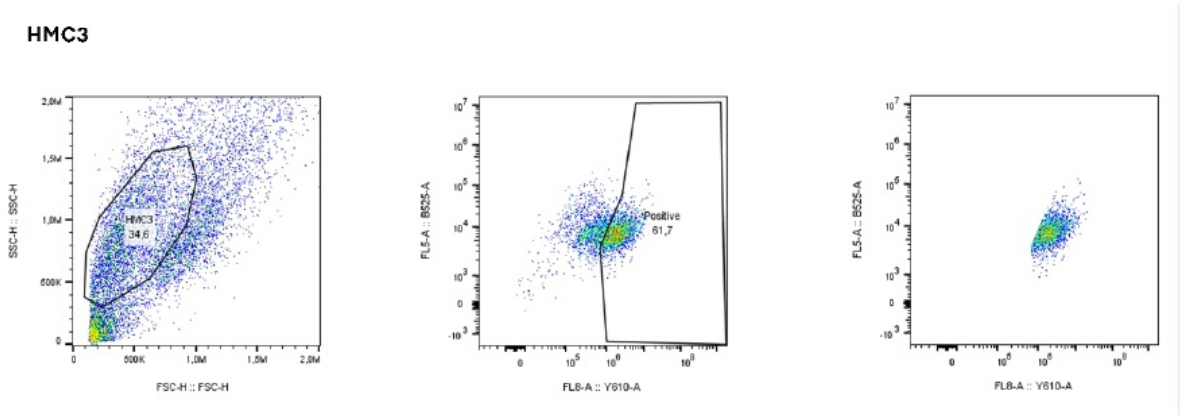


Figura Suplementaria 12. Estrategias de selección seguidas de las mediciones de autofagia con el kit de ensayo de autofagia.

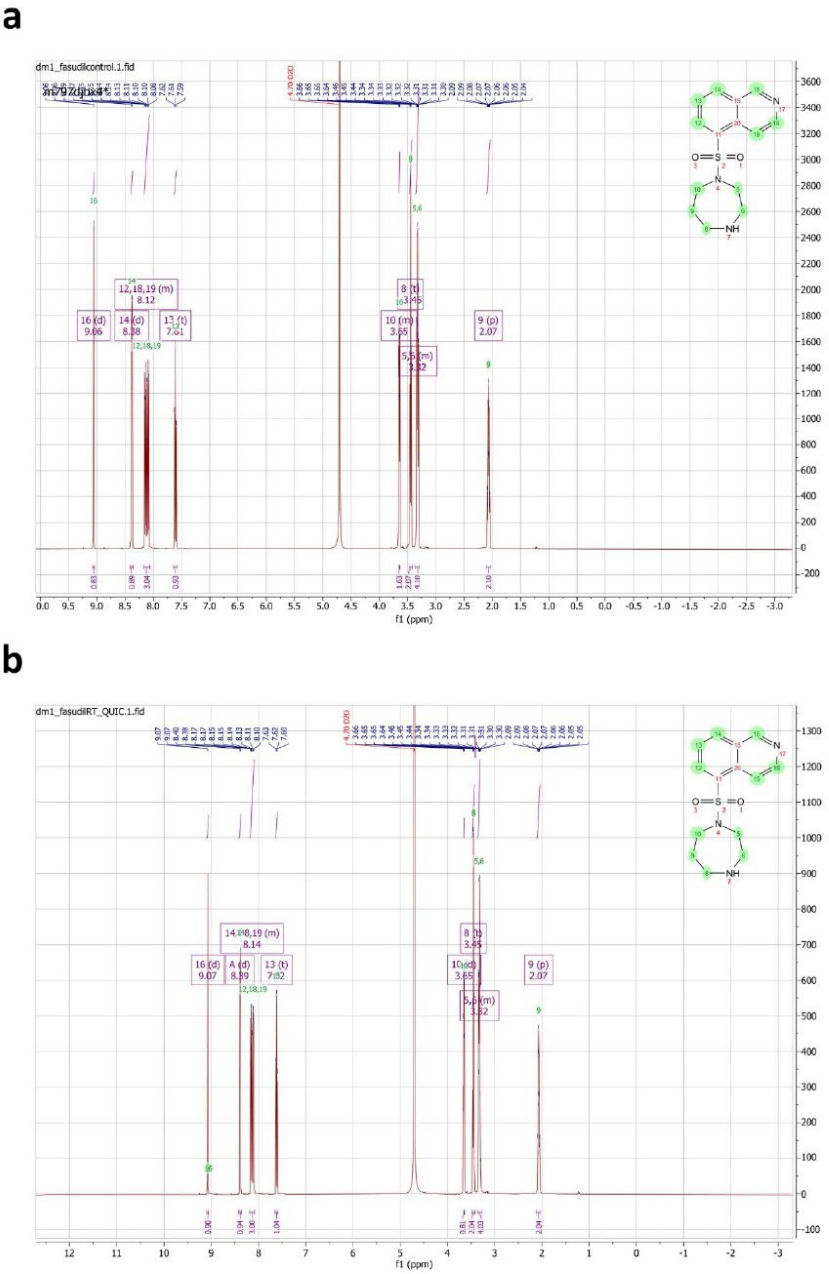


Figura Suplementaria 13. **a**: Perfil de ^{1}H-RMN de fasudil antes de RT-QuIC. **b**: Perfil de ^{1}H-RMN de fasudil después de RT-QuIC.

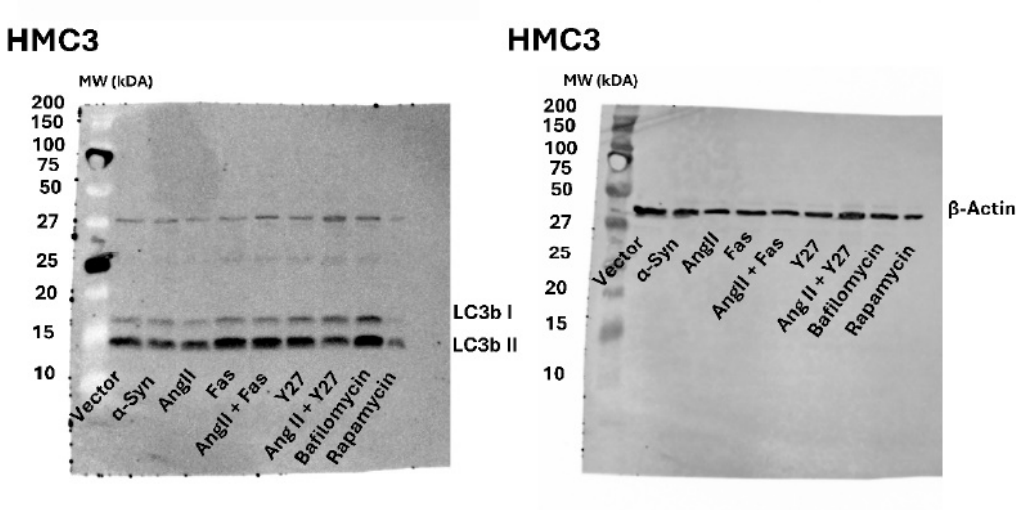


Figura Suplementaria 14. Membranas representativas de WB para la expresión de LC3b. La cuantificación se muestra en la Figura 31a-c.

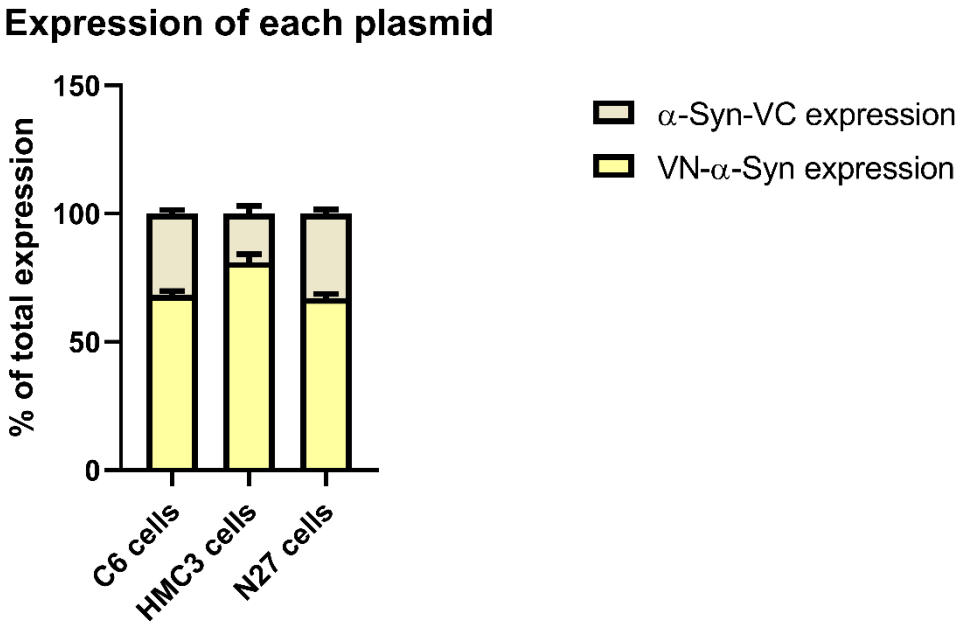


Figura Suplementaria 15. Porcentaje de expresión de VN-α-syn y α-syn-VC.

LEYENDAS PARA ARCHIVOS DE VÍDEO

Vídeo Suplementario 1. Proyección tridimensional de una sección estriatal de ratón control inmunomarcada para α-syn y teñida con ThS. El vídeo muestra niveles muy bajos de α-syn endógena (inmunofluorescencia roja) y proteínas positivas para ThS (fluorescencia verde).

Vídeo Suplementario 2. Proyección tridimensional de una sección estriatal de ratón tratada con MPTP, inmunomarcada para α-syn y teñida con ThS. Esta proyección muestra la presencia de α-syn endógena (inmunofluorescencia roja) y la presencia de proteínas positivas para ThS (fluorescencia verde). La colocalización de los colores rojo y verde (color naranja) revela la presencia de agregados de α-syn, los cuales se pueden observar en las terminales estriatales, presumiblemente terminales dopaminérgicas.

Vídeo Suplementario 3. Proyección tridimensional de una sección de sustancia negra de ratón control inmunomarcada para α-syn y teñida con ThS. La proyección muestra niveles muy bajos de α-syn endógena (inmunofluorescencia roja) y proteínas positivas para ThS (fluorescencia verde).

Vídeo Suplementario 4. Proyección tridimensional de una sección de sustancia negra de ratón tratada con MPTP, inmunomarcada para α-syn y teñida con ThS. Esta proyección muestra la presencia de α-syn endógena (inmunofluorescencia roja) y la presencia de proteínas positivas para ThS (áreas verdes). La colocalización de los colores rojo y verde (color naranja) muestra la presencia de agregados de α-syn en las células.

Vídeo Suplementario 5. Célula astroglial C6 expresando VN-α-syn y capturando α-syn-VC liberada por neuronas dopaminérgicas N27. La presencia de fluorescencia verde indica la interacción entre VN-α-syn y α-syn-VC dentro de una célula C6. Dado que α-syn-VC es expresada solo por las células N27 en este experimento, la célula C6 que emite fluorescencia debe haber capturado α-syn-VC liberada por las células N27. Las células C6 y N27 fueron cocultivadas mediante transwell durante 72 horas. Las células C6 fueron filmadas durante todo el período. Cada segundo del video representa tres horas en tiempo real. Solo las últimas 48 horas se muestran en el video.

Vídeos suplementarios disponibles en “Supplementary information” de:
https://www.nature.com/articles/s41531-024-00650-0#Sec30

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO II

Contenido de la publicación Lage et al., NPJ Parkinson´s disease 2024, reproducido con permiso de Springer Nature, permite la reutilización del artículo por parte de la autora como parte de su tesis. https://www.springernature.com/gp/partners/rights-permissions-third-party-distribution.

Contenido de la publicación Lage et al., Frontiers Immunology 2024, reproducido con permiso de Frontiers, permite la reutilización del artículo por parte de la autora como parte de su tesis. https://www.frontiersin.org/legal/copyright-statement.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN PARA EL USO DE FIGURAS

Figura 2. Permiso concedido de Jones et al., 2014 (Figura 2).

SAGE PUBLICATIONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 28, 2024

This Agreement between Lucía Lage Pita ("You") and Sage Publications ("Sage Publications") consists of your license details and the terms and conditions provided by Sage Publications and Copyright Clearance Center.

License Number	5893611059237
License date	Oct 21, 2024
Licensed Content Publisher	Sage Publications
Licensed Content Publication	Therapeutic Advances in Neurological Disorders
Licensed Content Title	Targeting heat shock proteins to modulate α-synuclein toxicity
Licensed Content Author	Daryl Rhys Jones, Simon Moussaud, Pamela McLean
Licensed Content Date	Jan 1, 2014
Licensed Content Volume	7
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	19
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	I am NOT the author of the requested article
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No, only English
Circulation	5
Title of new work	STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM AND THE DIFUSSION PROCESSESS OF ALPHA-SYNUCLEIN IN PARKINSON´S DISEASE
Institution name	University of Santiago de Compostela
Expected presentation date	Nov 2024
Portions	Figure 2
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Lucía Lage Pita
Requestor Location	University of Santiago de Compostela Avenida de Barcelona, s/n, edificio CIMU santiago de compostela, A coruña 15706 Spain
Publisher Tax ID	GB232600116
Billing Type	Invoice
Billing Address	University of Santiago de Compostela Avenida de Barcelona, s/n, edificio CIMU santiago de compostela, Spain 15706
Total	**0.00 EUR**
Terms and Conditions	

Sage Terms and Conditions for Permissions Administered Through RightsLink

You, the Requestor, are requesting to use the material specified in the permission request (the "Work"). Your agreement to the terms and conditions herein and completion of a permission request constitutes a Permission Request. You are in no way

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

La doctoranda, Lucía Lage Pita, declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la presente tesis doctoral.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

FINANCIACIÓN

- Ministerio de Ciencia e Innovación PID2021-126848NB-I00; PLEC2022-009401; PID2023-150743OB-I00); RD21/0017/0031 (Instituto de Salud Carlos III); Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).

- Gobierno de Galicia (Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia ED431C 2022/41; Ayudas de apoyo a la etapa predoctoral ED481A 2020/118).

- Fondo Europeo de desarrollo Regional (FEDER).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Xefatura Territorial
Sº de Gandaría
Edificio administrativo Monelos, 4º andar
Rúa Vicente Ferrer, Nº 2
15008 A Coruña
Tfno.: 981 184 565
Correo electrónico: servizo.gandaria.a.coruna@xunta.gal

galicia

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15012/2021/012
Persoa solicitante: Anxo Vidal Figueroa
Forma de inicio: solicitude da persoa interesada

Data de inicio do expediente: 16.4.2021
Procedemento: resolución de autorización

ANTECEDENTES

A persoa solicitante presentou con data 16.4.2021 unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal (entrada no Rexistro electrónico da Xunta de Galicia 2021/880369), cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Estudos de novas terapias en modelos de enfermidade de Parkinson e outras enfermidades neurodexenerativas

Nome do centro usuario: Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) da Universidade de Santiago de Compostela
Persoa responsable do proxecto: José Luis Labandeira García

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA)

Clasificación do proxecto : Tipo I ☐ Tipo II [X] Tipo III ☐

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1 O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2 O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

CVE: 7OYXzUVA62
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

Xacobeo 21·22

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Xefatura Territorial
Sº de Gandaría
Edificio administrativo Monelos, 4º andar
Rúa Vicente Ferrer, Nº 2
15008 A Coruña
Tfno.: 981 184 565
Correo electrónico: servizo.gandaria.a.coruna@xunta.gal

galicia

3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto realizada polo órgano habilitado, a Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1 Autorizar o proxecto solicitado.

2 O proxecto non precisa someterse a unha avaliación retrospectiva.

3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos e unha vez transcorrido este tempo, deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle a Anxo Vidal Figueroa esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

Asinado por: SANTOS MANEIRO, JOSE MANUEL
Cargo: Xefe Territorial
Data e hora: 30/04/2021 14:32:23

CVE: 7OTXzUVA62
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

Xacobeo 21·22

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaria Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaria Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881546425. Correo-e: ceic@sergas.es

galicia

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Guillermo José Prada Ramallal, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 18 de enero de 2018 el estudio:

Título: Obtención, purificación y concentración de Autoanticuerpos frente al receptor de Angiotensina tipo 1 a partir de muestras sanguíneas de pacientes con preeclampsia
Promotor*:* Ana Isabel Rodríguez Pérez
Tipo de estudio: Outros
Versión: versión nº2 de 3 de enero de 2018
Código del Promotor: AIRPRV-AAAT1-2018-01
Código de Registro: 2017/618

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humana, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Postautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y la Circular nº 07/2004, de investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos da Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del estudio **por el/la investigador/a del centro**:

Centros	**Investigadores Principales**
CIMUS. Universidade de Santiago de Compostela (USC)	Ana Isabel Rodríguez Pérez

En Santiago de Compostela, a 23 de enero 2018.

El Secretario del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,

guillermo.jose.prada.ramallal@sergas.es
2018.01.24 11:11:26 +02'00'

Guillermo José Prada Ramallal

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaria Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaria Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881546425. Correo-e: ceic@sergas.es

galicia

Guillermo José Prada Ramallal, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

HACE CONSTAR QUE:

1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes (RD 1090/2015 de ensayos clínicos, y la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica).

2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

- **Juan Manuel Vázquez Lago (Presidente).** Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta).** Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Guillermo José Prada Ramallal (Secretario).** Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago. Fundación Ramón Domínguez.
- **Lorenzo Armenteros del Olmo (Vicesecretario).** Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Francisco Campos Pérez.** Biólogo. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
- **Rosana Castelo Domínguez.** Farmacéutica de Atención Primaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Ricardo García Martínez.** Licenciado en Derecho. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Jaime Gulín Dávila**. Farmacéutico especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Victor Herrán Carreira.** Paciente. ADIL-Asociación de Diabéticos Lucense.
- **María Jesús Lamas Díaz.** Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Carlos Rodríguez Moreno.** Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Rafael Carlos Vidal Pérez.** Médico especialista en Cardiología. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **María Jesús Wandosell Picatoste.** Enfermera. Área de Gestión Integrada de Santiago.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor/investigador, en Santiago de Compostela, a 23 de enero de 2018.

El Secretario del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,

XUNTA DE GALICIA SECRETARÍA XERAL TÉCNICA COMITÉS DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN CONSELLERÍA DE SANIDADE

guillermo.jose.prada.ramallal@sergas.es
2018.01.24 11:11:28 +02'00'

Guillermo José Prada Ramallal

En esta tesis se estudia el papel del sistema renina-angiotensina (SRA) en los procesos de agregación y transmisión de α-sinucleína (α-syn) en modelos de la enfermedad de Parkinson (EP). Mediante modelos in vitro e in vivo, se evaluó cómo la activación del receptor AT1 por angiotensina II y autoanticuerpos contra este receptor favorece la acumulación de α-syn, promoviendo el estrés oxidativo y la disfunción del calcio intracelular. También se analizaron los procesos de captación y liberación de α-syn en células cerebrales, que contribuyen a la propagación de la patología. Además, se demostró que inhibir la vía RhoA/ROCK reduce la agregación y facilita su eliminación. Los resultados sugieren que la modulación del SRA y de la vía RhoA/ROCK podrían ser prometedoras estrategias terapéuticas en la EP.