

ANA LUIZA GUIMARÃES REIS

**Análise proteômica no líquido de doentes com a
Esclerose Lateral Amiotrófica que receberam infusão de
células-tronco mesenquimais**

SÃO PAULO

2023

ANA LUIZA GUIMARÃES REIS

**Análise proteômica no líquido de doentes com a
Esclerose Lateral Amiotrófica que receberam infusão de
células-tronco mesenquimais**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para a obtenção do título
de Doutora em Ciências.

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

Co-Orientadora: Dra Jessica Ruivo Maximino

SÃO PAULO

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Reis, Ana Luiza Guimarães
Análise proteômica no líquido de doentes com a
Esclerose Lateral Amiotrófica que receberam infusão
de células-tronco mesenquimais / Ana Luiza
Guimarães Reis. -- São Paulo, 2023.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.
Orientador: Gerson Chadi.
Coorientadora: Jessica Ruivo Maximino.

Descritores: 1.Esclerose lateral amiotrófica
2.Biomarcadores 3.Líquor 4.Células-tronco
mesenquimais 5.Proteômica 6.Matriz extracelular
7.Adesão celular 8.Terapia celular

USP/FM/DBD-432/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: REIS, Ana Luiza Guimarães

Título: Análise proteômica no líquido de doentes com Esclerose Lateral Amiotrófica que receberam infusão de células-tronco mesenquimais.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Francisco e Silvana por todo ensinamento, amor e suporte que eles generosamente me proporcionam. É graças à confiança deles que sou capaz de trilhar o caminho que escolhi.

Ao meu companheiro de vida Thiago, pelo apoio incondicional, por ser meu maior incentivador e minha fonte de inspiração.

À minha filha Helena, que ilumina a minha vida e me motiva a correr atrás de todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Gerson Chadi, meu orientador, pelo seu comprometimento e dedicação ao longo deste período. Sou grata por ter tido a oportunidade de trabalhar com alguém de tamanha competência e experiência, que sempre esteve disposto a compartilhar seu conhecimento e orientação. Sua confiança em mim e no meu trabalho foi fundamental para o meu crescimento profissional e para o alcance dos resultados obtidos.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão à Dra. Jessica Ruivo Maximino, minha co-orientadora, por sua infinita paciência, dedicação e apoio ao longo de toda a minha jornada. Sua competência e disposição em ajudar foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Além disso, sua amizade e conhecimento foram imprescindíveis para a conclusão deste projeto.

À minha querida irmã, Ana Lucilia, e à minha sobrinha, Anna, pelo carinho e apoio. Sou verdadeiramente abençoada por ter uma família tão maravilhosa ao meu lado.

Agradeço ao meu vô Djalma, vó Lelisa e vó Lucília por todo apoio e incentivo. Seu amor, carinho e encorajamento foram fundamentais para que eu pudesse superar os desafios e obstáculos ao longo dessa jornada acadêmica.

Ao Dr. Hélio Rodrigues, Dra. Sônia, Elenir e Silma eu agradeço pela coleta de liquor e por todo o apoio e suporte que forneceram para a conclusão bem-sucedida deste trabalho

À toda a equipe do LIM 45, composta por Gilmar, Florence, Iolanda e especialmente a Dra. Joyce Gilio, sua dedicação, paciência e ensinamentos foram verdadeiramente inspiradores.

Agradeço ao Ministério da Saúde e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Convênio #836458/2016, CNPq #401922/2014-6) pelo financiamento do Projeto. À FAPESP pelos apoios financeiros. Ao CNPq (#381200/2018-3) pela bolsa concedida, fundamental para que eu pudesse realizar este trabalho.

Agradeço à toda equipe do Centro de Tecnologia Celular da PUC do Paraná (CTC-PUCPR), coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman, pela colaboração através do preparo das células-tronco mesenquimais que foram infundidas nos doentes ELA desse estudo.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).´

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento, Suely Campos Cardoso. 3ª Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2016.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1. Esclerose Lateral Amiotrófica..... | 9 |
| 1.2. Patogênese da ELA | 13 |
| 1.3. Células-tronco | 17 |
| 1.4. Análise Proteômica do Líquor | 19 |
| 2. OBJETIVOS | 21 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 3.1. Sujeitos Incluídos no Estudo..... | 22 |
| 3.2. Obtenção de Amostras Biológicas | 22 |
| 3.3. Quantificação de Proteínas do Líquor por Espectrometria de Massas..... | 24 |
| 3.4. Análises Enriquecidas e Redes de Interação das Proteínas Desreguladas | 25 |
| 3.5. Análise da Regulação de Proteínas pelo Luminex | 26 |
| 4. RESULTADOS | 28 |
| 4.1. Proteínas Desreguladas no Líquor Identificadas pela Proteômica..... | 28 |
| 4.2. Modelagem dos Mecanismos Moleculares Possivelmente Modificados pelas CTM ... | 32 |
| 4.2.1. Identificação de Alvos Moleculares a Partir de Redes de Interação Proteína- proteína..... | 35 |
| 4.3. Modelagem Global para Apontamentos Adicionais de Moléculas e Mecanismos Envolvidos no Tratamento com as CTM | 38 |
| 4.4. Mecanismos Moleculares Evidenciados pela Análise Global da Modelagem..... | 42 |
| 4.5. Modelagem com Foco em Componentes Celulares e Funções Moleculares Possivelmente Modificados pelas CTM..... | 48 |
| 4.6. Moléculas em Realce a Partir da Análise Conjunta da Criteriorização Estabelecida ... | 54 |
| 4.7. Análise da Regulação de Proteínas pelo LUMINEX® | 55 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 58 |
| 5.1. O potencial das CTM na ELA e após injeção intratecal | 58 |
| 5.2. Moléculas e mecanismos destacados após infusão intratecal de CTM na ELA | 59 |
| 5.3. Biomarcadores moleculares dos efeitos das CTM no líquido de doentes com ELA..... | 65 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 68 |
| 7. REFERÊNCIAS | 69 |

RESUMO

Reis, ALG. Análise proteômica no líquido de doentes com a Esclerose Lateral Amiotrófica que receberam infusão de células-tronco mesenquimais. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é a doença degenerativa do neurônio motor, de progressão rápida, que acomete adultos, levando à fraqueza muscular e ao óbito entre 2 e 5 anos após seu diagnóstico. Sem tratamento específico, as células-tronco mesenquimais (CTM) são investigadas por sua capacidade de produzir moléculas com ações neurotróficas, imunomoduladoras e de reparo/cicatrização, com impacto direto no microambiente da lesão, podendo, assim, potencialmente modificar o curso da doença. Este estudo avaliou por proteômica e modelagem molecular líquido de 24 doentes com ELA, os processos celulares e moleculares 30 dias após infusão intratecal (líquor, região lombar) de 10^6 CTM autólogas derivadas da medula óssea /quilograma de peso corporal, comparado com o líquido antes da infusão. As plataformas de bioinformáticas do DAVID e seus bancos de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* e o *Gene Ontology Consortium Annotation*, bem como as Redes de Interação de Proteínas foram empregadas. Duzentas e vinte moléculas desreguladas (86 aumentadas e 134 diminuídas) foram identificadas no líquido dos doentes com ELA incluídos neste estudo. Mecanismos relacionados à adesão celular e matriz extracelular, assim como as moléculas A2M, ALCAM, APOA1, APOB, APOE APP, CHI3L1, CXCL12, MMP2, NCAM1 e SPARC ressaltaram a partir das análises no líquido dos sujeitos. A regulação das proteínas foi adicionalmente verificada pela técnica do Luminex e o emprego delas como biomarcadores da presença das CTM no líquido, dos eventos neurodegenerativos/protetivos na ELA, ou da interação de ambos foram discutidos.

Palavras-chave: Esclerose Lateral Amiotrófica. Biomarcadores. Líquor. Células-tronco mesenquimais. Proteômica. Matriz extracelular. Adesão celular. Terapia celular.

ABSTRACT

Reis, ALG. Cerebrospinal fluid proteomic analysis of patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis who received mesenchymal stem cells infusion. [thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2023.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a rapidly progressing degenerative motor neuron disease that affects adults, leading to muscle weakness and death between 2 and 5 years after diagnosis. Without specific treatment, mesenchymal stem cells (MSC) are investigated for their ability to produce molecules with neurotrophic, immunomodulatory and repair/healing actions, with a direct impact on the microenvironment of the lesion, thus being potentially able to modify the course of the disease. This study evaluated, using proteomics and molecular modeling, the cerebrospinal fluid of 24 patients with ALS, the cellular and molecular processes 30 days after intrathecal infusion (lumbar region) of 10^6 autologous MSC derived from bone marrow/kilogram of body weight, compared to cerebrospinal fluid before cells. DAVID's bioinformatics platforms and its databases Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes and Gene Ontology Consortium Annotation, as well as Protein Interaction Networks were employed applied. Two hundred and twenty dysregulated molecules (86 increased and 134 decreased) were identified in cerebrospinal fluid of ALS subjects included in this study. Mechanisms related to cell adhesion and extracellular matrix, as well as ~~and~~ the molecules A2M, ALCAM, APOA1, APOB, APOE APP, CHI3L1, CXCL12, MMP2, NCAM1 and SPARC were highlighted in the cerebrospinal fluid of ALS subjects. ~~The~~ Regulation of proteins was additionally verified using Luminex technique and their use as biomarkers for the presence of MSC in cerebrospinal fluid, neurodegenerative/protective events in ALS, or the interaction of both were discussed.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis. Biomarkers. Cerebrospinal fluid. Mesenchymal stem cells. Proteomics. Extracellular matrix. Cell adhesion. Cell therapy.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esclerose Lateral Amiotrófica

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença fatal caracterizada pela degeneração dos neurônios motores, também chamados de motoneurônios, superiores no córtex cerebral e daqueles inferiores no tronco encefálico e medula espinhal (Rowland 2001).

O início da doença ocorre, em geral, no final da meia-idade e apresenta-se como atrofia muscular e fraqueza progressivas (Hardiman et al. 2017). Os efeitos nos músculos respiratórios limitam a sobrevida em 2-4 anos após o início da doença (Chio et al. 2009). A ELA é, de fato, a doença do motoneurônio de adultos mais prevalente, na Europa estima-se que a incidência da ELA seja de 1,75-3 por 100.000 habitantes/ano, e a prevalência corresponde a 10-12 indivíduos por 100.000 habitantes, contudo há discrepâncias geográficas significativas nessas estimativas (Masrori and Van Damme 2020). Existem poucas publicações sobre dados epidemiológicos no Brasil, um estudo retrospectivo realizou o levantamento da taxa de mortalidade de sujeitos com ELA, no qual foram analisadas 8.942 certidões de óbito, a incidência estimada foi 1,77 a 2,3 casos novos por 100.000 habitantes/ano (Moura, Casulari, and Carvalho Garbi Novaes 2016).

Evidências de pesquisas clínicas e laboratoriais sugerem múltiplas causas da ELA com componentes genéticos importantes, mas variados (Al-Chalabi and Hardiman 2013). Cerca de 5-10% dos indivíduos afetados têm pelo menos outro membro da família com sintomas da doença, sendo definidos como portadores de ELA familiar. A maioria dos casos herdados são do tipo autossômico dominante (Alsultan et al. 2016). Os 90-95% restantes dos casos de ELA ocorrem em pessoas sem história familiar, e esses indivíduos são definidos como portadores de ELA esporádica (Chen et al. 2013). Embora mais de 50 genes potencialmente causadores ou modificadores da doença tenham sido identificados, as expansões no gene *C9ORF72* (do inglês *chromosome 9 open reading frame 72*) e variantes patogênicas nos genes *SOD1* (superóxido dismutase 1, primeiro gene associado a doença), *TDP-43* e *FUS* (*TAR DNA-binding protein 43* e *Fused in sarcoma*, respectivamente) ocorrem com mais frequência (Boylan 2015; Taylor, Brown, and Cleveland 2016).

A ELA caracteriza-se pela alta heterogeneidade clínica, relativas muitas vezes, pelo envolvimento de diferentes conjuntos de motoneurônios em partes específicas do corpo e em diversos membros durante a progressão da doença (Taylor, Brown, and Cleveland 2016). Deste modo, a ELA é usualmente dividida conforme o local de início da doença. Cerca de

25% dos casos começam a manifestar-se no segmento cefálico, comprometendo a fala, a deglutição e a respiração, sendo esses denominados ELA bulbar (Chiò et al. 2013). Os outros 75% referem-se aos sujeitos que desenvolvem os sintomas de fraqueza, tanto distal quanto proximal, nos membros inferiores e/ou superiores, indicando que a doença começou a se manifestar na musculatura inervada pelos motoneurônios espinhais, sendo essas formas denominadas ELA espinhal (Worms 2001).

A perda da atividade dos motoneurônios corticais, bem como aqueles bulbares e espinhais, leva aos sinais clínicos de hiper-reflexia, sinal de Babinski e espasticidade, fraqueza muscular progressiva, hiporreflexia, câimbras e fasciculações em apresentações e grau extremamente variáveis entre os sujeitos ou momentos da evolução da doença. As funções cognitivas mostram-se preservadas, à exceção dos casos em que a ELA está associada à demência frontotemporal, com distúrbios comportamentais severos. Independentemente das formas de apresentação e evolução da doença, a causa mais frequente de morte dos doentes se dá pela perda da inervação dos músculos respiratórios e complicações respiratórias associadas (Cleveland and Rothstein 2001).

O diagnóstico da ELA é clínico com suporte laboratorial. Exames laboratoriais como a eletroneuromiografia e análises laboratoriais, complementados por estudos de neuroimagem quando necessário, servem para exclusão de outras patologias que se confundem com a ELA em momentos iniciais da doença (Brooks et al. 2000). Deste modo, o diagnóstico da ELA requer experiência do neurologista para tal, de modo que os doentes ficam por mais de 12-16 meses até que recebam o diagnóstico definitivo (Hardiman, van den Berg, and Kiernan 2011). Os critérios diagnósticos de *El Escorial* para a ELA, revisado em 2006 (ALSFRS-R), são amplamente aplicados, e pode ser definido pelas seguintes categorias: *ELA clinicamente definida*, determinada pela presença de evidências clínicas ou eletrofisiológicas dos motoneurônios inferiores, assim como, o envolvimento nos motoneurônios superiores na região bulbar e pelo menos em duas regiões espinhais, ou o aparecimento de sinais em três regiões espinhas nos motoneurônios inferiores e superiores; *ELA clinicamente provável*, definida pelo aparecimento de evidências clínicas e eletrofisiológicas presentes nos motoneurônios inferiores e superiores em pelo menos duas regiões com alguns sinais nos motoneurônios superiores necessariamente rostrais (acima) e aos sinais dos motoneurônios inferiores; *ELA clinicamente possível*, caracterizada pela presença de sinais clínicos ou eletrofisiológicos dos motoneurônios superiores e disfunção dos motoneurônios inferiores são encontrados em apenas uma região ou sinais motoneurônios inferiores são encontrados sozinhos em duas ou mais regiões, ou, ainda sinais de comprometimento dos motoneurônios

inferiores encontrados rostrais aos sinais dos motoneurônios superiores. Visando melhorar a acurácia, foram incluídas variáveis eletrofisiológicas presentes no consenso *Awaji-Shima*, o que aumentou a sensibilidade do algoritmo para diagnóstico da ELA (de Carvalho et al. 2008; Kalra and Arnold 2003; Rowland 2001).

Além disso, estima-se que cerca de 20% de todos os casos de ELA estão associados a diferentes funções moleculares e fenótipos de doenças (Connolly et al. 2020), de modo que a tarefa de compreender as relações entre as vias moleculares comprometida é complexa.

Para investigar as diferentes vias moleculares envolvidas na ELA, vários modelos *in vivo*, incluindo drosófilas (Chen et al. 2011; Estes et al. 2011; Watson et al. 2008; Xu et al. 2013), peixe-zebra (Armstrong and Drapeau 2013; Ciura et al. 2013; Sakowski et al. 2012; Schmid et al. 2013) e roedores (Gurney et al. 1994), bem como modelos de células *in vitro*, como linhagem de células linfoblásticas de doentes (Pansarasa et al. 2018) e híbridas (Boston-Howes et al. 2008; Moreno-Martet et al. 2012) ou linhagens primárias de murinos (Van Damme, Robberecht, and Van Den Bosch 2017) foram desenvolvidos. A maioria desses modelos pesquisam os efeitos patológicos de mutações em genes da ELA, incluindo os genes *FUS*, *SOD1*, *TDP-43* e *C9ORF72* (Chia, Chio, and Traynor 2018; Volk et al. 2018).

De fato, estudos descrevem diversos mecanismos celulares e moleculares propostos bem como alvos terapêuticos novos para explicar a morte do motoneurônios. Os mecanismos frequentemente implicados incluem: espécies reativas de oxigênio (ROS) - estresse oxidativo associado (Boillee, Vande Velde, and Cleveland 2006; Chang et al. 2008; Gupta et al. 2017; Mitsumoto et al. 2008), disfunção mitocondrial (Boillee, Vande Velde, and Cleveland 2006), desregulação do tráfego axonal e vesicular (De Vos et al. 2007; Kiaei et al. 2007), excitotoxicidade mediada por glutamato (Foerster et al. 2013; Kumar et al. 2010; Laslo et al. 2001; Spreux-Varoquaux et al. 2002), deficiências proteostáticas (Cykowski et al. 2019; Leigh et al. 1991; Sreedharan et al. 2008; Taylor, Brown, and Cleveland 2016; Webster et al. 2016) e alteração do metabolismo e/ou processamento do RNA (Butti and Patten 2018; Haeusler, Donnelly, and Rothstein 2016; Lagier-Tourenne et al. 2012; Polymenidou et al. 2011). A alteração de um ou mais desses processos celulares pode estar presente, não apenas nos próprios motoneurônios, mas também em populações de células vizinhas, como células gliais, células inflamatórias periféricas e músculos, fazendo com que a ELA seja cada vez mais considerada uma doença multissistêmica que culmina na morte do motoneurônios (Boillee, Vande Velde, and Cleveland 2006; Vijayakumar et al. 2019).

Interessante que os astrócitos e a micróglia são implicados na liberação de mediadores pró-inflamatórios que levam toxicidade do neurônio motor (Rizzo et al. 2014).

Além disso, a superexpressão seletiva de *SOD1* mutante no músculo esquelético promoveu alterações mitocondriais, induziu a ativação microglial no sistema nervoso central e resultou em atrofia muscular grave em camundongos (Dobrowolny et al. 2008). Assim, diversos processos celulares parecem estar envolvidos na morte do neurônio motor e possivelmente determinam a progressão da doença.

A natureza complexa da doença e a grande heterogeneidade genética e fenotípica entre os doentes restringem a tradução dos resultados obtidos nos modelos animais geneticamente semelhantes nos ensaios clínicos em humanos. Atualmente, o padrão de atendimento para doentes com ELA envolve o gerenciamento multidisciplinar de sintomas, incluindo suporte nutricional e respiratório. Ainda, os tratamentos propostos nos ensaios clínicos envolvem predominantemente drogas anti-inflamatórias, antioxidantes, anti-glutamatérgicos e moléculas com ações neuroprotetoras específicas. A medida de desfecho primário mais utilizada para avaliar a eficácia dos tratamentos na ELA é a escala ALSFRS-R. As pontuações na escala são obtidas por um formulário de 12 perguntas que avalia a função motora grossa, motora fina, bulbar e respiratória dos doentes (Cedarbaum et al. 1999).

Deve ser ressaltado então as maiores dificuldades no avanço da solução na ELA, estas que incluem a sua fisiopatologia não é completamente compreendida, o desenvolvimento de terapias eficazes que prolonguem a vida ou melhorem a qualidade de vida dos doentes caminha a passos lentos, e a disponibilidade de apenas dois medicamentos atualmente aprovados no uso terapêutico dos doentes com ELA (Chio et al. 2020; Jaiswal 2019).

A droga a mais tempo prescrita para a ELA é o Riluzol, aprovado pela primeira vez em 1995, que postula-se ser capaz de prolongar a sobrevivência por 2-3 meses em alguns doentes, exercendo efeito benéfico apenas nos primeiros seis meses de terapia (Bensimon, Lacomblez, and Meininger 1994; Cetin et al. 2015). Quando lançado, o Riluzol foi dito capaz de atuar na modulação da transmissão glutamatérgica (Bensimon, Lacomblez, and Meininger 1994). Pesquisas sobre o mecanismo de ação do Riluzol mostram consistentemente que seus efeitos nos receptores de glutamato são unilimitados e que os mecanismos de ação são provavelmente mais variados e complexos (Bellingham 2011). Isso pode ajudar a explicar porque outros compostos anti-glutamatérgicos, como Ceftriaxona, Memantina e Talampanel, não mostraram eficácia em ensaios clínicos de ELA (Cudkowicz et al. 2014; de Carvalho et al. 2010; Pascuzzi et al. 2010). Durante esses anos, desde que o Riluzol foi lançado, mais de 60 outras moléculas foram investigadas como potenciais tratamentos para doença (Petrov et

al. 2017), cujos efeitos, porém atingiram o status de uso clínico.

O Edaravone, mais recentemente, foi aprovado em 2017 para uso em doentes com ELA no Japão, Coreia do Sul e Estados Unidos. O Edaravone é composto antioxidante proposto para reduzir o estresse oxidativo, embora seu mecanismo exato ainda seja desconhecido (Sawada 2017b). A droga foi inicialmente aprovada para uso no Japão para o tratamento de acidente vascular cerebral isquêmico agudo (Takei et al. 2017; Watanabe et al. 2018). A eficácia do Edaravone para o tratamento da ELA foi testada em dois ensaios clínicos de fase III e determinada pela alteração nas pontuações ALSFRS-R em comparação com a linha de base (Writing and Edaravone 2017). O primeiro ensaio duplo-cego e controlado com placebo não relatou diferenças significativas entre os grupos tratado e placebo (Abe et al. 2014). Após análise *post hoc* dos resultados, foi realizado um estudo de acompanhamento em uma população de doentes definida de maneira mais restrita. Este ensaio relatou diferença modesta, mas estatisticamente significativa, nos escores da ALSFRS-R, com doentes tratados com Edaravone apresentando perda funcional reduzida em comparação com doentes que receberam placebo após 6 meses de tratamento (Sawada 2017a).

1.2. Patogênese da ELA

A partir da sua descrição inicial em 1869 pelo neurologista francês Jean-Martin Charcot, o termo Esclerose Lateral Amiotrófica foi cunhado para o nome da doença, sendo que “amiotrófico” compete à atrofia muscular e “esclerose lateral” refere-se à cicatrização ou endurecimento dos tecidos na porção lateral da medula espinhal. Desde então, os conhecimentos adquiridos sobre a ELA conseguiram mudar pouco a história natural da doença (Ghatak et al. 1986; Hughes 1982). A característica patológica da ELA é a presença de inclusões proteicas citoplasmáticas neuronais (Taylor, Brown, and Cleveland 2016). Em 97% dos casos, os achados são de agregados da proteína TDP-43. Ainda, acúmulos das proteínas FUS e SOD1 são observados em doentes que possuem mutações nos genes *FUS* e *SOD1*, respectivamente (Casteron, Hunt, and Fanto 2020; Chio et al. 2020).

Postula-se que a degeneração dos motoneurônios envolve condições multifatoriais com interação de fatores ambientais, genéticos e epigenéticos que parecem interferir no desenvolvimento da ELA através de alterações complexas de vias moleculares (van den Bos, Geevasinga, and Higashihara 2019). Dentre os mecanismos fisiopatológicos descritos, mutações no gene *SOD1* aumentam o estresse oxidativo, pela geração de radicais livres, bem como, induzem instabilidade conformacional e falha no dobramento do peptídeo *SOD1*, o que acarreta acúmulo de inclusões citoplasmáticas ubiquitinadas, que agem inibindo a função

proteossômica normal e prejuízo do transporte axonal (Kiernan et al. 2011; Taylor, Brown, and Cleveland 2016). Além disso, o metabolismo aberrante de RNA na ELA pode estar relacionado com a localização errada de algumas proteínas essenciais de ligação do RNA, comprometendo o seu processamento, transporte e utilização (representado na Figura 1 K,J) (Hardiman et al. 2017; Taylor, Brown, and Cleveland 2016; Van Damme, Robberecht, and Van Den Bosch 2017).

Outro mecanismo descrito é a excitotoxicidade do glutamato, que envolve a redução da expressão significativa do transportador de aminoácido excitatório astrocístico 2 (EAAT2). O excesso de glutamato na fenda sináptica, causado pela falha dos astrócitos em recaptar esse neurotransmissor, desencadeia disparos repetitivos de potenciais de ação, bem como, aumento proporcional no influxo de Ca^{2+} , prejudicando a capacidade de armazenamento de cálcio nas organelas, e conseqüentemente interrompendo o seu funcionamento normal (representado na Figura 1 A,B) (Taylor, Brown, and Cleveland 2016; van den Bos, Geevasinga, and Higashihara 2019).

A mitocôndria desempenha papel importante na maquinaria celular, responsável pela produção energética, tamponamento de cálcio intracelular, respiração celular, além de estar intimamente ligada à regulação da apoptose e à produção de alto nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Bonafede and Mariotti 2017; Turner et al. 2013b). Em razão disso, a disfunção da mitocôndria parece estar envolvida nos aspectos relacionados com a patogênese da ELA já que foram relatadas anormalidade na homeostase energética e no cálcio mitocondrial, produção anormal de ATP e de ROS, desregulação da apoptose, além da alteração do transporte mitocondrial ao longo dos axônios na doença (ilustrado na Figura 1 L,H,E,M) (Bonafede and Mariotti 2017; Menzies et al. 2002; Shi et al. 2010). Ressalta-se que alterações na morfologia da mitocôndria, como a vacuolização da organela, em razão do acúmulo de agregados de proteínas, esses que incluem SOD1 mutante entre as membranas mitocôndrias, levam a prejuízos na importação de proteínas e a alterações no metabolismo celular na ELA (Bonafede and Mariotti 2017; Turner et al. 2013a). Além disso, o desequilíbrio na homeostase energética e déficits de ATP causada pelo dano oxidativo às proteínas mitocôndrias prejudicam a função das cadeias respiratórias em doenças neurodegenerativas (Bonafede and Mariotti 2017; Turner et al. 2013a; van den Bos, Geevasinga, and Higashihara 2019).

Há ainda evidências que a neuroinflamação e a reatividade imunológica podem também contribuir na fisiopatologia da doença, como observado nos modelos experimentais

e em amostras *post-mortem* de ELA (Hardiman et al. 2017; Turner et al. 2013a). Na medula espinhal e córtex cerebral de doentes com ELA é comum observar ativação de micróglia/macrófago, evento que pode ter relação com a progressão da ELA por promover a resposta inflamatória exagerada nos motoneurônios dos doentes (Zhang et al. 2005).

Interessante a descrição de que a micróglia pode ter ativação dupla, apresentando o fenótipo M1, classicamente ativado, tóxico, ou o fenótipo M2, que tem função neuroprotetora. Alguns autores sugerem a partir de estudos envolvendo modelos de animais SOD1 transgênicos, que o fenótipo da micróglia se modifica conforme a evolução da doença, ou seja, no início ela mantém fenótipo neuroprotetor e, à medida que a doença progride, esta célula adquire ação neurotóxica, já que o perfil de citocinas liberadas na fase final da doença modifica-se (Hardiman et al. 2017). Além disso, segundo Tarasiuk e colaboradores (2012), foram detectados no líquido de doentes com ELA aumento de anticorpos contra estruturas celulares, assim como de proteínas inflamatórias a exemplo das interleucinas 6 e 8, os fatores do complemento C3 e C4, prostaglandina E2, a proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP-1), entre outras (representadas na Figura 1 C,D).

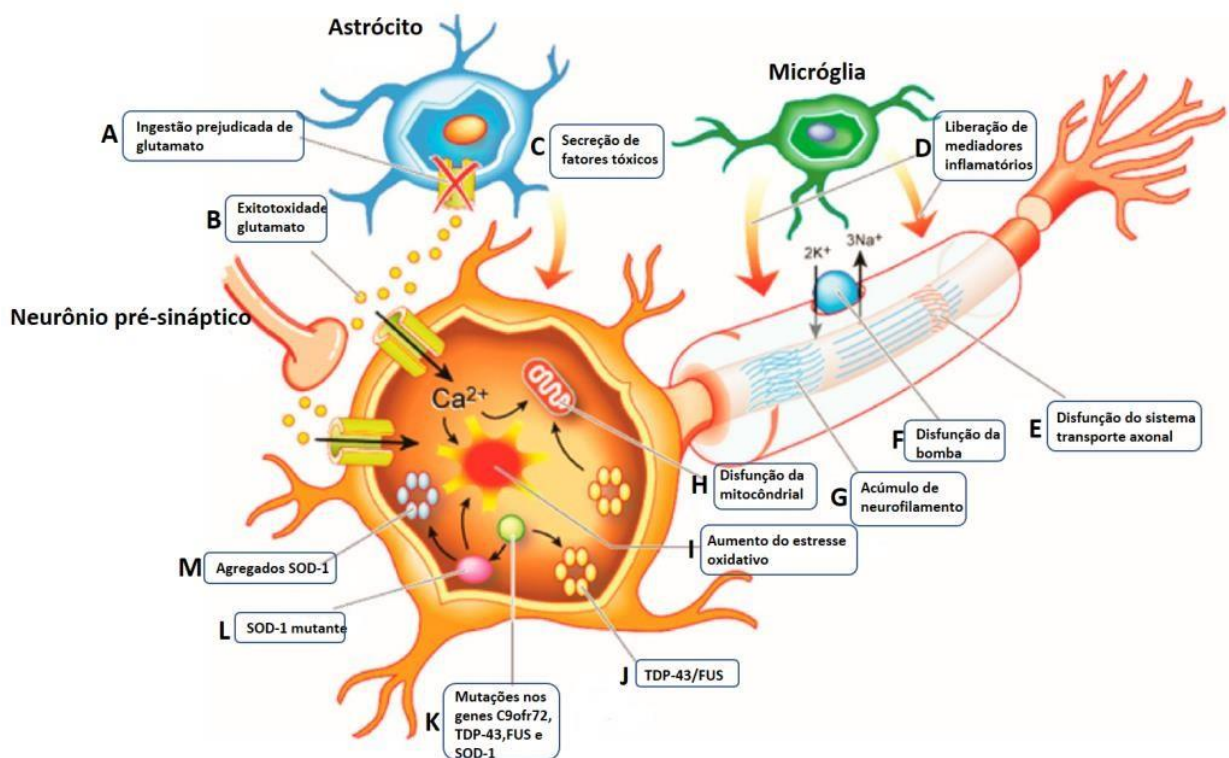


Figura 1. Interação complexa entre as vias moleculares e genéticas associadas a neurodegeneração na ELA. A redução da captação de glutamato pela fenda sináptica, levando à excitotoxicidade do glutamato, é mediada pela disfunção do transportador de aminoácido excitatório astrocístico 2 (EAAT2). Excitotoxicidade induzida por glutamato resulta em neurodegeneração por meio da ativação de vias enzimáticas dependentes de Ca^{2+} (A e B). Mutações nos genes C9ORF72, TDP-43 e FUS (K) levam a agregados de SOD-1 (M) e a presença de SOD-1 mutante (L). O TDP-43/FUS (J) também está envolvido no processo.

FUS resultam em metabolismo de RNA desregulado levando a anormalidades de tradução e formação de agregados neuronais intracelulares (**J** e **K**). Mutações no gene superóxido dismutase-1 (SOD-1) aumentam o estresse oxidativo (**L**), induz disfunção mitocondrial (**H**), leva a agregados intracelulares (**E**) e transporte axonal defeituoso (**M**). A ativação da micróglia resulta na secreção de citocinas pró-inflamatórias e neurotoxicidade (**C** e **D**). Esquema adaptado (van den Bos, Geevasinga, and Higashihara 2019).

1.3. Células-tronco

As células-tronco passam a ser vistas como abordagem terapêutica promissora na promoção da proteção neuronal, para diferentes doenças neurodegenerativas, incluindo ELA. Estudos com células-tronco justificam-se pela capacidade de migrarem para locais de tecidos lesados, estimularem a reparação dos mesmos e direcionarem suas ações segundo sinais extracelulares específicos que recebem (Faravelli et al. 2014).

As células-tronco possuem capacidade de se auto renovar e se diferenciar em outras categorias de células. Em geral, podem ser divididas em dois subtipos principais: células-tronco embrionárias, que possuem a capacidade de produzir todas as três camadas germinativas; e células-tronco adultas, que podem se diferenciar em várias categorias de células de diferentes órgãos, geralmente determinadas pela camada germinativa de origem (Meamar et al. 2013). Entre os diferentes tipos de células-tronco embrionárias, as mais utilizadas para doenças neurológicas são as células-tronco neurais, células-tronco mesenquimais (CTM) e células-tronco pluripotentes induzidas (Faravelli et al. 2014). O principal objetivo de estudos com células-tronco envolve a utilização dessas células com base em sua capacidade de liberar fatores tróficos e de remover moléculas neurotóxicas, fornecendo assim suporte local no microambiente da área lesada (Bonafede and Mariotti 2017). Entre as diferentes categorias de células-tronco utilizadas nos estudos de doenças neurodegenerativas, as CTM despontam maior interesse como candidatas promissoras (Baglio, Pegtel, and Baldini 2012). As CTM podem ser isoladas de diversos tecidos fetais e adultos, como músculo esquelético, placenta, cordão umbilical, sangue e tecido adiposo. Existem várias vantagens técnicas na aplicação das CTM. Em primeiro lugar, seu isolamento é seguro e fácil, sua expansão *in vitro* é simples, tendo sido demonstrada, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que elas podem se diferenciar em células do tipo neural, glial e astrocística (Haidet-Phillips and Maragakis 2015). Além disso, as CTM são menos suscetíveis às alterações tumorais e não requerem tratamento imunossupressor para prevenir a rejeição, dada a possibilidade de transplante autólogo (Meamar et al. 2013).

Publicações recentes envolvendo doenças neurológicas demonstraram que as CTM podem ser extraídas de tecidos adiposos ou de medula óssea, expandidas *in vitro*, e em seguida, injetadas no líquido ou em outros tecidos (Pittenger et al. 2019). A hipótese, com base em estudos pré-clínicos em modelo animal, é que as CTM secretam fatores com efeito terapêutico no microambiente ao redor de neurônios. A terapia baseada em CTM é atraente porque a maioria das doenças neurodegenerativas são multifatoriais e as CTM mostraram-se favoráveis na modulação da maioria desses processos patológicos (Sivandzade and Cucullo

2021).

Os mecanismos possíveis relacionados com ação das CTM no tratamento de doenças neurodegenerativas envolvem o *homing* para as regiões cerebrais lesadas, a produção de fatores neuroprotetores com ação parácrina e a modulação das células imunes com ações no tecido nervoso (Yao et al. 2020)

O *homing* refere-se à característica das CTM de migrar espontaneamente para a região lesada. Foi demonstrado que após a implantação de CTM marcadas com BrdU em ratos com lesão medular, as CTM podem migrar para o local da lesão e se diferenciar em neurônios e células gliais, levando à melhora persistente da função motora (Chopp et al. 2000). O *homing* efetivo das CTM pode ser influenciado por diversos fatores, como o tempo, quantidade de células transplantadas, método de cultura, pré-tratamento e a técnica utilizada no transplante das CTM (Chamberlain et al. 2007; Omori et al. 2008; Fatimah et al. 2013)

As CTM podem secretar diversos fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e várias enzimas, desempenhando um papel importante na migração celular e na regulação imunológica. Estudo anterior demonstrou o potencial neurotrófico do fator neurotrófico derivado de células gliais em modelos de Doença de Parkinson baseados em toxinas. Eles empregaram o modelo induzido pelo lipopolissacarídeo para investigar o potencial das CTM produtoras de fator neurotrófico derivado da linhagem das células gliais injetadas em conter a neuroinflamação, a neurodegeneração e os déficits funcionais desencadeados pelo lipopolissacarídeo. Enquanto a administração de lipopolissacarídeo na substância negra estimulou reações inflamatórias locais óbvias levando à perda de 20% dos neurônios dopaminérgicos, a injeção intraestriatal das CTM superexpressando fator neurotrófico derivado da linhagem das células gliais promoveu a proteção e/ou o desenvolvimento dos terminais dopaminérgicos (Hoban, Howard, and Dowd 2015). As CTM também podem secretar exossomos, que são ricos em componentes derivados de endossomos e moléculas bioativas, como proteínas, lipídios, RNA mensageiro, RNA transportador, DNA genômico e DNA mitocondrial. Os exossomos podem inibir a inflamação, participar de respostas imunes e promover a diferenciação e migração celular (Liu et al. 2019). Denota-se que exossomos derivados de CTM estimularam a neurogênese na zona subventricular e reduziram o comprometimento cognitivo no modelo de parkinsonismo experimental (Reza-Zaldivar et al. 2019).

As CTM são precursoras indiferenciadas com diferenciação fenotípica imatura e baixa imunogenicidade. A imunorregulação das CTM pode estar relacionada à sua interação com células T, células B e células natural *killer*. As CTM podem regular a função das células

imunes suprimindo a produção de anticorpos pelas células B, a ativação das células T e a secreção de citocinas pelas células natural *killer* (Mundra, Gerling, and Mahato 2013). Experimentos em animais mostraram que a imunorregulação de CTM derivadas da placenta pode inibir a liberação de citocinas inflamatórias, aliviar o comprometimento cognitivo, e aumentar a taxa de sobrevivência de neurônios e regeneração nervosa (Yun et al. 2013).

Considera-se que a efetividade do tratamento da ELA esteja associada com o prolongamento do tempo de sobrevivência dos motoneurônios. Estudos mostraram que as CTM podem migrar para a medula espinhal de camundongos e suprimir a ativação da micróglia e a proliferação glial tecidual, aumentando assim o número de motoneurônios, indicando que as CTM podem ter efeitos neuroprotetores (Mazzini et al. 2016). Finalmente, dentre as descrições mais importantes, ressalta-se ainda que exossomos derivados de células-troncos adiposas podem proteger motoneurônios derivados de NSC-34 de danos oxidativos, aumentar a sobrevivência celular (Bonafede et al. 2016), reduzir a agregação de SOD1 e disfunção mitocondrial (Lee et al. 2016).

1.4. Análise Proteômica do Líquor

A análise proteômica é uma ferramenta atual e poderosa, utilizada na identificação de moléculas relacionadas aos processos fisiológicos normais ou patológicos, bem como, às respostas a intervenções terapêuticas (Vu and Bowser 2017). Há uma variedade de biofluidos que podem ser alvos da análise proteômica, como, por exemplo, urina, soro, plasma, saliva e líquido (Hardiman et al. 2017). O presente estudo utilizou a proteômica no estudo do líquido de doentes com a ELA que receberam infusão de CTM homólogas no líquido, tecido esse que mantém relação anatômica e funcional com o sistema nervoso central. A identificação das moléculas pode refletir o efeito do tratamento com as CTM.

Diversos métodos analíticos são explorados, entretanto, a análise proteômica destaca-se por ter alta sensibilidade, permitindo a detecção de proteínas minimamente expressas por neurônios e células gliais do sistema nervoso central (Ravits et al. 2013). O estudo das proteínas é importante, pois elas são consideradas a resposta funcional das células, isto é, determinam os processos biológicos e os destinos celulares (MacDonald and Borman 2004). A análise proteômica pode ser definida como estudo de todo o conteúdo proteico, envolvendo a identificação e localização dessas proteínas, bem como, demonstrar vias de proteínas presentes em determinadas células, tecidos ou organismos em determinado momento (MacDonald and Borman 2004; Monti et al. 2005b). A dificuldade da análise do proteoma está relacionada com a dinâmica proteica, tendo em vista que o nível de expressão das proteínas

pode variar conforme o ciclo celular, tal como, as alterações intracelulares e extracelulares causadas por estresse e mudança de temperatura (Monti et al. 2005b).

O estudo do proteoma é classificado em duas áreas principais: proteômica de expressão e proteômica funcional (Monti et al. 2005b). A primeira identifica e quantifica os níveis de regulação das proteínas quando se comparam células ou condições diferentes, abordagem essa frequentemente adotada na identificação de proteínas reguladas positiva ou negativamente em situações específicas da doença/tratamento, podendo ser empregada tanto o uso como marcador diagnóstico, como para alvos terapêuticos (Banks et al. 2000). A proteômica funcional por sua vez busca caracterizar atividades biológicas, interações entre proteínas e vias de sinalização (Monti et al. 2005a). Essa pode ser direcionada a desvendar funções biológicas de proteínas desconhecidas e buscar ao nível molecular a elucidação de mecanismos celulares. As proteínas identificadas fazem parte do complexo de proteínas que interagem entre si, e a associação entre elas acontece de forma rápida e transitória nesse complexo (MacDonald and Borman 2004; Monti et al. 2019; Monti et al. 2005b). A identificação das proteínas parceiras em determinada rede é essencial para entender as funções biológicas, assim como, os mecanismos moleculares envolvidos naquele ambiente (MacDonald and Borman 2004; Monti et al. 2019; Monti et al. 2005b).

Além disso, a investigação das redes de interação de proteínas e vias de sinalização no líquor utilizando a análise proteômica com protocolos de terapias celulares, como o transplante autólogo de CTM, abre a possibilidade de identificarmos moléculas para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar, por análise proteômica, os possíveis mecanismos moleculares e celulares relacionados à CTM, 30 dias após infusão no líquido de doentes com ELA incluídos no protocolo clínico NCT 0291768.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Identificar por análise proteômica as proteínas desreguladas no líquido de doentes que receberam CTM.
- 2) Expandir os métodos de modelagem molecular para a interpretação dos resultados da proteômica.
- 3) Identificar por modelagem molecular os mecanismos celulares/moleculares relacionados às proteínas desreguladas no líquido possivelmente relacionados às CTM.
- 4) Verificar e discutir o potencial das moléculas realçadas como biomarcadores da presença das CTM no líquido dos sujeitos ELA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto fez parte do protocolo de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-HCFMUSP; #1.664.413). O estudo realizou infusão de duas doses intratecais de CTM autólogas obtidas do aspirado de medula óssea (10^6 CTM/quilograma de peso corporal) no espaço subaracnoídeo na região lombar de doentes com diagnóstico de ELA incluídos no protocolo (www.clinicaltrials.gov com o número NCT02917681). Os sujeitos da pesquisa foram submetidos à anestesia geral e à aspiração da medula óssea, procedimentos esses realizados no centro cirúrgico do HCFMUSP por anestesistas e neurocirurgiões vinculados ao projeto de pesquisa. As CTM formaram obtidas e expandidas individualmente dos aspirados de medula óssea por equipe especializada do Centro de Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, sob a coordenação do Professor Paulo S Brofman, colaborador desse projeto. As infusões de CTM autólogas foram separadas por intervalo de 30 dias. Imediatamente antes de cada infusão foram coletados 10 ml de líquido para análises de rotina e estudo de proteômica, este último, objeto deste estudo.

3.1. Sujeitos Incluídos no Estudo

O estudo foi aberto aos doentes de todo o território nacional. Os doentes foram informados dos detalhes da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram acompanhados clinicamente pelo período de 20 semanas, desde a triagem até a 1ª infusão de CTM. Em seguida, foram acompanhados por quatro semanas entre a 1ª e 2ª infusão e por 28 semanas da 2ª infusão até a última visita.

O diagnóstico e estadiamento da doença foram realizados por neurologista do grupo de pesquisa que utilizou os critérios de *El Escorial* Revisados, que envolve a presença de sinais de comprometimento de neurônios motores superiores e inferiores em diferentes regiões e ausência de evidências e sintomas por outra doença (Brooks et al. 2000). Neste estudo, foram incluídos 24 doentes com diagnóstico de ELA (Tabela 1) de ambos os sexos (10 mulheres e 14 homens), com idades variando entre 35 e 68 anos (média 53,21 anos) sem diagnóstico para outras doenças.

3.2. Obtenção de Amostras Biológicas

As amostras do líquido utilizadas neste estudo foram de dois períodos, a saber: 1- coleta imediatamente antes da primeira infusão de CTM (I1) e 2- antes da segunda infusão de

CTM (I2), intervenção essa ocorrida 30 dias após a primeira. As coletas foram realizadas por punção lombar em condições assépticas no centro cirúrgico do HCFMUSP, totalizando 48 amostras.

O volume de 5 ml do líquido foi encaminhado ao Laboratório de Investigação Médica 45 (LIM-45), centrifugado a 4°C por 10 minutos a 300 g, aliquoteado e congelado a -80°C até posterior utilização.

Tabela 1. Dados clínicos demográficos dos sujeitos com ELA

| Doentes ELA | Idade na coleta (anos) | Gênero | Local de início | Idade de início (anos) |
|-------------|------------------------|--------|-----------------|------------------------|
| 1 | 65 | M | MS | 65 |
| 2 | 42 | M | MI | 41 |
| 3 | 51 | F | MS | 51 |
| 4 | 67 | M | MS | 65 |
| 5 | 54 | M | MI | 53 |
| 6 | 51 | F | B | 50 |
| 7 | 61 | F | MS | 58 |
| 8 | 50 | M | MS | 50 |
| 9 | 60 | F | B | 59 |
| 10 | 58 | F | B | 56 |
| 11 | 44 | M | MI | 43 |
| 12 | 53 | M | MS | 52 |
| 13 | 44 | F | MS | 44 |
| 14 | 65 | M | MI e MS | 65 |
| 15 | 42 | M | MI | 42 |
| 16 | 59 | M | MS | 59 |
| 17 | 35 | M | MS | 35 |
| 18 | 59 | M | MI | 59 |
| 19 | 53 | F | MS | 52 |
| 20 | 46 | F | MI | 45 |
| 21 | 68 | F | B | 64 |
| 22 | 50 | M | MS | 48 |
| 23 | 35 | F | MI | 31 |
| 24 | 65 | M | B | 64 |

Sujeitos caucasianos com Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) do Serviço Ambulatorial de ELA do Departamento de Neurologia foram diagnosticados de acordo com *El Escorial* e submetidos à retirada do líquido antes e após 30 dias da infusão de células-tronco mesenquimais. As amostras de líquido foram submetidas à análise Proteômica e Luminex. Abreviaturas: F: feminino; M: masculino; MI: membro inferior; MS: membro superior; B: bulbar.

3.3. Quantificação de Proteínas do Líquor por Espectrometria de Massas

A análise proteômica foi realizada em 24 doentes com ELA (Tabela 1) utilizando a metodologia previamente descrita por Palmisano et al., (2010), cujo pesquisador principal e colaborador deste projeto. De modo resumido, 1 ml de líquido de cada período foram submetidas à centrifugação em membrana de corte molecular de 10 kDa. As proteínas retidas foram reduzidas por adição de ditioneitol (DTT) à concentração final de 10 mM. As proteínas foram alquiladas antes da digestão pela adição de iodoacetamida (Yari et al.) à concentração final de 40 mM e digeridas com tripsina (razão 1:50 enzima para proteína). A reação foi interrompida com a adição de ácido trifluoroacético (TFA) a 1% e os peptídeos resultantes purificados usando micro-coluna de sepharose de fase reversa Oligo R3 (Palmisano et al. 2010). As amostras foram então analisadas por nLC-MS/MS usando plataforma analítica

combinando cromatografia líquida de nanofluxo com espectrômetros de massa LTQ-Orbitrap.

Os peptídeos foram separados por espectrometria de massa em cromatografia líquida de nano-ultra-alto desempenho (nUHPLC LC-MS/MS) conforme a descrição prévia (Kawahara et al. 2018).

As proteínas identificadas como desreguladas foram selecionadas e seus peptídeos mapeados no banco de dados PeptideAtlas (<http://www.peptideatlas.org/>). Os valores de m/z selecionados foram monitorados em todo o gradiente e seus espectros de MS/MS registrados para pesquisa no banco de dados usando o *software* MaxQuant versão Matrix Science, versão 2.6.0 (Cox and Mann 2008). Para identificação de proteínas no MaxQuant, a pesquisa no banco de dados realizada (<http://www.mcponline.org/>), utilizando o Andromeda (Cox et al. 2011) para pesquisar os espectros de MS/MS em um banco de dados composto pelo Uniprot Human Protein Database.

O *software* Perseus foi utilizado para avaliação estatística dos dados proteômicos. Os valores normalizados de LFQ (do inglês, *label-free quantification*) foram carregados no *software* e transformados em \log^2 . Testes estatísticos foram aplicados para detectar as diferenças entre os períodos. Somente foram aceitas como variações significativas aquelas em que o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

3.4. Análises Enriquecidas e Redes de Interação das Proteínas Desreguladas

A análise enriquecida das proteínas desreguladas no estudo de proteômica foi realizada utilizando a plataforma DAVID (do inglês, *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*, versão 6.8) composta por vários bancos de dados. Este estudo identificou vias de sinalização (KEGG; do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e categorias das Ontologias Gênicas (GO; do inglês, *Gene Ontology*), que representam diferentes aspectos dos sistemas biológicos (Processos Biológicos, Componentes Celulares e Funções Moleculares).

Os dados apontados para estas bases de dados foram filtrados (EASE) para visualização dos resultados mais significativos (Huang da, Sherman, and Lempicki 2009; Sherman et al. 2022), de acordo com níveis específicos de significância para KEGG e Gene Ontology ($p \leq 0,001$). As categorias de cada vertente foram numeradas de forma decrescente, considerando o número de moléculas apontadas em cada uma delas. O diagrama de Venn das proteínas apontadas em cada categoria dentro de cada vertente (KEEG, Processos Biológicos, Componentes Celulares e Funções Moleculares) identificou as moléculas presentes no maior

número de categorias, utilizando-se a ferramenta *online* Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Crítérios e algoritmos especiais foram projetados para encontrar categorias relevantes e moléculas correspondentes com o mais alto nível de importância no líquido de indivíduos com ELA 30 dias após infusão de CTM entre todos aqueles apresentados pelas análises descritas acima.

Inicialmente, nas análises intra-vertentes, as categorias KEGG e GO foram classificadas de acordo com o nível de representação de suas moléculas entre categorias específicas e definidas como Categorias de Primeira e Segunda Grandeza, e suas respectivas moléculas foram identificadas como Moléculas de Primeira e Segunda Grandeza. Além disso, aquelas Moléculas de Primeira e Segunda Grandeza pertencentes a pelo menos duas categorias foram chamadas de Moléculas de Primeira e Segunda Grandeza Depuradas, respectivamente. Posteriormente, nas análises Inter-vertentes, as moléculas identificadas em quatro e três vertentes foram denominadas Moléculas de Primeira e Segunda Grandezas, respectivamente. Moléculas Intra- e Inter-Vertentes foram submetidas a critérios contínuos.

As redes de interação proteína-proteína foram construídas através do *software* Cytoscape 3.5.7 (Warde-Farley et al. 2010). Para estabelecer suas relações e identificar possíveis moléculas com maior grau de relevância, foram utilizados parâmetros de centralidade, indicando seus respectivos *betweenness* e *degree* (Scardoni, Petterlini, and Laudanna 2009). As 15 moléculas com maior *betweenness* e *degree* foram consideradas para os critérios posteriores.

As categorias enriquecidas do GO foram semanticamente agrupadas e visualizadas usando o *software* REVIGO (Supek et al. 2011). Os parâmetros foram os seguintes: similaridade permitida = média (0,7); Banco de dados *Homo sapiens* e SimRel como medida de similaridade semântica.

3.5. Análise da Regulação de Proteínas pelo Luminex

As moléculas promissoras identificadas por meio das modulações realizadas, apresentadas acima com detalhes, foram quantificadas por meio da técnica xMAP (Multiple Analyte Profiling). Resumidamente, o líquido de 24 doentes com ELA, provenientes das coletas antes e 30 dias e após a infusão de CTM, foi processado e avaliado seguindo as recomendações dos fabricantes. A tecnologia xMAP, desenvolvida pela Luminex®, utiliza microesferas fluorescentes coloridas (*beads*), que são covalentemente ligadas aos anticorpos de captura. Os anticorpos de captura são diretamente aplicados contra a molécula-alvo. Após a série lavagens para remover proteínas não ligadas, anticorpos de detecção foram adicionados para formar o

complexo sanduíche, seguido da adição do conjugado estreptavidina-ficoeritrina.

As amostras de líquido e da curva padrão (fornecidas pelo fabricante) foram adicionados em placa que contém microesferas coloridas com anticorpos de captura contra a amostra de interesse. A placa foi incubada em agitador de placas e, após as lavagens, o anticorpo de detecção foi adicionado e novamente incubado. As lavagens foram realizadas em lavadora magnética (Bio-plex PRO II Wash Station), retendo as microesferas na placa pela ação do ímã. Em seguida, a estreptavidina-ficoeritrina foi adicionada e incubada.

Após a lavagem para retirada dos reagentes não aderidos, a solução tampão foi adicionada nos poços para analisarmos no equipamento de leitor de microesferas Magpix Milliplex da Luminex. O sinal fluorescente foi emitido pela estreptavidina-ficoeritrina quando excitada pelos LEDs do equipamento de leitura. Utilizamos dois LEDs de alta performance, o verde com comprimento de onda de 525 nm e o vermelho com 635 nm, para a quantificação precisa dessas moléculas. A captura das imagens foi realizada por câmera equipada com dispositivo de carga acoplado (CCD) e os resultados foram enviados ao software Xponent 4.2 da Luminex Corp para uma análise detalhada dos dados, utilizando o software Milliplex Analyst 5.1 da EMD Millipore. Os níveis das moléculas estão expressos em pg/ml ou ng/ml de acordo com a curva padrão.

Os dados obtidos foram tratados utilizando-se os testes de Kolmogorov-Smirnov (normalidade) e o teste t pareado para análise de cada molécula entre os dois grupos. As proteínas que não se mostraram desreguladas no líquido dos sujeitos ELA 30 dias após as CTM dentre aquelas desreguladas pela proteômica foram analisadas segundo a estratificação dos valores proteicos em relação à média dos valores, na coorte de sujeitos antes da infusão, para cada proteína. Valores acima e abaixo da média foram considerados e comparados estatisticamente com os valores da média da coorte de sujeitos antes das CTM para cada molécula a ser analisada. Os dados obtidos foram tratados utilizando-se os testes de Kolmogorov-Smirnov e o t-teste para análise de cada molécula entre os dois grupos.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 8.0 para Windows (GraphPad *Software*, San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados estão apresentados como média aritmética e erro padrão da média. Somente foram aceitas como variações significativas aquelas em que o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Proteínas Desreguladas no Líquor Identificadas pela Proteômica

A análise proteômica comparativa das amostras do líquido coletadas antes da primeira infusão (I1) e 30 dias após essa infusão (I2) das CTM identificou 220 proteínas desreguladas, sendo que destas, 134 estavam diminuídas e 86 estavam aumentadas (Tabela 2).

Tabela 2. Proteínas desreguladas no líquido de doentes com ELA 30 dias após infusão de CTM

| Proteína | Símbolo | Fold | q-values |
|--|----------|-------|----------|
| Alpha-2-macroglobulin | A2M | 1,07 | 0,064 |
| Actin, alpha cardiac muscle 1 | ACTC1 | 1,33 | 0,085 |
| Actin, cytoplasmic 2 | ACTG1 | 1,25 | 0,085 |
| Agrin | AGRN | 0,91 | 0,034 |
| Alpha-2-HS-glycoprotein | AHSG | 1,08 | 0,091 |
| CD166 antigen | ALCAM | 0,87 | 0,076 |
| Fructose-bisphosphate aldolase C | ALDOC | 0,89 | 0,030 |
| Protein AMBP | AMBP | 1,12 | 0,026 |
| Angiogenin | ANG | 0,89 | 0,030 |
| Amyloid-like protein 1 | APLP1 | 0,93 | 0,034 |
| Amyloid-like protein 2 | APLP2 | 0,86 | 0,039 |
| Apolipoprotein A-I | APOA1 | 1,18 | 0,026 |
| Apolipoprotein A-II | APOA2 | 1,16 | 0,034 |
| Apolipoprotein A-IV | APOA4 | 1,12 | 0,078 |
| Apolipoprotein B-100 | APOB | 2,25 | 0,039 |
| Apolipoprotein E | APOE | 0,92 | 0,026 |
| Apolipoprotein L1 | APOL1 | 1,18 | 0,052 |
| Apolipoprotein M | APOM | 1,25 | 0,018 |
| Amyloid beta A4 protein | APP | 0,82 | 0,018 |
| N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 | B3GNT2 | 0,55 | 0,097 |
| Beta-1,4-glucuronyltransferase 1 | B4GAT1 | 0,88 | 0,018 |
| Brevican core protein | BCAN | 0,86 | 0,013 |
| Complement C1q subcomponent subunit A | C1QA | 1,16 | 0,048 |
| Complement C1q subcomponent subunit B | C1QB | 1,25 | 0,013 |
| Complement C1q subcomponent subunit C | C1QC | 1,22 | 0,026 |
| Complement C1r subcomponent | C1R | 1,16 | 0,026 |
| Complement C1r subcomponent-like protein | C1RL | 1,22 | 0,007 |
| Complement C1s subcomponent | C1S | 1,14 | 0,013 |
| Complement C2 | C2 | 1,08 | 0,075 |
| Complement C3 | C3 | 1,10 | 0,026 |
| Complement C4-A | C4A | 1,12 | 0,076 |
| C4b-binding protein alpha chain | C4BPA | 1,69 | 0,026 |
| Neuropeptide-like protein C4orf48 | C4orf48 | 0,90 | 0,052 |
| Complement C5 | C5 | 1,14 | 0,020 |
| Complement component C6 | C6 | 1,18 | 0,010 |
| Complement component C8 alpha chain | C8A | 1,10 | 0,026 |
| Complement component C8 beta chain | C8B | 1,12 | 0,031 |
| Complement component C9 | C9 | 1,10 | 0,076 |
| Carbonic anhydrase 1 | CA1 | 29,56 | 0,007 |
| Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1 | CACNA2D1 | 0,91 | 0,018 |
| Cell adhesion molecule 1 | CADM1 | 0,89 | 0,020 |
| Cell adhesion molecule 2 | CADM2 | 0,87 | 0,017 |
| Cell adhesion molecule 3 | CADM3 | 0,88 | 0,008 |
| Calreticulin | CALR | 0,92 | 0,034 |
| Cerebellin-1 | CBLN1 | 0,58 | 0,053 |

| | | | |
|---|---------|------|-------|
| Cerebellin-3 | CBLN3 | 0,86 | 0,087 |
| Monocyte differentiation antigen CD14 | CD14 | 1,13 | 0,073 |
| Complement decay-accelerating factor | CD55 | 0,85 | 0,043 |
| CD59 glycoprotein | CD59 | 0,87 | 0,027 |
| CD5 antigen-like | CD5L | 1,55 | 0,025 |
| Cadherin-10 | CDH10 | 0,74 | 0,018 |
| Cadherin-13 | CDH13 | 0,92 | 0,069 |
| Complement factor B | CFB | 1,12 | 0,030 |
| Complement factor D | CFD | 1,07 | 0,075 |
| Complement factor H | CFH | 1,10 | 0,028 |
| Complement factor I | CFI | 1,12 | 0,018 |
| Cofilin-1 | CFL1 | 0,42 | 0,048 |
| Secretogranin-1 | CHGB | 0,91 | 0,048 |
| Chitinase-3-like protein 1 | CHI3L1 | 0,84 | 0,030 |
| Neural cell adhesion molecule L1-like protein | CHL1 | 0,93 | 0,048 |
| Calsyntenin-1 | CLSTN1 | 0,82 | 0,006 |
| Calsyntenin-3 | CLSTN3 | 0,80 | 0,015 |
| Beta-Ala-His dipeptidase | CNDP1 | 0,93 | 0,076 |
| Ciliary neurotrophic factor receptor subunit alpha | CNTRF | 0,83 | 0,026 |
| Contactin-2 | CNTN2 | 0,87 | 0,013 |
| Contactin-associated protein-like 4 | CNTNAP4 | 0,77 | 0,037 |
| Collagen alpha-1(I) chain | COL1A1 | 1,48 | 0,000 |
| Collagen alpha-2(I) chain | COL1A2 | 1,53 | 0,003 |
| Collagen alpha-1(III) chain | COL3A1 | 1,48 | 0,003 |
| Collagen alpha-1(VI) chain | COL6A1 | 0,91 | 0,032 |
| Carboxypeptidase B2 | CPB2 | 1,16 | 0,026 |
| Carboxypeptidase E | CPE | 0,83 | 0,020 |
| Carboxypeptidase Q | CPQ | 0,85 | 0,026 |
| Cartilage acidic protein 1 | CRTAC1 | 0,94 | 0,059 |
| Cystatin-C | CST3 | 0,93 | 0,076 |
| Cathepsin D | CTSD | 0,89 | 0,023 |
| Protein CutA | CUTA | 0,84 | 0,095 |
| Stromal cell-derived factor 1 | CXCL12 | 1,40 | 0,007 |
| C-X-C motif chemokine 16 | CXCL16 | 0,84 | 0,026 |
| Decorin | DCN | 0,90 | 0,094 |
| Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor | DNER | 0,82 | 0,018 |
| Extracellular matrix protein 1 | ECM1 | 0,95 | 0,086 |
| Endothelin-3 | EDN3 | 0,85 | 0,026 |
| Gamma-enolase | ENO2 | 0,84 | 0,031 |
| Ectonucleotide pyrophosphatase | ENPP2 | 0,90 | 0,026 |
| Ephrin type-A receptor 4 | EPHA4 | 0,89 | 0,026 |
| Ephrin type-A receptor 5 | EPHA5 | 0,62 | 0,026 |
| Coagulation factor XII | F12 | 1,07 | 0,070 |
| Prothrombin | F2 | 1,11 | 0,006 |
| Coagulation factor V | F5 | 0,89 | 0,012 |
| Protein lifeguard 2 | FAIM2 | 0,87 | 0,074 |
| Protein FAM3C | FAM3C | 0,91 | 0,026 |
| Protocadherin Fat 2 | FAT2 | 0,80 | 0,052 |
| Fibulin-5 | FBLN5 | 0,93 | 0,060 |
| Fetuin-B | FETUB | 1,11 | 0,072 |
| Fibrinogen alpha chain | FGA | 1,35 | 0,006 |
| Fibrinogen beta chain | FGB | 1,22 | 0,037 |
| Fibroblast growth factor receptor 2 | FGFR2 | 0,85 | 0,017 |
| Fibrinogen gamma chain | FGG | 1,24 | 0,027 |
| Fibroleukin | FGL2 | 1,41 | 0,018 |
| Folate receptor beta | FOLR2 | 1,44 | 0,026 |
| Follistatin-related protein 4 | FSTL4 | 0,80 | 0,073 |
| Plasma alpha-L-fucosidase | FUCA2 | 0,88 | 0,048 |
| Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 | GALNT2 | 1,20 | 0,078 |
| Vitamin D-binding protein | GC | 1,07 | 0,074 |

| | | | |
|--|--------|------|-------|
| Rab GDP dissociation inhibitor alpha | GDI1 | 2,46 | 0,045 |
| Glypican-1 | GPC1 | 0,81 | 0,020 |
| Glutamate receptor 4 | GRIA4 | 0,86 | 0,073 |
| Hyaluronan-binding protein 2 | HABP2 | 1,20 | 0,026 |
| Protein HEG homolog 1 | HEG1 | 0,86 | 0,079 |
| Beta-hexosaminidase subunit alpha | HEXA | 0,81 | 0,026 |
| Haptoglobin-related protein | HPR | 1,31 | 0,026 |
| Histidine-rich glycoprotein | HRG | 1,13 | 0,026 |
| Serine protease HTRA1 | HTRA1 | 0,85 | 0,013 |
| Iduronate 2-sulfatase | IDS | 0,83 | 0,025 |
| Insulin-like growth factor II | IGF2 | 0,90 | 0,062 |
| Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit | IGFALS | 1,17 | 0,048 |
| Insulin-like growth factor-binding protein 2 | IGFBP2 | 1,06 | 0,082 |
| Insulin-like growth factor-binding protein 7 | IGFBP7 | 0,88 | 0,018 |
| Ig alpha-1 chain C region | IGHA1 | 1,09 | 0,030 |
| Ig alpha-2 chain C region | IGHA2 | 1,16 | 0,038 |
| Ig mu chain C region | IGHM | 1,57 | 0,006 |
| Immunoglobulin J chain | IGJ | 1,28 | 0,043 |
| Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 | IGLL5 | 1,38 | 0,032 |
| Inositol monophosphatase 3 | IMPAD1 | 0,88 | 0,079 |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 | ITIH1 | 1,19 | 0,017 |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 | ITIH2 | 1,21 | 0,007 |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 | ITIH4 | 1,14 | 0,007 |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5 | ITIH5 | 0,87 | 0,051 |
| Kallikrein-6 | KLK6 | 0,87 | 0,028 |
| Kininogen-1 | KNG1 | 1,07 | 0,093 |
| Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 | LAMP2 | 0,83 | 0,086 |
| Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase | LCAT | 0,87 | 0,026 |
| Plastin-2 | LCP1 | 1,27 | 0,013 |
| Galectin-1 | LGALS1 | 1,15 | 0,094 |
| Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1 | LRP1 | 0,87 | 0,032 |
| Leucine-rich repeat-containing protein 4B | LRRC4B | 0,91 | 0,074 |
| Limbic system-associated membrane protein | LSAMP | 0,92 | 0,039 |
| Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2 | LTBP2 | 1,13 | 0,045 |
| Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4 | LTBP4 | 0,85 | 0,025 |
| Lumican | LUM | 1,08 | 0,073 |
| Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1 | LYVE1 | 0,82 | 0,051 |
| Lysozyme C | LYZ | 1,35 | 0,007 |
| Cell surface glycoprotein MUC18 | MCAM | 0,89 | 0,020 |
| Multiple epidermal growth factor-like domains protein 8 | MEGF8 | 0,88 | 0,018 |
| 72 kDa type IV collagenase | MMP2 | 1,10 | 0,018 |
| Moesin | MSN | 6,99 | 0,017 |
| Neural cell adhesion molecule 1 | NCAM1 | 0,94 | 0,048 |
| Neurocan core protein | NCAN | 0,92 | 0,041 |
| Neuronal growth regulator 1 | NEGR1 | 0,84 | 0,003 |
| Protein kinase C-binding protein NELL2 | NELL2 | 0,90 | 0,013 |
| Neogenin | NEO1 | 0,92 | 0,031 |
| Neurofascin | NFASC | 0,90 | 0,053 |
| Nidogen-1 | NID1 | 1,23 | 0,008 |
| C-type natriuretic peptide | NPPC | 0,80 | 0,034 |
| Neuronal pentraxin-1 | NPTX1 | 0,84 | 0,026 |
| Neuronal pentraxin receptor | NPTXR | 0,88 | 0,026 |
| Neuronal cell adhesion molecule | NRCAM | 0,89 | 0,011 |
| Neuritin | NRN1 | 0,91 | 0,089 |
| Neurexin-1 | NRXN1 | 0,85 | 0,013 |
| Neurexin-2 | NRXN2 | 0,88 | 0,026 |
| Neurexin-3 | NRXN3 | 0,89 | 0,026 |
| Neurotrimin | NTM | 0,90 | 0,044 |
| Oligodendrocyte-myelin glycoprotein | OMG | 0,87 | 0,013 |
| Opioid-binding protein/cell adhesion molecule | OPCML | 0,87 | 0,039 |

| | | | |
|---|----------|------|-------|
| Alpha-1-acid glycoprotein 1 | ORM1 | 1,12 | 0,051 |
| Protocadherin-9 | PCDH9 | 0,83 | 0,018 |
| Procollagen C-endopeptidase enhancer 1 | PCOLCE | 1,06 | 0,057 |
| Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 | PEBP1 | 0,90 | 0,026 |
| Phosphatidylethanolamine-binding protein 4 | PEBP4 | 0,90 | 0,040 |
| Profilin-1 | PFN1 | 1,61 | 0,030 |
| N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase | PGLYRP2 | 1,10 | 0,026 |
| Phospholipase D3 | PLD3 | 0,78 | 0,036 |
| Plasminogen | PLG | 1,09 | 0,034 |
| Plexin-B2 | PLXNB2 | 0,90 | 0,037 |
| Protein O-linked-mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1 | POMGNT1 | 0,77 | 0,003 |
| Serum paraoxonase/arylesterase 1 | PON1 | 1,17 | 0,020 |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A | PPIA | 1,30 | 0,039 |
| Lysosomal Pro-X carboxypeptidase | PRCP | 0,86 | 0,026 |
| Proline-rich transmembrane protein 3 | PRRT3 | 0,90 | 0,073 |
| Prosaposin | PSAP | 0,94 | 0,069 |
| Prostaglandin-H2 D-isomerase | PTGDS | 0,92 | 0,048 |
| Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma | PTPRG | 0,83 | 0,017 |
| Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta | PTPRZ1 | 0,90 | 0,026 |
| Nectin-1 | PVRL1 | 0,89 | 0,095 |
| Dihydropteridine reductase | QDPR | 0,85 | 0,025 |
| Retinoic acid receptor responder protein 2 | RARRES2 | 0,87 | 0,013 |
| Reelin | RELN | 0,82 | 0,026 |
| RGM domain family member B | RGMB | 0,86 | 0,026 |
| Ribonuclease pancreatic | RNASE1 | 0,88 | 0,025 |
| Reticulon-4 receptor | RTN4R | 0,81 | 0,027 |
| Reticulon-4 receptor-like 2 | RTN4RL2 | 0,85 | 0,050 |
| Serum amyloid A-4 protein | SAA4 | 1,16 | 0,038 |
| Secretogranin-2 | SCG2 | 0,93 | 0,076 |
| Secretogranin-3 | SCG3 | 0,91 | 0,027 |
| Semaphorin-7A | SEMA7A | 0,83 | 0,028 |
| Kallistatin | SERPINA4 | 0,71 | 0,095 |
| Corticosteroid-binding globulin | SERPINA6 | 1,15 | 0,078 |
| Antithrombin-III | SERPINC1 | 1,10 | 0,020 |
| Alpha-2-antiplasmin | SERPINF2 | 1,12 | 0,018 |
| Plasma protease C1 inhibitor | SERPING1 | 1,08 | 0,026 |
| Neuroserpin | SERPINI1 | 0,76 | 0,048 |
| Seizure protein 6 homolog | SEZ6 | 0,90 | 0,048 |
| Seizure 6-like protein | SEZ6L | 0,90 | 0,080 |
| Seizure 6-like protein 2 | SEZ6L2 | 0,89 | 0,028 |
| Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1 | SIRPA | 0,85 | 0,087 |
| Superoxide dismutase [Cu-Zn] | SOD1 | 0,89 | 0,036 |
| SPARC | SPARC | 0,84 | 0,020 |
| SPARC-like protein 1 | SPARCL1 | 0,91 | 0,026 |
| Testican-1 | SPOCK1 | 0,85 | 0,026 |
| Spondin-1 | SPON1 | 0,88 | 0,026 |
| Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 | TGFBI | 1,20 | 0,013 |
| Thy-1 membrane glycoprotein | THY1 | 0,90 | 0,076 |
| Metalloproteinase inhibitor 1 | TIMP1 | 1,32 | 0,013 |
| Transmembrane protein 132A | TMEM132A | 0,87 | 0,030 |
| Tripeptidyl-peptidase 1 | TPP1 | 0,76 | 0,007 |
| Transthyretin | TTR | 0,90 | 0,056 |
| Vitronectin | VTN | 1,11 | 0,031 |
| WAP four-disulfide core domain protein 1 | WFDC1 | 0,84 | 0,094 |
| Kunitz and NTR domain-containing protein 2 | WFIKKN2 | 0,86 | 0,019 |

Duzentas e vinte proteínas desreguladas [n=86 (*fold* >1,0) reguladas positivamente e n=134 (*folds* <1,0) reguladas negativamente] foram identificadas no líquido de doentes com Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), 30 dias após infusão intratecal de células-tronco (CTM) em comparação com o líquido coletado antes da infusão das CTM. O *fold* refere-se à média das intensidades do LFQ do líquido 30 dias após a infusão de CTM pela média das intensidades do LFQ do líquido antes da infusão (n = 24).

4.2. Modelagem dos Mecanismos Moleculares Possivelmente Modificados pelas CTM

As análises enriquecidas das 220 proteínas desreguladas identificaram as vias do KEEG e categorias dos Processos Biológicos, Componentes Celulares e Funções Moleculares identificadas pelo DAVID e estão descritas nas Tabelas 3 a 6, respectivamente.

Tabela 3. Vias de sinalização apontadas pelo KEEG

| K | ID | Vias de Sinalização (Categorias) | | | | | N |
|--|---------------------------|---|-----------------------|----------------------|------------------------|---------------------------|----------|
| K1 | hsa04610 | Complemento e cascata de coagulação | | | | | 33 |
| K2 | hsa05150 | Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | | 15 |
| K3 | hsa05133 | Pertussis | | | | | 13 |
| K4 | hsa05322 | Lúpus Eritematoso Sistêmico | | | | | 13 |
| K5 | hsa04514 | Moléculas de adesão celular (CAMs) | | | | | 13 |
| K6 | hsa05020 | Doença priônica | | | | | 10 |
| K7 | hsa04512 | Interação entre MEC e receptor | | | | | 7 |
| Proteínas das Vias de Sinalização | | | | | | | |
| A2M ⁽¹⁾ | C2 ^(1,2,3,4) | C9 ^(1,4,6) | CFH ^(1,2) | CPB2 ⁽¹⁾ | LRRC4B ⁽⁵⁾ | NRXN2 ⁽⁵⁾ | |
| ALCAM ⁽⁵⁾ | C3 ^(1,2,3,4) | CADM1 ⁽⁵⁾ | CFI ^(1,2) | F12 ⁽¹⁾ | PLG ^(1,2) | NRXN3 ⁽⁵⁾ | |
| AGNR ⁽⁷⁾ | C4A ^(1,2,3,4) | CADM3 ⁽⁵⁾ | CFL1 ⁽³⁾ | F2 ⁽¹⁾ | NCAM1 ^(5,6) | RELN ⁽⁷⁾ | |
| C1QA ^(1,2,3,4,6) | C4BPA ^(1,3) | CD14 ⁽³⁾ | CNTN2 ⁽¹⁾ | F5 ⁽¹⁾ | NEGR1 ⁽⁵⁾ | SERPINC1 ⁽¹⁾ | |
| C1QB ^(1,2,3,4,6) | C5 ^(1,2,3,4,6) | CD55 ⁽¹⁾ | COL1A1 ⁽⁷⁾ | FGA ⁽¹⁾ | NEO1 ⁽⁵⁾ | SERPINF2 ⁽¹⁾ | |
| C1QC ^(1,2,3,4,6) | C6 ^(1,4,6) | CD59 ⁽¹⁾ | COL1A2 ⁽⁷⁾ | FGB ⁽¹⁾ | NFASC ⁽⁵⁾ | SERPING1 ^(1,3) | |
| C1R ^(1,2,3,4) | C8A ^(1,4,6) | CFB ^(1,2) | COL3A1 ⁽⁷⁾ | FGG ^(1,2) | NRCAM ⁽⁵⁾ | SOD1 ⁽⁶⁾ | |
| C1S ^(1,2,3,4) | C8B ^(1,4,6) | CFD ^(1,2) | COL6A1 ⁽⁷⁾ | KNG1 ⁽¹⁾ | NRXN1 ⁽⁵⁾ | VTN ⁽⁷⁾ | |

Vias de sinalização (K) apontadas pelo KEEG a partir das 220 proteínas (estringência de 0,01). O KEEG apontou as vias mais importantes (Categorias) mais relevantes, a identidade (ID) e o número de moléculas (N) presentes em cada uma dessas vias. As moléculas apontadas pelo KEEG estão apresentadas na parte inferior da tabela e as vias nas quais essas moléculas apareceram estão mencionadas nos números sobrescritos entre parênteses.

Tabela 4. Processos Biológicos

| PB | GO | Categorias | N |
|------|------------|---|----|
| PB1 | GO:0007155 | adesão celular | 34 |
| PB2 | GO:0002576 | degranulação plaquetária | 28 |
| PB3 | GO:0010951 | regulação negativa da atividade da endopeptidase | 27 |
| PB4 | GO:0006508 | proteólise | 27 |
| PB5 | GO:0045087 | resposta imune inata | 25 |
| PB6 | GO:0006958 | ativação do complemento, via clássica | 22 |
| PB7 | GO:0030198 | organização da matriz extracelular | 19 |
| PB8 | GO:0006898 | endocitose mediada por receptores | 18 |
| PB9 | GO:0030449 | regulação da ativação do complemento | 15 |
| PB10 | GO:0006956 | ativação do complemento | 15 |
| PB11 | GO:0044267 | processo metabólico da proteína celular | 14 |
| PB12 | GO:0007411 | orientação do axônio | 13 |
| PB13 | GO:0001523 | processo metabólico retinóide | 11 |
| PB14 | GO:0007417 | desenvolvimento do sistema nervoso central | 11 |
| PB15 | GO:0042730 | fibrinólise | 10 |
| PB16 | GO:0042157 | processo metabólico de lipoproteínas | 9 |
| PB17 | GO:0008203 | processo metabólico do colesterol | 9 |
| PB18 | GO:0022617 | desmontagem da matriz extracelular | 9 |
| PB19 | GO:0001558 | regulação do crescimento celular | 9 |
| PB20 | GO:0006957 | ativação do complemento, via alternativa | 8 |
| PB21 | GO:0042158 | processo biossintético de lipoproteínas | 6 |
| PB22 | GO:0034375 | remodelação de partículas de lipoproteína de alta densidade | 6 |
| PB23 | GO:0007597 | coagulação sanguínea, via intrínseca | 6 |
| PB24 | GO:0043691 | reverse cholesterol transport | 6 |
| PB25 | GO:0019835 | citólise | 6 |
| PB26 | GO:0034380 | montagem de partículas de lipoproteína de alta densidade | 5 |
| PB27 | GO:0051918 | regulação negativa da fibrinólise | 5 |

Proteínas apresentadas nos Processos Biológicos

| | | | | | | |
|--|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| A2M ^(2,3,18,23) | C1R ^(4,5,6,10) | CHL1 ^(1,12) | F2 ^(4,15,23,27) | ITIH5 ^(2,3) | NRCAM1 ⁽¹⁴⁾ | SPON1 ⁽¹⁾ |
| ALCAM ⁽¹⁾ | C1RL ^(4,5,6) | CLSTN1 ^(1,19) | F5 ^(2,4) | IGHA1 ^(5,6,8) | NTM ⁽¹⁾ | SERPINA4 ^(2,3) |
| AMBIP ^(1,3,8) | C1S ^(4,5,6,10) | CLSTN3 ⁽¹⁹⁾ | F12 ^(5,11,15,23) | IGHA2 ^(5,6,8) | NID1 ^(7,18) | SERPINF2 ^(2,3,15,27) |
| APLP1 ⁽¹⁾ | C2 ^(4,5,6,9,10) | CNDP1 ⁽⁴⁾ | FAM3C ⁽²⁾ | IGHM ^(5,6) | NFASC ⁽¹²⁾ | SERPING1 ^(2,3,5,6,15,23) |
| APLP2 ^(2,3) | C3 ^(3,4,6,9,10,20) | CNTN2 ^(1,12,14) | FGA ^(2,5,7,11,15) | IGLL5 ^(5,6) | NRXN1 ⁽¹²⁾ | SOD1 ⁽²⁾ |
| APP ^(1,2,3,5,7,11,17) | C4A ^(3,4,5,6,9,10) | COL1A1 ^(1,7) | FGB ^(2,5,7,15) | IGFBP2 ^(11,19) | NRXN3 ⁽¹²⁾ | SPARC ^(2,7,8) |
| APOA1 ^(2,11,13,16,17,21,22,24,26) | C4BPA ^(3,5,6) | COL1A2 ⁽⁷⁾ | FGG ^(2,7,15) | KNG1 ^(2,3,23) | OMG ⁽¹⁾ | SERPINA6 ⁽³⁾ |
| APOA2 ^(13,16,17,21,22,24,26) | C5 ^(3,6,9,10,20,25) | COL3A1 ⁽⁷⁾ | FETUB ⁽³⁾ | KLK6 ⁽¹⁴⁾ | ORM1 ⁽²⁾ | SERPINC1 ⁽³⁾ |
| APOA4 ^(11,13,16,17,21,22,24,26) | C6 ^(5,6,9,10,25) | COL6A1 ^(1,7) | FGL2 ⁽⁴⁾ | LSAMP ⁽¹⁾ | OPCML ⁽¹⁾ | SERPINI1 ^(3,14) |
| AHSG ^(2,3) | C8A ^(6,9,10,20,25) | CPB2 ^(4,15,27) | FBLN5 ^(7,19) | LAMP2 ⁽²⁾ (PV) | PLG ^(2,4,11,15,18,27) | TGFBI ^(1,7,11) |
| ANG ⁽⁵⁾ | C8B ^(6,9,10,20,25) | CTSD ⁽⁴⁾ | FOLR2 ⁽⁸⁾ | LYVE1 ⁽¹⁾ | PEBP1 ⁽³⁾ | THY1 ⁽¹⁾ |
| APOL1 ^(5,8,16,17,25) | C9 ^(6,9,20) | CPQ ⁽⁴⁾ | GPC1 ^(12,13) | LYZ ^(11,25) | PSAP ⁽²⁾ | TIMP1 ^(2,3,18) |
| AGNR ⁽¹³⁾ | CALR ⁽⁸⁾ | CNTNAP4 ⁽¹⁾ | HABP2 ^(1,4) | LRP1 ^(8,13,16) | PCOLCE ⁽⁴⁾ | TPP1 ^(4,14) |
| APOB ^(8,13,16,17,21) | CDH13 ⁽¹⁾ | CXCL12 ^(1,12) | HRG ^(2,3,15,27) | LCAT ^(16,17,21,22,24) | PRCP ^(4,23) | TTR ^(7,11,13) |
| APOE ^(8,13,16,17,21,22,24) | CD14 ^(5,8) | CXCL16 ⁽⁸⁾ | HTRA1 ^(4,18,19) | LCP1 ⁽¹⁸⁾ | PGLYRP2 ⁽⁵⁾ | VTN ^(1,3,7,8,9) |
| APOM ^(13,16,22,24,26) | CD55 ^(5,6,9) | CST3 ⁽¹¹⁾ | HPR ⁽⁸⁾ | LUM ⁽⁷⁾ | PTPRZ1 ⁽¹⁴⁾ | WFDC1 ^(3,19) |
| B4GAT1 ⁽¹²⁾ | CD5L ⁽⁸⁾ | DCN ^(7,18) | IGFALS ^(1,11) | LTBP4 ⁽¹⁹⁾ | PON1 ⁽¹⁷⁾ | WFIKKN2 ⁽³⁾ |
| B4GAT2 ⁽¹²⁾ | CD59 ⁽⁹⁾ | DNER ⁽¹⁴⁾ | IGFBP7 ^(1,19) | MCAM ⁽¹⁾ | RELN ^(1,4,12,14) | |
| BCAN ^(1,7,14,18) | CFB ^(4,9,10,20) | EPHA4 ⁽¹⁾ | IGF2 ^(2,11) | MMP2 ^(4,11,18) | RGMB ⁽¹⁾ | |
| C1QA ^(4,5,6,10) | CFD ^(2,4,10,20) | EPHA5 ⁽¹²⁾ | ITIH4 ^(2,3) | NCAM1 ^(1,12) | RARRS2 ^(2,13) | |
| C1QB ^(4,5,6,10) | CFI ^(4,5,6,8,9) | ECM1 ⁽²⁾ | ITIH1 ^(2,3) | NCAN ^(1,7,14) | SIRPA ⁽¹⁾ | |
| C1QC ^(4,5,6,10) | CFH ^(9,10,20) | ENPP2 ⁽⁸⁾ | ITIH2 ^(2,3) | NEO1 ^(1,12) | SPOCK1 ^(1,3,19) | |

Processos Biológicos (Ghatak et al.) apontados pelo GO a partir das 220 proteínas (estratégia de 0,00001). O GO apontou as Categorias, o termo (GO) e o número de moléculas (N) presentes em cada uma dessas categorias. As moléculas apontadas pelo GO estão apresentadas na parte inferior da tabela e as categorias nas quais essas moléculas apareceram estão mencionadas nos números sobrescritos entre parênteses.

Tabela 5. Componentes Celulares

| CC | GO | Categorias | N |
|------|------------|--|-----|
| CC1 | GO:0070062 | exossoma extracelular | 146 |
| CC2 | GO:0005615 | espaço extracelular | 111 |
| CC3 | GO:0005576 | região extracelular | 111 |
| CC4 | GO:0005886 | membrana de plasma | 83 |
| CC5 | GO:0072562 | micropartícula de sangue | 46 |
| CC6 | GO:0031012 | matriz extracelular | 29 |
| CC7 | GO:0009986 | superfície celular | 26 |
| CC8 | GO:0005578 | matriz extracelular proteica | 23 |
| CC9 | GO:0009897 | lado externo da membrana plasmática | 19 |
| CC10 | GO:0031093 | lúmen de grânulo alfa de plaquetas | 17 |
| CC11 | GO:0043025 | corpo celular neuronal | 17 |
| CC12 | GO:0031225 | componente ancorado da membrana | 15 |
| CC13 | GO:0043202 | lúmen lisossomal | 13 |
| CC14 | GO:0034364 | partícula de lipoproteína de alta densidade | 9 |
| CC15 | GO:0034361 | partícula de lipoproteína de densidade muito baixa | 7 |
| CC16 | GO:0005579 | complexo de ataque à membrana | 5 |
| CC17 | GO:0034366 | partícula esférica de lipoproteína de alta densidade | 5 |
| CC18 | GO:0005577 | complexo de fibrinogênio | 5 |

Proteínas representadas nos Componentes Celulares

| | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| A2M ^(1,3,5,10) | C1S ^(1,3,5) | CFH ^(1,2,3,5) | EDN3 ^(2,3) | HEXA ^(1,13) | LYZ ^(1,2,3) | PLD3 ⁽¹⁾ | SPARCL1 ^(1,2,8) |
| ACTC1 ^(1,2,5) | C2 ^(1,2,3) | CFI ^(1,2,3) | ENO2 ^(1,2,4) | HPR ^(1,3,5,17) | LRP1 ^(4,11) | PLG ^(1-5,7,10) | SCG2 ⁽²⁾ |
| ACTG1 ^(1,2,4,5,6) | C3 ⁽¹⁻⁵⁾ | CFL1 ^(1,2,6) | ENPP2 ^(2,4) | HRG ^(1,3-5,10) | MEGF8 ⁽¹⁾ | PLXNB2 ^(1,7) | SEMA7A ^(2,4,9,12) |
| AGRN ^(1,3,4,6,13) | C4A ^(1-5,11) | CHI3L1 ^(1,2,8) | EPHA4 ^(4,7) | HEXA ^(1,13) | MSN ^(1,2,4,5) | PONI ^(1-5,14,17) | SPARC ^(2-4,7,8,10) |
| AHSG ^(1,2,3,5,6,10) | C4BPA ^(2,3,4,5) | CHL1 ^(1,4,8) | EPHA5 ^(4,9,11) | HPR ^(1,3,5,17) | MMP2 ^(2,3,4,6,8) | PP1A ^(1,2,3) | SEZ6 ^(1,4,11) |
| ALCAM ^(1,9,11) | C5 ^(1,2,3,16) | CLSTN1 ^(1,7) | F12 ^(1,2,3,4) | HRG ^(1,3-5,10) | MCAM ^(2,4,9) | PRCP ^(1,4) | SPOCK1 ^(2,8) |
| ALDOC ⁽¹⁾ | C4ORF48 ⁽³⁾ | CLSTN3 ^(1,7) | F2 ^(1,2,3,4,5) | HEXA ^(1,13) | NCAM1 ^(1,4,7,9,12) | PSAP ^(1,2,3,13) | SPON1 ^(2,6,8) |
| AMBP ^(1-5,7) | C6 ^(1,3,16) | COL1A1 ^(2,3) | F5 ^(2,3,4,10) | HPR ^(1,3,5,17) | NEGR1 ^(1,4,12) | PTGDS ^(1,2,3) | SCG3 ⁽³⁾ |
| ANG ^(1,2,3,11) | C8A ^(1,2,3,5,16) | COL1A2 ^(1-3,6,8) | FAM3C1 ⁽³⁾ | HRG ^(1,3-5,10) | NFASC ^(1,4) | PTPRG ^(1,2) | SEZ6L ⁽¹¹⁾ |
| APLP1 ⁽⁴⁾ | C8B ^(1,2,3,16) | COL3A1 ^(2,3,6) | FAT2 ^(1,4) | HEXA ^(1,13) | NID1 ^(1,3,6) | PCDH9 ⁽⁴⁾ | SEZ6L2 ^(4,11) |
| APLP2 ^(1,4) | C9 ^(1,3,4,5,16) | COL6A1 ^(1,3,6) | FBLN5 ^(1,2,3,6,8) | HPR ^(1,3,5,17) | NPPC ^(2,3) | PTPRZ1 ⁽⁸⁾ | TGFBI ^(1-4,8) |
| APOA1 ^(1-5,7,14,15,17) | CA1 ⁽¹⁾ | CPB2 ^(1,2) | FETUB ^(1,2,3) | HRG ^(1,3-5,10) | NRN1 ^(2,4,12) | QDPR ⁽¹⁾ | THY1 ^(1,4,9) |
| APOA2 ^(1,3,5,14,15,17) | CACNA2D1 ^(1,4) | CPE ^(1,2,4,11) | FGA ^(1-5,7,9,10,18) | HEXA ^(1,13) | NCAN ^(3,8,13) | RNASE1 ⁽¹⁾ | TIMP1 ^(1-3,8,10) |
| APOA4 ^(1-3,5,7,14,15) | CADM1 ^(1,4) | CHGB ⁽³⁾ | FGB ^(1-5,7,9,10,18) | HPR ^(1,3,5,17) | NELL2 ⁽³⁾ | RTN4R ^(1,4,7,11,12) | TMEM132A ⁽¹⁾ |
| APOB ^(1-4,11,15) | CADM2 ⁽⁴⁾ | CNDP1 ⁽³⁾ | FGFR2 ^(3,4,6,7) | HRG ^(1,3-5,10) | NRCAM ^(3,4,9) | RTN4RL2 ^(1,7,9) | TPP1 ^(1,13) |
| APOE ^(1-6,11,14,15) | CALR ^(1-3,6-9) | CPQ ^(1,2) | FGL2 ^(1,18) | HEXA ^(1,13) | NEO1 ⁽⁴⁾ | RELN ^(2,4,8) | TTR ⁽¹⁻³⁾ |
| APOM ^(1,3,14,15,17) | CBLN3 ⁽¹⁾ | CRTAC1 ^(1,8) | FUCA2 ^(1,2) | HPR ^(1,3,5,17) | NRXN1 ^(4,7,11) | RARRES2 ^(1,3,6) | VTN ^(1-3,5,6) |
| APP ^(1,2,3,4,7,10) | CD14 ^(1,2,3,4) | CST3 ^(1,2,3,11) | FGG ^(1-5,7,9,10,18) | HRG ^(1,3-5,10) | NRXN2 ⁽⁴⁾ | RGMB ⁽⁴⁾ | WFDC1 ⁽²⁾ |
| APOL1 ^(2,3,5,14,15) | CBLN1 ⁽³⁾ | CTSD ^(1,2,3,6,13) | FOLR2 ^(3,7) | LAMP2 ^(1,2,4,13) | NTM ^(4,12) | SAA4 ^(1,2,3,14) | WFIKKN2 ⁽³⁾ |
| B3GNT2 ⁽¹⁾ | CD55 ^(1,3,4,7,12) | CUTA ⁽¹⁾ | FSTL4 ⁽³⁾ | LAMP ^(4,12) | OPCML ^(1,4) | SERPINA4 ^(1,2,3) | |
| B4GAT1 ⁽¹⁾ | CD59 ^(1,2,4,7) | CXCL12 ^(1,2,3,9) | GALNT2 ⁽¹⁾ | LCAT ^(1,2,3,14) | ORM1 ^(1-3,5,10) | SERPINA6 ^(1,2) | |
| BCAN ^(3,8,12,13) | CADM3 ⁽⁴⁾ | CXCL16 ^(2,3,4) | GC ^(1,2,3,5,13) | LCPI ^(1,2,4) | OMG ^(4,12) | SERPINC1 ⁽¹⁻⁵⁾ | |
| C1QA ^(1,3) | CD5L ^(1,2,3,5) | CNTFR ^(4,12) | GPC1 ^(1,3,8,12,13) | LGALS1 ^(1,2,6,7,8) | PCOLCE ^(1,2,6) | SERPINF2 ^(1-3,5,7,10,18) | |
| C1QB ^(1,3,5) | CDH10 ⁽⁴⁾ | CNTN2 ^(4,7,11,12) | GRIA4 ⁽⁴⁾ | LTBP2 ^(1,2,6,8) | PEBP1 ⁽¹⁾ | SERPING1 ^(1,2,3,5,10) | |
| C1QC ^(1,2,3,5) | CDH13 ^(1,2,4,9,12) | DCN ^(2,3,6,13) | HEXA ^(1,13) | LTBP4 ^(1,2,3,6,8) | PEBP4 ⁽¹⁾ | SERPINI1 ^(1,2) | |
| C1R ^(1,3,5) | CFB ^(1,2,3,4,5) | DNER ^(4,11) | HPR ^(1,3,5,17) | LUM ^(1,2,3,6,8,13) | PFN1 ^(1,5) | SIRPA ^(1,4) | |
| C1RL ^(1,2) | CFD ^(1,2,3,10) | ECM1 ^(1,2,3,6,8) | HRG ^(1,3-5,10) | LYVE1 ^(1,4) | PGLYRP2 ⁽¹⁾ | SOD1 ^(1,2,3,4,6,11) | |

Componentes celulares (CC) apontados pelo GO a partir das 220 proteínas (estringência de 0,00001). A análise apontou as Categorias, o termo (GO) e o número de moléculas (N) presentes em cada uma dessas categorias. As moléculas apontadas pelo GO estão apresentadas na parte inferior da tabela e as categorias nas quais essas moléculas apareceram estão mencionadas nos números sobrescritos entre parênteses.

Tabela 6. Funções Moleculares

| FM | GO | Categorias | N |
|------|------------|---|----|
| FM1 | GO:0005509 | ligação de íons de cálcio | 33 |
| FM2 | GO:0005102 | ligação ao receptor | 26 |
| FM3 | GO:0004252 | atividade de endopeptidase do tipo serina | 23 |
| FM4 | GO:0004867 | atividade do inibidor da endopeptidase do tipo serina | 19 |
| FM5 | GO:0008201 | ligação de heparina | 14 |
| FM6 | GO:0050839 | ligação da molécula de adesão celular | 11 |
| FM7 | GO:0004866 | atividade inibidora da endopeptidase | 9 |
| FM8 | GO:0005518 | ligação de colágeno | 8 |
| FM9 | GO:0004869 | atividade do inibidor da endopeptidase do tipo cisteína | 6 |
| FM10 | GO:0017127 | atividade transportadora de colesterol | 5 |
| FM11 | GO:0005319 | atividade transportadora de lipídios | 5 |
| FM12 | GO:0060228 | atividade do ativador de fosfatidilcolina-esterol O-aciltransferase | 5 |

Proteínas representadas nas Funções Moleculares

| | | | | | | | |
|------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| A2M ^(2,4,7) | C1R ^(1,2) | CADM3 ^(2,6) | EDN3 ⁽²⁾ | IGFBP2 ⁽²⁾ | LCP1 ⁽¹⁾ | NRXN2 ⁽⁶⁾ | SERPINC1 ^(4,5) |
| AGRN ⁽¹⁾ | C1QA ⁽³⁾ | CDH10 ⁽¹⁾ | FAT2 ⁽¹⁾ | ITIH1 ^(1,4) | LRP1 ⁽¹⁾ | NRXN3 ⁽⁶⁾ | SERPINF2 ^(4,7) |
| AHSG ^(7,9) | C1QB ⁽³⁾ | CDH13 ⁽¹⁾ | FBLN5 ⁽¹⁾ | ITIH2 ^(4,7) | LTBP2 ⁽¹⁾ | NID1 ⁽⁸⁾ | SERPING1 ⁽⁴⁾ |
| ALCAM ⁽²⁾ | C1QC ⁽³⁾ | CFB ⁽³⁾ | FSTL4 ⁽¹⁾ | ITIH4 ^(4,7) | LTBP4 ⁽¹⁾ | PCDH9 ⁽¹⁾ | SERPINI1 ⁽⁴⁾ |
| AMBP ⁽⁴⁾ | C1RL ⁽³⁾ | CFH ⁽⁵⁾ | FGA ^(2,6) | ITIH5 ⁽⁴⁾ | LRRC4B ⁽¹⁾ | PCOLCE ^(5,8) | TPP1 ⁽³⁾ |
| ANG ^(2,5) | C1S ^(1,2) | CLSTN1 ⁽¹⁾ | FGB ^(2,6) | ITIH4 ^(4,7) | LTBP2 ⁽⁵⁾ | PFN1 ⁽²⁾ | TGFBI ⁽⁸⁾ |
| APLP1 ⁽⁵⁾ | C2 ⁽³⁾ | CLSTN3 ⁽¹⁾ | FGG ^(2,6) | ITIH5 ⁽⁴⁾ | LUM ⁽⁸⁾ | PLG ^(2,3) | VTN ^(5,8) |
| APLP2 ^(4,5) | C3 ^(2,3,7) | CNTRF ⁽²⁾ | FGFR2 ⁽⁵⁾ | ITIH4 ^(4,7) | MEGF8 ⁽¹⁾ | PEBPI ⁽⁴⁾ | WFDC1 ⁽⁴⁾ |
| APOB ^(5,10,11) | C4A ^(3,7) | CPE ⁽⁶⁾ | FETUB ⁽⁹⁾ | ITIH5 ⁽⁴⁾ | MSN ^(2,6) | PON1 ⁽¹⁾ | WFIKKN2 ⁽⁴⁾ |
| APOE ^(5,10,11,12) | C5 ^(2,7) | CRTAC1 ⁽¹⁾ | F5 ⁽³⁾ | KNG1 ^(2,5,9) | MMP2 ⁽³⁾ | RARRES2 ⁽²⁾ | |
| APP ^(2,4,5) | CALR ⁽¹⁾ | CXCL12 ⁽²⁾ | HABP2 ^(1,3) | KLK6 ⁽³⁾ | NCAN ⁽¹⁾ | SPARC ^(1,8) | |
| APOA1 ^(10,12) | CADM1 ^(2,6) | CTSD ⁽³⁾ | HEG1 ⁽¹⁾ | KNG1 ^(2,5,9) | NELL2 ⁽¹⁾ | SPARCL1 ^(1,8) | |
| APOA2 ^(10,11,12) | CADM2 ^(2,6) | CST3 ^(7,9) | HRG ^(2,4,5,9) | KLK6 ⁽³⁾ | NID1 ⁽¹⁾ | SPOCK1 ^(1,4,9) | |
| APOM ⁽¹¹⁾ | CFD ⁽³⁾ | DNER ⁽¹⁾ | HPR ⁽³⁾ | KNG1 ^(2,5,9) | NRXN1 ^(1,2,6) | SERPINA4 ⁽⁴⁾ | |
| APOA4 ^(10,11,12) | CFI ⁽³⁾ | DCN ⁽⁸⁾ | HTRA1 ⁽³⁾ | KLK6 ⁽³⁾ | NPPC ⁽²⁾ | SERPINA6 ⁽⁴⁾ | |

Funções Moleculares apontadas pelo GO a partir das 220 proteínas (estrangência de 0,0001). A análise apontou as Categorias, o termo (GO) e o número de moléculas (N) presentes em cada uma dessas categorias. As moléculas apontadas pelo GO estão apresentadas na parte inferior da tabela e as categorias nas quais essas moléculas apareceram estão mencionadas nos números sobrescritos entre parênteses. As moléculas de primeira grandeza e primeira grandeza depuradas estão indicadas em amarelo e verde, respectivamente (ver análise adiante).

4.2.1. Identificação de Alvos Moleculares a Partir de Redes de Interação Proteína-proteína

As 220 proteínas foram inseridas no Cytoscape para análise de redes e de interações físicas (Figura 2). Os valores de betweenness e degree das 50 moléculas com maiores notas estão representadas na tabela 7.

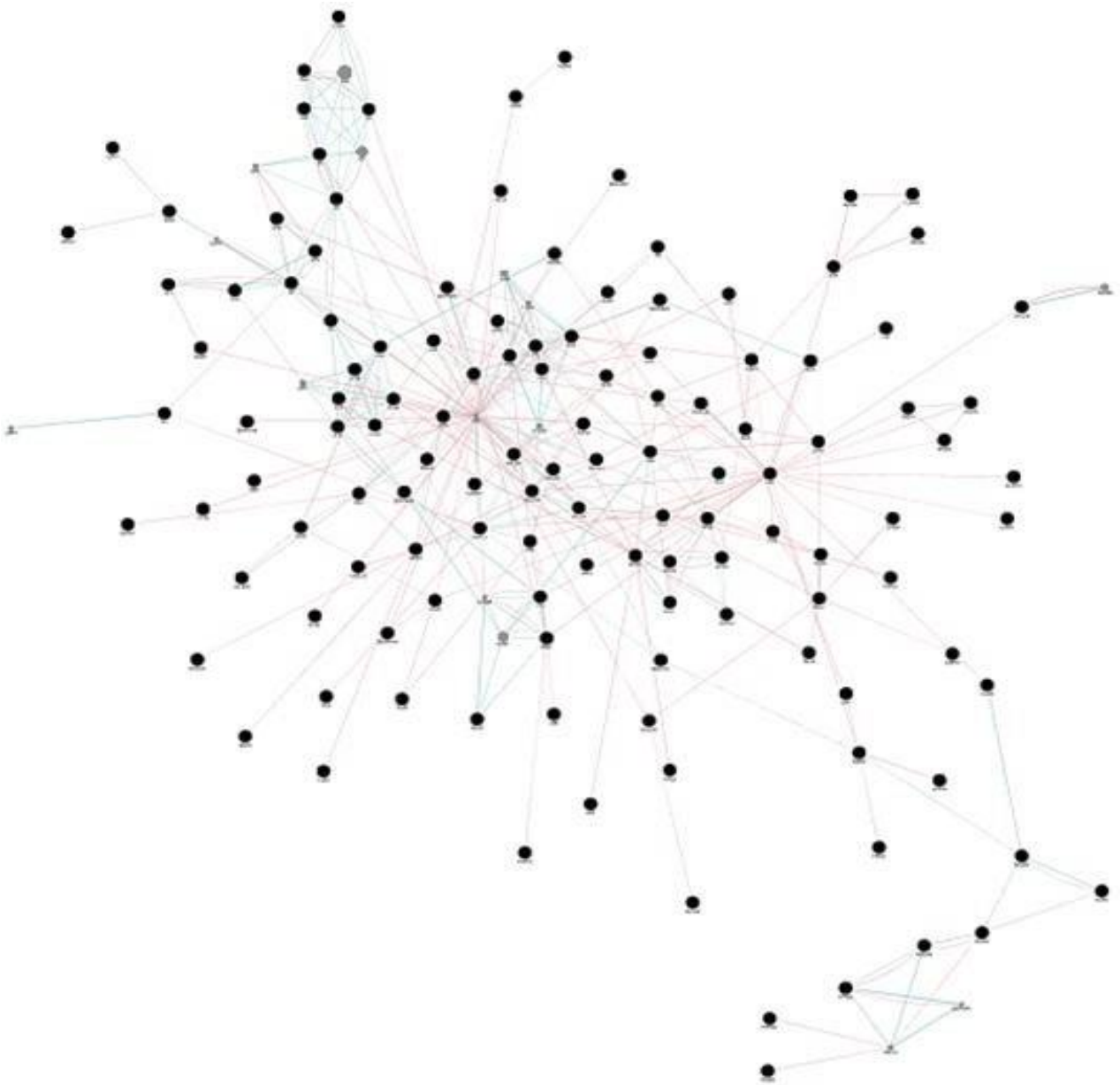


Figura 2. Ilustração da rede de interação entre as 220 proteínas desreguladas na proteômica. Linhas de interações físicas (vermelho) e de vias (azul). A rede foi criada a partir do programa Cytoscape 3.5.7. Os círculos em preto representam as 220 moléculas incluídas na análise e os círculos cinza foram inseridos durante a construção da rede para estabelecer as conexões.

Tabela 7. Moléculas da rede de interações ranqueadas pelos seus *betweenness* e *degree*

| <i>Betweenness</i> | | | | | | <i>Degree</i> | | | | | |
|--------------------|-----------|-------|----|----------|------|---------------|----------|------|----|----------|------|
| N | Proteínas | Nota | N | Proteína | Nota | N | Proteína | Nota | N | Proteína | Nota |
| 1 | APP* | 6.434 | 26 | ACTG1 | 516 | 1 | APP* | 28 | 26 | IGF2 | 10 |
| 2 | NCAM1* | 2.147 | 27 | C4A | 478 | 2 | PLG | 21 | 27 | KNG1 | 10 |
| 3 | C3 | 2.078 | 28 | PPIA | 432 | 3 | C3 | 20 | 28 | APOA2 | 9 |
| 4 | APOA1* | 1.936 | 29 | SOD1 | 401 | 4 | APOA1* | 18 | 29 | C6 | 9 |
| 5 | FGFR2 | 1.641 | 30 | LGALS1 | 370 | 5 | FGA | 18 | 30 | CFL1 | 9 |
| 6 | CNTN2 | 1632 | 31 | VTN | 335 | 6 | C1QA | 17 | 31 | CPB2 | 9 |
| 7 | PLG | 1.586 | 32 | C6 | 333 | 7 | C5 | 17 | 32 | APOB* | 8 |
| 8 | A2M* | 1.359 | 33 | C1QA | 321 | 8 | F2 | 16 | 33 | C8B | 8 |
| 9 | MMP2* | 1.161 | 34 | PVRL1 | 313 | 9 | A2M* | 15 | 34 | CALR | 8 |
| 10 | AGRN | 1.049 | 35 | GC | 302 | 10 | ACTG1 | 15 | 35 | DCN | 8 |
| 11 | COL1A2 | 980 | 36 | C5 | 291 | 11 | FGB | 15 | 36 | SOD1 | 8 |
| 12 | NTM | 838 | 37 | FGB | 284 | 12 | FGG | 15 | 37 | CFB | 7 |
| 13 | ACTC1 | 775 | 38 | AHSG | 282 | 13 | C4A | 14 | 38 | F12 | 7 |
| 14 | LRP1 | 760 | 39 | CXCL16 | 282 | 14 | COL1A2 | 14 | 39 | KLK6 | 7 |
| 15 | MSN | 721 | 40 | GDI1 | 282 | 15 | APOE* | 13 | 40 | LRP1 | 7 |
| 16 | DCN | 666 | 41 | FGA | 265 | 16 | COL1A1 | 13 | 41 | SERPING1 | 7 |
| 17 | CFL1 | 645 | 42 | KLK6 | 218 | 17 | MMP2* | 13 | 42 | COL3A1 | 6 |
| 18 | IGF2 | 640 | 43 | CPB2 | 152 | 18 | ACTC1 | 12 | 43 | HRG | 6 |
| 19 | CALR | 587 | 44 | CFB | 151 | 19 | C1QB | 12 | 44 | MSN | 6 |
| 20 | CD55 | 562 | 45 | C1QC | 138 | 20 | C1R | 12 | 45 | SERPINF2 | 6 |
| 21 | F2 | 550 | 46 | NRCAM | 137 | 21 | C1QC | 11 | 46 | SPARC* | 6 |
| 22 | APOE* | 546 | 47 | SERPING1 | 132 | 22 | C1S | 11 | 47 | VTN | 6 |
| 23 | CTSD | 541 | 48 | COL1A1 | 130 | 23 | C2 | 11 | 48 | CD59 | 5 |
| 24 | KNG1 | 541 | 49 | F12 | 128 | 24 | C8A | 11 | 49 | CFH | 5 |
| 25 | C9 | 535 | 50 | SERPINF2 | 117 | 25 | C9 | 10 | 50 | CNTN2 | 5 |

Moléculas evidenciadas nas redes de interações físicas e de vias de sinalização. Lista das 50 moléculas com os valores mais elevados de *betweenness* e *degree*. As moléculas de primeira grandeza depuradas estão indicadas em verde. As moléculas indicadas com asterisco (*) foram realçadas no estudo e sua concentração foi analisada em pg/ml, utilizando a técnica do Luminex®.

4.3. Modelagem Global para Apontamentos Adicionais de Moléculas e Mecanismos Envolvidos no Tratamento com as CTM

A ferramenta do Diagrama de Venn foi utilizada na visualização das sobreposições das moléculas nas categorias do KEGG e do *Gene Ontology* (GO) (Quadro 1).

A análise do diagrama de Venn entre as categorias de cada grupo (KEEG, Processos Biológicos, Componente Celular e Função Molecular), que considerou o número de moléculas que se repetiram nessas categorias apenas dentro de seu respectivo grupo, apresentou dois conjuntos que se sobressaíram em relação aos outros (devido a sua presença nas categorias elencadas como as mais importantes): um conjunto de moléculas de primeira grandeza e um conjunto de moléculas de segunda grandeza descritos no Quadro 1.

Em relação à análise do diagrama de Venn que comparou todas as moléculas das quatro categorias (KEGG e GO), notou-se que A2M, AGRN, ALCAM, C1QA, C1QB, C1R, C1S, C2, C3, C4A, C5, CFB, CFD, CFH, CFI, CIQC, F12, F2, F5, FGA, FGB, FGG, KNG1, NRXN1, PLG, SERPINC1, SERPINF2, SERPING1 e VTN constituem um elo molecular entre as categorias (Tabela 8). A análise demonstrou também quatro possibilidades de associações entre três vertentes, e três possibilidades de associações entre duas vertentes, e as moléculas que fazem parte dessas associações (Tabela 8).

| | CATEGORIAS de 1ª Grandeza | Moléculas de 1ª Grandeza | Moléculas de 1ª Grandeza depuradas | CATEGORIAS de 2ª Grandeza | Moléculas de 2ª Grandeza | Moléculas de 2ª Grandeza depuradas |
|------|---------------------------|---|--|---------------------------|--|---|
| KEGG | K1 (66,6%) | C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1S, C2, C3, C4A, C5, C6, C8A, C8B, C9, CABPA, CFB, CFD, CFH, CFI, FGG, PLG, SERPING1 | C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1S, C2, C3, C4A, C5, C6, C8A, C8B, C9, CABPA, CFB, CFD, CFH, CFI, FGG, PLG, SERPING1 | K3 (44,4%) | CD14, C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1S, C2, C3, C4A, C4BPA, C5, SERPING1 | C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1S, C2, C3, C4A, C5 |
| | | | | K4(44,4%) | C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1S, C2, C3, C4A, C5, C6, C8A, C8B, C9 | |
| | | | | K6(44,4%) | C1QA, C1QB, C1QC, C5, C6, C8A, C8B, C9, NCAM1 | |
| PB | PB4 (25,7%) | C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1RL, C1S, C2, C3, C4A, CFB, CFD, CFI, CPB2, F2, F5, HABP2, HTRA1, IGHA1, IGHA2, MMP2, PLG, PRCP, RELN, TPP1 | C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1S | PB1(20%) | AMBP, APP, BCAN, CHL1, CLSTN1, CNTN2, COL1A1, COL6A1, CXCL12, HABP2, IGFBP7, NCAM1, NCAN, NEO1, RELN, SPOCK1, TGFBI, VTN | APP, C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1RL, C1S, C2, C4A, FGA, FGB, IGHA1, IGHA2, VTN |
| | PB2 (24,2%) | A2M, AHSG, APLP2, APOA1, APOA2, APP, C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1S, CFD, F5, FGA, FGB, FGG, HRG, IGFBP2, ITIH4, KNG1, PLG, RARRES2, SERPINA4, SERPINF2, SERPING1, SPARC, TIMP1 | | PB3(21,4%) | A2M, AHSG, AMBP, APLP2, APP, C3, C4A, C5, HRG, ITIH4, KNG1, SERPINA4, SERPINF2, SERPING1, SERPIN1, SPOCK1, TIMP1, VTN, WFDC1 | |
| | PB5 (22,8%) | APOL1, APP, C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1RL, C1S, C2, C4A, C4BPA, C6, C8A, C8B, CD14, CD55, CFI, F12, FGA, FGB, IGHA1, IGHA2, IGHM, IGLL5, SERPING1 | | PB6(20%) | C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1RL, C1S, C2, C3, C4A, C4BPA, C5, C6, C8A, C8B, C9, CD55, CFI, IGHA1, IGHA2, IGHM, IGLL5, SERPING1 | |
| | | | | PB7(20%) | AGR, APP, BCAN, COL1A1, COL6A1, DCN, FBLN5, FGA, FGB, FGG, IGFBP2, NCAN, NID1, SPARC, TGFBI, TTR, VTN | |
| | | | | | | |
| FM | FM 2(44%) | A2M, ANG, APP, C3, C5, CADM1, CADM2, CADM3, F2, FGA, FGB, FGG, HRG, KNG1, M SN, NRXN1, PLG | APP, HRG | FM 7(24%) | A2M, AHSG, C3, C4A, C5, CST3, ITIH2, ITIH4, SERPINF2 | A2M, F2, HRG, KNG1, SPOCK1 |
| | FM 5(36%) | ANG, APLP2, APOB, APOE, APP, HRG, KNG1, LTBP2, PCOLCE, SERPINC1, VTN | | FM 3(20%) | C1R, C1S, C3, C4A, F12, F2, HABP2, PLG | |
| | FM 1(28%) | C1R, C1S, F12, F2, HABP2, ITIH1, LTBP2, NID1, NRXN1, SPARC, SPARCL1, SPOCK1 | | FM 9(16%) | AHSG, CST3, HRG, KNG1, SPOCK1 | |
| | FM 4(28%) | A2M, APLP2, APP, HRG, ITIH1, ITIH2, ITIH4, SERPINC1, SERPINF2, SPOCK1 | | FM 10(16%) | APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOE | |

| | | | | | | | |
|----|------------|---|---|------------|---|---|--|
| CC | CC1(73,3%) | A2M, ACTC1, ACTG1, AGRN, AHSG, ALCAM, AMBP, ANG, APLP2, APOA1, APOA2, APOA4, AP OB, APOE, APOM, APP, C1QA, C1QB, C1QC, CIR, C1RL, C1S, C2, C3, C4A, C5, C6, C8A, C8B, C9, CACNA2D1, CADM1, CALR, CD14, CD55, CD59, CD5L, CDH13, CFB, CFD, CFH, CFI, CFL1, CHI3L1, CHL1, CLSTN1, CLSTN3, COL1A2, COL6A1, CPB2, CPE, CPQ, CRTAC1, CST3, CTSD, CXCL12, E CM1, EDN3, ENO2, F12, F2, FAM3C, FAT2, FBLN5, FE TUB, FGA, FGB, FGG, FGL2, FU CA2, GC, GPC1, HABP2, HEXA, HPR, HRG, HTRA1, IGF2, IGFALS, IGFBP2, IGFBP7, IGHA1, IGHA2, IGHM, IGLL5, ITIH1, ITIH2, ITIH4, KLK6, KNG1, LAMP2, LCAT, LCP1, LGALS1, LTBP2, LTBP4, LUM, LYVE1, LYZ, MSN, NCAM1, NE GR1, NFASC, NID1, NPPC, OPCML, ORM1, PCOLCE, PFN1, PLG, PLXNB2, PONI, PPIA, PRCP, PSAP, PTGDS, PTPRG, RARRE S2, RTN4R, RTN4RL2, SAA4, SERPINA4, SERPINA6, SERPINC1, SERPINF2, SERPING1, SERPIN1, SIRPA, SOD1, SPARCL1, TGFB1, THY1, TIMP1, TPPI, TTR, VTN | | CC4(49,5%) | ACTG1, AGRN, AMBP, APLP2, APOA1, APOB, APOE, APP, C3, C4A, C4BPA, C9, CACNA2D1, CADM1, CD14, CD55, CD59, CDH13, CFB, CHL1, CNTFR, CNTN2, CPE, CXCL16, DNER, ENO2, ENPP2, EPHA4, EPHA5, F12, F2, F5, FAT2, FGA, FGB, FGFR2, FGG, GPC1, HRG, HTRA1, IGF2, IGHM, ITIH4, KNG1, LAMP2, LCP1, LRP1, LSAMP, LYVE1, M CAM, MMP2, MSN, NCAM1, NEGRI, NFASC, NRCAM, NRN1, NRXN1, NTM, OMG, OPCML, PLG, PRCP, RELN, RTN4R, SEMA7A, SERPINC1, SEZ6, SEZ6L2, SIRPA, SOD1, SPARC, TGFB1, THY1 | | |
| | CC2(64,2%) | ACTC1, ACTG1, AHSG, AMBP, ANG, APOA1, APOA4, APOB, APOE, APOL1, APP, C1QC, C1RL, C2, C3, C4A, C4BPA, C5, C8A, C8B, CALR, CD14, CD59, CD5L, CDH13, CFB, CFD, CFH, CFI, CFL1, CHI3L1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, CPB2, CPE, CPQ, CST3, CTSD, CXCL12, CXCL16, DCN, E CM1, EDN3, ENO2, ENPP2, F12, F2, F5, FBLN5, FETUB, FGA, FGB, FGG, FU CA2, GC, GPC1, HABP2, HTRA1, IGF2, IGFALS, IGFBP2, IGFBP7, IGHA1, IGHA2, IGHM, KLK6, KNG1, LAMP2, LCAT, LCP1, LGALS1, LTBP2, LTBP4, LUM, LYZ, M CAM, MMP2, MSN, NPPC, NRN1, ORM1, PCOLCE, PLG, PONI, PPIA, PSAP, PTGDS, PTPRG, RELN, SAA4, SEMA7A, SERPINA4, SERPINA6, SERPINC1, SERPINF2, SERPING1, SERPIN1, SEZ6, SOD1, SPARC, SPARCL1, SPOCK1, SPON1, TGFB1, TIMP1, TTR, VTN | AHSG, AMBP, ANG, APOA1, APOA4, APOB, APOE, APP, C1QC, C2, C3, C4A, C5, C8A, C8B, CALR, CD14, CD5L, CFB, CFD, CFH, CFI, COL1A2, CST3, CTSD, CXCL12, E CM1, EDN3, F12, F2, FBLN5, FETUB, FGA, FGB, FGG, GC, HABP2, HTRA1, IGF2, IGFALS, IGFBP2, IGFBP7, IGHA1, IGHA2, KLK6, KNG1, LCAT, LTBP4, LUM, LYZ, NPPC, ORM1, PLG, PONI, PPIA, PSAP, PTGDS, SAA4, SERPINA4, SERPINC1, SERPINF2, SERPING1, SOD1, TGFB1, TIMP1, TTR, VTN | CC5(30,2%) | A2M, ACTC1, ACTG1, AHSG, AMBP, APOA1, APOA2, APOA4, APOE, APOL1, C1QB, C1QC, CIR, C1S, C3, C4A, C4BPA, C8A, C9, CD5L, CFB, CFH, F2, FGA, FGB, FGG, GC, HPR, HRG, IGHA1, IGHA2, IGHM, IGLL5, ITIH1, ITIH2, ITIH4, KNG1, LAMP2, LCP1, LGALS1, LTBP2, LTBP4, LUM, MSN, ORM1, PFN1, PLG, PONI, SERPINC1, SERPINF2, SERPING1, VTN | ACTG1, AHSG, AMBP, APOA1, APOA4, APOB, APOE, APOL1, APP, C1QC, C3, C4A, C4BPA, C8A, CALR, CD14, CD59, CD5L, CDH13, CFB, CFH, CFL1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, CPE, CTSD, CXCL16, DCN, E CM1, ENO2, ENPP2, F12, F2, F5, FBLN5, FGA, FGB, FGFR2, FGG, GC, GPC1, HPR, HRG, HTRA1, IGF2, IGFBP7, IGHA1, IGHA2, IGHM, ITIH1, ITIH2, ITIH4, KNG1, LAMP2, LCP1, LGALS1, LTBP2, LTBP4, LUM, MMP2, MSN, NID1, ORM1, PCOLCE, PLG, PONI, RARRES2, SEMA7A, SERPINC1, SERPINF2, SERPING1, SOD1, SPARC, TGFB1, VTN | |
| | CC3(60,5%) | A2M, AGRN, AHSG, AMBP, ANG, APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOE, APOL1, APOM, APP, BCAN, C1QA, C1QB, C1QC, CIR, C1S, C2, C3, C4A, C4BPA, C5, C6, C8A, C8B, C9, CALR, CD14, CD55, CD5L, CFB, CFD, CFH, CFI, CNTN2, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL6A1, CST3, CTSD, CXCL12, CXCL16, DCN, E CM1, EDN3, ENPP2, F12, F2, F5, FAM3C, FBLN5, FETUB, FGA, FGB, FGFR2, FGG, FOLR2, GC, HABP2, HEG1, HPR, HRG, HTRA1, IGF2, IGFALS, IGFBP2, IGFBP7, IGHA1, IGHA2, ITIH1, ITIH2, ITIH4, KLK6, KNG1, LCAT, LTBP4, LUM, LYZ, MMP2, NCAN, NID1, NPPC, NRCAM, ORM1, PLG, PONI, PPIA, PSAP, PTGDS, RARRES2, SAA4, SEMA7A, SERPINA4, SERPINC1, SERPINF2, SERPING1, SOD1, SPARC, SPOCK1, TGFB1, TIMP1, TTR, VTN | | CC6(20,1%) | ACTG1, AGRN, AHSG, APOE, CALR, CFL1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL6A1, CTSD, DCN, E CM1, FBLN5, FGFR2, HTRA1, IGFBP7, LGALS1, LTBP2, LTBP4, LUM, MMP2, NID1, PCOLCE, RARRE S2, SOD1, SPON1, TGFB1, VTN | | |
| | | | | CC7(20,1%) | AMBP, APOA1, APOA4, APP, CALR, CD55, CD59, CLSTN1, CLSTN3, CNTN2, EPHA4, FGA, FGB, FGFR2, FGG, FOLR2, IGHM, LGALS1, NCAM1, NRXN1, PLG, PLXNB2, RTN4R, RTN4RL2, SERPINF2, SPARC | | |

| Resultados Globais das Vertentes | Moléculas 1ª Grandeza | Moléculas de 1ª Grandeza depuradas | Moléculas 2ª Grandeza | Moléculas de 2ª Grandeza depuradas |
|---|---|--|--|---|
| Moléculas identificadas em cada uma das grandezas, excluindo as moléculas das listas de 1ª e 2ª grandezas depuradas | A2M, ACTC1, ACTG1, AGRN, ALCAM, APLP2, APOA2, APOL1, APOM, BCAN, C1RL, CACNA2D1, CADM1, CADM2, CADM3, CD55, CD59, CDH13, CFL1, CHI3L1, CHL1, CLSTN1, CLSTN3, CNTN2, COL1A1, COL3A1, COL6A1, CPB2, CPE, CPB, CRTAC1, CXCL16, DCN, ENO2, ENPP2, F5, FAM3C, FAT2, FGFR2, FGL2, FOLR2, FUCA2, GPC1, HEG1, HEXA, HPR, IGHM, IGLL5, ITIH1, ITIH2, ITIH4, LAMP2, LCP1, LGALS1, LTBP2, LYVE1, MCAM, MMP2, MSN, NCAM1, NCAN, NEGR1, NFASC, NID1, NRCAM, NRM1, OPCML, PCOLCE, PFM1, PLXNB2, PRCP, PTPRG, RARRES2, RELN, RTN4R, RTN4RL2, SEMATA, SERPINA6, SERPIN1, SEZ6, SIRPA, SPARC, SPARCL1, SPOCK1, SPON1, THY1, TPP1 | AHSG, AMBP, ANG, APOA1, APOA4, APOB, APOE, APP, C1QA, C1QB, C1QC, CIR, C1S, C2, C3, C4A, C5, C6, C8A, C8B, C9, CALR, CABPA, CD14, CD5L, CFB, CFD, CFH, CFI, COL1A2, CST3, CTSD, CXCL12, ECM1, EDN3, F12, F2, FBLN5, FETUB, FGA, FGB, FGG, GC, HABP2, HRG, HTRA1, IGF2, IGFALS, IGFBP2, IGFBP7, IGHA1, IGHA2, KLK6, KNG1, LCAT, LTBP4, LUM, LYZ, NPPC, ORM1, PLG, PONI, PPIA, PSAP, PTGDS, SAA4, SERPINA4, SERPINC1, SERPINF2, SERPING1, SOD1, TGFB1, TIMP1, TTR, VTN | AGRN, APLP2, APOA2, BCAN, C1S, C6, C8B, C9, CACNA2D1, CADM1, CD55, CFI, CLSTN1, CHL1, CLSTN3, CNTFR, CNTN2, COL6A1, CST3, CXCL12, DNER, EPHA4, EPHA5, FAT2, FOLR2, HABP2, IGFALS, IGFBP2, IGLL5, ITIH4, LRP1, LSAMP, LYVE1, MCAM, NEGR1, NCAM1, NCAN, NEO1, NFASC, NRCAM, NRM1, NRXN1, NTM, OMG, OPCML, PLXNB2, PRCP, RELN, RTN4R, RTN4RL2, SERPINA4, SERPINF2, SERPIN1, SERPINC1, SERPINF2, SEZ6, SEZ6L2, SIRPA, SPON1, THY1, TIMP1, TTR, WFDC1 | A2M, ACTG1, AHSG, AMBP, APOA1, APOA4, APOB, APOE, APOL1, APP, C1QC, C1QA, C1QB, CIR, C1RL, CS, C2, C3, C4A, C4BPA, C5, C8A, CALR, CD14, CD59, CD5L, CDH13, CFB, CFH, CFL1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, CPE, CTSD, CXCL16, DCN, ECM1, ENO2, ENPP2, F12, F2, F5, FBLN5, FGA, FGB, FGFR2, FGG, GC, GPC1, HRG, HTRA1, IGF2, IGFBP7, IGHA1, IGHA2, IGHM, ITIH1, ITIH2, ITIH4, KNG1, LAMP2, LCP1, LGALS1, LTBP2, LTBP4, LUM, MMP2, MSN, NID1, ORM1, PCOLCE, PLG, PONI, RARRES2, SEMATA, SERPINC1, SERPINF2, SERPING1, SOD1, SPOCK1, SPARC, TGFB1, VTN |
| Moléculas finais identificadas em cada grandeza, excluindo todas as repetições da 2ª grandeza que apareceram na 1ª grandeza | A2M, ACTC1, ACTG1, AGRN, ALCAM, APLP2, APOA2, APOL1, APOM, BCAN, C1RL, CACNA2D1, CADM1, CADM2, CADM3, CD55, CD59, CDH13, CFL1, CHI3L1, CHL1, CLSTN1, CLSTN3, CNTN2, COL1A1, COL3A1, COL6A1, CPB2, CPE, CPB, CRTAC1, CXCL16, DCN, ENO2, ENPP2, F5, FAM3C, FAT2, FGFR2, FGL2, FOLR2, FUCA2, GPC1, HEG1, HEXA, HPR, IGHM, IGLL5, ITIH1, ITIH2, ITIH4, LAMP2, LCP1, LGALS1, LTBP2, LYVE1, MCAM, MMP2, MSN, NCAM1, NCAN, NEGR1, NFASC, NID1, NRCAM, NRM1, OPCML, PCOLCE, PFM1, PLXNB2, PRCP, PTPRG, RARRES2, RELN, RTN4R, RTN4RL2, SEMATA, SERPINA6, SERPIN1, SEZ6, SIRPA, SPARC, SPARCL1, SPOCK1, SPON1, THY1, TPP1 | AHSG, AMBP, ANG, APOA1, APOA4, APOB, APOE, APP, C1QA, C1QB, C1QC, CIR, C1S, C2, C3, C4A, C5, C6, C8A, C8B, C9, CALR, C4BPA, CD14, CD5L, CFB, CFD, CFH, CFI, COL1A2, CST3, CTSD, CXCL12, ECM1, EDN3, F12, F2, FBLN5, FETUB, FGA, FGB, FGG, GC, HABP2, HRG, HTRA1, IGF2, IGFALS, IGFBP2, IGFBP7, IGHA1, IGHA2, KLK6, KNG1, LCAT, LTBP4, LUM, LYZ, NPPC, ORM1, PLG, PONI, PPIA, PSAP, PTGDS, SAA4, SERPINA4, SERPINC1, SERPINF2, SERPING1, SOD1, TGFB1, TIMP1, TTR, VTN | CNTFR, DNER, EPHA4, EPHA5, LRP1, LSAMP, NEO1, NRXN1, NTM, OMG, SEZ6L2, WFDC1 | C1RL, CS, F5 |

Quadro 1: Categorias classificadas em primeira e segunda grandeza. Moléculas classificadas em primeira e segunda grandezas e primeira e segunda grandezas depuradas. K: vias do KEEG. PB: categorias dos processos biológicos. FM: categorias das funções moleculares. CC: categorias do componente celular. (%): percentagem que representa o número de intersecções da categoria no total de intersecções existentes.

Tabela 8. Moléculas representativas de modulações inter-vertentes

| INTERAÇÃO de 1ª GRANDEZA | Moléculas das Interações |
|----------------------------------|--|
| K + PB + FM + CC | A2M, AGRN, ALCAM, C1QA, C1QB, CIR, C1S, C2, C3, C4A, C5, CFB, CFD, CFH, CFI, CIQC, F12, F2, F5, FGA, FGB, FGG, KNG1, NRXN1, PLG, SERPINC1, SERPINF2, SERPING1, VTN |
| INTERAÇÕES de 2ª GRANDEZA | |
| K + PB + CC | C4BP4, C6, C8A, C8B, C9, CD14, CD55, CD59, CNTN2, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL6A1, CPB2, NCAM1, NEO1, NFASC, NRCAM, RELN, SOD1 |
| K + PB + FM | NRXN3 |
| K + CC + FM | CADM1, CADM3, NRXN2 |
| PB+CC+FM | AHSG, AMBP, ANG, APLP1, APLP2, APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOE, APOM, APP, C1RL, CALR, CDH13, CLSTN1, CLSTN3, CST3, CTSD, CXCL12, DCN, DNER, ENPP2, FBLN5, FETUB, HABP2, HGR, HPR, HTRA1, IGFBP2, ITIH1, ITIH2, ITIH4, ITIH5, KLK6, LRP1, LTBP2, LUM, MMP2, NCAN, NID1, PCOLCE, PEBP1, PON1, RARRES2, SERPINA4, SERPINA6, SERPINI1, SPARC, SPOCK1, TGFBI, TPP1, WFDC1, WFIKKN2 |
| INTERAÇÕES de 3ª GRANDEZA | |
| K + CC | CFL1, NEGR1 |
| PB+CC | APOL1, B3GNT2, B4GAT1, BCAN, CD5L, CHL1, CNDP1, CPQ, CXCL16, ECM1, EPHA4, EPHA5, FAM3C, FGL2, FOLR2, GPC1, IGF2, IGFALS, IGFBP7, IGHA1, IGHA2, IGHM, IGLL5, LAMP2, LCAT, LSAMP, LYVE1, LYZ, MCAM, NTM, OMG, OPCML, ORM1, PGLYRP2, PRCP, PSAP, PTPRZ1, RGMB, SCG3, SIRPA, SPON1, THY1, TIMP1, TTR |
| CC+FM | CADM2, CDH10, CNTFR, CPE, CRTAC1, EDN3, FAT2, FGFR2, FSTL4, HEG1, LCP1, LTBP2, MEGF8, MSN, NELL2, NPPC, PCDH9, PFN1, SPARCL1 |

Moléculas que se apresentaram com intersecções nos quatro grupos (K: KEEG; PB: Processos Biológicos; CC: Componente Celular; FM: Função Molecular). As moléculas de primeira grandeza e primeira grandeza depuradas estão indicadas em amarelo e verde, respectivamente.

4.4. Mecanismos Moleculares Evidenciados pela Análise Global da Modelagem

Os termos GO enriquecidos foram semanticamente agrupados e visualizados usando REVIGO. Com base nos GOs obtidos das 27 categorias apontadas em processos biológicos pelo DAVID, as proteínas foram organizadas em famílias e superfamílias pela ferramenta REVIGO, evidenciando nove superfamílias (Figura 3). O conjunto de proteínas pertencentes a essas superfamílias e famílias foram analisadas no Diagrama de Venn para obtenção da intersecção entre as mesmas (Tabela 9).

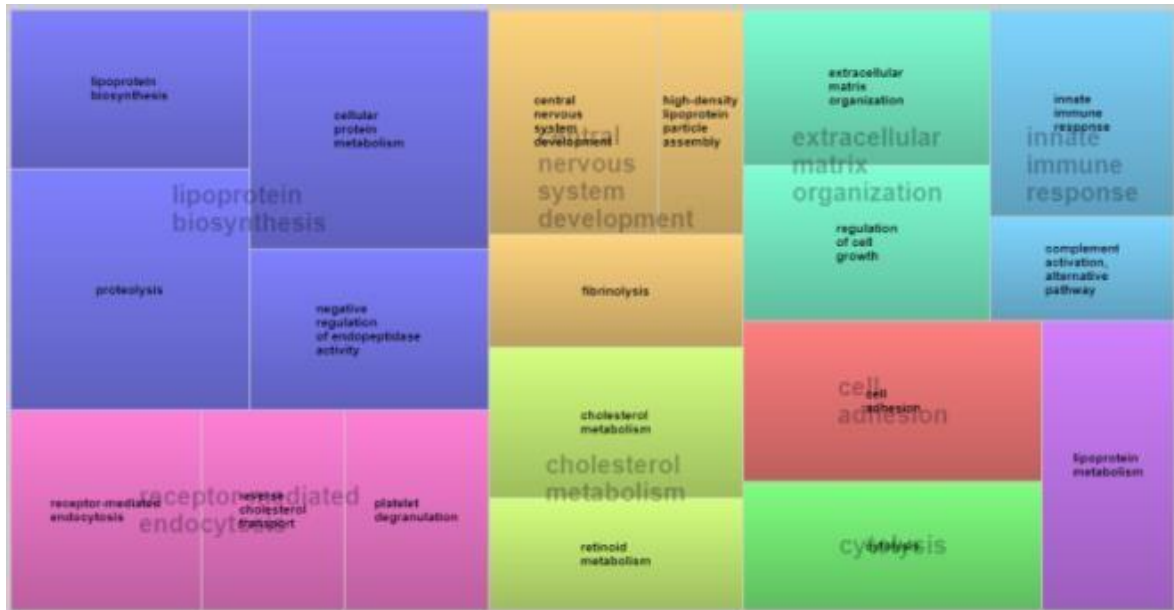


Figura 3. Famílias e superfamílias apontadas em processos biológicos. Categorias de ontologia genética (GO) agrupados pelo REVIGO. Os 27 GO dos processos biológicos ($p < 0,00001$) evidenciadas pelo DAVID agrupados pelo REVIGO evidenciaram nove superfamílias.

Tabela 9 Intersecção das superfamílias apontadas nos processos biológicos

| SF | N | SF | N |
|--|----|---|----|
| A Lipoprotein biosynthesis | 67 | F Central nervous system development | 26 |
| B Receptor-mediated endocytosis | 48 | G Cholesterol metabolism | 15 |
| C Cell adhesion | 34 | H Lipoprotein metabolism | 9 |
| D Innate immune response | 33 | I Cytolysis | 6 |
| E Extracellular matrix organization | 27 | | |

Combinações das Proteínas nas superfamílias

| SF | Proteínas | SF | Proteínas |
|-------------|-----------------------------|-----|---|
| A B C D E G | APP* | A B | AHSG, A2M*, APLP2, F5, IGF2, ITIH4, KNG1, SERPINA4, TIMP1 |
| A B D E F | FGA | A C | HABP2, IGFALS |
| A B F G H | APOA1*, APOA2, APOA4, APOE* | A D | C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1RL, C1S, C2, C3, C4A, CFB |
| B D G H I | APOL1 | A E | HTRA1, IGFBP2, WFDC1 |
| A B C E | VTN | A F | CPB2, F2, SERPINI1, TPP1, |
| A B D F | SERPING1 | A I | LYZ |
| A B G H | APOB*, LCAT | B D | CD14, IGHA1, IGHA2 |
| B D E F | FGB | B E | SPARC* |
| B F G H | APOM | B G | RARRES2 |
| A B C | AMBP | C E | CLSTN1, COL1A1, COL6A1, IGFBP7 |
| A B D | CFD, CFI | C F | CNTN2 |
| A B F | HRG, PLG, SERPINF2 | D F | F12 |
| A C E | SPOCK1, TGFB1 | D I | C6, C8A, C8B |
| A C F | RELN | E F | BCAN |
| A D I | C5 | E G | AGRN |
| A E G | TTR | | |
| B E F | FGG | | |
| B G H | LRP1 | | |
| C E F | NCAN | | |

Superfamílias (SF) apontadas nos processos biológicos. Representação em forma de tabela das SF e proteínas que pertencem às intersecções e a relação das que pertencem somente a sua respectiva superfamília. N: número de moléculas em cada SF. As proteínas iluminadas em verde são as depuradas de primeira grandeza e as indicadas com asterisco (*) foram realçadas no estudo e sua concentração foi analisada em pg/ml, utilizando a técnica do Luminex®.

A análise da rede de interações físicas e vias de sinalização, a partir das proteínas pertencentes a intersecção de até duas superfamílias dos processos biológicos (Figura 4), evidenciou o nível de interação e identificou os *betweenness* e *degree* (Tabela 10).

Essa análise apontou as seguintes moléculas com alto nível de *betweenness*: SERPING1, CIS, CIR, C5, CF1, C6, C2 e C8A e alto nível de *degree*: PLG, APOA1, C8A, C2, C5, CPB2, C8B, APOA2 (primeira grandeza descrita na análise posterior) (Tabela 10).

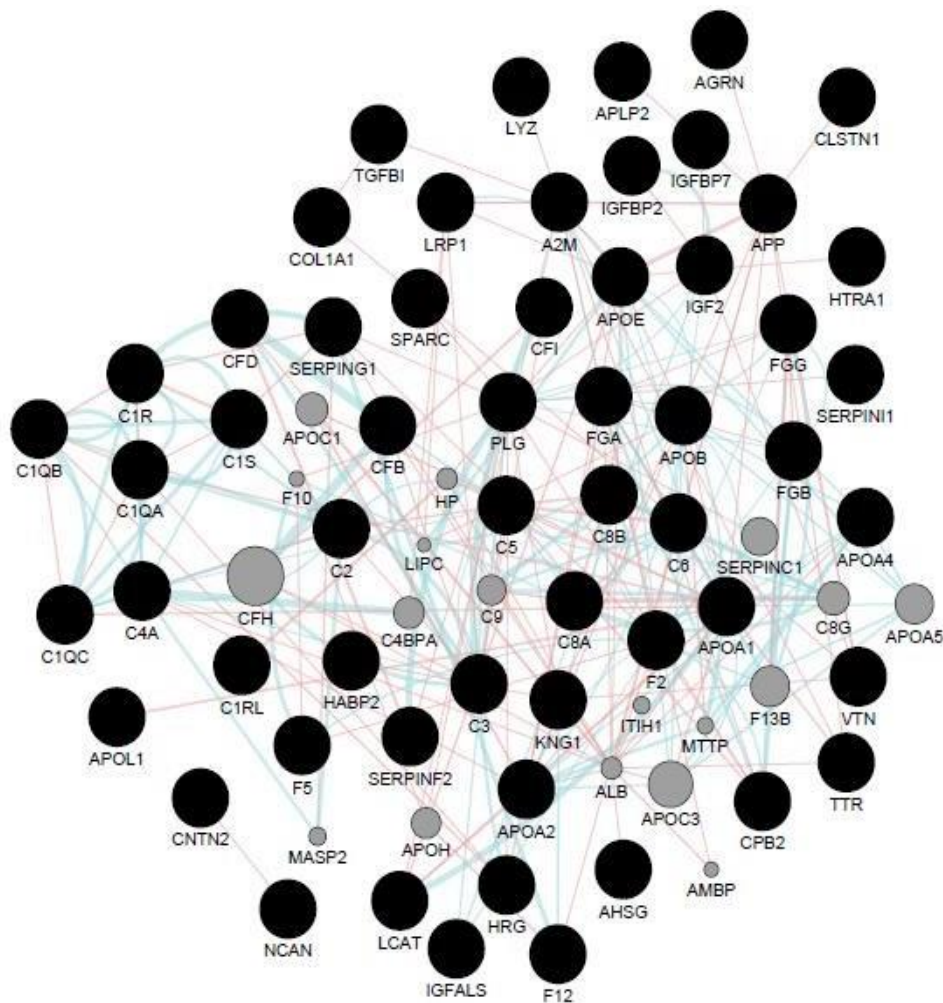


Figura 4. Rede de interação criada a partir das proteínas pertencentes a intersecção de até duas superfamílias dos processos biológicos. Linhas de interações físicas (vermelho) e de vias (azul). Os círculos em preto representam as moléculas incluídas na análise e os círculos cinza foram incluídos durante a construção da rede para estabelecer as conexões.

Tabela 10. Moléculas da rede de interações ranqueadas por *betweenness* e *degree*

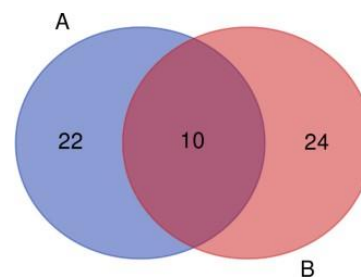
| <i>Betweenness</i> | | | | | | <i>Degree</i> | | | | | |
|--------------------|-----------|------|----|-----------|------|---------------|-----------|------|----|-----------|------|
| N | Proteínas | Nota | N | Proteínas | Nota | N | Proteínas | Nota | N | Proteínas | Nota |
| 1 | SERPING1 | 168 | 16 | CD14 | 64 | 1 | PLG | 133 | 16 | HABP2 | 95 |
| 2 | C1S | 134 | 17 | APOA1* | 63 | 2 | APOA1* | 125 | 17 | C1S | 93 |
| 3 | CIR | 130 | 18 | FGA | 63 | 3 | C8A | 124 | 18 | CIR | 93 |
| 4 | C5 | 114 | 19 | CFB | 60 | 4 | C2 | 117 | 19 | HRG | 93 |
| 5 | CFI | 107 | 20 | SERPINF2 | 53 | 5 | C5 | 116 | 20 | AHSG | 90 |
| 6 | C6 | 104 | 21 | APP* | 51 | 6 | CPB2 | 110 | 21 | CFI | 89 |
| 7 | C2 | 95 | 22 | C8B | 51 | 7 | C8B | 110 | 22 | F2 | 89 |
| 8 | C8A | 94 | 23 | C3 | 51 | 8 | APOA2 | 109 | 23 | APOE* | 86 |
| 9 | SPARC* | 94 | 24 | APOB* | 47 | 9 | C3 | 108 | 24 | ITIH4 | 86 |
| 10 | APOE* | 92 | 25 | FGB | 47 | 10 | APOB* | 106 | 25 | F12 | 86 |
| 11 | CPB2 | 88 | 26 | F2 | 42 | 11 | CFB | 104 | 26 | FGA | 80 |
| 12 | KNG1 | 75 | 27 | RARRES2 | 42 | 12 | KNG1 | 103 | 27 | TTR | 75 |
| 13 | A2M* | 69 | 28 | ITIH4 | 39 | 13 | C6 | 99 | 28 | SERPINA4 | 70 |
| 14 | PLG | 66 | 29 | HRG | 37 | 14 | SERPINF2 | 99 | 29 | VTN | 67 |
| 15 | HABP2 | 64 | 30 | LRP1 | 35 | 15 | SERPING1 | 95 | 30 | FGB | 66 |

Moléculas evidenciadas nas redes de interações físicas e de vias de sinalização. Lista das 30 moléculas com os valores mais elevados de *betweenness* e *degree*, das proteínas pertencentes a intersecção de até duas superfamílias dos processos biológicos. As proteínas iluminadas em verde são as depuradas de primeira grandeza e as indicadas com um asterisco (*) foram realçadas no estudo e sua concentração foi analisada em pg/ml, utilizando a técnica do Luminex® (Análise adiante).

A análise dos dados obtidos a partir das vias de sinalização (KEGG) e das superfamílias dos processos biológicos evidenciou as categorias adesão celular e matriz extracelular. A Tabela 11 representa a análise da intersecção dessas duas superfamílias apontadas. Foram observadas 10 proteínas que fazem parte dessas duas superfamílias (APP*, BCAN, CLSTN1, COL1A1, COL6A1, IGFBP7, NCAN, SPOCK1, TGFB1, VTN). A análise das redes de interações físicas e vias de sinalização (Figura 5) e o grau de centralidade das moléculas através das notas obtidas no *betweenness* e *degree* (Tabela 12) evidenciaram neste momento as moléculas APP e IGFBP7.

Tabela 11. Intersecção duas superfamílias processos biológicos

| SF | Proteínas |
|-----|---|
| A B | APP*, BCAN, CLSTN1, COL1A1, COL6A1, IGFBP7, NCAN, SPOCK1, TGFB1, VTN |
| A | A2M*, AGNR, CLSTN3, COL1A2, COL3A1, DCN, FBLN5, FGA, FGB, FGG, HTRA1, IGFBP2, LCP1, LTBP4, LUM, MMP2*, NID1, PLG, SPARC*, TIMP1, TTR, WFDC1 |
| B | ALCAM*, AMBP, APLP1, CDH13, CHL1, CNTN2, CNTNAP4, CXCL12*, EPHA4, HABP2, IGFALS, LSAMP, LYVE1, MCAM, NCAM*, NEO1, NTM, OMG, OPCML, RELN, RGMB, SIRPA, SPON1, THY1 |



Superfamílias (SF) apontadas nos processos biológicos. Representação gráfica e em forma de tabela das proteínas que pertencem à intersecção e a relação das que pertencem somente a sua respectiva superfamília. A letra A representa a superfamília da matriz extracelular e a B das células de adesão. As proteínas iluminadas em verde são as depuradas de primeira grandeza e as indicadas com um asterisco (*) foram realçadas no estudo e sua concentração foi analisada em pg/ml, utilizando a técnica do Luminex®.

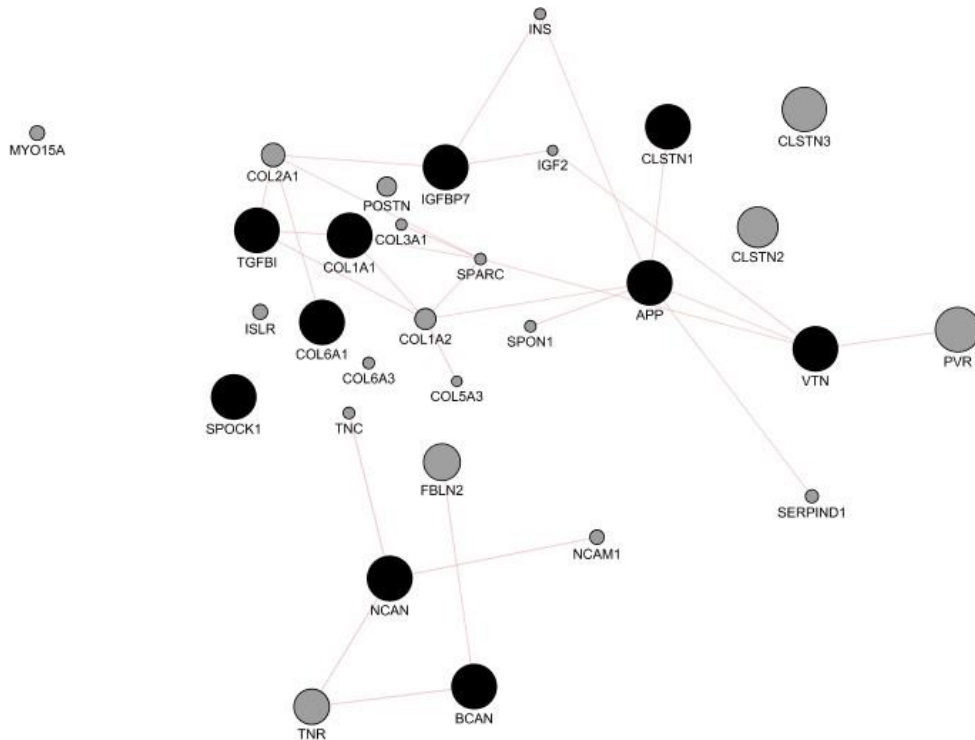


Figura 5. Rede de interação criada a partir das dez proteínas pertencentes a intersecção das duas superfamílias matriz extracelular e células de adesão. Linhas de interações físicas (vermelho) e de vias (azul). Os círculos em preto representam as moléculas incluídas na análise e os círculos cinza foram incluídos durante a construção da rede para estabelecer as conexões.

Tabela 12. Moléculas da rede de interações ranqueadas por *betweenness* e *degree*

| <i>Betweenness</i> | | <i>Degree</i> | |
|--------------------|------|---------------|------|
| Proteínas | Nota | Proteínas | Nota |
| APP* | 85,5 | COL1A1 | 35 |
| IGFBP7 | 67,1 | COL6A1 | 28 |
| COL1A1 | 47,3 | IGFBP7 | 19 |
| VTN | 36,8 | TGFBI | 16 |
| NCAN | 23,1 | APP* | 13 |
| CLSTN1 | 17,4 | NCAN | 10 |
| COL6A1 | 16,1 | CLSTN1 | 10 |
| TGFBI | 13,3 | VTN | 8 |
| SPOCK1 | 7,1 | SPOCK1 | 7 |
| BCAN | 5,41 | BCAN | 6 |

Lista das 10 proteínas com os principais escores de *betweenness* e *degree* pertencentes a intersecção das duas superfamílias matriz extracelular e células de adesão. As proteínas iluminadas em verde são as depuradas de primeira grandeza e as indicadas com um asterisco (*) foram realizadas no estudo e sua concentração foi analisada em pg/ml, utilizando a técnica do Luminex® (Análise adiante)

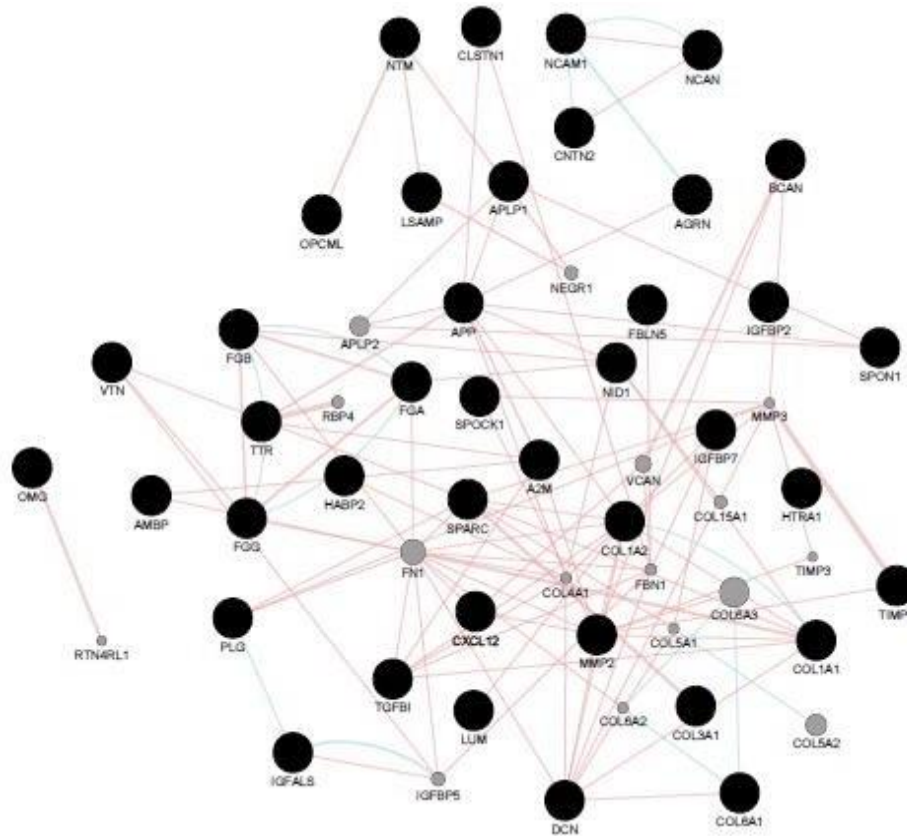


Figura 6. Rede de interações física e vias de sinalização criada a partir das 46 proteínas pertencentes às superfamílias matriz extracelular e células de adesão, utilizada para identificação do nível de interação entre proteínas e para identificar *betweenness* e *degree*. As linhas rosa e azul representam interações físicas e vias de sinalização, respectivamente.

Tabela 13. Moléculas da rede de interações ranqueadas por *betweenness* e *degree*

| <i>Betweenness</i> | | | | <i>Degree</i> | | | |
|--------------------|------|-----------|------|---------------|------|-----------|------|
| Proteínas | Nota | Proteínas | Nota | Proteínas | Nota | Proteínas | Nota |
| APP* | 143 | APLP1 | 66 | COL1A2 | 89 | SPOCK1 | 46 |
| SPARC* | 136 | DCN | 61 | MMP2* | 82 | HABP2 | 43 |
| LSAMP | 131 | IGFBP7 | 58 | SPARC* | 74 | FBLN5 | 43 |
| HABP2 | 128 | NEO1 | 56 | COL3A1 | 70 | LSAMP | 41 |
| CDH13 | 118 | CNTNAP4 | 55 | COL1A1 | 67 | HTRA1 | 41 |
| RELN | 114 | OPCML | 51 | COL6A1 | 64 | THY1 | 39 |
| A2M* | 101 | THY1 | 50 | DCN | 63 | FGA | 33 |
| SPON1 | 98 | TGFBI | 49 | LUM | 62 | APLP1 | 32 |
| SPOCK1 | 93 | CNTN2 | 45 | NID1 | 61 | SPON1 | 31 |
| COL1A2 | 92 | COL3A1 | 43 | CXCL12* | 60 | CNTN2 | 31 |
| LUM | 91 | TTR | 39 | APP* | 52 | NEO1 | 30 |
| FBLN5 | 88 | FGB | 36 | A2M* | 52 | MCAM | 30 |
| CXCL12* | 85 | FGA | 36 | IGFBP7 | 51 | FGG | 30 |
| MMP2* | 73 | HTRA1 | 32 | CDH13 | 49 | TIMP1 | 30 |
| NID1 | 70 | NCAM1* | 30 | TGFBI | 49 | FGB | 29 |

Lista das proteínas com os principais escores de *betweenness* e *degree* obtidas das duas superfamílias matriz extracelular e células de adesão. As proteínas iluminadas em verde são as depuradas de primeira grandeza e as indicadas com um asterisco (*) foram realçadas no estudo e sua concentração foi analisada em pg/ml, utilizando a técnica do Luminex®

4.5. Modelagem com Foco em Componentes Celulares e Funções Moleculares Possivelmente Modificados pelas CTM

A análise enriquecida das 220 proteínas desreguladas evidenciou mais duas categorias, Componentes Celulares (Tabela 5) e Funções Moleculares (Tabela 6). Seguindo o mesmo padrão de análise das categorias anteriores, os GOs dos termos apontados pelo DAVID e suas respectivas proteínas foram dispostas em famílias e superfamílias pela ferramenta REVIGO, as que se referem a componentes celulares estão representadas na Figura 7 e as observadas em funções moleculares estão demonstradas na Figura 9.

Em uma segunda etapa, as proteínas pertencentes a essas superfamílias e famílias foram analisadas no Diagrama de Venn para obtenção da intersecção entre as mesmas. Na Tabela 14, observam-se os dados referentes aos componentes celulares e na Tabela 16, os dados referentes a funções moleculares.

Com o propósito de identificarmos redes e vias de interação proteína-proteína que podem estar relacionadas com o efeito das células-tronco, utilizamos plataforma *Cytoscape*, na qual foram inseridas as proteínas obtidas da intersecção dos componentes celulares (113 proteínas) e das funções moleculares (25 proteínas). Esses dados podem ser observados nas Figuras 8 e 10, respectivamente. Os *betweenness* e *degree* estão listados na Tabela 15 e 17, respectivamente.



Figura 7. Famílias e superfamílias apontadas em componentes celulares. Categorias de ontologia genética (GO) agrupados pelo REVIGO. Os 18 GO dos componentes celulares ($P < 0,00001$) evidenciadas pelo DAVID agrupados pelo REVIGO evidenciaram sete superfamílias.

Tabela 14. Intersecção das superfamílias apontadas nos componentes celulares

| Análise do REVIGO – Componentes Celulares | | | | | |
|--|----------------------------------|----------|-----------|--------------------------------|----|
| SF | | N | SF | Nº | |
| A | Extracellular region | 111 | E | Cell surface | 26 |
| B | External side of plasma membrane | 95 | F | Neuronal cell body | 17 |
| C | Fibrinogen complex | 85 | G | Anchored component of membrane | 15 |
| D | Lysosomal lumen | 30 | | | |

| Intersecções das Proteínas nas Superfamílias | | | |
|---|---|-----------|---|
| SF | Proteínas | SF | Proteínas |
| A B C D E | FGA, FGB, FGG, PLG, SPARC* | A C E | APOA4 |
| A B C D | AGRN, HRG, KNG1 | B C E | IGHM |
| A B C E | AMBP, APOA1*, CALR, FGFR2 | B E F | NRXN1 |
| A B C F | APOE*, C4A, SOD1 | B E G | NCAM1* |
| A B D E | APP* | A B | C5, C6, C8B, CD14, CXCL12*, CXCL16, F12, HEG1 NRCAM |
| A B E G | CD55 | A C | APOA2, APOL1, APOM, C1QB, C1QC, C1R, C1S, CD5L, CFH, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL6A1, ECM1, FBLN5, HPR, IGFBP7, ITIH1 ITIH2, LTBP4, NID1, PON1, RARRES2, VTN |
| A C D E | SERPINF2 | A D | CFD, PSAP |
| A C D G | BCAN | A E | FOLR2 |
| B C D G | GPC1 | A F | ANG, CST3 |
| B E F G | CNTN2, RTN4R | B C | ACTG1, CHL1, IGLL5, MSN, RELN |
| A B C | C3, C4BP4, C8A, C9, CFB, F2, HTRA1, IGHA1, IGHA2, ITIH4, MMP2*, SERPINC1, TGFB1 | B D | LAMP2 |
| A B F | APOB* | B E | CD59, EPHA4, RTN4RL2 |
| A C D | AHSG, A2M*, CTSD, DCN, GC, LUM, NCAN, ORM1, SERPING1, TIMP1 | B F | ALCAM*, CPE, DNER, EPHA5, LRP1, SEZ6, SEZ6L2 |
| | | B G | CDH13, CNTFR, LSAMP, NEGR1, NTM, NRN1, OMG, OPCML, SEMA7A |

Superfamílias (SF) apontadas nos componentes celulares. Representação em forma de tabela das proteínas que pertencem à intersecção e a relação das que pertencem somente a sua respectiva superfamília. As proteínas iluminadas em verde são as depuradas de primeira grandeza e as indicadas com um asterisco (*) foram realçadas no estudo e sua concentração foi analisada em pg/ml, utilizando a técnica do Luminex®.

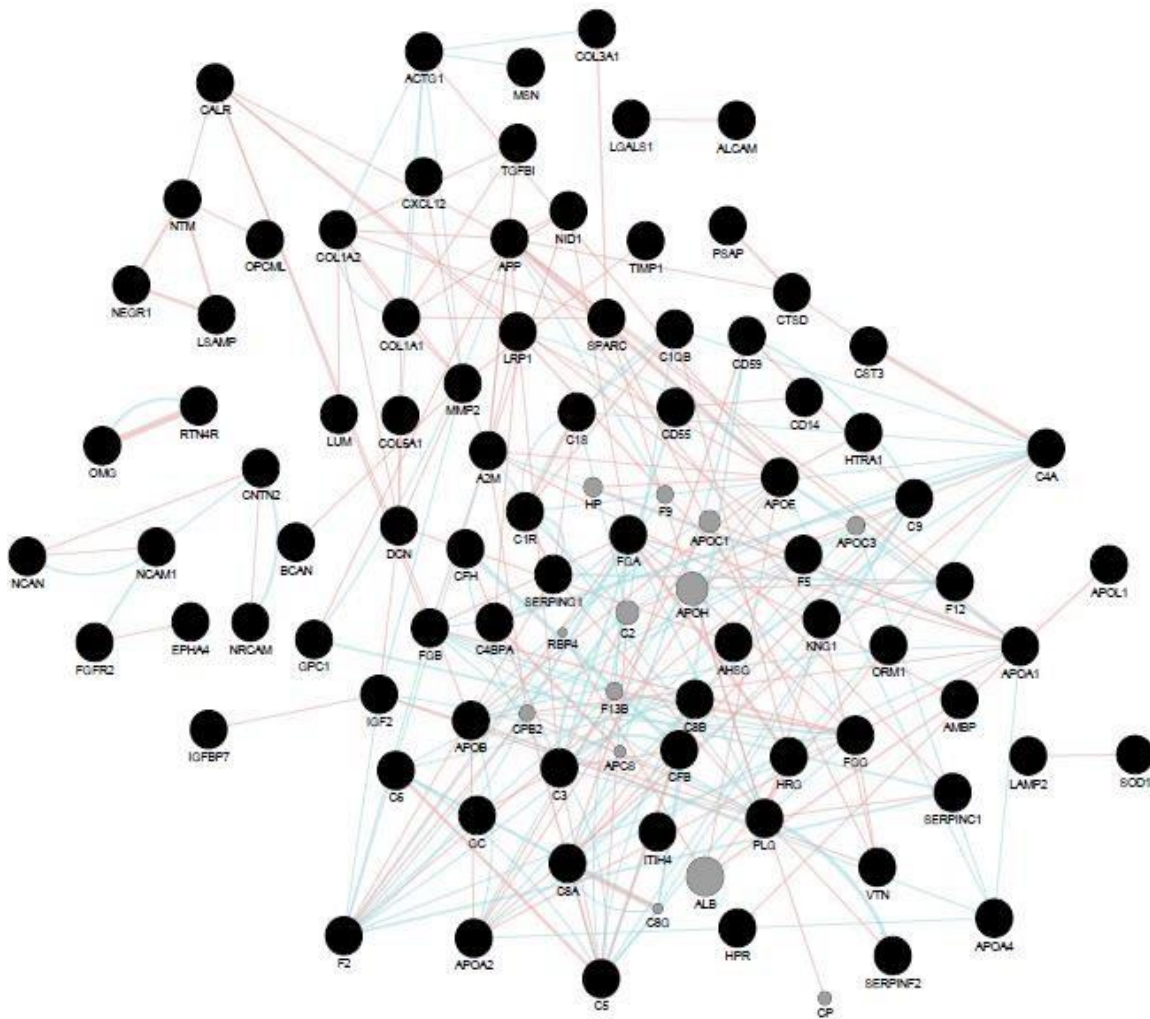


Figura 8. Rede de interações física e vias de sinalização criada a partir das 113 proteínas pertencentes a intersecção de até duas famílias ou superfamílias dos componentes celulares, utilizada para identificação do nível de interação entre proteínas e para identificar *betweenness* e *degree*. As linhas rosa e azul representam interações físicas e vias de sinalização, respectivamente. Os escores de *betweenness* e *degree* são indicados na Tabela 14.

Tabela 15. Moléculas da rede de interações ranqueadas por *betweenness* e *degree*

| <i>Betweenness</i> | | | <i>Degree</i> | | |
|--------------------|-----------|------|---------------|-----------|------|
| N | Proteínas | Nota | N | Proteínas | Nota |
| 1 | C1R | 502 | 1 | APOA1* | 134 |
| 2 | SERPING1 | 371 | 2 | PLG | 133 |
| 3 | APOE* | 341 | 3 | CFH | 122 |
| 4 | CFH | 334 | 4 | C5 | 121 |
| 5 | C1S | 325 | 5 | C8A | 120 |
| 6 | CD14 | 318 | 6 | C3 | 120 |
| 7 | C4BPA | 261 | 7 | C8B | 120 |
| 8 | A2M* | 220 | 8 | C4BPA | 119 |
| 9 | DCN | 195 | 9 | SERPINC1 | 119 |
| 10 | LUM | 185 | 10 | CFB | 115 |
| 11 | CNTN2 | 185 | 11 | ITIH2 | 113 |
| 12 | C6 | 170 | 12 | APOA2 | 113 |
| 13 | MMP2* | 153 | 13 | GC | 113 |
| 14 | IGFBP7 | 149 | 14 | AMBP | 112 |
| 15 | APOA1* | 147 | 15 | SERPING1 | 110 |
| 16 | LRP1 | 142 | 16 | ITIH1 | 110 |
| 17 | RARRES2 | 138 | 17 | KNG1 | 110 |
| 18 | CFB | 131 | 18 | C1R | 107 |
| 19 | AHSG | 125 | 19 | HRG | 107 |
| 20 | SERPINF2 | 122 | 20 | C6 | 103 |
| 21 | LGALS1 | 122 | 21 | SEERPINF2 | 103 |
| 22 | C8A | 114 | 22 | AHSG | 102 |
| 23 | ITIH2 | 113 | 23 | C1S | 101 |
| 24 | FGA | 110 | 24 | APOE* | 100 |
| 25 | C5 | 106 | 25 | APOB* | 100 |
| 26 | SPARC* | 104 | 26 | ORM1 | 99 |
| 27 | FGFR2 | 104 | 27 | ITIH4 | 97 |
| 28 | APOB* | 103 | 28 | F12 | 94 |
| 29 | NID1 | 102 | 29 | F2 | 93 |
| 30 | APP* | 97 | 30 | ANG | 91 |

Lista das 30 proteínas com os principais escores de *betweenness* e *degree* obtidas das 113 moléculas de até duas superfamílias dos componentes celulares. As proteínas iluminadas em verde são as depuradas de primeira grandeza e as indicadas com um asterisco (*) foram realçadas no estudo e sua concentração foi analisada em pg/ml, utilizando a técnica do Luminex® (Análise adiante).

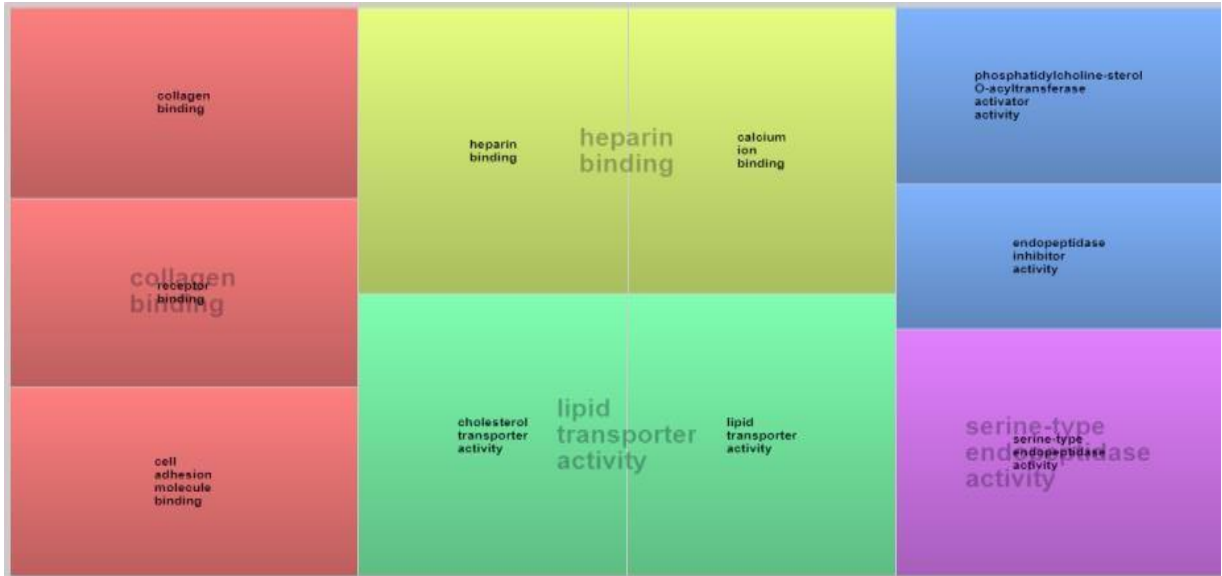


Figura 9. Famílias e superfamílias apontadas em funções moleculares. Categorias de ontologia genética (GO) agrupados pelo REVIGO. Os 12 GO das Funções moleculares ($P < 0,0001$) evidenciadas pelo DAVID agrupados pelo REVIGO evidenciaram cinco superfamílias

Tabela 16. Intersecção das superfamílias apontadas nas funções moleculares

| Análise do REVIGO – Funções Moleculares | | | |
|---|--|------------|----------------------|
| | Superfamílias | | Nº |
| A | Heparin binding | | 46 |
| B | Collagen Binding | | 38 |
| C | Serine-type endopeptidase activity | | 23 |
| D | Phosphatidylcholine - sterol O -acyltransferase activator activity | | 13 |
| E | Lipid transporter activity | | 6 |
| Intersecções das Proteínas nas Superfamílias | | | |
| SF | Proteínas | SFs | Proteínas |
| A B C | F2 | A E | APOB* |
| A D E | APOE* | B C | PLG |
| B C D | C3 | B D | A2M*, C5 |
| A B | APP*, ANG, HRG, KNG1, NID1, NRXN1, PCOLCE, SPARC*, SPARCL, VTN | C D | C4A |
| A C | C1S, C1R, F12, HABP2 | D E | APOA1*, APOA2, APOA4 |

Superfamílias (SF) apontadas em funções moleculares. Representação em forma de tabela das proteínas que pertencem à intersecção e a relação das que pertencem somente a sua respectiva superfamília. As proteínas iluminadas em verde são as depuradas de primeira grandeza e as indicadas com um asterisco (*) foram realçadas no estudo e sua concentração foi analisada em pg/ml, utilizando a técnica do Luminex®

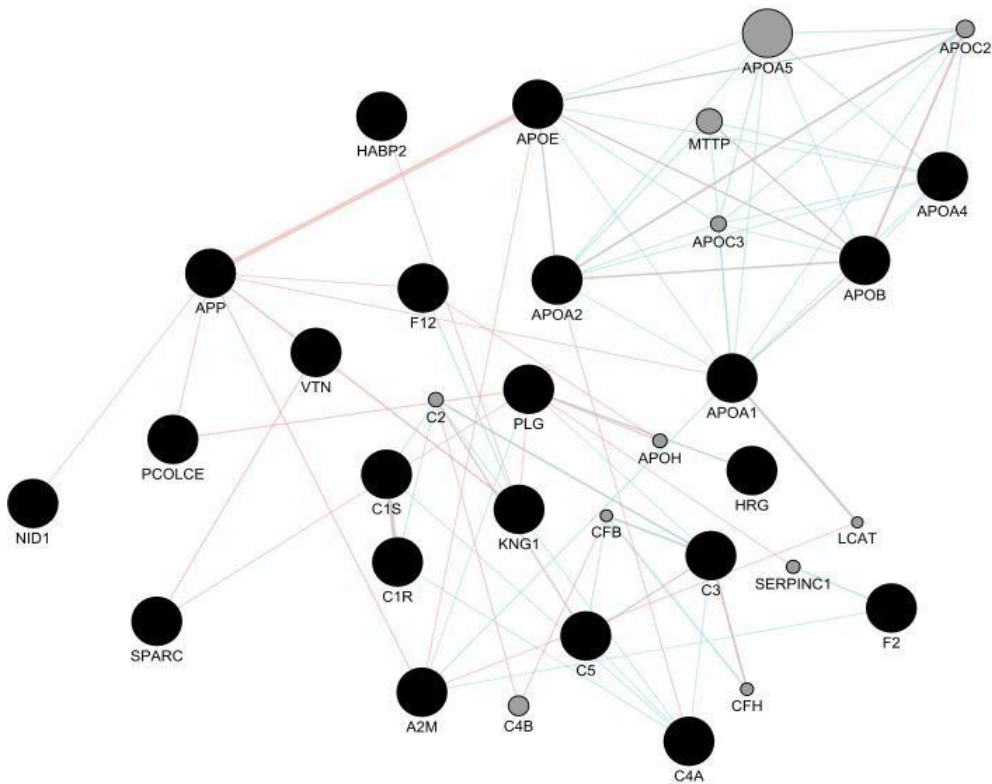


Figura 10. Rede de interações física e vias de sinalização criada a partir das 25 proteínas pertencentes a intersecção de até duas famílias ou superfamílias das funções moleculares, utilizada para identificação do nível de interação entre proteínas e para identificar *betweenness* e *degree*. As linhas rosa e azul representam interações físicas e vias de sinalização, respectivamente. Os escores de *betweenness* e *degree* são indicados na Tabela 17.

Tabela 17. Moléculas da rede de interações ranqueadas por *betweenness* e *degree*

| <i>Betweenness</i> | | | | <i>Degree</i> | | | |
|--------------------|------|-----------|------|---------------|------|-----------|------|
| Proteínas | Nota | Proteínas | Nota | Proteínas | Nota | Proteínas | Nota |
| APOB* | 79 | C1R | 16 | C3 | 69 | A2M* | 40 |
| C5 | 64 | APOA4 | 14 | APOA1 | 67 | C1R | 40 |
| A2M* | 62 | C4A | 13 | C5 | 66 | APOA4 | 38 |
| C3 | 50 | KNG1 | 11 | APOB* | 62 | VTN | 34 |
| HABP2 | 45 | HRG | 9 | PLG | 61 | F2 | 33 |
| APOE* | 44 | SPARCL1 | 9 | APOA2 | 58 | PCOLCE | 25 |
| F12 | 37 | VTN | 9 | F12 | 48 | C4A | 23 |
| C1S | 29 | ANG | 6 | KNG1 | 48 | APP* | 20 |
| APOA1* | 29 | SPARC | 4 | HRG | 48 | SPARCL1 | 18 |
| PLG | 22 | F2 | 3 | HABP2 | 47 | SPARC* | 15 |
| APOA2 | 22 | NID1 | 1 | APOE* | 46 | NID1 | 12 |
| PCOLCE | 17 | NRXN1 | 0 | C1S | 45 | NRXN1 | 3 |
| APP* | 17 | | | ANG | 41 | | |

Lista das proteínas com os principais escores de *betweenness* e *degree* a partir da rede de interações físicas e vias de sinalização das 25 proteínas pertencentes a intersecção de até duas famílias ou superfamílias das funções moleculares. As proteínas iluminadas em verde são as depuradas de primeira grandeza e as indicadas com um asterisco (*) foram realizadas no estudo e sua concentração foi analisada em pg/ml, utilizando a técnica do Luminex®

4.6. Moléculas em Realce a Partir da Análise Conjunta da Criteriorização Estabelecida

A análise conjunta da criteriorização apresentada, levando-se em consideração a representação de moléculas apontadas na análise enriquecida pela modulação intra-vertente e inter-vertente, grau de força de ligação apontadas pelas redes de interações moleculares, vias de sinalização e disposição de famílias e superfamílias pela ferramenta REVIGO, destacaram-se as moléculas A2M, ALCAM, APOA1, APOB, APOE, APP, CHI3L1, CXCL12, MMP2, NCAM1 e SPARC.

Tabela 18. Resumo das proteínas relevantes

| ALVO | DAVID | | | | Cytoscape (TOP 50) | | Intra-vertentes | | Inter-vertentes | |
|--------|-------|----|----|----|--------------------|---|-----------------|------------|-----------------|--------|
| | K | PB | CC | FM | B | D | 1ª Gdz | 1ª Gdz dep | 1ª Gdz | 2ª Gdz |
| A2M | X | X | X | X | X | X | X | | X | |
| ALCAM | X | X | X | X | | | X | | X | |
| APOA1 | | X | X | X | X | X | | X | X | X |
| APOB | | X | X | X | | X | | X | X | X |
| APOE | | X | X | X | X | X | | X | X | X |
| APP | | X | X | X | X | X | | X | X | X |
| CHI3L1 | | | X | | | | | | X | |
| CXCL12 | | X | X | X | | | | X | X | X |
| MMP2 | | X | X | X | X | X | | X | X | |
| NCAM1 | X | X | X | X | X | | | X | X | |
| SPARC | | X | X | X | | X | | X | X | |

Análise de resultados da proteômica por espectrometria de massa no líquido de doentes com ELA 30 dias após injeção de CTM. Resumo das proteínas selecionadas para validação e as respectivas categorias que elas validam. As proteínas de verde são as depuradas de primeira grandeza.

Adicionalmente, após a identificação das 220 proteínas desreguladas e posteriormente da análise enriquecida das moléculas, foram identificadas 186 moléculas pertencentes à matriz extracelular. Essas moléculas correspondem a 84% das proteínas identificadas. Além disso, 49 proteínas estão relacionadas às moléculas de adesão celular. Juntas, essas duas categorias totalizam 201 proteínas, conforme apresentado na tabela 19.

Tabela 19. Representação DAVID de “Matriz Extracelular” e “Moléculas de Adesão Celular”

| | Vias/Categorias | Moléculas: n (%) |
|---|-----------------------------------|-------------------------|
| Matriz Extracelular | K7, PB7, PB18, CC1, CC2, CC3, CC6 | 186 (84) |
| Moléculas de adesão celular | K5, PB1, MF6 | 49 (22) |
| Matriz Extracelular + Moléculas de adesão celular | | 201 (92) |

Vias/categorias do DAVID, juntamente com o número (n) de suas respectivas moléculas, relacionadas a "Matriz Extracelular" e "Moléculas de Adesão Celular". Foram descritas nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 o número e ID das vias/categorias específicas do DAVID. Além disso, também são mostradas as porcentagens (%) de moléculas agrupadas nas Vias/Categorias relacionadas a matriz extracelular e moléculas de adesão celular em relação a 220 proteínas desreguladas (Tabela 2) no líquido de indivíduos com esclerose lateral amiotrófica 30 dias após a infusão intratecal de células-tronco mesenquimais .

4.7. Análise da Regulação de Proteínas pelo LUMINEX®

Os níveis das moléculas A2M, ALCAM, APOA1, APOB, APOE, APP, CHI3L1, CXCL12, MMP2, NCAM1 e SPARC foram avaliados pela técnica Luminex nas mesmas amostras de líquido analisadas pela proteômica. A regulação foi coincidente nas moléculas ALCAM, APP, CXCL12, MMP2 e SPARC (Figura 11A-E). A2M mostrou-se diminuída pelo LUMINEX, enquanto aumentada pela proteômica (Figura 11F).

As moléculas APOA1, APOB, APOE, CHI3L1 e NCAM não se mostraram desreguladas pelo LUMINEX no líquido dos sujeitos ELA 30 dias após a infusão de CTM, a despeito de mostrarem-se dereguladas pela proteômica (Figura 12).

Os resultados em pg/ml foram apresentados segundo estratificação. A CHI3L1 mostrou-se diminuída na estratificação 2, a APOA1 mostrou tendência à elevação na estratificação 2, a APOE mostrou-se diminuída na estratificação 1 e a APOB mostrou-se inalterada nas três análises. Em relação aos resultados das regulações das moléculas CHI3L1, APOA1, APOB e APOE pelo Luminex apresentadas segundo a estratificação descrita, as moléculas CHI3L1, APOA1 e a APOE mostraram se em linha com as regulações apresentadas pela proteômica.

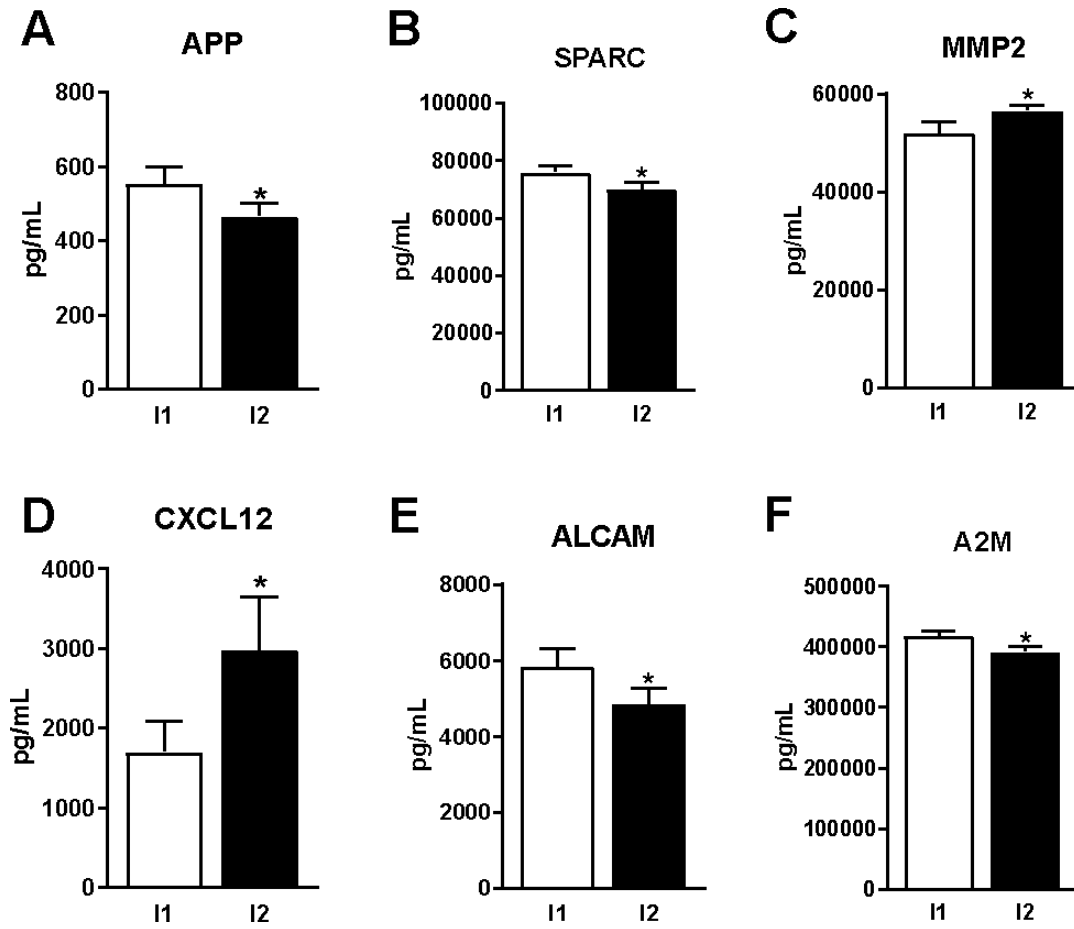


Figura 11. Análise de Luminex® das moléculas selecionadas a partir das modulações. Quantificação do APP (A), SPARC (B), MMP2 (C), CXCL12 (D), ALCAM (E) e A2M (F) no líquido doentes ELA pré (I1) e pós 30 dias (I2) da infusão das CTM. Os valores estão expressos em pg/mL. *P < 0,05 segundo teste t pareado. Os valores representam a média \pm S.E.M. dos doentes de cada grupo (n=24).

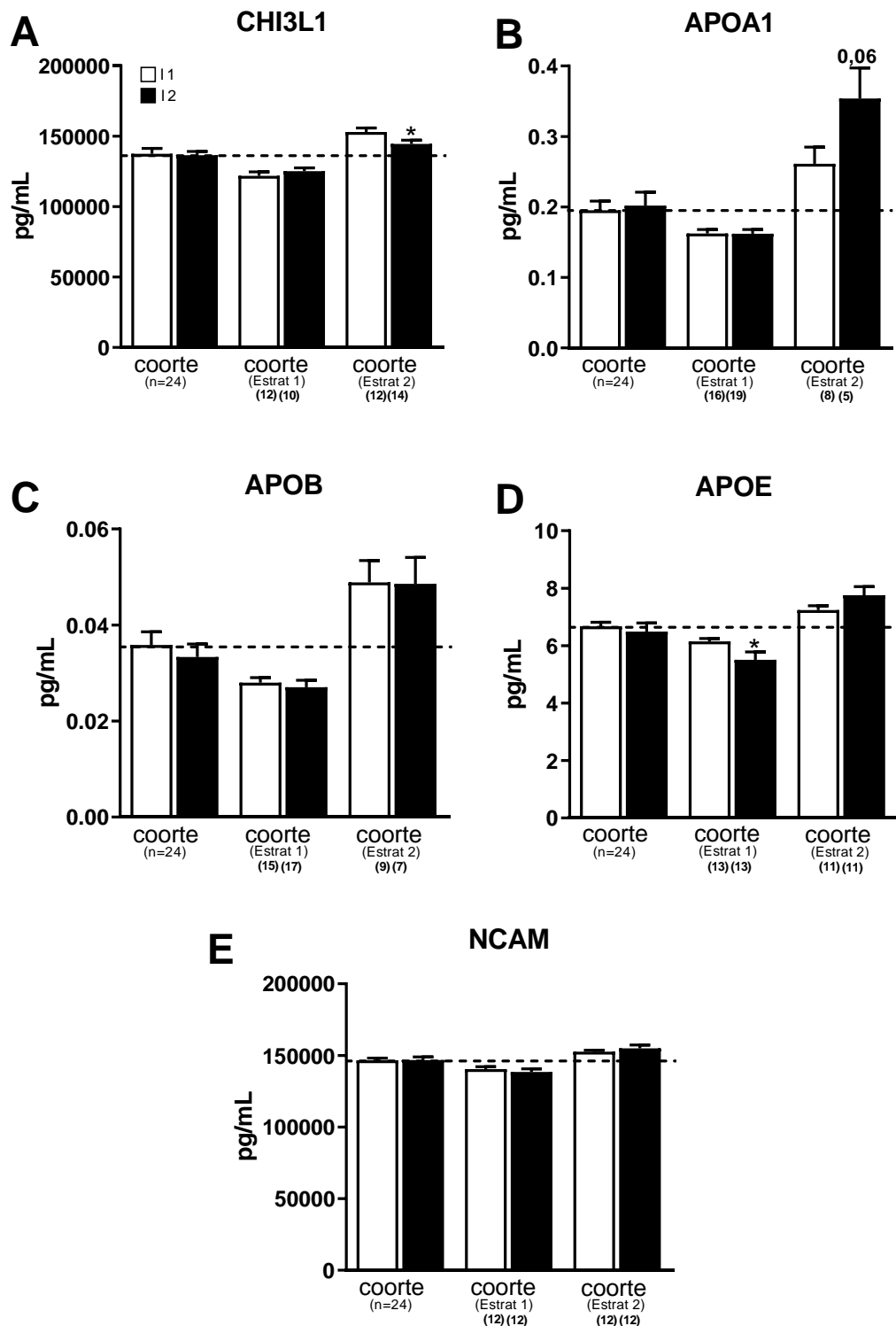


Figura 12. Regulação das moléculas CHI3L1 (A), APOA1 (B), APOB (C), APOE (D) e NCAM (E) não tiveram diferenças apontadas por meio de Luminex no líquido indivíduos com esclerose lateral amiotrófica (ELA) antes e após 30 dias da infusão de. Os indivíduos com ELA que receberam CTM foram estratificados de acordo com os valores proteicos em relação à média dos valores proteicos dos indivíduos antes da infusão para cada proteína. Foram encontrados dois grupos de valores proteicos de indivíduos estatisticamente diferentes em relação aos valores antes das células. Valores mais altos e mais baixos do momento anterior a infusão indicaram regulação positiva (para cima) e regulação negativa (para baixo), respectivamente, das proteínas avaliadas.

5. DISCUSSÃO

5.1. O potencial das CTM na ELA e após injeção intratecal

As CTM, células progenitoras multipotentes, demonstraram potencial terapêutico nas doenças neurodegenerativas por serem capazes de modular a neuroinflamação e a neuroproteção (Uccelli, Moretta, and Pistoia 2008). As CTM são usadas em diversos ensaios clínicos envolvendo terapia com células autólogas, seja por injeção intratecal ou outras vias, na avaliação de possíveis efeitos em doenças neurodegenerativas, incluindo a ELA (Petrou et al. 2016). Entretanto, poucos trabalhos detalham as respostas moleculares induzidas no indivíduo, incluindo as alterações nas proteínas no líquido de doentes com ELA que receberam infusões intratecais de CTM (Oh et al. 2018; Oh et al. 2015).

Staff e colaboradores avaliaram as concentrações do fator de crescimento endotelial vascular, do fator de crescimento placentário e do fator de crescimento fibroblástico básico no líquido de doentes com ELA sete dias após dose única de CTM autólogas derivadas do tecido adiposo (Staff et al. 2016). Embora estudos clínicos anteriores tenham fornecido evidências iniciais do potencial benefício terapêutico na ELA após o tratamento intratecal com CTM (Berry et al. 2019; Oh et al. 2018; Staff et al. 2016), as alterações proteicas e o mecanismo de ação das CTM no líquido, a longo prazo, permanecem carentes de estudos (Forostyak et al. 2014; Staff, Jones, and Singer 2019; Zhao et al. 2007).

De fato, a relação entre níveis alterados de proteínas do líquido em doentes com ELA e alterações patológicas nos neurônios motores já havia sido descrita (Collins et al. 2012; Collins et al. 2015), especialmente a diminuição das proteínas da matriz extracelular no líquido de doentes ELA quando comparado a sujeitos saudáveis nas mesmas idades (Collins et al. 2015).

O nosso estudo é pioneiro na análise proteômica por espectrometria de massa do líquido de doentes com ELA 30 dias após o tratamento com CTM. As CTM autólogas foram obtidas pelo aspirado da medula óssea dos doentes ELA, expandidas *in vitro* e injetadas intratecalmente no líquido do mesmo sujeito na região lombar da coluna vertebral. O líquido é considerado importante via para administração terapêutica e estudo de respostas moleculares pelas relações anatômicas e funcionais que estabelece com o sistema nervoso central, oferecendo uma importante oportunidade na avaliação das respostas das CTM (Krull et al. 2021).

Estudos *in vitro* demonstram que as CTM secretam fatores com propriedades tróficas

aos motoneurônios, entretanto investigações acerca das alterações efetivas no microambiente induzidas pela presença destas células injetadas no sistema nervoso ainda são escassas na literatura (Pittenger et al. 2019).

5.2. Moléculas e mecanismos destacados após infusão intratecal de CTM na ELA

Neste sentido, esse estudo analisou as respostas moleculares após injeção intratecal de CTM em doentes com ELA através da análise proteômica, metodologia essa que combina ferramentas complexas de identificação de peptídeos e proteínas nos tecidos parenquimatosos ou fluidos (Chandramouli and Qian 2009; Krause et al. 2021). Este estudo demonstrou 220 proteínas desreguladas no líquido dos sujeitos ELA 30 dias após infusão intratecal de CTM, sendo essas potencialmente importantes na determinação de biomarcadores dos efeitos da terapia celular, bem como dos mecanismos celulares e ou moleculares envolvidos nas ações das células injetadas. Adicionalmente, ferramentas bioinformáticas foram empregadas em análises enriquecidas no rastreamento dos mecanismos moleculares/celulares envolvidos bem como depurar e ressaltar biomarcadores relacionados (Sun et al. 2022; Chen et al. 2016; Collins et al. 2015). Deste modo, eventos biológicos e moleculares relacionados ao suporte, à sobrevivência neuronal e/ou à morte dos motoneurônios no microambiente da lesão na ELA, bem como o conjunto de moléculas relacionadas a essas situações, foram avaliados pela ferramenta DAVID no líquido de sujeitos que receberam as CTM no líquido.

Ressalta-se que as Redes de Interação de Proteínas (Recabarren and Alarcon 2017) empregadas neste estudo, que determinaram as principais moléculas elo de ligações dentre as 220 proteínas desreguladas descritas pela proteômica, contribuíram de modo inédito na identificação das proteínas mais relevantes, bem como os mecanismos celulares e moleculares a elas atrelados, em resposta à presença das CTM infundidas no líquido.

Este estudo também foi original no emprego da metodologia de modelagem molecular na depuração de mecanismos e proteínas relacionados ao desafio experimental deste estudo, qual seja, possíveis efeitos da CTM na ELA ou uma doença neurodegenerativa em evolução.

Notavelmente, o conjunto de análises enriquecidas, em associação com as redes de interação e as depurações intra-vertentes e inter-vertentes, realçou os mecanismos relacionados à adesão celular e à matriz extracelular como importantes nos efeitos possíveis da CTM nos doentes com ELA. Dessas análises, onze moléculas, especificamente, A2M, ALCAM, APOA1, APOB, APOE, APP, CHI3L1, CXCL12, MMP2, NCAM1 e SPARC, despontaram como potencialmente importantes às possíveis respostas à terapia celular 30 dias

após as CTM no líquido de doentes ELA. Ressalta-se que essas onze moléculas apontadas no estudo são em sua maioria integrantes da matriz extracelular e do sistema de adesão celular ou, ainda, das sinalizações celulares que participam envolvem de modo importante elementos da matriz extracelular e sistema de adesão celular (Kanchanawong and Calderwood 2023).

Dentre elas, não encontramos até o momento relatos sobre o envolvimento dessas moléculas em terapia com CTM em neurodegeneração ou doenças neurodegenerativas, que reafirma a grande importância da metodologia abordada neste estudo na depuração de moléculas e mecanismos envolvidos no tratamento com as CTM na ELA. Importante notar também que dentre as onze moléculas ressaltadas, apenas a ALCAM e a NCAM1 não foram relatadas como potencialmente envolvidas com os mecanismos da ELA, o que avança a possibilidade em uma análise inicial da regulação delas estar relacionada mais com os efeitos das CTM do que com eventos intrínsecos da neurodegeneração propriamente ditos.

Os mecanismos relacionados à adesão celular e à matriz extracelular possivelmente envolvidos nos efeitos das CTM nos doentes com ELA descritos nesse estudo parecem de fato importantes, posto que desempenham papel de destaque nas sinalizações moleculares no tecido nervoso desde o desenvolvimento até a senilidade (Tewari et al. 2022), bem como em situações fisiológicas normais (Su et al. 2021) ou patológicas (Meldolesi 2016), incluindo as doenças neurodegenerativas (Lin et al. 2021). Adicionalmente, as células tronco, bem como as CTM em particular, usam ou interagem com elementos da adesão celular e matriz extracelular para desenvolverem os inúmeros eventos ou funções já descritos nos tecidos, incluindo o sistema nervoso (Aizman et al. 2009). De fato, a adesão celular está envolvida em aspectos do desenvolvimento neuronal, incluindo as formações de feixes axonais, sinapses e redes gliais que circundam os axônios e as sinapses (Washbourne et al. 2004). As ligações físicas e químicas entre o espaço intracelular e extracelular são formadas por adesões celulares (Murasu and Schuman 1999). Moléculas de adesão são essenciais no estabelecimento e na manutenção da morfologia do tecido cerebral e funções cerebrais altamente coordenadas, como memória e aprendizagem (Sanes and Yamagata 1999; Washbourne et al. 2004; Yamagata, Sanes, and Weiner 2003). As interações entre as células e a matriz extracelular se dá através das moléculas de adesão celular, que também estão envolvidas na migração celular e na sinalização de diversos processos biológicos. As funções da adesão celular e moléculas de adesão são alvos de estudos na comunidade científica e indicadas como biomarcadores e/ou alvos farmacológicos de doenças neurodegenerativas (Wennstrom and Nielsen 2012).

A matriz extracelular é a porção não celular dos tecidos, formada por rede

tridimensional composta por macromoléculas e minerais extracelulares, fatores de crescimento, integrinas, colágeno IV, fibronectina, laminina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e enzimas proteolíticas como as metaloproteinases de matriz (MMPs), sendo secretadas pelas células adjacentes e permitem suporte bioquímico e/ou estrutural das mesmas, importantes na estabilização das junções neuromusculares e neurônios motores (Bonnans, Chou, and Werb 2014; Michel et al. 2010; Theocharis et al. 2016). As MMPs da matriz, em particular, estão relacionadas à patogênese de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Behl et al. 2021), atuando no sistema nervoso central em várias condições neurológicas, levando à quebra da barreira hematoencefálica, infiltração de células T, monócitos e macrófagos e neuroinflamação (Lukaszewicz-Zajac, Mroczko, and Slowik 2014). Em condições normais no sistema nervoso central, as MMPs são importantes na renovação da mielina, migração e sobrevivência celular, além de participar da plasticidade e fisiologia axonal (Fang et al. 2010). Ainda, as MMPs estão envolvidas na clivagem de várias proteínas e atuando assim na inflamação (Fang et al. 2010; Lukaszewicz-Zajac, Mroczko, and Slowik 2014).

Fang e colaboradores (2009) observaram níveis elevados de MMP-9 no líquido de doentes com ELA em relação a controles saudáveis, enquanto não foram avaliadas diferenças significativas de concentrações de MMP-2 no líquido de doentes com ELA em comparação aos controles. Os autores sugeriram que concentrações elevadas de MMP-9 no líquido estavam associadas a extensa degeneração neuroaxonal, rápida progressão da doença e pior sobrevida dos doentes com ELA (Fang et al. 2009). Esses mesmos autores demonstraram posteriormente, o aumento da MMP-2 e da MMP-9 na medula espinal e pele de camundongos SOD1, modelo experimental para ELA, nas fases sintomáticas da doença (Fang et al. 2010). As alterações nas MMPs selecionadas e seus níveis de inibidores teciduais também foram demonstradas no líquido e no sangue de doentes com ELA (Niebroj-Dobosz et al. 2010; Beuche et al. 2000). Os autores mostraram pelo método ELISA que no líquido de doentes com ELA as concentrações de MT-MMP-1, MMP-2 e TIMP-1 foram maiores do que nos sujeitos controles saudáveis (Niebroj-Dobosz et al. 2010). Ainda, aumento significativo das concentrações de TIMP-1 no líquido em doentes com ELA em relação ao grupo controle foi observado (Lorenzl et al. 2003). Foi sugerido que os níveis elevados de MMPs e TIMPs no líquido podem estar relacionados à ativação do sistema imunológico, enquanto concentrações mais altas de MT-MMP-1 e MMP-2 no líquido poderiam estar envolvidas no aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, já que a quebra da barreira é descrita em 20-46% dos doentes com ELA (Niebroj-Dobosz et al. 2010). Além disso, a elevação dos níveis

de MMP-2 e MT-MMP-1 pode ser resultado do desequilíbrio entre a MMP-2 e seu inibidor natural – TIMP-2 (Cabral-Pacheco et al. 2020). Deste modo, há fortes evidências de que as MMP-2 aumentada em nosso estudo, parece estar relacionada com a evolução da doença e podendo ser alvos para futuras estratégias terapêuticas usando inibidores seletivos de MMPs (Lukaszewicz-Zajac, Mroczko, and Slowik 2014).

As proteínas SPARC (do inglês *secreted protein acidic and rich in cysteine*) e SPARCL1 (do inglês *SPARC-like protein 1*) pertencem à família de proteínas da matriz extracelular (Klingler et al. 2020), são secretadas por astrócitos e promovem a formação de sinapses (Klingler et al. 2020). Camundongos *knockout* para o gene SPARCL1 apresentam menor número de sinapses excitatórias no colículo do mesencéfalo. Além da formação de sinapses, a proteína também pode ser essencial para a manutenção sináptica superior (Bradshaw and Sage 2001; Brekken and Sage 2001). Collins et al. (2015) demonstraram que os níveis relativos de SPARCL1 foram diminuídos no líquido de doentes com ELA em relação aos sujeitos saudáveis. Assim, é possível que os níveis reduzidos de SPARC e SPARCL1 em nosso estudo relacionados à diminuição na atividade sináptica, evento atrelado a degeneração do neurônio motor na ELA (Collins et al. 2015).

A proteína precursora de beta-amilóide (APP) é o tipo de proteína de membrana expressa em muitos tecidos e descrita como regulador do processo de formação de sinapse (Priller et al. 2006). A APP é molécula precursora cuja proteólise gera a molécula beta amilóide, principal componente das placas amilóides encontradas nos cérebros dos doentes com a doença de Alzheimer (Colletti et al. 2021; Wang et al. 2021). Estudos recentes demonstraram que a APP controla a transcrição do fator neurotrófico derivado da linhagem das células gliais nas fibras musculares, influenciando a formação de contatos neuromusculares em camundongo (Colletti et al. 2021; Wang et al. 2021), sugerindo que o APP esteja envolvido não apenas com a doença de Alzheimer, mas também com a ELA. De fato, a APP está aumentada no músculo do modelo murino da ELA familiar e de doentes com a ELA esporádica, em ambos os casos proporcionalmente à intensidade dos sintomas clínicos (Bryson et al. 2012; Koistinen et al. 2006), considerada então um marcador de evolução da doença (Steinacker et al. 2009). Neste contexto, a diminuição nos níveis de APP no nosso estudo sugere o possível papel das CTM como neuroprotetor na doença.

A proteína CXCL12 (do inglês *C-X-C Motif Chemokine Ligand 12*) é uma quimiocina presente na medula óssea que interage com os receptores CXCR4 e CXCR7 (Tashiro et al. 1993; Wang et al. 2016). No cérebro adulto, a CXCL12 e seu receptor CXCR4 são expressos em células endoteliais, gliais e neurônios (Heinisch and Kirby 2010). A molécula estimula a

resposta inflamatória por interferir com o sistema imunológico (Andrés-Benito et al. 2020). A CXCL12 e o receptor CXCR7, mas não o CXCR4, estão regulados positivamente em neurônios, astrócitos e endotélios na área da penumbra da isquemia cerebral, facilitando a angiogênese, neurogênese e transmissão sináptica local (Ardelt et al. 2013; Zhang et al. 2018). A quimiocina também promove a proliferação da glia radial e a migração de neuroblastos ao longo do corpo caloso após lesão cerebral traumática (Jaerve and Muller 2012; Mao et al. 2020). A CXCL12 atuando via receptores CXCR4 facilita o recrutamento de células progenitoras para os locais das lesões e apresenta papel importante na regeneração do sistema nervoso em resposta a diversas lesões (Li et al. 2012; Li and Ransohoff 2008). Estudos anteriores mostraram níveis aumentados da proteína CXCL12 no líquido de doentes com esclerose múltipla nos eventos de agudização da doença (Magliozzi et al. 2018), portanto possivelmente associada à resposta inflamatória prejudicial (Edwards et al. 2013). Por outro lado, a CXCL12 é expressa principalmente em neurônios motores da medula espinhal humana, tendo sido observados níveis aumentados de mRNA e proteína CXCL12 nos neurônios motores remanescentes e glia do corno anterior da medula espinhal lombar pós morte de doentes com ELA esporádica (Andres-Benito et al. 2020). Andrés-Benito e colaboradores (2020) observaram aumento significativo nos níveis de CXCL12 no líquido de doentes com ELA (Andres-Benito et al. 2020). Após 30 dias da administração intratecal de CTM, observamos um aumento nos níveis de CXCL12 no líquido de indivíduos com ELA. Essa descoberta sugere uma possível conexão entre a neurodegeneração e a presença dessa proteína.

A molécula de adesão de leucócitos ativados, conhecida pela sigla ALCAM, foi originalmente identificada como receptor transmembrânico envolvido na ativação de células T e posteriormente como membro da subfamília de receptores de imunoglobulina de domínio extracelular expressa em tumores (Weidle et al. 2010). Descrita também como ligante para o CD6, essa importante na apresentação de antígeno (Bowen et al. 1995; Hassan, Barclay, and Brown 2004; Nelissen et al. 2000; van Kempen et al. 2001) envolvida em muitos processos desde a implantação de blastocistos, passando pela neurogênese, crescimento de neuritos e invasão de tumores (Swart 2002) parece desempenhar papel na esclerose múltipla (Aruffo et al. 1997; Tomita et al. 2000; Yonemura et al. 1998; Zimmerman et al. 2004) e doença de Alzheimer, nesta última inclusive demonstrou-se os níveis da ALCAM diminuídos nos seus doentes (Whelan et al. 2019). Até agora, essas descrições nos levam a considerar que a diminuição nos níveis da ALCAM no líquido dos pacientes, 30 dias após a injeção de CTM deste estudo, pode estar mais relacionada aos eventos neurodegenerativos da ELA.

A alfa-2 macroglobulina (A2M), proteína da família das Chaperonas, é componente importante do sistema imunológico inato atuando como inibidor da pan-protease. Por se ligar a proteínas com dobramento incorreto e propensas à agregação, a A2M foi correlacionada à patogênese da doença de Alzheimer (Querfurth and LaFerla 2010; Zuroff et al. 2017), em cujos sujeitos aumento na concentração plasmática de A2M foi demonstrado por proteômica (Karch and Goate 2015; Zuroff et al. 2017). A desregulação da A2M no líquido de doentes com ELA descrita no estudo é inédita na literatura a despeito da diminuição do seu RNA mensageiro nas células mononucleares de doentes com ELA (Garofalo et al. 2020).

As moléculas APOA1, APOB, APOE, CHI3L1 e NCAM1, mostraram-se desreguladas no líquido de doentes com a ELA 30 dias após a infusão de CTM, indentificadas pela proteômica, já foram descritas como envolvidas em processos fisiológicos no sistema nervoso ou fisiopatológicos de doenças neurológicas (Ho, Hartmann, and Ling 2022; Berezin et al. 2014; Li et al. 2023).

As apolipoproteínas APOA1, APOB e APOE, capazes de cruzar as barreiras encefálicas, identificadas no plasma e líquido (Li et al. 2017), já foram apontadas como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico na ELA (Ingre et al. 2020; Thompson, Talbot, and Turner 2021).

A APOA1 é a principal proteína estrutural da lipoproteína de alta densidade, também conhecida por HDL. A APOA1 pode ativar a lecitina colesterol aciltransferase e está intimamente envolvida na supressão da reação inflamatória, na proteção do endotélio vascular e na regulação da resposta imune e foi correlacionada como fator protetor na doença de Alzheimer (Li et al. 2017). Ainda, o aumento no quociente dos colesterolis LDL/HDL foi correlacionado com o aumento da sobrevida na ELA (Dupuis et al. 2008; Sutedja et al. 2011). Claramente, estudos adicionais são necessários para esclarecer a relação entre os níveis de lipídios plasmáticos na ELA.

A APOE é a principal apolipoproteína do sistema nervoso central, sendo altamente expressa no cérebro, (Linton et al. 1991). As lipoproteínas contendo ApoE secretadas pelos astrócitos ligam-se aos receptores de lipoproteínas e são absorvidas pelos neurônios, onde atuam na homeostase do colesterol (Mahley, Weisgraber, and Huang 2006). Neurônios podem expressar apoE sob certas condições, como lesão excitotóxica (Xu et al. 1999). Apesar da relação da apoE com a doença de Alzheimer de início tardio é amplamente conhecida, sendo a sua isoforma $\epsilon 4$ o principal fator de risco (Corder et al. 1993; Schmechel et al. 1993), os estudos sobre a influência do genótipo apoE na ELA têm resultados conflitantes (Jawaid et al. 2011; Praline et al. 2011). Estudo recente que empregou larga coorte de doentes

franceses com ELA esporádica e controles pareados indicou que o alelo APOE -ε4 estava associado ao risco aumentado de ELA de início bulbar em homens (Praline et al. 2011).

Neste sentido, os resultados obtidos no nosso estudo acerca da desregulação das lipoproteínas APOA1, APOB, APOE no líquido de doentes com a ELA 30 dias após a injeção tecal de CTM representa uma contribuição original, contudo não se é possível identificar com clareza se tais desregulações estariam refletindo a presença das CTM injetadas ou os eventos neurodegenerativos/neuroprotetivos da doença.

A proteína 1 do tipo quitinase-3 (CHI3L1), também conhecida como YKL-40, é produzida por microglia e astrócitos reativos e associada à modulação da neuroinflamação durante a progressão de doenças (Sutherland 2018). Níveis e atividade aumentados de quitinases foram descritos em biofluidos de doentes com esclerose múltipla (Hinsinger et al. 2015; Bonne-Barkay et al. 2010) e doença de Alzheimer (Bonne-Barkay et al. 2010; Rosén et al. 2014). Vu e colaboradores (2020) observaram elevação da CHI3L1 nos doentes com ELA, dado esse em linha (Bonne-Barkay et al. 2010; Varghese et al. 2013) (Thompson et al. 2019; Oeckl et al. 2019) ou contraditórios (Gille et al. 2019). Adicionalmente, estudo recente correlacionou o aumento da CHI3L1 no líquido de doentes com ELA com o início da sintomatologia da doença (Abu-Rumeileh et al. 2019). Pelo exposto, a diminuição nos níveis de CHI3L1 no nosso estudo ressalta o possível papel da molécula pela presença das CTM, sem afastar, até esse momento, sua regulação pelo processo neurodegenerativo em si.

A molécula de adesão celular neuronal 1 (NCAM1) participa da adesão e do crescimento neurítico durante o desenvolvimento do sistema nervoso e plasticidade sináptica no cérebro do adulto (Liddel and Hoyer 2016). É possível que a desregulação da NCAM1 no líquido dos doentes ELA 30 dias após a infusão tecal das CTM esteja relacionada às CTM injetadas, visto que não foi observada alterações no líquido de doentes ELA comparado com controles em trabalho anterior (Werdelin et al. 1989).

5.3. Biomarcadores moleculares dos efeitos das CTM no líquido de doentes com ELA

A proteômica associada ao Luminex mostraram-se promissoras na avaliação da presença das CTM no líquido de doentes com a ELA 30 dias após a infusão intratecal das células. A metodologia à luz das informações sobre as moléculas descritas na literatura foi capaz de dar indicativos acerca da relação das moléculas ressaltadas com a presença das CTM no líquido ou com o processo neurodegenerativo em curso na ELA. Deste modo, este estudo é pioneiro e original neste tipo de descrição.

Como dito acima, dentre as 220 moléculas desreguladas no líquido dos sujeitos ELA

30 dias após a infusão intratecal de CTM, onze delas foram ressaltadas pelas modulações moleculares empregadas, especificamente as moléculas A2M, ALCAM, APOA1, APOB, APOE, APP, CHI3L1, CXCL12, MMP2, NCAM1 e SPARC. Os níveis dessas moléculas detectados pela técnica do Luminex no líquido dos sujeitos antes e 30 dias após da infusão de CTM no líquido foram confrontados com os resultados da proteômica. Interessante foi a correlação dos resultados de dez dentre as onze moléculas em relação as duas metodologias, salvaguardando alguns detalhes discutidos a seguir. O resultado final das análises ressalta fortemente a importância dessas células como biomarcadores do desafio experimental do ensaio clínico do estudo.

A regulação apontada pelo Luminex foi absolutamente coincidente com a proteômica em cindo das onze moléculas tendo como base toda a coorte de 24 sujeitos do estudo, de modo que as proteínas ALCAM, APP, CXCL12, MMP2 e SPARC adquiriram significado especial acerca da presença das CTM no líquido dos sujeitos independentemente das possíveis interferências da inerente heterogeneidade clínica da ELA (Grad et al. 2017) como discutido acima e complementado aqui, à luz das descrições encontradas na literatura, as moléculas SPARC, MMP2, CXCL12, ALCAM estariam possivelmente envolvidas com os eventos neurodegenerativos em curso (Andrés-Benito et al. 2020; Whelan et al. 2019) (Collins et al. 2015; Niebroj-Dobosz et al. 2010), enquanto que a APP por apresentar uma diminuição na sua concentração possivelmente está relacionada com a presença das CTM entregues no líquido dos doentes ELA (Rabinovich-Toidman et al. 2012).

As moléculas restantes, dentre as onze ressaltadas, especificamente as APOA1, APOB, APOE, CHI3L1, NCAM1 e A2M, não tiveram os seus resultados dos níveis das proteínas pelo Luminex perfeitamente coincidentes com as suas regulações apontadas pela proteômica considerando toda a coorte de 24 sujeitos ELA do estudo.

De fato, a regulação da A2M pelo Luminex (regulação negativa) foi inversa aquela apontada pela proteômica (regulação positiva). Encontramos na literatura apenas um estudo que avaliou a A2M no líquido de doentes com ELA. No entanto, o objetivo desse estudo foi investigar a permeabilidade da barreira hematoencefálica em diversas doenças, e resultados significativos no caso da ELA não foram encontrados (Meucci et al. 1993).

Adicionalmente, os níveis das moléculas APOA1, APOB, APOE, CHI3L1 e NCAM1 apontados pelo Luminex 30 dias após a infusão intratecal de CTM não se mostram desreguladas na corte dos 24 sujeitos ELA, a despeito da desregulação delas apresentada pela proteômica. É possível que a heterogeneidade clínica entre os sujeitos ELA, como dito anteriormente, marca registrada da doença, tenha influenciado nos níveis proteicos, com

diferenças estatísticas captadas pela proteômica, porém, não captadas pelo Luminex. Ressalta-se, como dito anteriormente nesse texto, diferenças técnicas entre as duas metodologias de identificação de níveis de proteínas podem justificar essas aparentes discrepâncias nos resultados como discutido na literatura (Boja et al. 2014). Tal explicação deve também justificar a aparente discrepância nos resultados da A2M, cujos resultados parecem indicar um nível muito pequeno de variabilidade entre os sujeitos que, por diferenças metodológicas, apontou regulações positiva e negativa da molécula pela proteômica e Luminex, respectivamente.

Neste sentido, especialmente importantes foram os resultados obtidos pela estratificação dos resultados dos sujeitos 30 dias após a entrega das CTM a partir da média dos resultados da média dos níveis proteicos dos sujeitos 30 dias anteriores à infusão de células, naqueles casos (APOA1, APOB, APOE, CHI3L1 e NCAM1) em que o Luminex não apontou diferenças estatísticas dentre as moléculas desreguladas apontadas pela proteômica, considerando a coorte inteira de 24 sujeitos. Dentre as cinco moléculas, as APOA1, APOE e a CHI3L1 tiveram regulações estatísticas nos estratos, regulação positiva ou negativa, coincidentes com as regulações apontadas pela proteômica, confirmando o que foi dito acima sobre a possível interferência da variabilidade dos resultados, em função da inerente heterogeneidade clínica, do Luminex em relação à proteômica. É possível que de alguma forma esta explicação também se aplique às moléculas APOB e NCAM1 que continuaram a não se mostrar desreguladas nos estratos dos resultados do Luminex, a despeito da desregulação delas apontadas na coorte inteira de 24 sujeitos pela proteômica.

Especialmente importante foi a observação de que dentre as onze moléculas destacadas, independentemente das suas possíveis relações com os processos neurodegenerativos ou com os mecanismos da CTM, algo que ainda carece de elucidação em estudos futuros, as moléculas APP, MMP2, CHI3L1, CXCL12, SPARC, APOB já foram descritas como desreguladas no líquido de doentes ELA em estudos clínicos controlados (Steinacker et al. 2009; Niebroj-Dobosz et al. 2010; Collins et al. 2015; Thompson et al. 2019; Andres-Benito et al. 2020; Oh, Jang, and Na 2023) de modo que as moléculas APOA1, APOE, A2M, NCAM1, ALCAM desreguladas no líquido de doentes ELA representam contribuição original do presente estudo e sugerimos que sejam exploradas como biomarcador na ELA.

6. CONCLUSÕES

1. A análise de proteômica identificou 220 moléculas desreguladas no líquido de doentes com ELA 30 dias após injeção tecal de CTM autólogas.
2. Os métodos de modelagem molecular mostram-se adequados no apontamento de proteínas e mecanismos relevantes a partir do conjunto de moléculas desreguladas apresentadas pela proteômica.
3. A modelagem molecular destacou os mecanismos relacionados à adesão celular e à matriz extracelular, bem como as moléculas A2M, ALCAM, APOA1, APOB, APOE APP, CHI3L1, CXCL12, MMP2, NCAM1 e SPARC a partir de análises no líquido dos sujeitos ELA 30 dias após a injeção intratecal de CTMs. Estudos futuros poderão indicar com precisão a relação dos mecanismos e moléculas realçadas à presença intratecal das CTMs, aos eventos neurodegenerativos ou à interação de ambos e, desta forma, direcionar as moléculas como biomarcadores dessas situações biológicas nos tratamentos com CTM autólogas na ELA.

7. REFERÊNCIAS

- Abe, K., Y. Itoyama, G. Sobue, S. Tsuji, M. Aoki, M. Doyu, C. Hamada, K. Kondo, T. Yoneoka, M. Akimoto, H. Yoshino, and A. L. S. Study Group Edaravone. 2014. 'Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients', *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 15: 610-7.
- Abu-Rumeileh, S., P. Steinacker, B. Polisch, A. Mammana, A. Bartoletti-Stella, P. Oeckl, S. Baiardi, C. Zenesini, A. Huss, P. Cortelli, S. Capellari, M. Otto, and P. Parchi. 2019. 'CSF biomarkers of neuroinflammation in distinct forms and subtypes of neurodegenerative dementia', *Alzheimers Res Ther*, 12: 2.
- Aizman, I., C. C. Tate, M. McGrogan, and C. C. Case. 2009. 'Extracellular matrix produced by bone marrow stromal cells and by their derivative, SB623 cells, supports neural cell growth', *J Neurosci Res*, 87: 3198-206.
- Al-Chalabi, A., and O. Hardiman. 2013. 'The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time', *Nat Rev Neurol*, 9: 617-28.
- Alsultan, A. A., R. Waller, P. R. Heath, and J. Kirby. 2016. 'The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights', *Degener Neurol Neuromuscul Dis*, 6: 49-64.
- Andrés-Benito, P., M. Povedano, R. Domínguez, C. Marco, M. J. Colomina, Ó López-Pérez, I. Santana, I. Baldeiras, S. Martínez-Yelámos, I. Zerr, F. Llorens, J. Fernández-Irigoyen, E. Santamaría, and I. Ferrer. 2020. 'Increased C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 Levels in Cerebrospinal Fluid as a Candidate Biomarker in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Int J Mol Sci*, 21.
- Andres-Benito, P., M. Povedano, R. Dominguez, C. Marco, M. J. Colomina, O. Lopez-Perez, I. Santana, I. Baldeiras, S. Martinez-Yelamos, I. Zerr, F. Llorens, J. Fernandez-Irigoyen, E. Santamaria, and I. Ferrer. 2020. 'Increased C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 Levels in Cerebrospinal Fluid as a Candidate Biomarker in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Int J Mol Sci*, 21.
- Ardelt, A. A., B. J. Bhattacharyya, A. Belmadani, D. Ren, and R. J. Miller. 2013. 'Stromal derived growth factor-1 (CXCL12) modulates synaptic transmission to immature neurons during post-ischemic cerebral repair', *Exp Neurol*, 248: 246-53.
- Armstrong, G. A., and P. Drapeau. 2013. 'Loss and gain of FUS function impair neuromuscular synaptic transmission in a genetic model of ALS', *Hum Mol Genet*, 22: 4282-92.
- Aruffo, A., M. A. Bowen, D. D. Patel, B. F. Haynes, G. C. Starling, J. A. Gebe, and J. Bajorath. 1997. 'CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function?', *Immunol Today*, 18: 498-504.
- Baglio, S. R., D. M. Pegtel, and N. Baldini. 2012. 'Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy', *Front Physiol*, 3: 359.
- Banks, R. E., M. J. Dunn, D. F. Hochstrasser, J. C. Sanchez, W. Blackstock, D. J. Pappin, and P. J. Selby. 2000. 'Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities', *Lancet*, 356: 1749-56.
- Behl, T., G. Kaur, A. Sehgal, S. Bhardwaj, S. Singh, C. Buhas, C. Judea-Pusta, D. Uivarosan, M. A. Munteanu, and S. Bungau. 2021. 'Multifaceted Role of Matrix Metalloproteinases in Neurodegenerative Diseases: Pathophysiological and Therapeutic Perspectives', *Int J Mol Sci*, 22.
- Bellingham, M. C. 2011. 'A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade?', *CNS Neurosci Ther*, 17: 4-31.
- Bensimon, G., L. Lacomblez, and V. Meininger. 1994. 'A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group', *N Engl J Med*, 330: 585-91.
- Berezin, V., P. S. Walmod, M. Filippov, and A. Dityatev. 2014. 'Targeting of ECM molecules and their metabolizing enzymes and receptors for the treatment of CNS diseases', *Prog Brain Res*, 214: 353-88.
- Berry, J. D., M. E. Cudkowicz, A. J. Windebank, N. P. Staff, M. Owegi, K. Nicholson, D. McKenna-Yasek, Y. S. Levy, N. Abramov, H. Kaspi, M. Mehra, R. Aricha, Y. Gothelf, and R. H. Brown. 2019. 'NurOwn, phase 2, randomized, clinical trial in patients with ALS: Safety, clinical, and

- biomarker results', *Neurology*, 93: e2294-e305.
- Beuche, W., M. Yushchenko, M. Mäder, M. Maliszewska, K. Felgenhauer, and F. Weber. 2000. 'Matrix metalloproteinase-9 is elevated in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis', *Neuroreport*, 11: 3419-22.
- Boillee, S., C. Vande Velde, and D. W. Cleveland. 2006. 'ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors', *Neuron*, 52: 39-59.
- Boja, E. S., T. E. Fehniger, M. S. Baker, G. Marko-Varga, and H. Rodriguez. 2014. 'Analytical validation considerations of multiplex mass-spectrometry-based proteomic platforms for measuring protein biomarkers', *J Proteome Res*, 13: 5325-32.
- Bonafede, R., and R. Mariotti. 2017. 'ALS Pathogenesis and Therapeutic Approaches: The Role of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles', *Front Cell Neurosci*, 11: 80.
- Bonafede, R., I. Scambi, D. Peroni, V. Potrich, F. Boschi, D. Benati, B. Bonetti, and R. Mariotti. 2016. 'Exosome derived from murine adipose-derived stromal cells: Neuroprotective effect on in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis', *Exp Cell Res*, 340: 150-8.
- Bonnans, C., J. Chou, and Z. Werb. 2014. 'Remodelling the extracellular matrix in development and disease', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 786-801.
- Bonneh-Barkay, D., G. Wang, A. Starkey, R. L. Hamilton, and C. A. Wiley. 2010. 'In vivo CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases', *J Neuroinflammation*, 7: 34.
- Boston-Howes, W., E. O. Williams, A. Bogush, M. Scolere, P. Pasinelli, and D. Trotti. 2008. 'Nordihydroguaiaretic acid increases glutamate uptake in vitro and in vivo: therapeutic implications for amyotrophic lateral sclerosis', *Exp Neurol*, 213: 229-37.
- Bowen, M. A., D. D. Patel, X. Li, B. Modrell, A. R. Malacko, W. C. Wang, H. Marquardt, M. Neubauer, J. M. Pesando, U. Francke, and et al. 1995. 'Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand', *J Exp Med*, 181: 2213-20.
- Boylan, K. 2015. 'Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Neurol Clin*, 33: 807-30.
- Bradshaw, A. D., and E. H. Sage. 2001. 'SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury', *J Clin Invest*, 107: 1049-54.
- Brekken, R. A., and E. H. Sage. 2001. 'SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication', *Matrix Biol*, 19: 816-27.
- Brooks, Benjamin Rix, Robert G. Miller, Michael Swash, and Theodore L. Munsat. 2000. 'El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis', *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 1: 293-99.
- Bryson, J. Barney, Carl Hobbs, Michael J. Parsons, Karen D. Bosch, Amelie Pandraud, Frank S. Walsh, Patrick Doherty, and Linda Greensmith. 2012. 'Amyloid precursor protein (APP) contributes to pathology in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis', *Human Molecular Genetics*, 21: 3871-82.
- Butti, Z., and S. A. Patten. 2018. 'RNA Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Front Genet*, 9: 712.
- Cabral-Pacheco, G. A., I. Garza-Veloz, C. Castruita-De la Rosa, J. M. Ramirez-Acuña, B. A. Perez-Romero, J. F. Guerrero-Rodriguez, N. Martinez-Avila, and M. L. Martinez-Fierro. 2020. 'The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases', *Int J Mol Sci*, 21.
- Casterton, R. L., R. J. Hunt, and M. Fanto. 2020. 'Pathomechanism Heterogeneity in the Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Disease Spectrum: Providing Focus Through the Lens of Autophagy', *J Mol Biol*, 432: 2692-713.
- Cedarbaum, J. M., N. Stambler, E. Malta, C. Fuller, D. Hilt, B. Thurmond, and A. Nakanishi. 1999. 'The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III)', *J Neurol Sci*, 169: 13-21.
- Cetin, H., J. Rath, J. Fuzi, B. Reichardt, G. Fulop, S. Koppi, M. Erdler, G. Ransmayr, J. Weber, K. Neumann, M. Hagmann, W. N. Loscher, E. Auff, and F. Zimprich. 2015. 'Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis and effect of riluzole on disease course', *Neuroepidemiology*, 44: 6-15.
- Chamberlain, J., T. Yamagami, E. Colletti, N. D. Theise, J. Desai, A. Frias, J. Pixley, E. D. Zanjani, C. D. Porada, and G. Almeida-Porada. 2007. 'Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep', *Hepatology*, 46:

- 1935-45.
- Chandramouli, K., and P. Y. Qian. 2009. 'Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity', *Hum Genomics Proteomics*, 2009.
- Chang, Y., Q. Kong, X. Shan, G. Tian, H. Ilieva, D. W. Cleveland, J. D. Rothstein, D. R. Borchelt, P. C. Wong, and C. L. Lin. 2008. 'Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS', *PLoS One*, 3: e2849.
- Chen, S., P. Sayana, X. Zhang, and W. Le. 2013. 'Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update', *Mol Neurodegener*, 8: 28.
- Chen, Y., X. H. Liu, J. J. Wu, H. M. Ren, J. Wang, Z. T. Ding, and Y. P. Jiang. 2016. 'Proteomic analysis of cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis', *Exp Ther Med*, 11: 2095-106.
- Chen, Y., M. Yang, J. Deng, X. Chen, Y. Ye, L. Zhu, J. Liu, H. Ye, Y. Shen, Y. Li, E. J. Rao, K. Fushimi, X. Zhou, E. H. Bigio, M. Mesulam, Q. Xu, and J. Y. Wu. 2011. 'Expression of human FUS protein in *Drosophila* leads to progressive neurodegeneration', *Protein Cell*, 2: 477-86.
- Chia, R., A. Chio, and B. J. Traynor. 2018. 'Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications', *Lancet Neurol*, 17: 94-102.
- Chio, A., G. Logroscino, O. Hardiman, R. Swingler, D. Mitchell, E. Beghi, B. G. Traynor, and Consortium Eurals. 2009. 'Prognostic factors in ALS: A critical review', *Amyotroph Lateral Scler*, 10: 310-23.
- Chiò, A., G. Logroscino, B. J. Traynor, J. Collins, J. C. Simeone, L. A. Goldstein, and L. A. White. 2013. 'Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature', *Neuroepidemiology*, 41: 118-30.
- Chio, A., C. Moglia, A. Canosa, U. Manera, F. D'Ovidio, R. Vasta, M. Grassano, M. Brunetti, M. Barberis, L. Corrado, S. D'Alfonso, B. Iazzolino, L. Peotta, M. F. Sarnelli, V. Solara, J. P. Zucchetti, F. De Marchi, L. Mazzini, G. Mora, and A. Calvo. 2020. 'ALS phenotype is influenced by age, sex, and genetics: A population-based study', *Neurology*, 94: e802-e10.
- Chopp, M., X. H. Zhang, Y. Li, L. Wang, J. Chen, D. Lu, M. Lu, and M. Rosenblum. 2000. 'Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation', *Neuroreport*, 11: 3001-5.
- Ciura, S., S. Lattante, I. Le Ber, M. Latouche, H. Tostivint, A. Brice, and E. Kabashi. 2013. 'Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis', *Ann Neurol*, 74: 180-7.
- Cleveland, D. W., and J. D. Rothstein. 2001. 'From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS', *Nat Rev Neurosci*, 2: 806-19.
- Colletti, T., L. Agnello, R. Spataro, L. Guccione, A. Notaro, B. Lo Sasso, V. Blandino, F. Graziano, C. M. Gambino, R. V. Giglio, G. Bivona, V. La Bella, M. Ciaccio, and T. Piccoli. 2021. 'Prognostic Role of CSF beta-amyloid 1-42/1-40 Ratio in Patients Affected by Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Brain Sci*, 11.
- Collins, M. A., J. An, B. L. Hood, T. P. Conrads, and R. P. Bowser. 2015. 'Label-Free LC-MS/MS Proteomic Analysis of Cerebrospinal Fluid Identifies Protein/Pathway Alterations and Candidate Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis', *J Proteome Res*, 14: 4486-501.
- Collins, M., D. Riascos, T. Kovalik, J. An, K. Krupa, K. Krupa, B. L. Hood, T. P. Conrads, A. E. Renton, B. J. Traynor, and R. Bowser. 2012. 'The RNA-binding motif 45 (RBM45) protein accumulates in inclusion bodies in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions (FTLD-TDP) patients', *Acta Neuropathol*, 124: 717-32.
- Connolly, O., L. Le Gall, G. McCluskey, C. G. Donaghy, W. J. Duddy, and S. Duguez. 2020. 'A Systematic Review of Genotype-Phenotype Correlation across Cohorts Having Causal Mutations of Different Genes in ALS', *J Pers Med*, 10.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, and M. A. Pericak-Vance. 1993. 'Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families', *Science*, 261: 921-3.
- Cox, J., and M. Mann. 2008. 'MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification', *Nat Biotechnol*, 26: 1367-72.
- Cox, J., N. Neuhauser, A. Michalski, R. A. Scheltema, J. V. Olsen, and M. Mann. 2011. 'Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment', *J Proteome Res*, 10: 1794-805.

- Cudkowicz, M. E., S. Titus, M. Kearney, H. Yu, A. Sherman, D. Schoenfeld, D. Hayden, A. Shui, B. Brooks, R. Conwit, D. Felsenstein, D. J. Greenblatt, M. Keroack, J. T. Kissel, R. Miller, J. Rosenfeld, J. D. Rothstein, E. Simpson, N. Tolkoff-Rubin, L. Zinman, J. M. Shefner, and Investigators Ceftriaxone Study. 2014. 'Safety and efficacy of ceftriaxone for amyotrophic lateral sclerosis: a multi-stage, randomised, double-blind, placebo-controlled trial', *Lancet Neurol*, 13: 1083-91.
- Cykowski, M. D., D. W. Dickson, S. Z. Powell, A. S. Arumanayagam, A. L. Rivera, and S. H. Appel. 2019. 'Dipeptide repeat (DPR) pathology in the skeletal muscle of ALS patients with C9ORF72 repeat expansion', *Acta Neuropathol*, 138: 667-70.
- de Carvalho, M., R. Dengler, A. Eisen, J. D. England, R. Kaji, J. Kimura, K. Mills, H. Mitsumoto, H. Nodera, J. Shefner, and M. Swash. 2008. 'Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS', *Clin Neurophysiol*, 119: 497-503.
- de Carvalho, M., S. Pinto, J. Costa, T. Evangelista, B. Ohana, and A. Pinto. 2010. 'A randomized, placebo-controlled trial of memantine for functional disability in amyotrophic lateral sclerosis', *Amyotroph Lateral Scler*, 11: 456-60.
- De Vos, K. J., A. L. Chapman, M. E. Tennant, C. Manser, E. L. Tudor, K. F. Lau, J. Brownlees, S. Ackerley, P. J. Shaw, D. M. McLoughlin, C. E. Shaw, P. N. Leigh, C. C. J. Miller, and A. J. Grierson. 2007. 'Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content', *Hum Mol Genet*, 16: 2720-28.
- Dobrowolny, G., M. Aucello, E. Rizzuto, S. Beccafico, C. Mammucari, S. Boncompagni, S. Belia, F. Wannenes, C. Nicoletti, Z. Del Prete, N. Rosenthal, M. Molinaro, F. Protasi, G. Fano, M. Sandri, and A. Musaro. 2008. 'Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity', *Cell Metab*, 8: 425-36.
- Dupuis, L., P. Corcia, A. Fergani, J. -L. Gonzalez De Aguilar, D. Bonnefont-Rousselot, R. Bittar, D. Seilhean, J. -J. Hauw, L. Lacomblez, J. -P. Loeffler, and V. Meininger. 2008. 'Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis', 70: 1004-09.
- Edwards, K. R., J. Goyal, T. Plavina, J. Czerkowicz, S. Goelz, A. Ranger, D. Cadavid, and J. L. Browning. 2013. 'Feasibility of the use of combinatorial chemokine arrays to study blood and CSF in multiple sclerosis', *PLoS One*, 8: e81007.
- Estes, P. S., A. Boehringer, R. Zwick, J. E. Tang, B. Grigsby, and D. C. Zarnescu. 2011. 'Wild-type and A315T mutant TDP-43 exert differential neurotoxicity in a Drosophila model of ALS', *Hum Mol Genet*, 20: 2308-21.
- Fang, L., F. Huber-Abel, M. Teuchert, C. Hendrich, J. Dorst, D. Schattauer, H. Zettlmeissel, M. Wlaschek, K. Scharffetter-Kochanek, H. Tumani, A. C. Ludolph, and J. Brettschneider. 2009. 'Linking neuron and skin: matrix metalloproteinases in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)', *J Neurol Sci*, 285: 62-6.
- Fang, L., M. Teuchert, F. Huber-Abel, D. Schattauer, C. Hendrich, J. Dorst, H. Zettlmeissel, M. Wlaschek, K. Scharffetter-Kochanek, T. Kapfer, H. Tumani, A. C. Ludolph, and J. Brettschneider. 2010. 'MMP-2 and MMP-9 are elevated in spinal cord and skin in a mouse model of ALS', *J Neurol Sci*, 294: 51-6.
- Faravelli, I., G. Riboldi, M. Nizzardo, C. Simone, C. Zanetta, N. Bresolin, G. P. Comi, and S. Corti. 2014. 'Stem cell transplantation for amyotrophic lateral sclerosis: therapeutic potential and perspectives on clinical translation', *Cell Mol Life Sci*, 71: 3257-68.
- Fatimah, S. S., G. C. Tan, K. Chua, M. M. Fariha, A. E. Tan, and A. R. Hayati. 2013. 'Stemness and angiogenic gene expression changes of serial-passage human amnion mesenchymal cells', *Microvasc Res*, 86: 21-9.
- Foerster, B. R., M. G. Pomper, B. C. Callaghan, M. Petrou, R. A. Edden, M. A. Mohamed, R. C. Welsh, R. C. Carlos, P. B. Barker, and E. L. Feldman. 2013. 'An imbalance between excitatory and inhibitory neurotransmitters in amyotrophic lateral sclerosis revealed by use of 3-T proton magnetic resonance spectroscopy', *JAMA Neurol*, 70: 1009-16.
- Forostyak, S., A. Homola, K. Turnovcova, P. Svitil, P. Jendelova, and E. Sykova. 2014. 'Intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells protects the structure of altered perineuronal nets in SOD1 rats and amends the course of ALS', *Stem Cells*, 32: 3163-72.
- Garofalo, M., C. Pandini, M. Bordoni, O. Pansarasa, F. Rey, A. Costa, B. Minafra, L. Diamanti, S. Zucca, S. Carelli, C. Cereda, and S. Gagliardi. 2020. 'Alzheimer's, Parkinson's Disease and

- Amyotrophic Lateral Sclerosis Gene Expression Patterns Divergence Reveals Different Grade of RNA Metabolism Involvement', *Int J Mol Sci*, 21.
- Ghatak, N. R., W. W. Campbell, R. H. Lippman, and M. G. Hadfield. 1986. 'Anterior horn changes of motor neuron disease associated with demyelinating radiculopathy', *J Neuropathol Exp Neurol*, 45: 385-95.
- Gille, B., M. De Schaepdryver, L. Dedeene, J. Goossens, K. G. Claeys, L. Van Den Bosch, J. Tournoy, P. Van Damme, and K. Poesen. 2019. 'Inflammatory markers in cerebrospinal fluid: independent prognostic biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis?', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 90: 1338-46.
- Grad, L. I., G. A. Rouleau, J. Ravits, and N. R. Cashman. 2017. 'Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7.
- Gupta, R., M. Lan, J. Mojsilovic-Petrovic, W. H. Choi, N. Safren, S. Barmada, M. J. Lee, and R. Kalb. 2017. 'The Proline/Arginine Dipeptide from Hexanucleotide Repeat Expanded C9ORF72 Inhibits the Proteasome', *eNeuro*, 4.
- Gurney, M. E., H. Pu, A. Y. Chiu, M. C. Dal Canto, C. Y. Polchow, D. D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y. W. Kwon, H. X. Deng, and et al. 1994. 'Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation', *Science*, 264: 1772-5.
- Haeusler, A. R., C. J. Donnelly, and J. D. Rothstein. 2016. 'The expanding biology of the C9orf72 nucleotide repeat expansion in neurodegenerative disease', *Nat Rev Neurosci*, 17: 383-95.
- Haidet-Phillips, A. M., and N. J. Maragakis. 2015. 'Neural and glial progenitor transplantation as a neuroprotective strategy for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)', *Brain Res*, 1628: 343-50.
- Hardiman, O., L. H. van den Berg, and M. C. Kiernan. 2011. 'Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis', *Nat Rev Neurol*, 7: 639-49.
- Hardiman, Orla, Ammar Al-Chalabi, Adriano Chio, Emma M. Corr, Giancarlo Logroscino, Wim Robberecht, Pamela J. Shaw, Zachary Simmons, and Leonard H. van den Berg. 2017. 'Amyotrophic lateral sclerosis', *Nature Reviews Disease Primers*, 3: 17071.
- Hassan, N. J., A. N. Barclay, and M. H. Brown. 2004. 'Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166', *Eur J Immunol*, 34: 930-40.
- Heinisch, S., and L. G. Kirby. 2010. 'SDF-1alpha/CXCL12 enhances GABA and glutamate synaptic activity at serotonin neurons in the rat dorsal raphe nucleus', *Neuropharmacology*, 58: 501-14.
- Hinsinger, G., N. Galéotti, N. Nabholz, S. Urbach, V. Rigau, C. Demattei, S. Lehmann, W. Camu, P. Labauge, G. Castelnovo, D. Brassat, D. Loussouarn, M. Salou, D. Laplaud, O. Casez, J. Bockaert, P. Marin, and E. Thouvenot. 2015. 'Chitinase 3-like proteins as diagnostic and prognostic biomarkers of multiple sclerosis', *Mult Scler*, 21: 1251-61.
- Ho, W. Y., H. Hartmann, and S. C. Ling. 2022. 'Central nervous system cholesterol metabolism in health and disease', *IUBMB Life*, 74: 826-41.
- Hoban, D. B., L. Howard, and E. Dowd. 2015. 'GDNF-secreting mesenchymal stem cells provide localized neuroprotection in an inflammation-driven rat model of Parkinson's disease', *Neuroscience*, 303: 402-11.
- Huang da, W., B. T. Sherman, and R. A. Lempicki. 2009. 'Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists', *Nucleic Acids Res*, 37: 1-13.
- Hughes, J. T. 1982. 'Pathology of amyotrophic lateral sclerosis', *Adv Neurol*, 36: 61-74.
- Ingre, C., L. Chen, Y. Zhan, J. Termorshuizen, L. Yin, and F. Fang. 2020. 'Lipids, apolipoproteins, and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis', *Neurology*, 94: e1835-e44.
- Jaerve, A., and H. W. Muller. 2012. 'Chemokines in CNS injury and repair', *Cell Tissue Res*, 349: 229-48.
- Jaiswal, M. K. 2019. 'Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs', *Med Res Rev*, 39: 733-48.
- Jawaid, A., M. Poon, A. M. Strutt, L. K. Rice, E. J. McDowell, A. R. Salamone, S. U. Qureshi, E. Simpson, S. H. Appel, M. K. York, and P. E. Schulz. 2011. 'Does apolipoprotein E genotype modify the clinical expression of ALS?', *Eur J Neurol*, 18: 618-24.
- Kalra, Sanjay, and Douglas Arnold. 2003. 'Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis', *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 4: 243-48.
- Kanchanawong, P., and D. A. Calderwood. 2023. 'Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell-ECM adhesions', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 24: 142-61.

- Karch, C. M., and A. M. Goate. 2015. 'Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis', *Biol Psychiatry*, 77: 43-51.
- Kawahara, R., F. Ortega, L. Rosa-Fernandes, V. Guimaraes, D. Quina, W. Nahas, V. Schwammle, M. Srougi, K. R. M. Leite, M. Thaysen-Andersen, M. R. Larsen, and G. Palmisano. 2018. 'Distinct urinary glycoprotein signatures in prostate cancer patients', *Oncotarget*, 9: 33077-97.
- Kiaei, M., K. Kipiani, N. Y. Calingasan, E. Wille, J. Chen, B. Heissig, S. Rafii, S. Lorenzl, and M. F. Beal. 2007. 'Matrix metalloproteinase-9 regulates TNF-alpha and FasL expression in neuronal, glial cells and its absence extends life in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis', *Exp Neurol*, 205: 74-81.
- Kiernan, M. C., S. Vucic, B. C. Cheah, M. R. Turner, A. Eisen, O. Hardiman, J. R. Burrell, and M. C. Zoing. 2011. 'Amyotrophic lateral sclerosis', *Lancet*, 377: 942-55.
- Klingler, A., D. Regensburger, C. Tenkerian, N. Britzen-Laurent, A. Hartmann, M. Sturzl, and E. Naschberger. 2020. 'Species-, organ- and cell-type-dependent expression of SPARCL1 in human and mouse tissues', *PLoS One*, 15: e0233422.
- Koistinen, H., R. Prinjha, P. Soden, A. Harper, S. J. Banner, P. F. Pradat, J. P. Loeffler, and C. Dingwall. 2006. 'Elevated levels of amyloid precursor protein in muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis and a mouse model of the disease', *Muscle Nerve*, 34: 444-50.
- Krause, K., M. Wulf, P. Sommer, K. Barkovits, M. Vorgerd, K. Marcus, and B. Eggers. 2021. 'CSF Diagnostics: A Potentially Valuable Tool in Neurodegenerative and Inflammatory Disorders Involving Motor Neurons: A Review', *Diagnostics (Basel)*, 11.
- Krull, A. A., D. O. Setter, T. F. Gendron, S. C. L. Hrstka, M. J. Polzin, J. Hart, A. Dudakovic, N. N. Madigan, A. B. Dietz, A. J. Windebank, A. J. van Wijnen, and N. P. Staff. 2021. 'Alterations of mesenchymal stromal cells in cerebrospinal fluid: insights from transcriptomics and an ALS clinical trial', *Stem Cell Res Ther*, 12: 187.
- Kumar, A., L. Bala, J. Kalita, U. K. Misra, R. L. Singh, C. L. Khetrpal, and G. N. Babu. 2010. 'Metabolomic analysis of serum by (1) H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis', *Clin Chim Acta*, 411: 563-7.
- Lagier-Tourenne, C., M. Polymenidou, K. R. Hutt, A. Q. Vu, M. Baughn, S. C. Huelga, K. M. Clutario, S. C. Ling, T. Y. Liang, C. Mazur, E. Wancewicz, A. S. Kim, A. Watt, S. Freier, G. G. Hicks, J. P. Donohue, L. Shiue, C. F. Bennett, J. Ravits, D. W. Cleveland, and G. W. Yeo. 2012. 'Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs', *Nat Neurosci*, 15: 1488-97.
- Laslo, P., J. Lipski, L. F. Nicholson, G. B. Miles, and G. D. Funk. 2001. 'GluR2 AMPA receptor subunit expression in motoneurons at low and high risk for degeneration in amyotrophic lateral sclerosis', *Exp Neurol*, 169: 461-71.
- Lee, M., J. J. Ban, K. Y. Kim, G. S. Jeon, W. Im, J. J. Sung, and M. Kim. 2016. 'Adipose-derived stem cell exosomes alleviate pathology of amyotrophic lateral sclerosis in vitro', *Biochem Biophys Res Commun*, 479: 434-39.
- Leigh, P. N., H. Whitwell, O. Garofalo, J. Buller, M. Swash, J. E. Martin, J. M. Gallo, R. O. Weller, and B. H. Anderton. 1991. 'Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity', *Brain*, 114 (Pt 2): 775-88.
- Li, F., A. Liu, M. Zhao, and L. Luo. 2023. 'Astrocytic Chitinase-3-like protein 1 in neurological diseases: Potential roles and future perspectives', *J Neurochem*, 165: 772-90.
- Li, L., M. S. Liu, G. Q. Li, J. Tang, Y. Liao, Y. Zheng, T. L. Guo, X. Kang, and M. T. Yuan. 2017. 'Relationship between Apolipoprotein Superfamily and Parkinson's Disease', *Chin Med J (Engl)*, 130: 2616-23.
- Li, M., J. S. Hale, J. N. Rich, R. M. Ransohoff, and J. D. Lathia. 2012. 'Chemokine CXCL12 in neurodegenerative diseases: an SOS signal for stem cell-based repair', *Trends Neurosci*, 35: 619-28.
- Li, M., and R. M. Ransohoff. 2008. 'Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology', *Prog Neurobiol*, 84: 116-31.
- Liddelow, S., and D. Hoyer. 2016. 'Astrocytes: Adhesion Molecules and Immunomodulation', *Curr Drug Targets*, 17: 1871-81.
- Lin, J. Z., M. R. Duan, N. Lin, and W. J. Zhao. 2021. 'The emerging role of the chondroitin sulfate proteoglycan family in neurodegenerative diseases', *Rev Neurosci*, 32: 737-50.

- Linton, M. F., R. Gish, S. T. Hubl, E. Bütler, C. Esquivel, W. I. Bry, J. K. Boyles, M. R. Wardell, and S. G. Young. 1991. 'Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation', *J Clin Invest*, 88: 270-81.
- Liu, W., Y. Wang, F. Gong, Y. Rong, Y. Luo, P. Tang, Z. Zhou, Z. Zhou, T. Xu, T. Jiang, S. Yang, G. Yin, J. Chen, J. Fan, and W. Cai. 2019. 'Exosomes Derived from Bone Mesenchymal Stem Cells Repair Traumatic Spinal Cord Injury by Suppressing the Activation of A1 Neurotoxic Reactive Astrocytes', *J Neurotrauma*, 36: 469-84.
- Lorenzl, S., D. S. Albers, P. A. LeWitt, J. W. Chirichigno, S. L. Hilgenberg, M. E. Cudkowicz, and M. F. Beal. 2003. 'Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases are elevated in cerebrospinal fluid of neurodegenerative diseases', *J Neurol Sci*, 207: 71-6.
- Lukaszewicz-Zajac, M., B. Mroczko, and A. Slowik. 2014. 'Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)', *J Neural Transm (Vienna)*, 121: 1387-97.
- MacDonald, Justin A., and Meredith A. Borman. 2004. 'Analyzing biological function with emerging proteomic technologies', *International Congress Series*, 1275: 14-21.
- Magliozzi, R., O. W. Howell, R. Nicholas, C. Cruciani, M. Castellaro, C. Romualdi, S. Rossi, M. Pitteri, M. D. Benedetti, A. Gajofatto, F. B. Pizzini, S. Montemezzi, S. Rasia, R. Capra, A. Bertoldo, F. Facchiano, S. Monaco, R. Reynolds, and M. Calabrese. 2018. 'Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis', *Ann Neurol*, 83: 739-55.
- Mahley, R. W., K. H. Weisgraber, and Y. Huang. 2006. 'Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 5644-51.
- Mao, W., X. Yi, J. Qin, M. Tian, and G. Jin. 2020. 'CXCL12 promotes proliferation of radial glia like cells after traumatic brain injury in rats', *Cytokine*, 125: 154771.
- Masrori, P., and P. Van Damme. 2020. 'Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review'.
- Mazzini, L., A. Vescovi, R. Cantello, M. Gelati, and A. Vercelli. 2016. 'Stem cells therapy for ALS', *Expert Opin Biol Ther*, 16: 187-99.
- Meamar, R., M. H. Nasr-Esfahani, S. A. Mousavi, and K. Basiri. 2013. 'Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis', *J Clin Neurosci*, 20: 1659-63.
- Meldolesi, J. 2016. 'Pharmacology of the cell/matrix form of adhesion', *Pharmacol Res*, 107: 430-36.
- Menzies, F. M., M. R. Cookson, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, Z. M. Chrzanowska-Lightowlers, L. Dong, D. A. Figlewicz, and P. J. Shaw. 2002. 'Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis', *Brain*, 125: 1522-33.
- Meucci, G., G. Rossi, R. Bettini, D. Montanaro, L. Gironelli, L. Voci, and F. Bianchi. 1993. 'Laser nephelometric evaluation of albumin, IgG and alpha 2-macroglobulin: applications to the study of alterations of the blood-brain barrier', *J Neurol Sci*, 118: 73-8.
- Michel, G., T. Tonon, D. Scornet, J. M. Cock, and B. Kloareg. 2010. 'The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes', *New Phytol*, 188: 82-97.
- Mitsumoto, H., R. M. Santella, X. Liu, M. Bogdanov, J. Zipprich, H. C. Wu, J. Mahata, M. Kilty, K. Bednarz, D. Bell, P. H. Gordon, M. Hornig, M. Mehrazin, A. Naini, M. Flint Beal, and P. Factor-Litvak. 2008. 'Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS', *Amyotroph Lateral Scler*, 9: 177-83.
- Monti, C., M. Zilocchi, I. Colugnat, and T. Alberio. 2019. 'Proteomics turns functional', *J Proteomics*, 198: 36-44.
- Monti, M., S. Orrù, D. Pagnozzi, and P. Pucci. 2005a. 'Functional proteomics', *Clin Chim Acta*, 357: 140-50.
- Monti, Maria, Stefania Orrù, Daniela Pagnozzi, and Piero Pucci. 2005b. 'Interaction Proteomics', *Bioscience Reports*, 25: 45-56.
- Moreno-Martet, M., L. Mestre, F. Loria, C. Guaza, J. Fernandez-Ruiz, and E. de Lago. 2012. 'Identification of receptors and enzymes for endocannabinoids in NSC-34 cells: relevance for in vitro studies with cannabinoids in motor neuron diseases', *Neurosci Lett*, 508: 67-72.
- Moura, Mirian Conceicao, Luiz Augusto Casulari, and Maria Rita Carvalho Garbi Novaes. 2016. 'Ethnic and demographic incidence of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Brazil: A population based study', *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 17: 275-81.

- Mundra, Vaibhav, Ivan C. Gerling, and Ram I. Mahato. 2013. 'Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy', *Molecular Pharmaceutics*, 10: 77-89.
- Murase, S., and E. M. Schuman. 1999. 'The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory', *Curr Opin Cell Biol*, 11: 549-53.
- Nelissen, J. M., I. M. Peters, B. G. de Grooth, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. 2000. 'Dynamic regulation of activated leukocyte cell adhesion molecule-mediated homotypic cell adhesion through the actin cytoskeleton', *Mol Biol Cell*, 11: 2057-68.
- Niebroj-Dobosz, I., P. Janik, B. Sokołowska, and H. Kwiecinski. 2010. 'Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis', *Eur J Neurol*, 17: 226-31.
- Oeckl, P., P. Weydt, P. Steinacker, S. Anderl-Straub, F. Nordin, A. E. Volk, J. Diehl-Schmid, P. M. Andersen, J. Kornhuber, A. Danek, K. Fassbender, K. Fliessbach, H. Jahn, M. Lauer, K. Müller, A. Knehr, J. Prudlo, A. Schneider, D. R. Thal, D. Yilmazer-Hanke, J. H. Weishaupt, A. C. Ludolph, and M. Otto. 2019. 'Different neuroinflammatory profile in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia is linked to the clinical phase', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 90: 4-10.
- Oh, K. W., M. Y. Noh, M. S. Kwon, H. Y. Kim, S. I. Oh, J. Park, H. J. Kim, C. S. Ki, and S. H. Kim. 2018. 'Repeated Intrathecal Mesenchymal Stem Cells for Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Ann Neurol*, 84: 361-73.
- Oh, Ki-Wook, Chanil Moon, Hyun Young Kim, Sung-il Oh, Jinseok Park, Jun Ho Lee, In Young Chang, Kyung Suk Kim, and Seung Hyun Kim. 2015. 'Phase I Trial of Repeated Intrathecal Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Stem Cells Translational Medicine*, 4: 590-97.
- Oh, S., Y. Jang, and C. H. Na. 2023. 'Discovery of Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis from Human Cerebrospinal Fluid Using Mass-Spectrometry-Based Proteomics', *Biomedicines*, 11.
- Omori, Y., O. Honmou, K. Harada, J. Suzuki, K. Houkin, and J. D. Kocsis. 2008. 'Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats', *Brain Res*, 1236: 30-8.
- Palmisano, G., S. E. Lendal, K. Engholm-Keller, R. Leth-Larsen, B. L. Parker, and M. R. Larsen. 2010. 'Selective enrichment of sialic acid-containing glycopeptides using titanium dioxide chromatography with analysis by HILIC and mass spectrometry', *Nat Protoc*, 5: 1974-82.
- Pansarasa, O., M. Bordoni, L. Drufuca, L. Diamanti, D. Sproviero, R. Trotti, S. Bernuzzi, S. La Salvia, S. Gagliardi, M. Ceroni, and C. Cereda. 2018. 'Lymphoblastoid cell lines as a model to understand amyotrophic lateral sclerosis disease mechanisms', *Dis Model Mech*, 11.
- Pascuzzi, R. M., J. Shefner, A. S. Chappell, J. S. Bjerke, R. Tamura, V. Chaudhry, L. Clawson, L. Haas, and J. D. Rothstein. 2010. 'A phase II trial of talampanel in subjects with amyotrophic lateral sclerosis', *Amyotroph Lateral Scler*, 11: 266-71.
- Petrou, P., Y. Gothelf, Z. Argov, M. Gotkine, Y. S. Levy, I. Kassis, A. Vaknin-Dembinsky, T. Ben-Hur, D. Offen, O. Abramsky, E. Melamed, and D. Karussis. 2016. 'Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials', *JAMA Neurol*, 73: 337-44.
- Petrov, D., C. Mansfield, A. Moussy, and O. Hermine. 2017. 'ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment?', *Front Aging Neurosci*, 9: 68.
- Pittenger, M. F., D. E. Discher, B. M. Peault, D. G. Phinney, J. M. Hare, and A. I. Caplan. 2019. 'Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress', *NPJ Regen Med*, 4: 22.
- Polymenidou, M., C. Lagier-Tourenne, K. R. Hutt, S. C. Huelga, J. Moran, T. Y. Liang, S. C. Ling, E. Sun, E. Wancewicz, C. Mazur, H. Kordasiewicz, Y. Sedaghat, J. P. Donohue, L. Shiue, C. F. Bennett, G. W. Yeo, and D. W. Cleveland. 2011. 'Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43', *Nat Neurosci*, 14: 459-68.
- Praline, J., H. Blasco, P. Vourc'h, M. A. Garrigue, P. H. Gordon, W. Camu, P. Corcia, and C. R. Andres. 2011. 'APOE ε4 allele is associated with an increased risk of bulbar-onset amyotrophic lateral sclerosis in men', *Eur J Neurol*, 18: 1046-52.
- Priller, C., T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H. A. Kretschmar, and J. Herms. 2006. 'Synapse

- formation and function is modulated by the amyloid precursor protein', *J Neurosci*, 26: 7212-21.
- Querfurth, H. W., and F. M. LaFerla. 2010. 'Alzheimer's disease', *N Engl J Med*, 362: 329-44.
- Rabinovich-Toidman, P., M. Becker, B. Barbiro, and B. Solomon. 2012. 'Inhibition of amyloid precursor protein beta-secretase cleavage site affects survival and motor functions of amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice', *Neurodegener Dis*, 10: 30-3.
- Ravits, J., S. Appel, R. H. Baloh, R. Barohn, B. R. Brooks, L. Elman, M. K. Floeter, C. Henderson, C. Lomen-Hoerth, J. D. Macklis, L. McCluskey, H. Mitsumoto, S. Przedborski, J. Rothstein, J. Q. Trojanowski, L. H. van den Berg, and S. Ringel. 2013. 'Deciphering amyotrophic lateral sclerosis: what phenotype, neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis', *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 14 Suppl 1: 5-18.
- Recabarren, D., and M. Alarcon. 2017. 'Gene networks in neurodegenerative disorders', *Life Sci*, 183: 83-97.
- Reza-Zaldivar, E. E., M. A. Hernández-Sapiéns, Y. K. Gutiérrez-Mercado, S. Sandoval-Ávila, U. Gomez-Pinedo, A. L. Márquez-Aguirre, E. Vázquez-Méndez, E. Padilla-Camberos, and A. A. Canales-Aguirre. 2019. 'Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote neurogenesis and cognitive function recovery in a mouse model of Alzheimer's disease', *Neural Regen Res*, 14: 1626-34.
- Rizzo, F., G. Riboldi, S. Salani, M. Nizzardo, C. Simone, S. Corti, and E. Hedlund. 2014. 'Cellular therapy to target neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis', *Cell Mol Life Sci*, 71: 999-1015.
- Rosén, C., C. H. Andersson, U. Andreasson, J. L. Molinuevo, M. Bjerke, L. Rami, A. Lladó, K. Blennow, and H. Zetterberg. 2014. 'Increased Levels of Chitotriosidase and YKL-40 in Cerebrospinal Fluid from Patients with Alzheimer's Disease', *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*, 4: 297-304.
- Rowland, L. P. 2001. 'How amyotrophic lateral sclerosis got its name: the clinical-pathologic genius of Jean-Martin Charcot', *Arch Neurol*, 58: 512-5.
- Sakowski, S. A., J. S. Lunn, A. S. Busta, S. S. Oh, G. Zamora-Berridi, M. Palmer, A. A. Rosenberg, S. G. Philip, J. J. Dowling, and E. L. Feldman. 2012. 'Neuromuscular effects of G93A-SOD1 expression in zebrafish', *Mol Neurodegener*, 7: 44.
- Sanes, J. R., and M. Yamagata. 1999. 'Formation of lamina-specific synaptic connections', *Curr Opin Neurobiol*, 9: 79-87.
- Sawada, H. 2017a. 'Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis', *Expert Opin Pharmacother*, 18: 735-38.
- Sawada, Hideyuki. 2017b. 'Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18: 735-38.
- Scardoni, Giovanni, Michele Petterlini, and Carlo Laudanna. 2009. 'Analyzing biological network parameters with CentiScaPe', *Bioinformatics*, 25: 2857-59.
- Schmechel, D. E., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, B. J. Crain, C. M. Hulette, S. H. Joo, M. A. Pericak-Vance, D. Goldgaber, and A. D. Roses. 1993. 'Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 9649-53.
- Schmid, B., A. Hruscha, S. Höggl, J. Banzhaf-Strathmann, K. Strecker, J. van der Zee, M. Teucke, S. Eimer, J. Hegermann, M. Kittelmann, E. Kremmer, M. Cruts, B. Solchenberger, L. Hasenkamp, F. van Bebber, C. Van Broeckhoven, D. Edbauer, S. F. Lichtenthaler, and C. Haass. 2013. 'Loss of ALS-associated TDP-43 in zebrafish causes muscle degeneration, vascular dysfunction, and reduced motor neuron axon outgrowth', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 4986-91.
- Sherman, Brad T, Ming Hao, Ju Qiu, Xiaoli Jiao, Michael W Baseler, H Clifford Lane, Tomozumi Imamichi, and Weizhong Chang. 2022. 'DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update)', *Nucleic Acids Research*, 50: W216-W21.
- Shi, P., J. Gal, D. M. Kwinter, X. Liu, and H. Zhu. 2010. 'Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis', *Biochim Biophys Acta*, 1802: 45-51.
- Sivandzade, F., and L. Cucullo. 2021. 'Regenerative Stem Cell Therapy for Neurodegenerative Diseases: An Overview', *Int J Mol Sci*, 22.

- Spreux-Varoquaux, O., G. Bensimon, L. Lacomblez, F. Salachas, P. F. Pradat, N. Le Forestier, A. Marouan, M. Dib, and V. Meininger. 2002. 'Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients', *J Neurol Sci*, 193: 73-8.
- Sreedharan, J., I. P. Blair, V. B. Tripathi, X. Hu, C. Vance, B. Rogelj, S. Ackerley, J. C. Durnall, K. L. Williams, E. Buratti, F. Baralle, J. de Belleruche, J. D. Mitchell, P. N. Leigh, A. Al-Chalabi, C. C. Miller, G. Nicholson, and C. E. Shaw. 2008. 'TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Science*, 319: 1668-72.
- Staff, N. P., D. T. Jones, and W. Singer. 2019. 'Mesenchymal Stromal Cell Therapies for Neurodegenerative Diseases', *Mayo Clin Proc*, 94: 892-905.
- Staff, N. P., N. N. Madigan, J. Morris, M. Jentoft, E. J. Sorenson, G. Butler, D. Gastineau, A. Dietz, and A. J. Windebank. 2016. 'Safety of intrathecal autologous adipose-derived mesenchymal stromal cells in patients with ALS', *Neurology*, 87: 2230-34.
- Steinacker, P., C. Hendrich, A. D. Sperfeld, S. Jesse, S. Lehnert, A. Pabst, C. A. von Arnim, F. M. Mottaghy, I. Uttner, H. Tumani, A. Ludolph, and M. Otto. 2009. 'Concentrations of beta-amyloid precursor protein processing products in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration', *J Neural Transm (Vienna)*, 116: 1169-78.
- Su, M., S. H. Soomro, J. Jie, and H. Fu. 2021. 'Effects of the extracellular matrix on myelin development and regeneration in the central nervous system', *Tissue Cell*, 69: 101444.
- Sun, H., M. Li, Y. Ji, J. Zhu, Z. Chen, L. Zhang, C. Deng, Q. Cheng, W. Wang, Y. Shen, and D. Shen. 2022. 'Identification of Regulatory Factors and Prognostic Markers in Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Antioxidants (Basel)*, 11.
- Supek, F., M. Bosnjak, N. Skunca, and T. Smuc. 2011. 'REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms', *PLoS One*, 6: e21800.
- Sutedja, N. A., Y. T. van der Schouw, K. Fischer, E. M. Sizoo, M. H. Huisman, J. H. Veldink, and L. H. Van den Berg. 2011. 'Beneficial vascular risk profile is associated with amyotrophic lateral sclerosis', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 82: 638-42.
- Sutherland, Tara E. 2018. 'Chitinase-like proteins as regulators of innate immunity and tissue repair: helpful lessons for asthma?', *Biochemical Society Transactions*, 46: 141-51.
- Swart, G. W. 2002. 'Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration', *Eur J Cell Biol*, 81: 313-21.
- Takei, K., K. Watanabe, S. Yuki, M. Akimoto, T. Sakata, and J. Palumbo. 2017. 'Edaravone and its clinical development for amyotrophic lateral sclerosis', *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 18: 5-10.
- Tashiro, K., H. Tada, R. Heilker, M. Shirozu, T. Nakano, and T. Honjo. 1993. 'Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins', *Science*, 261: 600-3.
- Taylor, J. P., R. H. Brown, Jr., and D. W. Cleveland. 2016. 'Decoding ALS: from genes to mechanism', *Nature*, 539: 197-206.
- Tewari, B. P., L. Chaunsali, C. E. Prim, and H. Sontheimer. 2022. 'A glial perspective on the extracellular matrix and perineuronal net remodeling in the central nervous system', *Front Cell Neurosci*, 16: 1022754.
- Theocharis, A. D., S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos. 2016. 'Extracellular matrix structure', *Adv Drug Deliv Rev*, 97: 4-27.
- Thompson, A. G., E. Gray, A. Bampton, D. Raciborska, K. Talbot, and M. R. Turner. 2019. 'CSF chitinase proteins in amyotrophic lateral sclerosis', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 90: 1215-20.
- Thompson, A. G., K. Talbot, and M. R. Turner. 2021. 'Higher blood high density lipoprotein and apolipoprotein A1 levels are associated with reduced risk of developing amyotrophic lateral sclerosis', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- Tomita, K., A. van Bokhoven, C. F. Jansen, M. J. Bussemakers, and J. A. Schalken. 2000. 'Coordinate recruitment of E-cadherin and ALCAM to cell-cell contacts by alpha-catenin', *Biochem Biophys Res Commun*, 267: 870-4.
- Turner, M. R., R. Bowser, L. Buijn, L. Dupuis, A. Ludolph, M. McGrath, G. Manfredi, N. Maragakis, R. G. Miller, S. L. Pullman, S. B. Rutkove, P. J. Shaw, J. Shefner, and K. H. Fischbeck. 2013a.

- 'Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis', *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 14 Suppl 1: 19-32.
- Turner, Martin R., Robert Bowser, Lucie Bruijn, Luc Dupuis, Albert Ludolph, Michael McGrath, Giovanni Manfredi, Nicholas Maragakis, Robert G. Miller, Seth L. Pullman, Seward B. Rutkove, Pamela J. Shaw, Jeremy Shefner, and Kenneth H. Fischbeck. 2013b. 'Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis', *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 14: 19-32.
- Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia. 2008. 'Mesenchymal stem cells in health and disease', *Nat Rev Immunol*, 8: 726-36.
- Van Damme, Philip, Wim Robberecht, and Ludo Van Den Bosch. 2017. 'Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities', *Disease Models & Mechanisms*, 10: 537.
- van den Bos, M. A. J., N. Geevasinga, and M. Higashihara. 2019. 'Pathophysiology and Diagnosis of ALS: Insights from Advances in Neurophysiological Techniques', 20.
- van Kempen, L. C., J. M. Nelissen, W. G. Degen, R. Torensma, U. H. Weidle, H. P. Bloemers, C. G. Figdor, and G. W. Swart. 2001. 'Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction', *J Biol Chem*, 276: 25783-90.
- Varghese, A. M., A. Sharma, P. Mishra, K. Vijayalakshmi, H. C. Harsha, T. N. Sathyaprabha, S. M. Bharath, A. Nalini, P. A. Alladi, and T. R. Raju. 2013. 'Chitotriosidase - a putative biomarker for sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Clin Proteomics*, 10: 19.
- Vijayakumar, U. G., V. Milla, M. Y. C. Stafford, A. J. Bjourson, W. Duddy, and S. M. R. Duguez. 2019. 'A Systematic Review of Suggested Molecular Strata, Biomarkers and Their Tissue Sources in ALS', *Frontiers in Neurology*, 10.
- Volk, A. E., J. H. Weishaupt, P. M. Andersen, A. C. Ludolph, and C. Kubisch. 2018. 'Current knowledge and recent insights into the genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis', *Med Genet*, 30: 252-58.
- Vu, Lucas T., and Robert Bowser. 2017. 'Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Neurotherapeutics*, 14: 119-34.
- Wang, H., J. A. Kulas, C. Wang, D. M. Holtzman, H. A. Ferris, and S. B. Hansen. 2021. 'Regulation of beta-amyloid production in neurons by astrocyte-derived cholesterol', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118.
- Wang, Y., P. Xu, L. Qiu, M. Zhang, Y. Huang, and J. C. Zheng. 2016. 'CXCR7 Participates in CXCL12-mediated Cell Cycle and Proliferation Regulation in Mouse Neural Progenitor Cells', *Curr Mol Med*, 16: 738-46.
- Warde-Farley, David, Sylva L. Donaldson, Ovi Comes, Khalid Zuberi, Rashad Badrawi, Pauline Chao, Max Franz, Chris Grouios, Farzana Kazi, Christian Tannus Lopes, Anson Maitland, Sara Mostafavi, Jason Montojo, Quentin Shao, George Wright, Gary D. Bader, and Quaid Morris. 2010. 'The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function', *Nucleic Acids Research*, 38: W214-W20.
- Washbourne, P., A. Dityatev, P. Scheiffele, T. Biederer, J. A. Weiner, K. S. Christopherson, and A. El-Husseini. 2004. 'Cell adhesion molecules in synapse formation', *J Neurosci*, 24: 9244-9.
- Watanabe, K., M. Tanaka, S. Yuki, M. Hirai, and Y. Yamamoto. 2018. 'How is edaravone effective against acute ischemic stroke and amyotrophic lateral sclerosis?', *J Clin Biochem Nutr*, 62: 20-38.
- Watson, M. R., R. D. Lagow, K. Xu, B. Zhang, and N. M. Bonini. 2008. 'A drosophila model for amyotrophic lateral sclerosis reveals motor neuron damage by human SOD1', *J Biol Chem*, 283: 24972-81.
- Webster, C. P., E. F. Smith, C. S. Bauer, A. Moller, G. M. Hautbergue, L. Ferraiuolo, M. A. Myszczyńska, A. Higginbottom, M. J. Walsh, A. J. Whitworth, B. K. Kaspar, K. Meyer, P. J. Shaw, A. J. Grierson, and K. J. De Vos. 2016. 'The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy', *EMBO J*, 35: 1656-76.
- Weidle, U. H., D. Eggle, S. Klostermann, and G. W. Swart. 2010. 'ALCAM/CD166: cancer-related issues', *Cancer Genomics Proteomics*, 7: 231-43.
- Wennstrom, M., and H. M. Nielsen. 2012. 'Cell adhesion molecules in Alzheimer's disease', *Degener Neurol Neuromuscul Dis*, 2: 65-77.
- Werdelin, L., A. Gjerris, G. Boysen, J. Fahrenkrug, O. S. Jorgensen, and J. F. Rehfeld. 1989.

- 'Neuropeptides and neural cell adhesion molecule (NCAM) in CSF from patients with ALS', *Acta Neurol Scand*, 79: 177-81.
- Whelan, Christopher D., Niklas Mattsson, Michael W. Nagle, Swetha Vijayaraghavan, Craig Hyde, Shorena Janelidze, Erik Stomrud, Julie Lee, Lori Fitz, Tarek A. Samad, Gayathri Ramaswamy, Richard A. Margolin, Anders Malarstig, and Oskar Hansson. 2019. 'Multiplex proteomics identifies novel CSF and plasma biomarkers of early Alzheimer's disease', *Acta Neuropathologica Communications*, 7: 169.
- Worms, P. M. 2001. 'The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies', *J Neurol Sci*, 191: 3-9.
- Writing, Group, and A. L. S. Study Group Edaravone. 2017. 'Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial', *Lancet Neurol*, 16: 505-12.
- Xu, P. T., J. R. Gilbert, H. L. Qiu, J. Ervin, T. R. Rothrock-Christian, C. Hulette, and D. E. Schmechel. 1999. 'Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons', *Am J Pathol*, 154: 601-11.
- Xu, Z., M. Poidevin, X. Li, Y. Li, L. Shu, D. L. Nelson, H. Li, C. M. Hales, M. Gearing, T. S. Wingo, and P. Jin. 2013. 'Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 7778-83.
- Yamagata, M., J. R. Sanes, and J. A. Weiner. 2003. 'Synaptic adhesion molecules', *Curr Opin Cell Biol*, 15: 621-32.
- Yao, P., L. Zhou, L. Zhu, B. Zhou, and Q. Yu. 2020. 'Mesenchymal Stem Cells: A Potential Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases', *Eur Neurol*, 83: 235-41.
- Yari, H., M. V. Mikhailova, M. Mardasi, M. Jafarzadehgharehziaaddin, S. Shahrokh, L. Thangavelu, H. Ahmadi, N. Shomali, Y. Yaghoubi, M. Zamani, M. Akbari, and S. Alesaeidi. 2022. 'Emerging role of mesenchymal stromal cells (MSCs)-derived exosome in neurodegeneration-associated conditions: a groundbreaking cell-free approach', *Stem Cell Res Ther*, 13: 423.
- Yonemura, S., M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Kondo, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1998. 'Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2', *J Cell Biol*, 140: 885-95.
- Yun, H. M., H. S. Kim, K. R. Park, J. M. Shin, A. R. Kang, K. il Lee, S. Song, Y. B. Kim, S. B. Han, H. M. Chung, and J. T. Hong. 2013. 'Placenta-derived mesenchymal stem cells improve memory dysfunction in an A β 1-42-infused mouse model of Alzheimer's disease', *Cell Death & Disease*, 4: e958-e58.
- Zhang, R., R. Gascon, R. G. Miller, D. F. Gelinas, J. Mass, K. Hadlock, X. Jin, J. Reis, A. Narvaez, and M. S. McGrath. 2005. 'Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS)', *J Neuroimmunol*, 159: 215-24.
- Zhang, Y., H. Zhang, S. Lin, X. Chen, Y. Yao, X. Mao, B. Shao, Q. Zhuge, and K. Jin. 2018. 'SDF-1/CXCR7 Chemokine Signaling is Induced in the Peri-Infarct Regions in Patients with Ischemic Stroke', *Aging Dis*, 9: 287-95.
- Zhao, C. P., C. Zhang, S. N. Zhou, Y. M. Xie, Y. H. Wang, H. Huang, Y. C. Shang, W. Y. Li, C. Zhou, M. J. Yu, and S. W. Feng. 2007. 'Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice', *Cytotherapy*, 9: 414-26.
- Zimmerman, A. W., J. M. Nelissen, S. E. van Emst-de Vries, P. H. Willems, F. de Lange, J. G. Collard, F. N. van Leeuwen, and C. G. Figdor. 2004. 'Cytoskeletal restraints regulate homotypic ALCAM-mediated adhesion through PKC α independently of Rho-like GTPases', *J Cell Sci*, 117: 2841-52.
- Zuroff, L., D. Daley, K. L. Black, and M. Koronyo-Hamaoui. 2017. 'Clearance of cerebral Abeta in Alzheimer's disease: reassessing the role of microglia and monocytes', *Cell Mol Life Sci*, 74: 2167-201.