Chrystian Junqueira Alves

Caracterização do papel da célula de Schwann
no processo de neurodegeneração do neurônio motor
na esclerose lateral amiotrófica no modelo animal
transgênico e no nervo periférico de pacientes:
estudo in vitro

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi
Coorientadora: Profa. Dra. Jessica Ruivo Maximino

São Paulo
2015

CHRYSTIAN JUNQUEIRA ALVES

Caracterização do papel da célula de Schwann no processo de neurodegeneração do neurônio motor na esclerose lateral amiotrófica no modelo animal transgênico e no nervo periférico de pacientes: estudo *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

Coorientadora: Profa. Dra. Jessica Ruivo Maximino

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Alves, Chrystian Junqueira

Caracterização do papel da células de Schwann no processo de neurodegeneração do neurônio motor na esclerose lateral amiotrófica no modelo animal transgênico e no nervo periférico de pacientes : estudo *in vitro* / Chrystian Junqueira Alves. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.

Orientador: Gerson Chadi.

Coorientadora: Jessica Ruivo Maximino

Descritores: 1.Esclerose amiotrófica lateral 2.Degeneração retrógrada
3.Técnicas de cultura de células 4.Células de Schwann 5.Neurônios motores

USP/FM/DBD-139/15

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurologia Translacional (LIM-45) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedicatória

Aos meus pais, Wilse e Paulo, que por uma vida de dedicação e amor aos seus filhos, sempre me apoiaram e possibilitaram que eu realizasse meus sonhos e conquistas.

Agradecimentos

Esta tese de doutorado é uma somatória de esforços de um grande número de pessoas e certamente esse trabalho não teria sido concluído sem a participação de todos. Assim é com grande entusiasmo e alegria que agradeço:

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Gerson Chadi**, pela oportunidade de trabalhar nesse grande projeto de pesquisa em ELA, pela orientação, correções e incentivos. Agradeço, sobretudo pela confiança depositada em mim em todos os aspectos, e na gratificante oportunidade de orientar meus primeiros alunos de iniciação científica.

À **Dra. Jéssica Ruivo Maximino**, pela co-orientação e inúmeras idéias que compõem esse trabalho, mas, sobretudo por todos os momentos em que você me auxiliou das mais diversas maneiras. Sua amizade e motivação me ajudaram a fazer o melhor que eu pude nesse projeto.

Aos meus pais, **Wilse e Paulo**, e a minha querida irmã **Ana Paula**, por todo amor e carinho e pelos incentivos em todos os aspectos que possibilitaram que eu completasse essa importante etapa na minha vida profissional. A todos os meus familiares, em especial à vovó **Zilda** e à tia **Noêmia** que sempre me apoiaram na conquista dos meus objetivos e às tias **Edith** e **Lú** (*in memorian*), sei que ficariam muito felizes nesse momento.

À querida **Nathália Stela**, por ter caminhado ao meu lado nessa emocionante jornada. Obrigado por todo carinho, apoio, conselhos e discussões. Sua dedicação e inteligência foram e sempre serão minhas inspirações. Aos queridos, **Haroldo** e **Rosângela de Figueiredo**, por sempre me tratarem como um filho, nunca me esquecerei de tudo o que fizeram por mim.

Aos grandes e eternos amigos **Willian Nunes**, **Phillipe Mendonça**, **Felipe Kitamura**, **Jair Trapé**, **Pedro Omar** e **César Nunes**, com os quais divido uma profunda cumplicidade e admiração. Por todos os momentos de alegria, experiências compartilhadas, discussões científicas e filosóficas. Vocês são os grandes cientistas.

Ao querido **Alan Fappi**, por sua amizade e por todos os momentos que passamos juntos. Sua contagiante alegria e capacidade de ouvir fizeram de você um grande pilar na minha trajetória. Ao amigo **Fernando de Oliveira**, foi um grande prazer conhecê-lo, sua mente pensante me trouxe muitos momentos de conversa enriquecedora. Ao amigo **Roberto Gabriel**, que eu tive o prazer de conhecer nesse período final e cujos momentos de descontração me trouxeram alegria e calma para finalizar essa etapa.

Aos meus alunos de iniciação científica, **Daniel Go, Alexandre Guimarães, Paula Martho e Matheus Monteiro**. Esse trabalho não seria possível sem a participação de alunos tão dedicados e sempre prontos a ajudar e discutir. De vocês levo mais do que a convivência, levo a amizade.

À amiga **Florence Dinucci** por todo apoio, palavras de incentivo e momentos inestimáveis que me fizeram chegar até aqui. À amiga **Iolanda Oruê**, pelo apoio, ajuda constante e pelos momentos de descontração. À **Sarah** e ao **Gilmar** pela enorme dedicação e pelo carinho que sempre tiveram por mim.

A todos os colegas e ex-colegas do LIM-45, **Juliana Neves, Marquinhos, Samantha, Juliana Scorisa, Tatiana Duobles, Thaís Virgínia** e todos os demais alunos que passaram pelo laboratório e com os quais eu convivi por mais de cinco anos. Em especial, à amiga **Gabriela Pintar**, com a qual eu compartilhei muitas discussões interessantes e conversas inesquecíveis. Todos me trouxeram de alguma forma muitas experiências valiosas que eu vou carregar por toda a vida.

Ao professor **Edmar Zanoteli** pelas experiências compartilhadas. Ao **Frederico de Mennucci de Haidar Jorge, Dr Dagoberto Callegaro e Dr Roberto Sérgio Martins** pela possibilidade de utilizar as amostras de pacientes nesse trabalho.

Ao **Victor Debbas** do laboratório de biologia vascular do InCOR/FMUSP pela doação dos anticorpos secundários e pela grande ajuda com o uso do aparelho de *In Cell WB*. À **Dra. Kátia Carvalho**, do laboratório de ginecologia da FMUSP pelas dicas valiosas e por nos permitir utilizar o equipamento de PCR quantitativo. Ao **Prof. Dr. Antonio Sesso** do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP pelo valioso e paciente auxílio com os marcadores de apoptose.

Aos professores **Debora Fior Chadi, Sérgio Paulo Bydlowski e Dagoberto Callegaro** pelas correções e considerações feitas na qualificação, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Finalmente, um agradecimento especial a todos os pacientes que participaram desse estudo, que as suas células possam representar fagulhas de esperança para o entendimento e tratamento da ELA.

À **pós-graduação em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**. À **FAPESP** pela bolsa de doutorado (2010/20467-2), fundamental para que eu pudesse realizar este trabalho e pelo financiamento do projeto regular (2010/20457-7). Ao **CNPq** pelos apoios financeiros.

Epígrafe

A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.

Charles Darwin

Esta tese 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. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	A Esclerose Lateral Amiotrófica	3
1.2.	A ELA familiar e o modelo experimental	6
1.3.	A ELA esporádica	7
1.4.	Células gliais e a patogênese da ELA.....	8
1.5.	A célula de Schwann e a denervação periférica na ELA.....	10
1.6.	O modelo <i>in vitro</i> da ELA	13
2.	OBJETIVOS.....	15
2.1.	Objetivo Geral	17
2.2.	Objetivos Específicos	17
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1.	Modelo animal da ELA	21
3.2.	Colônias de animais.....	21
3.3.	Genotipagem dos camundongos.....	22
3.4.	Análise comportamental	23
3.5.	Biópsia de nervo periférico em pacientes com ELA	24
3.6.	Experimentos <i>in vitro</i>	26
3.6.1.	Cultura de NM a partir da medula espinal de camundongos neonatos	26
3.6.2.	Cultura de CS a partir do nervo ciático do camundongo adulto jovem e do nervo periférico de pacientes com ELA e controles.....	27
3.6.3.	Procedimento imunocitoquímico para identificação das CS dos camundongos e de pacientes.....	29
3.6.4.	Congelamento das CS.....	30
3.6.5.	Quantificação da pureza das culturas de NM a partir da medula de camundongos neonatos.....	30
3.6.6.	Experimento 1 - Adequação e realização das co-culturas	31
3.6.7.	Experimento 1 - Análise da degeneração neuronal <i>in vitro</i> no sistema de co-cultura NM/CS pelo Fluoro-Jade C	31
3.6.8.	Experimento 2 - Adequação e realização do tratamento dos NM com o meio condicionado das CS	32

3.6.9. Experimento 2 - Análise da degeneração neuronal <i>in vitro</i> na presença do meio condicionado das CS	33
3.6.10. Experimento 2 - Análise do tamanho dos prolongamentos dos NM <i>in vitro</i> na presença do meio condicionado da CS	33
3.6.11. Experimentos controles pelo método do <i>In Cell</i> WB	35
3.6.12. Experimentos controles para detecção de apoptose	37
3.7. Experimento 3 - ELISA do meio condicionado das culturas de CS.....	38
3.8. Experimento 4 - Avaliação da expressão gênica das moléculas candidatas pela técnica do qPCR	39
3.9. Análise estatística	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Análise comportamental	45
4.2. Biópsia do nervo periférico de pacientes com ELA e controles.....	45
4.3. Experimentos <i>in vitro</i>	47
4.3.1. Quantificação da pureza das culturas de NM obtidas a partir da medula espinal de camundongos neonatos.....	47
4.3.2. Quantificação da pureza das culturas de CS do nervo ciático do camundongo e do nervo periférico de pacientes	50
4.3.3. Experimento 1 - Adequação e realização das co-culturas	54
4.3.4. Experimento 1 - Análise da degeneração neuronal <i>in vitro</i> no sistema de co-cultura de camundongos	55
4.3.5. Experimento 1 - Análise da degeneração neuronal <i>in vitro</i> no sistema de co-cultura de pacientes	56
4.3.6. Experimento 2 - Análise do tamanho dos prolongamentos neuronais <i>in vitro</i> na presença do meio condicionado das CS de camundongos.....	58
4.3.7. Experimento 2 - Análise da degeneração neuronal <i>in vitro</i> na presença do meio condicionado das CS de camundongos	60
4.3.8. Experimento 2 - Análise do tamanho dos prolongamentos neuronais <i>in vitro</i> na presença do meio condicionado da CS de pacientes.....	61
4.3.9. Experimento 2 - Análise da degeneração neuronal <i>in vitro</i> na presença do meio condicionado das CS dos pacientes	64
4.3.10. Experimentos controles pelo método do <i>In Cell</i> WB	65
4.3.11. Experimentos controles para detecção de apoptose	69
4.4. Experimento 3 - ELISA do meio condicionado das culturas de CS.....	71
4.5. Experimento 4 - Avaliação da expressão gênica das moléculas candidatas pela técnica do qPCR	72
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÕES	91
7. ANEXOS	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	Do inglês, <i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i>
Ara-C	Do inglês, <i>Cytosine arabinoside</i>
BAX	Do inglês, <i>Bcl-2-associated X protein</i>
BDNF	Do inglês, <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BLAST	Do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>
CAM	Do inglês, <i>Cell-Adhesion Molecules</i>
cDNA	Do inglês, <i>complementary DNA</i>
ChAT	Do inglês, <i>Choline Acetyltransferase</i>
CNTF	Do inglês, <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
CPO	Célula precursora de oligodendrócito
CS	Célula de Schwann
Ct	Do inglês, <i>Cycle threshold</i>
DAB	Do inglês, <i>Diaminobenzidine</i>
DAPI	Do inglês, <i>4',6-diamidino-2-phenylindol</i>
DISC	Do inglês, <i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAAT2	Do inglês, <i>Excitatory Amino-Acid Transporter 2</i>
EDTA	Do inglês, <i>Ethylene Diamine Tetracetic Acid</i>
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ELISA	Do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FUS	Do inglês, <i>RNA-binding protein Fused in Sarcoma</i>
GABA	Do inglês, <i>Gama Aminobutyric Acid</i>
GAD	Do inglês, <i>Glutamic Acid Decarboxylase</i>
GDNF	Do inglês, <i>Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor</i>
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
H₂O	Água
HCL	Ácido Clorídrico
HDL	Do inglês, <i>High-Density Lipoprotein</i>
HLA	Do inglês, <i>Human Leucocyte Antigen</i>
HRE	Do inglês, <i>Hypoxia Response Elements</i>
IGF-1	Do inglês, <i>Insulin-Like Growth Factor 1</i>
IL-2	Interleucina 2
iNOS	Do inglês, <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
JNM	Junção Neuromuscular
MAP-2	Do inglês, <i>Microtubule-Associated Protein 2</i>
M-CSF	Do inglês, <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MCT1	Do inglês, <i>Monocarboxylate Transporter 1</i>
MHC	Do inglês, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
mRNA	Do inglês, <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD	Do inglês, <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NGF	Do inglês, <i>Nerve Growth Factor</i>
NGS	Do inglês, <i>Normal Goat Serum</i>
NM	Neurônio motor
NT-3	Do inglês, <i>Neurotrophin-3</i>
PBS	Do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>

PLL	Do inglês, Poly(L-lysine)
qPCR	Do inglês, <i>quantitative PCR</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA_m	RNA mensageiro
rpm	rotações por minuto
S.E.M.	Do inglês, <i>Standart Error Mean</i>
SDS	Sulfato Dodecil de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD1	Superóxido Dismutase 1
SPF	Do inglês, <i>Specific Pathogen Free</i>
TDP-43	Do inglês, <i>Transactive Response DNA Binding Protein 43 kDa</i>
TE	Tris-EDTA
TFAM	Do inglês, <i>Mitochondrial Transcription Factor A</i>
TG	Transgênico
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tris	Do inglês, <i>Trishydroxymethylaminomethane</i>
Tris-HCl	Do inglês, <i>Tris-Hydrochloride</i>
Trk	Do inglês, <i>Tirosine Kinase Receptors</i>
VEGFA	Do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
WT	Do inglês, <i>Wild-Type</i>
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
nM	nanomolar
°C	graus Celsius
pb	pares de base
pg	picograma
U	Unidade
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrando os principais mecanismos descritos para as ações autócrinas e parácrinas das células gliais ao neurônio motor (NM) na ELA.	9
Figura 2. O modelo <i>dying-back</i> da degeneração do neurônio motor na ELA.	13
Figura 3. Procedimento de genotipagem para determinação do genótipo do camundongo.	23
Figura 4. Posição anatômica do nervo extensor curto do hálux.	25
Figura 5. Nervo extensor curto do hálux após a retirada durante biópsia realizada em pacientes acompanhados no Ambulatório de ELA do Departamento de Neurologia do HC/FMUSP.	26
Figura 6. Biópsia do nervo ciático do camundongo com 60 dias de idade.	27
Figura 7. Procedimento para a contagem estereológica dos prolongamentos neuronais.	35
Figura 8. Fotomicrografias por contraste de fase mostrando a cultura de neurônios motores da medula espinal de camundongos neonatos ao longo dos 6 dias <i>in vitro</i>	48
Figura 9. Culturas de neurônios motores da medula espinal de camundongos neonatos.	49
Figura 10. Pureza das culturas de neurônios motores no 3º dia <i>in vitro</i>	49
Figura 11. Fotomicrografias das células de Schwann (CS) do nervo ciático de camundongos cultivadas nas fases de explante E1 (A) e E2 (B).	50
Figura 12. Pureza das culturas de células de Schwann (CS) de camundongos, plaqueadas em poli-L-lisina (PLL) ou laminina com ou sem tratamento pelo anticorpo anti-Thy 1.1 ou 1.2.	51
Figura 13. Fotomicrografias mostrando imunoreatividade da proteína S100 β em culturas de células de Schwann (CS) de camundongos de 60 dias.	51
Figura 14. Fotomicrografias das células de Schwann (CS) humanas cultivadas na primeira passagem (P) 1.	52
Figura 15. Quantificação da pureza das culturas de células de Schwann (CS) humanas.	53
Figura 16. Fotomicrografia das culturas de células de Schwann (CS) humanas imunorreativas para a proteína S100 β visualizadas através de fluorescência.	53
Figura 17. Fotomicrografias das co-culturas de neurônios motores e células de Schwann (CS) de camundongos por contraste de fase (A) e imunofluorescência (B).	54
Figura 18. Fotomicrografia ilustrativa dos neurônios motores marcados com Fluoro-Jade C (FJC) no sistema de co-cultura.	55
Figura 19. Perfil de células Fluoro-Jade C positivas (FJC+) na co-cultura de células de Schwann (CS) de camundongos na fase pré-sintomática e neurônios motores.	56
Figura 20. Perfil de células Fluoro-Jade C positivas (FJC+) na co-cultura de células de Schwann (CS) de pacientes ELA (PELA) e controles (PCT).	57

Figura 21. Análise do tamanho dos prolongamentos neuronais nas culturas de neurônios motores tratados com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de camundongos na fase pré-sintomática.	59
Figura 22. Tamanho dos prolongamentos neuronais após o tratamento com o meio condicionado das células de Schwann (CS) do modelo animal.	59
Figura 23. Análise do tamanho dos corpos celulares dos neurônios motores tratados com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de camundongos de 60 dias.	60
Figura 24. Perfil de células Fluoro-Jade C positivas (FJC+) após o tratamento com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de camundongos na fase pré-sintomática.	61
Figura 25. Tamanho dos prolongamentos neuronais nas culturas de neurônios motores tratadas com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de pacientes. ...	62
Figura 26. Tamanho dos prolongamentos neuronais nas culturas de neurônios motores tratados com o meio condicionado das células de Schwann (CS) dos pacientes individuais.	63
Figura 27. Tamanho dos prolongamentos neuronais após o tratamento com o meio condicionado das células de Schwann (CS) dos pacientes.	64
Figura 28. Perfil de células Fluoro-Jade C positivas (FJC+) após o tratamento com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de pacientes.	65
Figura 29. Influência do meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) e dos fibroblastos na sobrevivência de tipos neuronais pelo método do <i>In Cell WB</i>	66
Figura 30. Sobrevivência dos neurônios motores avaliada pelo método do <i>In Cell WB</i> após o tratamento com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de camundongos.	67
Figura 31. Sobrevivência dos neurônios motores avaliada pelo método do <i>In Cell WB</i> após o tratamento com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de pacientes.	68
Figura 32. Perfil dos neurônios motores em apoptose pela marcação de poli-caspases após o tratamento com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS).	69
Figura 33. Perfil dos neurônios motores em apoptose pela marcação do TUNEL após co-cultura com as células de Schwann (CS) de pacientes.	70
Figura 34. Fatores neurotróficos no meio condicionado das culturas de células de Schwann (CS).	72
Figura 35. Resultados dos experimentos de qPCR, em Fold relativo, dos transcritos avaliados nas culturas de células de Schwann (CS) dos camundongos.	73
Figura 36. Resultados dos experimentos de qPCR, em Fold relativo, dos transcritos avaliados no nervo extensor curto do hálux de pacientes com ELA.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes causativos –alto risco de ELA.	4
Tabela 2. Genes associados –baixo risco de ELA.	5
Tabela 3. Primers utilizados nos experimentos de expressão gênica das moléculas candidatas pela técnica do qPCR SYBR.	42
Tabela 4. Relação dos pacientes acompanhados no Ambulatório de ELA do Departamento de Neurologia do HC/FMUSP e submetidos à biópsia do nervo extensor curto do hálux.	46
Tabela 5. Relação dos pacientes submetidos ao ato cirúrgico das Lesões Traumáticas do Plexo Braquial.	46

RESUMO

Alves CJ. *Caracterização do papel da célula de Schwann no processo de neurodegeneração do neurônio motor na esclerose lateral amiotrófica no modelo animal transgênico e no nervo periférico de pacientes: estudo in vitro*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa progressiva de evolução rápida, caracterizada pela perda seletiva dos neurônios motores (NM) superiores e inferiores. Recentemente, as células gliais centrais (astrócito, microglia e oligodendrócito) mostraram-se tóxicas aos NM, porém os detalhes moleculares não estão completamente elucidados. Em relação às células gliais periféricas, alterações eletrofisiológicas no nervo ciático do modelo animal da ELA na idade pré-sintomática foram reportadas pelo nosso grupo e os achados de denervação precoce tanto no modelo animal quanto em pacientes sugerem a participação das células de Schwann (CS) na morte neuronal retrógrada na ELA, teoria conhecida como *dying back*. Nesse contexto, as CS mostraram-se capazes de induzir a retração axonal e a denervação das junções neuromusculares, eventos precoces na doença, ocorrendo possivelmente na fase pré-sintomática. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência das CS do modelo experimental na fase pré-sintomática e do paciente com evolução recente da forma esporádica da ELA, na sobrevida e no tamanho dos prolongamentos dos NM *in vitro* e entender a natureza molecular do fenômeno. Culturas de CS altamente purificadas foram obtidas a partir do nervo ciático do camundongo modelo animal e do nervo periférico de pacientes com ELA. Os NM da medula espinal de camundongos neonatos foram co-cultivados com as CS. A neurodegeneração foi avaliada pela presença do marcador Fluoro-Jade C (FJC). Os NM também foram tratados com o meio condicionado das culturas de CS do modelo animal ou dos pacientes com ELA. Os motoneurônios tiveram os seus prolongamentos contados e a morte neuronal foi identificada pela presença do FJC. Diversos fatores neurotróficos foram quantificados no meio condicionado das culturas de CS pela técnica de ELISA. A reação em cadeia da polimerase quantitativa (do inglês, *quantitative polymerase chain reaction* - qPCR) foi realizada para detectar alterações nas CS e no nervo periférico que pudessem estar relacionadas com disfunção na unidade CS/NM. Os resultados mostraram que os NM cultivados na ausência das CS mostraram-se mais susceptíveis à morte. Os NM co-cultivados com as CS ELA mostraram maior número de perfis neurodegenerativos em comparação com os NM co-cultivados com as CS controle. Após o tratamento com o meio condicionado das CS ELA, os NM mostraram redução no tamanho dos prolongamentos e aumento do número de células em neurodegeneração em comparação com o grupo controle. Quantidades reduzidas dos fatores neurotróficos foram encontradas no meio condicionado das culturas de CS ELA. Alterações na expressão gênica das CS e no nervo periférico evidenciaram disfunções na unidade CS/NM que podem estar contribuindo para o processo neurodegenerativo visto na ELA. Conclui-se que a falência nos mecanismos de neuroproteção pelas CS ELA é um importante mecanismo implicado na morte neuronal, com grande potencial terapêutico.

Descritores: 1.Esclerose amiotrófica lateral; 2.Degeneração retrógrada; 3.Técnicas de cultura de células; 4.Células de Schwann; 5.Neurônios motores.

ABSTRACT

Alves CJ. *Characterization of Schwann cell role in the motor neuron neurodegeneration process in amyotrophic lateral sclerosis in the transgenic animal model and in the peripheral nerve of patients: in vitro study*. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease characterized by the selective loss of upper and lower motor neurons (MN). Recently, central glia (astrocytes, microglia and oligodendrocytes) were toxic to the MN, but the molecular aspects have not fully described. In relation to the peripheral glia, electrophysiological changes in the sciatic nerve of ALS animal model in the presymptomatic stage have been reported by our group and early denervation findings in both animal models and patients suggests the participation of Schwann cells (SC) in the retrograde neuronal death of ALS, theory known as dying back. In this context, the SC proved to be able to induce axonal retraction and denervation of the neuromuscular junctions, early events in the disease, possibly occurring in the pre-symptomatic phase. The aim of this thesis was to investigate the influence of SC of pre-symptomatic experimental model and from patient with recent evolution of ALS sporadic form, in the survival and axonal length of MN *in vitro* and understand the molecular nature of the phenomenon. Highly purified SC cultures were obtained from the sciatic nerve of the animal model and from ALS patient's peripheral nerve. MN from the newborn mouse spinal cord were co-cultured with SC and the neurodegeneration was assessed by the presence of the marker Fluoro-Jade C (FJC). MN were also treated with conditioned medium from cultures of SC of the animal model or ALS patients. MN had their neuronal length measured and neuronal degeneration was identified by the presence of the FJC. Several neurotrophic factors were measured in conditioned medium of mice and ALS patient's SC cultures by ELISA. The chain reaction quantitative polymerase (qPCR) was performed to detect changes in the SC and peripheral nerve that could be related with dysfunction in the functional unit SC/MN. The MN co-cultured with ALS SC showed a greater number of neurodegenerative profiles compared with MN co-cultured with control SC. After treatment with ALS SC conditioned medium, MN showed a reduction in the neuronal length and increased number of cells in neurodegeneration compared with the control group. Lower levels of neurotrophic factors were found in the conditioned medium of ALS SC cultures. Changes in the gene expression of SC and peripheral nerve showed dysfunctions in SC/MN unit, which may be contributing to the neurodegenerative process seen in ALS. In conclusion, the failure of neuroprotection by ALS SC is an important mechanism implicated in the MN cell death, with great therapeutic potential.

Descriptors: 1. Amyotrophic lateral sclerosis; 2. Retrograde Degeneration; 3. Cell culture techniques; 4. Schwann cells; 5. Motor Neurons.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Esclerose Lateral Amiotrófica

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela morte dos neurônios motores (NM) superiores e inferiores. A morte desses neurônios ocasiona atrofia muscular, fraqueza, fasciculações e espasticidade, culminando com paralisia progressiva, que geralmente é fatal dentro de 2 a 5 anos após os primeiros sintomas, devido, sobretudo à insuficiência respiratória (Rosen, 1993; Cleveland e Rothstein, 2001; Pasinelli e Brown, 2006).

A ELA é uma doença de adultos com início médio entre 55 e 65 anos de idade, e incidência de 2 casos a cada 100.000 habitantes por ano. Atualmente, reporta-se aumento no número de pacientes jovens portadores da enfermidade. A prevalência da ELA é de 6-8 casos para cada 100.000 habitantes, sendo que os Estados Unidos têm a prevalência mais elevada, com cerca de 22.600 americanos acometidos. A ELA também é mais frequente em homens do que em mulheres, na proporção de até 2:1. Porém, com o aumento da idade em relação ao início dos sintomas, essa diferença diminui e se aproxima de 1:1 acima dos 70 anos (Dal Bello-Haas et al., 1998).

Os sinais e sintomas da ELA surgem quando as conexões axonais começam a falhar, isto é, quando os axônios se retraem e a denervação central, dos NM inferiores ou periférica relacionada ao músculo ocorre. Inicialmente, a retração é compensada pela tentativa de reinervação pelos axônios colaterais (Saxena e Caroni, 2011). No entanto, conforme a doença progride, este mecanismo de compensação também falha e após a fase inicial da disfunção axonal, o corpo da célula neuronal torna-se visivelmente anormal e morre (Frey et al., 2000; Fischer et al., 2004). O momento exato desses eventos em humanos é incerto, mas estudos *post mortem* em pacientes com a doença e que morreram muito cedo confirmam esses achados (Fischer et al., 2004).

A ELA é tradicionalmente classificada em duas formas: ELA esporádica e ELA familiar (ou hereditária). As duas formas são clinicamente muito semelhantes. Aproximadamente 10% dos pacientes têm a forma hereditária, na maior parte das vezes autossômica dominante e causada por mutações em um heterogêneo conjunto de genes. As formas cujas quais os pacientes não têm histórico familiar de acometimento pela doença são classificadas como ELA esporádica e constituem a vasta maioria dos casos (Andersen e Al-Chalabi, 2011; Robberecht e Philips, 2013). As tabelas 1 e 2 resumizam genes causativos e associados com a ELA, respectivamente.

Tabela 1. Genes causativos –alto risco de ELA.

Locus	Cromossomo	Gene	Proteína/função	Herança	Mutação	Diagnóstico	Referência
ALS1	21q22. 11	<i>SOD1</i>	Cu/Zn superoxide dismutase 1,solúvel/estresse oxidativo	AD,AR	VNU	ELA,AMP	(Rosen,1993)
ALS2	2q33.2	<i>ELA2</i>	ELAIin/Rhoguaninenucleotide change factor	AR	VNU	ELA,ELP,PHE	(Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001)
ALS4	9q34.13	<i>SETX</i>	Senataxin/RNA/DNA helicase	AD	VNU	ELA, AAO2	(Chen et al.,2004)
ALS5	15q21.1	<i>SPG11</i>	Spatacsin/proteína transmembrana	AR	VNU	ELA, PHE	(Hentati et al., 1998; Orlicchio et al., 2010)
ALS6	16p11.2	<i>FUS</i>	Fused in sarcoma/RNA-binding protein,DNA repair,EXON splicing	AD	VNU	ELA,ELA-DFT	(Vance et al.,2009)
ALS7	20p13	<i>Desconhecido</i>	Desconhecido	AD	/	ELA	(Sapp et al.,2003)
ALS8	20q13.33	<i>VAPB</i>	Vesicle-associated membrane protein associated protein B/tráfico vesicular	AD	VNU	ELA,AMS	(Nishimura et al.,2004)
ALS10	1p36.22	<i>TARDBP</i>	TAR DNA binding protein 43 transcriptional repressor/regulação de splicing	AD	VNU	ELA,ELA-DFT	(Kabashi et al.,2008; Sreedharan et al,2008)
ALS12	10p13	<i>OPTN</i>	Optineurina /membrane de tensão ocular e tráfico vesicular	AD/AR	VNU	ELA,POAG	(Maruyama et al.,2010)
ALS14	9p13.3	<i>VCP</i>	Valosin –containing protein /proteína de ligação ATP, transporte e fusão vesicular	AD	VNU	ELA,ELA-DFT,DFT,MCI/DF	(Johnson et al.,2010)
ALS15	XP11.21	<i>UBQUN2</i>	Ubiquilin 2/ubiquitinização, degradação	Ligada ao X	VNU	ELA,ELA-DFT	(Deng et al., 2011)
ALS16	9p13.3	<i>SIGMAR1</i>	Sigma non-opioid intracelular receptor 1/ chaperona do retículo endoplasmático	AR	VNU	ELA,DFT	(Al-Saif et al., 2011)
	12q24.11	<i>DAO</i>	D-amino -acid oxidase /desconhecido	AD	VNU	ELA	(Mitchell et al., 2010)
	17p13.2	<i>PFN1</i>	Profilin 1/proteína de ligação à actina, polimerização da actina	AD	VNU	ELA	(Wu et al., 2012)
	7p15.2/12q13.3	<i>hnRNPA2B1/A1</i>	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein/processo de metabolismo e transporte do RNAm	AD	VNU	ELA, MCI/DF	(Kim et al., 2013)
ALS-FTD1	9q21-q22	<i>Desconhecido</i>	Desconhecido	AD	VNU	ELA,ELA-DFT,DFT	(Hosler et al., 2000)
ALS-FTD2	9p21.2	<i>C9orf72</i>	Chromosome 9 open reading frame 72/Desconhecido	AD,esporádica	Repetição C4C2	ELA,ELA-DFT,DFT	(DeJesus-Hernandez et al., 2011; Gijssels et al., 2012; Laaksovirta et al., 2010; Morita et al., 2006; Shatunov et al., 2010; Valdmanis et al., 2007; Vance et al., 2006)

Legenda: ELA, Esclerose Lateral Amiotrófica; DFT: Demência Frontotemporal; AD: Autossômico Dominante; AR: Autossômico Recessivo; VNU: Variação de Nucleotídeo Única; AMP: Atrofia Muscular Progressiva; PHE: Paraplegia Hereditária Espástica; ELP: Esclerose Lateral Primária; AAO2: Apraxia Atáxica Ocular 2; AMS: Atrofia Muscular Spinal; MCI/DF: Miopatia por Corpúsculos de Inclusão com Doença de Paget e Demência Frontotemporal. *Adaptada a partir de Leblond e colaboradores (2014).*

Tabela 2. Genes associados –baixo risco de ELA.

Locus	Cromossomo	Gene ID	Proteína/função	Herança	Mutação	Diagnóstico	Referência
ALS9	14q11.1	<i>ANG</i>	Angiogenina/ribonuclease	AD,Esporádica	PNU,VNU	ELA, ELA-DFT, DP	(Greenway et al., 2004, 2006; van Es et al.,2011)
ALS11	6q21	<i>FIG. 4</i>	SAC1 lipid phosphatase domain containing (<i>S. cerevisiae</i>)	AD,Esporádica	VNU	ELA,ELP,CMT	(Chow et al., 2009)
ALS13	12q24.12	<i>ATXN2</i>	Ataxina 2/Desconhecida	Esporádica	Repetição CAG	ELA,ASC2	(Elden et al., 2010)
	2p13.1	<i>DCTN1</i>	Dynactina/transporte axonal	AD	VNU	ELA	(Munch et al., 2004)
	3p11.2	<i>CHMP2B</i>	Chromatin modifying protein 2B/	Esporádica	VNU	ELA,DFT	(Parkinson et al., 2006)
	7q36.2	<i>DPP6</i>	Dipeptidyl-peptidase 6/ Vascular endothelial growth Factor/angiogênese, crescimento, migração vascular e fatores apoptóticos	Esporádica	PNU	ELA	(Cronin et al., 2008a)
	6p21.1	<i>VEGF</i>		Esporádica	PNU	ELA	(Lambrechts et al., 2003)
	19p13.12	<i>UNC13A</i>	Unc-13 homolog A/	Esporádica	PNU	ELA	(Shatunov et al., 2010)
	22q12.1-q13.1	<i>NEFH</i>	Neurofilamento, cadeia pesada/transporte intracelular para axônios e dendritos	Esporádica	VNU	ELA	(Al-Chalabi et al., 1999; Figlewicz et al.,1994)
	12q13.12	<i>PRPH</i>	Peripherina/preteína do citoesqueleto	AD,Esporádica	VNU	ELA	(Gros-Louis et al., 2004)
	5q35.3	<i>SQSTM1</i>	Sequestosome 1/proteína chaperona, NFkB, via de sinalização TATA box binding protein (TBP0-associated factor/RNA polimerase II transcrição gênica	AD,Esporádica	VNU	ELA	(Fecto et al., 2011)
	17q12	<i>TAF15</i>		AD	VNU	ELA	(Ticozzi et al., 2011)
	8p21.1	<i>ELP3</i>	Elongator acetyltransferase complex subunit 3/elongação de transcrito	Esporádica	PNU	ELA	(Simpson et al., 2009)
	5q13.2	<i>SMN1</i>	Survival of motor neuron 1	AD,Esporádica	CNV	ELA	(Corcia et al., 2002b)
	7q21.3	<i>PON 1,2,3</i>	Paraoxonase/hidrólise da organofosfatase	Esporádica	PNU,VNU	ELA	(Saeed et al., 2006)
	6p22.1	<i>HFE</i>	Hemochromatosis/absorção do ferro	Esporádica	VNU	ELA	(Yen et al., 2004)
	1q24.2	<i>KIFAP3</i>	Kinesin-associated protein 3/ proteína G	Esporádica	PNU	ELA	(Landers et al., 2009)
	14q11.2	<i>APEX1</i>	APEX nuclease 1/apurinic/endonuclease pirimídica	Esporádica	PNU	ELA	(Greenway et al., 2004)
	17q21.31	<i>PGRN</i>	Progranulina/regulador de crescimento celular	Esporádica	VNU	ELA,DFT	(Schymick et al., 2007b)
	12p12.1-11.23	<i>ITPR2</i>	INOSITOL 1,4,5-trisphosphatase receptor tipo 2	Esporádica	VNU	ELA	(Van Es et al., 2007)
	3p22.2	<i>PLCD1</i>	Phospholipase C delta 1	Esporádica	VNU	ELA	(Staats et al., 2013)
	5q13.2	<i>ARHGEF28</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor 28	AD	VNU	ELA	(Droppelmann et al., 2013)

Legenda: ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica; DFT: Demência Frontotemporal; AD: Autossômico Dominante; AR: Autossômico Recessivo; VNU: Variação de Nucleotídeo Único; PNU: Polimorfismo de Nucleotídeo Único; ELP: Esclerose Lateral Primária; DP: Doença de Parkinson; CMT: Doença de Charcot-Marie-Tooth; ASC2: Ataxia Spinocerebral Tipo2. *Adaptada a partir de Leblond e colaboradores(2014).*

1.2. A ELA familiar e o modelo experimental

As formas de ELA familiar com mutações no gene da enzima superóxido dismutase 1 (do inglês, *superoxide dismutase 1* - SOD1) representam 20% dos casos hereditários (Rosen, 1993; Pasinelli e Brown, 2006). A função da SOD1 é converter o ânion superóxido intracelular em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A descoberta das mutações no gene da SOD1 resultou no desenvolvimento dos modelos animais que permitiram o entendimento das vias moleculares pelas quais as mutações podem causar a doença, os tipos celulares envolvidos na morte do NM e a oportunidade de testar intervenções terapêuticas (McGoldrick et al., 2013). Atualmente, o modelo mais utilizado na pesquisa experimental da ELA é o camundongo SOD1^{G93A} (o qual possui a glicina substituída pela alanina na posição 93 da proteína SOD1 humana), seguido pelos modelos SOD1^{G37R}, SOD1^{G85R} e SOD1^{G86R}.

A superexpressão da proteína SOD1 humana mutada no camundongo produz a doença neurodegenerativa progressiva que se assemelha em muitos aspectos à patologia humana, com degeneração seletiva dos NM e gliose, acompanhada pelos agregados proteicos intracelulares característicos da ELA (Gurney et al., 1994). Dessa forma, as mutações no gene da SOD1 podem causar toxicidade às células neuronais, não somente pela perda de função enzimática (Saccon et al., 2013), mas sobretudo pelo ganho de função tóxica associada às mutações (Bruijn et al., 2004; Turner e Talbot, 2008).

Atualmente, diversos mecanismos buscam explicar a toxicidade dos agregados da SOD1 mutante aos NM na ELA. Alguns dos mecanismos propostos são: o comprometimento da maquinaria de degradação proteica e autofágica, o estresse do retículo endoplasmático, danos no processo de geração de energia pelas mitocôndrias, geração anormal do ânion superóxido e interrupção do transporte axonal (Rothstein et al., 1995; Liu et al., 2004; Kikuchi et al., 2006; Harraz et al., 2008; Zhong et al., 2008; Yang et al., 2009). De fato, todos esses mecanismos podem estar envolvidos na fisiopatologia da ELA, e o mais provável é que exista combinação de diferentes eventos que contribuam para o desenvolvimento global da patologia.

As características morfológicas e neuroquímicas dos NM humanos tornam esse grupo de células diferencialmente vulneráveis aos insultos descritos acima. Os NM são células grandes, com longo processo axonal, o que demanda elevado nível de atividade mitocondrial e alto requerimento dos componentes do citoesqueleto em comparação com outros neurônios. A falta de proteínas tamponantes de cálcio, parvalbumina e calbindina e a elevada expressão da proteína 2 transportadora de aminoácido excitatório

(do inglês, *Excitatory amino-acid transporter 2* – EAAT2) e da SOD1 também tornam os NM particularmente vulneráveis à toxicidade pelo cálcio após a sinalização glutamatérgica, bem como ao estresse oxidativo (Shaw e Eggett, 2000).

No entanto, apesar da contribuição dos modelos animais para o entendimento da fisiopatologia da ELA associada com mutações, esses modelos mostram limitada capacidade em recapitular a ELA esporádica e deficiência em prever eficácia terapêutica nos ensaios pré-clínicos, tornando imperativa a busca por novas alternativas de estudo da doença.

1.3. A ELA esporádica

A ELA esporádica representa a maioria dos casos da doença e embora sua etiologia seja em grande parte desconhecida, dados familiares e epidemiológicos indicam que fatores genéticos e ambientais se somam para desencadear a patologia na maioria dos casos (Majoor-Krakauer et al., 1994; Graham et al., 1997). Apesar de nenhum gene ser considerado fator causal, um grande número deles tem sido descoberto e implicados na patofisiologia da doença. Diversos achados de variantes genéticas e estudos de associação foram encontrados em indivíduos com ELA esporádica, cada um representando um pequeno número do total de casos e refletindo complexo padrão de herança com penetrância baixa, alto grau de heterogeneidade, aliado ou não a fatores ambientais que predisponham à doença. Considerando a semelhança clínica e patológica da ELA esporádica e familiar, compreender as formas familiares também ajuda a entender os mecanismos fisiopatológicos da ELA esporádica (Gros-Louis, 2012).

A identificação de genes e fatores de risco genéticos associados com a ELA ao longo dos últimos anos evidenciaram vias moleculares comuns entre as duas formas da doença, principalmente envolvendo tráfico intracelular e metabolismo de RNA. Também é interessante notar que os genes: *ALS2*, *VAPB*, *MAPT*, *DCTN1*, *EAAT2*, *NEFH*, *PRPH*, *FIG4*, *CNTF*, *SETX*, *TARDBP*, *FUS/TLS*, *CHGB* e *OPTN*, nos quais já foram encontradas mutações em subconjuntos de casos de ELA familiar e/ou alterados nos casos de ELA esporádica, estão relacionados com o tráfico intracelular, transporte axonal, ancoragem de vesículas, sinalização neurotrófica, metabolismo de RNA, splicing alternativo ou estabilização de microtúbulos (Gros-Louis, 2012).

Além disso, é importante notar que mesmo sem qualquer mutação, diversas proteínas foram detectadas em agregados intracelulares em pacientes com ELA esporádica, tais como TDP-43 (do inglês, *Transactive Response DNA Binding Protein*

43 kDa), FUS (do inglês, *RNA-binding protein Fused in Sarcoma*) e optineurina (Tan et al., 2007; Deng et al., 2010; Deng et al., 2011). Embora não se conheça o que provoca a agregação, estas observações implicam na possibilidade de um mecanismo comum convergindo entre as formas de ELA familiar e esporádica. Recentes evidências apontam para o envolvimento da SOD1 *wild-type* (WT; ou selvagem) nos casos de ELA esporádica (Rotunno e Bosco, 2013), sendo o mais importante a demonstração que a SOD1 WT mal dobrada nos astrócitos e nos NM de pacientes está associada à toxicidade celular (Haidet-Phillips et al., 2011).

1.4. Células gliais e a patogênese da ELA

A morte seletiva dos NM levou inicialmente a se acreditar somente em mecanismos celulares autônomos atuando na doença. No entanto, estudos genéticos e camundongos quiméricos indicaram que processos celulares não-autônomos desempenham papel importante na morte do NM. Foi demonstrado, por exemplo, que quando a expressão da SOD1 mutada era restrita aos NM ou aos astrócitos, não ocorria o desenvolvimento típico da doença no camundongo (Gong et al., 2000; Pramatarova et al., 2001; Lino et al., 2002). Quando a forma mutante da SOD1 foi expressa somente nos NM o camundongo apresentou fenótipo de início tardio da doença (Jaarsma et al., 2008). Além disso, a gravidade e a evolução da doença foram muito mais modestas quando comparadas aos camundongos nos quais a SOD1 mutante foi amplamente expressa em diversos tipos celulares. Em camundongos quiméricos com neurônios WT cercados por células gliais que expressavam a SOD1 mutante houve a expressão de fenótipo semelhante a ELA (Clement et al., 2003). Ainda, a remoção da SOD1 mutante nos astrócitos ou na microglia utilizando a enzima cre-recombinase retardou a progressão da doença e aumentou a expectativa de vida do camundongo (Boillee et al., 2006; Yamanaka et al., 2008b; Wang et al., 2009). Além disso, sabe-se que astrócito e microglia se tornam cada vez mais ativados à medida que a doença progride tanto no modelo animal quanto em pacientes, processo reacionário de neuroinflamação, com consequências ora protetora outras vezes deletéria (Hall et al., 1998; Alexianu et al., 2001).

Evidências recentes revelam o papel de outra célula glial na ELA: o oligodendrócito. Essa célula glial atua diretamente na manutenção dos axônios através do transporte de lactato para o NM por meio do transportador monocarboxilato transportador de lactato 1 (do inglês, *Monocarboxylate lactate transporter 1* - MCT1).

A perda do transportador é tóxica para o NM *in vitro* e *in vivo*. Em camundongos mutantes para a SOD1, os oligodendrócitos degeneram e são continuamente renovados por novas células precursoras de oligodendrócitos (CPO). No entanto, as CPO apresentaram expressão diminuída do transportador MCT1 em pacientes com ELA e no próprio modelo animal. É possível que a diminuição no aporte de lactato e no suporte trófico mediado pelos oligodendrócitos possa contribuir para a morte do NM na ELA (Lee et al., 2012; Valori et al., 2014).

A Figura 1 resume os principais mecanismos já descritos acerca da influência das células gliais contribuindo para a morte do NM na ELA.

Figura 1. Esquema ilustrando os principais mecanismos descritos para as ações autócrinas e parácrinas das células gliais ao neurônio motor (NM) na ELA.

A) Excitotoxicidade resultante da deficiência na remoção do glutamato das sinapses em virtude da alteração na expressão/atividade do transportador de glutamato EAAT2 em astrócitos. (B) Estresse no retículo endoplasmático (RE) induzido por interações anormais entre a SOD1 mutada e proteínas. (C) Inibição do proteossomo decorrente de super-estimulação da via de degradação proteossômica com agregados proteicos ubiquitinados. (D) Disfunção mitocondrial mediada pela deposição de SOD1 mutada na membrana da mitocôndria provocando liberação do citocromo C em neurônios e estresse oxidativo nos astrócitos. (E) Secreção de SOD1 mutada (SOD1m) para o meio extracelular pelos neurônios motores e astrócitos. (F) Produção de radicais livres pelas células gliais. (G) NM expressando SOD1 apresentaram transporte axonal alterado. (H) NM apresentam desregulação transcricional e processamento anormal de RNA. (I) Autofagia em decorrência de defeitos no proteossomo e estresse do retículo endoplasmático. (J) Déficit no metabolismo energético pela diminuição no aporte de lactato pelos oligodendrócitos e (K) suporte trófico mediado pelas células de Schwann. *Adaptado e traduzido de Ilieva e colaboradores (2009).*

1.5. A célula de Schwann e a denervação periférica na ELA

As células de Schwann (CS) ou célula glial do sistema nervoso periférico podem ser classificadas como CS mielinizantes, não-mielinizantes, perisinápticas ou células satélites perineuronais do gânglio da raiz dorsal ou do gânglio autonômico (Schwyn, 1967; Griffin e Thompson, 2008; Yamazaki et al., 2011). A importância das CS vai além de sua função mielinizante e é destacada pelas evidências crescentes do seu papel na modulação imunológica, manutenção da fisiologia axonal, resposta ao trauma e envolvimento em condições patológicas diversas (Zhou et al., 1999).

Evidências recentes demonstram que as CS superexpressam moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (do inglês, *Major histocompatibility complex* - MHC), apresentam antígenos e produzem citocinas de importância imunológica, evidenciadas a partir de culturas celulares e biópsias de pacientes (Armati et al., 1990; Pollard e Armati, 2011; Dubovy et al., 2013). As CS não-mielinizantes próximas à junção neuromuscular (JNM) participam ativamente da modulação e da formação sináptica, respondem à condução nervosa e sinalização dos neurotransmissores, e participam ativamente do reparo da JNM (Armati e Mathey, 2013).

Além da ativação glial observada na medula espinal de pacientes e animais mutantes na fase pré-sintomática da ELA, a retração dos terminais do axônio motor e a denervação das junções neuromusculares são os eventos mais precoces na doença (Schaefer et al., 2005; Pun et al., 2006). Fischer e colaboradores (2004) demonstraram que um dos primeiros fenótipos celulares da ELA é a perda das junções neuromusculares tanto no modelo animal pré-sintomático quanto no paciente com evolução recente, sugerindo que a ELA pode ter elementos de neuropatia periférica com morte neuronal retrógrada – *dying back*. Os autores encontraram uma taxa de 80% de denervação nas junções neuromusculares em camundongos SOD1^{G93A} no momento do aparecimento dos primeiros déficits motores. Achados de Gould e colaboradores (2006) também suportam a ideia de que a denervação periférica é o evento inicial predominante na ELA. Além disso, os sintomas clássicos da doença como paralisia e atrofia muscular progressiva confirmam esse fenômeno. Camundongos transgênicos SOD1^{G93A} e deficientes para a proteína X associada ao Bcl-2 (do inglês, *Bcl-2-associated X protein* - BAX) com função pró-apoptótica, apresentaram denervação neuromuscular e vacuolização mitocondrial sem a ocorrência de morte neuronal, denervação que precedeu o depósito da SOD1 mutante nos NM e a reatividade astrocitária na medula espinal. As evidências apresentadas acima sugerem que elementos periféricos

associados ao axônio, tais como as CS, podem ter papel relevante na fisiopatologia da ELA.

Estudos já demonstraram que reinervação das placas neuromusculares depende da capacidade das CS terminais, localizadas próximo à JNM, estenderem seus prolongamentos a fim de orientar as fibras nervosas em crescimento (Gordon et al., 2004; De Winter et al., 2006). Ao nível molecular, foi verificado que o quimiorrepelente semaforina 3A foi expresso seletivamente nas junções neuromusculares das fibras musculares fatigáveis rápidas após a indução de lesão do nervo, assim como no modelo animal da ELA de forma constitutiva após a ocorrência de denervação periférica já na fase pré-sintomática (De Winter et al., 2006). Dessa forma, as CS terminais das fibras musculares fatigáveis rápidas podem não somente restringirem a plasticidade após a denervação, mas também influenciar negativamente a integridade da JNM. Ainda é importante ressaltar que os axônios motores de fibras musculares fatigáveis rápidas são os primeiros acometidos no modelo animal da ELA, promovendo a denervação muscular antes mesmo dos déficits motores. Este fenômeno é seguido pelos axônios motores ligados às fibras musculares rápidas não fatigáveis, enquanto que as fibras lentas são parcialmente resistentes, uma vez que as fibras nervosas destas tentam reinervar as regiões musculares previamente denervadas (Pun et al., 2006).

Ainda corroborando a importância dos elementos periféricos no processo de denervação/reinervação, verificou-se que camundongos mutantes, capazes de maior síntese de dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês, *Nicotinamide adenine dinucleotide* - NAD) neuronal, que apresentam degeneração walleriana lenta dos segmentos distais subsequente à axotomia e que, por conseguinte, mostraram maior proteção axonal nos modelos de neuropatia periférica e axonopatia relacionada aos distúrbios de mielina, quando cruzados com o modelo transgênico SOD1^{G93A}, a prole não foi capaz de retardar a retração axonal (Vande Velde et al., 2004; Fischer et al., 2005). Estas evidências ampliam a possibilidade da participação de outra célula, não o neurônio, mas sim a célula glial do sistema nervoso periférico no processo de retração da fibra nervosa motora e desconexão dos axônios do seu alvo de inervação, denotando a necessidade de avaliação da possível influência parácrina mediada pelas CS aos NM na ELA.

As primeiras evidências da participação das CS no processo de neurodegeneração em pacientes com ELA advieram de descrições histopatológicas que mostraram aumento no número e alterações na estrutura destas células nas fibras não

mielínicas do nervo sural (sensitivo) de pacientes mantidos sob cuidados suplementares de respiração artificial ou a partir de biópsias musculares (Atsumi, 1981; Kanda et al., 1996). De fato, neuropatologistas já postularam que a ELA não é uma síndrome puramente motora ao constatarem a expressão aumentada do receptor do fator de crescimento do nervo (do inglês, *Nerve growth factor* - NGF), possivelmente do tipo p75, nas CS anexas às fibras nervosas degeneradas em nervos mistos, em raízes motoras e em menor extensão nas raízes sensitivas (Heads et al., 1991; Kerkhoff et al., 1991). A re-expressão do receptor p75 de NGF na CS, associado à morte celular desencadeada na injúria, à neurodegeneração do sistema nervoso e à progressão da ELA, foi revertida pelo tratamento das CS *in vitro* e pela injeção local da sequência anti-sense do RNAm do receptor no modelo animal, a qual promoveu atraso na progressão dos sintomas no modelo animal transgênico (Cheah et al., 2003; Turner et al., 2003).

Ainda em nervos humanos, já foram demonstradas alterações na mielina periférica ao longo dos axônios dos NM em pacientes com ELA esporádica e a presença de CS expressando o antígeno leucocitário humano (do inglês, *Human leucocyte antigen* - HLA)-DR, sugerindo que mecanismos imunológicos possam estar envolvidos na ELA, tendo as CS como componente principal (Perrie et al., 1993; Oliveira et al., 1994).

A Figura 2 sumariza os principais mecanismos propostos acerca da influência das células periféricas em contato com o axônio (CS e músculo) capazes de promover a morte neuronal retrógrada (*dying-back*).

Figura 2. O modelo *dying-back* da degeneração do neurônio motor na ELA. A retração dos axônios motores é um evento precoce que ocorre já na fase pré-sintomática da ELA e tem sido proposto como causa primária da morte neuronal. Diferentes mecanismos são propostos para explicar esse fenômeno. Danos no transporte axonal podem afetar o suprimento de componentes necessários para a manutenção da junção neuromuscular (JNM). Danos mitocondriais podem reduzir a quantidade de ATP disponível na sinapse distal e acarretar danos metabólicos, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e prejudicar o tamponamento de cálcio pela mitocôndria. O desmantelamento das JNM e a retração axonal já foram relacionados com alterações nas proteínas de guiamento axonal, tais como Semaforina 3A (SEMA 3A) e Nogo-A, nas células de Schwann (CS) do modelo animal da ELA. O papel da imunidade inata e a ativação do complemento no processo de morte neuronal retrógrada também tem sido propostos. Todos esses eventos podem ser desencadeados por degeneração das células musculares, alterações axonais e comprometimento do suporte trófico e mecânico oferecido pelas CS. A consequência da degeneração das sinapses distais é a inevitável morte dos NM. *Adaptado e traduzido de Cozzolino et al., 2012.*

1.6. O modelo *in vitro* da ELA

Os modelos *in vitro* são extremamente úteis para estudar doenças humanas, pois permitem analisar diferentes tipos celulares de forma independentemente em sistemas combinados. Nesse caso, as células podem ser combinadas umas com as outras para o melhor entendimento de qual tipo de celular é o mais crítico nas diferentes fases das doenças (Gros-Louis, 2012).

Os modelos *in vitro* para o estudo da ELA são desenvolvidos utilizando os modelos animais já existentes. No entanto, conforme já descrito acima para os casos de ELA esporádica, essas não são as plataformas de estudos mais adequadas. Além de que

NM são impossíveis de se obter de pacientes e sua extração a partir de tecidos *post mortem* é limitada devido à dificuldade de isolar as células vivas do cérebro ou da medula espinal de cadáveres. As biópsias de tecidos *post-mortem* são utilizadas principalmente para realizar análises histológicas e imunohistoquímicas, estudos genéticos e de proteômica (Gros-Louis, 2012). As biópsias realizadas *in vivo* têm alcance mais limitado em relação ao tipo de tecido que pode ser extraído, mas recentemente com avanço técnico-científico elas estão sendo usadas para desenvolver modelos inovadores da doença.

O isolamento de NM e células gliais é extremamente útil para o estudo dos mecanismos intracelulares relacionados com a ELA, tais como: mecanismos parácrinos de toxicidade ou neuroproteção, metabolismo de RNAm (do inglês, messenger *ribonucleic acid* – mRNA), função mitocondrial, agregação de proteínas, regulação do citoesqueleto e transporte axonal (Nagai et al., 2001; Phatnani et al., 2013).

Para o estabelecimento do modelo *in vitro* da ELA a partir do modelo animal ou de pacientes, são preferidos tecidos extraídos próximo ao estágio de desenvolvimento embrionário, particularmente no caso de NM de camundongos, ou anterior aos sintomas da neurodegeneração. A medula espinal e o nervo periférico de camundongos são de fácil acesso e remoção, e os NM, astrócitos, microglia e CS podem ser extraídas, purificadas e mantidas em cultura com rendimentos e viabilidade elevados (Schnaar e Schaffner, 1981; Gingras et al., 2007; Sanelli et al., 2007). O mesmo é válido para as células derivadas do sistema nervoso periférico de pacientes.

Com o objetivo de realizar estudos sobre a influência das células gliais na sobrevida e no trofismo dos NM, os sistemas *in vitro* são particularmente úteis para avaliar morfometria celular (comprimento do axônio), expressão de genes por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa (do inglês, *quantitative polymerase chain reaction* - qPCR), apoptose, vias de sinalização, dinâmica de cálcio, potencial da membrana mitocondrial, captação de glutamato e mecanismos de excitotoxicidade (Gros-Louis, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência das CS do modelo animal e do paciente com evolução recente da forma esporádica da ELA na sobrevida e no tamanho dos prolongamentos do NM *in vitro* e buscar indicativos da natureza molecular do efeito.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Avaliar a influência das CS dos animais SOD1^{G93A} na fase pré-sintomática (60 dias) e das CS dos pacientes com evolução recente da forma esporádica da ELA na sobrevida dos NM espinais dos animais neonatos SOD1^{G93A} em sistemas de co-culturas (Experimento 1).
- 2.2.2. Avaliar a influência do meio condicionado das CS dos animais SOD1^{G93A} na fase pré-sintomática e das CS dos pacientes com evolução recente da forma esporádica da ELA na degeneração e no tamanho dos prolongamentos dos NM espinais dos animais neonatos SOD1^{G93A} após cinco dias de tratamento com o meio condicionado (Experimento 2).
- 2.2.3. Avaliar a influência do meio condicionado das CS na sobrevida de neurônios expressando ácido gama-aminobutírico (GABAérgicos) do hipocampo e neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) pelo método do *In Cell* WB (Experimento controle).
- 2.2.4. Avaliar a influência do meio condicionado das CS na sobrevida dos NM (curva dose-resposta) pelo método do *In Cell* Western Blot (WB) (Experimento controle).
- 2.2.5. Avaliar a apoptose dos NM pela ativação de caspases e pela marcação de TUNEL após tratamento com o meio condicionado e co-cultura com as CS (Experimento controle).
- 2.2.6. Quantificar os níveis moléculas candidatas nos meios condicionados das culturas de CS citadas acima pela técnica de ELISA (Experimento 3).

2.2.7. Quantificar a expressão gênica de moléculas apontadas pelas análises de *microarray* nas CS cultivadas de camundongos SOD1^{G93A} e no nervo periférico de pacientes com evolução recente da forma esporádica da ELA através da técnica do qPCR (Experimento 4).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e de Biossegurança em Organismos Geneticamente Modificados e Comissão de Ética para Pesquisa em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP; Número do processo: 0187/11).

3.1. Modelo animal da ELA

Os camundongos transgênicos B6SJL-TgN (SOD1-G93A)¹Gur que expressam a mutação G93A (glicina substituída pela alanina na posição 93) para o gene da SOD1 humana (hSOD1) foram obtidos do Laboratório Jackson (Bar Harbor, ME, USA), originalmente produzidos por Gurney e colaboradores (1994). Estes animais são largamente utilizados como modelo experimental para o estudo da ELA.

3.2. Colônias de animais

As colônias de camundongos transgênicos SOD1^{G93A} e controles WT (B6SJL) foram expandidas no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A reprodução e o alojamento dos animais foram feitos em ambiente livre de patógenos específicos (do inglês, *specific pathogen free* - spf) para garantir a estabilidade das colônias, controle sobre a reprodução e homogeneidade fenotípica entre os animais.

O regime *spf* compreende gaiolas ventiladas e com filtros especiais, bem como a manipulação dos camundongos e suas proles em regime estéril dentro de câmara de fluxo laminar. Temperatura ambiente controlada entre 21 e 22°C, umidade do ar em torno de 55% e iluminação sob ciclo claro/escuro de 24 horas, sendo cada fase do ciclo de 12 horas, são itens que também receberam a atenção. A ração, a água e a maravalha foram autoclavadas antes da utilização. Para garantir a não contaminação da colônia por agentes patogênicos, os animais foram periodicamente submetidos a controles bacteriológico e parasitológico segundo a rotina *spf* estabelecida no Biotério da FMUSP.

Os cruzamentos foram sempre realizados entre machos heterozigotos SOD1^{G93A} com fêmeas da linhagem B6/SJL-F1, no intuito de gerar prole aproximadamente 50% heterozigota SOD1^{G93A} (TG) e 50% WT (controle), segundo orientações do Laboratório Jackson.

Os casais foram mantidos com suas respectivas proles até 21 dias de idade, separados por sexo e depois separados por genótipo.

3.3. Genotipagem dos camundongos

A identificação dos camundongos mutantes ou controles utilizados nos experimentos foi realizada através da genotipagem. O primeiro passo constituiu na extração de amostras de ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid* – DNA) de cada animal a partir de fragmento da cauda.

O procedimento de extração de DNA segue o protocolo a seguir: 500µl de tampão de lise (TrisHCl 0,5M pH 8,5, NaCl 5M, EDTA 0,5M, SDS 10% e H₂O) com proteinase K (5µl/ml) (Sigma Chemicals, EUA) foram adicionados a cada tubo contendo as amostras individuais de tecidos em pequenos fragmentos. Estas suspensões foram colocadas no thermo-mixer 60°C a 14000 rotações por minuto (rpm) por 1h até a digestão completa das caudas e após, foram centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm em temperatura ambiente para a sedimentação do material não digerido. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos contendo 500µl de isopropanol gelado e agitados suavemente por inversão, oscilando até o aparecimento do precipitado de DNA. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente e os sobrenadantes desprezados. Os *pellets* foram lavados por 2 vezes com 500µl de etanol 70%. Em seguida, os tubos foram deixados na posição invertida até secar completamente o etanol. Após secagem do *pellet* de DNA, cada amostra foi dissolvida em 200µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA e água deionizada). As amostras de DNA foram armazenadas na geladeira até realização da genotipagem pela reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polimerase chain reaction* - PCR).

Os *primers* utilizados nas reações de PCR foram utilizados conforme descrito previamente (Miana-Mena et al., 2005). Os *primers* IMR113 (5'-ATCAGCCCTAATCCATCTGA-3') e IMR114 (5'-CGCGACTAACAATCAAAGTGA-3') foram utilizados para a amplificação do fragmento da SOD1 humana e IMR042 (5'-CTAGGCCACAGAA TTGAAAGATCT-3') e IMR043 (5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3') para amplificação do fragmento da interleucina-2 (IL-2) murina (controle positivo). Estes *primers* estão descritos no protocolo do Laboratório Jackson (http://jaxmice.jax.org/public/protocols/protocols.sh?objtype=protocol&protocol_id=523).

A reação de PCR incluiu os *primers* citados acima e continha para cada amostra 12,5µl PCR Master Mix (2X) (Fermentas Life Sciences), 0,5µl de cada *primer*, 1µg DNA e água livre de nucleotídeos para o volume final de 25 µl. A reação compreendeu

o período inicial de 3 minutos à 95°C: 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, que se repetem por 35 ciclos, além do período de 2 minutos a 72°C com resfriamento até 10°C.

Os produtos das reações dos PCRs, corados com 1µl de *blue green*, foram visualizados sob luz UV após eletroforese em gel de agarose a 1% e fotografados para documentação (Figura 3).

Figura 3. Procedimento de genotipagem para determinação do genótipo do camundongo. Amostras obtidas a partir do protocolo de extração de DNA da cauda e subsequente genotipagem por PCR utilizando-se sondas para amplificação do fragmento da interleucina-2 de murino como controle positivo e da SOD1h mutante. Para o animal transgênico SOD1^{G93A} observa-se a presença da forma mutante da SOD1h (com 326 pares de bases) e da IL-2 (com 324 pares de bases). Já nos animais controles B6SJL (*wild-type*) observa-se apenas a presença da IL-2.

3.4. Análise comportamental

Os animais foram pesados e submetidos à avaliação do estado geral, aparecimento e progressão do tremor de extremidades, mortalidade, da escala motora neurológica. Ainda, outros testes motores classicamente empregados (*rotarod* e *hanging wire*) ou desenvolvidos no laboratório (teste de elevação de cauda, impressão quantitativa de pegadas, comportamento motor espontâneo em campo aberto registrado por infra-vermelho) foram periodicamente aplicados nos animais para o acompanhamento do fenótipo clínico e da progressão da doença na colônia. As descrições detalhadas destes testes e avaliações podem ser encontradas na literatura (Chadi et al., 1993; Rosen, 1993; Crawley, 1999; Karl et al., 2003; Guzen et al., 2009; Alves et al., 2011). Os testes foram realizados uma vez por semana a partir da 3ª semana de vida, pois a literatura não mostra início dos sinais clínicos antes desse período nos animais transgênicos.

3.5. Biópsia de nervo periférico em pacientes com ELA

Os pacientes com ELA foram acompanhados no Ambulatório de ELA do Departamento de Neurologia do HC/FMUSP. A avaliação neurológica e seleção dos pacientes foram realizadas pelo médico neurologista Frederico Mennucci De Haidar Jorge sob supervisão do professor Dagoberto Callegaro, chefe do Ambulatório, e colaborador do professor Gerson Chadi em todos os projetos de pesquisa sobre a patologia. Após explicar aos pacientes e aos familiares os detalhes da pesquisa e os benefícios do procedimento para o estudo, os riscos da biópsia, bem como a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os pacientes com evolução recente da forma esporádica da ELA foram submetidos à biópsia do nervo extensor curto do hálux unilateralmente.

Os critérios de inclusão foram pacientes diagnosticados com ELA definitiva ou provável segundo os critérios do El Escorial revisado (2000)(Brooks et al., 2000) e com o segmento distal do membro inferior com a funcionalidade preservada (local onde foi realizada a biópsia). Os critérios de exclusão foram pacientes portadores de ELA familiar e/ou diabetes mellitus.

O nervo extensor curto do hálux é o ramo medial que é a continuação mais distal do nervo fibular (Figura 2). Esse ramo medial (nervo extensor curto do hálux) é responsável por parte da extensão do hálux e ocupa posição superficial no espaço entre o primeiro (hálux) e segundo pododáctilos. Pela posição e músculo que inerva, a biópsia deste nervo é considerada pouco invasiva e leva o prejuízo funcional imperceptível ao paciente. De fato, no paciente com ELA, este prejuízo não existe já que o paciente foi biopsiado na fase em que apresenta déficits motores em toda a musculatura do membro inferior.

As CS humanas de pacientes controles (sem ELA) foram provenientes das biópsias de ramos motores do nervo acessório realizadas durante as cirurgias das Lesões Traumáticas do Plexo Braquial.

As biópsias dos nervos, tanto dos pacientes com ELA como de pacientes controles foi realizada em condições assépticas no Centro Cirúrgico da Neurocirurgia Funcional do HC/FMUSP pelo Dr. Roberto Sérgio Martins, pesquisador participante deste projeto. Após a tricotomia da região dorsal do pé, cada paciente foi submetido à anestesia local (solução de xilocaína a 2%, sem vasoconstritor) e a incisão com extensão de 5 cm a partir da junção entre o primeiro e segundo pododáctilos. Os diferentes planos

teciduais foram dissecados para posterior isolamento e exérese de 2 cm do nervo extensor curto do hálux (Figuras 4 e 5).

O fragmento de nervo retirado foi imediatamente seccionado em três partes; uma delas foi fixada em solução paraformaldeído 4% para análise histopatológica de rotina das condições normais do nervo e as outras duas partes foram destinadas à obtenção das CS em culturas (este projeto) e experimentos de *microarray* e microdissecação a laser (outro subprojeto do laboratório). As amostras destinadas à obtenção das CS em culturas foram mantidas em solução de Belzer (UW, DuPont Pharmaceuticals) por não mais do que 12 horas em temperatura de 4°C até o momento da realização dos explantes.

Figura 4. Posição anatômica do nervo extensor curto do hálux. Adaptado e traduzido de <http://pixshark.com/extensor-hallucis-brevis.htm>.

Figura 5. Nervo extensor curto do hálux após a retirada durante biópsia realizada em pacientes acompanhados no Ambulatório de ELA do Departamento de Neurologia do HC/FMUSP.

3.6. Experimentos *in vitro*

3.6.1. Cultura de NM a partir da medula espinal de camundongos neonatos

A cultura de NM da medula espinal de camundongos SOD1^{G93A} e WT foram obtidas a partir do protocolo descrito na literatura (Raoul et al., 2002) e gentilmente concedido e adaptado pelo pesquisador Bradley Turner da Universidade de Melbourne (AUS). Foram realizadas algumas modificações e adequações no protocolo em nosso laboratório, e o cultivo dessas células foi realizado a partir de medula espinal de animais neonatos.

A medula espinal foi dissecada e colocada em solução tampão fosfato (do inglês, *Phosphate buffer saline* - PBS). Em seguida a medula foi transferida para novo tubo contendo PBS e tripsina/EDTA na concentração final de 0,025% (Life Technologies, EUA). O tecido foi levado para banho-maria a 37°C por 5 minutos seguidos de 5 minutos de leve agitação. Após o período em banho-maria, o tecido foi imediatamente colocado em novo tubo com 400µl de meio Leibovitz-15 (L-15; Gibco, EUA), 50µl de albumina do soro bovino 4% (do inglês, *Bovine albumin serum* - BSA; Sigma, EUA) e 50µl de DNase na concentração de 1mg/ml (Sigma, EUA). A solução foi triturada com pipeta e em seguida adicionou-se 450µl de L-15, 50µl de BSA 4% e 10µl de DNase na concentração de 1mg/ml. Os fragmentos foram novamente triturados até ficarem completamente diluídos. Em seguida, cuidadosamente aplicou-se 1 ml de BSA 4% no fundo do tubo. O mesmo foi submetido à centrifugação 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 1 ml de L-15. As células foram transferidas cuidadosamente para novo tubo contendo 1 ml de 3,7% de gradiente de densidade Optiprep (Sigma, EUA), no qual ficam visíveis três fases. O tubo foi levado

para centrifugação a 700 g por 15 minutos sem breque, para separar as células de acordo com sua densidade. Após a centrifugação, a banda turva na interface transparente representa os NM. Essa banda foi cuidadosamente coletada e os mesmos foram plaqueados em placa de 24 poços com lamínula de vidro, previamente tratada com Poli-D-Ornitina (25µg/ml; Sigma, EUA) e laminina (25µg/ml; Sigma) por duas horas. Cada medula espinal rende cerca de 10^5 células, que por sua vez foram cultivadas com meio Neurobasal A suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma, EUA), 2% de soro de cavalo, 0,5 mM de L-glutamina, 25µM de 2-mercaptoethanol, 10ng/ml do fator neurotrófico ciliar (do inglês, *Ciliary neurotrophic factor* - CNTF), 100 pg/ml do fator neurotrófico derivado da glia (do inglês, *Glial derived neurotrophic factor* - GDNF) todos adquiridos da Sigma e suplemento B27 da Gibco, EUA.

3.6.2. Cultura de CS a partir do nervo ciático do camundongo adulto jovem e do nervo periférico de pacientes com ELA e controles

Nervo dos camundongos: os nervos ciáticos foram obtidos de camundongos adultos jovens (SOD1^{G93A} na fase pré-sintomática e controles) com 60 dias de vida, pesando em média 25 gramas. Os animais foram tricotomizados na região posterior da perna e os nervos foram retirados bilateralmente (Figura 6).

Figura 6. Biópsia do nervo ciático do camundongo com 60 dias de idade.

Após a retirada dos nervos, estes foram colocados em placa de petri de 60 mm com meio L-15. Todo o excesso de tecido, como músculo, gordura e vasos sanguíneos, assim como o perineuro, foram removidos com o auxílio de lupa.

Após a limpeza, os nervos foram cortados em fragmentos (explantes) com cerca de 1 mm e colocados em placas de petri de 60 mm (12 explantes por placa, derivados de aproximadamente 5 animais) e nutridos com solução D-10, composta por DMEM (Vitrocell, BRA), 1% de penicilina/estreptomicina, e 10% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell, BRA). Os explantes foram cobertos completamente, porém sem flutuarem no meio de cultura e, em seguida, foram incubados em estufa a 5% de CO₂ a 37°C (Oudega et al., 1997). Esta etapa foi chamada de E1.

A solução D-10 destas placas foi trocada 3 vezes por semana, e os explantes transferidos para nova placa a cada semana, dando início a novas etapas, chamadas de E2, E3 e E4. A transferência foi realizada sempre que se observou uma grande quantidade de fibroblastos migrando a partir dos explantes.

A dissociação enzimática foi realizada no momento em que a maioria das células que migraram dos explantes foram CS, processo este que consistiu em deixar os explantes pernovernarem em solução com dispase (1,25 U/ml, Boehringer Mannheim, DEU) e collagenase (0,05% Worthington, Freehold, EUA). Após esta etapa, as células foram retiradas juntamente com o meio da placa, centrifugadas e tratadas com o anticorpo THY-1.2 (BD Bioscience, EUA) e complemento sérico de coelho (ICN Pharmaceuticals, EUA) por 30 minutos a 37°C para a eliminação dos fibroblastos restantes, conforme já descrito anteriormente (Brockes et al., 1979; White et al., 1983; Dong et al., 1999) e modificado segundo a nossa experiência. Após o tratamento, as células foram semeadas em placas de 100 mm (pré-tratadas por 2 horas com laminina) em solução D-10 mitógeno, composto por D-10, forskolina (2µM/ml; Sigma, EUA) e extrato pituitário bovino (20µg/ml; Biomedical Technologies, EUA). O meio de cultura foi trocado três vezes por semana. Em caso de necessidade de expansão, as células foram amplificadas até no máximo a passagem (P) 3.

Nervos dos pacientes: as culturas de CS provenientes dos nervos humanos foram realizadas segundo o método descrito na literatura (Casella et al., 1996) e modificado em nosso laboratório. Os nervos foram mantidos em solução de Belzer (UW, DuPont Pharmaceuticals, EUA) por não mais do que 12 horas em temperatura de 4°C. Após esta etapa, os nervos foram lavados por três vezes em meio L-15. Todo o excesso de tecido

gorduroso e epineuro foram retirados cuidadosamente com o auxílio de pinças e lupa. Em seguida, os nervos foram fragmentados em pedaços com cerca de 2 mm de comprimento (explantes). Os explantes foram mantidos em placas de 35 mm, boiando em 2ml de meio de cultura com 10% de SFB, 1% penicilina/streptomicina, 2 μ M forskolina e 10nM de heregulina (Sigma, EUA). O meio foi trocado 3 vezes por semana e os explantes foram mantidos dessa forma por 2 semanas, para a eliminação dos fibroblastos presentes nos nervos. A dissociação dos explantes foi realizada da mesma forma que os explantes dos camundongos, conforme descrito acima. As CS humanas foram semeadas em placas de 100 mm pré-tratadas por no mínimo 2 horas com laminina, substrato que por sua vez, inibe o crescimento dos fibroblastos.

3.6.3. Procedimento imunocitoquímico para identificação das CS dos camundongos e de pacientes

A pureza das culturas de CS foi avaliada em P1, com as células semeadas em lamínulas de vidro em placas de 24 poços na densidade 5×10^4 células por poço. O meio de cultura foi removido e as células lavadas 2 vezes com PBS. Após a lavagem, a cultura foi fixada com 4% de paraformaldeído por 30 minutos, seguida por três lavagens de 5 minutos com PBS. A permeabilização das células foi realizada através da adição de solução 1% de triton (Sigma, EUA) em PBS por 10 minutos, e duas lavagens de 5 minutos, a primeira com solução composta por PBS e 0,02% Tween 20 (Sigma, EUA) e a segunda com solução de PBS, 0,02% de Twenn 20 e 1% de BSA. As células foram então bloqueadas com PBS, 2% de soro normal de cabra (do inglês, *Normal goat serum* - NGS; Vector, EUA), 4% BSA, 0,2% triton por 30 minutos em temperatura ambiente.

O anticorpo S100 β (Sigma, EUA) foi incubado por 18 horas na concentração de 1/100 seguido por três lavagens de 5 minutos com PBS e incubação do anticorpo secundário fluorescente anti-rabbit (Jackson Laboratories, EUA) na concentração 1/40 por duas horas. Nos controles negativos foi utilizado apenas o anticorpo secundário com o objetivo de calibrar a fluorescência em virtude da auto-fluorescência das células. Após a marcação com o anticorpo secundário, a lamínula foi colocada em lâmina juntamente com montex acoplado ao marcador nuclear 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI; Vector, EUA) e analisada no microscópio fluorescente Olympus AX70 (Olympus, JP). Foram realizadas fotografias com objetiva de 20 vezes em 6 campos equidistantes entre si e em seguida as células foram contadas pelo examinador. Foram consideradas CS aquelas que co-localizaram a marcação nuclear pelo DAPI (Vector, EUA) e a marcação

citoplasmática pelo anticorpo S100β. Os núcleos marcados pelo DAPI e sem a marcação pelo S100β foram considerados fibroblastos. O grau de pureza das culturas foi obtido através da razão entre o número de células S100β positivas pelo número total de núcleos.

3.6.4. Congelamento das CS

As CS dos camundongos e dos pacientes foram congeladas até o momento da realização dos experimentos *in vitro*, conforme o protocolo descrito a seguir: as placas foram lavadas 2 vezes com solução salina balanceada de Hanks (do inglês, *Hanks Balanced Salt Solution* - HBSS; Sigma, EUA). Foram adicionados 3ml de tripsina/EDTA em cada placa durante alguns minutos até que se observou o completo descolamento das células da superfície da placa. As células foram removidas das placas e colocadas em tubos contendo 1ml de D-10. As placas ainda foram lavadas com 3ml de D-10. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 2 ml de D-10 e completado até o volume final de 5 ml. As células foram novamente centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em DMEM com 15% de SFB (D-15) e 6% de DMSO (Sigma, EUA) na densidade de $1,5 \times 10^6$ células por ml. Rapidamente as amostras foram colocadas em gelo seco e levadas até o freezer -70°C, onde foram armazenadas.

3.6.5. Quantificação da pureza das culturas de NM a partir da medula de camundongos neonatos

A pureza da cultura primária de NM foi avaliada pela análise estereológica da marcação imunocitoquímica específica para NM utilizando o anticorpo colina acetiltransferase (ChAT, Millipore, EUA). Resumidamente, os NM foram plaqueados em lamínulas em placas de 24 poços na concentração de aproximadamente 10^5 células por poço e no 3º dia em cultura as células foram submetidas ao mesmo processo de fixação, permeabilização e bloqueio descrito acima para as culturas de CS.

O anticorpo primário para ChAT foi utilizado na concentração de 1:1.500, diluído em PBS contendo 0,2% Triton, 1% NGS e 2% BSA e incubado por 48 horas a 4°C. Em seguida, as células nas lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário anti-cabra conjugado ao fluoróforo Texas Red (Jackson Laboratories, EUA). O controle negativo foi realizado

pela omissão do anticorpo primário na incubação. As lamínulas foram montadas em lâminas utilizando meio de montagem contendo DAPI.

As fotografias foram realizadas com a objetiva de 20 vezes em 6 campos equidistantes entre si, utilizando-se o microscópio de fluorescência Olympus AX70. Em seguida, as células ChAT positivas e negativas (marcadas apenas com o DAPI) foram contadas pelo examinador. O grau de pureza das culturas foi obtido através da razão entre o número de células ChAT positivas pelo número total de núcleos.

3.6.6. Experimento 1 - Adequação e realização das co-culturas

As CS obtidas a partir do nervo ciático do camundongo em fase pré-sintomática e dos pacientes com evolução recente da forma esporádica da ELA, bem como de seus respectivos controles, foram isoladas, purificadas, expandidas e plaqueadas na densidade de 10^5 células por poço e mantidas em meio D-10 por aproximadamente 6 dias até a realização da co-cultura. Os NM isolados da medula espinal dos camundongos neonatos foram plaqueados na densidade de 10^5 células sobre a camada única de CS cultivadas previamente, de forma que oito combinações foram co-cultivadas: NM de camundongos WT ou TG plaqueados sobre CS de camundongos controles TG e NM de camundongos WT ou TG plaqueados sobre CS de pacientes com ELA ou controles. A co-cultura foi mantida em meio neuronal por 5 dias e o meio foi trocado a cada 2 dias. Ao fim do 5º dia, as células foram lavadas 2 vezes com PBS para retirada do meio de cultura e em seguida foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e congeladas no freezer -70°C . A adequação das co-culturas foi baseada em trabalhos já descritos na literatura (Haastert et al., 2005; Sparrow et al., 2012).

3.6.7. Experimento 1 - Análise da degeneração neuronal *in vitro* no sistema de co-cultura NM/CS pelo Fluoro-Jade C

A neurodegeneração na co-cultura de NM/CS foi avaliada através da marcação com o Fluoro-Jade C (FJC; Millipore, EUA), marcador fluorescente de neurônios que estão em processo de morte celular (Schmuck e Kahl, 2009). As lamínulas com as co-culturas foram descongeladas e fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos. Após a fixação, os poços foram lavados com PBS por 5 minutos e as células permeabilizadas com 0,2% de triton diluído em PBS por 10 minutos. O FJC foi incubado por 30 minutos na concentração de 0,001%. Após esse período, as células foram lavadas no escuro com água destilada por 4 vezes de 5 minutos e depois foram montadas em lâminas com

Montex contendo DAPI. De cada lamínula, 6 imagens equidistantes entre si foram obtidas sob microscópio de fluorescência Olympus AX70 no aumento de 20 vezes. Em seguida, os NM em degeneração (marcados em verde) e os núcleos totais das células presentes, marcados com DAPI (em azul), foram quantificados pelo método estereológico utilizando moldura de 456 pontos com área definida de $1,68 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ sobreposta às imagens fotografadas no software gráfico Adobe Photoshop® CS5 (Adobe, EUA). Os pontos que se sobrepunham aos núcleos celulares e às células em neurodegeneração foram contados. Os grupos controles do experimento – culturas de NM de camundongos WT e TG mantidas em meio neuronal – foram quantificadas sem a moldura, em virtude do baixo número de células por campo. A porcentagem de neurodegeneração foi obtida através da razão entre o número de células FJC positivas pelo número total de núcleos.

3.6.8. Experimento 2 - Adequação e realização do tratamento dos NM com o meio condicionado das CS

Os meios condicionados das culturas de CS do camundongo TG em fase pré-sintomática e do paciente com evolução recente da forma esporádica da ELA, bem como de seus respectivos controles foram coletados a partir das culturas purificadas – mantidas em meio D10 – ao final do 3º dia e do 6º dia. Os meios foram centrifugados a 700 g por 5 minutos para eliminação das células em suspensão e o sobrenadante foi coletado e congelado em freezer -70°C. Antes de tratar as culturas de NM, os meios condicionados foram suplementados com penicilina/estreptomicina e 10 ng/ml de CNTF e 100 pg/ml de GDNF.

As culturas purificadas de NM foram obtidas de animais TG e WT como descrito acima. Após 24 horas de plaqueamento dos NM, 20% do meio neuronal foi substituído pelo meio condicionado das culturas de CS do camundongo TG na fase pré-sintomática e do paciente com evolução recente da forma esporádica da ELA, bem como de seus respectivos controles. Esse procedimento se repetiu durante os 5 dias subsequentes da cultura neuronal. Nesse experimento, 8 combinações de tratamento foram verificadas, sendo NM de camundongos WT ou TG tratados com meio condicionado das CS de camundongos WT ou TG e NM de camundongos WT ou TG tratados com meio condicionado das CS de pacientes com ELA ou controles.

3.6.9. Experimento 2 - Análise da degeneração neuronal *in vitro* na presença do meio condicionado das CS

A degeneração dos NM dos camundongos WT ou TG tratados com meio condicionado das CS de camundongos WT ou TG e NM de camundongos WT ou TG tratados com meio condicionado das CS de pacientes com ELA ou controles também foi avaliada através da marcação com o FJC. Ao final do 5º dia de tratamento com meio condicionado (6º dia em cultura), as culturas de NM foram lavadas 2 vezes com PBS para retirada do meio de cultura e em seguida foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e congeladas no freezer -70°C.

O descongelamento foi realizado utilizando-se o mesmo processo de fixação, permeabilização e marcação pelo FJC realizado nas co-culturas, conforme descrito acima. De cada lamínula montada, 6 imagens equidistantes entre si foram obtidas no aumento de 20 vezes, utilizando o microscópio de fluorescência Olympus AX70. Os NM em degeneração (marcados em verde) e os núcleos totais das células presentes, marcados com DAPI (em azul), foram quantificados pelo método estereológico utilizando moldura de 456 pontos com área definida de $1,68 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ sobreposta às imagens fotografadas no software gráfico Adobe Photoshop® CS5. Os pontos que se sobrepunham aos núcleos celulares e às células em neurodegeneração foram contados. Os grupos controles do experimento – culturas de NM de camundongos WT e TG mantidas em meio neuronal – foram quantificadas sem a moldura, em virtude do baixo número de células por campo. A porcentagem de neurodegeneração foi obtida através da razão entre o número de células FJC positivas pelo número total de núcleos.

3.6.10. Experimento 2 - Análise do tamanho dos prolongamentos dos NM *in vitro* na presença do meio condicionado da CS

As culturas de NM dos camundongos WT ou TG tratados com meio condicionado das CS de camundongos WT ou TG e NM de camundongos WT ou TG tratados com meio condicionado das CS de pacientes com ELA ou controles foram acompanhadas por 6 dias após o plaqueamento. Os NM foram fotografadas no pré-tratamento (1º dia em cultura), com 24 horas de tratamento (2º dia em cultura) e no 5º dia de tratamento com o meio condicionado (6º dia em cultura) no microscópio invertido de contraste de fase Olympus CK40 (Olympus, JP) com objetiva de 40 vezes em 6 campos equidistantes entre si, sendo o primeiro campo obtido de um ponto aleatório no quadrante superior esquerdo do poço.

A área dos prolongamentos neuronais e do corpo celular dos NM foi determinada em cada campo fotografado utilizando ferramenta estereológica específica de acordo com o procedimento realizado de rotina no laboratório (Gomide e Chadi, 1999). Após o procedimento de coleta das imagens, as mesmas foram transferidas para o computador e com a utilização do software Adobe Photoshop® CS5 a moldura de contagem estereológica formada por 315 pontos com área definida de $4,9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ foi sobreposta às fotografias coletadas dos 6 campos de cada poço de cultura, conforme ilustra a Figura 7. Todos os prolongamentos neuronais e corpos celulares dos NM que atingiram os pontos da moldura foram contados. Os resultados foram obtidos a partir da quantificação da fração de área (Aa) que é a somatória de pontos dos prolongamentos (Σ_{pr}) ou corpos celulares (Σ_{cc}) divididos pelo total de pontos da moldura ($Aa = \Sigma_{pr}$ ou $\Sigma_{cc}/\text{total pontos}$) dividido pelo número de NM ($Aa = \{\Sigma_{pr} \text{ ou } \Sigma_{cc}/\text{total pontos}\}/\text{número de NM}$) de cada imagem obtida pela estereológica. O procedimento foi realizado para cada imagem dos 6 campos que representam o poço de tratamento. A média foi calculada para os 3 períodos analisados, pré-tratamento, 1º e 5º dia de tratamento.

Os resultados do 1º e 5º dias de tratamento com meio condicionado foram expressos como porcentagem em relação aos resultados obtidos no pré-tratamento. A partir disso, foi possível obter uma visão geral do tamanho dos prolongamentos e dos corpos celulares ao longo do tempo em que os neurônios foram tratados em comparação ao período que não receberam tratamento.

Figura 7. Procedimento para a contagem estereológica dos prolongamentos neuronais. As imagens dos prolongamentos neuronais foram transferidas para o computador e sobrepostas com moldura de contagem estereológica formada por 315 pontos com área definida de $4,9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$. Todos os prolongamentos neuronais e corpos celulares dos NM que atingiram os pontos da moldura foram contados.

3.6.11. Experimentos controles pelo método do *In Cell WB*

Culturas de neurônios do GRD de camundongos

As culturas de neurônios do GRD de camundongos TG neonatos foram realizadas conforme descrito na literatura (Liu et al., 2013b; Yuan et al., 2013) e modificados de acordo com a nossa experiência. Resumidamente, os GRD foram dissecados, dissociados em células individuais em solução de PBS contendo 0,025 % de tripsina/EDTA a 37 °C durante 15 minutos. As células foram transferidas para novo tubo contendo meio L-15, 10% de SFB e 10 $\mu\text{g/ml}$ DNase e trituradas com pipeta P200. A suspensão celular foi filtrada utilizando filtro de 70 μm , seguido por centrifugação a 250 g durante 10 minutos a 20°C. As células foram contadas, re-suspensas em meio neuronal e semeadas na densidade de cerca de $1,4 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços pré-revestidas com poli-D-ornitina (25 $\mu\text{g/ml}$) e laminina (25 $\mu\text{g/ml}$). Após 24 horas, as células foram tratadas com 5 $\mu\text{M/ml}$ de citosina-arabinosídeo (do inglês, *Cytosine arabinoside* - Ara-C; Sigma, EUA) para inibir o crescimento das células não neuronais. A identidade celular foi confirmada através da imunorreatividade da proteína associada ao microtúbulo 2 (do inglês, *Microtubule associated protein 2* - MAP-2; 1/100; Sigma, EUA) seguindo o mesmo protocolo de imunocitoquímica descrito acima.

Culturas de neurônios GABAérgicos do hipocampo de camundongos

As culturas de neurônios GABAérgicos do hipocampo de camundongos TG neonatos foi realizada conforme descrito na literatura (Kaeck e Banker, 2006; Bjorklund et al., 2010; Hughes et al., 2010) e modificadas de acordo com a nossa experiência. Resumidamente, hipocampos de camundongos foram dissecados e dissociados em HBSS contendo 0,025 % de tripsina/EDTA e incubados durante 15 minutos a 37 °C. O tecido foi lavado duas vezes durante 5 minutos com HBSS para retirar a tripsina residual e em seguida, dissociados com pipeta P200 até a obtenção da solução homogênea. As células foram semeadas a $1,4 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços pré-revestidas com poli-D-ornitina (25µg/ml) e laminina (25µg/ml) e mantidas em meio neuronal. Após 24 horas, as células foram tratadas com 5µM/ml de Ara-C para inibir o crescimento de células não neuronais. Os neurônios hipocampais GABAérgicos tiveram sua identidade confirmada pela imunorreatividade ao ácido glutâmico descarboxilase (do inglês, *Glutamic acid decarboxylase* - GAD; 1/100; Chemicon International Inc, EUA) seguindo o mesmo protocolo de imunocitoquímica descrito acima.

Culturas de fibroblastos da pele de pacientes e do nervo de camundongos

As culturas de fibroblastos da pele de pacientes foram obtidas através de biópsias. Em resumo, após a extração, as amostras de pele foram mantidas em solução de Belzer, lavadas duas vezes em PBS, cortadas em pequenos pedaços e, em seguida, colocadas em placas de 60 mm com meio D-10. Após 2 semanas, os fibroblastos que migraram da amostra de pele foram expandidos em placas de 100 mm e após a confluência foram transferidos para placas de 24 poços, de forma que o meio condicionado fosse coletado, conforme descrito abaixo. Os fibroblastos do nervo foram obtidos a partir de explantes de nervo ciático de camundongos de 60 dias TG e WT e após 2 semanas, os fibroblastos que migraram foram processados tal como descrito para os fibroblastos da pele dos pacientes.

Coleta do meio condicionado para os experimentos do In Cell WB

O meio condicionado das culturas de CS do nervo de pacientes e de camundongos, bem como das culturas de fibroblastos da pele de pacientes e do nervo dos camundongos foi coletado a partir de 10^5 células/poço semeadas em placas de 24 poços pré-revestidos com poli-D-ornithin (25µg/ml) e laminina (25µg/ml) cultivadas em

D-10. Após de 3 dias, o meio condicionado foi coletado, centrifugado (700 g por 5 minutos) e congelado. Antes da utilização, os meios condicionados foram suplementadas com 1% de penicilina/estreptomicina e o cocktail de factores tróficos, conforme já descrito anteriormente.

Realização dos experimentos de In Cell WB

Os experimentos de *In Cell WB* foram realizados utilizando NM, neurônios do GRD e neurônios GABAérgicos do hipocampo de camundongos neonatos semeados na densidade de aproximadamente $1,4 \times 10^4$ células/poço em microplacas de 96 poços e cultivados em meio neuronal. As células foram tratadas e incubadas com o meio condicionado das CS ou dos fibroblastos de camundongos ou de pacientes por cinco dias. Nos experimentos de “curva dose-resposta”, as doses de meio condicionado trocadas por dia foram: 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40 e 80%. Após o período de incubação, o meio foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com 4 % de formaldeído e marcadas para imunocitoquímica conforme o protocolo descrito acima. Os seguintes anticorpos foram incubados, anticorpo policlonal para GAD (neurônios GABAérgicos; 1:100) e MAP-2 (neurônios GRD; 1:100) a 4°C durante a noite. O anticorpo policlonal anti-ChAT (NM; 1:100) foi incubado a 4°C por 4 dias. As células foram lavadas com PBS, incubadas com anticorpos secundários anti-coelho (para GAD e MAP-2) ou anti-cabra (para ChAT) IRDye 700CW (1:200; LI-COR, EUA) durante 2 horas à temperatura ambiente e lavadas com PBS. As placas foram fotografadas no comprimento de 700nm utilizando o equipamento Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, EUA), e o software versão 3.0.29 Odyssey. As imagens foram feitas com resolução de 169µm, offset de qualidade média, 3,0 milímetros de foco e intensidade de definição entre 3-5. A quantificação foi realizada fazendo um círculo abrangendo toda a área do poço (0,31 cm²), incluindo as bordas.

3.6.12. Experimentos controles para detecção de apoptose

Avaliação da apoptose pela marcação de poli-caspases

A proporção de NM com caspases ativadas após o tratamento com o meio condicionado das culturas de CS foi detectado através do uso do inibidor fluorescente carboxifluoresceína caspase específico: FAM-VAD-fmk (poli- caspases: caspases 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9). Este reagente célula-permeável e não citotóxico reconhece sequências

de aminoácidos específicas nas caspases ativadas e se liga covalentemente a elas (Ekert et al., 1999). O substrato fluorogênico torna-se fluorescente após a clivagem pelas caspases (Vaux e Korsmeyer, 1999). Todas as etapas da reação foram realizadas de acordo com o manual de instruções do fabricante (kit de ensaio para a detecção de apoptose; Serotec, FRA). Resumidamente, os NM dos camundongos neonatos foram plaqueados em lâminulas de 13 mm e tratados durante 2 dias com o meio condicionado das CS de pacientes com ELA e de pacientes controle; o tratamento com meio neuronal foi utilizado como controle experimental. Em seguida, a solução de trabalho 30 X FLICA foi adicionada às células e a incubação ocorreu a 37 °C em 5% de CO₂ durante 1 hora. As amostras foram lavadas e colocadas em lâminas com meio de montagem contendo DAPI. Em seguida, doze imagens equidistantes entre si foram realizadas com objetiva de 20X a partir de cada lâminula, utilizando o microscópio de fluorescência Olympus AX70. As células FLICA positivas foram quantificadas por método estereológico específico empregando frame com 432 pontos de 30 µm² de área, conforme já descrito anteriormente.

Avaliação da apoptose pela marcação do TUNEL

A avaliação da apoptose foi realizada dois dias após o plaqueamento dos NM sobre as CS de pacientes, conforme realizado para as co-culturas descritas acima. As células TUNEL positivas foram identificadas pela marcação dos fragmentos de DNA pela dUTP-biotina mediada pela desoxinucleotidiltransferase para a detecção *in situ* do processo de apoptose. Resumidamente, as células foram fixadas em 4% de formaldeído e processadas com o kit de análise colorimétrica por DAB (3,3'-Diaminobenzidina) para TUNEL DeadEnd (Promega, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Perfis celulares TUNEL positivos foram quantificados usando o método de estereologia conforme descrito anteriormente para a análise da degeneração neuronal pelo FJC. Em experimento paralelo, a apoptose foi verificada após cinco dias de co-cultura pela marcação com o TUNEL fluorescente (*In situ* cell kit para detecção de morte celular por fluoresceína; Roche Diagnostics, EUA) conforme as recomendações do fabricante. Os NM em apoptose foram identificados com o anticorpo ChAT (1:1500).

3.7. Experimento 3 - ELISA do meio condicionado das culturas de CS

A escolha das moléculas candidatas a mediar o efeito das CS sobre os NM a serem quantificadas no meio condicionado das culturas de CS pelo método de ELISA,

foi baseada nos resultados dos experimentos 1 e 2 já descritos acima, nos resultados das análises de *microarray* das culturas de CS e do nervo de pacientes e do modelo animal (outro subprojeto do laboratório), bem como através das análises da literatura.

Resumidamente, as CS foram plaqueadas na densidade de 2×10^5 células por poço e foram mantidas em meio D-10 por 3 dias. O meio condicionado foi coletado, centrifugado (700 g por 5 minutos), armazenado em alíquotas de 200-250µl e estocado em freezer -70°C até o momento da realização dos experimentos.

A quantificação das moléculas candidatas: NGF (Promega, EUA), GDNF (Promega, EUA), fator de crescimento derivado do cérebro (do inglês, *Brain derived neurotrophic factor*; Promega, EUA), fator de crescimento do endotélio vascular A (do inglês, *Vascular endothelial growth factor A* - VEGFA; Cloud-Clone Corp., EUA), fator de crescimento insulínico-1 (do inglês, *Insuline growth factor 1* - IGF-1; Cloud-Clone Corp., EUA) e neurotrofina-3 (do inglês, *Neurotrophin-3* - NT-3; Cloud-Clone Corp., EUA) no meio condicionado das culturas de CS de camundongos ou de pacientes foi realizada pelo método de ELISA utilizando kits comerciais específicos.

As amostras, os calibradores e a curva de diluição foram incubados em poços pré-sensibilizados com anticorpo pelo período de 3 horas, de acordo as instruções do fabricante. Depois desta etapa os poços foram incubados com o anticorpo primário, lavagens foram realizadas para remover os anticorpos não ligados, seguida da incubação por 2 horas com o anticorpo conjugado ao complexo enzimático para amplificação da leitura. Finalmente, o substrato 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) foi adicionado, reagindo com o conjugado enzimático e produzindo cor. Essa cor foi medida no espectrofotômetro, no qual foi determinada a densidade óptica de cada poço, mensurando na absorbância $\lambda=450$ nm (BioTek, EUA). Os resultados foram obtidos a partir das curvas de diluições seriadas com concentrações conhecidas e expressos em pg/ml.

3.8. Experimento 4 - Avaliação da expressão gênica das moléculas candidatas pela técnica do qPCR

A expressão gênica das moléculas apontadas pelas análises de *microarray* nas CS cultivadas de camundongos SOD1^{G93A} e no nervo periférico de pacientes com evolução recente da forma esporádica da ELA foi realizada através da técnica do qPCR. Os procedimentos para a extração do RNA a partir das culturas e do nervo periférico estão descritos em detalhe na nossa publicação (Maximino et al., 2014).

Resumidamente, o RNA das culturas de CS (densidade de 2×10^5 células/poço) e do nervo periférico foram extraídos pelo método do Trizol (Invitrogen, EUA) e usando o kit Miniprep (Zymo, EUA) respectivamente, ambos de acordo com as recomendações dos fabricantes. A quantidade e a integridade do RNA foi determinada pelo espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific, EUA) e eletroforese baseada em microfluidos (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, EUA), respectivamente. As amostras de RNA com densidade óptica 260/280 de aproximadamente 2.0 e RIN > 7.0 foram usadas nos experimentos.

As amostras de RNA total foram submetidas à reação de transcrição reversa utilizando o kit *RT-transcription reagent* (Applied biosystems, EUA), que utiliza a enzima *Multriscribe* como transcriptase, de acordo com as recomendações do fabricante. A reação foi incubada em termociclador por 10 minutos a 25°C, seguidos de 30 minutos a 42°C, finalizando por 5 minutos a 70°C para inativação da enzima. O cDNA (*do inglês*, complementary DNA) foi armazenado a -20°C até a utilização nos experimentos de qPCR.

Experimentos de qPCR SYBR

As reações foram realizadas no aparelho PikoReal™ Real-Time PCR System (Thermo Scientific, EUA) em volume final de 20µl, contendo 1X Dynamo Color Flash SYBR Green qPCR kit (Thermo Scientific, EUA), 400nM de oligonucleotídeos e 60ng de cDNA convertido a partir do RNA total. Os transcritos foram escolhidos por apresentarem valores de *Fold* elevados ou diminuídos nas análises de microarray e possível participação dos seus produtos nos mecanismos da doença. As sequências dos *primers* escolhidos para validação estão apresentadas na Tabela 3.

As reações foram realizadas nas condições de ciclagem recomendadas pelo fabricante: 7 minutos a 95°C para a ativação da enzima *Tbr* DNA Polymerase modificada, seguidos de 60 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e um minuto a 60°C para o pareamento dos iniciadores e extensão. Ao final da amplificação foi adicionada uma etapa de 20 minutos de duração, na qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 98°C a 0,3°C por segundo com a contínua aquisição da fluorescência (Morrison et al., 1998), a partir da qual se obtém a curva de dissociação, na qual a presença de pico único confirma a especificidade da amplificação. As reações foram realizadas em placas de 96 poços com qualidade óptica.

Uma vez que a cada ciclo da reação novas moléculas de fita dupla são formadas, o nível de fluorescência emitida aumenta gradualmente, sendo que quanto menor o ciclo em que a fluorescência atinge determinado limite, maior é o nível de expressão do transcrito analisado (Morrison et al., 1998). O parâmetro utilizado foi o ciclo limite (do inglês, *Cycle threshold* - Ct), uma linha aleatória fixa na região exponencial das reações e usada para determinar o ciclo em que cada amostra atinge determinado valor de fluorescência (Livak e Schmittgen, 2001). As reações, realizadas em duplicata, aceitaram valores de desvio padrão até 0,5 e foram repetidas quando ultrapassaram esse valor.

Os *primers* foram selecionados utilizando-se a ferramenta disponível na internet (<http://www.idtdna.com/scitools/Applications/REalTimePCR/>), a qual forneceu as sequências, as temperaturas de anelamento e tamanhos dos fragmentos. A especificidade das sequências foi verificada utilizando-se a ferramenta BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Diferentes concentrações (400nM, 800nM e 1000nM) foram testadas para cada par de *primers*, de forma que as quantidades individuais foram padronizadas individualmente. Considerou-se a utilização da menor concentração de *primers* capaz de fornecer menores valores de Ct, a fim de evitar a formação de estruturas secundárias.

Obtidas as concentrações ideais dos *primers*, a eficiência para cada par foi calculada usando cinco diluições seriadas de cDNA convertido de RNA total (100ng, 20ng, 4ng, 0,8ng e 0,16ng). A partir dos resultados, a curva relaciona os Cts com o valor das quantidades de cDNA em logaritmo de base 10 e o software calcula as eficiências de cada par de *primers*. O valor correspondente ao coeficiente angular (*slope*) da equação da reta da curva padrão ($y = ax + b$, $a = \text{slope}$) foi utilizado para o

cálculo da eficiência da reação através da seguinte equação: $E_f = 10^{\left(\frac{-1}{\text{slope}}\right)} - 1$

A expressão diferencial dos transcritos-alvo foi determinada pela quantificação relativa em relação à média dos genes endógenos actina beta (do inglês, *beta-actin* - ACTB) e gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (do inglês, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* - GAPDH) para as culturas de CS e para o nervo periférico, respectivamente. O modelo matemático para o cálculo da medida relativa de expressão foi $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System protocol; Applied Biosystems, EUA).

Tabela 3. Primers utilizados nos experimentos de expressão gênica das moléculas candidatas pela técnica do qPCR SYBR.

GeneID	Primer sequences (5'-3')		Amplicon (bp)
	Foward	Reverse	
<i>Cultura CS (modelo animal)</i>			
<i>Aldh1a2</i>	ATGGATGCGTCTGAAAGAGG	TGACTCCCTGCAAATCGATG	142
<i>Col3a1</i>	GAAGTCTCTGAAGCTGATGGG	TTGCCTTGCGTGTTTGATATTC	149
<i>Csf1</i>	ACCCAGGATGAGGACAGAC	AGGAAGATGGTAGGAGAGGG	129
<i>Lpl</i>	CTTTTCTGGGACTGAGGATGG	TCCACCTCCGTGTAAATCAAG	150
<i>Mmp3</i>	CAGGAAGATAGCTGAGGACTTTC	GGTCAAATTCCAAGTCCGAAG	110
<i>Ncam1</i>	CCCTGATTCTCTTCTGTGC	TGAGTGATGGTTGGAGGTTG	97
<i>Ntng1</i>	TCATACCTCCCCATCCCC	GTTGTGTTTACAGCTCACGC	147
<i>Osmr</i>	TCACAAAGGTCACAACTCCAG	GGATTGGGAATGTCAGGGTAG	148
<i>Plac8</i>	TTTGAGACCTCGCATCGAAG	AACAAAAGGTCCCACAGAGG	150
<i>Rela</i>	ACCCGAAACTCAACTTCTGTC	TTGATGGTGCTGAGGGATG	74
<i>Tgfa</i>	GGAACCTGCCGGTTTTTGG	CACCCACGTACCCAGAGTG	67
<i>Vcam1</i>	GCAAAGGACACTGGAAAAGAG	TCAAAGGGATACACATTAGGGAC	138
<i>Actb</i>	ACCTTCTACAATGAGCTGCG	CTGGATGGCTACGTACATGG	147
<i>Nervo periférico (pacientes)</i>			
<i>CSF3</i>	TTCCTGCTCAAGTGCTTAGAG	AGCTTGTAGGTGGCACAC	95
<i>EGR1</i>	TGTCACCAACTCCTTCAGC	TCCTGTCTTTAAGTCTCTTGTC	144
<i>EGR3</i>	TCGGTAGTCCATTACAATCAGATG	CTTTCCCAAGTAGGTCACGG	141
<i>FAS</i>	AAGCTCTTTCACCTTCGGAGG	GGGCATTAACACTTTTGGACG	110
<i>FOS</i>	TTGTGAAGACCATGACAGGAG	CCATCTTATTCCTTTCCCTTCGG	117
<i>HLA-A</i>	TCCCTCACAGCTTGTAAGTG	ATGCCTACACGAACACAGAC	145
<i>JUN</i>	AGCCCAAATAACCTCACG	TGCTCTGTTTCAGGATCTTGG	150
<i>PDGFB</i>	ATGATCTCCAACGCCTGC	TCAGCAATGGTCAGGGAAC	145
<i>PDGFRB</i>	CCACACTCCTTGCCCTTTAAG	CTCACAGACTCAATCACCTTCC	146
<i>GAPDH</i>	ACATCGCTCAGACACCATG	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	143

3.9. Análise estatística

Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via (one-way), seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. Em alguns casos (os quais estão relatados na apresentação de cada resultado e na legenda de cada figura) o teste *t* de Student *one-tailed* foi empregado para análises entre dois grupos. Todos os experimentos foram realizados utilizando ao menos três replicatas por genótipo do modelo animal (WT ou TG) e por fenótipo do paciente (controle ou ELA). As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). 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. Análise comportamental

A análise comportamental do modelo animal da ELA foi realizada com a avaliação do estado geral (*escala neurológica*), início e progressão do tremor de extremidades, mortalidade, testes motores (*rotarod* e *hanging wire*), teste de elevação da cauda, impressão da pegada (*footprint*), comportamento motor espontâneo em campo aberto (*infrared*) e avaliação eletrofisiológica do nervo. Todos os detalhes metodológicos e resultados estão publicados na revista *Brain Research* (Alves et al., 2011; em anexo).

O acompanhamento do fenótipo clínico e a avaliação eletrofisiológica foram de importância fundamental para que pudéssemos optar por estudar as CS do nervo na fase pré-sintomática (60 dias), uma vez que os resultados mostraram alterações no nervo ciático (20 dias de vida) sem, no entanto, o aparecimento dos sinais clássicos da doença.

4.2. Biópsia do nervo periférico de pacientes com ELA e controles

As biópsias do nervo extensor curto do hálux de pacientes acompanhados no Ambulatório de ELA do Departamento de Neurologia do HC/FMUSP e de ramos motores do nervo acessório obtidas durante as cirurgias de lesões traumáticas do plexo braquial em pacientes controles estão apresentadas nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Relação dos pacientes acompanhados no Ambulatório de ELA do Departamento de Neurologia do HC/FMUSP e submetidos à biópsia do nervo extensor curto do hálux.

Paciente ELA	Data da biópsia	Iniciais do nome	Idade	Local do 1º acometimento	Início da doença	Sexo
1	31/08/2011	PRS	47	Bulbar	Junho/09	Masculino
2	19/10/2011	NZ	67	Bulbar	Janeiro/11	Masculino
3	24/10/2011	ERL	42	MID	Abril/03	Masculino
4	18/01/2012	LPS	42	MSD	Janeiro/10	Masculino
5	01/02/2012	AVC	64	MIE	Janeiro/10	Feminino
6	11/04/2012	GJS	55	MID	Novembro/10	Masculino
7	18/04/2012	SAT	63	MID	Fevereiro/06	Masculino
8	30/05/2012	FDC	57	MIE	Julho/09	Feminino
9	20/08/2012	MCKI	48	MIE	Julho/11	Masculino
10	19/11/2012	MPB	60	MIE	Janeiro/10	Masculino
11	10/12/2012	VLSZ	58	MIE	Outubro/10	Feminino
12	25/02/2013	EMM	58	Bulbar	Novembro/09	Feminino
13	06/05/2013	EVS	48	MSD	Abril/11	Feminino
14	10/06/2013	OBM	67	Bulbar	Setembro/10	Feminino
15	10/06/2013	JAL	58	Bulbar	Março/12	Masculino
I	19/08/2013	PIS	60	MID	Março/11	Masculino
II	26/08/2013	IFS	68	MSE	Junho/11	Masculino
16	18/11/2013	JRS	46	MSE	Outubro/09	Masculino
17	17/02/2014	JCSS	34	MID	Setembro/11	Masculino

Os registros dos pacientes acima estão arquivados no laboratório. Pela confidencialidade firmada, apresentaremos apenas nas necessidades justificadas. MSD (E): membro superior direito ou esquerdo; MID (E): membro inferior direito ou esquerdo.

Tabela 5. Relação dos pacientes submetidos ao ato cirúrgico das Lesões Traumáticas do Plexo Braquial.

Paciente controle	Data da biópsia	Iniciais do nome	Idade	Sexo
1	19/01/2012	TAD	21	Masculino
2	09/04/2012	OBO	44	Masculino
3	04/06/2012	ALVM	25	Masculino
4	28/06/2012	LHNC	----	Masculino
5	17/09/2012	ELSR	32	Masculino
6	10/01/2013	IBSJ	41	Masculino
7	14/01/2013	MLC	30	Feminino
8	07/02/2013	WARJ	25	Masculino
9	25/02/2013	MSM	28	Masculino
10	25/03/2013	GSS	35	Masculino
11	15/04/2013	GBCP	29	Masculino
A	05/08/2013	MAA	43	Feminino
B	19/08/2013	MRS	57	Masculino
12	27/02/2014	LCM	28	Masculino
13	17/03/2014	JASB	21	Masculino
14	31/03/2014	ECS	18	Feminino
15	07/04/2014	AARB	37	Masculino
16	14/04/2014	SDS	47	Masculino

* Os registros dos pacientes listados acima estão guardados no laboratório. Pela confidencialidade firmada, apresentaremos apenas nas necessidades justificadas. ---- dados não disponíveis.

4.3. Experimentos *in vitro*

4.3.1. Quantificação da pureza das culturas de NM obtidas a partir da medula espinal de camundongos neonatos

O desenvolvimento dos NM *in vitro* obtidos da medula espinal de camundongos neonatos TG e WT foi observado ao longo de seis dias. Na figura 8 é possível verificar o crescimento da cultura ao longo do tempo pela microscopia de contraste de fase. No primeiro dia *in vitro* (DIV; A) foram observadas células aderidas na placa e após o segundo DIV (B-D) neurônios com morfologia típica, os quais permaneceram vivos até o quinto dia (E). No sexto DIV (F) verificou-se somente células com morfologia glial. A morfologia neuronal mais comumente observada foi células multipolares com numerosos neuritos delicados e que cresceram ao longo dos DIV.

Figura 8. Fotomicrografias por contraste de fase mostrando a cultura de neurônios motores da medula espinal de camundongos neonatos ao longo dos 6 dias *in vitro* (DIV; A-F). As setas apontam para células neuronais e a cabeça de seta aponta para células com morfologia típica de glia. Barras: 50µm.

A pureza das culturas de NM foi avaliada a partir da quantificação estereológica das células ChAT positivas (Figura 9) em relação ao número total de células na cultura que tiveram seus núcleos marcados com DAPI.

Figura 9. Culturas de neurônios motores da medula espinal de camundongos neonatos. NM imunorreativos ao anticorpo da colina acetiltransferase (ChAT). Os núcleos marcados com DAPI são observados em azul. Barra: 20 μ m.

A contagem do número de células ChAT positivas permitiu a determinação do grau de pureza da ordem de 81% (Figura 10).

Figura 10. Pureza das culturas de neurônios motores no 3º dia *in vitro*. O gráfico mostra a quantificação das células imunorreativas para a colina acetiltransferase (ChAT) na cultura de células da medula espinal do camundongo neonato. O número de NM e de outras células está expresso em porcentagem do número total de células. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo.

4.3.2. Quantificação da pureza das culturas de CS do nervo ciático do camundongo e do nervo periférico de pacientes

Nervo ciático dos camundongos: após a biópsia do nervo ciático do camundongo com 60 dias e o estabelecimento dos explantes, foram observados fibroblastos migrando a partir dos fragmentos do nervo (Figura 11A). Após quatro semanas, quando se observou a migração predominante das CS (Figura 11B), os explantes foram dissociados e as células purificadas e semeadas em placas de 100 mm pré-tratadas com laminina até se tornarem confluentes de 7 a 12 dias após o plaqueamento. O tratamento com o anticorpo anti-Thy 1.2 seguido pela citólise mediada pelo complemento sérico de coelho apresentou eliminação eficiente dos fibroblastos (Figura 11D) em comparação com as culturas não tratadas (Figura 11C).

Figura 11. Fotomicrografias das células de Schwann (CS) do nervo ciático de camundongos cultivadas nas fases de explante E1 (A) e E2 (B). As fotomicrografias mostram as culturas antes (C) e depois (D) do tratamento com o anticorpo anti-Thy 1.2 (D). As células provenientes dos nervos de camundongos transgênicos SOD1^{G93A} foram fotografadas em microscópio invertido acoplado a contraste de fase. A cabeça de seta aponta fibroblastos e a seta aponta as CS. Barras: 100 μ m.

A figura 12 mostra o resultado da quantificação da pureza das culturas de CS plaqueadas em laminina e tratadas com o anticorpo anti-Thy 1.2, as quais apresentaram 95% de pureza. A figura mostra também os resultados das quantificações realizados em experimentos nos quais as células foram plaqueadas somente em laminina ou em poli-L-lisina (PLL) e tratadas ou não com anti-Thy 1.1.

Figura 12. Pureza das culturas de células de Schwann (CS) de camundongos, plaqueadas em poli-L-lisina (PLL) ou laminina com ou sem tratamento pelo anticorpo anti-Thy 1.1 ou 1.2. O número de CS e de fibroblastos está expresso em porcentagem do número total de células. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo.

A figura 13 ilustra a pureza das culturas de CS plaqueadas em PLL e não submetidas ao processo de purificação (A) e culturas plaqueadas em lamina e submetidas à citólise após tratamento com o anticorpo anti-Thy 1.2 (B).

Figura 13. Fotomicrografias mostrando imunoreatividade da proteína S100 β em culturas de células de Schwann (CS) de camundongos de 60 dias. As células foram plaqueadas em PLL e não purificadas (A) ou plaqueadas em laminina e tratadas com anti-Thy 1.2 (B), através da microscopia de fluorescência. A marcação em verde indica a especificidade das CS na cultura e o grau de pureza da cultura celular. Em azul, o DAPI cora o núcleo das células, as quais representam os fibroblastos quando não apresentam o citoplasma marcado em verde. Barras: 50 μ m.

Nervos dos pacientes: após a biópsia os nervos periféricos dos pacientes foram explantados e mantidos em suspensão por duas semanas para a purificação. As CS foram semeadas e expandidas em placas de 100 mm cobertas com laminina por em média 14 dias.

Na figura 14 as CS provenientes dos nervos de cinco pacientes com ELA e de um paciente controle são visualizadas pela microscopia de contraste de fase. Nota-se que as células do paciente ELA em (B) estão no início do processo de expansão enquanto que as células dos demais pacientes estão em confluência ao final de P1.

Figura 14. Fotomicrografias das células de Schwann (CS) humanas cultivadas na primeira passagem (P) 1. As células foram fotografadas em microscópio invertido acoplado a contraste de fase. As CS do paciente controle 1 (PCT1) são apresentadas em (A). As CS dos

nervos dos cinco pacientes com ELA (PELA) são apresentadas em (B-F). Barras: 200 μm .

A figura 15 mostra o resultado da quantificação da pureza das culturas de CS humanas, as quais apresentaram 96,6% de purificação.

Figura 15. Quantificação da pureza das culturas de células de Schwann (CS) humanas. As CS foram obtidas das biópsias do nervo periférico de pacientes, purificadas a partir de explantes mantidos em suspensão por 2 semanas e plaqueamento em laminina. O número de CS e de fibroblastos está expresso em porcentagem do número total de células. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo.

A figura 16 ilustra a cultura de CS humanas positivas para S100 β .

Figura 16. Fotomicrografia das culturas de células de Schwann (CS) humanas imunorreativas para a proteína S100 β visualizadas através de fluorescência. A marcação em verde indica a especificidade das CS na cultura e o grau de pureza da cultura celular. Em azul, o DAPI cora o núcleo das células, as quais representam os fibroblastos quando não apresentam o citoplasma marcado em verde. Barra: 50 μm .

4.3.3. Experimento 1 - Adequação e realização das co-culturas

Com o objetivo de estabelecer a metodologia para verificar a influência direta das CS aos NM *in vitro*, as células neuronais foram isoladas da medula espinal dos camundongos neonatos e semeadas sobre camada única de CS cultivadas previamente.

A figura 17 ilustra a co-cultura de NM e CS em contraste de fase (A) e imunofluorescência de dupla marcação (B). Os NM foram imunomarcados com ChAT e as CS com S100 β no 3º dia *in vitro*. O mesmo padrão foi observado para as CS humanas.

Figura 17. Fotomicrografias das co-culturas de neurônios motores e células de Schwann (CS) de camundongos por contraste de fase (A) e imunofluorescência (B). A co-cultura em contraste de fase permite observar a presença de dois perfis celulares com morfologias distintas: NM (seta) e CS (cabeça de seta). A imunofluorescência permite verificar a marcação específica dos NM pela colina acetiltransferase (ChAT, em vermelho) além da marcação específica para as CS (S100 β , em verde). Barras: 50 μ m (A) e 20 μ m (B).

4.3.4. Experimento 1 - Análise da degeneração neuronal *in vitro* no sistema de co-cultura de camundongos

As culturas de NM co-cultivadas com CS foram marcadas com o indicador de neurodegeneração FJC e a fotomicrografia representativa é apresentada na figura 18.

Figura 18. Fotomicrografia ilustrativa dos neurônios motores marcados com Fluoro-Jade C (FJC) no sistema de co-cultura. Os NM em degeneração marcados com FJC estão em verde e os núcleos marcados com DAPI estão em azul. Na fotomicrografia são visualizados apenas os NM. Barra: 20 μ m.

Com o objetivo de verificar a influência das CS do nervo ciático dos camundongos pré-sintomáticos na sobrevivência dos NM, ao fim do 5º dia em co-cultura com as CS dos camundongos os NM foram marcados com FJC e as lâminas foram fotografadas e quantificadas.

Verificou-se aumento de 48% ($p < 0,05$) no número de NM TG FJC positivos co-cultivados com CS TG em relação aos NM de mesmo genótipo co-cultivados com CS WT. Além de aumento médio de 470% ($p < 0,001$) no número de NM FJC positivos de ambos os genótipos cultivados somente na presença do meio neuronal em relação aos co-cultivados com CS. As quantificações do perfil de células FJC positivas no sistema de co-cultura dos camundongos estão representadas na figura 19.

Figura 19. Perfil de células Fluoro-Jade C positivas (FJC+) na co-cultura de células de Schwann (CS) de camundongos na fase pré-sintomática e neurônios motores. O gráfico mostra a porcentagem de células FJC+ após 5 dias de co-cultura. As médias estão expressas em porcentagem dos NM FJC+ em relação a quantidade total de núcleos marcados pelo DAPI. Como controle do experimento, culturas de NM foram mantidas em meio neuronal. *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls; # teste t de Student. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo.

4.3.5. Experimento 1 - Análise da degeneração neuronal *in vitro* no sistema de co-cultura de pacientes

Com o objetivo de verificar a influência das CS dos pacientes com ELA na sobrevivência dos NM, ao fim do 5º dia em co-cultura com as CS humanas os NM foram marcados com o FJC e as lâminas foram fotografadas e quantificadas.

Verificou-se aumento médio de 1.074% no número de NM FJC positivos WT ($p < 0,001$) e TG ($p < 0,01$) co-cultivados com as CS de pacientes ELA em relação aos NM co-cultivados com as CS de pacientes controles. Além de aumento médio de 197% ($p < 0,001$) e 3,389% ($p < 0,001$) no número de NM FJC positivos de ambos os genótipos cultivados somente na presença de meio neuronal em relação aos grupos de NM co-cultivados com as CS de pacientes ELA e controles, respectivamente. Os resultados das quantificações de NM FJC positivos no sistema de co-cultura com as CS de pacientes ELA e controles estão demonstrados na figura 20.

Figura 20. Perfil de células Fluoro-Jade C positivas (FJC+) na co-cultura de células de Schwann (CS) de pacientes ELA (PELA) e controles (PCT). (A) Porcentagem de neurônios motores FJC+ no final de 5 dias em co-cultura com as CS de PELA (n=5) e PCT (n=5). As médias estão expressas em porcentagem dos NM FJC+ em relação a quantidade total de núcleos marcados pelo DAPI. Como controle do experimento, culturas de NM de camundongos *wild-type* (WT) e transgênico (TG) foram mantidas em meio neuronal e quantificadas ao final do 5º dia. (B) Quantificações individuais dos PELA e PCT. *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo ou por paciente.

4.3.6. Experimento 2 - Análise do tamanho dos prolongamentos neuronais *in vitro* na presença do meio condicionado das CS de camundongos

Com o objetivo de avaliar a influência do meio condicionado das CS do camundongo na fase pré-sintomática no tamanho dos prolongamentos e do corpo celular dos NM cultivados ao fim do 1º e do 5º dia de tratamento, os mesmos foram fotografados e os seus prolongamentos quantificados.

Após o 1º dia de tratamento, verificou-se aumento de 121% ($p<0,01$) e 230% ($p<0,01$) nos prolongamentos dos NM WT tratados com meio condicionado das CS WT em relação aos NM de mesmo genótipo tratados com meio neuronal ou meio condicionado das CS TG, respectivamente. No mesmo período, os NM TG tratados com o meio condicionado das CS WT também apresentaram maiores prolongamentos 118% ($p<0,01$) em relação aos tratados com meio condicionado das CS TG.

Após o 5º dia de tratamento, o tamanho dos prolongamentos dos NM WT tratados com meio condicionado de CS WT manteve-se elevado 180% ($p<0,05$) em relação aos mesmos NM tratados com meio condicionado de CS TG. A elevação de 158% ($p<0,01$) também foi verificada para os NM TG tratados com o meio condicionado das CS WT em comparação com os NM TG tratados com meio condicionado das CS de mesmo genótipo. Nesse período de análise (6º dia em cultura) não foram observados NM WT ou TG nas culturas tratadas com meio neuronal, não sendo possível, portanto a medição estereológica dos prolongamentos.

A quantificação dos prolongamentos neuronais das culturas de NM tratadas com o meio condicionado das CS dos camundongos WT e TG na fase pré-sintomática é apresentada na figura 21.

Figura 21. Análise do tamanho dos prolongamentos neuronais nas culturas de neurônios motores tratados com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de camundongos na fase pré-sintomática. O tamanho dos prolongamentos foi analisado em dois períodos (1º e 5º dia) nas culturas de NM após os tratamentos com os meios condicionados das CS de camundongos *wild-type* (WT) e transgênicos (TG). As médias estão expressas em porcentagem relativa aos respectivos valores encontrados no pré-tratamento. Como controle do experimento, culturas de NM foram tratadas com meio neuronal. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls; ## $p < 0,01$ teste *t* de Student. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo.

As fotomicrografias dos prolongamentos neuronais das culturas de NM tratadas com o meio neuronal ou com o meio condicionado das culturas de CS dos camundongos WT ou TG na fase pré-sintomática é apresentada na figura 22.

Figura 22. Tamanho dos prolongamentos neuronais após o tratamento com o meio condicionado das células de Schwann (CS) do modelo animal. Fotomicrografia representativa mostrando a morfologia dos neurônios motores tratados com o meio neuronal ou com o meio condicionado das CS *wild-type* (WT) ou transgênicas (TG) por 24 horas (h) ou 5 dias (d). Barras: 25 μ m.

A quantificação do tamanho do corpo celular dos NM tratados com o meio condicionado das CS do camundongo não revelou alteração em nenhum dos grupos ao longo dos dois períodos analisados (Figura 23).

Figura 23. Análise do tamanho dos corpos celulares dos neurônios motores tratados com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de camundongos de 60 dias. Os corpos celulares foram analisados em dois períodos (1º e 5º dia) após os tratamentos com os meios condicionados das CS de camundongos *wild-type* (WT) e transgênicos (TG). As médias estão expressas em porcentagem relativa aos respectivos valores encontrados no pré-tratamento. Como controle do experimento, culturas de NM foram tratadas com meio neuronal. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo.

4.3.7. Experimento 2 - Análise da degeneração neuronal *in vitro* na presença do meio condicionado das CS de camundongos

Com o objetivo de verificar a influência do meio condicionado das CS dos camundongos na fase pré-sintomática na degeneração dos NM, ao fim do 5º dia de tratamento os NM foram marcados com FJC e as lâminas foram fotografadas e quantificadas.

Verificou-se aumento de 140% ($p < 0,05$) no perfil de células FJC positivas nos NM WT e 67% ($p < 0,05$) nos NM TG tratados com o meio condicionado de CS TG em relação ao tratamento com o meio condicionado das CS WT. No mesmo período de análise (6º dia em cultura) não foram observados NM WT ou TG nas culturas tratadas somente com meio neuronal, não sendo possível, portanto a quantificação das células em neurodegeneração.

A quantificação do perfil de células FJC positivas nas culturas de NM WT e TG após o 5º dia de tratamento com o meio condicionado das CS de camundongos WT e TG está demonstrada na figura 24.

Figura 24. Perfil de células Fluoro-Jade C positivas (FJC+) após o tratamento com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de camundongos na fase pré-sintomática. Porcentagem de morte neuronal após o 5º dia de tratamento com o meio condicionado das CS *wild-type* (WT) e transgênico (TG). As médias estão expressas em porcentagem dos neurônios motores FJC+ em relação a quantidade total de núcleos marcados pelo DAPI. * $p < 0,05$ ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo.

4.3.8. Experimento 2 - Análise do tamanho dos prolongamentos neuronais *in vitro* na presença do meio condicionado da CS de pacientes

Com o objetivo de avaliar a influência do meio condicionado das CS dos pacientes com ELA no tamanho dos prolongamentos dos NM, ao fim do 1º e do 5º dia de tratamento os NM foram fotografados e os seus prolongamentos quantificados.

Após o 1º dia de tratamento, houve diminuição de 29% ($p < 0,05$) e 69% ($p < 0,01$) no tamanho dos prolongamentos dos NM TG tratados com o meio condicionado das CS dos PELA em relação aos NM tratados com o meio condicionado dos PCT e com meio neuronal, respectivamente.

Após o 5º dia de tratamento, verificou-se aumento no tamanho dos prolongamentos dos NM WT (67%; $p < 0,05$) e TG (79%; $p < 0,01$) tratados com o meio condicionado das CS PCT quando comparados aos NM de mesmo genótipo tratados com meio condicionado das CS PELA. No mesmo período (6º dia em cultura) não

foram observados NM WT ou TG nas culturas tratadas com meio neuronal, não sendo possível, portanto a medição estereológica dos prolongamentos.

A quantificação dos prolongamentos neuronais das culturas de NM tratadas com o meio condicionado das CS dos pacientes está apresentada na figura 25 e as quantificações individuais são apresentadas na figura 26.

Figura 25. Tamanho dos prolongamentos neuronais nas culturas de neurônios motores tratadas com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de pacientes. O tamanho dos prolongamentos foi analisado em dois períodos (1º e 5º dia) nas culturas de NM tratados com os meios condicionados das CS de pacientes com ELA (PELA; n=7) e pacientes controles (PCT; n=3). As médias estão expressas em porcentagem relativa aos respectivos valores encontrados no pré-tratamento. Como controle do experimento, culturas de NM foram tratadas com meio neuronal. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ teste *t* de Student. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo.

Figura 26. Tamanho dos prolongamentos neuronais nas culturas de neurônios motores tratados com o meio condicionado das células de Schwann (CS) dos pacientes individuais. Os prolongamentos foram analisados no 1º (A) e no 5º dia (B) nas culturas de NM após os tratamentos com os meios condicionados das CS de pacientes com ELA (PELA; n=7) e pacientes controles (PCT; n=3). As médias estão expressas em porcentagem relativa aos respectivos valores encontrados no pré-tratamento. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por paciente.

As fotomicrografias dos prolongamentos neuronais das culturas de NM tratadas com o meio neuronal ou com o meio condicionado das culturas de CS dos pacientes controles ou dos pacientes ELA com evolução recente da doença estão apresentadas na figura 27.

Figura 27. Tamanho dos prolongamentos neuronais após o tratamento com o meio condicionado das células de Schwann (CS) dos pacientes. Fotomicrografia representativa mostrando a morfologia dos neurônios motores tratados com o meio neuronal ou com o meio condicionado das CS dos pacientes controles (PCT) ou pacientes com ELA (PELA) por 24 horas (h) ou 5 dias (d). Barras: 25μm.

4.3.9. Experimento 2 - Análise da degeneração neuronal *in vitro* na presença do meio condicionado das CS dos pacientes

Com o objetivo de analisar a influência do meio condicionado das CS dos pacientes com ELA na degeneração neuronal, ao fim do 5º dia de tratamento os NM foram marcados com FJC e as lâminas foram fotografadas e quantificadas.

Verificou-se aumento de 106% ($p < 0,05$) e 60% ($p < 0,05$) no perfil de células FJC positivas nas culturas de NM WT e TG, respectivamente, quando tratados com o meio condicionado das CS PELA em comparação com o meio condicionado das CS PCT. Nesse período (6º dia em cultura) não foram observados NM WT ou TG nas culturas tratadas com meio neuronal, não sendo possível, portanto a quantificação do número de células em neurodegeneração. A quantificação do perfil de células FJC positivas após o

5º dia de tratamento com o meio condicionado das CS de pacientes está demonstrada na figura 28.

Figura 28. Perfil de células Fluoro-Jade C positivas (FJC+) após o tratamento com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de pacientes. (A) Porcentagem de células FJC+ após o 5º dia de tratamento com o meio condicionado das CS de pacientes com ELA (PELA; n=7) e de pacientes controles (PCT; n=3). As médias estão expressas em porcentagem dos neurônios motores FJC+ em relação a quantidade total de núcleos marcados pelo DAPI. (B) Quantificações individuais dos PELA e PCT. # $p < 0,05$ teste t de Student. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo ou por paciente.

4.3.10. Experimentos controles pelo método do *In Cell WB*

Avaliação da influência do meio condicionado das CS e dos fibroblastos na sobrevivência dos NM da medula espinal, neurônios GABAérgicos do hipocampo e neurônios do GRD pelo método do In Cell WB

O tratamento dos NM com o meio condicionado dos fibroblastos (Figura 29D) do nervo dos camundongos WT ou TG demonstrou aumento de 3,4% ($p<0,05$) e 11,3% ($p<0,05$), respectivamente, na sobrevida dos NM ChAT positivos em relação ao grupo tratado com meio neuronal após a quantificação pelo *In Cell WB* (Figura 29A). O mesmo não foi verificado em relação à sobrevida dos NM tratados com o meio condicionado dos fibroblastos da pele dos pacientes.

O tratamento dos neurônios GABAérgicos (Figura 29B) do hipocampo e dos neurônios do GRD (Figura 29C) com o meio condicionado das culturas de CS dos camundongos ou dos pacientes não promoveu diferença na sobrevida em relação aos seus respectivos grupos controles após a quantificação pelo método do *In Cell WB* (Figura 29A).

Figura 29. Influência do meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) e dos fibroblastos na sobrevida de tipos neuronais pelo método do *In Cell WB*.

(A) Quantificação da sobrevida dos neurônios GABAérgicos hipocámpais e dos neurônios do GRD após o tratamento com o MC das CS de camundongos ou de pacientes. O gráfico mostra também a quantificação da sobrevida dos NM após o tratamento com o MC dos fibroblastos do nervo de camundongos ou da pele de pacientes. Os resultados da quantificação são valores arbitrários fornecidos pelo equipamento de *In Cell WB*. # $p<0,05$, teste *t* de Student. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo. Fotomicrografias

mostrando a morfologia dos neurônios GABAérgicos do hipocampo (anticorpo GAD), do GRD (anticorpo MAP-2) e fibroblastos (anticorpo THY-1) utilizados nos experimentos. Barras: 25 μ m.

Avaliação da influência do meio condicionado das CS na sobrevivência dos NM pelo método do In Cell WB (curva dose-resposta)

A quantificação da sobrevivência dos NM pelo método do *In Cell WB* mostrou diminuição de 19,25% ($p<0,01$), 17,5% ($p<0,05$) e 18% ($p<0,05$) no número de células ChAT positivas após o tratamento com 20%, 40% e 80% do meio condicionado das CS de camundongos TG, respectivamente, em comparação com o meio condicionado dos camundongos WT (Figura 30), além das diferenças apontadas nos parâmetros: genótipos ($p<0,001$), dose ($p<0,001$) e interação entre os fatores ($p<0,05$).

A metade da concentração máxima efetiva (EC_{50}) determinada a partir da curva dose-resposta ocorreu nas doses de 8,36% ($\log EC_{50}=0.92$) e 9.32% ($\log EC_{50}=0.96$) para os meios condicionados das CS TG e WT, respectivamente.

Figura 30. Sobrevivência dos neurônios motores avaliada pelo método do *In Cell WB* após o tratamento com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de camundongos. Curva dose-resposta dos NM marcados com o anticorpo para colina acetiltransferase (ChAT) depois do tratamento com diferentes doses do MC das culturas de CS dos camundongos transgênicos (TG) e *wild-type* (WT) trocados a cada dia durante 5 dias. Os resultados das quantificações são valores arbitrários fornecidos pelo equipamento de *In Cell WB*. As quantidades de MC trocadas por dia estão expressas em escala logarítmica. ** $p<0,01$, * $p<0,05$, two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao

menos três replicatas por dose. NM marcados pelo ChAT estão mostrados nos poços depois do tratamento com diferentes doses do MC das CS.

A quantificação dos NM ChAT positivos mostrou diminuição de 7,8% ($p<0,05$) e 12,8% ($p<0,05$) após o tratamento com 20% e 40% do meio condicionado das CS de PELA, respectivamente, em comparação com o tratamento pelo meio condicionado das CS de PCT (Figura 31), além das diferenças apontadas nos parâmetros: fenótipo ($p<0,05$) e dose ($p<0,05$).

A metade da concentração máxima efetiva (EC_{50}) determinada a partir da curva dose-resposta ocorreu nas doses de 30,93% ($\log EC_{50}=1.49$) e 73.45% ($\log EC_{50}=1.86$) para os meios condicionados das CS de pacientes com ELA e controles, respectivamente.

Figura 31. Sobrevida dos neurônios motores avaliada pelo método do *In Cell WB* após o tratamento com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS) de pacientes. Curva dose-resposta dos NM marcados com o anticorpo para colina acetiltransferase (ChAT) depois do tratamento com diferentes doses do MC das culturas de CS dos pacientes com ELA (PELA) e controles (PCT) trocados a cada dia durante 5 dias. Os resultados das quantificações são valores arbitrários fornecidos pelo equipamento de *In Cell WB*. As quantidades de MC trocadas por dia estão expressas em escala logarítmica. * $p<0,05$, two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por dose. NM marcados pelo ChAT estão mostrados nos poços depois do tratamento com diferentes doses do MC das CS.

4.3.11. Experimentos controles para detecção de apoptose

Avaliação da apoptose pela marcação de poli-caspases após tratamento com o meio condicionado das CS

A quantificação dos NM em apoptose pela ativação de caspases (FLICA+) mostrou aumento de 58% ($p<0,05$) e 123% ($p<0,001$) no número de células FLICA+ após o tratamento com o meio condicionado das culturas de CS de camundongos TG e de pacientes com ELA, respectivamente, em relação aos seus grupos controles (Figura 32A). O perfil apoptótico dos NM FLICA positivos após o tratamento com o meio condicionado das culturas de CS de pacientes com ELA e a identificação pelo ChAT estão apresentadas na figura 32B e C, respectivamente.

Figura 32. Perfil dos neurônios motores em apoptose pela marcação de poli-caspases após o tratamento com o meio condicionado (MC) das células de Schwann (CS).

(A) Quantificação NM em apoptose pela ativação de caspases (FLICA+) após o tratamento com o MC das culturas de CS de pacientes controles (PCT) e com ELA (PELA). Os valores estão expressos em porcentagem do total de células. # $p<0,05$, ## $p<0,01$ teste t de Student. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo. Perfil dos NM FLICA+ (B) após o tratamento com o meio condicionado das culturas de CS de PELA e marcados com anticorpo específico colina acetiltransferase (ChAT; C). Barras: 25 μ m.

Avaliação da apoptose na co-cultura pela marcação do TUNEL

A quantificação dos NM em apoptose pela marcação do TUNEL mostrou aumento de 90% ($p<0,001$) no número de células TUNEL positivas após dois dias em

co-cultura com as CS dos pacientes ELA em relação aos NM co-cultivados com as CS dos pacientes controles (Figura 33A).

O perfil apoptótico dos NM evidenciado pela marcação TUNEL DAB após dois dias de co-cultura com as CS de pacientes com ELA pode ser verificado na figura 33B. Após cinco dias de co-cultura com as CS de pacientes ELA, maior densidade de NM em apoptose pode ser verificada após a marcação com TUNEL fluorescente (Figura 33C). A marcação com TUNEL fluorescente apresenta padrão nuclear na cor verde e os núcleos não apoptóticos apresentam marcação pelo DAPI, em azul.

Figura 33. Perfil dos neurônios motores em apoptose pela marcação do TUNEL após co-cultura com as células de Schwann (CS) de pacientes. (A) Quantificação da fragmentação do DNA evidenciada pela porcentagem de células DAB TUNEL positivas após dois dias de co-cultura entre NM e CS de pacientes com ELA (PELA) ou controles (PCT). Os valores são expressos em porcentagem do total de células. ### $p < 0,001$ teste t de Student. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo. Fotomicrografias representativas da marcação pelo TUNEL DAB (B; utilizada na quantificação) e NM positivos para TUNEL fluorescente (confirmados por imureatividade do ChAT; não apresentados). Os núcleos não apoptóticos estão marcados com o DAPI (4', 6'-diamino-2-fenilindol; em azul). Barras: 25 μ m.

4.4. Experimento 3 - ELISA do meio condicionado das culturas de CS

A quantificação dos fatores neurotróficos NGF, GDNF e BDNF a partir do meio condicionado das culturas de CS dos camundongos e do NT-3, VEGFA e IGF-1 a partir do meio condicionado das culturas de CS dos pacientes foi realizada através da técnica de ELISA por meio de kits comerciais específicos.

As análises mostraram diminuição de 77% ($p<0,05$) e 78% ($p<0,05$) nos níveis de NGF e GDNF, respectivamente, no meio condicionado das culturas de CS TG em comparação com as CS WT (Figura 34A,B). Os níveis de NT-3 e VEGFA mostraram diminuição de 14% ($p<0,05$) e 33% ($p<0,01$) no meio condicionado das culturas de CS de pacientes com ELA em comparação com as CS de pacientes controles (Figura 34D,E). Os níveis de BDNF e IGF-1 quantificados no meio condicionado das culturas de camundongos TG e de pacientes com ELA, respectivamente, não apresentaram diferença em relação aos seus grupos controles (Figura 34C,F).

Figura 34. Fatores neurotróficos no meio condicionado das culturas de células de Schwann (CS). Quantificação do NGF (A; *Nerve growth factor*), GDNF (B; *Glial derived neurotrophic factor*) e BDNF (C; *Brain derived neurotrophic factor*) no meio condicionado das culturas de células de Schwann (CS) de camundongos *wild-type* (WT) e transgênicos (TG). Quantificação do NT-3 (D; *Neurotrophin-3*), VEGFA (E; *Vascular endothelial growth factor A*) e IGF-1 (F; *Insulin growth factor-1*) no meio condicionado das culturas de CS de pacientes com ELA (PELA) e controles (PCT). Os valores são expressos em pg/ml. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ teste *t* de Student. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas ou três pacientes por grupo.

4.5. Experimento 4 - Avaliação da expressão gênica das moléculas candidatas pela técnica do qPCR

Os experimentos de *microarray* realizados no nosso laboratório permitiram a eleição de moléculas para serem avaliadas pelo qPCR nas culturas das CS dos camundongos TG e no nervo periférico dos pacientes com ELA.

O qPCR das culturas de CS dos camundongos TG na fase pré-sintomática da ELA mostrou a expressão aumentada de sete transcritos, *Col3a1* (*Fold*=5,35; $p<0,001$; Figura 35A), *Csf1* (*Fold*=1,08; $p<0,01$; Figura 35B), *Lpl* (*Fold*=20,02; $p<0,01$; Figura 35C), *Mmp3* (*Fold*=13,55; $p<0,01$; Figura 35D), *Osmr* (*Fold*=4,47; $p<0,001$; Figura 35E), *Plac8* (*Fold*=8,27; $p<0,01$; Figura 35F) e *Vcam1* (*Fold*=9,72; $p<0,01$; Figura 35G) e a expressão diminuída de cinco genes *Aldh1a2* (*Fold*=-3,30; $p<0,01$; Figura 35H), *Ncam1* (*Fold*=-2,42; $p<0,01$; Figura 35I), *Ntng1* (*Fold*=-1,73; $p<0,05$; Figura 35J), *Rela* (*Fold*=-1,36; $p<0,01$; Figura 35K) e *Tgfa* (*Fold*=-7,00; $p<0,05$; Figura 35L) em comparação com os animais WT.

Figura 35. Resultados dos experimentos de qPCR, em Fold relativo, dos transcritos avaliados nas culturas de células de Schwann (CS) dos camundongos. Foram avaliados doze genes nas culturas de CS de camundongos transgênicos (TG) na fase pré-sintomática e seus controles, *wild-type* (WT). Os valores estão expressos em mudança na expressão gênica em relação ao grupo controle (*Relative Fold-change*). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ teste *t* de Student. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de ao menos três replicatas por grupo.

O qPCR do nervo dos pacientes com ELA mostrou a expressão aumentada de quatro transcritos, *FAS* (*Fold*=1,73; $p<0,05$; Figura 36A), *HLA-A* (*Fold*=2,19; $p<0,05$; Figura 36B), *PDGFB* (*Fold*=2,14; $p<0,05$; Figura 36C), *PDGFRB* (*Fold*=2,03; $p<0,05$; Figura 36D) e a expressão diminuída de cinco genes *CSF3* (*Fold*=-3,12; $p<0,01$; Figura 36E), *EGR1* (*Fold*=-13; $p<0,001$; Figura 36F), *EGR3* (*Fold*=-27,8; $p<0,001$; Figura 36G), *FOS* (*Fold*=-9; $p<0,01$; Figura 36H) e *JUN* (*Fold*=-3,64; $p<0,01$; Figura 36I) em comparação com os pacientes controles.

Figura 36. Resultados dos experimentos de qPCR, em Fold relativo, dos transcritos avaliados no nervo extensor curto do hálux de pacientes com ELA. Foram avaliados nove genes no nervo periférico de pacientes com ELA (PELA) e pacientes controles (PCT). Os valores estão expressos em mudança na expressão gênica em relação ao grupo controle (*Relative Fold-change*). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ teste *t* de Student. Os valores representam a média ± S.E.M. de ao menos três pacientes por grupo.

5. DISCUSSÃO

Atualmente a ELA vem sendo reconhecida como axonopatia distal (Moloney et al., 2014) em virtude de uma série de evidências mostrando que alterações moleculares precoces nas JNM desencadeiam e influenciam na morte dos NM (Frey et al., 2000; Fischer et al., 2004; Dupuis e Loeffler, 2009; Liu et al., 2013a). Evidências de ativação precoce (Keller et al., 2009), aumento da imunoreatividade da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase (do inglês, *inducible nitric oxide synthase* - iNOS) (Chen et al., 2010) e anormalidades na homeostase do cálcio associada com a perda da proteínas S100 β (Liu et al., 2013a) nas CS tanto do modelo animal (Keller et al., 2009; Chen et al., 2010) quanto de pacientes com ELA (Liu et al., 2013a) sugerem a participação dessa célula glial na fisiopatologia da doença. No entanto, a literatura carece de evidências diretas da participação da CS na morte dos NM na ELA e os mecanismos envolvidos não estão elucidados.

O presente estudo demonstrou de forma pioneira a influência negativa das CS do modelo experimental na fase pré-sintomática e do paciente com evolução recente da ELA esporádica na sobrevida e no tamanho dos prolongamentos dos NM *in vitro*. Essa conclusão foi obtida a partir de experimentos utilizando sistemas de co-cultura e tratamento dos NM com o meio condicionado das CS. A dosagem de moléculas no meio condicionado das culturas revelou falência neurotrófica nas CS ELA, e a análise pelo qPCR mostrou diversas alterações moleculares nas CS dos camundongos e no nervo periférico dos pacientes com ELA.

Este estudo se iniciou com a avaliação do comportamento motor do camundongo TG SOD1^{G93A} com o objetivo de caracterizar a colônia e mostrar que os animais se comportam da mesma forma que os equivalentes já descritos na literatura (Gurney, 1994). No estudo foram realizados diversos testes para verificar a condição geral, a força e a coordenação motora dos animais TG e WT a partir três semanas de vida. O estudo culminou com a publicação em revista internacional (Alves et al., 2011; em anexo) na qual nós descrevemos, além das anormalidades motoras precoces, aumento da latência e diminuição na velocidade de condução do nervo já aos 20 dias de vida. Esses resultados nos levaram a questionar se as alterações eletrofisiológicas no nervo estariam associadas com anormalidades morfofuncionais no sistema nervoso periférico ocorrendo antes mesmo da morte dos NM. De fato, já fora demonstrado anteriormente que a doença é iniciada simultaneamente na medula espinal e nos nervos periféricos dos camundongos TG SOD1^{G93A}, ao redor de 25 a 30 dias de idade (Keller et al., 2009). Esse achado questiona, mas não esclarece se as anormalidades verificadas no nervo

estão associadas com alterações intrínsecas dos NM na fase pré-sintomática ou pode envolver a influência não autônoma das CS ELA.

Com o objetivo de elucidar a influência das células gliais sobre os NM, nosso grupo desenvolveu sistemas *in vitro* que permitem essa investigação. Nessa tese nós desenvolvemos e aperfeiçoamos as culturas de CS a partir do nervo ciático do camundongo e do nervo periférico dos pacientes. Particularmente o processo de purificação, considerado extremamente importante, pois a contaminação por fibroblastos possui efeito inibitório para o crescimento das CS e cria viés nos resultados dos experimentos *in vitro*. Nesse estudo nós padronizamos a utilização do anticorpo THY-1.2 associado ao sistema complemento para lisar os fibroblastos contaminantes (White et al., 1983; Dong et al., 1999) e da laminina como substrato para o crescimento das CS, pois essa molécula inibe o crescimento de fibroblastos em culturas de CS humanas (Casella et al., 1996). Com tais modificações nos protocolos nós obtivemos culturas ultrapuras de CS para os experimentos que viriam a seguir.

Outro aspecto analisado por essa tese foi o desenvolvimento das culturas de CS, nas quais verificamos a expansão das células por no máximo 18 dias *in vitro* (P2-P3) seguido por limitado crescimento ao longo das semanas seguintes, até o momento em que as células entraram em período quiescente e não mais se dividiram. Conforme afirma Honkanen e colaboradores (2007), as CS dos camundongos parecem estar sujeitas a um limite de crescimento máximo de 3 semanas, sendo que após este período as células entram em estado quiescente que só acaba quando as mesmas são colocadas na presença de neurônios. Além disso, nós não observamos quaisquer diferenças morfológicas ou na taxa de crescimento das CS dos animais TG ou dos pacientes com ELA em relação aos seus controles.

Nesse estudo nós também aperfeiçoamos e estudamos as culturas de NM da medula espinal de camundongos neonatos. Em linha com os protocolos presentes na literatura que mostram sobrevivência máxima dos NM neonatos de até sete dias *in vitro* (Bataille et al., 1998; Haastert et al., 2005), nosso estudo verificou alta porcentagem de células em neurodegeneração após cinco dias em cultura na presença de meio neuronal, seguida de células em suspensão e proliferação glial no sexto dia. O mesmo resultado não foi observado quando os NM foram co-cultivados ou tratados com o meio condicionado das CS do modelo animal e dos pacientes, independentemente de serem saudáveis ou acometidos pela doença. A maior sobrevida dos NM na presença das CS ou de seu meio condicionado corrobora a importância dessa célula glial para a fisiologia

do NM, uma vez que as CS oferecem suporte trófico robusto (Arce et al., 1998) e permitem interações célula a célula durante o crescimento dos prolongamentos neuronais (Jessen e Mirsky, 1998).

Outros dois aspectos importantes das culturas de NM são o estágio de obtenção das células a partir da medula espinal do camundongo e o grau de pureza das culturas. Diversos protocolos presentes na literatura utilizam culturas neuronais obtidas de animais em estágio embrionário, mas não reportam o grau de pureza (Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007). A utilização dos animais neonatos de um dia já havia sido estabelecida no nosso laboratório e foi um grande avanço para o estudo da ELA *in vitro*. Esse mesmo protocolo foi utilizado nessa tese e nos possibilitou culturas com mais de 80% de pureza, valor considerado alto por se tratar de cultura primária de células neuronais. Em estudo utilizando NM de ratos em estágio embrionário, os autores reportaram grau de pureza de 70% com protocolo de purificação bastante semelhante ao nosso (Haastert et al., 2005).

Os experimentos *in vitro* realizados para investigar a influência das CS sobre os NM foram a co-cultura NM/CS e o tratamento das culturas de NM com o meio condicionado das CS. Ambos os experimentos foram realizados com as CS do modelo experimental (ELA familiar) e com as CS dos pacientes (ELA esporádica).

Nos dois experimentos, apesar do efeito protetor verificado pelas CS de ambos os genótipos (WT ou TG) ou fenótipos (pacientes controle ou com ELA esporádica), as CS do animal TG ou dos pacientes com ELA mostraram menor proteção aos NM quando co-cultivados ou tratados com o meio condicionado dos seus respectivos controles. Esse fenômeno foi evidenciado tanto pelo maior número de células em neurodegeneração quanto pelo menor tamanho dos prolongamentos neuronais quando em contato com as CS ELA ou com seu meio condicionado.

Interessante notar nas co-culturas que as CS dos pacientes com ELA esporádica se mostraram menos propensas em promover neuroproteção, uma vez que até mesmo os NM WT ficaram mais susceptíveis à neurodegeneração quando em contato com essas células. No modelo animal, somente os NM TG apresentaram maior neurodegeneração quando em contato com as CS TG. É possível que a fase pré-sintomática na qual esses animais se encontram seja um dos fatores para que o prejuízo das CS aos NM seja menor, pois os pacientes com evolução recente da ELA já apresentam sintomas e sua função celular pode estar mais comprometida.

De fato, a incapacidade do meio condicionado das CS com ELA promover a proteção dos NM nos sugeriu a possível falha nos mecanismos de neuroproteção, hipótese que tem sido proposta fazer parte da fisiopatologia da ELA (Festoff, 1996; Walling, 1999; McGeer e McGeer, 2005; Abe, 2007). Essa influência poderia acarretar tanto na morte do NM quanto na sua incapacidade de promover a reinervação. Evidências já demonstraram que as CS participam ativamente do guiamento dos axônios em regeneração para as células musculares (Son et al., 1996; Love e Thompson, 1999) e secretam sinais solúveis que promovem a sinaptogênese (Esper e Loeb, 2004). Além disso, o meio condicionado das CS é fundamental para promover a inervação de miócitos humanos *in vitro* (Guettier-Sigrist et al., 2000; Esper e Loeb, 2004). Qualquer falha nesse processo deixaria o NM susceptível à neurodegeneração, conforme estávamos vendo nos nossos resultados.

Apesar de não proposto inicialmente para esse projeto, nós realizamos uma série de experimentos controles utilizando outras metodologias para reproduzir os resultados e obter mais informações a respeito do fenômeno descoberto nos experimentos de co-cultura e de tratamento com o meio condicionado.

Ainda que os nossos dados implicassem as CS no processo de neurodegeneração do NM na ELA, eles não pressupunham a possibilidade de outro tipo celular do sistema nervoso periférico também influenciar esse processo. De fato, tal como se sabe para as células do sistema nervoso central (SNC), o fenótipo da ELA pode ser retardado pela diminuição da expressão da SOD1 mutada seletivamente nos NM, astrócitos ou microglia (Boillee et al., 2006; Yamanaka et al., 2008a; Wang et al., 2011), indicando que múltiplos tipos celulares estão envolvidos na neurodegeneração. No entanto, nossos experimentos controles não mostraram comprometimento dos fibroblastos ELA no processo de morte do NM, a despeito do efeito trófico promovido pelos fibroblastos do nervo dos camundongos (de ambos os genótipos) na sobrevivência dos NM.

Nossos achados até aquele momento estavam destacando a influência negativa específica das CS ELA na sobrevivência e no crescimento dos prolongamentos neuronais, mas não tínhamos indicativos de que o efeito era específico aos NM. A utilização de outros tipos neuronais mostrou que os NM são os únicos a sucumbirem pela influência negativa do meio condicionado das CS ELA, ou seja, o meio condicionado dessas células não afetou a sobrevivência dos neurônios hipocámpais e dos neurônios do GRD. A mesma seletividade já fora reportada para a toxicidade astrocitária na ELA (Nagai et al., 2007).

Uma vez confirmada a influência seletiva das CS ELA aos NM, duas questões ainda permaneciam em aberto, o tipo de morte do NM *in vitro* e como a CS contribuíam para a neurodegeneração desses neurônios. A primeira questão foi respondida após a detecção do aumento da ativação de poli-caspases nas culturas de NM tratadas com o meio condicionado das CS ELA, seguida pelo massivo número de células TUNEL positivas nas co-culturas NM e CS dos pacientes ELA. Portanto, a presença das CS ELA ou de seu meio condicionado desencadeia a ativação de vias apoptóticas, o que por sua vez desencadeia a neurodegeneração. De fato existem evidências a favor e contra a apoptose como mecanismo de morte celular na ELA. Dentro do primeiro grupo, se encontram as evidências mais antigas e relativamente bem estabelecidas de alterações nos níveis de Bcl-2 (Kostic et al., 1997; Martin, 1999), aumento na expressão/ativação das caspases-1 e -3 (Martin, 1999; Li et al., 2000) além de alterações morfológicas celulares remanescentes do processo apoptótico (Migheli et al., 1994; Ekegren et al., 1999). No entanto, evidência recente sugere processo mais complexo de morte celular na ELA conhecido como necroptose (Re et al., 2014), uma forma de necrose programada independente de caspases e que envolve proteínas com domínio quinase específico (Ofengeim e Yuan, 2013). Esse tipo de morte celular foi induzida por astrócitos co-cultivados com NM, e em comparação com o nosso estudo, sugere que diferentes tipos celulares podem ter diferentes repercussões no processo de neurodegeneração do NM na ELA.

A segunda questão começou a ser respondida após os experimentos controles de curva “dose-resposta”. Aspecto importante destacado pelos experimentos controles foi que embora os NM não sobrevivessem somente na presença do meio condicionado das CS, a suplementação diária com 20-40% de meio condicionado das CS saudáveis foi suficiente para promover a maior sobrevivência dos NM. O tratamento com as mesmas doses do meio condicionado das CS ELA foi incapaz de promover efeito semelhante. Esses experimentos deixaram claro que a deficiência de fatores neuroprotetores no meio condicionado das culturas de CS ELA poderia ser a responsável pela neurodegeneração dos NM *in vitro*.

As CS exercem papel fundamental na manutenção do sistema nervoso periférico através da produção e secreção de diversos fatores que promovem a sobrevivência e o trofismo neuronal. Os diversos fatores neurotróficos secretados pelas CS atuam de forma parácrina e/ou autócrina e são geralmente expressos em níveis basais, mas podem aumentar ou diminuir consideravelmente de acordo com o estágio do desenvolvimento

ou mediante alterações patológicas no sistema nervoso (Gupta et al., 2005; Bhatheja e Field, 2006). O comprometimento da sinalização trófica pelas CS é indicado como o responsável pela desestabilização axonal nos processos de neurodegeneração periférica (Friedman et al., 1996; Haney et al., 1999; Gatzinsky et al., 2003; Nobbio et al., 2009).

Considerando a ampla gama de fatores neurotróficos que atuam na célula neuronal, o complexo balanço entre essas moléculas é o que determina se a célula vai sobreviver ou morrer em virtude de uma série de sinalizações intracelulares (Poser et al., 2003). Nos modelos *in vitro*, uma vez que os fatores neurotróficos são liberados no meio de cultura pelas CS, não é de se surpreender que os NM apresentem maior sobrevivência quando em contato com essas substâncias. Baseando-se nos resultados dos experimentos funcionais descritos acima, nas análises de *microarray* das culturas de CS e do nervo de camundongos e de pacientes realizados pelo nosso laboratório, bem como nos estudos da biologia das CS descritos na literatura, nós quantificamos os níveis de NGF, GDNF e BDNF (Funakoshi et al., 1993; Bolin e Shooter, 1994; Wetmore e Olson, 1995) nos meios condicionados das culturas de CS de camundongos e VEGFA, NT-3 e IGF-1 (Gupta et al., 2005; Feng e Von Bartheld, 2010) nos meios condicionados das culturas de CS de pacientes.

Os fatores NGF, GDNF, VEGFA e NT-3 se mostraram diminuídos nas culturas das CS ELA em comparação com seus respectivos controles. O NGF foi a primeira neurotrofina descoberta e caracterizada com papel anti-apoptótico durante o desenvolvimento neuronal (Colafrancesco e Villoslada, 2011), agindo também nos neurônios maduros e em processos de lesão ou degeneração (Tuszynski e Gage, 1995; Lykissas et al., 2007). No contexto da ELA, o NGF secretado pelos astrócitos reativos se liga ao receptor de neurotrofina p75 [p75(NTR)] e induz a morte dos NM por mecanismo envolvendo a formação de peróxinitrito (Pehar et al., 2004). Essa função antagônica se deve a um mecanismo específico dos receptores, pois a ligação do NGF ao seu receptor de alta afinidade Trk (do inglês, *Tyrosine kinase receptor*) ativa vias anti-apoptóticas através do fator de transcrição CREB ao mesmo tempo em que promove a supressão do fator pró-apoptótico c-Jun (Sanes e Kotak, 2011).

O GDNF foi primeiramente identificado como fator trófico dos neurônios dopaminérgicos no sobrenadante das culturas de linhagens gliais (Lin et al., 1993). A molécula é altamente expressa pelas CS e pelo músculo esquelético durante a morte celular programada dos NM e após processos de injúria no nervo (Henderson et al., 1994; Hammarberg et al., 1996). Na ELA, a superexpressão do GDNF no músculo

mantém as JNM inervadas e consequentemente a progressão da doença é estendida (Mohajeri et al., 1999; Li et al., 2007; Suzuki et al., 2008). A diminuição do GDNF no meio condicionado das CS ELA se não é o mecanismo causal da neurodegeneração, pode representar a deficiência das CS em responder ao processo de injúria neuronal e contribuir para o comprometimento da JNM e com a progressão da doença.

O VEGFA é uma das moléculas recentemente associadas com as doenças do NM. Pacientes com atrofia muscular espinhal ou com ELA apresentam níveis diminuídos de VEGFA (Sopher et al., 2004). Camundongos deficientes para o elemento de resposta a hipóxia (do inglês, *Hypoxia response element* - HRE) dentro da região promotora do gene do VEGFA desenvolvem doença do NM (Oosthuyse et al., 2001). Evidências demonstram que a molécula protege os NM do processo de excitotoxicidade (Brunet et al., 2007; Tolosa et al., 2008) quando administrada antes do início dos sintomas (Azzouz et al., 2004; Storkebaum et al., 2005). Além disso, os receptores de VEGFA estão expressos nos NM e o tratamento com o agonista prolonga a vida dos NM *in vitro* (Van Den Bosch et al., 2004). Portanto, a diminuição do VEGFA no meio condicionado das CS dos pacientes com ELA esporádica sugere a incapacidade das CS em prevenir a toxicidade que surge a partir do processo neurodegenerativo antes do início dos sintomas e ocasiona a morte do NM.

O NT-3 e seu receptor de alta afinidade TrkC são necessários para a sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento embrionário (Ernfors et al., 1994; Farinas et al., 1994; Klein, 1994). Interessante, camundongos *knockout* para NT-3 perdem a inervação muscular após o nascimento e desenvolvem neuropatia motora (Woolley et al., 2005). Esse fenótipo está associado com o requerimento do NT-3 para a sobrevivência das CS pós-natais (Woolley et al., 2008), o que reflete na sobrevivência dos NM (Riethmacher et al., 1997) e manutenção da inervação das JNM (Reddy et al., 2003). Os níveis diminuídos de NT-3 no meio condicionado das CS dos pacientes ELA sugerem que alterações na sinalização desse fator neurotrófico estão associadas com os mecanismos não autônomos da degeneração dos NM na ELA.

Nosso estudo não encontrou diferenças nos níveis de IGF-1 e BDNF nos meios condicionados das culturas de CS ELA em relação aos seus controles. Embora o IGF-1 induza inervação muscular e acelere a regeneração dos NM após a axotomia (Caroni e Grandes, 1990; Rabinovsky et al., 2003), seus níveis no sangue ou na medula espinhal de pacientes com ELA foram normais (Braunstein e Reviczky, 1987). No entanto, alterações na dinâmica dos seus receptores já foram observadas na medula de pacientes

com ELA e do modelo animal (Adem et al., 1994a; Adem et al., 1994b; Chung et al., 2003; Dagvajantsan et al., 2008) e podem explicar a implicação do IGF-1 na patologia da ELA.

Em contraste com outros fatores neurotróficos, o BDNF não se mostrou protetor aos NM sujeitos à excitotoxicidade *in vitro* (Fryer et al., 2000) e *in vivo* (Tovar-y-Romo e Tapia, 2012). Surpreendentemente, o BDNF representou fator de risco para os NM por aumentar a sensibilidade à excitotoxicidade (Fryer et al., 2000) e ativar a NADPH oxidase (Kim et al., 2002), enzima que pode prejudicar as vias de sobrevivência ativadas por fatores neurotróficos. Portanto, apesar de proteger os neurônios da degeneração nos modelos de neuropatia motora (Ikeda et al., 1995; Haase et al., 1997), o BDNF parece não estar envolvido nos mecanismos não autônomos de neurodegeneração promovido pelas CS aos NM.

Nossos resultados *in vitro* sugerem a falência trófica das CS durante a fase pré-sintomática da ELA colaborando para a destruição das JNM *in vivo* e consequentemente a morte dos NM. A importância do suporte trófico periférico na ELA foi corroborada pela melhora da capacidade motora dos animais transgênicos que receberam injeções intramusculares de fatores neurotróficos ou de genes destes fatores (Lu et al., 2003; Kliem et al., 2011), os mesmos produzidos e secretados pelas CS. Interessante notar que esses fatores foram detectados nos NM que projetam axônios para os músculos injetados, indicando o transporte desses fatores neurotróficos a despeito das já confirmadas alterações do transporte axonal retrógrado pelos axônios motores (Lu et al., 2003). A expressão reduzida de CNTF nas CS já fora observada nas neuropatias periféricas hereditárias com comprometimento desta célula glial (Friedman et al., 1996; Nobbio et al., 2009). Na ELA, a reduzida expressão de CNTF no nervo ciático de pacientes suporta que a deficiência na produção desse fator neurotrófico pelas CS é um importante mecanismo para o início e progressão da doença (Lee et al., 1996).

Uma vez elucidada a falência trófica das CS ELA, nós fomos investigar alterações na expressão gênica das CS e do nervo que pudessem esclarecer possíveis disfunções associadas contribuindo para o processo neurodegenerativo. De particular interesse no contexto da ELA, as alterações nos genes discutidos a seguir podem representar mecanismos chaves para o entendimento do papel das CS na patofisiologia da doença.

O *Lpl* codifica para a lipoproteína lipase envolvida no metabolismo lipídico, a qual é expressa também no coração, músculo e tecido adiposo. Variantes do gene *Lpl*

tem sido associados com elevados níveis da lipoproteína de alta densidade (do inglês, *High density lipoprotein* - HDL) no plasma (Lu et al., 2008). Apesar de ainda controverso o papel do HDL na ELA, a hiperlipidemia é considerada fator de sobrevida aos pacientes com ELA (Dupuis et al., 2008). Buscema e colaboradores (2012) mostraram que variantes do gene *Lpl* são fatores protetivos na ELA, o que em conjunção com nossos resultados de expressão aumentada do gene nas CS, pode representar a tentativa de proteção das CS aos NM.

Por outro lado, anormalidades no metabolismo lipídico nas CS podem ser tóxicas aos NM. Viader e colaboradores (2013) promoveram a ablação do fator de transcrição mitocondrial (do inglês, *Mitochondrial transcription factor A* - TFAM) especificamente nas CS de camundongos saudáveis e verificaram prejuízos ao DNA mitocondrial, danos à cadeia transportadora de elétrons e alteração na síntese lipídica. Experimentos de *microarray* do nervo ciático identificaram lipídios neurotóxicos que intermediaram a perda axonal.

O gene *Mmp3* codifica uma proteína da família das matrix metaloproteinases (MMP). Essas proteínas são efetoras na quebra da barreira hematoencefálica e promovem a invasão do tecido nervoso por leucócitos no SNC e periférico. As MMP têm sido implicadas na patologia da ELA e diversos estudos têm apontado seu papel no remodelamento sináptico, regeneração neuronal e remielinização (Renaud e Leppert, 2007). O fator de risco aumentado associado com as variantes do gene *Mmp3* na ELA (Buscema et al., 2012), os achados de clivagem de proteínas pela MMP3 contribuindo para a formação de agregados (Brower et al., 2013) e o aumento na expressão do gene nas CS ELA implicam sua participação nos mecanismos de neurodegeneração associados com as CS.

A proteína N-CAM1 é implicada no processo de reinervação sináptica após a denervação muscular (Rieger et al., 1988; Langenfeld-Oster et al., 1994; Sanes e Lichtman, 2001). Nesse processo, a N-CAM1 se acumula nos fibroblastos em proliferação dentro dos espaços intersticiais pós denervação para sinalizar e guiar o processo de reinervação. Gordon e colaboradores (2009) verificaram que a imunoreatividade da N-CAM1 nas membranas das fibras musculares é marcador de denervação precoce no modelo animal da ELA. Os níveis diminuídos do gene *Ncam1* nas CS ELA podem representar deficiência na reinervação das JNM e contribuir para a neurodegeneração. O mesmo processo pode estar relacionado com a diminuição na expressão do gene *Ntng1* que codifica para a proteína Netrina G1 nas CS ELA,

envolvida no guiamento axonal e na formação e manutenção das sinapses (Yin et al., 2002). O gene *Ntng1* já fora identificado como alvo de splicing alternativo nos casos de ELA associada com mutações no gene da FUS, mas sem detalhes a respeito da sua influência na patofisiologia da doença (Orozco e Edbauer, 2013).

A influência negativa das CS no processo de reinervação das JNM já é conhecida pela expressão aumentada do quimiorrepelente axonal Semaforina 3A (De Winter et al., 2006) pelas CS terminais e pela expressão alterada do co-receptor CD44, envolvido na sinalização neuregulina-ErbB3 em processos de denervação e reinervação da JNM no modelo animal na fase pré-sintomática da doença (Gorlewicz et al., 2009).

O gene *Rela* codifica para a proteína p65 da família do NF- κ B, fatores de transcrição sensíveis ao estresse celular. O NF- κ B funciona como regulador dos processos de morte ou sobrevivência dos neurônios mediante fatores externos (Ishige et al., 2005). Na ELA, a deregulação da TDP-43 induz a ativação de p65 e aumenta a vulnerabilidade dos NM (Swarup et al., 2011). No entanto, já foi mostrado que a ativação do p65 dependente de I κ B α protege os NM da excitotoxicidade glutamatérgica e consequente morte celular dependente de caspase 3 no modelo da ELA familiar (Pyo et al., 2010). Apesar do papel de p65 ainda ser controverso na ELA, a diminuição da expressão gênica de *Rela* nas CS é achado inédito e pode suportar o aumento da vulnerabilidade glial e deficiência no suporte parácrino aos NM na doença.

Outra alteração interessante foi o aumento na expressão do gene *Csf1* nas CS ELA que codifica para o fator macrofágico estimulador de colônia (do inglês, *Macrophage colony stimulating factor* - M-CSF), conhecido por promover a proteção e a sobrevivência de neurônios pós-injúria (Mitrassinovic et al., 2005; Majumdar et al., 2007). A tentativa de eliciar a resposta protetiva da microglia com o M-CSF acelerou a progressão da doença no modelo animal SOD1^{G37R} associada com redução da reinervação e aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias (Gowing et al., 2009). Essa é uma evidência de que além da falência neurotrófica, a deregulação na expressão de fatores neurotróficos pelas CS ELA pode induzir o comprometimento das JNM e a morte dos NM.

Os genes *Col3a1* codificante para colágeno alfa 1(III), *Osmr* codificante para o receptor M de oncostatina, *Plac8* codificante para a proteína específica de placenta 8, *Vcam1* codificante para a molécula de adesão da célula vascular 1, *Aldh1a2* codificante para aldeído desidrogenase 1 membro A2 e *Tgfa* codificante para o fator de crescimento transformante alfa, apresentaram *fold* elevado nas análises de microarray

mas não foram descritos no contexto da ELA e suas desregulações nas CS precisam ser investigadas.

A expressão gênica no nervo periférico apresenta a minoria dos transcritos relacionados ao axônio e a maioria proveniente das CS (Baraban et al., 2013; Malmqvist et al., 2014; Maximino et al., 2014), fazendo com que a análise molecular do nervo apresente um panorama geral da interação entre CS e NM no contexto da hipótese do *dying back* na patologia da ELA (Dadon-Nachum et al., 2011; de Oliveira et al., 2014).

O aumento na expressão do gene *HLA-A* no nervo periférico de pacientes resgata evidências de alterações imunológicas na ELA, consistente com desordem autoimune ou apenas consequência de outras alterações (Kawamata et al., 1992). De fato, mecanismo semelhante já fora proposto após a detecção de CS expressando o componente *HLA-DR* do MHC no nervo periférico de pacientes com ELA (Oliveira et al., 1994). Esses achados fortalecem as evidências do papel das CS na modulação imunológica através expressão de MHC, moléculas de adesão, citocinas e substâncias inflamatórias (Armati e Pollard, 1996), com implicação deletéria para o NM na ELA.

O gene *FAS* codifica a expressão da proteína homotrimérica transmembrana que sinaliza apoptose através do receptor FASR formando o complexo de sinalização indutor de morte (do inglês, *Death-inducing signaling complex* - DISC). A ligação culmina com a liberação da caspase-8 no citosol que por sua vez promove a quebra do DNA e induz o processo apoptótico (Cullen e Martin, 2009). Existem diversas evidências de ativação da via de sinalização FAS mediando a morte do NM na ELA (Lee et al., 2008; Gandelman et al., 2010; Bernard-Marissal et al., 2012; Haulcomb et al., 2014). O aumento na expressão do FAS no nervo de pacientes com ELA é indicativo de que processos de morte celular estão ocorrendo através da interação entre os axônios do NM com as CS.

Os genes codificantes para as proteínas JUN e FOS se apresentaram com expressão diminuída no nervo de pacientes ELA. JUN em combinação com FOS forma o fator de transcrição de resposta imediata AP-1, induzido por fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo, radiação UV e outras formas de anormalidades celulares (Wisdom, 1999; Wisdom et al., 1999). JUN e FOS são frequentemente induzidos em neurônios em degeneração. A presença de líquido cefalorraquidiano de pacientes com ELA estimula a expressão de FOS em populações específicas de neurônios espinhais via receptores de NMDA (Manabe et al., 1999). Ainda, níveis aumentados da proteína JUN foram encontrados na zona intermédia da

medula espinhal de pacientes com ELA (Jaarsma et al., 1996). Uma vez que a expressão de JUN e FOS estão associadas com a indução ou prevenção de morte neuronal (Estus et al., 1994; Herdegen et al., 1994) a expressão gênica diminuída das duas proteínas no nervo de pacientes pode ser explicada pela redução do número de células em virtude da degeneração ou pela incapacidade de elaborar resposta protetiva na presença de estímulos nocivos.

EGR1 e EGR3 também são fatores de transcrição de resposta imediata e já descritos no contexto da ELA (Butovsky et al., 2015). O *EGR3* está com expressão reduzida nos NM de pacientes ELA (Jiang et al., 2007) e no nervo dos pacientes do nosso estudo. Camundongos *EGR3 knockout* desenvolvem ataxia, escoliose, tremor de repouso e pitose palpebral em decorrência da degeneração dos fusos musculares mediada pela deregulação de NT-3 (Chen et al., 2002). Portanto, a expressiva diminuição da expressão gênica do *EGR3* nas nossas análises do nervo deve estar associada com a redução nos níveis de NT-3 no meio condicionado das culturas de CS, levando ao comprometimento dos mecanismos parácrinos de neuroproteção pelas CS e a consequente neurodegeneração.

O gene *CSF3* codifica para o fator granulocítico estimulador de colônias (do inglês, *Granulocyte-colony stimulating factor* - G-CSF), conhecido por sua função protetiva em diversos modelos de doenças neurodegenerativas (Nishio et al., 2007; Pitzer et al., 2010; Sanli et al., 2010) pois reduz a apoptose, promove a neurogênese/angiogênese e atua como fator anti-inflamatório (Lee et al., 2005; Schneider et al., 2005a; Schneider et al., 2005b; Kawada et al., 2006). No modelo animal da ELA o G-CSF diminuiu a inflamação no SNC e periférico, resgatou a integridade da JNM, aumentou a regeneração axonal e atrasou a progressão da doença (Henriques et al., 2011; Naumenko et al., 2011; Pollari et al., 2011). Em pacientes com ELA a administração de G-CSF provou ser segura e diminuiu o declínio da função motora (Zhang et al., 2009; Duning et al., 2011). A diminuição nos níveis de *CSF3* no nervo periférico de pacientes com ELA verificada nesta tese é mais uma evidência do envolvimento de um fator de crescimento no processo de denervação periférica, implicando em processos autócrinos e parácrinos aberrantes envolvendo as CS e os NM.

Os genes *PDGFB* codificante para o fator de crescimento beta derivado de plaquetas e o seu receptor codificado pelo gene *PDGFRB* apresentaram *folds* elevados nas análises de microarray, mas ainda não foram descritos no contexto da ELA e suas desregulações no nervo periférico precisam ser investigadas.

Importante destacar os resultados de outro subprojeto do nosso laboratório utilizando microarranjos de DNA dos nervos de pacientes com ELA que encontrou genes desregulados relacionados com a via de sinalização das MAP quinases, adesão focal, moléculas de adesão celular (do inglês, *Cell-adhesion molecules* - CAMs) e interação matrix extracelular-receptor (Chadi et al., 2015; em elaboração). Os genes pertencentes a estas vias se relacionam com a sinalização das integrinas, que são os principais receptores de superfície celular. As alterações na sinalização mediada pelas integrinas com a matriz extracelular estão associadas com as vias de fatores de crescimento, reorganização do citoesqueleto e respostas relacionadas com a sobrevivência celular (Delon e Brown, 2007). Nas CS as integrinas estão relacionadas com as interações CS/axônio, mielinização, sobrevivência e migração celular (Feltri et al., 2002).

A sinalização das integrinas está diretamente relacionada com os componentes do citoesqueleto e fatores de crescimento através do complexo PINCH/ILK (Tu et al., 1998; Li et al., 1999; Tu et al., 1999; Zhang et al., 2002; Fukuda et al., 2003; Velyvis et al., 2003). A influência negativa das CS na sobrevida dos NM *in vitro*, o comprometimento da sinalização trófica e as alterações moleculares nas CS ELA podem ser consequências diretas de alterações nessas vias de sinalização. De fato, estudos recentes de nossos colaboradores indicam que a via PINCH/ILK modela o IGF-1 a nível transcricional e quando componentes dessa via são deletados no camundongo adulto, a CS se torna dependente do axônio e não desenvolve mecanismos autócrinos de sobrevivência (Relvas et al., 2014; em submissão).

Portanto, a expressão de fatores neurotróficos pelas CS pode ser amplamente dependente da via PINCH/ILK, sendo que seus componentes podem ter funções transcricionais modulando tanto fatores neurotróficos quanto fatores de crescimento para a própria CS. A falência neurotrófica verificada nos experimentos desta tese e categorias de genes desregulados, como *growth factor binding* e *growth factor activity* encontradas nas análises de microarranjos de DNA das culturas de CS do modelo animal, sustentam a importância dessa via na manutenção da CS e sua potencial implicação na patogênese da ELA.

No contexto dos resultados dessa tese, alguns achados da literatura precisam ser mais bem interpretados para se entender o papel da CS na ELA. Turner e colaboradores (2009) verificaram que a expressão da SOD1^{G93A} restrita às CS não ocasionou paralisia ou a neuropatologia característica da doença no modelo animal. Esses achados são

compatíveis com as demonstrações de que a expressão da SOD1^{G86R} nos astrócitos também não desencadeou o fenótipo da ELA (Gong et al., 2000). Utilizando o modelo experimental SOD1^{G37R}, Lobsiger e colaboradores (2009) mostraram que a remoção da enzima mutada nas CS, ao contrário do que se esperava, acelerou a progressão da doença. Por sua vez, o nocaute da SOD1^{G85R} nas CS do modelo experimental, promoveu atraso no início da doença e aumento da sobrevivência do camundongo transgênico, indicando que a expressão dessa forma mutante da SOD1 nas CS é neurotóxica (Wang et al., 2012). Esses estudos demonstram que diferentes mutações na SOD1 influenciam a fisiologia das CS e o seu papel na fisiopatologia da ELA, fazendo com que sejam necessários mais estudos para elucidar mecanismos outros associados com a morte do NM pela glia periférica na ELA. No entanto, os resultados desta tese oferecem as evidências mais diretas para o entendimento dos fenômenos “não-autônomos” da degeneração dos NM associados com as CS na ELA familiar e esporádica, com grande potencial para intervenções terapêuticas.

6. CONCLUSÕES

1. Os experimentos de co-cultura NM/CS tanto do modelo animal quanto de pacientes mostraram efeito protetor das CS independentemente do genótipo/fenótipo aos NM *in vitro* quando comparados aos NM não co-cultivados. No entanto, maior neurodegeneração foi verificada na co-cultura das CS ELA em comparação com as CS dos controles saudáveis.
2. Os experimentos de tratamento dos NM com o meio condicionado das CS tanto do modelo animal quanto de pacientes com ELA mostraram efeito protetor do meio condicionado independentemente do genótipo/fenótipo quando comparados aos NM não tratados. No entanto, diminuição no crescimento dos prolongamentos neuronais e maior neurodegeneração foi verificada após o tratamento com o meio condicionado das CS ELA em relação aos dos controles saudáveis.
3. Os experimentos controles para a avaliação da sobrevivência neuronal pelo método do *In Cell* WB mostraram que a influência negativa das CS é específica aos NM e ocorre de forma dose-dependente após o tratamento com o meio condicionado das CS ELA.
4. Os experimentos controles para a detecção de apoptose apontaram aumento na ativação de poli-caspases nas culturas de NM tratadas com o meio condicionado das CS ELA, seguida pelo massivo número de células TUNEL positivas nas co-culturas NM/CS dos pacientes ELA, evidenciando que a natureza da morte neuronal induzida pelas CS na ELA é apoptótica.
5. Diminuição nos níveis de NGF e GDNF no meio condicionado das culturas de CS do modelo animal, bem como NT-3 e VEGFA no meio condicionado das culturas de CS dos pacientes indicam falência neurotrófica ocorrendo precocemente na fisiopatologia da ELA.
6. Alterações na expressão gênica das CS e do nervo periférico mostraram que disfunções na unidade CS/NM podem contribuir para o processo neurodegenerativo. De particular interesse, alterações em genes relacionados com o metabolismo lipídico, reinervação e guiamento axonal, modulação imunológica, apoptose e fatores de crescimento/neurotróficos oferecem alternativas pioneiras para o entendimento do papel das CS na fisiopatologia da ELA com grande potencial para intervenções terapêuticas.

7. ANEXOS

ANEXO A. Cópia do parecer de aprovação do projeto no Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CaPPesq.

APROVAÇÃO

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CaPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 30/03/2011, **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **0187/11**, intitulado: **"CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DA CÉLULA DE SCHWANN NO PROCESSO DE NEURODEGENERAÇÃO DE NEURÔNIO MOTOR NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA NO MODELO ANIMAL TRANSGÊNICO E NO NERVO PERIFÉRICO DE PACIENTES"**, apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este protocolo faz parte do projeto temático já aprovado pela CaPPesq – Protocolo de Pesquisa nº 0113/08.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CaPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. GERSON CHADI**

Pesquisadores Executantes: **CHRYSIAN JUNQUEIRA ALVES, RITA DE CÁSSIA M. SANTOS, TATIANA DUOBLES, DRA. ANGELINA MARIA MARTINS LINO, DRA. JÉSSICA RUIVO MAXIMINO**

CaPPesq, 30 de março de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador

**Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CaPPesq**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappel@hcfmusp.br

ANEXO B. *Cópia do parecer de aprovação pelo CAPPesq da inclusão de um membro no processo 0187/11.*

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0187/11

Título: "CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DA CÉLULA DE SCHWANN NO PROCESSO DE NEURODEGENERAÇÃO DO NEURÔNIO MOTOR NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA NO MODELO ANIMAL TRANSGÊNICO E NO NERVO PERIFÉRICO DE PACIENTES."

Pesquisador Responsável: Gerson Chadi

Pesquisador Executante: Chrystian Junqueira Alves

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: NEUROLOGIA

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** em 18/11/2011, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

- Carta datada de 04/10/2011 - Inclusão do pesquisador executante Dr. Frederico Mennucci de Haidar Jorge.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 18 de Novembro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe K. [Pathogenesis and therapeutic perspectives for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)]. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology*. 2007 Nov;47(11):790-4.

Adem A, Ekblom J, Gillberg PG, Jossan SS, Hoog A, Winblad B, Aquilonius SM, Wang LH, Sara V. Insulin-like growth factor-1 receptors in human spinal cord: changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm Gen Sect*. 1994;97(1):73-84.

Adem A, Ekblom J, Gillberg PG. Growth factor receptors in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol*. 1994 Aug-Dec;9(1-3):225-31.

Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, Chioza B, Andersson JL, Russ C, Shaw CE, Powell JF, Leigh PN. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 1999 Feb;8(2):157-64.

Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology*. 2001 Oct 9;57(7):1282-9.

Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*. 2011 Dec;70(6):913-9.

Alves CJ, de Santana LP, dos Santos AJ, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, Martins RS, Maximino JR, Chadi G. Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res*. 2011 Jun 7;1394:90-104.

Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nature reviews Neurology*. 2011 Nov;7(11):603-15.

Arce V, Pollock RA, Philippe JM, Pennica D, Henderson CE, deLapeyriere O. Synergistic effects of schwann- and muscle-derived factors on motoneuron survival involve GDNF and cardiotrophin-1 (CT-1). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998 Feb 15;18(4):1440-8.

Armati PJ, Mathey EK. An update on Schwann cell biology - Immunomodulation, neural regulation and other surprises. *Journal of the neurological sciences*. 2013 Oct 15;333(1-2):68-72.

Armati PJ, Pollard JD, Gatenby P. Rat and human Schwann cells in vitro can synthesize and express MHC molecules. *Muscle & nerve*. 1990 Feb;13(2):106-16.

Armati PJ, Pollard JD. Immunology of the Schwann cell. *Baillieres Clin Neurol*. 1996 Mar;5(1):47-64.

Atsumi T. The ultrastructure of intramuscular nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*. 1981;55(3):193-8.

Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature*. 2004 May 27;429(6990):413-7.

Baraban M, Anselme I, Schneider-Maunoury S, Giudicelli F. Zebrafish embryonic neurons transport messenger RNA to axons and growth cones in vivo. *The Journal of*

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2013 Oct 2;33(40):15726-34.

Bataille S, Portalier P, Coulon P, Ternaux JP. Influence of acetylcholinesterase on embryonic spinal rat motoneurons growth in culture: a quantitative morphometric study. *The European journal of neuroscience*. 1998 Feb;10(2):560-72.

Bernard-Marissal N, Moumen A, Sunyach C, Pellegrino C, Dudley K, Henderson CE, Raoul C, Pettmann B. Reduced calreticulin levels link endoplasmic reticulum stress and Fas-triggered cell death in motoneurons vulnerable to ALS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012 Apr 4;32(14):4901-12.

Bhatheja K, Field J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(12):1995-9.

Bjorklund U, Persson M, Ronnback L, Hansson E. Primary cultures from cerebral cortex and hippocampus enriched in glutamatergic and GABAergic neurons. *Neurochem Res*. 2010 Nov;35(11):1733-42.

Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*. 2006 Oct 5;52(1):39-59.

Bolin LM, Shooter EM. Characterization of a Schwann cell neurite-promoting activity that directs motoneuron axon outgrowth. *J Neurosci Res*. 1994 Jan;37(1):23-35.

Braunstein GD, Reviczky AL. Serum insulin-like growth factor-I levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1987 Jun;50(6):792-4.

Brockes JP, Fields KL, Raff MC. Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res*. 1979 Apr 6;165(1):105-18.

Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000 Dec;1(5):293-9.

Brower CS, Piatkov KI, Varshavsky A. Neurodegeneration-associated protein fragments as short-lived substrates of the N-end rule pathway. *Mol Cell*. 2013 Apr 25;50(2):161-71.

Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annual review of neuroscience*. 2004;27:723-49.

Brunet N, Tarabal O, Portero-Otin M, Oppenheim RW, Esquerda JE, Caldero J. Survival and death of mature avian motoneurons in organotypic slice culture: trophic requirements for survival and different types of degeneration. *The Journal of comparative neurology*. 2007 Apr 10;501(5):669-90.

Buscema M, Penco S, Grossi E. A Novel Mathematical Approach to Define the Genes/SNPs Conferring Risk or Protection in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis

Based on Auto Contractive Map Neural Networks and Graph Theory. *Neurology research international*. 2012;2012:478560.

Butovsky O, Jedrychowski MP, Cialic R, Krasemann S, Murugaiyan G, Fanek Z, Greco DJ, Wu PM, Doykan CE, Kiner O, et al. Targeting miR-155 restores abnormal microglia and attenuates disease in SOD1 mice. *Annals of neurology*. 2015 Jan;77(1):75-99.

Caroni P, Grandes P. Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated levels of insulin-like growth factors. *J Cell Biol*. 1990 Apr;110(4):1307-17.

Casella GT, Bunge RP, Wood PM. Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia*. 1996 Aug;17(4):327-38.

Chadi G, Moller A, Rosen L, Janson AM, Agnati LA, Goldstein M, Ogren SO, Pettersson RF, Fuxe K. Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP-lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. *Exp Brain Res*. 1993;97(1):145-58.

Cheah IK, Cheema SS, Langford SJ, Lopes EC, Macfarlane KJ, Petratos S, Turner BJ. Design and application of a peptide nucleic acid sequence targeting the p75 neurotrophin receptor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2003 Jul 21;13(14):2377-80.

Chen HH, Tourtellotte WG, Frank E. Muscle spindle-derived neurotrophin 3 regulates synaptic connectivity between muscle sensory and motor neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002 May 1;22(9):3512-9.

Chen K, Northington FJ, Martin LJ. Inducible nitric oxide synthase is present in motor neuron mitochondria and Schwann cells and contributes to disease mechanisms in ALS mice. *Brain structure & function*. 2010 Mar;214(2-3):219-34.

Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, Dierick I, Abel A, Kennerson ML, Rabin BA, et al. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet*. 2004 Jun;74(6):1128-35.

Chow CY, Landers JE, Bergren SK, Sapp PC, Grant AE, Jones JM, Everett L, Lenk GM, McKenna-Yasek DM, Weisman LS, et al. Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *Am J Hum Genet*. 2009 Jan;84(1):85-8.

Chung YH, Joo KM, Shin CM, Lee YJ, Shin DH, Lee KH, Cha CI. Immunohistochemical study on the distribution of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor in the central nervous system of SOD1(G93A) mutant transgenic mice. *Brain Res*. 2003 Dec 24;994(2):253-9.

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science*. 2003 Oct 3;302(5642):113-7.

Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature reviews Neuroscience*. 2001 Nov;2(11):806-19.

Colafrancesco V, Villoslada P. Targeting NGF pathway for developing neuroprotective therapies for multiple sclerosis and other neurological diseases. *Archives italiennes de biologie*. 2011 Jun;149(2):183-92.

Corcia P, Khoris J, Couratier P, Mayeux-Portas V, Bieth E, De Toffol B, Autret A, Muh JP, Andres C, Camu W. SMN1 gene study in three families in which ALS and spinal muscular atrophy co-exist. *Neurology*. 2002 Nov 12;59(9):1464-6.

Cozzolino M, Pesaresi MG, Gerbino V, Grosskreutz J, Carri MT. Amyotrophic lateral sclerosis: new insights into underlying molecular mechanisms and opportunities for therapeutic intervention. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Nov 1;17(9):1277-330.

Crawley JN. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res*. 1999 Jul 17;835(1):18-26.

Cronin S, Blauw HM, Veldink JH, van Es MA, Ophoff RA, Bradley DG, van den Berg LH, Hardiman O. Analysis of genome-wide copy number variation in Irish and Dutch ALS populations. *Hum Mol Genet*. 2008 Nov 1;17(21):3392-8.

Cullen SP, Martin SJ. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death Differ*. 2009 Jul;16(7):935-8.

Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D. The "dying-back" phenomenon of motor neurons in ALS. *J Mol Neurosci*. 2011 Mar;43(3):470-7.

Dagvajantsan B, Aoki M, Warita H, Suzuki N, Itoyama Y. Up-regulation of insulin-like growth factor-II receptor in reactive astrocytes in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis transgenic rats. *Tohoku J Exp Med*. 2008 Apr;214(4):303-10.

Dal Bello-Haas V, Kloos AD, Mitsumoto H. Physical therapy for a patient through six stages of amyotrophic lateral sclerosis. *Physical therapy*. 1998 Dec;78(12):1312-24.

de Oliveira GP, Maximino JR, Maschietto M, Zanoteli E, Puga RD, Lima L, Carraro DM, Chadi G. Early gene expression changes in skeletal muscle from SOD1(G93A) amyotrophic lateral sclerosis animal model. *Cell Mol Neurobiol*. 2014 Apr;34(3):451-62.

De Winter F, Vo T, Stam FJ, Wisman LA, Bar PR, Niclou SP, van Muiswinkel FL, Verhaagen J. The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Mol Cell Neurosci*. 2006 May-Jun;32(1-2):102-17.

- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):245-56.
- Delon I, Brown NH. Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Feb;19(1):43-50.
- Deng HX, Bigio EH, Zhai H, Fecto F, Ajroud K, Shi Y, Yan J, Mishra M, Ajroud-Driss S, Heller S, et al. Differential involvement of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 mutations. *Archives of neurology*. 2011 Aug;68(8):1057-61.
- Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H, et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*. 2011 Sep 8;477(7363):211-5.
- Deng HX, Zhai H, Bigio EH, Yan J, Fecto F, Ajroud K, Mishra M, Ajroud-Driss S, Heller S, Sufit R, et al. FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*. 2010 Jun;67(6):739-48.
- Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci*. 2007 May;10(5):608-14.
- Dong Z, Sinanan A, Parkinson D, Parmantier E, Mirsky R, Jessen KR. Schwann cell development in embryonic mouse nerves. *J Neurosci Res*. 1999 May 15;56(4):334-48.
- Droppelmann CA, Keller BA, Campos-Melo D, Volkening K, Strong MJ. Rho guanine nucleotide exchange factor is an NFL mRNA destabilizing factor that forms cytoplasmic inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2013 Jan;34(1):248-62.
- Dubovy P, Jancalek R, Kubek T. Role of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration. *International review of neurobiology*. 2013;108:173-206.
- Duning T, Schiffbauer H, Warnecke T, Mohammadi S, Floel A, Kolpatzik K, Kugel H, Schneider A, Knecht S, Deppe M, et al. G-CSF prevents the progression of structural disintegration of white matter tracts in amyotrophic lateral sclerosis: a pilot trial. *PLoS One*. 2011;6(3):e17770.
- Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar JL, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Seilhean D, Hauw JJ, Lacomblez L, Loeffler JP, et al. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2008 Mar 25;70(13):1004-9.
- Dupuis L, Loeffler JP. Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Jun;9(3):341-6.
- Ekegren T, Grundstrom E, Lindholm D, Aquilonius SM. Upregulation of Bax protein and increased DNA degradation in ALS spinal cord motor neurons. *Acta Neurol Scand*. 1999 Nov;100(5):317-21.

Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ.* 1999 Nov;6(11):1081-6.

Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, Armakola M, Geser F, Greene R, Lu MM, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature.* 2010 Aug 26;466(7310):1069-75.

Ernfors P, Lee KF, Kucera J, Jaenisch R. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell.* 1994 May 20;77(4):503-12.

Esper RM, Loeb JA. Rapid axoglial signaling mediated by neuregulin and neurotrophic factors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2004 Jul 7;24(27):6218-27.

Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM, Jr. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127(6 Pt 1):1717-27.

Farinas I, Jones KR, Backus C, Wang XY, Reichardt LF. Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature.* 1994 Jun 23;369(6482):658-61.

Fecto F, Yan J, Vemula SP, Liu E, Yang Y, Chen W, Zheng JG, Shi Y, Siddique N, Arrat H, et al. SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology.* 2011 Nov;68(11):1440-6.

Feltri ML, Graus Porta D, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Cassetti A, Littlewood-Evans A, Reichardt LF, Messing A, Quattrini A, et al. Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J Cell Biol.* 2002 Jan 7;156(1):199-209.

Feng C, Von Bartheld CS. Schwann cells as a source of insulin-like growth factor-1 for extraocular muscles. *Muscle & nerve.* 2010 Apr;41(4):478-86.

Festoff BW. Amyotrophic lateral sclerosis: current and future treatment strategies. *Drugs.* 1996 Jan;51(1):28-44.

Figlewicz DA, Garruto RM, Krizus A, Yanagihara R, Rouleau GA. The Cu/Zn superoxide dismutase gene in ALS and parkinsonism-dementia of Guam. *Neuroreport.* 1994 Jan 31;5(5):557-60.

Fischer LR, Culver DG, Davis AA, Tennant P, Wang M, Coleman M, Asress S, Adalbert R, Alexander GM, Glass JD. The WldS gene modestly prolongs survival in the SOD1G93A fALS mouse. *Neurobiology of disease.* 2005 Jun-Jul;19(1-2):293-300.

Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol.* 2004 Feb;185(2):232-40.

Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000 Apr 1;20(7):2534-42.

Friedman HC, Jelsma TN, Bray GM, Aguayo AJ. A distinct pattern of trophic factor expression in myelin-deficient nerves of Trembler mice: implications for trophic support by Schwann cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996 Sep 1;16(17):5344-50.

Fryer HJ, Wolf DH, Knox RJ, Strittmatter SM, Pennica D, O'Leary RM, Russell DS, Kalb RG. Brain-derived neurotrophic factor induces excitotoxic sensitivity in cultured embryonic rat spinal motor neurons through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Journal of neurochemistry*. 2000 Feb;74(2):582-95.

Fukuda T, Chen K, Shi X, Wu C. PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *J Biol Chem*. 2003 Dec 19;278(51):51324-33.

Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, Persson H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol*. 1993 Oct;123(2):455-65.

Gandelman M, Peluffo H, Beckman JS, Cassina P, Barbeito L. Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroinflammation*. 2010;7:33.

Gatzinsky KP, Holtmann B, Daraie B, Berthold CH, Sendtner M. Early onset of degenerative changes at nodes of Ranvier in alpha-motor axons of Cntf null (-/-) mutant mice. *Glia*. 2003 Jun;42(4):340-9.

Gijselink I, Van Langenhove T, van der Zee J, Slegers K, Philtjens S, Kleinberger G, Janssens J, Bettens K, Van Cauwenberghe C, Pereson S, et al. A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *Lancet Neurol*. 2012 Jan;11(1):54-65.

Gingras M, Gagnon V, Minotti S, Durham HD, Berthod F. Optimized protocols for isolation of primary motor neurons, astrocytes and microglia from embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci Methods*. 2007 Jun 15;163(1):111-8.

Gomide VC, Chadi G. The trophic factors S-100beta and basic fibroblast growth factor are increased in the forebrain reactive astrocytes of adult callosotomized rat. *Brain Res*. 1999 Jul 24;835(2):162-74.

Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000 Jan 15;20(2):660-5.

Gordon T, Hegedus J, Tam SL. Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease. *Neurological research*. 2004 Mar;26(2):174-85.

Gordon T, Ly V, Hegedus J, Tyreman N. Early detection of denervated muscle fibers in hindlimb muscles after sciatic nerve transection in wild type mice and in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurological research*. 2009 Feb;31(1):28-42.

Gorlewicz A, Wlodarczyk J, Wilczek E, Gawlak M, Cabaj A, Majczynski H, Nestorowicz K, Herbiak MA, Grieb P, Slawinska U, et al. CD44 is expressed in non-myelinating Schwann cells of the adult rat, and may play a role in neurodegeneration-induced glial plasticity at the neuromuscular junction. *Neurobiology of disease*. 2009 May;34(2):245-58.

Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevett D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW. Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006 Aug 23;26(34):8774-86.

Gowing G, Lalancette-Hebert M, Audet JN, Dequen F, Julien JP. Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) exacerbates ALS disease in a mouse model through altered responses of microglia expressing mutant superoxide dismutase. *Exp Neurol*. 2009 Dec;220(2):267-75.

Graham AJ, Macdonald AM, Hawkes CH. British motor neuron disease twin study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1997 Jun;62(6):562-9.

Greenway MJ, Alexander MD, Ennis S, Traynor BJ, Corr B, Frost E, Green A, Hardiman O. A novel candidate region for ALS on chromosome 14q11.2. *Neurology*. 2004 Nov 23;63(10):1936-8.

Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, Ennis S, Cashman S, Donaghy C, Patterson V, Swingler R, Kieran D, Prehn J, et al. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2006 Apr;38(4):411-3.

Griffin JW, Thompson WJ. Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia*. 2008 Nov 1;56(14):1518-31.

Gros-Louis F, Lariviere R, Gowing G, Laurent S, Camu W, Bouchard JP, Meininger V, Rouleau GA, Julien JP. A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*. 2004 Oct 29;279(44):45951-6.

Guettier-Sigrist S, Coupin G, Warter JM, Poindron P. Cell types required to efficiently innervate human muscle cells in vitro. *Exp Cell Res*. 2000 Aug 25;259(1):204-12.

Gupta R, Gray M, Chao T, Bear D, Modafferi E, Mozaffar T. Schwann cells upregulate vascular endothelial growth factor secondary to chronic nerve compression injury. *Muscle & nerve*. 2005 Apr;31(4):452-60.

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 1994 Jun 17;264(5166):1772-5.

Gurney ME. Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 1994 Dec 22;331(25):1721-2.

Guzen FP, de Almeida Leme RJ, de Andrade MS, de Luca BA, Chadi G. Glial cell line-derived neurotrophic factor added to a sciatic nerve fragment grafted in a spinal cord gap ameliorates motor impairments in rats and increases local axonal growth. *Restor Neurol Neurosci*. 2009;27(1):1-16.

Haase G, Kennel P, Pettmann B, Vigne E, Akli S, Revah F, Schmalbruch H, Kahn A. Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat Med*. 1997 Apr;3(4):429-36.

Haastert K, Grosskreutz J, Jaeckel M, Laderer C, Bufler J, Grothe C, Claus P. Rat embryonic motoneurons in long-term co-culture with Schwann cells--a system to investigate motoneuron diseases on a cellular level in vitro. *J Neurosci Methods*. 2005 Mar 30;142(2):275-84.

Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, et al. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet*. 2001 Oct;29(2):166-73.

Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD, et al. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature biotechnology*. 2011 Sep;29(9):824-8.

Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia*. 1998 Jul;23(3):249-56.

Hammarberg H, Piehl F, Cullheim S, Fjell J, Hokfelt T, Fried K. GDNF mRNA in Schwann cells and DRG satellite cells after chronic sciatic nerve injury. *Neuroreport*. 1996 Mar 22;7(4):857-60.

Haney CA, Sahenk Z, Li C, Lemmon VP, Roder J, Trapp BD. Heterophilic binding of L1 on unmyelinated sensory axons mediates Schwann cell adhesion and is required for axonal survival. *J Cell Biol*. 1999 Sep 6;146(5):1173-84.

Harraz MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson K, Luo M, Paulson H, Schoneich C, et al. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *The Journal of clinical investigation*. 2008 Feb;118(2):659-70.

Haulcomb MM, Mesnard NA, Batka RJ, Alexander TD, Sanders VM, Jones KJ. Axotomy-induced target disconnection promotes an additional death mechanism involved in motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *The Journal of comparative neurology*. 2014 Jul 1;522(10):2349-76.

Heads T, Pollock M, Robertson A, Sutherland WH, Allpress S. Sensory nerve pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*. 1991;82(4):316-20.

Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simmons L, Moffet B, Vandlen RA, Simpson LC, et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*. 1994 Nov 11;266(5187):1062-4.

Henriques A, Pitzer C, Dittgen T, Klugmann M, Dupuis L, Schneider A. CNS-targeted viral delivery of G-CSF in an animal model for ALS: improved efficacy and preservation of the neuromuscular unit. *Mol Ther*. 2011 Feb;19(2):284-92.

Hentati A, Ouahchi K, Pericak-Vance MA, Nijhawan D, Ahmad A, Yang Y, Rimmner J, Hung W, Schlotter B, Ahmed A, et al. Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. *Neurogenetics*. 1998 Dec;2(1):55-60.

Herdegen T, Rudiger S, Mayer B, Bravo R, Zimmermann M. Expression of nitric oxide synthase and colocalisation with Jun, Fos and Krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994 Mar;22(1-4):245-58.

Honkanen H, Lahti O, Nissinen M, Myllyla RM, Kangas S, Paivalainen S, Alanne MH, Peltonen S, Peltonen J, Heape AM. Isolation, purification and expansion of myelination-competent, neonatal mouse Schwann cells. *The European journal of neuroscience*. 2007 Aug;26(4):953-64.

Hosler BA, Siddique T, Sapp PC, Sailor W, Huang MC, Hossain A, Daube JR, Nance M, Fan C, Kaplan J, et al. Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. *JAMA*. 2000 Oct 4;284(13):1664-9.

Hughes EG, Elmariah SB, Balice-Gordon RJ. Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Mol Cell Neurosci*. 2010 Jan;43(1):136-45.

Ikeda K, Klinkosz B, Greene T, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM, Mitsumoto H. Effects of brain-derived neurotrophic factor on motor dysfunction in wobbler mouse motor neuron disease. *Annals of neurology*. 1995 Apr;37(4):505-11.

Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol*. 2009 Dec 14;187(6):761-72.

Ishige K, Tanaka M, Arakawa M, Saito H, Ito Y. Distinct nuclear factor-kappaB/Rel proteins have opposing modulatory effects in glutamate-induced cell death in HT22 cells. *Neurochem Int*. 2005 Dec;47(8):545-55.

Jaarsma D, Holstege JC, Troost D, Davis M, Kennis J, Haasdijk ED, de Jong VJ. Induction of c-Jun immunoreactivity in spinal cord and brainstem neurons in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 1996 Nov 29;219(3):179-82.

Jaarsma D, Teuling E, Haasdijk ED, De Zeeuw CI, Hoogenraad CC. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase is sufficient to induce amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008 Feb 27;28(9):2075-88.

Jessen KR, Mirsky R. Origin and early development of Schwann cells. *Microsc Res Tech*. 1998 Jun 1;41(5):393-402.

Jiang YM, Yamamoto M, Tanaka F, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, et al. Gene expressions specifically detected in motor neurons (dynactin 1, early growth response 3, acetyl-CoA transporter, death receptor 5, and cyclin C) differentially correlate to pathologic markers in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2007 Jul;66(7):617-27.

Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Gibbs JR, Brunetti M, Gronka S, Wu J, et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*. 2010 Dec 9;68(5):857-64.

Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):572-4.

Kaech S, Banker G. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2406-15.

Kanda T, Tsukagoshi H, Oda M, Miyamoto K, Tanabe H. Changes of unmyelinated nerve fibers in sural nerve in amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Acta neuropathologica*. 1996;91(2):145-54.

Karl T, Pabst R, von Horsten S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxicol Pathol*. 2003 Jul;55(1):69-83.

Kawada H, Takizawa S, Takanashi T, Morita Y, Fujita J, Fukuda K, Takagi S, Okano H, Ando K, Hotta T. Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation*. 2006 Feb 7;113(5):701-10.

Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol*. 1992 Mar;140(3):691-707.

Keller AF, Gravel M, Kriz J. Live imaging of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: disease onset is characterized by marked induction of GFAP in Schwann cells. *Glia*. 2009 Aug 1;57(10):1130-42.

Kerkhoff H, Jennekens FG, Troost D, Veldman H. Nerve growth factor receptor immunostaining in the spinal cord and peripheral nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*. 1991;81(6):649-56.

Kikuchi H, Almer G, Yamashita S, Guegan C, Nagai M, Xu Z, Sosunov AA, McKhann GM, 2nd, Przedborski S. Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 Apr 11;103(15):6025-30.

Kim SH, Won SJ, Sohn S, Kwon HJ, Lee JY, Park JH, Gwag BJ. Brain-derived neurotrophic factor can act as a pronecrotic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. *J Cell Biol.* 2002 Dec 9;159(5):821-31.

Kim YJ, Lee G. Candidate ALS therapeutics motor toward "in vitro clinical trials". *Cell Stem Cell.* 2013 Jun 6;12(6):633-4.

Klein R. Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB J.* 1994 Jul;8(10):738-44.

Kliem MA, Heeke BL, Franz CK, Radovitskiy I, Raore B, Barrow E, Snyder BR, Federici T, Kaye Spratt S, Boulis NM. Intramuscular administration of a VEGF zinc finger transcription factor activator (VEGF-ZFP-TF) improves functional outcomes in SOD1 rats. *Amyotroph Lateral Scler.* 2011 Sep;12(5):331-9.

Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 1997 Jul 25;277(5325):559-62.

Laaksovirta H, Peuralinna T, Schymick JC, Scholz SW, Lai SL, Myllykangas L, Sulkava R, Jansson L, Hernandez DG, Gibbs JR, et al. Chromosome 9p21 in amyotrophic lateral sclerosis in Finland: a genome-wide association study. *Lancet Neurol.* 2010 Oct;9(10):978-85.

Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003 Aug;34(4):383-94.

Landers JE, Melki J, Meininger V, Glass JD, van den Berg LH, van Es MA, Sapp PC, van Vught PW, McKenna-Yasek DM, Blauw HM, et al. Reduced expression of the Kinesin-Associated Protein 3 (KIFAP3) gene increases survival in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009 Jun 2;106(22):9004-9.

Langenfeld-Oster B, Faissner A, Irintchev A, Wernig A. Polyclonal antibodies against NCAM and tenascin delay endplate reinnervation. *J Neurocytol.* 1994 Oct;23(10):591-604.

Leblond CS, Kaneb HM, Dion PA, Rouleau GA. Dissection of genetic factors associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol.* 2014 Dec;262 Pt B:91-101.

Lee DA, Gross L, Wittrock DA, Windebank AJ. Localization and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in postmortem sciatic nerve from patients with motor neuron disease and diabetic neuropathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology.* 1996 Aug;55(8):915-23.

Lee JK, Shin JH, Suh J, Choi IS, Ryu KS, Gwag BJ. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) expression is increased during serum deprivation-induced neuronal apoptosis in vitro and in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a potential modulator of Fas-mediated apoptosis. *Neurobiology of disease.* 2008 May;30(2):174-85.

Lee M, Aoki M, Kondo T, Kobayashi K, Okumura K, Komori K, Murohara T. Therapeutic angiogenesis with intramuscular injection of low-dose recombinant granulocyte-colony stimulating factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Dec;25(12):2535-41.

Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature.* 2012 Jul 26;487(7408):443-8.

Li F, Zhang Y, Wu C. Integrin-linked kinase is localized to cell-matrix focal adhesions but not cell-cell adhesion sites and the focal adhesion localization of integrin-linked kinase is regulated by the PINCH-binding ANK repeats. *J Cell Sci.* 1999 Dec;112 (Pt 24):4589-99.

Li M, Ona VO, Guegan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, et al. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science.* 2000 Apr 14;288(5464):335-9.

Li W, Brakefield D, Pan Y, Hunter D, Myckatyn TM, Parsadanian A. Muscle-derived but not centrally derived transgene GDNF is neuroprotective in G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Exp Neurol.* 2007 Feb;203(2):457-71.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 1993 May 21;260(5111):1130-2.

Lino MM, Schneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2002 Jun 15;22(12):4825-32.

Liu J, Lillo C, Jonsson PA, Vande Velde C, Ward CM, Miller TM, Subramaniam JR, Rothstein JD, Marklund S, Andersen PM, et al. Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron.* 2004 Jul 8;43(1):5-17.

Liu JX, Brannstrom T, Andersen PM, Pedrosa-Domellof F. Distinct changes in synaptic protein composition at neuromuscular junctions of extraocular muscles versus limb muscles of ALS donors. *PLoS One.* 2013;8(2):e57473.

Liu R, Lin G, Xu H. An efficient method for dorsal root ganglia neurons purification with a one-time anti-mitotic reagent treatment. *PLoS One.* 2013;8(4):e60558.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.

Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K, Cleveland DW. Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009 Mar 17;106(11):4465-70.

Love FM, Thompson WJ. Glial cells promote muscle reinnervation by responding to activity-dependent postsynaptic signals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999 Dec 1;19(23):10390-6.

Lu Y, Dolle ME, Imholz S, van 't Slot R, Verschuren WM, Wijmenga C, Feskens EJ, Boer JM. Multiple genetic variants along candidate pathways influence plasma high-density lipoprotein cholesterol concentrations. *J Lipid Res*. 2008 Dec;49(12):2582-9.

Lu YY, Wang LJ, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, et al. Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci Res*. 2003 Jan;45(1):33-40.

Lykissas MG, Batistatou AK, Charalabopoulos KA, Beris AE. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Current neurovascular research*. 2007 May;4(2):143-51.

Majoor-Krakauer D, Ottman R, Johnson WG, Rowland LP. Familial aggregation of amyotrophic lateral sclerosis, dementia, and Parkinson's disease: evidence of shared genetic susceptibility. *Neurology*. 1994 Oct;44(10):1872-7.

Majumdar A, Cruz D, Asamoah N, Buxbaum A, Sohar I, Lobel P, Maxfield FR. Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils. *Mol Biol Cell*. 2007 Apr;18(4):1490-6.

Malmqvist T, Anthony K, Gallo JM. Tau mRNA is present in axonal RNA granules and is associated with elongation factor 1A. *Brain Res*. 2014 Oct 10;1584:22-7.

Manabe Y, Kashiwara K, Shiro Y, Shohmori T, Abe K. Enhanced Fos expression in rat lumbar spinal cord cultured with cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurological research*. 1999 Apr;21(3):309-12.

Martin LJ. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1999 May;58(5):459-71.

Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 2010 May 13;465(7295):223-6.

Maximino JR, de Oliveira GP, Alves CJ, Chadi G. Deregulated expression of cytoskeleton related genes in the spinal cord and sciatic nerve of presymptomatic SOD1(G93A) Amyotrophic Lateral Sclerosis mouse model. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:148.

McGeer EG, McGeer PL. Pharmacologic approaches to the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2005;19(1):31-7.

McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EM, Greensmith L. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Sep;1832(9):1421-36.

- Miana-Mena FJ, Munoz MJ, Yague G, Mendez M, Moreno M, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R. Optimal methods to characterize the G93A mouse model of ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2005 Mar;6(1):55-62.
- Migheli A, Attanasio A, Schiffer D. Ubiquitin and neurofilament expression in anterior horn cells in amyotrophic lateral sclerosis: possible clues to the pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1994 Jun;20(3):282-9.
- Mitchell J, Paul P, Chen HJ, Morris A, Payling M, Falchi M, Habgood J, Panoutsou S, Winkler S, Tisato V, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Apr 20;107(16):7556-61.
- Mitrasinovic OM, Grattan A, Robinson CC, Lapustea NB, Poon C, Ryan H, Phong C, Murphy GM, Jr. Microglia overexpressing the macrophage colony-stimulating factor receptor are neuroprotective in a microglial-hippocampal organotypic coculture system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005 Apr 27;25(17):4442-51.
- Mohajeri MH, Figlewicz DA, Bohn MC. Intramuscular grafts of myoblasts genetically modified to secrete glial cell line-derived neurotrophic factor prevent motoneuron loss and disease progression in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Gene Ther*. 1999 Jul 20;10(11):1853-66.
- Moloney EB, de Winter F, Verhaagen J. ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Front Neurosci*. 2014;8:252.
- Morita M, Al-Chalabi A, Andersen PM, Hosler B, Sapp P, Englund E, Mitchell JE, Habgood JJ, de Belleruche J, Xi J, et al. A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia. *Neurology*. 2006 Mar 28;66(6):839-44.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 1998 Jun;24(6):954-8, 60, 62.
- Munch C, Sedlmeier R, Meyer T, Homberg V, Sperfeld AD, Kurt A, Prudlo J, Peraus G, Hanemann CO, Stumm G, et al. Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology*. 2004 Aug 24;63(4):724-6.
- Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH, Jr., Itoyama Y. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001 Dec 1;21(23):9246-54.
- Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci*. 2007 May;10(5):615-22.

Naumenko N, Pollari E, Kurronen A, Giniatullina R, Shakirzyanova A, Magga J, Koistinaho J, Giniatullin R. Gender-Specific Mechanism of Synaptic Impairment and Its Prevention by GCSF in a Mouse Model of ALS. *Front Cell Neurosci.* 2011;5:26.

Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, Kok F, Oliveira JR, Gillingwater T, Webb J, et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.* 2004 Nov;75(5):822-31.

Nishio Y, Koda M, Kamada T, Someya Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okada S, Okawa A, Moriya H, et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology.* 2007 Aug;66(8):724-31.

Nobbio L, Fiorese F, Vigo T, Cilli M, Gherardi G, Grandis M, Melcangi RC, Mancardi G, Abbruzzese M, Schenone A. Impaired expression of ciliary neurotrophic factor in Charcot-Marie-Tooth type 1A neuropathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology.* 2009 May;68(5):441-55.

Ofengeim D, Yuan J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Nov;14(11):727-36.

Oliveira AS, Isozaki E, Younger D, Gabbai AA, Hays AP. Expression of HLA-DR in peripheral nerve of amyotrophic lateral sclerosis. *Arquivos de neuro-psiquiatria.* 1994 Dec;52(4):493-500.

Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet.* 2001 Jun;28(2):131-8.

Orlacchio A, Babalini C, Borreca A, Patrono C, Massa R, Basaran S, Munhoz RP, Rogaeva EA, St George-Hyslop PH, Bernardi G, et al. SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 2010 Feb;133(Pt 2):591-8.

Orozco D, Edbauer D. FUS-mediated alternative splicing in the nervous system: consequences for ALS and FTL. *J Mol Med (Berl).* 2013 Dec;91(12):1343-54.

Oudega M, Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB. A combination of insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor enhances myelination but diminishes axonal regeneration into Schwann cell grafts in the adult rat spinal cord. *Glia.* 1997 Mar;19(3):247-58.

Parkinson N, Ince PG, Smith MO, Highley R, Skibinski G, Andersen PM, Morrison KE, Pall HS, Hardiman O, Collinge J, et al. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology.* 2006 Sep 26;67(6):1074-7.

Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nature reviews Neuroscience.* 2006 Sep;7(9):710-23.

Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Castellanos R, Viera L, Beckman JS, Estevez AG, Barbeito L. Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry*. 2004 Apr;89(2):464-73.

Perrie WT, Lee GT, Curtis EM, Sparke J, Buller JR, Rossi ML. Changes in the myelinated axons of femoral nerve in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neural transmission Supplementum*. 1993;39:223-33.

Phatnani HP, Guarnieri P, Friedman BA, Carrasco MA, Muratet M, O'Keeffe S, Nwakeze C, Pauli-Behn F, Newberry KM, Meadows SK, et al. Intricate interplay between astrocytes and motor neurons in ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013 Feb 19;110(8):E756-65.

Pitzer C, Klusmann S, Kruger C, Letellier E, Plaas C, Dittgen T, Kirsch F, Stieltjes B, Weber D, Laage R, et al. The hematopoietic factor granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in experimental spinal cord injury. *Journal of neurochemistry*. 2010 May;113(4):930-42.

Pollard JD, Armati PJ. CIDP - the relevance of recent advances in Schwann cell/axonal neurobiology. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*. 2011 Mar;16(1):15-23.

Pollari E, Savchenko E, Jaronen M, Kanninen K, Malm T, Wojciechowski S, Ahtoniemi T, Goldsteins G, Giniatullina R, Giniatullin R, et al. Granulocyte colony stimulating factor attenuates inflammation in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroinflammation*. 2011;8:74.

Poser S, Impey S, Xia Z, Storm DR. Brain-derived neurotrophic factor protection of cortical neurons from serum withdrawal-induced apoptosis is inhibited by cAMP. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003 Jun 1;23(11):4420-7.

Pramatarova A, Laganieri J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001 May 15;21(10):3369-74.

Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci*. 2006 Mar;9(3):408-19.

Pyo JS, Ko YS, Kim WH, Kim M, Lee KW, Nam SY, Chung HY, Cho SJ, Baik TK, Lee BL. Impairment of nuclear factor-kappaB activation increased glutamate excitotoxicity in a motoneuron-neuroblastoma hybrid cell line expressing mutant (G93A) Cu/Zn-superoxide dismutase. *J Neurosci Res*. 2010 Aug 15;88(11):2494-503.

Rabinovsky ED, Gelir E, Gelir S, Lui H, Kattash M, DeMayo FJ, Shenaq SM, Schwartz RJ. Targeted expression of IGF-1 transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. *FASEB J*. 2003 Jan;17(1):53-5.

Raoul C, Estevez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyriere O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B. Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream

of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron*. 2002 Sep 12;35(6):1067-83.

Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, Ikiz B, Hoffmann L, Koolen M, Nagata T, et al. Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron*. 2014 Mar 5;81(5):1001-8.

Reddy LV, Koirala S, Sugiura Y, Herrera AA, Ko CP. Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo. *Neuron*. 2003 Oct 30;40(3):563-80.

Renaud S, Leppert D. Matrix metalloproteinases in neuromuscular disease. *Muscle & nerve*. 2007 Jul;36(1):1-13.

Rieger F, Nicolet M, Pincon-Raymond M, Murawsky M, Levi G, Edelman GM. Distribution and role in regeneration of N-CAM in the basal laminae of muscle and Schwann cells. *J Cell Biol*. 1988 Aug;107(2):707-19.

Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C. Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):725-30.

Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews Neuroscience*. 2013 Apr;14(4):248-64.

Rosen DR. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993 Jul 22;364(6435):362.

Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncel RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*. 1995 Jul;38(1):73-84.

Rotunno MS, Bosco DA. An emerging role for misfolded wild-type SOD1 in sporadic ALS pathogenesis. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:253.

Saccon RA, Bunton-Stasyshyn RK, Fisher EM, Fratta P. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain*. 2013 Aug;136(Pt 8):2342-58.

Saeed M, Siddique N, Hung WY, Usacheva E, Liu E, Sufit RL, Heller SL, Haines JL, Pericak-Vance M, Siddique T. Paraoxonase cluster polymorphisms are associated with sporadic ALS. *Neurology*. 2006 Sep 12;67(5):771-6.

Sanelli T, Ge W, Leystra-Lantz C, Strong MJ. Calcium mediated excitotoxicity in neurofilament aggregate-bearing neurons in vitro is NMDA receptor dependant. *Journal of the neurological sciences*. 2007 May 15;256(1-2):39-51.

Sanes DH, Kotak VC. Developmental plasticity of auditory cortical inhibitory synapses. *Hear Res*. 2011 Sep;279(1-2):140-8.

Sanes JR, Lichtman JW. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nature reviews Neuroscience*. 2001 Nov;2(11):791-805.

Sanli AM, Serbes G, Caliskan M, Kaptanoglu E, Sargon MF, Kilinc K, Besalti O, Sekerci Z. Effect of granulocyte-colony stimulating factor on spinal cord tissue after experimental contusion injury. *J Clin Neurosci*. 2010 Dec;17(12):1548-52.

Sapp PC, Hosler BA, McKenna-Yasek D, Chin W, Gann A, Genise H, Gorenstein J, Huang M, Sailer W, Scheffler M, et al. Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet*. 2003 Aug;73(2):397-403.

Saxena S, Caroni P. Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron*. 2011 Jul 14;71(1):35-48.

Schaefer AM, Sanes JR, Lichtman JW. A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of comparative neurology*. 2005 Sep 26;490(3):209-19.

Schmuck G, Kahl R. The use of Fluoro-Jade in primary neuronal cell cultures. *Arch Toxicol*. 2009 Apr;83(4):397-403.

Schnaar RI, Schaffner AE. Separation of cell types from embryonic chicken and rat spinal cord: characterization of motoneuron-enriched fractions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1981 Feb;1(2):204-17.

Schneider A, Kruger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Aug;115(8):2083-98.

Schneider A, Kuhn HG, Schabitz WR. A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle*. 2005 Dec;4(12):1753-7.

Schwyn RC. An autoradiographic study of satellite cells in autonomic ganglia. *The American journal of anatomy*. 1967 Nov;121(3):727-38.

Schymick JC, Yang Y, Andersen PM, Vonsattel JP, Greenway M, Momeni P, Elder J, Chio A, Restagno G, Robberecht W, et al. Progranulin mutations and amyotrophic lateral sclerosis or amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia phenotypes. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2007 Jul;78(7):754-6.

Shatunov A, Mok K, Newhouse S, Weale ME, Smith B, Vance C, Johnson L, Veldink JH, van Es MA, van den Berg LH, et al. Chromosome 9p21 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis in the UK and seven other countries: a genome-wide association study. *Lancet Neurol*. 2010 Oct;9(10):986-94.

Shaw PJ, Eggett CJ. Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2000 Mar;247 Suppl 1:I17-27.

Simpson CL, Lemmens R, Miskiewicz K, Broom WJ, Hansen VK, van Vught PW, Landers JE, Sapp P, Van Den Bosch L, Knight J, et al. Variants of the elongator protein

3 (ELP3) gene are associated with motor neuron degeneration. *Hum Mol Genet.* 2009 Feb 1;18(3):472-81.

Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci.* 1996 Jul;19(7):280-5.

Sopher BL, Thomas PS, Jr., LaFevre-Bernt MA, Holm IE, Wilke SA, Ware CB, Jin LW, Libby RT, Ellerby LM, La Spada AR. Androgen receptor YAC transgenic mice recapitulate SBMA motor neuronopathy and implicate VEGF164 in the motor neuron degeneration. *Neuron.* 2004 Mar 4;41(5):687-99.

Sparrow N, Manetti ME, Bott M, Fabianac T, Petrilli A, Bates ML, Bunge MB, Lambert S, Fernandez-Valle C. The actin-severing protein cofilin is downstream of neuregulin signaling and is essential for Schwann cell myelination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2012 Apr 11;32(15):5284-97.

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 2008 Mar 21;319(5870):1668-72.

Staats KA, Van Helleputte L, Jones AR, Bento-Abreu A, Van Hoecke A, Shatunov A, Simpson CL, Lemmens R, Jaspers T, Fukami K, et al. Genetic ablation of phospholipase C delta 1 increases survival in SOD1(G93A) mice. *Neurobiology of disease.* 2013 Dec;60:11-7.

Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelmans S, Oh H, Van Damme P, Rutten B, Man WY, De Mol M, et al. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci.* 2005 Jan;8(1):85-92.

Suzuki M, McHugh J, Tork C, Shelley B, Hayes A, Bellantuono I, Aebischer P, Svendsen CN. Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS. *Mol Ther.* 2008 Dec;16(12):2002-10.

Swarup V, Phaneuf D, Dupre N, Petri S, Strong M, Kriz J, Julien JP. Deregulation of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis triggers nuclear factor kappaB-mediated pathogenic pathways. *J Exp Med.* 2011 Nov 21;208(12):2429-47.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Tan CF, Eguchi H, Tagawa A, Onodera O, Iwasaki T, Tsujino A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta neuropathologica.* 2007 May;113(5):535-42.

Ticozzi N, Vance C, Leclerc AL, Keagle P, Glass JD, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Silani V, Bosco DA, Shaw CE, et al. Mutational analysis reveals the FUS homolog

TAF15 as a candidate gene for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2011 Apr;156B(3):285-90.

Tolosa L, Mir M, Asensio VJ, Olmos G, Llado J. Vascular endothelial growth factor protects spinal cord motoneurons against glutamate-induced excitotoxicity via phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of neurochemistry.* 2008 May;105(4):1080-90.

Tovar-y-Romo LB, Tapia R. Delayed administration of VEGF rescues spinal motor neurons from death with a short effective time frame in excitotoxic experimental models in vivo. *ASN Neuro.* 2012;4(2).

Tu Y, Li F, Goicoechea S, Wu C. The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):2425-34.

Tu Y, Li F, Wu C. Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways. *Mol Biol Cell.* 1998 Dec;9(12):3367-82.

Turner BJ, Ackerley S, Davies KE, Talbot K. Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice. *Hum Mol Genet.* 2009 Mar 1;19(5):815-24.

Turner BJ, Cheah IK, Macfarlane KJ, Lopes EC, Petratos S, Langford SJ, Cheema SS. Antisense peptide nucleic acid-mediated knockdown of the p75 neurotrophin receptor delays motor neuron disease in mutant SOD1 transgenic mice. *Journal of neurochemistry.* 2003 Nov;87(3):752-63.

Turner BJ, Talbot K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol.* 2008 May;85(1):94-134.

Tuszynski MH, Gage FH. Bridging grafts and transient nerve growth factor infusions promote long-term central nervous system neuronal rescue and partial functional recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995 May 9;92(10):4621-5.

Valdmanis PN, Dupre N, Bouchard JP, Camu W, Salachas F, Meininger V, Strong M, Rouleau GA. Three families with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia with evidence of linkage to chromosome 9p. *Archives of neurology.* 2007 Feb;64(2):240-5.

Valori CF, Brambilla L, Martorana F, Rossi D. The multifaceted role of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Jan;71(2):287-97.

Van Den Bosch L, Storkebaum E, Vleminckx V, Moons L, Vanopdenbosch L, Scheveneels W, Carmeliet P, Robberecht W. Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on motor neuron degeneration. *Neurobiology of disease.* 2004 Oct;17(1):21-8.

van Es AC, van der Grond J, de Craen AJ, Westendorp RG, Bollen EL, Blauw GJ, Greenberg SM, van Buchem MA. Cerebral microbleeds and cognitive functioning in the PROSPER study. *Neurology.* 2011 Oct 11;77(15):1446-52.

van Es MA, Van Vught PW, Blauw HM, Franke L, Saris CG, Andersen PM, Van Den Bosch L, de Jong SW, van 't Slot R, Birve A, et al. ITPR2 as a susceptibility gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a genome-wide association study. *Lancet Neurol*. 2007 Oct;6(10):869-77.

Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, Smith BN, Hu X, Sreedharan J, Siddique T, Schelhaas HJ, Kusters B, Troost D, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain*. 2006 Apr;129(Pt 4):868-76.

Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*. 2009 Feb 27;323(5918):1208-11.

Vande Velde C, Garcia ML, Yin X, Trapp BD, Cleveland DW. The neuroprotective factor Wlds does not attenuate mutant SOD1-mediated motor neuron disease. *Neuromolecular medicine*. 2004;5(3):193-203.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999 Jan 22;96(2):245-54.

Velyvis A, Vaynberg J, Yang Y, Vinogradova O, Zhang Y, Wu C, Qin J. Structural and functional insights into PINCH LIM4 domain-mediated integrin signaling. *Nat Struct Biol*. 2003 Jul;10(7):558-64.

Viader A, Sasaki Y, Kim S, Strickland A, Workman CS, Yang K, Gross RW, Milbrandt J. Aberrant Schwann cell lipid metabolism linked to mitochondrial deficits leads to axon degeneration and neuropathy. *Neuron*. 2013 Mar 6;77(5):886-98.

Walling AD. Amyotrophic lateral sclerosis: Lou Gehrig's disease. *American family physician*. 1999 Mar 15;59(6):1489-96.

Wang L, Gutmann DH, Roos RP. Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Hum Mol Genet*. 2011 Jan 15;20(2):286-93.

Wang L, Pytel P, Feltri ML, Wrabetz L, Roos RP. Selective knockdown of mutant SOD1 in Schwann cells ameliorates disease in G85R mutant SOD1 transgenic mice. *Neurobiology of disease*. 2012 Oct;48(1):52-7.

Wang L, Sharma K, Grisotti G, Roos RP. The effect of mutant SOD1 dismutase activity on non-cell autonomous degeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease*. 2009 Aug;35(2):234-40.

Wetmore C, Olson L. Neuronal and nonneuronal expression of neurotrophins and their receptors in sensory and sympathetic ganglia suggest new intercellular trophic interactions. *The Journal of comparative neurology*. 1995 Feb 27;353(1):143-59.

White FV, Ceccarini C, Georgieff I, Matthieu JM, Costantino-Ceccarini E. Growth properties and biochemical characterization of mouse Schwann cells cultured in vitro. *Exp Cell Res*. 1983 Oct;148(1):183-94.

Wisdom R, Johnson RS, Moore C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J*. 1999 Jan 4;18(1):188-97.

Wisdom R. AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res*. 1999 Nov 25;253(1):180-5.

Woolley AG, Sheard PW, Duxson MJ. Neurotrophin-3 null mutant mice display a postnatal motor neuropathy. *The European journal of neuroscience*. 2005 Apr;21(8):2100-10.

Woolley AG, Tait KJ, Hurren BJ, Fisher L, Sheard PW, Duxson MJ. Developmental loss of NT-3 in vivo results in reduced levels of myelin-specific proteins, a reduced extent of myelination and increased apoptosis of Schwann cells. *Glia*. 2008 Feb;56(3):306-17.

Wu LS, Cheng WC, Shen CK. Targeted depletion of TDP-43 expression in the spinal cord motor neurons leads to the development of amyotrophic lateral sclerosis-like phenotypes in mice. *J Biol Chem*. 2012 Aug 10;287(33):27335-44.

Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, Cleveland DW, Goldstein LS. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 May 27;105(21):7594-9.

Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*. 2008 Mar;11(3):251-3.

Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*. 2011 Nov 23;147(5):1146-58.

Yang Y, Gozen O, Watkins A, Lorenzini I, Lepore A, Gao Y, Vidensky S, Brennan J, Poulsen D, Won Park J, et al. Presynaptic regulation of astroglial excitatory neurotransmitter transporter GLT1. *Neuron*. 2009 Mar 26;61(6):880-94.

Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, et al. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2001 Oct;29(2):160-5.

Yen AA, Simpson EP, Henkel JS, Beers DR, Appel SH. HFE mutations are not strongly associated with sporadic ALS. *Neurology*. 2004 May 11;62(9):1611-2.

Yin Y, Miner JH, Sanes JR. Laminets: laminin- and netrin-related genes expressed in distinct neuronal subsets. *Mol Cell Neurosci*. 2002 Mar;19(3):344-58.

Yuan H, Zhang W, Li H, Chen C, Liu H, Li Z. Neuroprotective effects of resveratrol on embryonic dorsal root ganglion neurons with neurotoxicity induced by ethanol. *Food Chem Toxicol*. 2013 May;55:192-201.

Zhang Y, Guo L, Chen K, Wu C. A critical role of the PINCH-integrin-linked kinase interaction in the regulation of cell shape change and migration. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):318-26.

Zhang Y, Wang L, Fu Y, Song H, Zhao H, Deng M, Zhang J, Fan D. Preliminary investigation of effect of granulocyte colony stimulating factor on amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009 Oct-Dec;10(5-6):430-1.

Zhong Z, Deane R, Ali Z, Parisi M, Shapovalov Y, O'Banion MK, Stojanovic K, Sagare A, Boillee S, Cleveland DW, et al. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat Neurosci*. 2008 Apr;11(4):420-2.

Zhou XF, Deng YS, Chie E, Xue Q, Zhong JH, McLachlan EM, Rush RA, Xian CJ. Satellite-cell-derived nerve growth factor and neurotrophin-3 are involved in noradrenergic sprouting in the dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in the rat. *The European journal of neuroscience*. 1999 May;11(5):1711-22.

available at www.sciencedirect.com www.elsevier.com/locate/brainres**BRAIN
RESEARCH****Research Report****Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome**

Chrystian Junqueira Alves, Luana Pereira de Santana, Angélica Janaína Dias dos Santos, Gabriela Pintar de Oliveira, Tatiana Duobles, Juliana Milani Scorisa, Roberto Sérgio Martins, Jessica Ruivo Maximino, Gerson Chadi*

Neuroregeneration Center, Department of Neurology, University of São Paulo School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, 01246-903 Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 18 February 2011

Available online 24 February 2011

Keywords:

Amyotrophic lateral sclerosis

Mutant SOD1^{G93A}

Early motor impairments

Footprint

Tail elevation gender

Electrophysiology

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive degenerative disorder affecting motoneurons and the SOD1^{G93A} transgenic mice are widely employed to study disease pathophysiology and therapeutic strategies. Despite the cellular and biochemical evidences of an early motor system dysfunction, the conventional behavioral tests do not detect early motor impairments in SOD1 mouse model. We evaluated early changes in motor behavior of ALS mice by doing the analyses of tail elevation, footprint, automatic recording of motor activities by means of an infrared motion sensor activity system and electrophysiological measurements in male and female wild-type (WT) and SOD1^{G93A} mice from postnatal day (P) 20 up to endpoint. The classical evaluations of mortality, weight loss, tremor, rotometer, hanging wire and inclined plane were also employed. There was a late onset (after P90) of the impairments of classical parameters and the outcome varied between genders of ALS mice, being tremor, cumulative survival, weight loss and neurological score about 10 days earlier in male than female ALS mice and also about 20 days earlier in ALS males regarding rotarod and hanging wire performances. While diminution of hindpaw base was 10 days earlier in ALS males (P110) compared to females, the steep length decreased 40 days earlier in ALS females (P60) than ALS males. The automatic analysis of motor impairments showed substantial late changes (after P90) of motility and locomotion in the ALS females, but not in the ALS males. It was surprising that the scores of tail elevation were already decreased in ALS males and females by P40, reaching the minimal values at the endpoint. The electrophysiological analyses showed early changes of measures in the ALS mouse sciatic nerve, i.e., decreased values of amplitude (P40) and nerve conduction velocity (P20), and also an increased latency (P20) reaching maximal level of impairments at the late disease phase. The early changes were not accompanied by reductions of neuronal protein markers of neurofilament 200 and ChAT in the ventral part of the lumbar spinal cord of P20 and P60 ALS mice by means of Western blot technique, despite remarkable decreases of those protein levels in P120 ALS

* Corresponding author at: Department of Neurology University of São Paulo Av. Dr Arnaldo, 455 2nd floor, room 2119, 01246-903 – São Paulo. Fax: +5511 3061 7460.

E-mail address: gerchadi@usp.br (G. Chadi).

mice. In conclusion, early changes of motor behavior and electrophysiological parameters in ALS mouse model must be taken into attention in the analyses of disease mechanisms and therapeutic effects.

© 2011 Published by Elsevier B.V. Open access under the [Elsevier OA license](#).

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset neurodegenerative disorder involving motoneuron loss in the brain, brainstem, and spinal cord leading to progressive paralysis and death after 3–5 years from respiratory failure (Bruijn et al., 2004; Ince et al., 1998).

The majority of ALS cases are apparently sporadic, with 90–95% of patients presenting disease symptoms without a familial history of the pathology, and the remaining 5–10% patients are included as a familial ALS group. Both types of ALS are, however, indistinguishable in the clinical outcome (Bruijn et al., 2004). About 25% of familial cases are caused by dominant mutations in the Cu/Zn super oxide dismutase (SOD1) gene (Andersen, 2004).

Several transgenic rodent models of ALS have been developed for assessing novel therapeutic interventions, being the SOD1^{G93A} mouse model the most widely studied. This model was generated by over expression of mutant allele of human SOD1 gene carrying the glycine to alanine substitution at position 93 (Gly₉₃ → Ala), resulting in a toxic gain of mutant molecule (Gurney et al., 1994; Yim et al., 1996). The clinical phenotype of that animal model is characterized by an adult-onset of motor signs in the hindlimbs around 90 days of age, which progress rapidly to the end stage by 130–150 days (Dal Canto and Gurney, 1997). At the cell level, several structural changes in neurons and glial cells are known to precede neurodegeneration that takes place in the course of classical symptoms (Durand et al., 2006). In fact, for instance, the appearance of small vacuoles and early axonal retraction in the axons of motoneurons of 37- to 47-day-old non symptomatic SOD1^{G93A} mice might represent important pathophysiological issues influencing the disease onset and/or progression (Bruijn et al., 2004; Chiu et al., 1995; Fischer et al., 2004).

Recent papers have pointed out the appearance of early motor impairments that anticipate the classical signs of disease (Browne et al., 2006; Niessen et al., 2007; Ringer et al., 2009). Such early behavioral changes must be evaluated in more details because they could be of valuable contribution in the analyses of the effects of preclinical therapeutical approaches and also to interpret better the significance of preclinical cellular/molecular changes in the physiopathology of the disease.

Conventional tests used for assessing motor function in ALS rodent models, like rotarod, hanging wire and inclined plane are not able to detect deficits that occur early in the disease process (Knippenberg et al., 2010). Tail elevation is a parameter used in the generalized neurological screens to assess phenotypes in large-scale multicenter random programs and it has not been used in the clinical evaluation of ALS model (Rogers et al., 1997). Therefore, the purpose of this study was to investigate the progression of motor impairments in freely behaving presymptomatic SOD1^{G93A} mice beginning at postnatal day (P) 20, by means of the evaluation of tail elevation, footprint analyses and

automatic recordings of motor activities by an infrared motion sensor activity system. The analyses were continued in the symptomatic periods in parallel to conventional evaluation of body weight and neurological score as well as tests like rotarod, hanging wire and inclined plane. We have also performed electrophysiological registers of the compound motor action potential (CMAP) parameters amplitude, latency and nerve conduction velocity. To evaluate whether early behavioral changes are associated to motoneuron degeneration, we conducted quantitative Western blot analysis of neuronal markers in the spinal cord of presymptomatic (P20 and P60) and symptomatic (P120) ALS mice.

2. Results

2.1. Survival time, body weight and neurological score

There was a gender difference ($p < 0.05$) in the survival time between groups of male (P125) and female (P135) SOD1^{G93A} mice (Fig. 1). Two-way ANOVA showed time-dependent differences of body weight between groups of transgenic and wild-type (WT) males as well as transgenic and WT females and also among genders of transgenic animals (Fig. 2A, B; Table 1). Bonferroni comparisons of WT and SOD1 demonstrated a weight loss ($p < 0.001$) occurring after P90 in males and P110 in females (Fig. 2A, B). By weekly monitoring using the neurological score, tremors were recorded and disease progression was evaluated. The WT animals never showed signs of motor dysfunction. The

Fig. 1 – Tremor onset and survival time. Kaplan-Meier curves comparing tremor onset and survival time between groups of male and female SOD1^{G93A} mice. Clinical symptom onset (tremor in at least one hind limb upon tail suspension) occurred significantly ($p < 0.01$) sooner in male (P100) ($n = 28$) compared to female (P110) ($n = 25$) SOD1^{G93A} mice. Survival time (animals unable to right themselves within 30 seconds) showed a gender difference ($p < 0.05$) among male (P125) ($n = 25$) and female (P135) ($n = 28$) SOD1^{G93A} mice. The number of wild-type mice was as follows: females $n = 10$ and males $n = 11$.

Fig. 2 – Body weight and neurological score. Changes over time in body weight (gram, A, B) and neurological score (C, D) of male (A, C) and female (B, D) wild-type (WT) and transgenic SOD1^{G93A} mice were monitored weekly from P20 to P130. See text for details regarding neurological score. *** $p < 0.001$, two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test. Means $\pm$ SEM. The numbers of animals were as follows: WT females $n = 10, 27$ and males $n = 9, 27$; transgenic females $n = 9, 27$ and males $n = 9, 27$ for body weight and neurological score, respectively. The results of two-way repeated measure analyses of variance are shown in Table 1.

Kaplan–Meier (log-rank test) analysis showed the tremor onset occurring significantly sooner ($p < 0.01$) in male (P100) compared to female (P110) SOD1^{G93A} mice (Fig. 1). In relation to the motor impairments evaluated by neurological score, the two-way ANOVA showed time-dependent differences between groups of transgenic and WT males as well as females and a trend ($p = 0.07$) for difference between genders of transgenic animals (Fig. 2C, D; Table 1). Bonferroni comparisons of WT and SOD1 revealed the first decreases of the neurological score occurring at 90 days of age ($p < 0.001$) for ALS males and at 100 days of age ($p < 0.001$) for ALS females, that were worsened at the subsequent periods (Fig. 2C, D).

2.2. Behavioral analysis

2.2.1. Rotarod, hanging wire and inclined plane

The results of the rotarod, hanging wire and inclined plane tests are shown in Fig. 3A–F. The two-way ANOVA showed time-dependent differences between groups of transgenic and WT males as well as females for the three tests, and also between genders of transgenic animals (Table 1). Bonferroni comparisons of WT and SOD1 demonstrated a decreased performance of

transgenic males 10 to 20 days earlier compared to transgenic females for hanging wire and rotarod, respectively. Moreover, in inclined plane test, significant differences between groups of WT and SOD1 mice appeared lately in relation to the other tests, with a worse performance of transgenic females at P120 ($p < 0.001$) and for transgenic males at P130 ($p < 0.001$) when comparing with their respective WT. Other differences regarding the isolated effects of gender or age in the strands are presented in Table 1.

2.2.2. Tail elevation

An impairment in tail elevation was the first clinical sign found in the SOD1^{G93A} male and female mice that appeared in both genders already by P40 and remained different of their respective controls throughout period of analysis (Fig. 4A, B). Despite the tail of transgenic males acquired a horizontal position (score 1) earlier than transgenic females (Fig. 4A, B), the two-way ANOVA showed differences in the interaction of genotype/age between transgenic and WT for both genders, but not between genders of transgenic mice (Table 1). The scores of WT animals demonstrated a constant and maximum elevation of the tail over the entire observation period (score zero in the vertical axis). Other differences regarding the

Table 1 – The results of statistical analysis by two-way ANOVA concerning the effects of gender or genotype, the age of animals and the interaction gender/genotype versus age parameters.

Parameter	$\delta^{\text{WT}} \times \delta^{\text{WT}}$						$\delta^{\text{WT}} \times \delta^{\text{TG}}$						$\delta^{\text{TG}} \times \delta^{\text{TG}}$						$\delta^{\text{WT}} \times \delta^{\text{TG}}$																	
	Gender			Age			Interaction			Gender			Age			Interaction			Genotype			Age			Interaction			Genotype			Age			Interaction		
	p	F		p	F		p	F		p	F		p	F		p	F		p	F		p	F		p	F		p	F		p	F				
Body weight	***	295		***	474		***	32.3		***	243		***	96.9		***	37.4		***	12.5		***	393		***	31.3		***	20.0		***	253		***	21.5	
NS	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	319		***	1.0		***	215		***	1.6		***	172		***	172		***	195		***	175		***	175	
Rotarod	–	1.9	***	–	42.4	***	–	3.0	***	–	18.2		***	10.8		***	18.9		***	2.3		***	35.6		***	11.4		***	23.4		***	19.9		***	17.9	
Hangwire	–	0.6	***	–	4.1	***	–	0.6	***	–	74.4		***	5.9	*	***	36.1		***	2.4		***	26.6		***	11.5		***	72.2		***	39.0		***	23.3	
Inclined plane	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	81.8		***	–	0.3	***	25.2		***	2.5		***	31.7		***	31.7		***	217		***	66.5		***	66.5	
Tail elevation	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	50.1		***	7.4	*	***	63.5		***	0.7		***	50.1		***	17.2		***	87.9		***	29.8		***	29.8	
Footprint SL	t	3.4	***	–	9.9	***	t	1.6	***	–	71.5		***	5.4	*	***	41.9		***	2.5		***	49.4		***	14.8		***	266		***	42.3		***	30.4	
Footprint BW	–	0.5	***	–	7.4	***	–	1.5	***	–	112		***	32.0	***	–	47.6		***	18.3		***	91.4		***	26.8		***	27.4		***	57.9		***	45.5	
analysis	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5.7		***	–	0.01	***	0.08		***	0.1		***	3.9		***	2.2		***	0.1		***	4.0		t	1.8	
Automatic	–	0.04	***	–	5.6	***	–	0.03	***	–	4.7		***	7.0	*	***	0.4		***	1.9		***	7.9		***	0.01		***	12.2		**	1.0		–	1.9	
NWMM	–	0.1	***	–	2.8	***	–	1.5	***	–	6.0		***	–	0.1	***	0.01		***	0.2		***	9.3		***	0.4		***	4.1		*	3.9		–	0.02	
evaluation	NSM	**	10.3		7.1	***	–	0.8	***	–	3.0		*	3.9		–	0.6		***	3.7		*	6.3		**	0.5		**	8.4		–	1.0		**	4.1	
NLM	–	2.4	***	–	1.9	***	–	4.0	***	–	3.0		*	3.9	t	***	0.6		***	3.7		*	6.3		**	0.5		**	8.4		–	1.0		**	4.1	

The follow parameters were evaluated in male (δ^{WT}) and female (δ^{WT}) wild-type (WT) and SOD1^{G93A} mice: body weight, neurological score (NS), rotarod, hangwire, inclined plane and tail elevation. In the footprint analyses, the parameters step length (SL), base width (BW) and spreading toes (ST) were measured. In the automatic evaluation of motor behavior in an open field by means of an infrared motion sensor activity monitor, the parameters number without movements (NWM), number of small movements (NSM) and number of large movements (NLM) were evaluated (see text for details). The F-values were calculated by the two-way ANOVA repeated measures. The higher the F-value, the more significant the difference between groups. The p value is the level of significance: t is a trend (0.05 < p < 0.08); *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; – is no variation or p > 0.05.

The follow parameters were evaluated in male (δ^{WT}) and female (δ^{TG}) wild-type (WT) and SOD1^{G93A} mice: body weight, neurological score (NS), rotarod, hangwire, inclined plane and tail elevation. In the footprint analyses, the parameters step length (SL), base width (BW) and spreading toes (ST) were measured. In the automatic evaluation of motor behavior in an open field by means of an infrared motion sensor activity monitor, the parameters number without movements (NWM), number of small movements (NSM) and number of large movements (NLM) were evaluated (see text for details). The F-values were calculated by the two-way ANOVA repeated measures. The higher the F-value, the more significant the difference between groups. The p value is the level of significance: t is a trend (0.05 < p < 0.08); *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; – is no variation or p > 0.05.

isolated effects of gender or age in the strands are presented in Table 1.

2.2.3. Footprint analysis

The results of the footprint analyses of step length and hind paw base are shown in Figs. 5A–D; 6A, B. The two-way ANOVA showed time-dependent differences between groups of transgenic and WT males as well as females for step length and base width measures (Table 1). The evaluation of the spreading toes showed a time-dependent decrease of the values (data not shown) between groups of transgenic and WT males and a trend (p=0.07) for reduction between transgenic and WT females (Table 1). Time-dependent differences were found between genders of transgenic mice for step length and base width parameters (Table 1). Bonferroni comparisons of WT and SOD1 demonstrated decreases in the step length measures of transgenic females 40 days earlier than transgenic males and in the base width measures of transgenic males 10 days earlier than transgenic females (Fig. 5A–D, also illustrated in Fig. 6). Other differences regarding the isolated effects of gender or age in the strands are demonstrated in Table 1.

2.3. Automatic evaluation

The results of automatic evaluation by infrared motion sensor activity system are shown in the Fig. 7A–F. Despite some differences in the three analyzed parameters (without movement events, small movement events, large movement events) regarding age or genotype between groups of WT and transgenic mice of both genders, the two-way ANOVA demonstrated time-dependent interactions only for large movement events between groups of WT and transgenic females and also between genders of transgenic mice (Table 1). Bonferroni comparisons of WT and transgenic females demonstrated increases of without movement events and large movement events developed by SOD1^{G93A} females compared to WT females in the III and IV periods of analysis (Fig. 7A–F).

It should be noticed that two-way ANOVA also pointed the differences in the interaction gender/age between male and female WT in the body weight, rotarod and large movement event measurements (Table 1).

2.4. Electrophysiological measurements

In order to determine whether there were differences in latency, velocity and amplitude in the conduction of the nerve input in the sciatic nerve of SOD1^{G93A} compared with WT male littermates, we recorded the parameters between the time of the stimulus onset in the nerve and the initial positive potential recorded in gastrocnemius muscle. Since the evaluations were done in different groups of WT and transgenic mice with specific ages, the results were treated with Mann–Whitney U-test and not evaluated with two-way ANOVA (Fig. 8A–C). CMAP amplitude was decreased (p<0.05) at P40 in SOD1 mice compared to controls and no differences have been detected at P60 and P80 (Fig. 8A). Changes in the amplitude was found again in the sciatic nerve of ALS mice at the end stage (P120) of the disease when the recording decreased again in SOD1^{G93A} animals (p<0.01) compared to WT. We observed

Fig. 3 – Rotarod, hanging wire and inclined plane. Changes over time in the rotarod (A, B), hanging wire (C, D) and inclined plane (E, F) performances (seconds) of male (A, C, E) and female (B, D, E) wild-type (WT) and transgenic SOD1^{G93A} mice were monitored weekly from P20 to P130. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test. Means $\pm$ S.E.M. The numbers of animals were: WT females $n = 13$, 11 and males $n = 15$, 10; transgenic females $n = 15$, 10 and males $n = 15$, 10 for rotarod and hanging wire, respectively. The results of two-way repeated measure analyses of variance are shown in Table 1.

increases in the latency in the conduction of the nerve input in the sciatic nerve of SOD1^{G93A} mice already at P20 ($p < 0.05$) with a maximum value by P120 (Fig. 8B) when compared with WT animals. The nerve conduction velocity was decreased in SOD1 mice from P20 ($p < 0.05$) up to the final point of disease at P120 (Fig. 8C).

2.5. Western blot analysis

To determine whether these early motor phenotypes are associated with spinal cord motoneurons degeneration, we conducted Western blot analyses using antibodies to the cytoskeletal neuronal marker neurofilament 200 (NF-200) and

Fig. 4 – Tail elevation. Changes over time in tail elevation accessed by tail score measurements (see text for details) of male (A) and female (B) wild-type (WT) and transgenic SOD1^{G93A} mice were monitored weekly from P20 to P130. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test. Means $\pm$ SEM. $n = 9$, in all evaluated groups. The results of two-way repeated measure analyses of variance are shown in Table 1.

to the motoneuron marker choline acetyltransferase (ChAT) in the presymptomatic (P20 and P60) and symptomatic (P120) SOD1^{G93A} and WT female mice of respective age. Although we

found early motor impairments at presymptomatic ages, no evidence for neuronal loss was found in ventral portion of the lumbar spinal cord of SOD1^{G93A} mice compared with WT

Fig. 5 – Footprint analyses. Changes over time in step length (A, B) and hind paw base (C, D) (measurements in centimeters) of male (A, C) and female (B, D) wild-type (WT) and transgenic SOD1^{G93A} mice were monitored weekly from P20 to P130. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test. Means $\pm$ SEM. $n = 11$, in all evaluated groups. The results of two-way repeated measure analyses of variance are shown in Table 1.

Fig. 6 – Walking pattern. (A) Footprints of a wild-type mouse at the 120 days of age. Three-step parameters were measured by footprint analyses: stride length, hind base width and spreading of toes. (B) Footprints of a SOD1^{G93A} mouse at the same age (symptomatic stage) of the WT mouse presented in A.

animals as seen by the unaltered levels of neurofilament 200 (Fig. 9) and ChAT (not shown). At the symptomatic age however, the levels of neurofilament and ChAT decreased substantively (Fig. 9A, B). The levels of neurofilament 200 increased in postnatal development of normal mice, which was already described (Riederer et al., 1996; Schlaepfer and Bruce, 1990), thus highlighting its diminution at the late stage of the disease.

3. Discussion

The identification of early motor deficits in transgenic animal models of ALS is crucial for the development of therapeutical strategies aimed at preventing motoneuron cell death. However, conventional tests used for assessing motor function in these animals, which are mainly relied on forced exercise tasks, are not sensitive enough to detect early behavior abnormalities (Hayworth and Gonzalez-Lima, 2009). Therefore, in addition to conventional forced exercise tests (rotarod, hanging wire and inclined plane) and also the classical assessment of neurological score and body weight, we investigated the progression of motor

performance deficits in freely behaving presymptomatic SOD1^{G93A} mice beginning at P20, using the evaluation of tail elevation, footprint analyses and automatic (observer-independent) motor activities by an infrared motion sensor activity system. We also performed electrophysiological evaluations in order to measure the CMAP parameters (amplitude, latency and conduction velocity) in the mouse sciatic nerve.

Previously, the earliest reported behavioral symptom in the SOD1^{G93A} mice was a fine tremor of the hindlimbs observed around 100 days of age when animals were suspended by their tails (Barneoud et al., 1997; Chiu et al., 1995). We found a tremor onset in free moving transgenic males by P100 that was delayed in the ALS females (P110), which is in agreement with a previous paper (Veldink et al., 2003), despite some studies have reported no sex differences in tremor onset in SOD1^{G93A} mice (Heiman-Patterson et al., 2005; Knippenberg et al., 2010). Such discrepancies may be due to the subjective nature of the examination of initial tremor.

There has been a varied range of body weight impairments reported for SOD1^{G93A} mice (Chiu et al., 1995; Fischer et al., 2004; Knippenberg et al., 2010). Our results are in agreement to those of Weydt et al. (2003) showing an overall difference of the body weight among SOD1^{G93A} and WT mice with the onset of weight loss for males (P90) and for females (P110) near the age of tremor onset.

Several studies have described longer survival of females than males in SOD1^{G93A} mice (Choi et al., 2008; Kirkinezos et al., 2003) while others have reported no significant gender differences (Hayworth and Gonzalez-Lima, 2009; Knippenberg et al., 2010). Our results showed a significant gender difference in the average survival time for males (P125) and for females (P135).

The rotarod was specifically designed for making measurements of neurological deficits in rodents (Dunham and Miya, 1957), and it is one of the most commonly used test of motor impairment in mice. Our results showed an earlier less balance of SOD1^{G93A} male (P90) than female (110) mice on rotarod apparatus than respective controls. Those findings are in agreement to Smittkamp et al. (2008) (females at P113) and to Kirkinezos et al. (2003) (males at P100) and in disagreement to others that showed the onset of impaired performance of ALS females in the rotarod by P75 (Hayworth and Gonzalez-Lima, 2009; Kirkinezos et al., 2003). Differences in the protocols, diameter of the rotating cylinders and genetic background of mutant SOD1^{G93A} mice may explain the different published results of the rotarod test (Brooks and Dunnett, 2009).

In our study, the hanging wire sensitivity to detect the onset of ALS behavioral impairments seemed to be similar to rotarod. Like rotarod results, the impaired hanging wire performance was earlier in males (P100) than females (P110), thus near the classical symptom onset (fine tremor of the hindlimbs). Our results suggest that although rotarod and hanging wire may be good tools for evaluating balance, coordination and strength in late stage of disease progression, these tests are not sensitive measures to detect early motor changes of the disease in ALS mice as discussed below.

Barneoud et al. (1997) have reported an early deficit in the inclined plane by SOD1^{G93A} mice (P60) by employing a different protocol of analysis. We showed significant differences among WT and SOD1^{G93A} mice in the inclined plane measures with an

Fig. 7 – Motor activity by automatic evaluation. Changes over time in spontaneous activity corresponding to number without movement events (A, D), small movement events (0.01-second duration, motility) (B, E) and large movement events (1.0-second duration, locomotion) (C, F) of male (A, B, C) and female (D, E, F) wild-type (WT) and transgenic SOD1^{G93A} mice were measured by means of an Infrared Motion Sensor Activity Monitor weekly from P40 to P120. The data were pooled in periods of analysis: period I (P40–60), II (P70–80), III (P90–100) and IV (P110–120) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test. Means $\pm$ SEM. $n = 11$, in all evaluated groups. The results of two-way repeated measures analyses of variance are shown in Table 1.

initial deficit at P120 for female and at P130 for male ALS mice, thus later than the first behavioral differences pointed by others tests and therefore less sensitive to detect early motor deficits in ALS mouse model.

We also found a very early (P40) and progressive impairment in tail elevation in SOD1^{G93A} male and female mice

compared with WT. To our knowledge, it is the first time such an early impairment in tail elevation of ALS rodents has been reported, despite a recent publication (Suzuki et al., 2010) that showed an increased tone in the tail musculature, resulting in a contracted segmentally spastic tail posture by P130 in ALS mice of both genders. Tail elevation is a parameter used in the

primary SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital phenotype assessment (SHIRPA) screen. SHIRPA battery was developed as a generalized neurological screen to assess phenotypes in a large-scale multicenter random mutagenesis program (Rogers et al., 1997). Using the SHIRPA tail score modified by our group, the animals were classified in 4 different grades to describe tail elevation. WT

animals maintained a constant and maximum vertical elevation of the tail over the whole observation period. P30–40 ALS males showed an earlier and faster decline in the tail score compared with ALS females. After that period, the aspect of the progressive impairment in the shape position was similar in the transgenes of both genders. This may explain the results of two-way ANOVA on significances between transgenic male and female groups regarding gender and animal age without difference in the interaction gender versus age. Moreover, the first deficit in tail elevation was horizontal and dragging positioning suggesting a proximal muscle weakness. Later, as the classical signals of disease progress, spasticity and hyperreflexia took place.

We have also found marked differences in gait pattern between WT and SOD1^{G93A} groups of mice. Our results in footprint analyses are in partial agreement to previous publications that reported a shortened gait by about P125 for ALS males and females (Chiu et al., 1995; Knippenberg et al., 2010), a little later than that found in our study for ALS male mice (P100) and substantially different (later) from our transgenic females in which that parameter corresponded to an important early (P60) signal of the disease. Such differences found in the published reports may be due to the number of evaluated animals and individual variability. Other point to take into attention is the detail of the genotype of transgenic strands bearing the number of copies of mutant human SOD1 gene that could interfere in the phenotype of the colony, or also the genetic backgrounds (Heiman-Patterson et al., 2005), that are not commonly shown in the descriptions. Anyhow, it should be noticed that the timing of early appearance of step length changes in ALS females in our study corresponded with the timing of the early changes of the motor unit or neuromuscular junction reported previously (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Kennel et al., 1996). Furthermore, the early changes in the hind paw step angle and hind paw stance width in SOD1^{G93A} males and females at P45–60 reported previously (Guillot et al., 2008) opened up the possibility for additional findings in more accurate ongoing future analyses. We also observed later changes in hind paw base measures in transgenic males and also females, an occurrence that has not been described for ALS rodent models. It is possible that the later deterioration of the neurological condition has allowed the ALS females to adapt stepping earlier toward a diminution of the step length which has prompted them a later base width decrement, an adaptive behavior not evidenced in the early-compromised ALS males.

Regarding the spontaneous motor behavior, we observed the appearance of significant increases in number of events

Fig. 8 – Electrophysiological measurements. Changes over time in evoked Compound Motor Action Potential (CMAP) in the gastrocnemius muscle after stimulation of the sciatic nerve in male wild-type (WT) and transgenic SOD1^{G93A} mice were monitored at P20, P40, P60, P80, P100 and P120. The data of CMAP amplitude (A) are expressed in millivolts (the data of P100 animals were missed), the data of latency (B) are expressed in milliseconds and the data of nerve conduction velocity (C) are expressed in meters per second (m/s). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Mann-Whitney U-test. Means $\pm$ SEM. $n = 5$, in all evaluated groups.

Fig. 9 – Western blot analysis. The relative optical density of cytoskeletal neuronal marker neurofilament 200 (200 kDa) by means of Western blot analysis in the ventral region of the lumbar spinal cord of wild-type (WT) and transgenic SOD1^{G93A} female mice at different postnatal ages (P20, P60, P120) is shown in A. The representative bands of the neurofilament 200 of animals as well as of the choline acetyltransferase (ChAT, 68 kDa) of P120 WT and SOD1 mice are illustrated in B. β -Tubulin III (55 kDa) was used as sample loading control. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to compare the groups. The numbers represent the mean $\pm$ SEM. $n=5$ (WT) and 6 (transgenic).

without movement and in number of events of large movement in females SOD1^{G93A} in the third period of analysis (P90–100). Interestingly, no changes in the spontaneous movement were detected in the ALS males compared to control. Infrared motion sensor activity system has been used to show motor impairment in the open field of rodents with spinal cord injury (Andrade et al., 2010; Guzen et al., 2009). Overall, the first appearances of impairments in neurological score, fine tremors in the hindlimbs, the rotarod, hanging wire and inclined plane performance were earlier in transgenic males than transgenic females, different from the onset of step length impairment in the footprint that was earlier in transgenic females compared to transgenic males. It is possible that the later detrimental evolution of several major parameters in transgenic females with earlier decreases of step length has allowed those females to adapt themselves in the open fields, in line regarding the gender difference in the step length, by increasing the number of large movements and consequently the number of events without movements. The transgenic males did not have the opportunity to adapt the spontaneous locomotion because their more precocious deterioration of general condition. It is also possible that the infrared motion sensor activity system was not able to register the fine tremor described herein because no statistical differences were found regarding the number of small movements between strands of both genders.

Deterioration of the nerve conduction could be assessed by electrophysiological measurements. However, few studies have

detailed functional changes in nerve conduction in the ALS rodent models despite the importance of the evaluation at clinical practice. Our results are in line and extend a prior description that has shown early changes in the electrical properties of sciatic nerve of SOD1^{G93A} mice. Decrease in the amplitude by P63 (Azzouz et al., 1997) was registered in the sciatic nerve of SOD1^{G93A}. We have contributed to this analysis by showing early changes in electrophysiological parameters by P20–40, which might be related to a very precocious functional impairment of motoneurons (Shefner et al., 2002) and/or decreases of motor units (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Kennel et al., 1996) in the SOD1^{G93A} mice at P47–60. Furthermore, the massive changes in the electrophysiological parameters that were detected in our work after P100 are also in line with a previous publication which has also shown a biphasic decrement of the CMAP amplitude in ALS mice (Azzouz et al., 1997). Such later massive changes are coincident with the appearance/worsening of the majority of functional impairments in the ALS animals and probably are related to neuronal death in this phase (Hegedus et al., 2009; Shefner et al., 2002) that is also in line with the electromyographical register in the SOD1^{G93A} mice at the endpoint about P120–130 (Azzouz et al., 1997; Miana-Mena et al., 2005). All in all, it is possible CMAP amplitude has been decreased in sciatic nerve of SOD1 mice since from the adolescence to adulthood, in line with very precocious electrophysiological changes of the latency and nerve conduction velocity recorded in those mice, and the absence of statistical significances at P60 and P80 was due to small number of the employed animals in that analysis.

In fact, the early changes in the tail elevation and electrophysiological measures before P60 described in our works may not be accompanied by neuronal death at ventral horn of the lumbar spinal cord because no changes in the level of neurofilament 200 and ChAT were detected in the P20 and P60 SOD1^{G93A} mice, which is in agreement to previous papers that have found first diminution in the counts of motoneurons in the ALS rodent models after P90 (Chiu et al., 1995; Gurney et al., 1994). That is in line with the knowledge that the deterioration of the classical symptoms of the disease in the rodent model is accompanied by the death of motoneurons in the spinal cord (Chiu et al., 1995), which is also in agreement to our work that showed decreased levels of motoneuron markers (neurofilament 200 and ChAT) in the ventral spinal cord of SOD1^{G93A} mice at the fully manifested symptomatic phase by P120. It is possible that the early motor behavioral impairments described in this paper are associated to morpho-functional alterations in still alive motoneurons or in the motoneuron/Schwann cell unity. It should be highlighted that several papers have used different histological stainings, including the recent described Fluoro-Jade C and peroxynitrite, to show the absence of neuronal death before the onset of classical ALS symptoms (around P90), despite the early changes in neurons, i.e., vacuoles in swollen mitochondria, diminution of large axons in the ventral roots and motor endplate denervation have been found by P37–P47 of age (Fischer et al., 2004; Chiu et al., 1995; Yang et al., 2011). Finally, biochemical alterations in the Schwann cells of sciatic nerve of early ALS have just been described in animal models (Chen et al., 2010) and the implicated events in the mechanisms of ALS are the current subject of ongoing research of our laboratory.

In conclusion, the conventional tests used for assessing motor function in ALS mouse model are not sensitive enough to detect early changes of the disease. Tail elevation score, footprint analyses and electrophysiological evaluations might contribute to record disease onset and to provide additional parameters to study the physiopathology of the disease.

4. Experimental procedures

4.1. Animals

Transgenic mice carrying high copy numbers (25 ± 1.5) of the transgene with the G93A human SOD1 mutation, hereafter referred to as SOD1G93A were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and the colony was established in the biotery of the São Paulo University Medical School in a specific pathogen-free environment and maintained on a background B6SJL. Male SOD1G93A mice were crossed with non-transgenic B6SJL/J hybrid females as previously described by Gurney et al., 1994. Mice were genotyped by PCR amplification of DNA extracted from the tails to identify the SOD1 mutation (described below). Non-transgenic littermates were used as controls (wild type, WT). Animals were kept under controlled temperature and humidity conditions with a standardized light–dark cycle (lights on at 7.00 a.m. and off at 7.00 p.m.) and free access to food pellets and tap water. The study was conducted under protocols approved by the Animal Care and Use Ethic Committee at University of São Paulo and in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

The number of mice varied for each test and was about 10–27 of each group (male and female, and also WT and SOD1^{G93A} mice). We have used five different mice per group in every time point of the electrophysiological measurements and Western blot analysis.

For genotyping, the DNA was extracted from all mice tails by using a protocol described previously (Scorisa et al., 2010). Briefly, 500 μ l of 1 mg/ml K proteinase buffer (Sigma, USA) (Tris–HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 10 mM, EDTA 30 mM pH 8.0 and SDS 0.5%) was added to each tail sample. The suspension was incubated at 55 to 60 °C during 48 hours and then centrifuged (16,000 $\times$ g/10 minutes, at 4 °C). The aqueous phase was replaced into a new tube and 500 μ l cold isopropanol was added. After gently mixing, DNA became visible and could be precipitated for centrifugation (16,000 $\times$ g/2 minutes, at room temperature). The DNA pellet was washed twice with 500 μ l 70% ethanol. After the ethanol removal and a 5-minute drying, the DNA was resolved in 50 μ l TE buffer (10 mM Tris–HCl pH 7.4; 1 mM EDTA in deionized water). DNA samples were stored at 4 °C until PCR assay. PCR assay was performed as described earlier (Rosen, 1993), by using the following primers: IMR113 (5′-ATCAGCCCTAATCCATCTGA-3′) and IMR114 (5′-CGCGAC-TAACAATCAAAGTGA-3′) to amplify SOD1h fragment, and also IMR042 (5′-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3′) and IMR043 (5′-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3′) to amplify a fragment of murin interleucin-2 as positive control. For each sample, PCR assay included 12.5 μ l PCR Master Mix (2X) (Fermentas Life Sciences, USA), 0.5 μ l of each primer described above, 1 μ g DNA and water free from nucleotides for a final

volume of 25 μ l, submitted to an initial period of 3 minutes at 95 °C, followed by 36 PCR amplification cycles (30 seconds at 95 °C, 30 seconds at 60 °C and 45 seconds at 72 °C) and finally 2 minutes at 72 °C. PCR products with 1 μ l blue green could be visualized in a 1% Agarose gel.

4.2. Assessment of neurological score and body weight

All procedures were performed by two observers blinded to genotype. Neurological score were performed in mice weekly starting at postnatal day 20 (P20) by visual inspection. Neurological score was based on the scale originally described by Gurney et al. (1994) and modified by others (Weydt et al., 2003). The scores from “0” to “5” are defined as follow: “0” indicates a healthy mouse with no classical signs of ALS; “1” indicates the presence of tremors in the hind legs that occur in early disease stage; “2” indicates that mice have difficulty in separating their hind legs when suspended by their tails, which is indicative of muscle weakness; “3” was given when mice exhibit difficulty walking, either stumbling or wobbling; “4” was given when mice were unable to walk on all four legs and drag their hind legs; “5” was given when mice were unable to right themselves after 30 seconds.

When the animals reached a score of “4”, the access to food and water was facilitated by placing food pellets on the cage floor to all transgenic mice. Reaching a score of “5”, the animals were euthanized for ethical reasons. Onset was defined retrospectively as the earliest time when the mice showed symptoms (score <4) for ≥ 2 consecutive weeks.

Animals were weighed weekly after P20 with a normal digital balance. For weighing, animals were placed in a plastic bowl. Weighing was always performed between 11 a.m. and 2 p.m. to avoid diurnal variations.

4.3. Behavioral analysis

4.3.1. Rotarod, hanging wire and inclined plane

Beginning at P20, we analyzed weekly the motor function using a rotarod apparatus engineered by Rafael Augusto Reis Moreira (Brazil). The dimensions and specifications of the apparatus were described elsewhere (Miana-Mena et al., 2005). Each animal was given three trials and the maximum period (seconds) that it could remain on a rotating axle (3.5 cm diameter; speed of rotation: 15 rpm) without falling was measured. The test was stopped after an arbitrary limit of 180 seconds. In the first 2 weeks, an adaptation period of three trials was performed before the beginning of the recordings.

Hanging wire test began at P20 and was performed weekly, 24 hours before the rotarod test. Animals were placed on the wire lid of a conventional housing cage. The lid was gently turned upside down, 50 cm above a soft surface to avoid injuries. The latency to fall was timed. Each mouse was given up to three attempts for a maximum of 180 seconds and the longest period was recorded.

The inclined plane apparatus consisted of a hinged wooden board which was set at an angle of 0° (Guzen et al., 2009). The animals at P20 were placed head up on the board and it was raised at constant speed until the mouse slip out the board. The maximum angle reached without slip out was recorded.

4.3.2. Tail elevation

Tail elevation was determined weekly starting at P20 by visual inspection using the tail score during the assessment of neurological score. Tail score was based on the SHIRPA tail scale, procedure developed by Rogers et al. in MRC, United Kingdom (Niimi and Takahashi, 2009; Rogers et al., 1997) and modified by our group. The scores “0” to “3” were defined as follows: “0” indicates vertical position of the tail (maximum elevation); “1” indicates horizontally extended tail; “2” indicates dragging tail for more than 20 seconds; “3” was given when the tail displayed proximal contracture and distal laxity (mice with this score were in the terminal phase of the disease).

4.3.3. Footprint analyses

The footprint test was used to compare the gait of SOD1^{G93A} transgenic mice to WT control mice. To obtain footprints, the hind feet of the mice were coated bilaterally with a black nontoxic paint. The animals were then allowed to walk along a 50-cm-long, 10-cm-wide runway (with 10-cm-high walls). All mice had two training runs and were then given one run per week, beginning at P20. A fresh sheet of paper was placed on the floor of the runway for each run. The footprint patterns were analyzed for three classical step parameters (all measured in centimeters) (Fig. 6A). (1) Stride length was measured as the average distance of forward movement between each stride. (2) Hind-base width was measured as the average distance between left and right hind footprints. This value was determined by measuring the perpendicular distance of a given step to a line connecting its opposite preceding and proceeding steps. (3) Spreading of toes was measured as the average of the distance between the first and fifth toes.

For each step parameter, two values were measured from each run, excluding footprints made at the beginning and end of the run where the animal was initiating and finishing movement, respectively. The mean value of each set of two values was used in subsequent analyses. When the gait pattern became “dragged” and irregular, a “0” centimeter was assigned for each animal. Footprints located directly side by side indicate sitting of the animal and were not included in the evaluation of steep length (Dijkstra et al., 2000).

4.4. Automatic evaluation

The motor behavior was evaluated in an open-field by automatic recording of motor activity based on movement time, without any intervention by the investigator, using an infrared motion sensor monitor (Coulbourn Instruments, USA) as described previously (Andrade et al., 2010; Gomide and Chadi, 2004). The experimental room was diffusely illuminated and kept at constant temperature and humidity (Chadi et al., 1993). Rats were individually placed in polyethylene cages (37×17×30 cm), which had an infrared motion sensor on the top of the wall, and the register was done in blocks of 2-minutes observation time during 30 minutes (Chadi et al., 2001). From the resulting data, the following dependent measures parameters were calculated: without-movement time, which is defined as the mean of the time (seconds) during which the animal did not move or moved for a time less than 0.01 second during the observation time; without-movement events are the mean

number of events registered at every without-movement time during the observation time; small-movement time, which is defined as the mean of the time (seconds), during which the animal moved between a time interval superior to 0.01 second but inferior to 0.1 second, during the observation time; small-movement events are the mean number of events registered at every small-movement time, during the observation time; large-movement time, which is defined as the mean of the time (seconds) during which the animal moved in a time interval superior to 1.0 second; large-movement events are the mean number of events registered at every large-movement time, during the observation time. The data were transferred to a host computer and analyzed by specific software. Only the numbers of without-movement, small-movement and large-movement events were used in the present evaluation. The graphics were plotted in periods in x-axis, corresponding to: first period (P40–60), second period (P70–80), third period (P90–100) and fourth period or end stage of disease (P110–120). It has to be emphasized that the movements (large or small) are interrupted by periods of time-without movement, except when animal develop continuous such larger movements much bigger in time that 1.0 second (an extremely anomalous situation that has not occurred in the present work) that would decrease the time without movement events.

4.5. Electrophysiological measurements

The electrophysiological measurements were recorded in different groups of male SOD1^{G93A} mice and wild-type animals at P20, P40, P60, P80, P100 and P120 anesthetized with ketamine chlorhydrate (Ketalar) and diazepam (Valium) (1 ml/kg of a solution containing 11.25 mg ketalar and 0.375 mg of valium; IP). Mice were deeply anesthetized and normal body temperature was maintained using a heater. The sciatic nerve was exposed and the animals were submitted to electrophysiological evaluation consisting of measurement of compound motor action potential (CMAP). Such evaluation aimed at checking nerve electrophysiological integrity and measuring parameters used in calculating the mean between the amplitudes, the mean between the latencies and the mean between the conduction velocities of each potential. To reduce possible interference, 2 ground electrodes were installed after surgical nerve exposure, one of which was a monopolar straight needle electrode (26 G) placed within the muscle adjacent to the nerve; the other ground electrode was manufactured from 316 L stainless steel wire and its extremity was of helical configuration so as to surround the nerve and increase the contact area. The bipolar electrodes for CMAP stimulation were manufactured from 316 L stainless steel wire 0.5 mm in diameter, with anode–cathode separation of 1 mm. Recordings were made on a 2-channel electromyography system (Keypoint portable; Medtronic, Skovlunde, Denmark), with the high-frequency filter set at 5 kHz and the low-frequency filter set at 2 Hz. Electric stimulation produces artifacts; to reduce them, rectangular monophasic electric pulses with a pulse width of 0.04 ms were used.

For CMAP measurements the stimulation electrode was placed on the nerve at distance of 1 cm from the recording electrode placed on the gastrocnemius muscle through percutaneous puncture in the distal third of the paw, ipsilaterally to the surgical procedure, with a coaxial needle.

An initial negative deflection and biphasic waveform indicated recording at the motor point. The CMAP amplitude was measured only in positive peak (Dumitru and DeLisa, 1991). The latency of evoked potentials was measured in milliseconds as described elsewhere (Azzouz et al., 1997). From such recorded potential, the conduction velocity was calculated using the distance of 1 cm divided by latency. The records of SOD1^{G93A} animals were compared with WT animals at the studied time points.

4.6. Western blot analysis

WT and SOD1^{G93A} female animals at P20 ($n=5$), P60 ($n=5$) and P120 ($n=5$) were killed by decapitation. The lumbar spinal cords of rodents were rapidly removed, trimmed in ventral and posterior parts and immediately frozen in dry ice and stored in -70°C freezer until processing.

Tissues from the ventral part of mouse spinal cords, including the ventral horn, were homogenized in lyses buffer containing 1% protease inhibitor cocktail (Sigma), 1% NP40 (Sigma), 0.5% sodium deoxycholate (Sigma), 1 mM EDTA (Sigma), 1 mM EGTA (Sigma), diluted in phosphate-buffered and centrifuged (14,000 rpm) for 30 minutes at 4°C as described previously (Chadi et al., 2008; Silva et al., 2009); supernatants were transferred into new tubes and stored at -70°C until use.

Protein concentration was determined according to the method of Bradford (1976). 60 μg of protein was separated on a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide (Bio-Rad, USA) by an electrophoresis gel. Proteins were transferred onto PVDF membranes (Bio-Rad) for 1 hour in 100 V. After 30-minute blocking with 10% milk in Tris-buffered saline-tween (TBS-T), the membranes were incubated over night at 4°C with a rabbit antibody to neurofilament 200 (NF 200) (1:10,000 in 3% milk/TBS-T, Sigma) or a goat antibody to choline acetyltransferase (ChAT) (1:1000 in 3% milk/TBS-T, Millipore, USA). Membranes were washed twice for 10 minutes in TBS-T and incubated at room temperature for 1 hour with IgG-ECL anti-rabbit or anti-goat conjugated secondary antiserum (1:2000–10,000, respectively; Amersham Biosciences, UK). Blots were washed for 10 minutes twice with TBS-T and once with TBS. After final washes, the membranes were incubated with Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, USA) for 3 minutes. The membranes were exposed to an X-ray film for imaging (HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences, USA) to visualize protein bands. After, blots were stripped, blocked and incubated with rabbit antibody to β -tubulin III (1:30,000 in 3% milk/TBS-T, Sigma) during 1 hour at room temperature and developed as previously described. The films were scanned (HP Scanjet G4000 series) and NF 200 and ChAT protein levels were quantified by densitometry by means of a computer-assisted image analyzer using Image J software (version 1.43u, National Institute of Health, USA). Density normalization was done by dividing the proteins by β -tubulin III density values.

4.7. Statistical analysis

Survival and tremor onset were analyzed by Kaplan–Meier (log-rank test). Statistical analyses for all behavioral data

consisted of two-way repeated measures analyses of variance (RM ANOVA) to compare genotypes (SOD1^{G93A} and WT) and gender (males and females) as the between factors, variable and time (age), as the within factors variable. Differences between groups were identified via post hoc comparisons. Statistical significance for electrophysiological measurements between the males SOD1^{G93A} and WT was assessed using Mann–Whitney U-test.

In cases where a mouse had to be killed before the end of the study (reaching a score of “5”) and in rare cases where data points were missing (from low motivation to perform the motor tasks), those points were filled in with the mean of that time point (Smittkamp et al., 2008). All analyses were performed using Prism 5.0 (Graph Pad, CA). Data were presented as mean $\pm$ SEM and significance level was set at $p<0.05$.

In the Western blot analysis experiments, the one-way analysis of variance (ANOVA) was applied to compare the transgenic and wild-type animals, using Tukey’s multiple comparison post test to identify statistical significances between groups.

Acknowledgments

This work has been supported by grants from FAPESP, CNPq and CAPES (Brazil).

REFERENCES

- Andersen, P.M., 2004. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Suppl. Clin. Neurophysiol.* 57, 211–227.
- Andrade, M.S., Mendonca, L.M., Chadi, G., 2010. Treadmill running protects spinal cord contusion from secondary degeneration. *Brain Res.* 1346, 266–278.
- Azzouz, M., Leclerc, N., Gurney, M., Warter, J.M., Poindron, P., Borg, J., 1997. Progressive motor neuron impairment in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 20, 45–51.
- Barneoud, P., Lolivier, J., Sanger, D.J., Scatton, B., Moser, P., 1997. Quantitative motor assessment in FALS mice: a longitudinal study. *NeuroReport* 8, 2861–2865.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brooks, S.P., Dunnett, S.B., 2009. Tests to assess motor phenotype in mice: a user’s guide. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 519–529.
- Browne, S.E., Yang, L., DiMauro, J.P., Fuller, S.W., Licata, S.C., Beal, M.F., 2006. Bioenergetic abnormalities in discrete cerebral motor pathways presage spinal cord pathology in the G93A SOD1 mouse model of ALS. *Neurobiol. Dis.* 22, 599–610.
- Bruijn, L.I., Miller, T.M., Cleveland, D.W., 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 723–749.
- Chadi, G., Moller, A., Rosen, L., Janson, A.M., Agnati, L.A., Goldstein, M., Ogren, S.O., Pettersson, R.F., Fuxe, K., 1993. Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP-lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. *Exp. Brain Res.* 97, 145–158.

- Chadi, G., Andrade, M.S., Leme, R.J., Gomide, V.C., 2001. Experimental models of partial lesion of rat spinal cord to investigate neurodegeneration, glial activation, and behavior impairments. *Int. J. Neurosci.* 111, 137–165.
- Chadi, G., Silva, C., Maximino, J.R., Fuxe, K., da Silva, G.O., 2008. Adrenalectomy counteracts the local modulation of astroglial fibroblast growth factor system without interfering with the pattern of 6-OHDA-induced dopamine degeneration in regions of the ventral midbrain. *Brain Res.* 1190, 23–38.
- Chen, K., et al., 2010. Inducible nitric oxide synthase is present in motor neuron mitochondria and Schwann cells and contributes to disease mechanisms in ALS mice. *Brain Struct. Funct.* 214, 219–234.
- Chiu, A.Y., Zhai, P., Dal Canto, M.C., Peters, T.M., Kwon, Y.W., Prattis, S.M., Gurney, M.E., 1995. Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Cell. Neurosci.* 6, 349–362.
- Choi, C.I., Lee, Y.D., Gwag, B.J., Cho, S.I., Kim, S.S., Suh-Kim, H., 2008. Effects of estrogen on lifespan and motor functions in female hSOD1 G93A transgenic mice. *J. Neurol. Sci.* 268, 40–47.
- Dal Canto, M.C., Gurney, M.E., 1997. A low expressor line of transgenic mice carrying a mutant human Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1) gene develops pathological changes that most closely resemble those in human amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 93, 537–550.
- Dijkstra, J.R., Meek, M.F., Robinson, P.H., Gramsbergen, A., 2000. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J. Neurosci. Methods.* 96, 89–96.
- Dumitru, D., DeLisa, J.A., 1991. AAEM Minimonograph #10: volume conduction. *Muscle Nerve* 14, 605–624.
- Dunham, N.W., Miya, T.S., 1957. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc. Baltim.* 46, 208–209.
- Durand, J., Amendola, J., Bories, C., B., Lamotte d'Incamps, 2006. Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol. Paris* 99, 211–220.
- Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., Glass, J.D., 2004. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* 185, 232–240.
- Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., Caroni, P., 2000. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J. Neurosci.* 20, 2534–2542.
- Gomide, V.C., Chadi, G., 2004. Prenatal ethanol enhances rotational behavior to apomorphine in the 24-month-old rat offspring with small striatal lesion. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 417–427.
- Guillot, T.S., Asress, S.A., Richardson, J.R., Glass, J.D., Miller, G.W., 2008. Treadmill gait analysis does not detect motor deficits in animal models of Parkinson's disease or amyotrophic lateral sclerosis. *J. Mot. Behav.* 40, 568–577.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., et al., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772–1775.
- Guzen, F.P., de Almeida Leme, R.J., de Andrade, M.S., de Luca, B.A., Chadi, G., 2009. Glial cell line-derived neurotrophic factor added to a sciatic nerve fragment grafted in a spinal cord gap ameliorates motor impairments in rats and increases local axonal growth. *Restor. Neurol. Neurosci.* 27, 1–16.
- Hayworth, C.R., Gonzalez-Lima, F., 2009. Pre-symptomatic detection of chronic motor deficits and genotype prediction in congenic B6. SOD1(G93A) ALS mouse model. *Neuroscience* 164, 975–985.
- Hegedus, J., Putman, C.T., Gordon, T., 2009. Progressive motor unit loss in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis is unaffected by gender. *Muscle Nerve* 39, 318–327.
- Heiman-Patterson, T.D., Deitch, J.S., Blankenhorn, E.P., Erwin, K.L., Perreault, M.J., Alexander, B.K., Byers, N., Toman, I., Alexander, G.M., 2005. Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)1Gur mouse model of ALS. *J. Neurol. Sci.* 236, 1–7.
- Ince, P.G., Lowe, J., Shaw, P.J., 1998. Amyotrophic lateral sclerosis: current issues in classification, pathogenesis and molecular pathology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24, 104–117.
- Kennel, P.F., Finiels, F., Revah, F., Mallet, J., 1996. Neuromuscular function impairment is not caused by motor neurone loss in FALS mice: an electromyographic study. *NeuroReport* 7, 1427–1431.
- Kirkinezos, I.G., Hernandez, D., Bradley, W.G., Moraes, C.T., 2003. Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 53, 804–807.
- Knippenberg, S., Thau, N., Dengler, R., Petri, S., 2010. Significance of behavioural tests in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Behav. Brain Res.* 213, 82–87.
- Miana-Mena, F.J., Munoz, M.J., Yague, G., Mendez, M., Moreno, M., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., 2005. Optimal methods to characterize the G93A mouse model of ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Mot. Neuron. Disord.* 6, 55–62.
- Niessen, H.G., Debska-Vielhaber, G., Sander, K., Angenstein, F., Ludolph, A.C., Hilfert, L., Willker, W., Leibfritz, D., Heinze, H.J., Kunz, W.S., Vielhaber, S., 2007. Metabolic progression markers of neurodegeneration in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1669–1677.
- Niimi, K., Takahashi, E., 2009. Combination of modified SHIRPA and pharmacological approach uncovers neuronal alteration in senescence-accelerated mouse prone 6 (SAMP6) strain. *Neurosci. Lett.* 458, 53–56.
- Riederer, B.M., et al., 1996. Differential expression and modification of neurofilament triplet proteins during cat cerebellar development. *J. Comp. Neurol.* 364, 704–717.
- Ringer, C., Weihe, E., Schutz, B., 2009. Pre-symptomatic alterations in subcellular betaCGRP distribution in motor neurons precede astrogliosis in ALS mice. *Neurobiol. Dis.* 35, 286–295.
- Rogers, D.C., Fisher, E.M., Brown, S.D., Peters, J., Hunter, A.J., Martin, J.E., 1997. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm. Genome* 8, 711–713.
- Rosen, D.R., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364, 362.
- Schlaepfer, W.W., Bruce, J., 1990. Simultaneous up-regulation of neurofilament proteins during the postnatal development of the rat nervous system. *J. Neurosci. Res.* 25, 39–49.
- Scorisa, J.M., Duobles, T., de Oliveira, G.P., Maximino, J.R., Chadi, G., 2010. The review of the methods to obtain non-neuronal cells to study glial influence on amyotrophic lateral sclerosis pathophysiology at molecular level in vitro. *Acta Cir. Bras.* 25, 281–289.
- Shefner, J.M., Cudkowicz, M.E., Brown Jr., R.H., 2002. Comparison of incremental with multipoint MUNE methods in transgenic ALS mice. *Muscle Nerve* 25, 39–42.
- Silva, C., Fuxe, K., Chadi, G., 2009. Involvement of astroglial fibroblast growth factor-2 and microglia in the nigral 6-OHDA parkinsonism and a possible role of glucocorticoid hormone on the glial mediated local trophism and wound repair. *J. Neural Transm. Suppl.* 185–202.
- Smittkamp, S.E., Brown, J.W., Stanford, J.A., 2008. Time-course and characterization of orolingual motor deficits in B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J mice. *Neuroscience* 151, 613–621.
- Suzuki, N., Mizuno, H., Warita, H., Takeda, S., Itoyama, Y., Aoki, M., 2010. Neuronal NOS is dislocated during muscle

- atrophy in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 294, 95–101.
- Veldink, J.H., Bar, P.R., Joosten, E.A., Otten, M., Wokke, J.H., van den Berg, L.H., 2003. Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul. Disord.* 13, 737–743.
- Weydt, P., Hong, S.Y., Kliot, M., Moller, T., 2003. Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *NeuroReport* 14, 1051–1054.
- Yang, W.W., et al., 2011. Relationship between neuropathology and disease progression in the SOD1(G93A) ALS mouse. *Exp Neurol.* 227, 287–295.
- Yim, M.B., Kang, J.H., Yim, H.S., Kwak, H.S., Chock, P.B., Stadtman, E.R., 1996. A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu. Zn-superoxide dismutase mutant: an enhancement of free radical formation due to a decrease in K_m for hydrogen peroxide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 5709–5714.