Universidade de São Paulo

JÁINA ARAÚJO REIS

Distribuição celular e função da proteína C9ORF72 em modelos celulares de Esclerose Lateral Amiotrófica.

Cellular distribution and function of C9ORF72 protein in cellular models of Amyotrophic Lateral Sclerosis



São Paulo

2020

JÁINA ARAÚJO REIS

Distribuição celular e função da proteína C9ORF72 em modelos celulares de Esclerose Lateral Amiotrófica.

Cellular distribution and function of C9ORF72 protein in cellular models of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas - Biologia Genética.

Orientadora: Prof^a. Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Reis, Jáina Araújo Distribuição celular e função da proteína C9ORF72 em modelos celulares de Esclerose Lateral Amiotrófica. Jáina Araújo Reis; orientadora Merari de Fátima Ramires Ferrari -- São Paulo, 2020.

107 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

C9ORF72. 2. Proteínas Rab. 3. Autofagia. 4. Homeostase do RE.
 Neurodegeneração. I. Ferrari, Merari de Fátima Ramires. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Merari F. R. Ferrari Orientadora

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo, meu porto seguro, minha inspiração diária. Aos meus pais, meus incansáveis incentivadores, companheiros de todas as horas, a quem eu amo infinitamente.

AGRADECIMENTOS

Antes de todos eu agradeço a Deus. Crer em Sua existência tem dado um propósito sublime para a minha vida. Ele tem sido meu refúgio e minha fortaleza, um socorro bem presente quando estou em dificuldades. Obrigada Deus querido! Agradeço também aos meus pais, Zenila e José (meus exemplos de vida), e ao meu esposo Vitor. Eu os amo demais e quero deixar registrado aqui a minha gratidão por todo o esforço que fizeram e fazem por mim. Sem vocês eu não teria conseguido concluir este trabalho.

Quero expressar também a minha especial gratidão a essa mulher incrível e inspiradora, muito querida e a melhor orientadora que eu poderia ter escolhido, Prof^a. Dr^a. Merari de Fátima Ramires Ferrari. Obrigada professora por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa, mesmo sabendo que eu nunca tinha feito IC, e que teria que aprender tudo praticamente do zero. Você me ensinou quase tudo o que eu sei sobre ser pesquisadora, foi paciente com os meus erros, respondeu gentilmente as minhas perguntas mais bobas e me incentivou a ser melhor. Você é uma excelente professora, muito humana e humilde, apesar de seu extraordinário conhecimento científico. Eu agradeço de coração por seus ensinamentos, pelo carinho com que ensina e pela sua dedicação. Um dia quero ser como você!

Não poderia deixar de agradecer aos técnicos e especialistas que colaboraram com a realização desse trabalho: Sheila e Waldir Caldeira (da microscopia), Thiago Alegria (do Lab. do prof. Luís Neto), Letícia (do Lab. da prof^a. Mariz), Heloísa (do biotério do Genoma), Neide (do biotério do IPEN), Teresa Auricchio e especialmente a Andressa Sakugawa, com quem tive muitas "conversas científicas", quem me ensinou novas técnicas, me ajudou em diversos experimentos e em tudo quanto estava ao seu alcance. Obrigada Dressa! Você fez a diferença na minha vida acadêmica. Te desejo tudo de melhor do mundo!

Ao Dr. Fernando Gomes, pós-doc no laboratório do professor Luís Neto, que me ensinou sobre imunoprecipitação, agradeço muitíssimo a você por compartilhar comigo seus conhecimentos e por ceder seu tempo e material para me ajudar. As professoras Luciana Haddad (do IB), Débora Schechtman (do IQ) e Andréa Torrão (do ICB) que doaram células da linhagem Neuro-2a e também anticorpos que foram fundamentais para realização desse trabalho, deixo o meu muito obrigada! Finalmente, deixo meus sinceros agradecimentos aos meus colegas de trabalho, alguns dos quais tiveram a disposição e a paciência de me ensinar, passo a passo, as técnicas experimentais usadas no laboratório: Karla Pacheco, Rafaela Regina, Nathan Cogliatti, Natália Teruel e Raquel Lima. Aos colegas que chegaram junto comigo ou depois de mim, mas que também contribuíram de alguma forma com a minha jornada acadêmica: Amanda Palermo, Patrícia Castro, Eduardo Oliveira, Alan, e Dr. Reza Raeisossadati, obrigada pessoal pelos conhecimentos que compartilharam comigo, pelas vezes que trocaram o meio das minhas células em cultura e colocaram para incubar, lavaram ou revelaram as minhas membranas de western. Obrigada a todos!

Às instituições de fomento, CAPES e FAPESP. O apoio financeiro para a compra de materiais e equipamentos e para subsidiar a minha bolsa de mestrado foram indispensáveis para a conclusão dessa pós-graduação.

Aos membros da banca, meus sinceros agradecimentos por aceitarem analisar e contribuir com o meu trabalho como parte da banca avaliadora. Sei que o tempo de vocês é precioso. Obrigada!

APOIO FINANCEIRO

Bolsa de estudos concedida pela *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES* (Beneficiária: Jáina Araújo Reis, período de 07/2017 a 07/2019)

Auxílios à pesquisa da FAPESP - Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo (2015/18961-2; 2018/07592-4; 2013/08028-1)

FICHA CATALOGRÁFICA	iii
DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
APOIO FINANCEIRO	vii
ÍNDICE	viii
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	XV
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Envelhecimento, neurodegeneração e proteostase	1
1.2. Autofagia e homeostase do retículo endoplasmático	
1.3. Esclerose Lateral Amiotrófica	7
1.3.1 SOD1: o mais conhecido gene da Esclerose Lateral Amiotrófica	9
1.3.2 O papel da mutação em C9ORF72 na patologia da ELA	
1.4. Estrutura e função de C9ORF72: o que sabemos	15
1.4.1 Características de C9ORF72	16
1.4.2 A via autofágica é modulada pela atividade de C9ORF72	19
1.4.3 O papel de C9ORF72 nas sinapses	
1.4.4 C9ORF72 participa do transporte núcleo-citoplasmático	
1.5. O papel das GTPases no tráfego intracelular	
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo Geral	
2.2. Objetivos Específicos	
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Animais	
3.1.1 Extração de DNA e Genotipagem	
3.2. Modelos celulares de Neurodegeneração associada a SOD1G93A	
3.2.1 Cultura primária de camundongos neonatos	
3.2.2 Linhagem Neuro-2a com superexpressão da SOD1	
3.3. Caracterização das Culturas	
3.3.1 Culturas primárias de Córtex Motor e Medula Espinhal	
3.3.2 Cultura de linhagem Neuro-2a	

3.4. Análise da distribuição celular de C9ORF72	32
3.4.1 Imunofluorescência e microscopia confocal	32
3.4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	33
3.5. Ensaios de Colocalização entre C9ORF72 e RabGTPases	34
3.6. Fracionamento Celular	35
3.7. Silenciamento gênico por lipofecção de siRNA	36
3.8. Superexpressão de C9ORF72	36
3.9. Fluxo Autofágico	37
3.10. Homeostase do Retículo Endoplasmático	37
3.11. Extração de proteínas e Western Blotting	38
3.12. Análise Estatística	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Caracterização e padronizações	39
4.1.1 Caracterização das culturas	39
4.1.2 Padronização da transfecção com hSOD1	42
4.1.3 Transfecção com plasmídeo eGFP-C2-C9ORF72-long	43
4.1.4. Ensaio de silenciamento gênico	43
4.2. A proteína C9ORF72 tem distribuição celular ampla	45
4.3. Distribuição celular de C9ORF72 em células Neuro-2a modelo de esclerose la amiotrófica	teral
4.4. A presença de hSOD1 mutante leva à translocação nuclear da proteína C9ORI linhagem celular Neuro-2a	F72 em
4.5. Análise da expressão de proteínas da via autofágica em modelos de ELA	51
4.6. Interação entre C9ORF72 e Rabs citoplasmáticas não é alterada pela translocaç nuclear de C9-L	ção 55
4.7. Efeito do silenciamento de C9-L sobre a autofagia em linhagem celular Neuro-	-2a 59
4.7.1 Análise da expressão de proteínas autofágicas	60
4.7.2 O fluxo autofágico diminui com o silenciamento de C9ORF72	62
4.8. Efeito do silenciamento de C9 sobre a homeostase do Retículo endoplasmático	63
5. CONCLUSÃO	68
6 REFERÊNCIAS	70
ANEXO I	84
ANEXO II	86
ANEXO III	87

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Lista dos anticorpos secundários usados nos experimentos de colocalização
- Tabela 2. Sequências Nucleotídicas dos siRNAs C9ORF72 e Scramble
- **Tabela 3.** Porcentagem de células positivas à MAP2 em cada cultura celular.
- Tabela 4. Resumo dos resultados apresentados.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os estágios da autofagia.

Figura 2. As diferentes vias de sinalização do sistema UPR.

Figura 3. Ilustração da transcrição bidirecional do DNA.

Figura 4. Hipóteses para patogênese da ELA por mutação em C9ORF72.

Figura 5. Representação esquemática das variantes de mRNA e isoformas proteicas codificadas por C9ORF72 em humanos e camundongos.

Figura 6. Modelo representativo do domínio tripartido DENN com seus subdomínios.

Figura 7. Cada etapa da autofagia conta com a participação de diferentes RABs.

Figura 8. Imagem do gel de agarose ilustrando o padrão de bandas da genotipagem de camundongos.

Figura 9. Representação esquemática das regiões dissecadas.

Figura 10. Caracterização da cultura primária de córtex e medula espinhal de camundongos e linhagem Neuro-2a.

Figura 11. Neurônios motores das culturas de medula espinhal e córtex motor.

Figura 12. Células Neuro-2a transfectadas com plasmídeo para expressão da proteína hSOD1.

Figura 13. Fotomicrografias ilustrando a transfecção com o plasmídeo eGFP-C2-C9ORF72-long em células da linhagem Neuro-2a.

Figura 14. Teste de silenciamento da proteína C9ORF72, isoforma longa.

Figura 15. Teste de Viabilidade celular com azul de Trypan.

Figura 16. C9ORF72 está presente em neurônios e em células da glia do córtex motor e medula espinhal de camundongos.

Figura 17. A proteína C9ORF72 está presente no núcleo (azul) e citoplasma das células.

Figura 18. Eletromicrografias de células da linhagem Neuro-2a mostrando a distribuição celular de C9ORF72.

Figura 19. Há mais colocalização entre C9ORF72 e núcleo em células Neuro-2a que expressam SOD1 mutante.

Figura 20. Expressão de C9ORF72, isoforma longa, no núcleo de células Neuro-2a.

Figura 21. Translocação nuclear da proteína C9ORF72.

Figura 22. Análise da expressão de proteínas da via autofágica em linhagem Neuro-2a.

Figura 23. Análise da expressão de proteínas autofágicas no córtex motor de camundongos.

Figura 24. A proteína C9ORF72 colocaliza com Rab1 e Rab7 em células da linhagem Neuro-2a.

Figura 25. A proteína C9ORF72 colocaliza com Rab1 e Rab7 em células primárias de camundongos.

Figura 26. Análise quantitativa da Colocalização entre C9ORF72 e Rab1 ou Rab7.

Figura 27. A modulação dos níveis endógenos de C9ORF72 provoca alterações autofágicas.

Figura 28. Análise do fluxo autofágico com LC3GFPmCherry em cultura de células da linhagem Neuro-2a.

Figura 29. Análise da expressão de proteínas da via UPR em células de linhagem Neuro-2a com silenciamento de C9-L.

Figura 30. O silenciamento de C9ORF72-L aumenta o remodelamento do RE.

LISTA DE ABREVIATURAS

C9ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica associada a mutação no gene C9ORF72
C9-L	Isoforma longa da proteína C9ORF72
DENN	Differentially Expressed in Normal and Neoplasia
DNA	Ácido desoxirribonucleico (sigla em Inglês)
DPRs	Proteínas de repetição dipeptídicas (sigla em Inglês)
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ELA/FTD	Esclerose Lateral Amiotrófica associada a Demência Frontotemporal
E.V	Empty vector
FTD	Demência frontotemporal (sigla em Inglês)
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Fator de troca de nucleotídeo guanina (sigla em Inglês)
GFP	Proteína fluorescente verde (sigla em Inglês)
GTP	Guanosina trifosfato
HRE	Hexanucleotide repeat expansion
hSOD1	Superóxido dismutase 1 humana
iPSC	Células tronco pluripotentes induzidas (sigla em Inglês)
MAP2	Proteína 2 associada ao microtúbulo (sigla em Inglês)
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Mamalian target of rapamycin
NMs	Neurônios motores
PCR	Reação em cadeia da polimerase (sigla em Inglês)
RBPs	Proteínas de ligação a RNA (sigla em Inglês)

RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico (sigla em Inglês)
siRNA	Small interfering RNA
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD1	Superóxido dismutase 1
SOD1G93A	Superóxido dismutase 1 com mutação a missense G93A
UPR	Resposta a proteínas mal enoveladas (sigla em Inglês)
Wt	Wild-type

RESUMO

Estudos genéticos recentes apontaram uma mutação no gene C9ORF72 como a causa genética mais comum para Esclerose lateral amiotrófica (ELA) e Demência Frontotemporal (FTD), porém, sua contribuição para o surgimento dessas desordens neurodegenerativas permanece incerta e é dificultada pela falta de compreensão completa de sua função. Assim, desvendar as funções de C9ORF72 e as vias bioquímicas das quais participa é um passo fundamental para compreender completamente os mecanismos patogênicos associados à C9ELA/FTD. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar aspectos da distribuição celular e expressão de C9ORF72, sua interação com proteínas Rabs e sua contribuição para a via autofágica e para a manutenção da homeostase do retículo endoplasmático (RE) em modelos celulares de ELA, como células primárias de camundongos SOD1G93A e da linhagem Neuro-2a. Os ensaios experimentais revelaram uma localização celular ampla para a isoforma longa de C9ORF72, presente no interior do núcleo, membrana nuclear, citoplasma, vesículas e membrana plasmática. A análise da expressão de proteínas envolvidas na autofagia mostrou que a presença de SOD1 mutante provoca disfunção autofágica, com redução nos níveis de Rab1, P62 e Beclina-1, e leva a translocação nuclear da isoforma longa de C9ORF72. Curiosamente a translocação de C9-L não interfere na sua interação citoplasmática com as proteínas Rab estudadas. De maneira semelhante, o silenciamento de C9ORF72 por lipofecção de siRNA levou a prejuízo da autofagia com acúmulo de autofagossomos e redução de Rab1, uma proteína indispensável para o tráfego RE-Golgi e formação de vesículas autofágicas, o que desencadeou remodelamento do retículo endoplasmático e alterações no transporte entre RE e Golgi, evidenciado pela redução de ATF6α clivada. Em conjunto, esses resultados sugerem que C9ORF72 atua na regulação da via autofágica e na manutenção da homeostase do RE, além de fornecerem indícios de um possível papel nuclear para a isoforma longa de C9ORF72, independente de sua função citoplasmática.

Palavras-chave: 1. C9ORF72; 2. Proteínas Rab; 3. Autofagia; 4. Homeostase do RE; 5. Neurodegeneração.

ABSTRACT

Recent genetic studies have pointed to a mutation in the C9ORF72 gene as the most common genetic cause for Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Frontotemporal dementia (FTD), however, its contribution to the emergence of these neurodegenerative disorders remains uncertain and is hampered by a lack of complete understanding of its function. Thus, unraveling the functions of C9ORF72 and the biochemical pathways in which it participates is a pivotal step towards the fully knowledge of the pathogenic mechanisms associated with C9ALS/FTD. In view of this, the present study aimed to evaluate aspects of the cellular distribution and expression of C9ORF72, its interaction with Rabs proteins and its contribution to the autophagic pathway and to the maintenance of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis in ALS cell models, such as primary neurons from SOD1G93A mice and Neuro-2a cell line. Experimental data revealed a wide cell location for the long C9ORF72 isoform, present inside the nucleus, nuclear membrane, cytoplasm, vesicles and plasma membrane. Analysis of the expression of proteins involved in autophagy showed that the presence of mutant SOD1 causes autophagic dysfunction, with a reduction in the levels of Rab1, P62 and Beclin-1, and leads to nuclear translocation of the long C9ORF72 isoform. Interestingly, C9-L translocation does not interfere with its cytoplasmic interaction with the studied Rab proteins. Similarly, silencing C9ORF72 by siRNA lipofection led to defective autophagy with accumulation of autophagosomes and reduction of Rab1, involved in ER-Golgi traffic, which triggered remodeling of the endoplasmic reticulum and impairment of transport between RE and Golgi, evidenced by the reduction of cleaved ATF6a. Together, these results suggest that C9ORF72 acts in the regulation of the autophagic pathway and in the maintenance of ER homeostasis, in addition to its possible nuclear role for the long isoform of C9ORF72, regardless of its cytoplasmic function.

Keywords: 1. C9ORF72; 2. Rab proteins; 3. Autophagy; 4. ER homeostasis; 5. Neurodegeneration.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Envelhecimento, neurodegeneração e proteostase

Estudos recentes apontam que o número de idosos teve crescimento global significativo nos últimos anos e a tendência é crescer cada vez mais. Em 2017 a população idosa no Brasil já ultrapassava os 30 milhões, segundo dados da PNAD (Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios – Contínua). Uma projeção divulgada em 2018 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE) aponta que até 2060, 1 em cada 4 brasileiros terá mais de 65 anos (https://agenciadenoticias.ibge.gov.br).

O envelhecimento é um processo fisiológico natural caracterizado pelo declínio das funções orgânicas em todo o organismo. O declínio cognitivo, a perda de massa encefálica e alterações bioquímicas então entre as mudanças características do envelhecimento fisiológico saudável e afetam diretamente o funcionamento do sistema nervoso central (SNC) (BAKER & PETERSEN, 2018). Disfunções mitocondriais, aumento de estresse oxidativo e acúmulo de proteínas mal enoveladas associado a déficits autofágicos são alterações bioquímicas patentes no processo de senescência celular. Esse acúmulo de danos celulares ao longo do tempo, torna o envelhecimento o principal fator de risco para o aparecimento de doenças neurodegenerativas (BISHOP *et al.*, 2010; LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

O termo genérico "doenças neurodegenerativas" se refere a uma gama de patologias que afetam o funcionamento do sistema nervoso pela destruição progressiva e irreversível das células neuronais. A doença de Alzheimer (AD), doença de Parkinson (PD), Esclerose Lateral amiotrófica (ELA) e doença de Huntington (HD) são algumas das desordens neurodegenerativas mais conhecidas e todas possuem uma característica patológica comum: desregulação da homeostase proteica, também chamada de proteostase (POWERS *et al.*, 2009). Proteostase constitui um conceito amplo que engloba todos os processos referentes ao gerenciamento da meia vida das proteínas: desde a regulação da transcrição até a degradação (DOUGLAS & DILLIN, 2010). Esse mecanismo modula as funções celulares para adaptação da célula a diversas situações, impedindo por exemplo o declínio das funções celulares que culminam com o aparecimento de doenças (BALCH *et al.*, 2008).

As proteínas são o produto final da expressão de alguns genes e desempenham um papel fundamental no metabolismo e fisiologia celular. A funcionalidade dessas moléculas depende da eficiência dos processos de síntese, dobramento - para formação de estruturas tridimensionais funcionais - e distribuição celular. Para fiscalizar cada uma dessas etapas de produção, as células contam com um sistema de controle de qualidade proteico (*Protein quality control*- PQC), formado por um conjunto de vias moleculares capazes de detectar proteínas alteradas, coordenar mecanismos de reparo e encaminhar proteínas para reciclagem através dos sistemas de degradação celular (KOGA *et al.*, 2011).

Os sistemas de chaperonas moleculares, ubiquitina/proteossoma e autofagia/lisossomo são as principais vias intracelulares para controle de qualidade das proteínas. Esse controle é exercido durante toda a vida útil de uma proteína e é indispensável para manutenção da proteostase e homeostase celular (KOGA *et al.*, 2011). Infelizmente o controle proteostático declina com a idade e o resultado é a formação de proteínas mal dobradas, oligômeros e agregados proteicos insolúveis, característicos de numerosas doenças neurodegenerativas (BALCH *et al.*, 2008; DOUGLAS & DILLIN, 2010).

Na doença de Alzheimer (DA), por exemplo, defeitos no processamento da proteína precursora amiloide (APP) resultam no acúmulo e agregação do peptídeo β-amilóide (Aβ), enquanto a hiperfosforilação da proteína tau, associada a microtúbulos, resulta na formação de agregados que compõem os chamados emaranhados neurofibrilares (CREWS & MASLIAH, 2010). Já na esclerose lateral amiotrófica (ELA), tanto nos casos esporádicos, que são a maioria (90%), quanto nos casos familiares, existem mutações em genes bem conhecidos, como o *SOD1*, *VAPB*, *TDP-43*, *FUS*, *ALSin*, dentre muitos outros (http://alsod.iop.kcl.ac.uk/), as quais estão associadas à presença de agregados proteicos intracelulares (ROSS & POIRIER, 2005).

Diante da indiscutível relevância do proteoma no funcionamento de sistemas biológicos e seu papel na patologia de doenças neurodegenerativas, cada avanço no estudo de proteínas, cujas funções ainda são pouco conhecidas, é fundamental para a compreensão de novas vias moleculares, etiologia de doenças associadas, descoberta de novos biomarcadores e possíveis alvos terapêuticos para diversas proteinopatias, incluindo as doenças neurodegenerativas.

Os sistemas proteolíticos ubiquitina/proteossomo e autofagia/lisossomo, que fazem parte das vias de controle de qualidade proteico, tem sua atividade reduzida com o envelhecimento, contribuindo ativamente para a perturbação da homeostase celular através do acúmulo de proteínas mal dobradas em diferentes compartimentos celulares, entre os quais o retículo endoplasmático (ER) (RUBINSZTEIN *et al.*, 2011; TOMARU *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2015). No tópico a seguir serão abordados os aspectos moleculares implicados na autofagia e as consequências de disfunções autofágicas para a homeostase do retículo endoplasmático.

1.2 Autofagia e homeostase do retículo endoplasmático

A autofagia é um mecanismo de controle de qualidade citoplasmático vital para a homeostase celular, através do qual componentes intracelulares danificados são encaminhados aos lisossomos para degradação e suas moléculas recicladas para atender a demanda bioenergética da célula. A autofagia pode ser dividida em três tipos: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas e microautofagia (RUBINSZTEIN *et al.*, 2011).

A macroautofagia é, sem dúvida, a mais estudada rota de degradação intracitoplasmática, comumente denominada pelo termo generalista "autofagia". Esse processo de "auto-alimentação" e reciclagem pode ser subdividido em quatro etapas: (1) nucleação, com o recrutamente de membrana para formação do fagóforo, (2) alogamento da membrana do fagóforo e recrutamento de cargas para degradação, (3) formação do autofagossomo e (4) fusão com lisossomos e degradação (RUBINSZTEIN *et al.*, 2015).

Disfunções autofágicas podem levar ao aparecimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, Huntington, Parkinson e demência lobar frontotemporal (FRIEDMAN *et al.*, 2012; KOMATSU *et al.*, 2006). As evidências são que o acúmulo de autofagossomos em encéfalos em degeneração está associado à progressão de doenças neurológicas, no entanto a relação exata da função autofágica da célula e o aparecimento e/ou manutenção do estado neurodegenerativo precisa ser melhor estudada.

A sinalização inicial da macroautofagia envolve os complexos Ulk1 e Beclina que geram as vesículas com dupla camada lipídica (TANIDA, 2011). A Beclina-1 é ortóloga da Atg6 de leveduras e é a principal constituinte de uma série de complexos proteicos com papel na autofagia, entre eles o complexo Atg14L - Vps34 - p150 - Beclina1, também

chamado de complexo PI3K I, que é essencial para a formação dos autofagossomos e é recrutado para a membrana do fagóforo em formação, sendo necessário para indução da autofagia (SIMONSEN & TOOZE, 2009). Além disso, Beclina-1 tem papel central na programação da sobrevivência celular, sendo que sua disfunção pode implicar em neurodegeneração (KANG *et al.*, 2011).

A proteína P62 é um receptor de autofagia que se liga à ubiquitina presente nos substratos a serem degradados e posteriormente se liga a LC3-II na membrana do fagóforo nascente, resultando na entrega da carga para a degradação, sendo ela mesma degradada na etapa final desse processo (PANKIV *et al.*, 2007). P62 também participa da autofagocitose mediada por chaperonas, em que reconhece as cargas a serem degradadas e as direciona aos lisossomos.

A proteína LC3, da família das Atg8, foi originalmente identificada como sendo uma proteína associada a microtúbulos, e também se associa de forma estável à membrana do autofagossomo. LC3-I é citosólica e a LC3-II é associada à membrana autofágica. A detecção da LC3-I e LC3-II marca sensivelmente a distinção e estudo do autofagossomo e autofagolisossomo, sendo útil para monitorar o estado de autofagocitose (RAMI, 2009).

O sucesso da autofagia está intimamente relacionado às proteínas de tráfego intracelular, dentre elas estão as proteínas histona deacetilase 6 (HDAC6), C9ORF72 e Rabs. As proteínas Rab são GTPases monoméricas responsáveis pela formação de vesículas, mobilidade entre os compartimentos celulares, ancoramento e transporte de organelas (ZHEN & STENMARK, 2015). Disfunção dessas proteínas causa grande prejuízo celular, como por exemplo, acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático, bem como falhas nas vias de degradação (SCHEPER *et al.*, 2007). A figura 1 apresenta um resumo do processo autofágico e algumas das principais proteínas envolvidas.

O retículo endoplasmático (ER) é uma organela citoplasmática que desempenha um importante papel na síntese, dobramento e transporte de proteínas, além do armazenamento e sinalização de cálcio, e, portanto, na homeostase celular e controle de qualidade proteico. Alterações em mecanismo da autofagia decorrentes do envelhecimento, perturbações da homeostase de cálcio, ou mesmo disfunções em moléculas críticas para o funcionamento do ER podem levar ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmem dessa organela, causando estresse e mudanças nas vias de sinalização celular (BRAVO *et al.*, 2013).



Figura 1. Os estágios da autofagia. (A) Resumo do processo autofágico. LC3-II e Rab-9 são marcadores de autofagia dependente e independente de Atg5 / Atg7, respectivamente. (B). Para iniciação da autofagia é necessária a ativação dos complexos ULK1 e ULK2, que habitualmente são inibidos pelo mTOR. (C) O complexo Beclina-1 juntamente com outras proteínas são necessários para a etapa de nucleação. (D) O alongamento do fagóforo conta com a participação de diferentes proteínas ATG assim como LC3. PE = fosfatidiletanolamina. (E) Conjunto de proteínas necessárias para a maturação do autofagossomo. LAMP-1 e 2 são proteínas da membrana lisossômica, SKD1 é uma ATPase e PS1 é presenilina 1. Modificado de KANG *et al.* (2011).

O acúmulo e agregação de proteínas mal dobradas, caraterístico de doenças neurodegenerativas, resultam em estresse do ER e consequente ativação da resposta a proteínas mal enoveladas (UPR). O sistema UPR é formado por um conjunto de vias de

sinalização, ativadas primariamente com a finalidade de restaurar o equilíbrio intracelular. Entretanto, a exposição prolongada a fatores de estresse leva à morte celular por meio da sinalização apoptótica (PASCHEN & MENGESDORF, 2005).

O sistema UPR coordena ações que possibilitam a célula lidar com o estresse e restaurar a homeostase, tais como diminuição na síntese de proteínas gerais, evitando desse modo um acúmulo adicional de proteínas com defeitos de dobramento, e a ativação de fatores de transcrição de genes específicos, cujos produtos proteicos auxiliem no reparo e degradação de proteínas de mal enoveladas, por exemplo, BiP, uma chaperona do RE (KAUFMAN, 1999).

As principais vias de sinalização UPR (figura 2) são as seguintes: (1) ativação da PERK, proteína quinase do RE, que aumenta a tradução do fator de transcrição ATF4 e assim, a expressão de genes envolvidos no metabolismo de proteínas, além de fosforilar a subunidade alfa do fator de iniciação eucariótico 2, eIF2 α , desligando a etapa de iniciação da tradução; (2) fosforilação de IRE1 que induz a clivagem do mRNA de XBP1 por splicing, produzindo duas isoformas de proteínas, uma de 34 kDa e outra de 54 kDa, que funciona como um fator de transcrição para genes codificadores de proteínas necessárias para processamento de outras proteínas no interior do RE; (3) a translocação de ATF6, de 90 kDa, do RE para o complexo de Golgi, onde é clivada por duas proteases e dá origem a forma madura de ATF6, com 50 kDa, que é um fator de transcrição para genes de chaperonas e enzimas que auxiliam no metabolismo de proteínas no RE (DOYLE *et al.*, 2011; HAZE *et al.*, 1999).

Se as condições de estresse persistirem, a célula ativa vias de sinalização próapoptóticas como a indução da transcrição do gene que codifica a proteína CHOP, também conhecida como GADD 153, pelos fatores de transcrição XBP-1, ATF4 e ATF6, e a ativação de caspase-12 que posteriormente ativa caspase-3, proteína que efetivamente executa a morte celular (NAKAGAWA *et al.*, 2000; OYADOMARI & MORI, 2004). A figura 2 apresenta um resumo das três vias de sinalização UPR.



Figura 2. As diferentes vias de sinalização do sistema UPR: ATF6, PERK e IRE1. Cada via conta com mecanismos distintos para a transdução do sinal gerado pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do RE. Fonte: WALTER e RON (2011).

O estresse do retículo endoplasmático é um evento comum a diferentes doenças neurodegenerativas. Estudos em tecido cerebral pós-morte de pacientes com a doença de Huntington, Alzheimer ou Parkinson indicaram a ocorrência de estresse no RE em estágios precoces dessas doenças (CARNEMOLLA *et al.*, 2009; HOOZEMANS *et al.*, 2012). Tal evento é apontado também como um mecanismo potencial para a patogênese da esclerose lateral amiotrófica (WALKER & ATKIN, 2011).

1.3 Esclerose Lateral Amiotrófica

A Esclerose Lateral amiotrófica, também conhecida como doença de Charcot ou doença de Lou Gehring, é uma desordem multifatorial com diversos componentes genéticos e ambientais pertencente ao grupo das doenças do neurônio motor. Ela é caracterizada pela perda progressiva de neurônios motores do córtex motor primário, tronco encefálico e medula espinhal (CHEN *et al.*, 2013; PETERS *et al.*, 2015; ZAREI *et al.*, 2015).

Esta doença do sistema nervoso afeta dois tipos de neurônios motores: neurônios motores superiores (NMS) que se localizam na área motora no cérebro, e os neurônios

motores inferiores (NMI), localizados no tronco cerebral e na porção anterior da medula espinhal. O termo "Esclerose lateral" refere-se ao endurecimento da porção lateral da medula espinhal decorrente da morte dos neurônios motores superiores enquanto "amiotrófica" refere-se à fraqueza dos músculos que se tornam atróficos devido à morte dos neurônios motores inferiores (<u>abrela.org.br</u>).

A evolução da doença causa debilidade e atrofia progressiva da musculatura respiratória e dos membros, espasticidade, distúrbios do sono, estresse psico-social e sintomas de origem bulbar como disartria e disfagia, posteriormente evoluindo para óbito (XEREZ, 2008).

O tratamento é feito por meio de acompanhamento por uma equipe multidisciplinar, incluindo atendimento fisioterapêutico, que melhora os sintomas relativos à doença e aumenta a qualidade de vida do paciente, e uso de medicamentos como o riluzole, droga inibidora da excitoxicidade pelo glutamato, que aumenta a sobrevida de três a seis meses (BENSIMON *et al.*, 1994; XEREZ, 2008).

No mundo, a prevalência calculada para ELA é de 4 a 6 casos/100.000 habitantes. No Brasil, a incidência é de 1,5 casos/100.000 habitantes, totalizando 2.500 novos casos por ano (CRONIN *et al.*, 2007). Embora existam algumas hipóteses que tentam explicar a sua ocorrência, os fatores desencadeantes da fisiopatologia da ELA ainda são desconhecidos (PASINELLI & BROWN, 2006).

A nível molecular, numerosos fatores afetam a patologia da ELA, incluindo agregados de proteína e RNA, disfunções mitocondriais, estresse oxidativo, excitotoxicidade, neuroinflamação, alterações do metabolismo energético, além dos fatores genéticos (PETERS *et al.*, 2015; TURNER *et al.*, 2013).

Aproximadamente 90% dos casos de Esclerose lateral amiotrófica são esporádicos, ou seja, não há uma ligação genética conhecida. Esses casos podem estar associados a eventuais mutações gênicas (de novo) ou a fatores ambientais ou ambos. Estudos sugerem que a exposição a determinados fatores ambientais pode ser crítica para o desenvolvimento da patologia: exposições a produtos químicos agrícolas, metais pesados, tipo de dieta e fumaça de cigarro (ZAREI *et al.*, 2015)

Embora a maioria dos casos de esclerose lateral amiotrófica sejam esporádicos, ocorrendo em indivíduos que não apresentam história familiar da doença, cerca de 10%

dos casos de ELA tem histórico familiar (fELA) e seu início ocorre em média dez anos mais cedo que nos casos esporádicos. A identificação de mutações em genes de pacientes com ELA familiar colocou em debate novos possíveis mecanismos para o desenvolvimento da doença. Mutações em mais de 40 genes já foram associadas a ELA, com destaque para os genes *SOD1, FUS, C90RF72 e TARDBP*, que juntos respondem por 70% dos casos de fELA, podendo ocorrer também nos casos de ELA esporádica (CHEN *et al.*, 2013; PETERS *et al.*, 2015; VALDMANIS & ROULEAU, 2008).

A Esclerose Lateral Amiotrófica pode ter ainda uma origem oligogênica. Examinando pacientes que apresentam ELA familiar ou esporádica, VAN BLITTERSWIJK *et al.* (2012) observaram que múltiplas mutações associadas aos genes da ELA podem estar presentes no mesmo indivíduo. Foram identificados pacientes portando mutações no gene *C9ORF72* concomitante com mutações nos genes *TARDBP*, *SOD1* ou *FUS*.

Mutações em múltiplos genes atribuem maior letalidade para a ELA que mutações em um único gene? Qual a contribuição de cada mutação na patogênese da ELA? Mais estudos são necessários para que estas e muitas outras questões quanto a fisiopatologia da ELA sejam respondidas. Na verdade, após anos de muita pesquisa e muitas descobertas, a questão principal ainda não possui uma resposta definitiva: o que causa a ELA?

1.3.1 SOD1: o mais conhecido gene da Esclerose Lateral Amiotrófica

O gene *SOD1* foi o primeiro cujas mutações foram associadas a forma familiar da Esclerose Lateral Amiotrófica (fELA) (ROSEN *et al.*, 1993) e até hoje é o mais estudado devido a quantidade de modelos animais que foram desenvolvidos especificamente para o estudo desse gene, com destaque para os modelos de camundongos transgênicos para o gene *SOD1* humano com uma mutação missense G93A (GURNEY *et al.*, 1994).

Localizado no cromossomo 21, o gene *SOD1* codifica a proteína Cu / Zn superóxido dismutase (SOD-1), uma enzima antioxidante que catalisa a conversão de moléculas tóxicas de oxigênio (O_2^-), também chamadas de radicais superóxido, em oxigênio molecular (O2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Cerca de 20% dos casos de ELA familiar apresentam mutações no gene da SOD1. Mais de 125 mutações missense diferentes já foram identificadas nesse gene (ANDERSEN *et al.*, 2003; PASINELLI & BROWN, 2006; ROWLAND & SHNEIDER, 2001).

Dois mecanismos foram propostos para a toxicidade da superóxido dismutase 1 mutante: prejuízos no metabolismo do oxigênio causados por alterações na atividade enzimática dos sítios Cu / Zn e instabilidade conformacional que leva a formação de agregados de SOD1, potencialmente prejudiciais para as células. (PASINELLI & BROWN, 2006). Agregados de SOD1 mutante foram identificados em tecidos cerebrais de pacientes com ELA, em células de camundongos modelo de ELA e ainda em linhagens celulares transfectadas com a proteína SOD1 mutante (FORSBERG *et al.*, 2010; OH *et al.*, 2008; WATANABE *et al.*, 2001).

Embora existam controvérsias quanto a toxicidade dos agregados de SOD1 mutante, evidências revelam que tais agregados sequestram o proteossoma, prejudicando sua atividade, além de reduzir a sobrevivência celular em linhagens neuronais (MATSUMOTO *et al.*, 2005). Alternativamente, mutações em SOD1 podem, por si só, causar estresse do retículo endoplasmático, disfunções mitocondriais e no metabolismo de DNA e RNA além de defeitos no transporte axonal (DE VOS *et al.*, 2007; HAYASHI *et al.*, 2016; PASINELLI & BROWN, 2006).

1.3.2 O papel da mutação em C9ORF72 na patologia da ELA

O possível papel do gene *C9ORF72* na patologia da ELA foi proposto pela primeira vez em 2011, quando dois grupos de pesquisa, distintos, liderados pela Dra. Rosa Rademakers, da *Mayo Clinic* em Jacksonville, Flórida, e pelo Dr. Brian Traynor, do *National Institute on Aging* (NIA) em Bethesda, Maryland, descobriram ao mesmo tempo uma mutação de expansão de uma sequência hexanucleotídica na região correspondente ao primeiro íntron do gene *C9ORF72* (DEJESUS-HERNANDEZ *et al.*, 2011; DOLGIN, 2017; RENTON *et al.*, 2011).

Desde então, as centenas de artigos científicos que surgiram tendo como principal foco de estudo o gene *C90RF72* revelam que os pesquisadores estão numa corrida para desvendar a função da mutação de expansão G_4C_2 na patologia da ELA e, quem sabe, encontrar um novo alvo terapêutico para tratamento da doença.

A mutação em *C9ORF72*, gene também conhecido como *DENNL72* e *ALSFTD*, é apontada como a causa genética mais comum de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) e Demência Frontotemporal (FTD), e pode explicar até 40% dos casos familiares e 10% dos casos esporádicos de ELA. Em indivíduos saudáveis, pode haver até 23 cópias de repetição

GGGGCC, já em indivíduos com ELA, esse número se expande para 700 a 1600 cópias (DEJESUS-HERNANDEZ *et al.*, 2011; MAJOUNIE *et al.*, 2012; RENTON *et al.*, 2011).

Estudos já consolidados para compreensão de como repetições trinucleotídicas podem desencadear doenças tais como a doença de Huntington e a distrofia miotônica, certamente contribuíram na investigação do mecanismo pelo qual a mutação de repetição hexanucleotídica pode levar a Esclerose Lateral Amiotrófica e Demência Frontotemporal (BROOK *et al.*, 1992; DAVIS *et al.*, 1997; DAYALU & ALBIN, 2015).

Até o presente momento já foram propostas três hipóteses para explicar como a HRE (*hexanucleotide repeat expansion*) causa ELA/FTD: focos de RNA intranucleares, a produção de proteínas de repetição dipeptídicas (DPRs) por uma tradução não canônica do segmento intrônico expandido e haploinsuficiência (DEJESUS-HERNANDEZ *et al.*, 2011; SELLIER *et al.*, 2016; ZU *et al.*, 2013).

A primeira hipótese postula que o gene *C9ORF72* contendo a mutação HRE é transcrito bidirecionalmente (figura 3), gerando pré-mRNAs senso e anti-senso, que se acumulam no núcleo da célula e sequestram proteínas de ligação a RNA (RBPs). Isso sugere um ganho de função tóxica do RNA, que contribui para a neurodegeneração (RENTON *et al.*, 2011; ZU *et al.*, 2013).



Figura 3. **Ilustração da transcrição bidirecional do DNA**. O mesmo gene é transcrito nos dois sentidos originando dois mRNA. Modificado de: Resumo da transcrição, khan academy¹

¹ Disponível em: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/transcriptionof-dna-into-rna/a/overview-of-transcription> acesso em: set. 2019.

A associação entre RNA e RBPs forma o que se conhece como focos de RNA nuclear, encontrados no córtex frontal, cerebelo e medula espinhal de pacientes com C9ELA/FTD (DEJESUS-HERNANDEZ *et al.*, 2011; GENDRON *et al.*, 2013). Além disso, estudos demonstram que esses focos de RNA estão associados a depleção de TDP-43 (*Transactive DNA-binding protein 43*) nuclear e a presença de inclusões de P62 e TDP-43 no citoplasma. Essas inclusões citoplasmáticas são uma característica marcante de ELA/FTD mediada pela mutação em *C9ORF72* (COOPER-KNOCK *et al.*, 2015; MIZIELINSKA *et al.*, 2013).

Entre as proteínas de ligação a RNA que se associam ao pré-mRNA de *C9ORF72* mutante, formando inclusões nucleares tóxicas, estão as proteínas heterogêneas nucleares hnRNPA1 e hnRNP-H, fatores de splicing SF2 e SC35, e a proteína de transporte núcleocitoplasmático RanGAP (LEE, Y. B. *et al.*, 2013; MORI; LAMMICH; *et al.*, 2013; ZHANG, K. *et al.*, 2015).

Uma segunda hipótese sugerida para a patogênese da ELA, diz respeito a expressão aberrante de proteínas de repetição dipeptídicas (DPRs). A expansão repetitiva de GGGGCC, que é transcrita bidirecionalmente gerando RNA senso e anti-senso, pode ser traduzida mesmo que esteja em uma região não codificante e não disponha de um códon AUG. Isso é possível graças a um mecanismo de tradução não canônica denominada RAN (*repeat- unassociated non-ATG*), semelhante ao que ocorre na distrofia miotônica tipo 1 e na doença de Huntington (BANEZ-CORONEL *et al.*, 2015; ZU *et al.*, 2011).

A tradução RAN ocorre em todos os quadros de leitura do mRNA dando origem a cinco proteínas de repetição dipeptídicas: do RNA senso, glicina-alanina (poli-GA) e glicina-arginina (poli-GR), do RNA anti-senso prolina-arginina (poli-PR) e prolaminaalanina (poli-PA) e dos transcritos senso e anti-senso glicina-prolina (poli-GP). Esses polipeptídeos são insolúveis, propensos a agregação e tóxicos para a célula (ASH *et al.*, 2013; MORI; WENG; *et al.*, 2013; ZU *et al.*, 2013).

As DRPs podem se acumular como agregados citoplasmáticos em diferentes regiões cerebrais, incluindo o córtex frontal e motor, hipocampo e neurônios da medula espinhal de pacientes com a mutação em *C90RF72*. Dentre todos, os polipeptídeos glicina-arginina (GR) e prolina-arginina (PR) detêm o maior potencial tóxico. Essas proteínas ricas em aminoácido arginina causam neurodegeneração em modelos experimentais de

Drosophila e levam a morte celular da linhagem U2OS, uma vez que entrando no núcleo da célula, ligam-se ao nucléolo e interrompem a biogênese de RNA (KWON *et al.*, 2014; MIZIELINSKA *et al.*, 2013; ZU *et al.*, 2013).

É possível, segundo os achados de GENTRON (2013), que os focos de RNA e as inclusões de proteínas de repetição dipeptídica coexistem na mesma célula, sugerindo que esses dois eventos são mecanismos distintos para a morte neuronal.

Por fim, a hipótese da haploinsuficiência sugere um mecanismo de perda de função da proteína C9ORF72. Isso ocorre porque o alelo que carrega a mutação é incapaz de produzir proteínas funcionais e somente o produto proteico do alelo selvagem não é suficiente para garantir um fenótipo normal.

Estudos em tecido cerebelar *post-mortem* e neurônios motores induzidos (iMNs) derivados de iPSC, ambos provenientes de pacientes C9ELA/FTD, demonstraram que as células dos portadores da mutação HRE possuem menor expressão da proteína C9ORF72 se comparadas as células provenientes de pacientes controles, fator que reduziu a sobrevivência dos neurônios motores induzidos (FRICK *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2018). A expressão da proteína C9ORF72 também diminuiu no córtex frontal de portadores da expansão G₄C₂, e os níveis do mRNA se mostraram reduzidos no cérebro e nos linfoblastos de pacientes com ELA/FTLD esporádica (CIURA *et al.*, 2013; VIODÉ *et al.*, 2018).

Experimentos com Zebrafish indicam que a perda de função do transcrito C9ORF72 causa déficit comportamental e locomotor, mas o fenótipo normal é restaurado com a superexpressão do mRNA C9ORF72. De modo semelhante, em *C. elegans* a redução nos níveis de C9ORF72 leva a degeneração dos neurônios motores (CIURA *et al.*, 2013; THERRIEN *et al.*, 2013). Em contrapartida, o knockout de *C9ORF72* em camundongos não foi suficiente para causar neurodegeneração ou déficits motores, sugerindo que a perda de C9ORF72, por si só, não causa ELA (KOPPERS *et al.*, 2015).

Para explicar como a expansão da repetição hexanucleotídica pode afetar os níveis endógenos da proteína C9ORF72, FRATTA *et al.* (2012) propôs a formação de tétrades de G, favorecida pela presença da mutação HRE (G_4C_2) que contém nucleotídeos guanina adjacentes. Essa estrutura em tétrade é conhecida como G-quadruplex e pode prejudicar a transcrição do DNA pela enzima RNA polimerase, levando a transcrição abortiva e consequente formação de mRNAs truncados (HAEUSLER *et al.*, 2014). Por outro lado, a hipermetilação do DNA na região correspondente ao gene *C9ORF72* também pode explicar os baixos níveis da proteína em portadores da C9ELA/FTD. Em virtude da expansão GGGGCC há um aumento no número de dinucletídeos CG, o que fornece mais substratos para a metilação aberrante em ilhas CpG. Essa hipótese é apoiada pelos resultados de XI *et al.* (2013), que encontraram o locus *C9ORF72* hipermetilado em portadores da expansão. Alternativamente, a expressão do gene *C9ORF72* também pode ser reduzida pela trimetilação nos resíduos de lisina das histonas H3 e H4 de pacientes C9ELA (BELZIL *et al.*, 2013).

Ao contrário do que se poderia pensar, a hipermetilação na região promotora de *C9ORF72* mutante tem efeito neuroprotetor, diminuindo os focos de RNA nuclear e os agregados de proteínas de repetição dipeptídica. A metilação de *C9ORF72* também está associada a menor atrofia na substância cinzenta do hipocampo, tálamo e córtex pré-motor e redução da perda neuronal no cerebelo, córtex frontal e hipocampo, segundo análises realizadas no tecido *post-mortem* de pacientes portadores da mutação (LIU *et al.*, 2014; MCMILLAN *et al.*, 2015).

Os baixos níveis de C9ORF72 já foram relacionados a alterações no tráfego intracelular de vesículas e na autofagia. Entretanto, ainda não se tem total clareza quanto as consequências fisiológicas da redução de C9ORF72, uma vez que não são conhecidas outras vias moleculares nas quais essa proteína pode estar envolvida. (AOKI *et al.*, 2017; FARG *et al.*, 2014; SELLIER *et al.*, 2016).

A figura 4 apresenta um resumo das hipóteses abordadas neste tópico



Figura 4. Hipóteses para patogênese da ELA por mutação em *C9ORF72*. (A) A mutação de expansão de repetição hexanucleotídica (G4C2)n pode inibir a transcrição de C9ORF72, ocasionando (B) diminuição dos níveis endógenos da proteína C9ORF72. (C) A transcrição de C9ORF72 gera transcritos senso e anti-senso - C9RNA com a mutação (G4C2)n - que se acumulam no núcleo e sequestram outras proteínas de ligação a RNA, ou (D) são traduzidos em proteínas de repetição dipeptídica (DPRs) tóxicas, que (E) ligam-se aos poros nucleares interrompendo o transporte núcleo-citoplasmático, (F) formam agregados citoplasmáticos juntamente com P62 e ubiquitina e (G) podem causar danos ao DNA. Modificado de: NASSIF *et al.* (2017).

Sabe-se que a proteína C9PRF72 é altamente conservada entre os metazoários, o que sugere a existência de uma função biológica fundamental. Contudo, a contribuição dessa proteína ou de sua ausência para a patogênese da ELA permanece incerta e é dificultada pela falta de uma compreensão completa de sua função (XIAO *et al.*, 2016). Portanto, desvendar as funções celulares de C9ORF72 e as vias bioquímicas das quais participa é um passo fundamental para compreender completamente os mecanismos patogênicos associados à C9ELA/FTD.

1.4 Estrutura e função de C9ORF72: o que sabemos

Análises de ligação e estudos de associação genômica ampla (GWA) em indivíduos afetados pela ELA ou FTD sugeriram uma causa genética comum para ambas as doenças e uma região no cromossomo 9p21 foi identificada como um loci de susceptibilidade para

ambos os distúrbios neurodegenerativos (MORITA et al., 2006; VAN ES et al., 2009; VANCE et al., 2006).

Essa mutação é a causa genética mais comum de Esclerose lateral Amiotrófica ELA e FTD, representando até 40% dos casos familiares de ELA. A partir dessa descoberta, o gene *C90RF72*, até então de função desconhecida, passou a ser amplamente estudado na busca por respostas quanto ao mecanismo causador das enfermidades a ele associadas (DEJESUS-HERNANDEZ *et al.*, 2011; RENTON *et al.*, 2011).

Muito tem se discutido a respeito do papel de *C9ORF72* na patogênese da ELA/FTD e da função que esse gene e seu produto proteico desempenham na fisiologia celular. As centenas de trabalhos publicados desde 2011 demonstram o grande esforço que tem sido empregado pelos pesquisadores neste sentido. Ainda assim, pouco se sabe quanto ao papel celular de *C9ORF72* e as implicações moleculares da recém descoberta mutação.

Neste tópico revisaremos o conhecimento atual da estrutura do gene *C90RF72* e suas funções celulares conhecidas.

1.4.1 Características de C9ORF72

Em humanos, o splicing alternativo do pré-mRNA de C9ORF72 gera três transcritos que conduzem à expressão de duas isoformas da proteína C9ORF72. As variantes 2 (V2) e 3 (V3) do transcrito codificam para uma proteína longa, denominada C9-L, de 481 aminoácidos e aproximadamente 54 kDa, codificada pelos éxons 2-11 (NP_060795.1), enquanto a variante 1 (V1) codifica uma proteína curta, denominada C9-S, de 222 aminoácidos e aproximadamente 24 kDa, codificada pelos éxons 2-5 (NP_659442.2) (DEJESUS-HERNANDEZ *et al.*, 2011; RENTON *et al.*, 2011).

Em camundongos, o ortólogo de C9ORF72 (3110043O21Rik) também produz três transcritos que são traduzidos em três proteínas de isoformas diferentes: a V1 codifica a isoforma 1 com 481 aminoácidos, homóloga a C9-L humana (NP_001074812.1), V2 codifica a isoforma 2 com 317 aminoácidos, homóloga a C9-S humana (NP_082742.2) e V3 que codifica a isoforma 3 com 420 aminoácidos, como mostra a figura 5 (ATKINSON *et al.*, 2015).



Figura 5. Representação esquemática das variantes de mRNA e isoformas proteicas codificadas por *C90RF72* em humanos e camundongos. Os éxons codificadores estão representados por caixas brancas para RNA ou verdes, enquanto os éxons não codificadores estão representados em preto. A posição dos códons de início (ATG) e término (TAA) da tradução, assim como o tamanho de cada proteína, também estão indicados. (A) A localização da mutação de expansão da repetição hexanucleotídica é indicada por (G_4C_2) na estrutura do pré-mRNA de C90RF72, que passa por splicing alternativo e origina (B) as três variantes conhecidas de RNA C9orf72 humano. Na V1, a caixa magenta representa uma retenção parcial do íntron 5, que resulta na (C) adição de um resíduo de lisina, indicado pelo mesmo símbolo, na região C-terminal da isoforma curta da proteína, C9-S. (D) Apresenta as variantes do mRNA de C9orf72 encontradas em camundongo e (E) as isoformas (Iso) produzidas pela tradução de cada mRNA.

Pesquisas de homologia utilizando ferramentas de alinhamento de sequências (BLAST) mostraram que C9ORF72 é um homólogo estrutural de proteínas associadas ao domínio DENN (*Differentially Expressed in Normal and Neoplasia*) (LEVINE *et al.*, 2013). Esse domínio é característico de uma superfamília de proteínas conhecidas como DENN-like, que são Rab-GEFs, isto é, fatores de troca de nucleotídeo guanina (*guanine*

nucleotide exchange factors), altamente conservadas, que regulam a atividade de proteínas Rab GTPases (MARAT *et al.*, 2011; YOSHIMURA *et al.*, 2010).

DENN é um domínio tripartido composto por três módulos, ou subdomínios, indissociáveis: um módulo central DENN flanqueado pelos módulos uDENN (*upstream* DENN) a montante e dDENN (*downstream* DENN) a jusante. O espaço entre cada um dos módulos varia de acordo com a proteína e a espécie em estudo (LEVIVIER *et al.*, 2001; MARAT *et al.*, 2011).

Embora indissociáveis, em organismos como os fungos, um ou outro módulo das proteínas de domínio DENN podem ter sido perdidos. Mas, em C9ORF72 os três módulos foram conservados. Isso pode ser explicado por estudos de análise estrutural que sugerem a necessidade de todos os módulos do domínio DENN para o contato com GTPases, ainda que, em alguns casos, os subdomínios do tipo Longin possam se ligar a GTPase de forma independente. Assim, C9ORF72 é composta por um módulo N-terminal Longin, também conhecido como u-DENN, pelo módulo principal DENN seguido por um subdomínio dDENN, também chamado de Alpha por alguns autores (WU *et al.*, 2011; ZHANG, D. *et al.*, 2012), conforme mostra a figura 6.



Figura 6. Modelo representativo do domínio tripartido DENN com seus subdomínios, nas isoformas longa (C9-L) e curta (C9-S) da proteína C9orf72 humana. Longin corresponde ao módulo a montante uDENN.

A descoberta de C9ORF72 como uma proteína DENN-like sugere para ela um possível papel na regulação de GTPases, atuando como fator de troca de nucleotídeoguanina (GEF). Os GEFs atuam em substratos específico, tais como proteínas Rab, catalisando a remoção do GDP e favorecendo a interação com o GTP, de modo que o substrato alterne entre um estado inativo, ligado ao GDP, e ativo, vinculado ao GTP (MARAT *et al.*, 2011).

1.4.2 A via autofágica é modulada pela atividade de C9ORF72

A proteína C9ORF72 é conhecida por seu papel fundamental na regulação da autofagia através da interação com diferentes proteínas, entre elas as Rab GTPases (FARG *et al.*, 2014). A autofagia é um mecanismo de degradação e reciclagem de componentes intracelulares como macromoléculas e organelas. Em condições normais esse processo é utilizado pela célula para manter a homeostase e regular o metabolismo. Em condições adversas, a autofagia possibilita a adaptação e a sobrevivência celular (GLICK *et al.*, 2010; RAVANAN *et al.*, 2017).

Pesquisas com células da linhagem Neuro-2a demonstram que a isoforma longa de C9ORF72 é essencial para a indução da autofagia, uma vez que o nocaute desse gene reduziu a degradação de P62 e a conversão de LC3 I em LC3 II durante a autofagia induzida por depleção sérica. Além disso, a própria proteína C9ORF72 é degradada pelas vias lisossômica e proteossomal (LESKELÄ *et al.*, 2019).

C9ORF72 regula a autofagia por diferentes vias moleculares. Em uma delas, C9ORF72 se associa a duas outras proteínas de função desconhecida, SMCR8 e WDR41, formando um complexo proteico que interage com as proteínas FIP200 e ULK1, que juntamente com ATG13 e ATG101 formam o complexo de iniciação da autofagia, também conhecido por complexo ULK1 (SULLIVAN *et al.*, 2016). Tanto o silenciamento de C9ORF72 quanto o knockdown de FIP200, impedem a indução autofágica, levando a conclusão de que a interação entre C9ORF72 e o complexo ULK1 é crítica para ocorrência dessa etapa inicial, mas, ao contrário do que se poderia imaginar, o nocaute de C9ORF72 não interfere na ativação de ULK1 (WEBSTER *et al.*, 2016).

Curiosamente, C9ORF72 se associa às proteínas ATG13 e SMCR8 através do domínio DENN-dDENN, presente exclusivamente na isoforma longa C9-L, indicando que tal domínio é indispensável para a interação direta de C9ORF72 com complexo de iniciação da autofagia. Na ausência de C9ORF72, neurônios primários do hipocampo de camundongos apresentam um fenótipo de arborização dendrítica reduzida, e esse fenômeno está relacionado a diminuição da autofagia por um mecanismo dependente de ULK1, que também tem seus níveis reduzidos em células nocaute de C9ORF72 (HO *et al.*, 2019).

Após constatarem que a diminuição nos níveis de ULK1 em neurônios primários com nocaute de C9ORF72 não está relacionada a alteração na expressão de seu mRNA, HO *et al.* (2019) sugeriram que C9ORF72 regula a redução de ULK1 através de um mecanismo pós-transcricional. Essa ideia é consistente com a hipótese de FARG *et al.* (2014) de que a interação entre C9ORF72, hnRNPA1 e hnRNPA2B1 seja um indício de um possível papel funcional de para C9ORF72 como uma proteína de ligação ao RNA com função no metabolismo do RNA.

O complexo ULK1 controla as fases iniciais da autofagia atuando no recrutamento de membrana para a formação do fagóforo e autofagossomo. Ele mesmo tem sua atividade regulada pelo mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que quando inativo, deixa de fosforilar a ser757 do ULK1 que, por sua vez, passa ao seu estado ativado e fosforila ATG13 e FIP200, possibilitando o início da autofagia (HOSOKAWA *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2009; KIM, J. *et al.*, 2011).

Entre as principais moléculas que atuam nas etapas posteriores a formação do autofagossomo, estão as proteínas LC3 e P62, que são utilizadas, inclusive, como medidores da autofagia. Como já mencionado, a proteína LC3I citoplasmática passa por uma série de modificações até ser lipidada, passando a LC3II, que é encontrada exclusivamente na membrana dos autofagossomos. Já a proteína P62 reconhece as cargas a serem degradadas e as direciona ao autofagossomo, onde se associa a LC3II e também é degradada pelas hidrolases lisossomais após a formação dos autofagolisossomos (HOSOKAWA *et al.*, 2009; ICHIMURA & KOMATSU, 2010; JUNG *et al.*, 2009; KABEYA *et al.*, 2000).

Evidências experimentais sugerem que o complexo formado entre C9ORF72, SMCR8 e WDR41 também atua como um fator de troca de nucleotídeo guanina (GEF) para Rab8A e Rab39B, GTPases envolvidas no tráfego de vesículas e autofagia, além de se associar indiretamente a P62 tendo essas Rabs como mediadoras. Alternativamente, SELLIER *et al.* (2016) evidenciam que a expressão reduzida de C9ORF72 prejudica a autofagia e leva ao acúmulo de agregados citoplasmáticos de P62 e TDP-43.

Por outro lado, UGOLINO *et al.* (2016) demonstraram em seus resultados que a diminuição de C9ORF72 leva ao aumento do fluxo autofágico, evidenciado pelo acúmulo de LC3I e diminuição da razão LC3II/LC3I, interpretado como aumento na degradação lisossomal, além da diminuição dos níveis da proteína P62 e aumento de vesículas LC3
positivas. Ademais, o mesmo estudo mostrou que C9ORF72 está envolvida na ativação de mTOR, um regulador negativo da autofagia, uma vez que o knockdown de C9ORF72 em células HEK293T resultou em uma menor fosforilação da proteína ribossômica S6K1, levando a diminuição da ativação de mTOR. Como consequência, o substrato de mTOR, TFEB - fator de transcrição que regula a expressão de muitos genes associados a autofagia – teve sua expressão aumentada.

Em condições normais, a proteína C9ORF72 tem uma distribuição citoplasmática difusa, enquanto sob condições de inanição colocaliza-se fortemente com os lisossomos, sugerindo que a privação de nutrientes regula o recrutamento de C9ORF72 para a membrana dessa organela. Além disso, o nocaute de C9ORF72 afeta o tamanho e a distribuição celular dos lisossomos, indicando que essa proteína tem uma função lisossomal (AMICK *et al.*, 2016). Concordantemente, em modelos de camundongos, a perda de C9ORF72 levou a defeitos na resposta imune de macrófagos e micróglia devido a interrupção do transporte e acúmulo lisossomal, além de ocasionar uma resposta imunológica alterada com inflamação no baço e no sistema nervoso (O'ROURKE *et al.*, 2016).

O tráfego endossomal de vesículas é outra via autofágica na qual C9ORF72 está envolvida. Experimentos de imunocitoquímica e imunoprecipitação apontam Rab1, Rab5, Rab7 e Rab11 como parceiros de interação de C9ORF72 e fornecem indícios de que C9ORF72 desempenha um papel no tráfego intracelular como um fator de troca de nucleotídeo guanina para Rabs GTPases. Evidências adicionais apontam inibição da endocitose e acúmulo de LC3II em resposta a depleção de C9ORF72 (FARG *et al.*, 2014).

Mediante a interação de C9ORF72 com Rab1a o complexo ULK1 é translocado para a membrana do fagóforo, promovendo a formação de autofagossomos. Além disso, há indícios experimentais de que a secreção de vesículas para o meio extracelular, a produção de endossomos multivesiculares e o tráfego de vesículas na rede Trans-Golgi são processos regulados pela interação entre C9ORF72 com Rab7 (AOKI *et al.*, 2017; WEBSTER *et al.*, 2016).

1.4.3 Papel de C9ORF72 nas sinapses

A localização de C9ORF72 nos axônios de neurônios de camundongos e a presença de sua isoforma longa, C9-L, na fração celular correspondente a sinaptossomas

purificados, sugere que essa proteína também desempenha uma função sináptica (ATKINSON *et al.*, 2015). Em neurônios motores derivados de iPSC, a proteína C9ORF72 foi encontrada de forma abundante nos terminais pré-sinápticos e parte dela co-localizada com vesículas sinápticas marcadas com sinaptofisina (FRICK *et al.*, 2018).

De forma semelhante, XIAO *et al.* (2019) encontraram C9ORF72 em associação com SMCR8 nas regiões pré e pós-sinápticas de neurônios murinos e parcialmente colocalizada com Rab39b nos terminais pós-sinápticos. Os autores também detectaram diminuição de Rab39b e aumento de receptores de glutamato tipo 1 (GluR1) no hipocampo de camundongos após silenciamento de C9ORF72, sugerindo que a presença desta proteína e da Rab39b na densidade pós-sináptica é crítica para regulação dos receptores de glutamato.

Sabe-se que a Rab39b exerce um importante papel no tráfego intracelular das subunidades (GluR1 a 4) do receptor AMPAR, garantindo sua maturação no complexo de Golgi e o transporte dos heterômeros GluA2/GluA3 para a via secretora (MIGNOGNA *et al.*, 2015).

Além disso, a expressão do RNA mensageiro das subunidades GluR1 e GluR3 do receptor AMPA se mostrou aumentada em neurônios motores derivados de iPSC de pacientes com C9ELA. A presença da mutação tornou os neurônios motores mais vulneráveis a excitotoxidade induzida por um aumento na expressão de AMPA permeável a Ca2+, mas as células que tiveram a mutação HRE em C9ORF72 corrigida por CRISPR / Cas9 se mostraram menos vulneráveis (SELVARAJ *et al.*, 2018).

Juntos, esses achados experimentais fornecem indícios de que a haploinsuficiência de C9ORF72 em portadores da mutação HRE pode causar neurodegeneração mediada pela excitotoxidade do glutamato (FORAN & TROTTI, 2009; SHI *et al.*, 2018).

1.4.4 C9ORF72 participa do transporte núcleo-citoplasmático

Defeitos no transporte núcleo-citoplasmático já foram sugeridos como uma potencial via para patologia da ELA associada a mutação HRE no gene *C90RF72*. Isso porque diversos estudos apresentam evidências de que a repetição G_4C_2 , presente nos RNAs senso e anti-senso de *C90RF72* mutante, causa defeitos na estrutura envelope nuclear, alterações na localização de nucleoporinas e interage diretamente com proteínas

RanGAP1 causando prejuízos a sua função neuronal e a importação e exportação nuclear (FREIBAUM *et al.*, 2015; ZHANG, K. *et al.*, 2015).

Ademais, os transcritos senso e antisenso de *C9ORF72* são submetidos à RAN tradução e a região com a mutação HRE é traduzida em todos os quadros de leitura, gerando proteínas de repetições dipeptídicas (DPRs). Essas proteínas formam agregados que, por si só, podem comprometer o transporte núcleo-citoplasmático (KHOSRAVI *et al.*, 2017; WOERNER *et al.*, 2016).

Alternativamente, fora de um contexto de mutação gênica, C9ORF72 também se associa a proteínas da via de transporte núcleo-citoplasmático. Em células murinas de linhagem Neuro-2a, resultados de imunocitoquímica e imunoprecipitação mostraram que tanto C9-L quanto C9-S interagem com Importina - β 1 e Ran - GTPase (XIAO *et al.*, 2015).

A proteína C9ORF72 selvagem interage ainda com actina, hnRNPA1 e hnRNPA2B1. As hnRNPs, ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares, são complexos formados por proteínas e RNA que atuam no splicing do pré-mRNA e são transportadas continuamente entre o núcleo e o citoplasma (FARG *et al.*, 2014; GEUENS *et al.*, 2016). À vista disso, C9ORF72 é sugerida por FARG *et al.* (2014) como um facilitador do transporte de hnRNPs entre o núcleo e o citoplasma.

Um estudo com neurônios motores (NMs) revelou que a dinâmica da actina é prejudicada em NMs de camundongo com diminuição da expressão de *C9ORF72* e em neurônios derivados de iPSC de pacientes com C9ELA. Ensaios de imunoprecipitação mostraram que C9ORF72 interage com Arf6 GTPase e cofilina, duas proteínas reguladoras da dinâmica da actina. Os autores sugerem que C9ORF72 modula a dinâmica da actina via regulação da atividade GTPase de Arf6 que leva a fosforilação de cofilina e consequente despolimerização da actina (SIVADASAN *et al.*, 2016).

A actina é uma proteína que compõe o citoesqueleto celular. Da homeostase dos filamentos de actina dependem inúmeros processos celulares, tais como o crescimento dos axônios, atividade de fatores de transcrição específicos, remodelamento da cromatina, reparo de danos ao DNA e estrutura e integridade do envelope nuclear (KELPSCH & TOOTLE, 2018; SIVADASAN *et al.*, 2016). A ligação da actina com a lamina nuclear é possivelmente um dos principais mecanismos que regula e mantém a estrutura e a

integridade do envelope nuclear (SASSEVILLE & LANGELIER, 1998; SIMON et al., 2010).

Coletivamente, esses dados fornecem indícios de que C9ORF72 pode ter mais uma função no transporte núcleo-citoplasmático, via interação direta ou indireta com actina, podendo atuar como mantenedor da estrutura dos poros e do envelope nuclear através da modulação da polimerização da actina, ou regulando a ligação da actina com laminas nucleares. Mas, por enquanto, essa é apenas uma hipótese que deverá ser testada.

Apesar dessas descobertas, ainda há muito muito a ser estudado a respeito de C9ORF72.

1.5 O papel das GTPases no tráfego intracelular

As proteínas Rab são pequenas GTPases que fazem parte da grande família Ras. Sua atividade de GTPase impulsiona a hidrólise o GTP permitindo que essas proteínas alternem entre um estado ativo, ligado a GTP, e um estado inativo, ligado a GDP. Quando ativadas, as Rabs interagem com substratos específicos desempenhando assim um papel central na endocitose, ancoramento, autofagocitose, formação, direcionamento e fusão de vesículas, transporte e degradação de organelas. Uma disfunção nessas proteínas ou em qualquer um de seus efetores pode causar acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático, falhas nas vias de transporte intracelular de vesículas e falhas na degradação de proteínas e organelas pela via autofágica (LI & MARLIN, 2015; SCHEPER *et al.*, 2007; STENMARK, 2009).

Diferentes etapas da autofagia contam com a participação de diversas proteínas Rab, como apresenta a figura 7.

A proteína Rab1 participa da translocação do complexo de iniciação da autofagia ULK1, tendo como efetor a proteína C9ORF72, que medeia a interação entre Rab1a e ULK1 (WEBSTER *et al.*, 2016). Além disso, Rab1 parece ter um papel primordial na homeostase do retículo endoplasmático, uma vez que a redução nos níveis de Rab1 contribui para o estresse e remodelamento de ER, enquanto a superexpressão da mesma proteína impede o comprometimento da viabilidade celular durante a agregação proteica em células primárias do hipocampo de ratos (LIMA *et al.*, 2019).

A Rab24 regula a formação dos autofagossomos, além de participar do tráfego retrógrado de proteínas entre a região Cis do complexo de Golgi em direção ao retículo endoplasmático, enquanto Rab7 direciona vesículas e organelas vindas do endossomo tardio e autofagossomo para o lisossomo, sendo considerada como um marcador molecular de tais vesículas. Rab7 parece ter ainda um papel chave no crescimento e manutenção neuronal, uma vez que participa do tráfego retrógrado dos receptores do tipo TrkA, essenciais para o reconhecimento de fatores de crescimento neuronal, NGF (AO *et al.*, 2014).



Figura 7. Cada etapa da autofagia conta com a participação de diferentes RABs. Fonte: WEBSTER *et al.* (2018).

Deficiências na função da Rab7 foram descritas em doenças neurodegenerativas como a doença de Charcot-Marie-Tooth e doença de Alzheimer, implicando em prejuízo da degradação celular. Disfunções no tráfego provocado pela alteração de Rab7 pode resultar em inibição do crescimento e promover a morte celular (CATALDO *et al.*, 2008; DEINHARDT *et al.*, 2006; VERHOEVEN *et al.*, 2003).

A Rab5 é utilizada como um marcador de endossomos precoces e regula as primeiras fases da endocitose. Ela está presente na membrana de vesículas revestidas de clatrina e é essencial para a fusão de tais vesículas com os endossomas. Além disso, através da interação com diferentes efetores, Rab5 regula a mobilidade, o ancoramento e a fusão das membranas endossomais, além da produção de fosfatidilinositol 3-fosfato, uma proteína de localização restrita a endossomas iniciais e corpos multivesiculares (OLCHOWIK & MIACZYNSKA, 2009; RUBINO *et al.*, 2000; SHIN *et al.*, 2005).

A proteína Rab6 está envolvida no direcionamento de vesículas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e no tráfego retrógrado Golgi-RE (ANTONY *et al.*, 1992). SCHEPER *et al.* (2007) encontraram os níveis de Rab6 aumentados no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer. Paralelamente os níveis de proteínas indicadoras de estresse no retículo endoplasmático também aumentaram, sugerindo que Rab6 desempenha um papel na resposta a proteínas mal enoveladas.

As proteínas Rab podem regular o tráfego intracelular de organelas através da interação com proteínas motoras, como a miosina, que se liga a cargas específicas e as transporta deslizando ao longo dos filamentos de actina. A Rab27a, por exemplo, recruta a miosina V para o transporte de melanossomas em melanócitos humanos e de camundongos (BAHADORAN *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2001), enquanto Rab11a se associa com a miosina Vb através da proteína adaptadora Rab11-FIP2 para regular a reciclagem de membranas em linhagem de células HeLa e MDCK (HALES *et al.*, 2002).

A superexpressão de Rab11a melhora a disfunção sináptica e déficits locomotores em *Drosophila melanogaster* modelo de doença de Huntington, sugerindo para essa proteína um papel também na transmissão sináptica (STEINERT *et al.*, 2012).

Além das proteínas já mencionadas, diversas outras Rabs já foram descritas na literatura como componentes moleculares envolvidas no tráfego vesículas e autofagia, entre elas Rab2, Rab3, Rab8, Rab15, Rab17, Rab18, Rab26, Rab32, Rab33, Rab35, Rab38, Rab40 e outras. Cada uma delas atua sobre substratos específicos e possuem diferentes reguladores chamados coletivamente de GEFs (fatores de troca de nucleotídeo guanina), mediadores da ativação das Rabs, e GAPs (proteínas ativadoras de hidrólise de GTP) que estimulam a inativação da Rab (BARR & LAMBRIGHT, 2010; STENMARK, 2009).

A presença de um domínio DENN, característico de Rab GEFs, em C9ORF72 e sua comprovada interação com algumas proteínas Rab, levaram diversos autores a conclusão de que C9ORF72 pode ser uma proteína reguladora de RabGTPases. Entretanto, não está claro como ocorre a associação mecânica entre C9ORF72 e as Rabs, ou se C9ORF72 realmente atua como um fator de troca de nucleotídeo guanina ou se exerce qualquer outra função associada a expressão, distribuição e atividade das proteínas Rab (FARG *et al.*, 2014; TANG, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a distribuição celular de C9ORF72 e sua participação nas vias autofágica e de homeostase do Retículo endoplasmático em modelos celulares de Esclerose Lateral Amiotrófica.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar em neurônios motores do córtex e medula espinhal de camundongos modelos de Esclerose Lateral Amiotrófica e em linhagem de células Neuro-2a transfectadas com hSOD1-G93A os seguintes aspectos:

- ✓ Localização celular e expressão de C9ORF72
- ✓ Interação entre C9ORF72 e as proteínas Rab7 e Rab1
- ✓ Participação de C9ORF72 na macroautofagia pela análise da expressão de Beclina-1, p-62 e LC3, proteínas associadas à ativação da autofagia e maturação dos autofagossomos.
- Os efeitos da inibição da expressão de C9ORF72 sobre o fluxo autofágico e homeostase do retículo endoplasmático.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo emprega um modelo celular de doença neurodegenerativa na forma familiar para estudar a distribuição e expressão da proteína C9ORF72 em ambiente celular não homeostático.

3.1 Animais

Os camundongos (*Mus musculus*) das linhagens B6SJLTg (SOD1*G93A) 1Gur/J (transgênico para a SOD1 humana mutante) e B6SJLTg (SOD1)2Gur/J (transgênico para a SOD1 humana não mutante), os quais servem para o estudo da esclerose lateral amiotrófica, foram utilizados para o estudo da proteína C9ORF72. As linhagens foram adquiridas da Jackson (Estados Unidos) e são mantidas no biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), localizado na Cidade Universitária, livres de germes específicos (spf), em ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7h), com ração apropriada e água *ad libitum*.

Os experimentos realizados estão em conformidade com todos os aspectos éticos de experimentação animal recomendados pelo Concea, bem como de acordo com a lei federal nº. 11.794. Além disso o projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal do Instituto de Biociências da USP (271/2016) (ANEXO I).

3.1.1 Extração de DNA e Genotipagem

Todos os animais foram submetidos a genotipagem para determinar a que grupo pertenciam (SOD1 mutante, SOD1 não mutante ou não transgênico), segundo o protocolo disponibilizado pela Jackson.

Um fragmento de aproximadamente 5mm da extremidade da cauda de cada animal neonato foi retirado no momento da eutanásia e armazenado devidamente identificado em microtubos separados. O DNA total foi isolado pela incubação do fragmento da cauda com 0,5 ml de tampão de lise (100mM Tris, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl, pH8,5) e 2,5ul de proteinase K, a 55°C overnight.

Após essa etapa, a solução foi homogeneizada vigorosamente e centrifugada (10 minutos a 3000rpm) para separação do material não digerido. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo no qual foram adicionados 0,5 ml de isopropanol e misturado por inversão. Esta solução foi centrifugada por 15 minutos a 12000rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado diluído em 100ul de tampão TE.

Para a genotipagem 1ul de DNA (5ng/ul) é adicionado em uma solução contendo a sonda controle e 1ul desse mesmo DNA (5ng/ul) é adicionado a uma solução contendo a sonda SOD1 (transgene). A receita para o preparo da referida solução é 1,2 µl de 10x PCR

Buffer (Invitrogen), 0,25 μ l de 10 mM dNTP, 0,36 μ l de 50 mM MgCl2, 0,05 μ l de cada sonda controle (20uM; oIMR7338 e oIMR7339) ou 0,4 μ l de cada sonda que reconhece o transgene (20uM; oIMR0113 e oIM0114), 0,42 μ l de Taq DNA polimerase e água para completar 12 μ l de reação. O protocolo detalhado bem como as sequências dos primers encontram-se na página da Jackson na internet (www.jax.org).

O programa de ciclagem (eppendorf mastercycler) foi: ciclo $1=95^{\circ}$ C por 3 minutos, ciclo $2=95^{\circ}$ C por 30 segundos, ciclo $3=60^{\circ}$ C por 1 minuto, ciclo $4=72^{\circ}$ C por 45 segundos, repetição por 35 ciclos do ciclo 2 ao 4; seguido de 2 minutos a 72^{\circ}C e hold a 4°C. A visualização foi feita em gel de agarose aplicando 6ul da solução da PCR contendo 1ul de reagente Blue Green (LGC biotecnologia) para marcação do DNA, em cada pocinho do gel. Em um dos poços foi aplicado o padrão de peso molecular 1Kb. O camundongo transgênico apresenta uma banda com peso de 236bp, como mostrado na figura 8.



Figura 8. Imagem do gel de agarose ilustrando o padrão de bandas da genotipagem de camundongos, cujo o macho parental possui o transgene hSOD1. Cada animal é representado em duas colunas. Uma coluna recebeu o DNA amplificado com primer SOD1 e outra o DNA amplificado com primer Controle Interno. O quadro de linha continua destaca um animal transgênico, apresentando bandas nos tamanhos de 236pb (SOD1) e 324pb (Controle), enquanto o quadro pontilhado evidencia um animal não transgênico para o gene SOD1, apresentando somente a banda controle de 324pb. A seta indica excesso de primer em todas as reações.

3.2 Modelos celulares de Neurodegeneração associada a SOD1G93A

3.2.1 Cultura primária de camundongos neonatos

Para a cultura de células primárias, a metodologia empregada foi uma modificação da descrita por KIVELL *et al.* (2001). Resumidamente, os camundongos neonatos das linhagens descritas no tópico 3.2 foram decapitados para retirada do córtex motor e medula espinhal (figura 9) e da cauda.



Figura 9. Representação esquemática das regiões dissecadas. (A). Córtex motor (Cx). Os círculos marcam a área do encéfalo que foi utilizada. (B) Medula Espinhal (Md). Barra de escala 1mm. Fonte: EL-KHOURY *et al.* (2014)

As caudas foram armazenadas em microtubos devidamente identificados a -80°C para posterior genotipagem dos animais, conforme descrito no item 3.1.1, enquanto os outros tecidos foram colocados, isoladamente, em microtubos com solução fisiológica gelada. Em seguida, as células foram dissociadas, suspensas em meio de cultura Neurobasal A (Invitrogen) suplementado com L-glutamina (250µM, Sigma), glutamax (250µM, Gibco), complexo B27 (2%, Invitrogen), penicilina/estreptomicina (40mg/L, Invitrogen), e plaqueadas, separadamente, em placas de culturas, sob uma lamínula previamente tratadas com poli-D-lisina (PDL). O meio de cultura foi trocado após 3 horas do plaqueamento e a cada 3 dias, até a utilização das células com 9 dias de culturo. As células de cada animal foram plaqueadas individualmente em um poço da placa de cultura para possibilitar o pareamento do material plaqueado com o resultado da genotipagem.

3.2.2 Linhagem Neuro-2a com superexpressão SOD1

Células da linhagem Neuro-2a foram plaqueadas e mantidas no meio DMEM (1X) e suplementadas com 10% se soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. Ao atingirem uma confluência de 70%, as células foram transfectadas com 600ng dos plasmídeos hSOD1-Wt ou hSOD1-G93A utilizando Lipofectamina 3000 (Invitrogen) de acordo com o protocolo da companhia. Após o período de 24 horas da transfecção essas células foram utilizadas em ensaios de Western Blotting ou fixadas para análise em microscopia.

3.3 Caracterização das Culturas

3.3.1 Culturas primárias de Córtex Motor e Medula Espinhal

A caracterização da cultura de células foi feita por imunofluorescência. Os neurônios das culturas foram identificados por meio da utilização do anticorpo anti-MAP2, proteína associada ao microtúbulo (Sigma, M4403, 1:1000). Já os neurônios motores foram identificados por meio de anticorpos específicos para cada cultura: para córtex motor utilizou-se anti-SMI32 (Covance, SMI-32R, 1:1000), que reconhece uma proteína do neurofilamento H presente em neurônios piramidais e para as culturas de medula espinhal utilizou-se anti-ChAT, colina-acetil-transferase (Santa Cruz, sc-20672, 1:300).

Para essas marcações as células foram fixadas com uma solução de paraformaldeído a 4% gelado durante 5 minutos seguido de permeabilização com triton X100 a 0,2% e posteriormente incubadas durante 18 horas a 4°C com os anticorpos primários. Os anticorpos secundários utilizados foram anti-mouse conjugado a FITC (Jackson ImmunoResearch, 97619, 1:120) e anti-rabbit Texas Red (Jackson ImmunoResearch, 90519, 1:250). Após a incubação com os anticorpos secundários, as placas foram lavadas 3x com PBS gelado por 5 minutos. Os núcleos celulares foram marcados com adição de meio de montagem contendo DAPI (Vector Laboratories).

As células foram visualizadas em microscópio Confocal (Zeiss). A quantificação da porcentagem de células expressando MAP2, SMI32 ou Chat foi realizada por meio de fotomicrografias digitais. Foram selecionadas para a quantificação 5 fotos de áreas escolhidas aleatoriamente em cada cultura analisada (n=3). A porcentagem das células positivas para cada anticorpo (AC) foi calculada seguindo a fórmula abaixo:



3.3.2 Cultura de linhagem Neuro-2a

As células da linhagem Neuro-2a foram submetidas a imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-MAP2 para certificar a pureza da cultura, uma vez que no laboratório outras linhagens celulares são manipuladas em equipamentos de uso comum. A metodologia utilizada foi a mesma descrita anteriormente para cultura primária.

3.4 Análise da distribuição Celular de C9ORF72

3.4.1 Imunofluorescência e microscopia confocal

Todas as células utilizadas em imunofluorescência, tanto de culturas primárias quanto de linhagem Neuro-2a, foram plaqueadas sobre uma lamínula de vidro previamente tratada com poli-D-lisina (PDL).

O meio de cultura foi descartado e as células foram submetidas a um banho de 5 minutos com PBS gelado e em seguida fixadas com uma solução de 4% paraformaldeído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas 3x de 5 minutos (cada lavagem) em PBS e permeabilizadas com PBS contendo 0,2% de Triton por 30 minutos em temperatura ambiente. O bloqueio para evitar ligações inespecíficas do anticorpo primário foi feito com PBS contendo 2% NGS, 4% BSA e 0,2% Triton, durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Após estas etapas as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-C9ORF72 (Santa Cruz, sc-138763, 1:100) e/ou Anti-MAP2 (Sigma, M4403, 1:1000) conforme o objetivo do experimento, overnight a 4°C. Os anticorpos secundários utilizados foram anti-mouse conjugado a FITC (Jackson ImmunoResearch, 97619, 1:120), anti-rabbit Texas Red (Jackson ImmunoResearch, 90519, 1:250) ou anti-rabbit Rhodamine red (Jackson ImmunoResearch, 111-295-003, 1:200), incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Depois das incubações as células foram lavadas novamente com PBS, as lamínulas foram retiradas da placa de cultura e posicionadas sobre uma lâmina de vidro própria para microscopia. Os núcleos celulares foram marcados com a adição do meio de montagem contendo DAPI e a visualização foi feita em microscópio confocal (Zeiss Microscopy LSM 880; Leica Microsystems SP 8).

3.4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Nesta técnica foram utilizadas exclusivamente células da linhagem Neuro-2a previamente transfectadas com os plasmídeos hSOD1-Wild type, hSOD1-G93A ou vetor vazio.

Preparo das amostras

As células, em uma densidade de 2,5 x 10^6 por tratamento, foram transferidas para microtubos identificados e centrifugadas a 800 rpm. Os pellets resultantes foram fixados com uma solução de Glutaraldeído 0,3% em Tampão Fosfato (Sorensen) 0,1M e Paraformaldeído 4% durante 2 horas a 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas com Tampão Fosfato 0,1M por cinco vezes de 10 minutos a 4°C, desidratadas através de banhos sucessivos em diferentes concentrações de álcool etílico (70%, 95% e 100%), à temperatura ambiente, e embebidas em solução de álcool 100% + resina acrílica LR White (Electron Microscopy Scienses, Ft Washington, U.S.A) na proporção de 1:1 em dois banhos de 10 minutos à temperatura ambiente. Por fim, as células foram colocadas na resina LR White e deixadas overnight, sob agitação, a 4°C. No dia seguinte, as amostras foram novamente impregnadas com LR White, recém preparada, em três banhos de 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foram transferidas para moldes (cápsulas de gelatinas) com resina. As cápsulas de gelatina contendo as amostras foram, então, colocadas em uma estufa, a 58°C e lá permaneceram por 72 horas. Após essa etapa, foram efetuados cortes ultrafinos, utilizando o ultramicrótomo Leica Ultracut UCT. Os cortes, recolhidos em grades (telas) de níquel de 200 mesh, foram submetidos à técnica de marcação de imuno-ouro, para detecção da proteína C9ORF72.

Marcação com Ouro (Imuno-ouro)

As grades foram submersas em gotas de tampão Tris-HCL 0,05M, pH 7.2, contendo 0,15 M de NaCL (TBS) e 1% de albumina sérica bovina (BSA – Sigma, St Louis, USA) por 5 minutos. Depois, foram bloqueadas com soro normal de cabra (NGS – Amersham, Little Chalfont, UK) diluído 1:30, durante 30 minutos a 4°C. Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário anti-C9ORF72 (Proteintech, 66140-1-Ig, 1:50), diluído em TBS com 1% BSA, overnight a 4°C. Os controles foram incubados com soro não imune sob as mesmas condições. Após lavagem em TBS com 0,2% BSA e 0,1% Tween 20 as amostras foram colocadas em TBS pH 8,2 com BSA a 1% durante 30

minutos a temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-rabbit conjugado a partículas de ouro de 12 nm (Jackson Immuno Research, cód. 111-205-144, 1:15) diluído em TBS pH 8,2 com 1% BSA durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, as grades foram lavadas com TBS pH 7,2 contendo BSA a 0,2% e Tween 20 a 0,1%, e lavadas novamente com a mesma solução sem BSA. Após fixação em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 10 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram lavadas com água destilada, contrastadas com acetato de uranila 2% (solução aquosa) e citrato de chumbo 0,2% por 10 minutos em cada solução, e observadas no microscópio eletrônico de transmissão (MET) com suporte do laboratório de microscopia, sob responsabilidade do Professor Dr. Alberto Ribeiro, e do especialista em microscopia Waldir Caldeira.

3.5 Ensaios de Colocalização entre C9ORF72 e RabGTPases

As células do córtex motor, medula espinhal e da linhagem Neuro-2a foram submetidas à imunofluorescência, conforme a metodologia já descrita no tópico 3.5.1 deste trabalho. As diferentes combinações de anticorpos primários e secundários que foram utilizados foram escolhidas conforme o tipo da cultura celular: cultura primária ou de linhagem. Se linhagem, transfectadas com plasmídeo contendo eGFP ou não.

Os anticorpos primários utilizados foram anti-C9ORF72 (Santa Cruz, sc-138763, 1:100), anti-Rab7 (Santa Cruz, sc-376362, 1:100) e anti-Rab1a (Santa Cruz, sc-311, 1:100). Os anticorpos secundários estão descritos na tabela abaixo:

Anticorpo/marca	Código	Diluição
Alexa Fluor® 488 (anti-mouse)	A-11029	1:200
Alexa Fluor® 594 (anti-mouse)	A-11005	1:250
Alexa Fluor® Pacific Blue (anti-mouse)	P-31582	1:250
Alexa Fluor® 488 (anti-rabbit)	A-21206	1:200
Alexa Fluor® 594 (anti-rabbit)	A-11037	1:250
Alexa Fluor® Pacific Blue (anti-rabbit)	P-10994	1:250
Rhodamine Red	111-295-003	1:200

Tabela1. Lista dos anticorpos secundários usados nos experimentos de colocalização

Para a lista completa dos anticorpos utilizados em todos os experimentos de imunofluorescência, ver o anexo II.

A análise quantitativa dos dados de colocalização entre C9ORF72 e as proteínas Rab7 ou Rab1a foi realizada utilizando-se o plugin "*Coloc2*" do software Image J (NIH).

3.6 Fracionamento Celular

Este protocolo de fracionamento celular é uma adaptação da metodologia desenvolvida pela ABCAM para separação de núcleos, membranas, mitocôndrias e citoplasma. A metodologia original completa pode ser consultada na biblioteca de protocolos da companhia (https://www.abcam.com/protocols/subcellular-fractionation-protocol).

O meio de cultura foi retirado e as células da linhagem Neuro-2a foram lavadas 1x com PBS gelado. Com o auxílio de um raspador (cell scraper) e uma pipeta, as células foram transferidas para um microtubo e incubadas no gelo durante 15 minutos com 500 μ L de tampão de fracionamento. A suspensão de células foi passada através de uma agulha de calibre 27 (27g) embutida em uma seringa de 1ml até que todas as células fossem lisadas. O lisado ficou no gelo por 20 minutos antes de ser centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo identificado como fração citoplasmática.

O pellet foi lavado 1 x com 500 μ L de tampão de fraccionamento, dispersado com o auxílio de uma ponteira, passado por uma agulha calibre 25 (25g) por 20 vezes e centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em TBS com 0,1% de SDS. A suspensão foi sonicada brevemente para quebrar o DNA genômico e homogeneizar o lisado. Após uma breve centrifugação, o lisado foi transferido para um novo tubo identificado como fração nuclear.

A receita do tampão de fracionamento é a seguinte: HEPES 20mM (pH 7,4), KCl 10mM, MgCl₂ 2mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, 0,02% de DTT 1mM e 0,5% de Coquetel inibidor e protease (Sigma). Os dois últimos reagentes foram adicionados somente no momento do uso.

A quantidade de proteína presente nas frações nuclear e citoplasmática foi acessada por meio do método de Bradford (1976). Após a quantificação as proteínas foram submetidas a separação por eletroforese e western blotting.

3.7 Silenciamento gênico por lipofecção de siRNA

Quando as culturas de linhagem Neuro-2a atingiram uma confluência de aproximadamente 70%, o meio de cultivo (DMEM suplementado) foi descartado e as células foram submetidas as condições indicadas para a transfecção com Lipofectamina 3000 (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. Utilizou-se uma concentração de 70 pmol do siRNA específico para a isoforma longa da proteína C9ORF72 (siRNA-C9-L) - visto que é a isoforma mais abundante em camundongos - ou de siRNA scramble, ambos desenhados através da plataforma BLOCK-iT[™] RNAi Designer da Invitrogen (Tabela 2).

siF	RNA	Sequência de Nucleotídeos (5' – 3')
C9ORF72-	Sense	GCGGCUACCUUUGCUUACUGGGAUA
long	Anti-sense	UAUCCCAGUAAGCAAAGGUAGCCGC
Scramble	Sense	GCGCCAUGUUUAUUCGGUCGCGAUA
	Anti-sense	UAUCGCGACCGAAUAAACAUGGCGC

Tabela 2. Sequências Nucleotídicas dos siRNAs C9orf72 e Scramble

Após a transfecção, as células foram cultivadas em estufa a 37,5°C em 5% de CO₂. Passado o período de 24 horas as culturas foram lisadas para extração de proteínas e western blotting ou as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, imunomarcadas com anti-C9ORF72 e posteriormente com um anticorpo secundário fluorescente para visualização em microscópio confocal (Leica Microsystems). Ambas as técnicas permitiram a análise da eficiência da transfecção, uma vez que os oligonucleotídeos não são conjugados a sondas fluorescentes.

A concentração de siRNA e o tempo de transfecção foram determinados previamente através de um processo de dose-resposta, utilizando como base valores já descritos na literatura. Determinado os valores que seriam utilizados na lipofecção, as culturas foram analisadas visualmente quanto a mortalidade celular através de ensaios de coloração com azul de Tripan (Gibco, 10 µl).

3.8 Superexpressão de C9ORF72

As células Neuro-2a em cultura foram transfectadas com 600 ng do vetor fluorescente pEGFP-C2 contendo a sequência da proteína C9ORF72 isoforma longa (*long*,

C9-L), utilizando a Lipofectamina 3000 (Invitrogen) e seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. As células transfectadas com o plasmídeo C9-L durante 24 horas foram fixadas com paraformaldeído 4% e submetidas a técnica de imunofluorescência. Já para Western Blot, as células Neuro-2a foram transfectadas com o plasmídeo C9-L por 6 horas ou co-transfectadas com siRNA-C9-L durante 18 horas e após esse período, o meio com siRNA foi retirado e o meio Optmem (Gibco) com o plasmídeo C9-L e Lipofectamina 3000 foi adicionado nas culturas. As células ficaram por mais 6 horas na incubadora a $37,5^{\circ}$ C e 5% CO₂ e depois foram lisadas para extração das proteínas.

O plasmídeo (C9-L) foi gentilmente doado pelo professor Dr. Shangxi Xiao, do Centro de Pesquisa em Doenças Neurodegenerativas da Universidade de Toronto, no Canadá (XIAO *et al.*, 2015).

3.9 Fluxo Autofágico

O fluxo autofágico foi monitorado utilizando o vetor fluorescente LC3eGFPmCherry. A expressão do eGFP é restrita aos autofagossomos e o mCherry pode ser encontrado nos autofagossomos e autofagolisossomos. O fluxo autofágico foi calculado pela razão entre o número de vesículas apresentando as duas fluorescências (eGFP e mCherry), pelas vesículas apresentando apenas o sinal da mCherry (Kimura et al., 2007).

Após 20 horas da transfecção com siRNA, as culturas de linhagem Neuro-2a foram transfectadas com 1000ng de LC3- eGFPmCherry utilizando lipofectamina 3000 (Invitrogen), de acordo com o protocolo da companhia. Após 4 horas as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e montadas em lâmina de vidro com meio de montagem sem DAPI.

As células foram avaliadas em microscopia confocal nos comprimentos de onda de excitação de 488nm para eGFP e 535nm para mCherry, a emissão foi registrada a 520nm e 620nm, respectivamente. A análise quantitativa dos dados foi realizada utilizando-se o programa Image J (NIH) e o plug-in "Find maxima".

3.10 Homeostase do Retículo Endoplasmático

Quando as células Neuro-2a em cultura atingiram uma confluência de aproximadamente 90% foi adicionado ao meio de cultivo a Probe molecular ER Tracker Blue-White DPX (Molecular Probes) a uma concentração final de 1 µM. As células foram

incubadas por 30 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% e visualizadas em microscópio confocal (Leica Microsystems).

3.11 Extração de Proteínas e Western Blotting

Os tecidos de Córtex motor e medula espinhal extraídos de camundongos neonatos, assim como as células das culturas de linhagem Neuro-2a, foram lisados e homogeneizados utilizando-se 250µL de tampão de lise constituído de 1% NP40, 0,5% deoxicolato de sódio, 1% SDS, 1mM EDTA, 1mM EGTA e 1% coquetel inibidor de proteases (Sigma). A quantidade de proteína em cada lisado foi acessada pelo método de BRADFORD (1976). A curva de calibração foi feita utilizando-se albumina em quantidade de 0 a 16 µg de proteína por poço.

As amostras foram aplicadas às canaletas do gel de poliacrilamida a 12% ou 15% para separação por eletroforese. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose que foi bloqueada e incubada com um ou mais dos seguintes anticorpos primários: anti-C9ORF72 (Santa Cruz, sc-138763, 1:500) anti-C9ORF72 (Proteintech, 66140-1-Ig, 1:500), anti-Rab7 (Santa Cruz, sc-376362, 1:200), anti-beclina1 (Santa Cruz, sc-11427, 1:1000), anti-p-62 (Cell Signaling, #5114, 1:1000), anti-LC3 (Cell Signaling #3868, 1:500), anti-Rab1a (Santa Cruz, sc-311, 1:500), anti-ATF6 α (Santa Cruz, sc-166659, 1:1000), anti-CHOP (Santa Cruz, sc-166682, 1:500), anti-Lamina B1 (Santa Cruz, sc-54145, 1:500), anti α -Tubulina (Sigma, T6199, 1:1000). A imunodetecção desses anticorpos foi utilizada para avaliação da expressão da proteína C9ORF72, avaliação da iniciação da autofagia, tráfego e maturação de autofagossomos, homeostase do retículo endoplasmático e eficiência do fracionamento celular. A diluição e as condições de incubação dos anticorpos descritos neste tópico estão detalhadas no anexo III.

Os anticorpos secundários utilizados foram anti-mouse IgG (GE Healthcare, NA931, 1:6000), anti-rabbit IgG (GE Healthcare, NA934, 1:10000) e anti-goat IgG (Abcam, ab97110, 1:2000), conjugados a peroxidase (HRP). A incubação das membranas com estes anticorpos foi feita à temperatura ambiente durante 1 hora. As membranas foram então lavadas e a marcação foi revelada através de incubação com reagente quimioluminescente (*Western Enhancing Chemiluminescence Reagent Plus*, ECL kit, Perkinelmer, EUA) durante 1 minuto e exposição a filme apropriado (Hyperfilm ECL,

Amersham Biosciences) revelados conforme instruções do fabricante ou pela utilização do fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 sob responsabilidade da Prof^a Dr^a Maria Rita Passos Bueno.

O controle de loading foi feito com Ponceau-S ou com o anticorpo contra a βactina (Santa Cruz, sc47778, 1:1000), para normalização. Os filmes foram quantificados por densitometria óptica usando o programa ImageJ (NIH).

3.12 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados usando o programa GraphPadPrism para Windows (versão 5.0, GraphPadSoftware, San Diego, Califórnia, USA). Os testes estatísticos adotados foram o Teste-t e análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni para comparação entre todos os grupos de estudo. A colocalização entre C9ORF72 e outras proteínas foi analisada pelo coeficiente de sobreposição de Mander (*Mander's overlap coefficient* - MOC). O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p \le 0.05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização e Padronizações

4.1.1 Caracterização das culturas

As culturas primárias do córtex motor e da medula espinhal apresentaram 57% e 59% de neurônios, respectivamente (Figura 10 e Tabela 3). Já as células Neuro-2a confirmaram ser imunorreativas ao marcador neuronal MAP2 (Figura 10 e Tabela 3).



Figura 10. Caracterização da cultura primária de córtex e medula espinhal de camundongos e linhagem Neuro-2a. Nas fotomicrografias a proteína MAP-2 evidencia o citoesqueleto neural em (A) córtex motor, (B) medula espinhal e (C) linhagem celular de neuroblastoma de camundongo. Barra de escala 50 µm.

Tabela 3. Porcentagem de células positivas à MAP2 em cada cultura celular. DAPI indica o número total de núcleos marcados.

Área	DAPI	% Células MAP2 positivas
Córtex Motor	324	186 (57,5%)
Medula Espinhal	212	125 (58,9%)
Neuro-2a	417	417 (100%)

As culturas primárias foram caracterizadas também quanto à presença de neurônios motores. A figura 11 mostra células positivas para os marcadores SMI e colina acetil transferase, indicando que as culturas são apropriadas para as análises propostas.



Figura 11. Neurônios motores das culturas de medula espinhal e córtex motor. O anticorpo anti-Chat detecta a presença da enzima Colina acetil transferase, característica de neurôrios motores colinérgicos da medula espinhal, enquanto o anticorpo anti-SMI32 reage seletivamente com neurofilamento H de subconjuntos de neurônios piramidais do neocórtex. Escala 20 µm.

4.1.2 Padronização da Transfecção com hSOD1

As células da linhagem Neuro-2a foram transfectadas durante 48 horas com os plasmídeos GFP-hSOD1-Wt e GFP-hSOD1-G93A utilizando lipofectamina® 3000 (Thermo Fisher Scientific). A figura 12 revela a eficiência da transfecção, ilustrando alta eficiência de expressão dos plasmídeos.



4.1.3 Transfecção com plasmídeo eGFP-C2-C9ORF72-long

A fim de se analisar as melhores condições de transfecção para o plasmídeo eGFP-C2-C9ORF72-long (C9-L), foram realizados testes de transfecção para o referido plasmídeo em cultura de células Neuro-2a com 600 ng de DNA durante 2, 6 e 24 horas de transfecção, respectivamente. Conforme mostra a figura 13, a partir de 6 horas de transfecção já é possível obter uma boa quantidade de células expressando a proteína C9-L.



Figura 13. Fotomicrografias ilustrando a transfecção com o plasmídeo eGFP-C2-C9orf72-long em células da linhagem Neuro-2a. As células foram transfectadas durante 2, 6 e 24 horas. As imagens foram capturadas com contraste diferencial de fase (DIC) e com laser que detecta a emissão de fluorescência verde, presente somente nas células que receberam o plasmídeo. Barra de escala 50 µm.

4.1.4 Ensaio de silenciamento gênico

Para testar o silenciamento de C9ORF72, células da linhagem Neuro-2a foram transfectadas, utilizando a lipofectamina® 3000, com diferentes concentrações do siRNA dupla fita contra C9ORF72, durante 5, 8 (dados não mostrados) e 24h. Só foi possível observar redução na expressão de C9ORF72 com 24 horas de transfecção, dados mostrados na figura 14. A concentração de 70 pmol foi a que gerou a melhor eficiência de silenciamento, mostrando uma redução de aproximadamente 60% na expressão do gene alvo.



Figura 14. Teste de silenciamento da proteína C9ORF72, isoforma longa. (A) O Gráfico apresenta os níveis endógenos da proteína C9ORF72 após silenciamento por siRNA. (B) A figura detalha a sequência nucleotídica do ds-siRNA e sua região de hibridação no mRNA.

O índice de morte celular com a transfecção de 70 pmol de siRNA durante 24 horas foi acessado pelo método de coloração com azul de Trypan, em que células com a membrana plasmática íntegra excluem o corante, enquanto células com a membrana danificada, não viáveis, permitem a entrada do corante tornando seu citoplasma azul (STROBER, 2001). O resultado, apresentado na figura 15, indica que a taxa de morte celular nas culturas transfectadas com siRNA foi desprezível.



Figura 15. Teste de Viabilidade celular com azul de Trypan. As células Neuro-2a foram submetidas a lipofecção com siRNA a 70 pmol durante 24 horas. A seta indica uma célula não viável. Não foram encontradas taxas significativas de morte celular. Barra de escala 50 µm.

4.2 A proteína C9ORF72 tem distribuição celular ampla

A proteína C9ORF72 está presente em neurônios e em células da glia da medula espinhal e do córtex motor de camundongos neonatos (Figura 16).



Figura 16. C9ORF72 está presente em neurônios e em células da glia do córtex motor e medula espinhal de camundongos. Os Neurônios podem ser identificados pela marcação verde do anticorpo anti-MAP2, enquanto as células da glia aparecem destacadas somente em vermelho pelo anticorpo anti-C9ORF72. É possível notar que tanto neurônios quanto as células da glia apresentam marcação vermelha, indicando a presença de C9ORF72 em ambos os tipos celulares. As setas e os quadros pontilhados apontam para células da glia nas culturas do córtex motor e medula espinhal, respectivamente. Imagens de microscopia confocal. Barra de escala 20 µm.

C9ORF72 também foi identificada no núcleo e no citoplasma das células primárias, como mostra a figura 17. Alguns trabalhos apontam para uma expressão diferencial de C9ORF72, sendo a isoforma longa a mais expressa no citoplasma enquanto a isoforma curta é mais expressa na membrana nuclear, sugerindo inclusive papeis distintos para C9-L e C9-S (ATKINSON *et al.*, 2015; XIAO *et al.*, 2015).



Figura 17. A proteína C9ORF72 está presente no núcleo (azul) e citoplasma das células. Neurônios marcado em verde com anti-MAP2. Vermelho corresponde a proteína C9ORF72. A seta indica a região da célula que aparece ampliada no canto esquerdo da imagem. As imagens foram capturadas em Z-stack por microscopia confocal. A espessura das fatias é mostrada pelos valores em cada imagem (µm). Escala 20 µm.

Com intuito de observar especificamente a distribuição celular da isoforma longa de C9ORF72, células da linhagem Neuro-2a foram fixadas, submetidas a ensaios de imuno-ouro utilizando o anticorpo primário anti-C9ORF72 (Proteintech, 66140-1-Ig), e um anticorpo secundário conjugado a esferas de ouro de 12 mm, e visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão. É importante destacar que segundo informações do próprio fabricante, o anticorpo anti-C9ORF72 (Proteintech, 66140-1-Ig) detecta somente a isoforma longa da proteína C9ORF72, C9-L, fato atestado pelos experimentos de westen blotting realizados por FRICK *et al.* (2018) e pelo trabalho de avaliação de anticorpos comerciais de DAVIDSON *et al.* (2018).

A proteína C9-L foi detectada tanto no interior do núcleo quanto no citoplasma das células, livre ou associada a membrana de vesículas e à membrana nuclear (figura 18).



Figura 18. Eletromicrografias de células da linhagem Neuro-2a mostrando a distribuição celular de C9ORF72. Núcleo (*Nuc*), Citoplasma (*Cyto*), envelope nuclear (*en*) e vesículas (*vs*). (A) A seta 1 aponta para imuno marcação de C9ORF72 nuclear. A cabeça de seta indica C9 presente na membrana que delimita o núcleo. C9ORF72, indicada pelas setas 2 e 3 (B), 4 e 5 (C), aparece na membrana e no interior de vesículas citoplasmáticas com conteúdo amorfo e eletrodenso, semelhante a vacúolos autofágicos. (D) A seta 6 aponta para C9ORF72 citoplasmática, enquanto cabeça de seta indica C9 associada à membrana de uma vesícula, aparentemente vazia. (E) C9ORF72 também aparece nas regiões mais escuras do núcleo onde há maior concentração de DNA. As cabeças de seta apontam as regiões amplificadas no canto superior direito de cada imagem. As barras de escala equivalem a 0,5 µm em todas as imagens.

4.3 Distribuição celular de C9ORF72 em células Neuro-2a modelo de esclerose lateral amiotrófica

A partir da lipofecção com plasmídeos para expressão da proteína humana mutante hSOD1-G93A, propensa à agregação, foram obtidas culturas de células da linhagem Neuro-2a modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica, semelhante ao modelo descrito no trabalho de OH *et al.* (2008). Foram geradas culturas expressando também o transgene hSOD1 selvagem (Wt) e células transfectadas com o vetor vazio (E.V.) que foram utilizadas como controles. Essas culturas foram submetidas a experimentos de

imunofluorescência utilizando o anticorpo primário anti-C9ORF72 (sc-138763), para detecção de C9 total, e observadas no microscópio confocal.

A distribuição celular da proteína C9ORF72 citoplasmática parece inalterada nas culturas de Neuro-2a SOD1-G93A em relação a Wt e controle. Por outro lado, análises quantitativas revelaram maior porcentagem de C9ORF72 no núcleo de células que expressam o transgene hSOD1 mutante (figura 19) em relação a Wt e controle. A quantificação foi realizada pela análise de co-localização entre C9ORF72 e o marcador nuclear DAPI utilizando software Image-J.



Figura 19. Há mais colocalização entre C9ORF72 e núcleo em células Neuro-2a que expressam SOD1 mutante. (A) Células transfectadas com o vetor vazio (E.V). (B) e (C) Células transfectadas com hSOD1 wild type, Wt, e hSOD1 mutante G93A, respectivamente. A proteína C9orf72 está marcada em vermelho. As setas apontam a região da célula que foi amplificada. (D) Quantificação de C9ORF72 nuclear. Análise estatística One way ANOVA, pós teste de Bonferroni, (** $p \le 0,01$). Dados apresentados como média \pm SEM. N=5. Escala 20 µm.

Dado que háa indícios da expressão diferencial das isoformas de C9ORF72 nos diferentes compartimentos celulares, foram realizados ensaios de imuno-ouro utilizando a microscopia eletrônica de transmissão para determinar a contribuição de C9-L para o aumento da proteína C9ORF72 no compartimento nuclear.

O resultado apresentado na figura 20 indica que há um aumento na quantidade de C9ORF72, isoforma longa, no núcleo das células, sugerindo que a proteína de 481 aminoácidos também desempenha uma função nuclear e que seu aumento está associado a presença da proteína humana SOD1 mutante (G93A), propensa a agregação.



Figura 20. Expressão de C9ORF72, isoforma longa, no núcleo de células Neuro-2a. Em (A), (B) e (C) as setas apontam para a região amplificada. *Cyto* indica a área das células correspondente ao citoplasma, enquanto *Nuc* indica a região nuclear. (D) Quantificação das punctas de C9ORF72. Análise estatística One way ANOVA, pós teste de Bonferroni, (*p<0,05). Dados apresentados como média \pm SEM. N=3. Barra de escala 0,5 µm.

4.4 A presença de hSOD1 mutante leva à translocação nuclear da proteína C9ORF72 em linhagem celular Neuro-2a

Para determinar se o aumento de punctas de C9ORF72 no núcleo estava correlacionado a um aumento nos níveis totais de expressão dessa proteína, amostras de

células Neuro-2a, dos três grupos de transfecção (E.V, Wt e G93A), foram submetidas a separação por eletroforese e western blot. Os níveis totais da proteína C9ORF72 endógena se mostraram inalterados (figura 21-A), sugerindo que na presença de hSOD1 mutante, a isoforma longa da proteína C9ORF72 é translocada para o núcleo.

A quantidade de proteína C9ORF72 no núcleo das células foi analisada ainda através de fracionamento celular e western blotting (figura 21-C). O resultado corrobora os dados obtidos por microscopia confocal e eletrônica, sugerindo um aumento de C9ORF72 no núcleo de células hSOD1-G93A, ainda que não significativo (figura 21-D).



Figura 21. Translocação nuclear da proteína C9ORF72. (A) Quantificação dos níveis de expressão da proteína C9ORF72 total com o anticorpo sc-138763 (**B**). Não foi possível detectar a presença da isoforma curta de C9orf72, de 25 KDa. A seta aponta para a banda marcada com anti-SOD1 mutante. (**C**). As células foram lisadas e separadas em frações citosólica (Cyto) e nuclear (Nuc) e submetidas a análise por western blotting e imunodetecção com anticorpos específicos. O anticorpo anti-C9ORF72 (66140-1-Ig) revela os níveis da proteína C9-L endógena. As proteínas Alfa-tubulina, exclusiva do compartimento citoplasmático, e lamina B1, exclusiva do núcleo celular, foram utilizadas como controles para atestar a eficácia do fracionamento. (**D**) Análise quantitativa dos níveis da proteína C9ORF72 longa. As barras são a Média \pm SEM. Teste estatístico one-way ANOVA. N = 3.

Embora o anticorpo anti-C9ORF72 (sc-138763) tenha afinidade por um epítopo presente nas isoformas longa (55 kDa) e curta (25 kDa) de C9ORF72, não foi possível detectar por western blot a isoforma curta (C9-S), como mostrado na figura 21-B. De forma semelhante, LESKELÄ *et al.* (2019) também não detectaram a expressão endógena da isoforma curta em células Neuro-2a. FRICK *et al.* (2018) encontraram resultados semelhantes em sua pesquisa com células humanas e murinas, sugerindo que a isoforma A, de 481 aminoácidos (C9-L), é a principal e predominante isoforma proteica expressa no sistema nervoso central humano e de camundongo.

Em conjunto, esses dados levantam um questionamento: qual papel a isoforma longa de C9ORF72 desempenha no núcleo, que justifique sua translocação na presença de um fator de estresse, como a SOD1-G93A?

Uma hipótese plausível parte do princípio de que C9ORF72 interage, através da região de repetição hexanucleotídica GGGGCC, com proteínas de ligação a RNA e ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares (hnRNA). Logo, a translocação nuclear de C9-L seria um mecanismo responsivo para regulação do metabolismo de RNAs, transporte dessas moléculas do núcleo para o citoplasma ou controle da tradução, a fim de reestabelecer a homeostase celular (FARG *et al.*, 2014; MORI; LAMMICH; *et al.*, 2013).

4.5 Análise da expressão de proteínas da via autofágica em modelos de ELA

Células da linhagem Neuro-2a apresentam formação de agregados da proteína SOD1 após 8 horas de transfecção com plasmídeo para superexpressão de SOD1 humana mutante G93A, e a presença da proteína mutante propensa a agregação é suficiente para induzir nas células o estresse do retículo endoplasmático (OH *et al.*, 2008). Além disso, a eficiência da autofagia aparece diminuída em camundongos modelos da esclerose lateral amiotrófica em estágio assintomático (XIE *et al.*, 2015). Embora os níveis de expressão de C90RF72 não apresentem variações entre o grupo controle e grupo com superexpressão de SOD1 mutante, como detalhado no tópico anterior, os dados da literatura apoiam a ideia de que outras proteínas autofágicas poderiam ter sua expressão alterada na presença de SOD1-G93A, ou quem sabe, pela translocação nuclear de C90RF72.

Portanto, para analisar possíveis diferenças nos níveis de expressão de proteínas envolvidas na autofagia, foram realizados ensaios de Western blot com lisados de células Neuro-2a para a detecção de Beclina-1, que atua na iniciação da autofagia, LC3 I/II, um marcador de autofagossomos, P62, proteína adaptadora que faz a ponte entre cargas

marcadas para a degradação e o autofagossomo, Rab7, GTPase fundamental para a maturação e transporte de endossomos e Rab1, GTPase envolvida no recrutamento de membrana para formação do fagóforo, além de C9ORF72, de função amplamente discutida neste trabalho (Figura 22).

Nenhuma das proteínas analisadas apresentou alterações significativas na expressão entre os grupos experimentais. Entretanto, vale destacar que Beclina-1, P62 e Rab1 tiveram seus níveis endógenos reduzidos nas amostras de células transfectadas com SOD1-G93A, como mostrado nos gráficos da figura 22-B, D e F. A redução na expressão de Beclina-1 e Rab1 poderiam implicar em disfunções na maquinaria de iniciação da autofagia enquanto a diminuição de P62 pode ter razões controvérsias.



Figura 22. Análise da expressão de proteínas da via autofágica em linhagem Neuro-2a. E.V. = culturas transfectadas com o vetor vazio, utilizadas como controle; Wt = culturas transfectadas com o plasmídeo hSOD1-wild type; G93A = culturas transfectadas com o plasmídeo para expressão da proteína mutante hSOD1-G93A. (A). Não foi possível detectar a isoforma de 25 KDa de C9ORF72. (B) Quantificação da expressão de Beclina-1. (C) O gráfico apresenta a razão entre os níveis endógenos das proteínas LC3I (banda superior) e LC3 II (banda inferior), normalizados por ponceau. (D), (E) e (F) Quantificação das referidas proteínas indicadas no eixo Y de cada gráfico. Análise estatística One way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Dados apresentados como média \pm SEM. N=5.

Se, por um lado, a redução nos níveis de P62 tem sido amplamente utilizada como sinal de maior atividade autofágica, uma vez que, ao entregar substratos para a degradação, ela mesma é degradada via formação dos autofagolisossomos (PANKIV *et al.*, 2007), por outro lado, P62 é uma proteína envolvida em inúmeras vias intracelulares, como a via de ativação de NF-kB e oligomerização de caspase-8, portanto, existem outros mecanismos, além de alterações na atividade autofágica, que podem afetar seus níveis endógenos (MOSCAT & DIAZ-MECO, 2009; MOSCAT *et al.*, 2016). Por exemplo, um estudo recente demonstrou que a proteína parkina, uma ligase de ubiquitina E3, pode promover a degradação proteossomal de P62, reduzindo significativamente seus níveis em células SH-SY5Y por uma via independente da autofagia (SONG *et al.*, 2016). Mas, P62 também se mostrou sujeita a degradação proteossomal por uma via dependente de autofagia com ubiquitinação induzida por ATG16L1, em fibroblastos embrionários de camundongo (LEE, J. *et al.*, 2012).

Além disso, a diminuição nos níveis de P62 também poderia ser explicada como efeito de sua clivagem, juntamente com outras proteínas autofágicas, por caspases 6, 8 e calpaína 1 (NORMAN *et al.*, 2010), assim como seu aumento poderia ser resultado de regulação transcricional e não necessariamente de prejuízos na degradação autofágica (KIM, J. H. *et al.*, 2014). Dadas essas informações, a quantificação de P62, por si só, não representa um bom indicador de fluxo autofágico, devendo ser analisada em conjunto com outros experimentos.

A redução nos níveis de BECN1 (figura 22-B) sugere um mecanismo de iniciação de autofagia deficiente, visto que a associação dessa proteína a membrana do fagóforo é crítica para a formação dos autofagossomos, e consequentemente para a autofagia (KANG *et al.*, 2011). Porém, é importante salientar que níveis reduzidos de Beclina-1 são comuns em células cancerígenas, que é o caso desse modelo de estudo (LIANG *et al.*, 1999; MIRACCO *et al.*, 2007).

Dado que neurônios primários são mais sensíveis a quaisquer alterações na dinâmica intracelular, esboçando uma resposta mais acentuada que células de neuroblastoma, análises semelhantes foram realizadas utilizando lisado de células extraídas do córtex motor de camundongos transgênicos para os genes SOD1 humana selvagem ou mutante, a fim de avaliar melhor os efeitos de SOD1 mutante sobre a expressão de C9ORF72 e outras proteínas autofágicas (figura 23).

Semelhante ao resultado encontrado em células Neuro-2a, nas células de tecido do córtex motor a proteína C9ORF72 não apresentou mudanças em seus níveis (figura 23-A), assim como Beclina-1, que também não mostrou alterações significativas nos níveis proteicos, mas contrasta com a leve diminuição (embora não significativa) encontrada nas células Neuro-2a. Por outro lado, os resultados de LC3 e Rab7 (figura 23 - C e D) indicam maior expressão das respectivas proteínas em amostras de animais modelo de ELA, o que pode ser considerado um indicativo de aumento na atividade autofágica que, juntamente com a redução nos níveis de P62 observados em células de linhagem Neuro-2a (figura 22-D), corroboram a hipótese de autofagia aumentada na presença de SOD1 mutante.



Figura 23. Análise da expressão de proteínas autofágicas no córtex motor de camundongos. Amostras obtidas de animais não transgênicos (CTRL); amostras extraídas de animais transgênicos para o gene humano SOD1 wild type (Wt) ou SOD1 Mutante (G93A). (A) Níveis endógenos da proteína C9ORF72. A isoforma curta, de 25 kDa, não foi detectada, portanto, as bandas apresentadas representam a isoforma longa, de 55 kDa. (B) Quantificação da expressão de Beclina-1. (C) O gráfico apresenta a razão entre os níveis endógenos das proteínas LC3 I (banda superior) e LC3 II (banda inferior), normalizados por ponceau (D) Quantificação da expressão de Rab7. Análise estatística One way ANOVA, seguida do pós-teste de Bonferroni (*p \leq 0,05 e #p \leq 0,1). Dados apresentados como média ± SEM. N=3

Entretanto, embora a quantidade de LC3 II seja um bom indicador de formação de autofagossomos, não significa ocorrência de atividade autofágica. Na verdade, o aumento de LC3 II pode indicar tanto maior formação quanto acúmulo de autofagossomos devido a um bloqueio na fusão com os lisossomos, levando a consequente disfunção autofágica (MIZUSHIMA *et al.*, 2010). Portanto, admite-se a partir desses resultados, que o aumento na expressão de LC3II não está associado ao aumento de autofagia, mas a seu prejuízo, na hipótese de que LC3II não estaria sendo degradada, o que concorda com Rab7 menos ativada. O aumento nos níveis de Rab7 (figura 23-D) não pode ser associado à sua atividade.

ZHANG, F. *et al.* (2007) demonstraram que SOD1 mutante interage *in vitro* e *in vivo* diretamente com complexo dineína, essencial para o transporte retrógrado de autofagossomos e fusão com os lisossomos (KIMURA, S. *et al.*, 2008), fato apontado pelos autores como possível causa de prejuízos no transporte axonal e consequentemente na autofagia, levando a morte de neurônios motores. Esse resultado reforça a ideia de que, na presença de SOD1 mutante, o aumento de LC3 II está relacionado ao acúmulo de autofagossomos e prejuízos na autofagia em razão do impedimento no transporte e fusão entre autofagossomos e lisossomos.

É possível ainda que essa interrupção no tráfego retrógrado e acúmulo de vesículas autofágicas desencadeie uma cascata de sinalização apoptótica que leve a clivagem de P62 e Beclina-1 por caspases e calpaínas, reduzindo seus níveis intracelulares. Essa hipótese é, em parte, apoiada pelo fato amplamente revisado de que a autofagia e a apoptose possuem vias de sinalização em comum e de que a inibição autofágica pode conduzir a ativação da apoptose (BOOTH *et al.*, 2014; BOYA *et al.*, 2005; DJAVAHERI-MERGNY *et al.*, 2010).

Portanto, de um modo geral, pode-se afirmar que a presença de SOD1 mutante nas células acarretou prejuízos para a autofagia com deficiência na maquinaria de iniciação e maturação de autofagossomos, representada pela redução na expressão de Beclina-1, Rab1 e P62 em linhagem e aumento na expressão de LC3 II e Rab7 em células primárias, além de ocasionar a translocação nuclear de C9ORF72.

4.6 Interação entre C9ORF72 e Rabs citoplasmáticas não é alterada pela translocação nuclear de C9-L

As proteínas Rab7 e Rab1 já foram apontadas como alvos específicos de C9ORF72. Diversos estudos comprovaram a existência de interação molecular entre essas proteínas, corroborando o pressuposto de que C9ORF72 atua como um GEF para essas Rabs (FARG *et al.*, 2014; WEBSTER *et al.*, 2016). Através de ensaios de imuno-histoquímica utilizando secções medulares pós-morte de portadores de ELA e pessoas sem a neurodegeneração, FARG *et al.* (2014) demostraram que há mais colocalização entre C9ORF72 com Rab7 ou Rab11 em indivíduos com ELA portadores da mutação de expansão no gene C9ORF72, sugerindo uma possível desregulação do tráfego endossômico.

A fim de verificar se resultados semelhantes aos encontrados por FARG *et al.* (2014) seriam observados também em modelos celulares de ELA com SOD1 mutante, foram realizados ensaios de imunofluorescência com células Neuro2-a e células de culturas primária do córtex motor de camundongos. As análises de colocalização foram realizados utilizando o software ImageJ para determinar o Coeficiente de Sobreposição de Mander (MOC) para os pixels referentes à C9ORF72. Os resultados, apresentados nas figuras 24 e 25 e nos gráficos da figura 26 indicam que não há diferença significativa no grau de colocalização entre C9ORF72 com Rab7 ou Rab1 entre os grupos estudados, sugerindo que a translocação de C9-L para o núcleo na presença de SOD1 mutante não interfere em sua função citoplasmática como RabGEF, uma vez que não afeta a interação C9ORF72-Rab. Esse resultado sugere que a translocação e a ativação de Rabs via C9ORF72 são eventos independentes.


Linhagem Neuro-2a

Figura 24. A proteína C9ORF72 colocaliza com Rab1 e Rab7 em células da linhagem Neuro-2a, apesar de sua translocação nuclear. **(A) e (B)** Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal revelam a localização celular de C9ORF72 (vermelho), Rab1 e Rab7 (azul). *CTRL*= grupo transfectado com o vetor vazio, Wt = grupo transfectado com o plasmídeo para expressão de hSOD1 selvagem e *G93A*= grupo com expressão de hSOD1 mutante G93A. Escala 20 µm.



Córtex Motor

Figura 25. A proteína C9ORF72 colocaliza com Rab1 e Rab7 em células primárias de camundongos, a despeito de sua translocação nuclear. (A) e (B) Fotomicrografias de células do córtex motor de camundongos CTRL = não transgênicos, Wt = transgênicos quanto ao gene hSOD1 selvagem e G93A = transgênicos para hSOD1 mutante, mostrando a localização celular de C9ORF72 (vermelho), Rab1 e Rab7 (verde). Escala 20 μ m.



Figura 26. Análise quantitativa da Colocalização entre C9orf72 e Rab1 ou Rab7, apresentadas nas figuras 22 e 23 utilizando o coeficiente de sobreposição de Mander para determinar o grau de colocalização entre as proteínas. Os gráficos (A) e (B) apresentam a quantificação da colocalização em células da linhagem Neuro-2a, enquanto os gráficos (C) e (D) mostram a quantificação em células primárias do córtex motor de camundongos; tM2 indica que o coeficiente em análise se refere a sobreposição do sinal de C9orf72 (canal vermelho) com o sinal das Rabs (canal azul ou verde). Os valores são apresentados como média \pm SEM. Teste estatístico One way ANOVA, com pós teste de Bonferroni, considerando significativo $p \le 0.05$. N=3.

4.7 Efeito do silenciamento de C9-L sobre a autofagia em linhagem celular Neuro-2a

A hipótese da haploinsuficiência de C9ORF72 tem sido discutida como um dos principais mecanismos patogênicos associados a ELA. Concordantemente, C9ORF72 tem se mostrado uma proteína indispensável para manutenção do equilíbrio intracelular, uma vez que organismos com nocaute do gene C9 apresentam disfunções em diferentes vias moleculares. O nocaute de *C9ORF72* tem ajudado pesquisadores a desvendar algumas importantes funções dessa proteína para a fisiologia da célula, e simula o mecanismo de haploinsuficiência, sugerido como mecanismo patogênico em ELA com mutação no gene *C9ORF72* (C9ELA).

De modo semelhante e com o objetivo de verificar quais os efeitos de níveis reduzidos da isoforma longa de C9ORF72 sobre a atividade autofágica, foi realizado o

silenciamento do gene *C9ORF72* por meio de RNA de interferência em células da linhagem Neuro-2a. Após 24 horas da lipofecção com siRNA, as células foram submetidas a diferentes análises.

Inicialmente, as células foram lisadas, e essas amostras foram submetidas a ensaios de Western Blotting para verificação da expressão de diferentes proteínas envolvidas na via autofágica. Posteriormente, células da mesma linhagem tratadas previamente com siRNA C9-L foram transfectadas com o plasmídeo LC3eGFPmCherry para análise do fluxo autofágico.

4.7.1 Análise da expressão de proteínas autofágicas

Disfunções na dinâmica autofágica são eventos patentes em doenças neurodegenerativas. Na esclerose lateral amiotrófica associada à mutação de expansão repetida no gene *C9ORF72*, o acúmulo intracelular de proteínas de repetição dipeptídica provenientes da tradução não canônica de C9ORF72 mutante, os focos de RNA nuclear e principalmente os níveis reduzidos de C9ORF72 funcional estão relacionados a alterações na autofagia, e provocam graves consequências celulares.

Em células da linhagem Neuro-2a, ensaios de western blotting revelaram que o silenciamento da isoforma longa de C9ORF72 provoca uma redução na expressão de P62 e Rab1 (figura 27-C e D). Já a superexpressão de C9-L não exerceu efeito significativo sobre a expressão de nenhuma das proteínas analisadas na figura 27.

Embora existam controvérsias quanto as consequências de níveis reduzidos de C9ORF72 para a autofagia (SELLIER *et al.*, 2016; UGOLINO *et al.*, 2016; WEBSTER *et al.*, 2016), devido aos inúmeros estudos apontando o papel crítico desta proteína em diferentes etapas autofágicas, era esperado que seu silenciamento levasse a disfunções na autofagia, o que pode ser corroborado pela redução na expressão de Rab1 (figura 27-D), que por sua vez, contrasta com a semelhante diminuição nos níveis de P62 (figura 27-C), comumente utilizado como um indicativo de aumento da atividade autofágica. Mas, como discutido em tópicos anteriores, a redução dos níveis de P62 também pode ocorrer de modo independente da autofagia.

A redução de Rab1 é vista como um indicativo de disfunção na autofagia dado seu papel no transporte de membranas do RE para a formação dos autofagossomos na via autofágica (WANG *et al.*, 2015; ZOPPINO *et al.*, 2010).



Figura 27. A modulação dos níveis endógenos de C9ORF72 provoca alterações autofágicas. Células da linhagem Neuro-2a foram tratadas com siRNA C9 ou com plasmídeo eGFP-C9-L (A) A eficiência do silenciamento e superexpressão de C9ORF72 foi avaliada por Western blot 24 horas após a transfecção. (C) e (C) A expressão das proteínas P62 e Rab1 se mostrou reduzida em lisados celulares com C9-L silenciada, mas a superexpressão de C9-L resgatou os níveis endógenos das respectivas proteínas. (B) e (E). Os gráficos indicam que os níveis de expressão das proteínas BECN1 e Rab7 não sofreram alterações significativas entre os grupos estudados. A análise estatística foi realizada utilizando-se o Teste t, (**p \leq 0.01). Dados apresentados como média \pm SEM. N=3

Uma outra hipótese para explicar a menor expressão de P62 e Rab1, que também foi detectada em células Neuro-2a superexpressando SOD1 mutante (figura 22 - D e F), é de que a redução nos níveis endógenos de tais proteínas está associada a uma função nuclear de C9ORF72, ainda desconhecida, que afeta os transcritos das respectivas proteínas por meio de um mecanismo de regulação pós-transcricional, de maneira semelhante ao que foi sugerido por Ho e colaboradores para explicar a redução da proteína ULK1 em neurônios primários com nocaute de C9ORF72 (HO *et al.*, 2019).

A fim de melhor avaliar os efeitos do silenciamento de *C9ORF72* sobre a autofagia, foi realizado também um ensaio de monitoramento do fluxo autofágico, apresentado no tópico a seguir.

4.7.2 O fluxo autofágico diminui com o silenciamento de C9ORF72

Durante a autofagia, os autofagossomos se fundem aos lisossomos, vesículas ricas em enzimas ácidas, formando os autolisossomos. O marcador autofagossomal GFP-LC3, que exibe fluorescência verde, perde sinal após a formação dos autolisossomos, devido às substâncias ácidas e o pH no interior dos lisossomos. Já o marcador mCherry-LC3, se localiza tanto nos autofagossomos quanto nos lisossomos, e sua fluorescência vermelha é afetada mais tardiamente pelo conteúdo ácido lisossomal. Assim, é possível monitorar a dinâmica de formação dos autolisossomos e quantificar a ocorrência da última etapa da autofagia, permitindo uma análise global do fluxo autofágico (KIMURA, SHUNSUKE *et al.*, 2007).

Utilizando o método descrito acima, células da linhagem Neuro-2a foram transfectadas com o plasmídeo LC3GFPmCherry e o fluxo autofágico foi observado com auxílio de um microscópio confocal. O resultado é apresentado na figura 28.

Α	DIC GFP m		mCherry	Merge	
CTRL					
siRNA scr					
siRNA C9				20 pm	



Figura 28. Análise do fluxo autofágico com LC3GFPmCherry em cultura de células da linhagem Neuro-2a, tratadas com siRNA C9ORF72 (C9), siRNA scramble (scr) ou não tratadas (CTRL). (A) Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal, aumento de 63x com imersão, mostrando células que expressam o plasmídeo LC3GFPmCherry. Escala 20 µm. (B) Total de vesículas expressando GFP. (C) Quantificação das vesículas expressando mCherry. (D) Análise quantitativa do fluxo autofágico. Os valores foram obtidos com plugin *Find Maxima*, do softwere Image J, e são apresentados como porcentagem do controle, média \pm SEM. Teste estatístico One way ANOVA, com pós teste de Bonferroni, (**p<0.01), N=3.

O silenciamento de C9ORF72 não provocou alteração no número de vesículas menos-ácidas (GFP positivas), mas levou a uma diminuição na porcentagem de vesículas ácidas mCherry positivas ($52,14 \pm 7,19$) e ao aumento, embora não significativo ($159,5 \pm 25,18$), da razão entre vesículas GFP e mCherry, indicando disfunção autofágica com acúmulo de autofagossomos (Figura 28).

Em conjunto com a redução de P62 e Rab1 (figura 27-C e D), esses resultados demonstram que o silenciamento de C9ORF72 provoca disfunções autofágicas, semelhante ao que foi relatado por HO *et al.* (2019) em sua pesquisa, onde a perda de C9ORF72 reduziu a autofagia basal, com diminuição dos níveis de LC3II puncta e ULK1, em neurônios primários de camundongos. Em contraste com esses resultados, UGOLINO *et al.* (2016) aponta C9ORF72 como um regulador negativo da autofagia, cuja perda resulta em menor atividade de mTOR e aumento na sinalização do fator de transcrição TFEB.

4.8 Efeito do silenciamento de C9ORF72 sobre a homeostase do Retículo endoplasmático

Inúmeros fatores podem levar ao estresse do retículo endoplasmático (RE) e a ativação da resposta a proteínas mal enoveladas (UPR), que visa ao restabelecimento da proteostase. Entre esses fatores pode-se destacar disfunções em genes e proteínas que atuem nas vias de controle de qualidade do RE (OAKES & PAPA, 2015).

A proteína Rab1 desempenha um papel central na homeostase de RE. Essa pequena GTPase atua na regulação do transporte de vesículas entre o RE e o complexo de Golgi (ORTIZ SANDOVAL & SIMMEN, 2012). Resultados recentes obtidos em nosso laboratório demonstraram que na presença de oligômeros e agregados de proteínas, induzidos por tratamento com rotenona em células do hipocampo de ratos, há uma diminuição nos níveis de Rab1 e aumento na vacuolização do RE, enquanto a superexpressão de Rab1 impediu a ativação de CHOP, uma proteína pró-apoptótica da via UPR, e impediu a vacuolização do ER, indicando que Rab1 previne o estresse do RE (LIMA *et al.*, 2019).

Com base nessas evidências, e tendo conhecimento por meio da literatura que C9ORF72 interage diretamente com Rab1 e atua como RabGEF para essa GTPase, decidimos testar se o silenciamento de C9ORF72 induz ao estresse do RE com ativação da resposta UPR e se ocorre vacuolização dessa organela com a redução dos níveis de C9-L.

As células Neuro-2a, previamente transfectadas com siRNA C9 ou com plasmídeo C9-L, foram lisadas e submetidas a ensaios de Western Blotting para detecção de Rab1 (gráfico apresentado na figura 27) e outras proteínas associadas a via de resposta a proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático, UPR, resultado apresentado na figura 29. A expressão das proteínas Rab1 (figura 27) e ATF-6α clivada (figura 29-B) foi reduzida nos lisados celulares com silenciamento de C9-L. Nesse mesmo grupo, a expressão de ATF-6 não-clivada e CHOP não apresentaram alterações.

Por outro lado, no grupo com superexpressão de C9-L houve aumento na expressão de Rab1 (figura 27), ATF-6α clivada e CHOP, como mostrado nos gráficos B e C da figura 29.



Figura 29. Análise da expressão de proteínas da via UPR em células de linhagem Neuro-2a com silenciamento de C9-L. Os gráficos apresentam os níveis endógenos das proteínas (A) ATF-6 α completa, (B) ATF-6 α clivada e (C) CHOP. Os dados são apresentados como média ± SEM, após o teste T de Student e teste pós-teste de Bonferroni (*p < 0.05; **p < 0.01). N=3.

Células da linhagem Neuro-2a, previamente transfectadas com siRNA C9 ou com plasmídeo C9-L, também foram tratadas com meio de cultura contendo a Probe molecular ER Tracker Blue-White DPX, durante 30 minutos, para observação da morfologia do retículo endoplasmático. Após esse tempo as células foram fixadas com paraformaldeído e observadas em microscópio confocal. O silenciamento de C9-L elevou o índice de células apresentando vacuolização do retículo endoplasmático, processo denominado remodelamento do RE, mas a expressão de C9-L exógena recuperou em parte o fenótipo normal do RE (figura 30).





Figura 30. O silenciamento de C9ORF72-L aumenta o remodelamento do RE. (A) Imagens de microscopia confocal de células Neuro-2a com retículo endoplasmático (RE) marcado em azul pela Probe ER Tracker Blue-White DPX (em azul), a proteína C9ORF72 endógena destacada em vermelho e a proteína C9-L exógena em verde. Escala 20 μ m. (B) Quantificação de células que apresentam vacuolização do RE. Os dados são apresentados como média ± SEM obtidos com o teste estatístico One way ANOVA e pós teste de Bonferroni, (*p < 0.05; ***p < 0.001). N = 100 células/grupo.

LIMA *et al.* (2019) sugerem que a vacuolização do RE está associado a presença de oligômeros e agregados proteicos, mas, os dados apresentados na figura 30 indicam que apenas o silenciamento de C9ORF72 foi suficiente para promover um fenótipo de remodelamento do retículo semelhante ao apresentado pelo autor. Embora, não tenham sido detectadas alterações na expressão das proteínas de resposta UPR que indicassem a ocorrência de estresse do RE (ver figura 29), houve diminuição na expressão de Rab1, que desempenha um importante papel no tráfego entre o RE e Golgi. Déficits no tráfego entre essas organelas causa estresse do RE e pode levar a seu remodelamento (LIMA *et al.*, 2019; PRESTON *et al.*, 2009).

Uma evidência da relevância de Rab1 para o tráfego RE-Golgi é que a superexpressão de Ypt1p, um homólogo de Rab1 em levedura, reduziu a toxicidade induzida por αSyn e resgatou o tráfego de vesículas do RE para o Golgi. Além disso, a expressão de Rab1 resgatou a perda de neurônios dopaminérgicos em modelos animais de doença de Parkinson (COOPER *et al.*, 2006). A superexpressão de Rab1 também impediu a vacuolização do RE (LIMA *et al.*, 2019).

Quanto a diminuição ATF6 α clivada, pode-se especular que a ativação da resposta UPR via clivagem de ATF6 α foi impedida pela redução nos níveis de Rab1 decorrentes do silenciamento de C9-L. Isso porque a clivagem e ativação de ATF6 α como um fator de transcrição ocorre no complexo de Golgi, sendo assim, o transporte dessa proteína entre tais compartimentos é crítico para sua função na resposta celular a proteínas mal dobradas. Por sua vez, o tráfego RE-Golgi é regulado pela pequena GTPase Rab1 (PLUTNER *et al.*, 1991).

Em contrapartida, a superexpressão de C9-L levou a diminuição no remodelamento do RE, assim como provocou aumento na expressão de Rab1, ATF6α clivada e CHOP, resultado contrário ao observado com o silenciamento de C9-L, reforçando a hipótese de que C9ORF72 regula, através de algum mecanismo ainda desconhecido, a expressão de Rab1, e consequentemente atua também na regulação do transporte entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi e na homeostase do RE.

Assim como o estresse do retículo endoplasmático causado por mutações nos genes *TDP-43*, *SOD1* e *FUS* está associado a patogênese da esclerose lateral amiotrófica familiar (WALKER & ATKIN, 2011), a haploinsuficiência de *C90RF72* também pode

desempenhar um papel relevante na patogênese da ELA por perturbações na homeostase do RE e do transporte RE-Golgi.

Os resultados apresentados neste trabalho foram resumidos na tabela 4 para melhor visualização e compreensão.

Tabela 4. Resumo dos resultados	apresentados
---------------------------------	--------------

Sobre C9ORF72:					
Presente em neurônios e células da glia					
Distribuída no núcleo e no citoplasma das células					
Associada ao envelope nuclear e a membranas vesiculares					
Na presença do hSOD1 mutante há:					
Translocação nuclear de C90RF72					
Aumento da expressão das proteínas LC3II e Rab7					
Diminuição nos níveis das proteínas Beclina-1, P62 e Rab1					
O silenciamento de C9ORF72 leva a:					
Redução na expressão de Rab1 e P62					
Acúmulo de autofagossomos					
Aumento da vacuolização do RE					
Redução nos níveis de ATF6α clivada					
A superexpressão de C9ORF72 gera:					
Aumento na expressão de CHOP					
Aumento de ATF6α clivada					
Aumento de Rabl					

5. CONCLUSÕES

✓ A proteína C9ORF72 tem uma distribuição celular ampla, sendo encontrada de forma abundante em neurônios e células da glia, no interior do núcleo e no citoplasma de células primárias e de linhagem, na membrana nuclear, membrana vesicular e no interior de vesículas citoplasmáticas em células de neuroblastoma.

- ✓ Em modelo celular de Esclerose Lateral Amiotrófica, a presença de SOD1 mutante acarretou prejuízos para a autofagia com deficiência na maquinaria de iniciação e maturação de autofagossomos, representada pela redução na expressão de Beclina-1, Rab1 e P62 em linhagem e aumento na expressão de LC3 II e Rab7 células corticais primárias, além de ocasionar a translocação nuclear de C9ORF72, porém os níveis endógenos de C9-L não foram alterados.
- ✓ A translocação de C9-L para o núcleo na presença de SOD1 mutante não interfere em sua função citoplasmática como RabGEF, uma vez que não afetou a interação entre C9ORF72 e Rab1 ou Rab7, sugerindo que a translocação de C9 e a ativação dessas Rabs por C9ORF72 são eventos independentes.
- ✓ O silenciamento de C9-L leva a redução nos níveis das proteínas P62 e Rab1 e do fluxo autofágico com a diminuição na porcentagem de vesículas ácidas no interior das células Neuro-2a, sugerindo que os baixos níveis de C9-L provocam disfunções na autofagia. A menor expressão de P62 e Rab1 pode também estar associada a uma função nuclear de C9ORF72, ainda desconhecida, que afeta os transcritos das respectivas proteínas por meio de um mecanismo de regulação pós-transcricional.
- O nocaute de C9-L por siRNA promove o remodelamento do retículo endoplasmático e reduz os níveis intracelulares de ATF6α clivada, um indicativo de estresse do RE ocasionado por alterações do tráfego RE-Golgi dependente de Rab1.

6. REFERÊNCIAS

AMICK, J.; ROCZNIAK-FERGUSON, A.; FERGUSON, S. M. C9orf72 binds SMCR8, localizes to lysosomes, and regulates mTORC1 signaling. **Mol Biol Cell**, 27, n. 20, p. 3040-3051, Oct 15 2016.

ANDERSEN, P. M.; SIMS, K. B.; XIN, W. W.; KIELY, R. *et al.* Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. **Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord**, 4, n. 2, p. 62-73, Jun 2003.

ANTONY, C.; CIBERT, C.; GERAUD, G.; SANTA MARIA, A. *et al.* The small GTPbinding protein rab6p is distributed from medial Golgi to the trans-Golgi network as determined by a confocal microscopic approach. 103, n. 3, p. 785-796, 1992.

AO, X.; ZOU, L.; WU, Y. Regulation of autophagy by the Rab GTPase network. Cell **Death Differ**, 21, n. 3, p. 348-358, Mar 2014.

AOKI, Y.; MANZANO, R.; LEE, Y.; DAFINCA, R. *et al.* C9orf72 and RAB7L1 regulate vesicle trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. **Brain**, 140, n. 4, p. 887-897, Apr 1 2017.

ASH, P. E.; BIENIEK, K. F.; GENDRON, T. F.; CAULFIELD, T. *et al.* Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. **Neuron**, 77, n. 4, p. 639-646, Feb 20 2013.

ATKINSON, R. A.; FERNANDEZ-MARTOS, C. M.; ATKIN, J. D.; VICKERS, J. C. *et al.* C9ORF72 expression and cellular localization over mouse development. Acta Neuropathol Commun, 3, p. 59, Sep 25 2015.

BAHADORAN, P.; ABERDAM, E.; MANTOUX, F.; BUSCA, R. *et al.* Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes. **J Cell Biol**, 152, n. 4, p. 843-850, Feb 19 2001.

BAKER, D. J.; PETERSEN, R. C. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. **J Clin Invest**, 128, n. 4, p. 1208-1216, Apr 2 2018.

BALCH, W. E.; MORIMOTO, R. I.; DILLIN, A.; KELLY, J. W. Adapting proteostasis for disease intervention. **Science**, 319, n. 5865, p. 916-919, Feb 15 2008.

BANEZ-CORONEL, M.; AYHAN, F.; TARABOCHIA, A. D.; ZU, T. *et al.* RAN Translation in Huntington Disease. **Neuron**, 88, n. 4, p. 667-677, Nov 18 2015.

BARR, F.; LAMBRIGHT, D. G. Rab GEFs and GAPs. Curr Opin Cell Biol, 22, n. 4, p. 461-470, Aug 2010.

BELZIL, V. V.; BAUER, P. O.; PRUDENCIO, M.; GENDRON, T. F. *et al.* Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood. **Acta Neuropathol**, 126, n. 6, p. 895-905, Dec 2013.

BENSIMON, G.; LACOMBLEZ, L.; MEININGER, V. A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. 330, n. 9, p. 585-591, 1994.

BISHOP, N. A.; LU, T.; YANKNER, B. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**, 464, n. 7288, p. 529-535, Mar 25 2010.

BOOTH, L. A.; TAVALLAI, S.; HAMED, H. A.; CRUICKSHANKS, N. *et al.* The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. **Cell Signal**, 26, n. 3, p. 549-555, Mar 2014.

BOYA, P.; GONZÁLEZ-POLO, R. A.; CASARES, N.; PERFETTINI, J. L. *et al.* Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. **Mol Cell Biol**, 25, n. 3, p. 1025-1040, Feb 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976.

BRAVO, R.; PARRA, V.; GATICA, D.; RODRIGUEZ, A. E. *et al.* Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. **Int Rev Cell Mol Biol**, 301, p. 215-290, 2013.

BROOK, J. D.; MCCURRACH, M. E.; HARLEY, H. G.; BUCKLER, A. J. *et al.* Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. **Cell**, 68, n. 4, p. 799-808, Feb 21 1992.

CARNEMOLLA, A.; FOSSALE, E.; AGOSTONI, E.; MICHELAZZI, S. *et al.* Rrs1 is involved in endoplasmic reticulum stress response in Huntington disease. **J Biol Chem**, 284, n. 27, p. 18167-18173, Jul 3 2009.

CATALDO, A. M.; MATHEWS, P. M.; BOITEAU, A. B.; HASSINGER, L. C. *et al.* Down syndrome fibroblast model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects. **Am J Pathol**, 173, n. 2, p. 370-384, Aug 2008.

CHEN, S.; SAYANA, P.; ZHANG, X.; LE, W. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. **Mol Neurodegener**, 8, p. 28, Aug 13 2013.

CIURA, S.; LATTANTE, S.; LE BER, I.; LATOUCHE, M. *et al.* Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. **Ann** Neurol, 74, n. 2, p. 180-187, Aug 2013.

COOPER-KNOCK, J.; HIGGINBOTTOM, A.; STOPFORD, M. J.; HIGHLEY, J. R. *et al.* Antisense RNA foci in the motor neurons of C9ORF72-ALS patients are associated with TDP-43 proteinopathy. **Acta Neuropathol**, 130, n. 1, p. 63-75, Jul 2015.

COOPER, A. A.; GITLER, A. D.; CASHIKAR, A.; HAYNES, C. M. *et al.* α-Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models. 313, n. 5785, p. 324-328, 2006.

CREWS, L.; MASLIAH, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Hum Mol Genet**, 19, n. R1, p. R12-20, Apr 15 2010.

CRONIN, S.; HARDIMAN, O.; TRAYNOR, B. J. Ethnic variation in the incidence of ALS. A systematic review, 68, n. 13, p. 1002-1007, 2007.

DAVIDSON, Y. S.; ROBINSON, A. C.; ROLLINSON, S.; PICKERING-BROWN, S. *et al.* Immunohistochemical detection of C9orf72 protein in frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease: patterns of immunostaining and an evaluation of commercial antibodies. **Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener**, 19, n. 1-2, p. 102-111, Feb 2018.

DAVIS, B. M.; MCCURRACH, M. E.; TANEJA, K. L.; SINGER, R. H. *et al.* Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94, n. 14, p. 7388-7393, Jul 8 1997.

DAYALU, P.; ALBIN, R. L. Huntington disease: pathogenesis and treatment. Neurol Clin, 33, n. 1, p. 101-114, Feb 2015.

DE VOS, K. J.; CHAPMAN, A. L.; TENNANT, M. E.; MANSER, C. *et al.* Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. **Hum Mol Genet**, 16, n. 22, p. 2720-2728, Nov 15 2007.

DEINHARDT, K.; SALINAS, S.; VERASTEGUI, C.; WATSON, R. *et al.* Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. **Neuron**, 52, n. 2, p. 293-305, Oct 19 2006.

DEJESUS-HERNANDEZ, M.; MACKENZIE, I. R.; BOEVE, B. F.; BOXER, A. L. *et al.* Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. **Neuron**, 72, n. 2, p. 245-256, Oct 20 2011.

DJAVAHERI-MERGNY, M.; MAIURI, M. C.; KROEMER, G. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. **Oncogene**, 29, n. 12, p. 1717-1719, 2010/03/01 2010.

DOLGIN, E. Genetics: The hexanucleotide hex. Nature, 550, n. 7676, p. S106-s108, Oct 18 2017.

DOUGLAS, P. M.; DILLIN, A. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. **The Journal of Cell Biology**, 190, n. 5, p. 719-729, 2010.

DOYLE, K. M.; KENNEDY, D.; GORMAN, A. M.; GUPTA, S. *et al.* Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. **J Cell Mol Med**, 15, n. 10, p. 2025-2039, Oct 2011.

EL-KHOURY, R.; PANAYOTIS, N.; MATAGNE, V.; GHATA, A. *et al.* GABA and Glutamate Pathways Are Spatially and Developmentally Affected in the Brain of Mecp2-Deficient Mice. **PloS one**, 9, p. e92169, 03/25 2014.

FARG, M. A.; SUNDARAMOORTHY, V.; SULTANA, J. M.; YANG, S. *et al.* C90RF72, implicated in amytrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. **Hum Mol Genet**, 23, n. 13, p. 3579-3595, Jul 1 2014.

FORAN, E.; TROTTI, D. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **Antioxid Redox Signal**, 11, n. 7, p. 1587-1602, Jul 2009.

FORSBERG, K.; JONSSON, P. A.; ANDERSEN, P. M.; BERGEMALM, D. *et al.* Novel Antibodies Reveal Inclusions Containing Non-Native SOD1 in Sporadic ALS Patients. **PLOS ONE**, 5, n. 7, p. e11552, 2010.

FRATTA, P.; MIZIELINSKA, S.; NICOLL, A. J.; ZLOH, M. *et al.* C9orf72 hexanucleotide repeat associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia forms RNA G-quadruplexes. **Sci Rep**, 2, p. 1016, 2012.

FREIBAUM, B. D.; LU, Y.; LOPEZ-GONZALEZ, R.; KIM, N. C. *et al.* GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. **Nature**, 525, n. 7567, p. 129-133, Sep 3 2015.

FRICK, P.; SELLIER, C.; MACKENZIE, I. R. A.; CHENG, C. Y. *et al.* Novel antibodies reveal presynaptic localization of C9orf72 protein and reduced protein levels in C9orf72 mutation carriers. **Acta Neuropathol Commun**, 6, n. 1, p. 72, Aug 3 2018.

FRIEDMAN, L. G.; LACHENMAYER, M. L.; WANG, J.; HE, L. *et al.* Disrupted autophagy leads to dopaminergic axon and dendrite degeneration and promotes presynaptic accumulation of alpha-synuclein and LRRK2 in the brain. **J Neurosci**, 32, n. 22, p. 7585-7593, May 30 2012.

GENDRON, T. F.; BIENIEK, K. F.; ZHANG, Y. J.; JANSEN-WEST, K. *et al.* Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. **Acta Neuropathol**, 126, n. 6, p. 829-844, Dec 2013.

GEUENS, T.; BOUHY, D.; TIMMERMAN, V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. **Hum Genet**, 135, n. 8, p. 851-867, Aug 2016.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J Pathol**, 221, n. 1, p. 3-12, May 2010.

GURNEY, M.; PU, H.; CHIU, A.; DAL CANTO, M. *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. 264, n. 5166, p. 1772-1775, 1994.

HAEUSLER, A. R.; DONNELLY, C. J.; PERIZ, G.; SIMKO, E. A. *et al.* C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. **Nature**, 507, n. 7491, p. 195-200, Mar 13 2014.

HALES, C. M.; VAERMAN, J. P.; GOLDENRING, J. R. Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. **J Biol Chem**, 277, n. 52, p. 50415-50421, Dec 27 2002.

HAYASHI, Y.; HOMMA, K.; ICHIJO, H. SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS. Adv Biol Regul, 60, p. 95-104, Jan 2016.

HAZE, K.; YOSHIDA, H.; YANAGI, H.; YURA, T. *et al.* Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. **Mol Biol Cell**, 10, n. 11, p. 3787-3799, Nov 1999.

HO, W. Y.; TAI, Y. K.; CHANG, J.-C.; LIANG, J. *et al.* The ALS-FTD-linked gene product, C9orf72, regulates neuronal morphogenesis via autophagy. **Autophagy**, 15, n. 5, p. 827-842, 2019/05/04 2019.

HOOZEMANS, J. J.; VAN HAASTERT, E. S.; NIJHOLT, D. A.; ROZEMULLER, A. J. *et al.* Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. **Neurodegener Dis**, 10, n. 1-4, p. 212-215, 2012.

HOSOKAWA, N.; HARA, T.; KAIZUKA, T.; KISHI, C. *et al.* Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. **Mol Biol Cell**, 20, n. 7, p. 1981-1991, Apr 2009.

ICHIMURA, Y.; KOMATSU, M. J. S. i. I. Selective degradation of p62 by autophagy. 32, n. 4, p. 431-436, December 01 2010. journal article.

JUNG, C. H.; JUN, C. B.; RO, S. H.; KIM, Y. M. *et al.* ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. **Mol Biol Cell**, 20, n. 7, p. 1992-2003, Apr 2009.

KABEYA, Y.; MIZUSHIMA, N.; UENO, T.; YAMAMOTO, A. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **Embo j**, 19, n. 21, p. 5720-5728, Nov 1 2000.

KANG, R.; ZEH, H. J.; LOTZE, M. T.; TANG, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. Cell Death Differ, 18, n. 4, p. 571-580, Apr 2011.

KAUFMAN, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes Dev**, 13, n. 10, p. 1211-1233, May 15 1999.

KELPSCH, D. J.; TOOTLE, T. L. Nuclear Actin: From Discovery to Function. Anat Rec (Hoboken), 301, n. 12, p. 1999-2013, Dec 2018.

KHOSRAVI, B.; HARTMANN, H.; MAY, S.; MOHL, C. *et al.* Cytoplasmic poly-GA aggregates impair nuclear import of TDP-43 in C9orf72 ALS/FTLD. **Hum Mol Genet**, 26, n. 4, p. 790-800, Feb 15 2017.

KIM, J.; KUNDU, M.; VIOLLET, B.; GUAN, K. L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nat Cell Biol**, 13, n. 2, p. 132-141, Feb 2011.

KIM, J. H.; HONG, S. K.; WU, P. K.; RICHARDS, A. L. *et al.* Raf/MEK/ERK can regulate cellular levels of LC3B and SQSTM1/p62 at expression levels. **Exp Cell Res**, 327, n. 2, p. 340-352, Oct 1 2014.

KIMURA, S.; NODA, T.; YOSHIMORI, T. Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3. **Autophagy**, 3, n. 5, p. 452-460, 2007/09/20 2007.

KIMURA, S.; NODA, T.; YOSHIMORI, T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. **Cell Struct Funct**, 33, n. 1, p. 109-122, 2008.

KIVELL, B. M.; MCDONALD, F. J.; MILLER, J. H. Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. **Brain Res Brain Res Protoc**, 6, n. 3, p. 91-99, Feb 2001.

KOGA, H.; KAUSHIK, S.; CUERVO, A. M. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. **Ageing Res Rev**, 10, n. 2, p. 205-215, Apr 2011.

KOMATSU, M.; WAGURI, S.; CHIBA, T.; MURATA, S. *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. **Nature**, 441, n. 7095, p. 880-884, Jun 15 2006.

KOPPERS, M.; BLOKHUIS, A. M.; WESTENENG, H. J.; TERPSTRA, M. L. *et al.* C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. **Ann** Neurol, 78, n. 3, p. 426-438, Sep 2015.

KWON, I.; XIANG, S.; KATO, M.; WU, L. *et al.* Poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeats bind nucleoli, impede RNA biogenesis, and kill cells. **Science**, 345, n. 6201, p. 1139-1145, Sep 5 2014.

LEE, J.; KIM, H. R.; QUINLEY, C.; KIM, J. *et al.* Autophagy suppresses interleukin-1 β (IL-1 β) signaling by activation of p62 degradation via lysosomal and proteasomal pathways. **J Biol Chem**, 287, n. 6, p. 4033-4040, Feb 3 2012.

LEE, Y. B.; CHEN, H. J.; PERES, J. N.; GOMEZ-DEZA, J. *et al.* Hexanucleotide repeats in ALS/FTD form length-dependent RNA foci, sequester RNA binding proteins, and are neurotoxic. **Cell Rep**, 5, n. 5, p. 1178-1186, Dec 12 2013.

LESKELÄ, S.; HUBER, N.; ROSTALSKI, H.; NATUNEN, T. *et al.* C9orf72 Proteins Regulate Autophagy and Undergo Autophagosomal or Proteasomal Degradation in a Cell Type-Dependent Manner. **Cells**, 8, n. 10, Oct 10 2019.

LEVINE, T. P.; DANIELS, R. D.; GATTA, A. T.; WONG, L. H. *et al.* The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. **Bioinformatics**, 29, n. 4, p. 499-503, Feb 15 2013.

LEVIVIER, E.; GOUD, B.; SOUCHET, M.; CALMELS, T. P. *et al.* uDENN, DENN, and dDENN: indissociable domains in Rab and MAP kinases signaling pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, 287, n. 3, p. 688-695, Sep 28 2001.

LI, G.; MARLIN, M. C. Rab family of GTPases. Methods Mol Biol, 1298, p. 1-15, 2015.

LIANG, X. H.; JACKSON, S.; SEAMAN, M.; BROWN, K. *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. **Nature**, 402, n. 6762, p. 672-676, Dec 9 1999.

LIMA, N. C. R.; MELO, T. Q.; SAKUGAWA, A. Y. S.; MELO, K. P. *et al.* Restoration of Rab1 Levels Prevents Endoplasmic Reticulum Stress in Hippocampal Cells during Protein Aggregation Triggered by Rotenone. **Neuroscience**, 419, p. 5-13, Nov 1 2019.

LIU, E. Y.; RUSS, J.; WU, K.; NEAL, D. *et al.* C9orf72 hypermethylation protects against repeat expansion-associated pathology in ALS/FTD. Acta Neuropathol, 128, n. 4, p. 525-541, Oct 2014.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M. *et al.* The hallmarks of aging. **Cell**, 153, n. 6, p. 1194-1217, Jun 6 2013.

MAJOUNIE, E.; RENTON, A. E.; MOK, K.; DOPPER, E. G. *et al.* Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. **Lancet Neurol**, 11, n. 4, p. 323-330, Apr 2012.

MARAT, A. L.; DOKAINISH, H.; MCPHERSON, P. S. DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases. **J Biol Chem**, 286, n. 16, p. 13791-13800, Apr 22 2011.

MATSUMOTO, G.; STOJANOVIC, A.; HOLMBERG, C. I.; KIM, S. *et al.* Structural properties and neuronal toxicity of amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu/Zn superoxide dismutase 1 aggregates. **J Cell Biol**, 171, n. 1, p. 75-85, Oct 10 2005.

MCMILLAN, C. T.; RUSS, J.; WOOD, E. M.; IRWIN, D. J. *et al.* C9orf72 promoter hypermethylation is neuroprotective: Neuroimaging and neuropathologic evidence. **Neurology**, 84, n. 16, p. 1622-1630, Apr 21 2015.

MIGNOGNA, M. L.; GIANNANDREA, M.; GURGONE, A.; FANELLI, F. *et al.* The intellectual disability protein RAB39B selectively regulates GluA2 trafficking to determine synaptic AMPAR composition. **Nat Commun**, 6, p. 6504, Mar 18 2015.

MIRACCO, C.; COSCI, E.; OLIVERI, G.; LUZI, P. *et al.* Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. **Int J Oncol**, 30, n. 2, p. 429-436, Feb 2007.

MIZIELINSKA, S.; LASHLEY, T.; NORONA, F. E.; CLAYTON, E. L. *et al.* C9orf72 frontotemporal lobar degeneration is characterised by frequent neuronal sense and antisense RNA foci. **Acta Neuropathol**, 126, n. 6, p. 845-857, Dec 2013.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; LEVINE, B. Methods in mammalian autophagy research. Cell, 140, n. 3, p. 313-326, Feb 5 2010.

MORI, K.; LAMMICH, S.; MACKENZIE, I. R.; FORNE, I. *et al.* hnRNP A3 binds to GGGGCC repeats and is a constituent of p62-positive/TDP43-negative inclusions in the hippocampus of patients with C9orf72 mutations. **Acta Neuropathol**, 125, n. 3, p. 413-423, Mar 2013.

MORI, K.; WENG, S. M.; ARZBERGER, T.; MAY, S. *et al.* The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTLD/ALS. **Science**, 339, n. 6125, p. 1335-1338, Mar 15 2013.

MORITA, M.; AL-CHALABI, A.; ANDERSEN, P. M.; HOSLER, B. *et al.* A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia. **Neurology**, 66, n. 6, p. 839-844, Mar 28 2006.

MOSCAT, J.; DIAZ-MECO, M. T. p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. Cell, 137, n. 6, p. 1001-1004, 2009/06/12/ 2009.

MOSCAT, J.; KARIN, M.; DIAZ-MECO, M. T. p62 in Cancer: Signaling Adaptor Beyond Autophagy. Cell, 167, n. 3, p. 606-609, 2016/10/20/2016.

NAKAGAWA, T.; ZHU, H.; MORISHIMA, N.; LI, E. *et al.* Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. **Nature**, 403, n. 6765, p. 98-103, Jan 6 2000.

NASSIF, M.; WOEHLBIER, U.; MANQUE, P. A. The Enigmatic Role of C9ORF72 in Autophagy. **Front Neurosci**, 11, p. 442, 2017.

NORMAN, J. M.; COHEN, G. M.; BAMPTON, E. T. The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. **Autophagy**, 6, n. 8, p. 1042-1056, Nov 2010.

O'ROURKE, J. G.; BOGDANIK, L.; YÁÑEZ, A.; LALL, D. *et al.* C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. **Science**, 351, n. 6279, p. 1324-1329, Mar 18 2016.

OAKES, S. A.; PAPA, F. R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. **Annu Rev Pathol**, 10, p. 173-194, 2015.

OH, Y. K.; SHIN, K. S.; YUAN, J.; KANG, S. J. Superoxide dismutase 1 mutants related to amyotrophic lateral sclerosis induce endoplasmic stress in neuro2a cells. **J Neurochem**, 104, n. 4, p. 993-1005, Feb 2008.

OLCHOWIK, M.; MIACZYNSKA, M. [Effectors of GTPase Rab5 in endocytosis and signal transduction]. **Postepy Biochem**, 55, n. 2, p. 171-180, 2009.

ORTIZ SANDOVAL, C.; SIMMEN, T. Rab proteins of the endoplasmic reticulum: functions and interactors. **Biochem Soc Trans**, 40, n. 6, p. 1426-1432, Dec 1 2012.

OYADOMARI, S.; MORI, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ, 11, n. 4, p. 381-389, Apr 2004.

PANKIV, S.; CLAUSEN, T. H.; LAMARK, T.; BRECH, A. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. **J Biol Chem**, 282, n. 33, p. 24131-24145, Aug 17 2007.

PASCHEN, W.; MENGESDORF, T. Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. Cell Calcium, 38, n. 3-4, p. 409-415, Sep-Oct 2005.

PASINELLI, P.; BROWN, R. H. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. **Nature Reviews Neuroscience**, 7, n. 9, p. 710-723, 2006/09/01 2006.

PETERS, O. M.; GHASEMI, M.; BROWN, R. H., Jr. Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS. J Clin Invest, 125, n. 5, p. 1767-1779, May 2015.

PLUTNER, H.; COX, A. D.; PIND, S.; KHOSRAVI-FAR, R. *et al.* Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. **J Cell Biol**, 115, n. 1, p. 31-43, Oct 1991.

POWERS, E. T.; MORIMOTO, R. I.; DILLIN, A.; KELLY, J. W. *et al.* Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. **Annu Rev Biochem**, 78, p. 959-991, 2009.

PRESTON, A. M.; GURISIK, E.; BARTLEY, C.; LAYBUTT, D. R. *et al.* Reduced endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload. **Diabetologia**, 52, n. 11, p. 2369-2373, Nov 2009.

RAMI, A. Review: autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiarist? **Neuropathol Appl Neurobiol**, 35, n. 5, p. 449-461, Oct 2009.

RAVANAN, P.; SRIKUMAR, I. F.; TALWAR, P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. Life Sci, 188, p. 53-67, Nov 1 2017.

RENTON, A. E.; MAJOUNIE, E.; WAITE, A.; SIMON-SANCHEZ, J. *et al.* A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. **Neuron**, 72, n. 2, p. 257-268, Oct 20 2011.

ROSEN, D. R.; SIDDIQUE, T.; PATTERSON, D.; FIGLEWICZ, D. A. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature**, 362, n. 6415, p. 59-62, Mar 4 1993.

ROSS, C. A.; POIRIER, M. A. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? **Nat Rev Mol Cell Biol**, 6, n. 11, p. 891-898, Nov 2005.

ROWLAND, L. P.; SHNEIDER, N. A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. 344, n. 22, p. 1688-1700, 2001.

RUBINO, M.; MIACZYNSKA, M.; LIPPE, R.; ZERIAL, M. Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. **J Biol Chem**, 275, n. 6, p. 3745-3748, Feb 11 2000.

RUBINSZTEIN, D. C.; BENTO, C. F.; DERETIC, V. Therapeutic targeting of autophagy in neurodegenerative and infectious diseases. **J Exp Med**, 212, n. 7, p. 979-990, Jun 29 2015.

RUBINSZTEIN, D. C.; MARINO, G.; KROEMER, G. Autophagy and aging. Cell, 146, n. 5, p. 682-695, Sep 2 2011.

SASSEVILLE, A. M.; LANGELIER, Y. In vitro interaction of the carboxy-terminal domain of lamin A with actin. **FEBS Lett**, 425, n. 3, p. 485-489, Apr 3 1998.

SCHEPER, W.; HOOZEMANS, J. J.; HOOGENRAAD, C. C.; ROZEMULLER, A. J. *et al.* Rab6 is increased in Alzheimer's disease brain and correlates with endoplasmic reticulum stress. **Neuropathol Appl Neurobiol**, 33, n. 5, p. 523-532, Oct 2007.

SELLIER, C.; CAMPANARI, M. L.; JULIE CORBIER, C.; GAUCHEROT, A. *et al.* Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death. **Embo j**, 35, n. 12, p. 1276-1297, Jun 15 2016.

SELVARAJ, B. T.; LIVESEY, M. R.; ZHAO, C.; GREGORY, J. M. *et al.* C9ORF72 repeat expansion causes vulnerability of motor neurons to Ca(2+)-permeable AMPA receptor-mediated excitotoxicity. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 347, Jan 24 2018.

SHI, Y.; LIN, S.; STAATS, K. A.; LI, Y. *et al.* Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. **Nat Med**, 24, n. 3, p. 313-325, Mar 2018.

SHIN, H. W.; HAYASHI, M.; CHRISTOFORIDIS, S.; LACAS-GERVAIS, S. *et al.* An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. **J Cell Biol**, 170, n. 4, p. 607-618, Aug 15 2005.

SIMON, D. N.; ZASTROW, M. S.; WILSON, K. L. Direct actin binding to A- and B-type lamin tails and actin filament bundling by the lamin A tail. **Nucleus**, 1, n. 3, p. 264-272, May-Jun 2010.

SIMONSEN, A.; TOOZE, S. A. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. **J Cell Biol**, 186, n. 6, p. 773-782, Sep 21 2009.

SIVADASAN, R.; HORNBURG, D.; DREPPER, C.; FRANK, N. *et al.* C9ORF72 interaction with cofilin modulates actin dynamics in motor neurons. **Nature Neuroscience**, 19, n. 12, p. 1610-1618, 2016/12/01 2016.

SONG, P.; LI, S.; WU, H.; GAO, R. *et al.* Parkin promotes proteasomal degradation of p62: implication of selective vulnerability of neuronal cells in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Protein Cell**, 7, n. 2, p. 114-129, Feb 2016.

STEINERT, J. R.; CAMPESAN, S.; RICHARDS, P.; KYRIACOU, C. P. *et al.* Rab11 rescues synaptic dysfunction and behavioural deficits in a Drosophila model of Huntington's disease. **Hum Mol Genet**, 21, n. 13, p. 2912-2922, Jul 1 2012.

STENMARK, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 10, n. 8, p. 513-525, Aug 2009.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Curr Protoc Immunol**, Appendix 3, p. Appendix 3B, May 2001.

SULLIVAN, P. M.; ZHOU, X.; ROBINS, A. M.; PAUSHTER, D. H. *et al.* The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway. **Acta Neuropathol Commun**, 4, n. 1, p. 51, May 18 2016.

TANG, B. L. C9orf72's Interaction with Rab GTPases-Modulation of Membrane Traffic and Autophagy. **Front Cell Neurosci**, 10, p. 228, 2016.

TANIDA, I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. **Antioxid Redox Signal**, 14, n. 11, p. 2201-2214, Jun 2011.

THERRIEN, M.; ROULEAU, G. A.; DION, P. A.; PARKER, J. A. Deletion of C9ORF72 results in motor neuron degeneration and stress sensitivity in C. elegans. **PLoS One**, 8, n. 12, p. e83450, 2013.

TOMARU, U.; TAKAHASHI, S.; ISHIZU, A.; MIYATAKE, Y. *et al.* Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. **Am J Pathol**, 180, n. 3, p. 963-972, Mar 2012.

TURNER, M. R.; BOWSER, R.; BRUIJN, L.; DUPUIS, L. *et al.* Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. **Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener**, 14 Suppl 1, n. 0 1, p. 19-32, May 2013.

UGOLINO, J.; JI, Y. J.; CONCHINA, K.; CHU, J. *et al.* Loss of C9orf72 Enhances Autophagic Activity via Deregulated mTOR and TFEB Signaling. **PLoS Genet**, 12, n. 11, p. e1006443, Nov 2016.

VALDMANIS, P. N.; ROULEAU, G. A. Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. 70, n. 2, p. 144-152, 2008.

VAN BLITTERSWIJK, M.; VAN ES, M. A.; HENNEKAM, E. A.; DOOIJES, D. *et al.* Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. **Hum Mol Genet**, 21, n. 17, p. 3776-3784, Sep 1 2012.

VAN ES, M. A.; VELDINK, J. H.; SARIS, C. G. J.; BLAUW, H. M. *et al.* Genome-wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Genetics**, 41, p. 1083, 09/06/online 2009.

VANCE, C.; AL-CHALABI, A.; RUDDY, D.; SMITH, B. N. *et al.* Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. **Brain**, 129, n. Pt 4, p. 868-876, Apr 2006.

VERHOEVEN, K.; DE JONGHE, P.; COEN, K.; VERPOORTEN, N. *et al.* Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. **Am J Hum Genet**, 72, n. 3, p. 722-727, Mar 2003.

VIODÉ, A.; FOURNIER, C.; CAMUZAT, A.; FENAILLE, F. *et al.* New Antibody-Free Mass Spectrometry-Based Quantification Reveals That C9ORF72 Long Protein Isoform Is Reduced in the Frontal Cortex of Hexanucleotide-Repeat Expansion Carriers. 12, n. 589, 2018-August-28 2018. Methods.

WALKER, A. K.; ATKIN, J. D. Stress signaling from the endoplasmic reticulum: A central player in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. **IUBMB Life**, 63, n. 9, p. 754-763, Sep 2011.

WALTER, P.; RON, D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. 334, n. 6059, p. 1081-1086, 2011.

WANG, J.; DAVIS, S.; MENON, S.; ZHANG, J. *et al.* Ypt1/Rab1 regulates Hrr25/CK18 kinase activity in ER–Golgi traffic and macroautophagy. **Journal of Cell Biology**, 210, n. 2, p. 273-285, 2015.

WATANABE, M.; DYKES-HOBERG, M.; CULOTTA, V. C.; PRICE, D. L. *et al.* Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. **Neurobiol Dis**, 8, n. 6, p. 933-941, Dec 2001.

WEBSTER, C. P.; SMITH, E. F.; BAUER, C. S.; MOLLER, A. *et al.* The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy. **Embo j**, 35, n. 15, p. 1656-1676, Aug 1 2016.

WEBSTER, C. P.; SMITH, E. F.; GRIERSON, A. J.; DE VOS, K. J. C9orf72 plays a central role in Rab GTPase-dependent regulation of autophagy. **Small GTPases**, 9, n. 5, p. 399-408, Sep 3 2018.

WOERNER, A. C.; FROTTIN, F.; HORNBURG, D.; FENG, L. R. *et al.* Cytoplasmic protein aggregates interfere with nucleocytoplasmic transport of protein and RNA. **Science**, 351, n. 6269, p. 173-176, Jan 8 2016.

WU, X.; BRADLEY, M. J.; CAI, Y.; KÜMMEL, D. *et al.* Insights regarding guanine nucleotide exchange from the structure of a DENN-domain protein complexed with its Rab GTPase substrate. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 46, p. 18672-18677, Nov 15 2011.

WU, X.; RAO, K.; BOWERS, M. B.; COPELAND, N. G. *et al.* Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. **J Cell Sci**, 114, n. Pt 6, p. 1091-1100, Mar 2001.

XEREZ, D. R. Rehabilitation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: literature review. Acta Fisiátr, 182-188, 15 (3), 2008.

XI, Z.; ZINMAN, L.; MORENO, D.; SCHYMICK, J. *et al.* Hypermethylation of the CpG island near the G4C2 repeat in ALS with a C9orf72 expansion. **Am J Hum Genet**, 92, n. 6, p. 981-989, Jun 6 2013.

XIAO, S.; MACNAIR, L.; MCGOLDRICK, P.; MCKEEVER, P. M. *et al.* Isoformspecific antibodies reveal distinct subcellular localizations of C9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol**, 78, n. 4, p. 568-583, Oct 2015.

XIAO, S.; MCKEEVER, P. M.; LAU, A.; ROBERTSON, J. Synaptic localization of C9orf72 regulates post-synaptic glutamate receptor 1 levels. Acta Neuropathol Commun, 7, n. 1, p. 161, Oct 24 2019.

XIE, Y.; ZHOU, B.; LIN, M. Y.; SHENG, Z. H. Progressive endolysosomal deficits impair autophagic clearance beginning at early asymptomatic stages in fALS mice. **Autophagy**, 11, n. 10, p. 1934-1936, 2015.

YOSHIMURA, S.; GERONDOPOULOS, A.; LINFORD, A.; RIGDEN, D. J. *et al.* Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors. **J** Cell Biol, 191, n. 2, p. 367-381, Oct 18 2010.

ZAREI, S.; CARR, K.; REILEY, L.; DIAZ, K. *et al.* A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. **Surg Neurol Int**, 6, p. 171, 2015.

ZHANG, D.; IYER, L. M.; HE, F.; ARAVIND, L. Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. **Front Genet**, 3, p. 283, 2012.

ZHANG, F.; STRÖM, A. L.; FUKADA, K.; LEE, S. *et al.* Interaction between familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked SOD1 mutants and the dynein complex. **J Biol Chem**, 282, n. 22, p. 16691-16699, Jun 1 2007.

ZHANG, K.; DONNELLY, C. J.; HAEUSLER, A. R.; GRIMA, J. C. *et al.* The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. **Nature**, 525, n. 7567, p. 56-61, Sep 3 2015.

ZHEN, Y.; STENMARK, H. Cellular functions of Rab GTPases at a glance. J Cell Sci, 128, n. 17, p. 3171-3176, Sep 1 2015.

ZOPPINO, F. C. M.; MILITELLO, R. D.; SLAVIN, I.; ÁLVAREZ, C. *et al.* Autophagosome Formation Depends on the Small GTPase Rab1 and Functional ER Exit Sites. **Traffic**, 11, n. 9, p. 1246-1261, 2010/09/01 2010.

ZU, T.; GIBBENS, B.; DOTY, N. S.; GOMES-PEREIRA, M. *et al.* Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 1, p. 260-265, Jan 4 2011.

ZU, T.; LIU, Y.; BANEZ-CORONEL, M.; REID, T. *et al.* RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. **Proc Natl** Acad Sci U S A, 110, n. 51, p. E4968-4977, Dec 17 2013.

ANEXO I





CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da autofagia como mecanismo para o desencadeamento de doenças neurodegenerativas", registrada com o nº 271/2016 (Proc. 16.1.607.41.7), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari e com a participação dos colaboradores Raquel de Souza Lima (IB/USP), Karla Pacheco Melo (IB/USP), Thais Alexandre Falkembach Andreis (IB/USP), Rafaela Regina Cardoso (IB/USP), Nathan Cogliatti Ribeiro de Lima (IB/USP), Barbara Santos de Oliveira (IB/USP), Natália Fagundes Borges Teruel (IB/USP), (*)Jaína Araújo Reis (IB/USP) e (*)Amanda Palermo Nunes (IB/USP), que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em reunião de 13 de dezembro de 2016.

Vigência da autorização: 13/12/2016 a 12/12/2019

Finalidade: Pesquisa Científica

Espécies/linhagens: 1) camundongos transgênicos (*Mus musculus*)/B6SJL1-tg (SOD1*G93A)1Gur/J – SOD1, B6SJL1-tg (SOD1)2Gur/J – SOD1, B6 EiC3Sn-Rb(12.Ts1716Dn)2Cje/CjeDnJ-Down; 2) camundongos heterogênicos/controle do SOD1 e controle do Down; 3) ratos isogênicos (*Rattus norvegicus*)/Lewis.

Nº de animais: 1.295

Peso/Idade: 2 meses e 1-2 dias/5g, 10, 20g e 200g

Sexo: (M+F)

Origem: Biotério do Laboratório de Biologia Celular da Neurodegeneração do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.





Adendo:

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em reunião de 06/10/2017 aprovou a inclusão de duas alunas, como (*)colaboradoras do projeto.

OBS.: Qualquer alteração e/ou intercorrência deverá ser comunicada a CEUA-IB.

Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais



ANEXO II

	Marca	Código	Diluição		
Anticorpos Primários					
Choactase	Santa Cruz	Sc-20672	1:100		
SMI-32	Covance	SMI-32R	1:1000		
MAP-2	Sigma	M4403	1:1000		
C9ORF72	Santa Cruz	sc-138763	1:100		
Rab7	Santa Cruz	sc-376362	1:100		
Rab1	Santa Cruz	sc-311	1:100		
Anticorpos Secundários					
Texas Red	Jackson Immuno Research	90519	1:250		
Alexa 488	Thermo Fisher	A-11029	1:200		
Alexa 594	Thermo Fisher	A-11037	1:200		
FITC	Jackson Immuno Research	97619	1:120		
Pacific Blue	Invitrogen	P31582	1:120		

Lista dos anticorpos utilizados em imunofluorescência

ANEXO III

Lista dos anticorpos utilizados em Western Blotting

Observação: O leite utilizado em todas as incubações é da BIO-RAD; TA = Temperatura ambiente; [C] 30 µg de proteína por poço

Anticorpo	Marca/código	Bloqueio	AC Primário	Lavagem	AC Secundário	Lavagem
Rab7 24 kDa	Santa Cruz Sc-376362	5% leite em PBS-T 0,05%; 1h T. A.	1% Leite em PBS-T 0,05%, 1:200; 4h TA + overnigth 4°C	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05%	1% Leite em PBS-T 0,05%, anti-mouse 1:2000; 1h T.A.	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05% + 1 x com TBS
Rab7 24 kDa	Invitrogen PA578238	5% leite em TBS-T 0,05%; 1h TA.	1% BSA em TBS-T 0,05%, 1:500 overnight 4°C	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05%	1% BSA em TBS-T 0,05%, anti-rabbit 1:10.000; 1h TA	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05% + 1 x com TBS
P62 62 kDa	Cell Sinaling #5114	5% leite em TBS-T 0,1%; 1h TA.	1% BSA em TBS-T 0,1%, 1:1000 overnight 4°C	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05%	1% BSA em TBS-T 0,1%, anti-rabbit 1:10.000; 1h TA	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05% + 1 x com TBS
Beclina-1 60 kDa	Santa Cruz Sc-11427	5% leite em TBS-T 0,05%; 1h TA.	3% Leite em TBS-T 0,05%, 1:500; 1h30 TA ou overnight 4°C ou	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05%	3% leite em TBS-T 0,05%, anti-rabbit 1:10.000; 1h TA.	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05% + 1 x com TBS
C9ORF72 55 kDa	Proteintech 66140-1-Ig	5% leite em TBS-T 0,1% 1h TA.	TBS-T 0,1% 1:500 overnight 4°C	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,2%	3% Leite em TBS-T 0,1%, anti-mouse 1:; 1h T.A.	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,2% + 1 x com TBS
C9ORF72 55 kDa	Santa Cruz Sc-138763	3% BSA em TBS- T 0,05%; overnight 4°C	1% BSA em TBS-T 0,05%, 1:500 2h TA	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05%	1% BSA em TBS-T 0,05%, anti-rabbit 1:10.000; 1h TA.	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05% + 1 x com TBS

B-actina 43kDa	Santa Cruz Sc-47778	5% leite em TBS-T 0,05%; 1h TA.	TBS-T 0,05% 1:1000; 1h TA ou overnight 4°C	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05%	TBS-T 0,05%, anti- mouse 1:6000; 1h TA.	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05% + 1 x com TBS
LC3 I e II 16 e 14 kDa	Sigma L7543	5% leite em TBS-T 0,1%; 1h TA.	5 % BSA em TBS-T 0,1%, 1:1000 overnight 4°C	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05%	3% leite em TBS-T 0,1%, anti-rabbit 1:10.000; 1h. TA.	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05% + 1 x com TBS
SOD-M 24 kDa	Medimabs MM-0070-2-P	5% leite em TBS-T 0,05%; 1h TA.	3% Leite em TBS-T 0,05%, 1:500 Overnight 4°C	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05%	3% Leite em TBS-T 0,05%, anti-mouse 1:6000; 1h TA.	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05% + 1 x com TBS
α-Tubulina 50 kDa	Sigma T6199	5% leite em PBS-T 0,2%; 1h TA.	1% BSA em PBS-T 0,2%, 1:1000 overnight 4°C	3 x de 5 minutos com PBS-T 0,02%	3% Leite em PBS-T 0,2%, anti-mouse 1:6000; 1h TA.	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05% + 1 x com TBS
Lamin-B 67 kDa	Santa Cruz sc-6217	5% leite em PBS-T 0,2%; 1h T. A.	1% BSA em TBS-T 0,05%, 1:500 overnight 4°C	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05%	3% Leite em TBS-T 0,05%, anti-goat 1:6000; 1h TA.	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05% + 1 x com TBS
ATF6 90 e 50 kDa	Santa Cruz Sc-166659	5% leite em TBS-T 0,05%; 1h T. A.	3% Leite em TBS-T 0,05%, 1:1000 Overnight 4°C	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05%	3% Leite em TBS-T 0,05%, anti-mouse 1:6000 1h30 TA.	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05% + 1 x com TBS
CHOP (GADD 153) 30 kDa	Santa Cruz Sc-166682	3% leite em TBS-T 0,05%; 1h T. A.	1% BSA em TBS-T 0,05%, 1:500 overnight 4°C	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05%	1% BSA em TBS-T 0,05%, anti-mouse 1:6000; 1h TA.	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,1% + 1 x com TBS
Rab1 24 kDa	Santa Cruz Sc-311	5% BSA em TBS- T 0,05%; 1h TA	TBS-T 0,05% 1:500 overnight 4°C	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05%	1% BSA em TBS-T 0,05%, anti-rabbit 1:10.000; 1h T.A.	3 x de 5 minutos com TBS-T 0,05% + 1 x com TBS

BIOGRAFIA

Jáina Araújo Reis

Nome usado em citações: REIS, J. A.; ARAUJO, J. S.

Filiação: Zenila Santos de Araújo e José Pereira de Araújo

Nascimento: 23/05/1994; Santa Luzia do Paruá, Maranhão, Brasil.

Email: jaina.a.reis@ib.usp.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

2017 - 2020

Mestrado em andamento em Ciências Biológicas (Genética) (Conceito CAPES 5).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Distribuição celular e função da proteína C9ORF72 em modelos celulares de Esclerose Lateral Amiotrófica. Orientadora: Prof^a. Dr^a Merari de Fátima Ramires Ferrari.

Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2013 - 2016

Graduação em Ciências Biológicas (bacharelado).

Centro Universitário Adventista de São Paulo, UNASP, Brasil.

Título: Caracterização Morfohistoquímica da Pele de Robalo Flecha (*Centropomus undecimalis*). Orientador: Prof^o. Dr. Antenor Aguiar Santos.

2013 - 2016

Graduação em Ciências Biológicas (licenciatura).

Centro Universitário Adventista de São Paulo, UNASP, Brasil.

Título: Análise da produção argumentativa com uso de jogo didático investigativo em uma aula de biologia. Orientador: Prof^o. Ms. Enios Carlos Duarte.

Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

2018 - Monitora do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) na disciplina de Fundamentos de Biologia Molecular BIO0205, para alunos de graduação em Ciências Biológicas. Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo USP- São Paulo, Brasil.

Outros cursos:

2019 - 2019

Técnicas básicas de Microscopia eletrônica de varredura (MEV). (Carga horária: 10h). Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Brasil.

2018 - 2018

Extensão universitária em Uso de Animais em experimentação. (Carga horária: 10h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2018 - 2018

Docência no Ensino Superior: uma primeira aproximação. (Carga horária: 8h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2017 - 2017

Extensão universitária em Parkinson e Alzheimer: determinantes moleculares e
celulares.(Cargahorária:16h).Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo, IB/USP, Brasil.

2016 - 2016

Aplicação das técnicas de PCR e eletroforese na pesquisa com DNA. (Carga horária: 5h).

Centro Universitário Adventista de São Paulo, UNASP, Brasil.

2015 - 2015

Jogos didáticos no ensino de Ciências Biológicas. (Carga horária: 6h). Centro Universitário Adventista de São Paulo, UNASP, Brasil.

APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS:

- REIS, J. A.; FERRARI, M. F. R. The presence of mutant hSOD1 leads to nuclear translocation of the C9orf72 protein. In: XIII Reunião Regional da FeSBE, Belém-PA, 2019.
- REIS, J. A.; FERRARI, M. F. R. Cellular distribution and colocalization of C9orf72 with RAB7 protein in a neurodegeneration model. In: XIX Congress of The Brazilian Society for Cell Biology, São Paulo, 2018.
- **3. ARAUJO, J. S.**; MARQUES, R. M.; SANTOS, A. A. Caracterização morfohistoquímica da pele de robalo flecha (Centropomus undecimalis). In: XVIII Encontro Anual de Iniciação Científica (ENAIC), UNASP SP, São Paulo, 2016.

4. ARAUJO, J. S.; MARQUES, R. M. ; DUARTE, E. C. . Análise da produção argumentativa com uso de jogo didático investigativo em uma aula de Biologia. In: Encontro de Ensino de Ciências por Investigação, 2017.

PRÊMIOS:

2016

Excelência Acadêmica, Encontro Anual de Iniciação Científica (ENAIC), UNASP SP.

ARTIGOS EM ELABORAÇÃO

Artigo intitulado: **"Structure and function of C9ORF72: what is known".** Autoria de: Jáina Araújo Reis e Merari F. R. Ferrari.